

Aus der Klinik für Anaesthesiologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor : Prof. Dr. med. Bernhard Zwißler

**Bestimmung von Glykokalyxbestandteilen und
atrialem natriuretischen Peptid bei
koronarchirurgischen Patienten**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Lisa Caroline Schwartz
aus
Ludwigshafen am Rhein
2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter : Priv. Doz. Dr. med. Dirk Brügger

Mitberichterstatter : Prof. Dr. Thomas Koeppel
Prof. Dr. Klaus Wenke
Prof. Dr. Peter Überfuhr

Dekan : Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACP, FRCP

Tag der mündlichen Prüfung : 02.10.2014

Für meine Eltern
in Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	4
Tabellenverzeichnis	5
1 Einleitung	6
1.1 Die endotheliale Glykokalyx	6
1.1.1 Historie	6
1.1.2 Aufbau der endothelialen Glykokalyx	8
1.1.3 Physiologische Bedeutung der endothelialen Glykokalyx	11
1.1.4 Shedding der endothelialen Glykokalyx	16
1.2 Natriuretische Peptide	17
1.3 Die koronare Bypassoperation	19
1.4 Fragestellung	20
2 Material und Methoden	22
2.1 Votum der Ethikkommission	22
2.2 Studiendesign	22
2.2.1 Ein- und Ausschlusskriterien	22
2.2.2 Messzeitpunkte	23
2.3 Operationscharakteristika	25
2.3.1 Infusions- und Transfusionsregime	25
2.3.2 Operation mit extrakorporaler Zirkulation (HLM-Methode)	25
2.3.3 Operation am schlagenden Herzen (OPCAB-Methode)	28

2.4 Bestimmung von Glykokalyxbestandteilen	30
2.4.1 Bestimmung von Hyaluron	30
2.4.2 Bestimmung von Syndecan-1	31
2.4.3 Bestimmung von Heparansulfat	31

2.5 Bestimmung von Zytokinen	32
-------------------------------------	-----------

2.6 Bestimmung von atrialem natriuretischen Peptid	33
---	-----------

2.7 Statistik	33
----------------------	-----------

3 Ergebnisse **34**

3.1 Demographische Daten und Operationscharakteristika	34
---	-----------

3.2 Volumensubstitution und Bilanzierung	35
---	-----------

3.3 Bestimmung der Glykokalyxbestandteile	36
--	-----------

3.4 Bestimmung der Zytokine	39
------------------------------------	-----------

3.4 Bestimmung von atrialem natriuretischen Peptid	41
---	-----------

4 Diskussion **43**

4.1 Zusammenfassung	43
----------------------------	-----------

4.2 Potentielle Auslöser eines Glykokalyxsheddings	43
---	-----------

4.2.1 Ischämie/Reperfusion	44
----------------------------	----

4.2.2 Inflammatorische Zytokine	45
---------------------------------	----

4.2.3 Atriales natriuretisches Peptid	45
---------------------------------------	----

4.3 Zeitliche Korrelation zwischen Glykokalyxshedding, inflammatorischen Zytokinen

und atrialem natriuretischem Peptid	46
--	-----------

4.4 Möglicher Mechanismus eines ANP-induzierten Glykokalyxsheddings	49
--	-----------

4.5 Klinische Relevanz	51
-------------------------------	-----------

5 Zusammenfassung **53**

6 Literaturverzeichnis	55
7 Anhang	64
7.1 Patienteneinwilligung	64
7.2 Publikation	66
8 Danksagung	67

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Elektronenmikroskopische Darstellung der endothelialen Glykokalyx	7
Abbildung 2:	Schematische Darstellung der Starling-Gleichung	13
Abbildung 3:	Schematische Darstellung des Glykokalyxsheddings	15
Abbildung 4:	Struktur der natriuretischen Peptide	18
Abbildung 5:	Schematische Darstellung der Messzeitpunkte	24
Abbildung 6:	Die Herz-Lungen-Maschine	26
Abbildung 7:	Offener Situs während der Operation mit Herz-Lungen-Maschine	28
Abbildung 8:	Offener Situs während der Operation ohne Herz-Lungen-Maschine	29
Abbildung 9:	Konzentrationen der Glykokalyxbestandteile	37
Abbildung 10:	Konzentrationen der Zytokine	40
Abbildung 11:	Konzentrationen des atrialen natriuretischen Peptids	42
Abbildung 12:	Konzentrationen der Glykokalyxbestanteile, des atrialen natriuretischen Peptids und der Zytokine zum Zeitpunkt T2	48
Abbildung 13:	Signalkaskade des atrialen natriuretischen Peptids	49

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Demographische Daten und Operationscharakteristika	34
Tabelle 2: Einfuhr, Ausfuhr und Gesamtbilanz	35
Tabelle 3: Basalwerte der Glykokalyxbestandteile	36
Tabelle 4: Basalwerte der Zytokine	39
Tabelle 5: Basalwerte des atrialen natriuretischen Peptids	41

1 Einleitung

1.1 Die endotheliale Glykokalyx

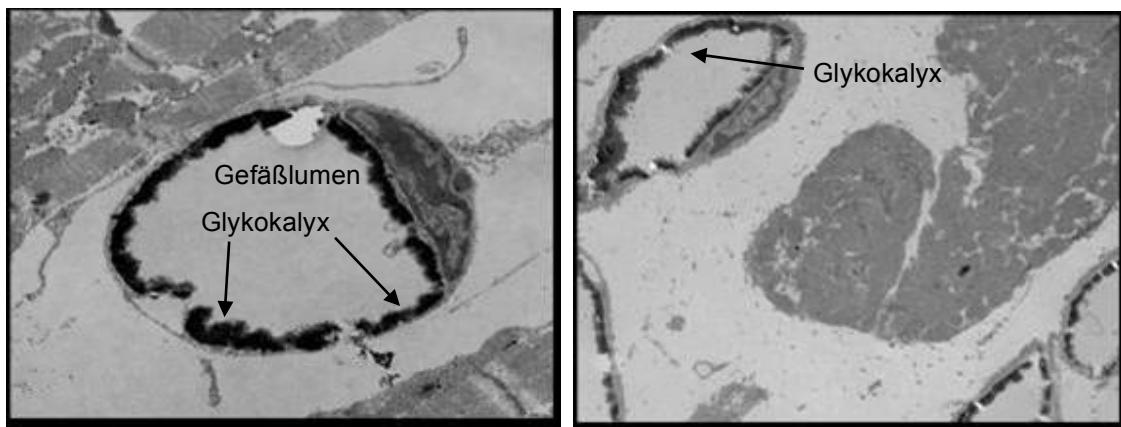
1.1.1 Historie

Bereits seit den vierziger Jahren des 20. Jahrhunderts ist bekannt, dass Gefäßwände mit einer an den Endothelzellen haftenden Schicht membrangebundener Substanzen ausgekleidet sind [12, 23]. Mit Hilfe elektronenmikroskopischer Aufnahmen konnte diese Schicht erstmals 1966 dargestellt werden [47]. Diese als „endotheliale Glykokalyx“ bezeichnete Schicht wurde mit einer Dicke von nur 20 nm dargestellt. Damit erschien zu diesem Zeitpunkt eine relevante physiologische Bedeutung für die Mikrozirkulation ausgeschlossen.

Mittlerweile ist bekannt, dass die äußerst fragile Struktur der endothelialen Glykokalyx bei herkömmlicher Gewebefixierung schon vor Durchführung der Elektronenmikroskopie größtenteils zerstört wird. Erst mit Hilfe weiterer intravitalmikroskopischer Studien konnte gezeigt werden, dass diese Schicht wesentlich dicker als bisher angenommen ist [26, 58, 75]. Mittels konfokaler Lasermikroskopie gelang sogar eine Darstellung mit einer Dicke von 4 µm [4].

Unserer Arbeitsgruppe ist es in Zusammenarbeit mit der Anatomischen Anstalt der Ludwig-Maximilians-Universität München mit Hilfe eines speziell entwickelten und besonders gewebeschonenden Fixierungsverfahrens gelungen, die Glykokalyx in elektronenmikroskopischer Bildgebung mit einer Dicke von ca. 0,5 µm darzustellen (Abbildung 1) [9].

Abbildung 1



Elektronenmikroskopische Aufnahmen der endothelialen Glykokalyx im isoliert perfundierten Meerschweinchenherzen nach spezieller Anfärbung auf Lanthanbasis. Auf der luminalen Seite des Gefäßes ist eine intakte Glykokalyx zu erkennen [9].

Das Interesse an der pathophysiologischen Bedeutung der endothelialen Glykokalyx wuchs Ende der siebziger Jahre mit der Entdeckung eines im Vergleich zum Gesamtblut geringeren Hämatokrits in den Kapillaren. Zunächst galt der Fahraeus-Lindquist-Effekt als Erklärung für dieses Phänomen [29]. Die Abnahme der Viskosität des Blutes und der damit geringere Hämatokrit in Kapillaren wurde von Fahraeus dadurch erklärt, dass sich die Erythrozyten in der Mitte des Blutstroms aufgrund geringerer Scherkräfte schneller bewegen, wodurch eine vermehrte Verschiebung dorthin bewirkt wird (Axialmigration). Dadurch kommt es nach Fahraeus zur Entstehung einer zellarmen Gleitschicht in der Randzone des Gefäßes, die die Fortbewegung der Flüssigkeit im Zentrum des Gefäßes beschleunigt. Dieser Effekt stand im Einklang mit der intravitalmikroskopischen Beobachtung, dass Erythrozyten selbst in den kleinsten Gefäßen nie die Endothelschicht berühren [29].

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass durch eine Zerstörung der zellarmen Gleitschicht mittels Heparinase, einem Enzym, das selektiv Bestandteile der endothelialen Glykokalyx entfernt, der kapilläre Hämatokrit ansteigt und sich dem Gesamthämatokrit des Blutes angleicht [18, 26]. Hierdurch wurde der Fahraeus-Lindquist-Effekt als Erklärung für den geringeren kapillären Hämatokrit

nachhaltig in Frage gestellt. Vielmehr lieferte die Präsenz einer endothelialen Glykokalyx eine schlüssige Erklärung für den beobachteten Effekt.

1.1.2 Aufbau der endothelialen Glykokalyx

Ein gesundes vaskuläres Endothel ist extrazellulär mit einer Vielfalt membrangebundener Moleküle ausgekleidet, welche zusammen die sogenannte Glykokalyx bilden. Deren Hauptbestandteile sind Proteoglykane und Glykoproteine [53].

Proteoglykane

Proteoglykane sind durch lange Seitenketten (bis zu 200 Zuckermoleküle, ca. 80 nm lang und unverzweigt) gekennzeichnet. Sie werden allgemein als die wichtigsten Bestandteile des Grundgerüstes der Glykokalyx bezeichnet und bestehen aus einem Kernprotein, an dem eine oder mehrere Glykosaminoglykanketten gebunden sind [62]. Es gibt eine große Vielfalt unterschiedlich großer Kernproteine, der gebundenen Glykosaminoglykanketten und ihrer Verankerung an der Zellmembran. Die wichtigsten Proteoglykane sind Syndecane und Glypicane, beide fest mit der Zellmembran durch eine membranumspannende Kette oder einen Glycosylphosphatidylinositol-Anker verbunden [62]. An diese Kernproteine binden vier verschiedene Arten von Glykosaminoglykanketten [62]:

- Heparansulfate
- Chondroitinsulfate
- Dermatansulfate
- Keratansulfate

Es handelt sich um Disaccharidpolymere variabler Länge, die durch Sulfonierung und Acetylierung zu unterschiedlicher Ausprägung modifiziert werden. Heparansulfate sind im Gefäßsystem mit ca. 50-90 % die größte Gruppe der Glykosaminoglykane [37, 57]. Ein weiteres wichtiges Glykosaminoglykan ist Hyaluron, das sich von den anderen Glykosaminoglykanen darin unterscheidet,

dass es nicht als Kette an ein Kernprotein gebunden ist. Vermutlich besteht eine feste Bindung über den CD44-Rezeptor an die Hyaluronsynthase an der zytosolischen Seite der Zellmembran [76]. Heparansulfate und Chondroitinsulfate werden im endoplasmatischen Retikulum der Endothelzelle produziert. Nach Kettenpolymerisation durchläuft das Glykosaminoglykan im Golgiapparat weitere Modifikationen wie N-Sulfatierung, O-Sulfatierung und Epimerisation. Im Gegensatz dazu wird Hyaluron direkt an der zytosolischen Seite der Zellmembran produziert und danach nicht weiter modifiziert, so dass es keine Sulfatgruppen oder andere Modifikationsmuster besitzt [62].

Da die Glykosaminoglykanketten eine Vielzahl an spezifischen Bindungen für Plasmaproteine besitzen, können kleinste Veränderungen der Ketten zu großen funktionellen Konsequenzen führen. Durch viele verschiedene Sulfatierungsmuster eines Disaccharids kommt es zu einer strukturellen Vielfalt und damit zu verschiedenartigen biologischen Funktionen [62].

In dieses Geflecht sind *in vivo* Plasmaproteine und lösliche Moleküle eingebunden und bilden so den „Endothelial Surface Layer“ (ESL) mit einer Dicke von bis zu 1,0 µm. Der ESL ist die physiologische Wirkungsform der Glykokalyx.

Ein dynamisches Gleichgewicht zwischen dieser Schicht und dem fließenden Blut sorgt für eine ständige Änderung ihrer Dicke und Zusammensetzung [57]. Durch enzymatischen und durch Abscherung verursachten Abbau, das sogenannte Shedding, entsteht ein fortwährendes Äquilibrium aus Biosynthese und Lyse [50].

Glykoproteine

Neben den Proteoglykanen mit ihren langen linearen Seitenketten werden auch Glykoproteine als ein wichtiger Bestandteil des sogenannten Rückgrats der Glykokalyx betrachtet, die diese mit der Zellmembran verbinden. Diese Gruppe endothelialer Glykoproteine ist durch kurze, verzweigte Kohlenhydratseitenketten charakterisiert.

Bekannte Klassen der endothelialen Glykoproteine sind Zelladhäsionsmoleküle und Bestandteile des Blutgerinnungs- und Fibrinolysesystems. Folgende Zelladhäsionsmoleküle sind in der endothelialen Glykokalyx repräsentiert [62]:

- Selektine
- Integrine
- Immunglobuline

Bei den Glykoproteinen der Selektinfamilie, die auf der vaskulären Endotheloberfläche identifiziert wurden, handelt es sich um E-Selektine und P-Selektine. Diese werden mit Leukozyten-Endothel-Interaktionen in Verbindung gebracht [66]. P-Selektine werden im Weibel-Palade-Körper der Endothelzelle synthetisiert und nach Stimulation durch unter anderem Thrombin und Histamin durch Exozytose an die Zelloberfläche transportiert [27]. E-Selektine werden durch Stimulation der Endothelzelle durch Zytokine, wie z.B. Interleukin-1 und Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), vermehrt synthetisiert und an der Zelloberfläche präsentiert [41].

Integrine werden in einer Vielzahl von Zellen gefunden, z.B. in Thrombozyten, Leukozyten und Endothelzellen. Sie gelten als ein wichtiger Mediator von Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen [8]. Zudem binden sie an extrazelluläre Matrix und sind hierdurch verantwortlich für Interaktionen mit Fibronectin, Laminin oder Kollagen.

Die bekanntesten Glykoproteine der Immunglobulin-Superfamilie sind Intercellular Adhesion Molecule 1 und 2 (ICAM-1 und -2), Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1) und Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule 1 (PECAM-1), welche als Liganden für Integrine auf Leukozyten und Thrombozyten fungieren und so zu Mediatoren der Diapedese werden [51].

Neben den Glykoproteinen mit Zelladhäsionsfunktion enthält die Glykokalyx weitere Glykoproteine, die eine Rolle bei der Blutgerinnung, Fibrinolyse und Hämostase spielen. Ein Beispiel hierfür ist der auf Endothelzellen und Thrombozyten präsentierte Glykoproteinkomplex Ib-IX-V, welcher den von Willebrand-Faktor (vWF) bindet und als vWF-Rezeptor gilt [63].

Lösliche Komponenten

In dem Netzwerk von membrangebundenen Glykoproteinen und Proteoglykanen sind lösliche, plasmatische oder endotheliale Proteine und Proteoglykane gebunden, beispielsweise Albumin und Orosomucoid, denen eine wichtige Rolle

bei der Funktion als Permeabilitätsbarriere zwischen Blutstrom und Endothelzelle zukommt [35].

1.1.3 Physiologische Bedeutung der endothelialen Glykokalyx

Aufgrund ihrer Lage zwischen Intravasalraum und Endothelzelle hat die endotheliale Glykokalyx einen großen Einfluss auf viele Interaktionen und spielt eine wichtige Rolle in zahlreichen physiologischen Prozessen.

Endotheliale Permeabilität

Zwischen dem Blutstrom und der endothelialen Oberfläche lokalisiert, fungiert die Glykokalyx als Permeabilitätsbarriere. Bisher war man sich sicher, dass die Starling-Gleichung aus dem Jahr 1896 die vaskuläre Barrierefunktion ausreichend beschreiben würde [68].

$$Q = K_f [(P_c - P_i) - \sigma(\pi_p - \pi_i)]$$

Starling-Gleichung mit Q: filtriertes Flüssigkeitsvolumen; K_f: Filtrationskoeffizient; P_c: hydrostatischer Druck in den Kapillaren; P_i: hydrostatischer Druck im Interstitium; σ: osmotischer Reflexionskoeffizient; π_p: kolloidosmotischer Druck des Plasmas; π_i: kolloidosmotischer Druck des Interstitiums.

Dieses Prinzip erfordert einen ausgeprägten kolloidosmotischen Konzentrationsgradienten zwischen intravasalem Kompartiment (hoher kolloidosmotischer Druck) und extravasalem Kompartiment (niedriger kolloidosmotischer Druck), um Wasser im Gefäßsystem zu binden. Allerdings konnte experimentell mehrfach gezeigt werden, dass die interstitiellen und die intravasalen Proteinkonzentrationen sich nahezu gleichen und die vaskuläre Barriere dennoch funktioniert [9, 38, 61]. Der nach intravasal gerichtete kolloidosmotische Druckgradient würde nach Berechnungen der Starling-Gleichung fast vollständig wegfallen und in einer Nettofiltration ins Interstitium resultieren, welche die Kapazität des Lymphsystems weit übersteigen würde und

nicht der Realität entspräche [44]. Wie kann man also dieses „*Low-Lymph-Flow-Paradoxon*“ erklären?

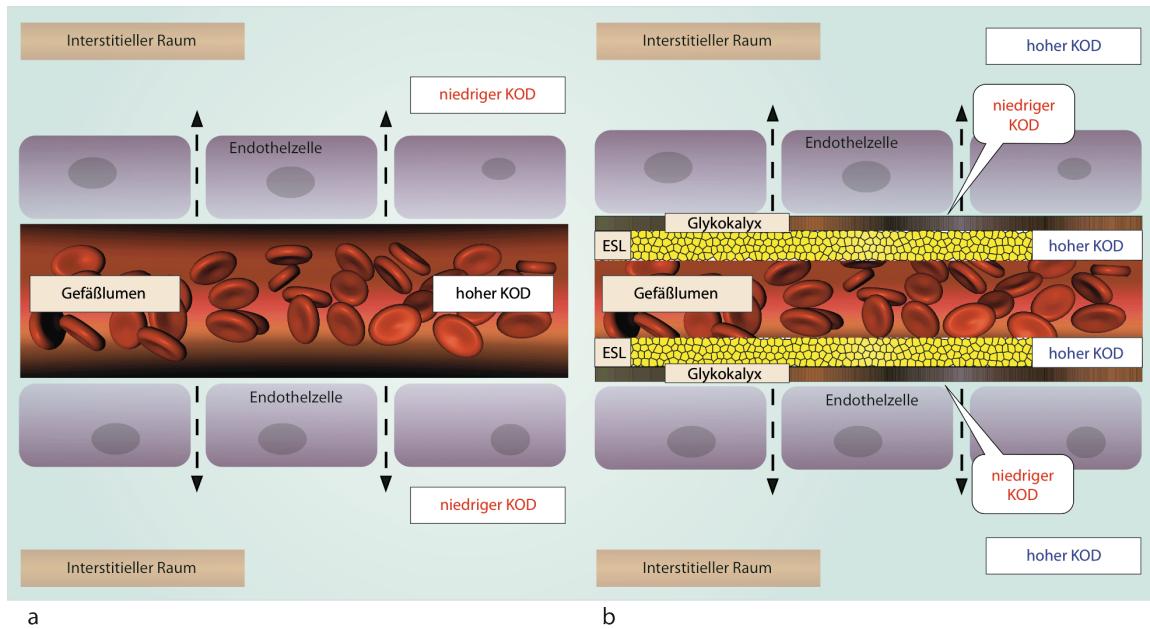
Zur Erklärung stellten Rehm et al. das auf ihren Studien beruhende „*Double-Barrier-Konzept*“ vor, nach dem sich sowohl die Endothelzelle, als auch die endotheliale Glykokalyx dem Auswärtsstrom von Flüssigkeit und Kolloiden aus dem Intravasalraum als eigenständige Barrieren entgegenstellen [61].

Adamson et al. brachten die Starling-Gleichung mit den neuen Erkenntnissen zur Permeabilitätsbarriere in Einklang, indem sie die Glykokalyx als Kolloidfilter identifizierten, der sich immer weiter mit Kolloiden auflädt und den auswärtsströmenden Proteinen entgegenstellt [1]. Sie bezeichneten den kolloidosmotischen Konzentrationsgradienten, der sich zwischen Glykokalyx und der Endothelzelle ausbildet, als Träger der vaskulären Integrität. Der kolloidosmotisch wirksame Gradient bildet sich lediglich in dem schmalen Raum unterhalb der Glykokalyx und der Endothelzelle aus. Die revidierte Starling-Gleichung erklärt, warum es bei gleichen kolloidosmotischen Druckverhältnissen in den beiden Kompartimenten Gefäßlumen und Interstitium nicht zu einem Zusammenbruch der Permeabilitätsbarriere kommt [40].

Jakob et al. beobachteten, dass erst eine mit bestimmten Kolloiden beladene endotheliale Glykokalyx in der Lage ist, die Barrierefunktion gegen eine Extravasation zu übernehmen [38]. Vor allem Albumin scheint hierbei eine tragende Rolle einzunehmen [40].

Ein permanenter hydrostatischer Druck erzeugt einen Auswärtsstrom an Plasma. Durch den Plasmafilter der Glykokalyx wird dieser Auswärtsstrom weitgehend von Proteinen befreit und die Glykokalyx zum ESL aufgeladen. Der schmale Spalt unter der Glykokalyx bleibt so von Proteinen befreit und baut den Konzentrationsgradienten zur kolloidosmotisch dichten Endothelzelle auf. Sie verhindert durch ihr Maschenwerk an Glykoproteinen und Proteoglykanen den Auswärtsstrom von Molekülen in den Extravasalraum [39, 40]. Diese modifizierte Starling-Gleichung ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt.

Abbildung 2



a Bisher gültige Starling-Gleichung mit einem hohen intravasalen kolloidosmotischen Druck und einem niedrigen kolloidosmotischen Druck im interstitiellen Raum.

b Modifizierte Starling-Gleichung mit der endothelialen Glykokalyx als Kolloidfilter. Es entsteht ein schmaler kolloidarmer Raum zwischen Endothelzelle und Intravasalraum, der einen Auswärtsstrom von Proteinen aus dem Gefäß in das Gewebe verhindert.

KOD: Kolloidosmotischer Druck; ESL: Endothelial Surface Layer. Modifiziert nach Chappell et al. [15].

Zellinteraktionen

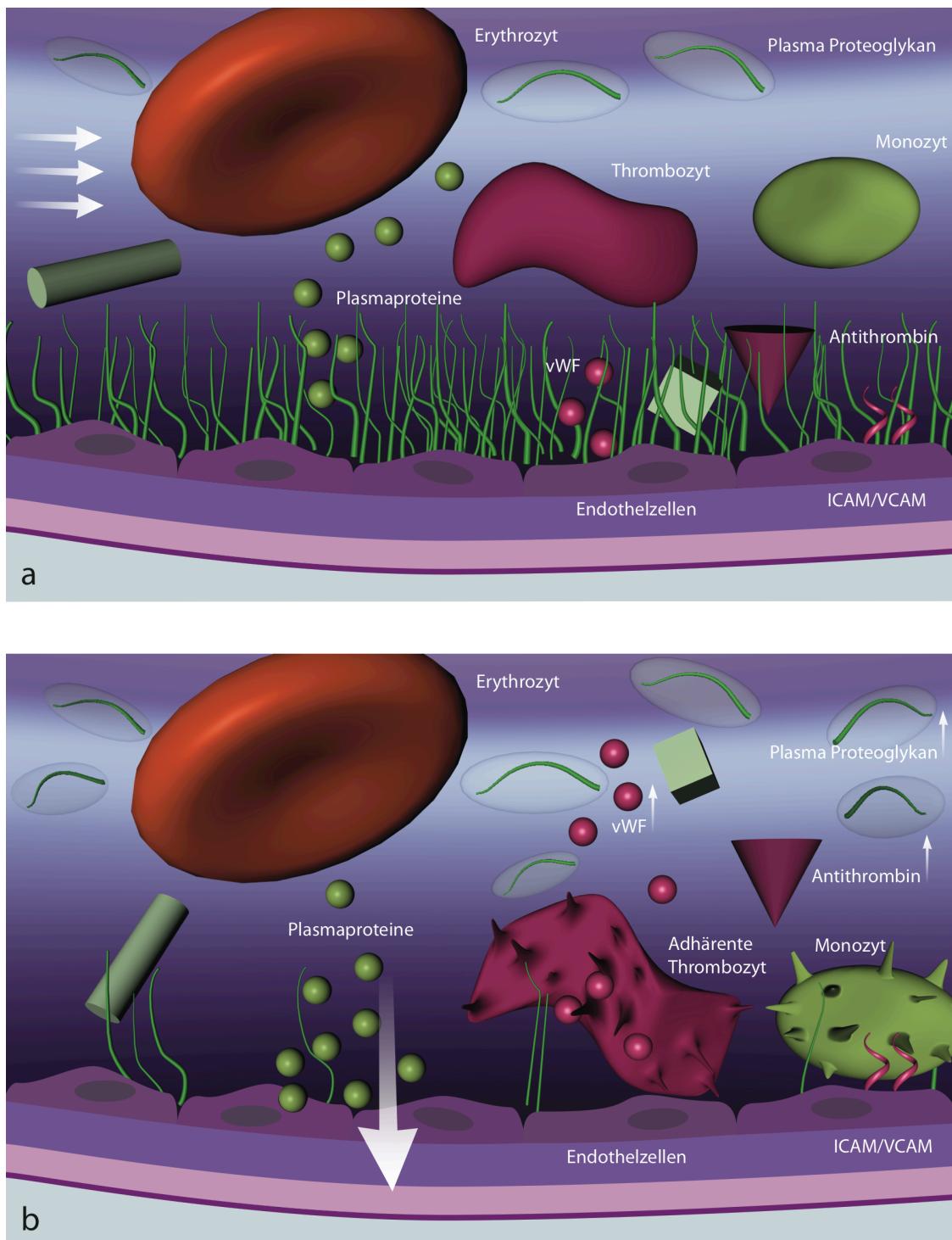
Neben der Erhaltung eines kolloidosmotischen Gradienten und der daraus resultierenden Permeabilitätsbarriere zwischen Blutstrom und Interstitium beeinflusst die Glykokalyx auch die Interaktionen zwischen Blutzellen und Gefäßwand. Eine dicke endothiale Glykokalyx schützt die Endotheloberfläche wie eine Art Schutzbeschichtung. Wird diese zerstört, kommt es zu Interaktionen der im Blut befindlichen Zellen und Proteine mit der Gefäßwand (Abbildung 3). Es konnte ein Einfluss der endothelialen Glykokalyx in der Thrombozyten- und Leukozytenadhäsion nachgewiesen werden [74]. So wurde in

intravitalmikroskopischen Beobachtungen gezeigt, dass es bei einem Glykokalyx-Shedding zu einem deutlichen Anstieg der Thrombozytenaggregation in den Kapillaren kommt [74]. Die Rolle der Glykokalyx bei Leukozyten-Gefäßwand-Interaktionen scheint zwiespältig. Zum einen enthält die Glykokalyx Adhäsionsmoleküle wie P-Selektine, ICAM-1 und VCAM-1, die ein Anlagern der Blutzellen an das Endothel ermöglichen. Auf der anderen Seite verhindert sie die Interaktion mit den im Blutstrom enthaltenen Leukozyten, in dem sie deren Rezeptoren zwischen ihrem Maschenwerk an Proteoglykanen und Glykoproteinen verbirgt. Durch die Abtragung der endothelialen Glykokalyx kommt es zu einem Freilegen der Rezeptoren (Abbildung 3). Es resultiert das sogenannte Leukozytenrollen und eine Adhäsion der Zellen an das Endothel [21].

Blutgerinnung und Fibrinolytisches System

Auch die vasoprotektive Rolle der Glykokalyx wird durch die Bindung von plasmatischen Molekülen und gerinnungshemmenden Mediatoren, wie Antithrombin III, Heparin Cofaktor II, Thrombomodulin und Tissue-factor-pathway-inhibitor (TFPI) unterstrichen. Antithrombin III ist einer der wichtigsten natürlichen Hemmstoffe der Blutgerinnung. Es hemmt die Serinproteasen der plasmatischen Gerinnung, baut Thrombin proteolytisch ab und aktiviert an den Endothelzellen die Synthese des t-PA (Plasminogenaktivator vom Gewebetyp). Es bindet an Heparansulfate der Glykokalyx und verstärkt so seine Wirkung durch Hemmung prokoagulatorischer Enzyme wie Thrombin oder weitere Faktoren der Gerinnungskaskade (Faktoren XII, XI, IX, X, II) [59]. Zudem schützt Antithrombin III vor enzymatischem Abbau der endothelialen Glykokalyx durch TNF- α und verhindert so eine steigende Gefäßpermeabilität [14]. Der durch Glykosaminoglykane der Glykokalyx aktivierte Heparin-Cofaktor II inaktiviert Thrombin, eine prokoagulatorische Protease, und unterbricht die Blutgerinnungskaskade [72]. Auf der anderen Seite konnte nachgewiesen werden, dass Thrombin und Wachstumsfaktoren zu einem Shedding von Syndecan-1 führen und bei induziertem entzündlichen Geschehen die Expression der Syndecan-1 mRNA durch TNF- α unterdrückt wird [42, 69].

Abbildung 3



a Intakte Glykokalyx: Rezeptoren, wie VCAM/ICAM und vWF sind in ihrem Maschenwerk verborgen und die Endothelzellen sind vor einer Interaktion mit Plasmaproteinen und Blutzellen geschützt.

b Zerstörte Glykokalyx: Invasion von Blutzellen und Plasmaproteinen.

vWF: von-Willebrand-Faktor; ICAM: Intercellular Adhesion Molecule; VCAM: Vascular Cell Adhesion Molecule. Modifiziert nach Chappell et al. und Nieuwdorp et al. [15, 53].

Ähnliche Mechanismen gelten auch bei der Kontrolle der Fibrinolyse. Gewebespezifischer Plasminogenaktivator, Urokinase und auch Plasminogen selbst binden an die endotheliale Oberfläche. Diese Bindung stimuliert die Konversion des Proenzymes Plasminogen in Plasmin und schützt Plasmin vor der Hemmung durch α_2 -Antiplasmin [46]. Durch diese antikoagulatorischen, antithrombotischen Moleküle, die durch die Glykokalyx gebunden und präsentiert oder aktiviert werden, erhält das gesunde Endothel seine starke thromboresistente Eigenschaft.

1.1.4 Shedding der endothelialen Glykokalyx

In gesunden Gefäßen beeinflusst die endotheliale Glykokalyx die vaskuläre Permeabilität, moduliert Zell-Gefäß-Interaktionen, vermittelt Schubspannung an die Endothelzelle und wirkt vasoprotektiv. Ein Abbau der Glykokalyx (sogenanntes Shedding) kann viele Ursachen haben.

Tierexperimentelle Untersuchungen

Am isoliert perfundierten Meerschweinchenherzen konnte mehrfach ein Abspalten von Glykokalyxbestandteilen von der Endothelmembran nach Ischämie/Reperfusion nachgewiesen werden [11, 16, 38, 61]. Durch warme Ischämie wurde schon nach 15 Minuten eine erhöhte Gefäßpermeabilität gezeigt, die zu einem erheblichen Gewebeödem führte [11]. Die quantitative Bestimmung von Bestandteilen der endothelialen Glykokalyx im koronarvenösen Effluat von Meerschweinchen und eine elektronenmikroskopische Darstellung bestätigten eine fast vollständige Destruktion der endothelialen Glykokalyx nach Ischämie/Reperfusion [11, 16, 38, 61].

Auch die Applikation von Entzündungsmediatoren wie TNF- α oder oxidierten Lipoproteinen führte tierexperimentell zu einer Alteration der Glykokalyx [14, 34, 74].

Ein weiteres Agens, für das ein Shedding der Glykokalyx im Tierexperiment nachgewiesen werden konnte, ist das atriale natriuretische Peptid (ANP). Am isoliert perfundierten Meerschweinchenherzen konnte gezeigt werden, dass die Infusion von ANP zu einem Anstieg der Transsudatbildung (Maß für die

Nettofiltration im gesamten Koronarbett) und zu einer verstärkten Extravasation von Hydroxyethylstärke führt [9]. Die Freisetzung des Glykokalyxbestandteils Syndecan-1 im koronarvenösen Effluat war unter Infusion von ANP deutlich erhöht. Die ANP-bedingte Zerstörung der Glykokalyx konnte histologisch mittels Elektronenmikroskopie verifiziert werden [9].

Untersuchungen am Menschen

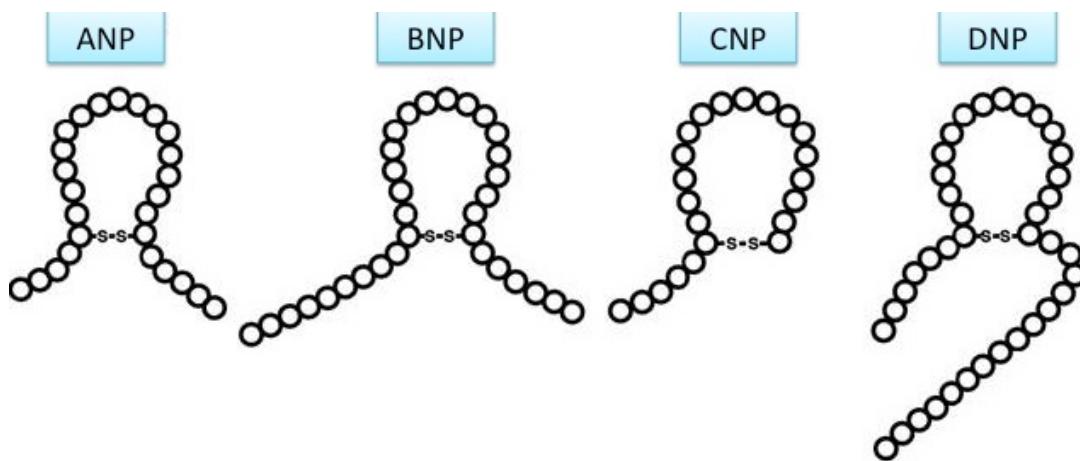
Im Gegensatz zu den tierexperimentellen Untersuchungen ist das Shedding der endothelialen Glykokalyx am Menschen bis heute nur wenig untersucht. Rehm et al. gelang es erstmalig, ein Shedding von Glykokalyxbestandteilen am Menschen nachzuweisen [60]. Bei gefäßchirurgischen Patienten mit globaler oder regionaler Ischämie konnte ein Anstieg der Glykokalyxhauptbestandteile Syndecan-1 und Heparansulfat im Plasma nach der Reperfusion festgestellt werden. Die Arbeitsgruppe fand zudem heraus, dass die intraoperative Zerstörung der Glykokalyx mit dem Ausmaß und der Dauer der Ischämie korreliert [60].

1.2 Natriuretische Peptide

Übersicht

Die natriuretischen Peptide sind Hormone, die bei Druck- oder Volumenbelastung des kardiovaskulären Systems von Muskelzellen des Vorhof- oder des Ventrikelmyokards ausgeschüttet werden. Als Entdecker des ANP gilt de Bold, dem es 1982 gelang, das Hormon zu isolieren und seine Struktur 1984 zu identifizieren [25]. Wenig später wurden weitere Hormone der gleichen Familie isoliert, zunächst 1988 das brain natriuretic peptide (BNP) im Schweinehirn, 1990 das C-type natriuretic peptide (CNP) mit ähnlicher natriuretischer und diuretischer Wirkung, und schließlich 1992 das Dendroaspis natriuretic peptide (DNP) [65, 67, 70, 71]. ANP repräsentiert zusammen mit dem BNP und dem CNP eine Familie strukturverwandter Peptide. Gemeinsam ist ihnen eine aus 17 Aminosäureresten bestehende Ringstruktur (Abbildung 4) [5].

Abbildung 4



Struktur der natriuretischen Peptide: Die für die rezeptorvermittelte Wirkung entscheidende Ringstruktur besteht aus 17 Aminosäuren.

ANP: Atriales natriuretisches Peptid; BNP: Brain natriuretic Peptide; CNP: C-Typ natriuretic Peptide; DNP: Dendroaspis natriuretic peptide. Modifiziert nach Baxter [5].

Wirkung, Synthese und Sekretion des atrialen natriuretischen Peptids

Das ANP hat bis heute eine noch nicht vollständig untersuchte und verstandene Rolle in der Regulation der kardiovaskulären Homöostase. Neben den gut erforschten diuretischen und natriuretischen Effekten wirkt es auch als ein Modulator der mikrovaskulären Permeabilität. Mehrere Studien konnten einen Anstieg der kapillaren Permeabilität für Wasser und Makromoleküle durch ANP nachweisen [9, 33, 36]. Dennoch blieb der genaue Mechanismus ungeklärt. Die essentielle Rolle des ANP in der kardiovaskulären Homöostase wurde anhand verschiedener Gen-Maus-Modelle beobachtet. Sabrane et. al zeigten in ihrer Studie, in welchem Ausmaß und durch welche Mechanismen ANP das Plasmavolumen reguliert [64]. In ihrem Modell mit selektiv unterdrücktem Typ-A-Rezeptor für ANP in den Endothelzellen bewiesen sie, dass die direkte Wirkung des ANP auf die Gefäßpermeabilität bedeutender ist als die renale und vasodilatierende Wirkung des ANP. In dem Modell blieben die Mäuse dauerhaft volumenüberladen und hypertensiv [64].

Das ANP-Gen codiert für ein 151 Aminosäuren großes Präpro-Molekül, aus dem durch Abspaltung eines N-terminalen Signalpeptids Pro-ANP wird. Zuletzt wird ANP durch eine Serinprotease vom C-Terminus abgespalten. Außer im Herzen wird ANP auch in Hypothalamus, Thalamus, Nebenniere und Niere synthetisiert. ANP ist auch bei herzgesunden Menschen als Pro-ANP in Granula der atrialen Myozyten vorrätig und kann daher bei Druck- oder Volumenbelastung des Herzens schnell ausgeschüttet werden [5].

Rezeptoren und Signalkaskade

Die Wirkung der natriuretischen Peptide wird über mindestens drei verschiedene Rezeptortypen vermittelt (Typ-A, Typ-B, Typ-C, oder auch Guanylylzyklase-Rezeptor- A, -B und -C) [2]. Der Typ-A-Rezeptor wird in Herz, Kleinhirn, in Niere und Nebenniere, Lunge, Auge, Fettgewebe und Hypophyse exprimiert und bindet vor allem ANP und BNP [5, 24]. Der Typ-B-Rezeptor wird nur in Herz, Kleinhirn, Nebenniere und Hypophyse, der Typ-C-Rezeptor dagegen im Herzen, in Niere und Nebenniere, im sympathischen Nervensystem und in den Gefäßen, sowie in der Hypophyse exprimiert und bindet selektiv CNP [78]. An beiden Rezeptoren bewirkt die Bindung der natriuretischen Peptide eine durch die Guanylylzyklase verursachte Umwandlung von Guanosintriphosphat (GTP) in zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP), wobei die Bindung von ANP eine 10-fach potentere Umwandlung bewirkt [5].

1.3 Die koronare Bypassoperation

Bei der koronaren Bypassoperation werden die Koronarstenosen mittels Gefäßtransplantaten, die distal der Stenosen mit den Koronarien anastomosiert werden, überbrückt. Prinzipiell kann man zwei Gruppen unterscheiden:

Im Regelfall wird die Operation im Herzstillstand mit Herz-Lungen-Maschine (HLM-Methode) in moderater Hypothermie (28-32°C) durchgeführt. Unter bestimmten Voraussetzungen ist aber eine Operation am schlagenden Herzen (sog. Off-pump-coronary-artery-bypass, OPCAB-Methode) ohne Kardioplegie und

externe Oxygenierung durch die Herz-Lungen-Maschine (HLM) möglich [20]. Bei der Verwendung der Herz-Lungen-Maschine (HLM) werden während des Nähens des Bypasses sowohl Herz als auch Lungen nicht perfundiert. Das Blut wird über die Herz-Lungen-Maschine (HLM) oxygeniert. Im Gegensatz dazu kommt es bei der OPCAB-Methode nicht zu einer generellen Ischämie des Herzens und der Lungen.

1.4 Fragestellung

Von besonderem Interesse ist die Frage, durch welche Mechanismen ein Glykokalyxshedding beim Menschen ausgelöst werden kann. Prinzipiell kommen die tierexperimentell untersuchten Noxen wie Ischämie/Reperfusion, Entzündungsmediatoren oder das ANP in Frage. Für die Untersuchung der Ischämie/Reperfusion bieten sich Patienten, die sich einem koronarchirurgischen Eingriff unterziehen müssen, in besonderem Maße an. Diese Patienten können entweder am schlagenden Herzen mittels der so genannten OPCAB-Methode (ohne globale Ischämie von Herz und Lungen) oder unter Verwendung der HLM-Methode (mit Ischämie/Reperfusion von Herz und Lungen) operiert werden.

Überraschenderweise kam es bei bisherigen Untersuchungen sowohl in der Gruppe der Patienten, die mit der OPCAB-Methode operiert wurden, als auch bei Patienten, die mittels HLM-Methode operiert wurden, zu einem vergleichbaren systemischen Anstieg der Glykokalyxbestandteile Syndecan-1 und Heparansulfat [10]. Ischämie/Reperfusion scheint also nicht der alleinige Trigger eines Glykokalyxsheddings zu sein. Konkret sollten folgende Fragen geklärt werden:

1. Kommt es im Rahmen von koronarchirurgischen Operationen zu einer Freisetzung von Glykokalyxbestandteilen (Heparansulfat, Syndecan-1 und Hyaluron) und können diese im Plasma der Patienten bestimmt werden?

2. Sind mögliche Alterationen der endothelialen Glykokalyx abhängig von der verwendeten Operationstechnik (OPCAB-Methode vs. HLM-Methode)?
3. In welchem Ausmaß kommt es durch die Operation zu einer Freisetzung von ANP?
4. Liegen andere mögliche Auslöser für ein Glykokalyxshedding (Interleukin-6, Interleukin-8, Interleukin-10) vor?
5. Ist die Freisetzung möglicher Auslöser für ein Glykokalyxshedding abhängig von der verwendeten Operationstechnik (OPCAB-Methode vs. HLM-Methode)?
6. Gibt es eine Korrelation zwischen möglichen Auslösern für ein Glykokalyxshedding und den Glykokalyxbestandteilen?

2 Material und Methoden

2.1 Votum der Ethikkommission

Für die vorliegende Studie wurde im Vorfeld ein Antrag zur Durchführung einer klinischen Studie, gemäß den „Richtlinien zum Antrag an die Ethikkommission bei Forschungsvorhaben am Menschen“ vom Mai 1994, bei der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München eingereicht und genehmigt (Projekt-Nummer 226-09). Sie folgt den Richtlinien der „Good Clinical Practice“ (WHO) und der Deklaration von Helsinki mit ihren Novellierungen (Tokio 1975, Hong Kong 1989 und Somerset West 1996).

2.2 Studiendesign

2.2.1 Ein- und Ausschlusskriterien

Alle Patienten mussten bestimmte Kriterien erfüllen, um präoperativ als mögliche Studienteilnehmer ausgewählt zu werden.

Einschlusskriterien:

- elektive koronare Mehrfachbypassoperation ohne weitere herzchirurgische Interventionen
- Alter über 18 Jahre

Ausschlusskriterien:

- Notfalloperation
- ASA-Klasse V (Klassifikation des Anästhesierisikos gemäß der „American Society of Anesthesiologists“)
- maligne Tumorerkrankung
- Zeichen einer akuten Infektion

Ein Abbruchkriterium beim einzelnen Patienten war die Konversion zu einer anderen Operationsmethode (z.B. intraoperativer Umstieg von OPCAB-Methode auf HLM-Methode).

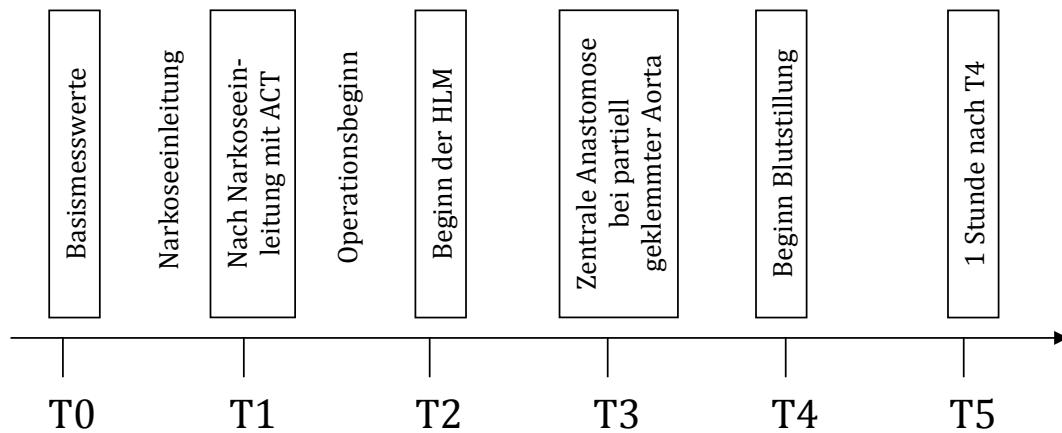
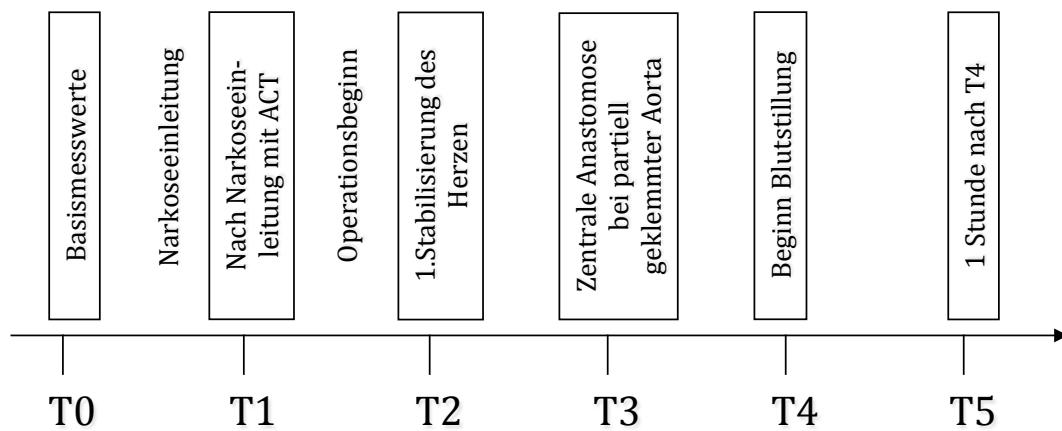
2.2.2 Messzeitpunkte

Bei den Patienten wurden zu folgenden Zeitpunkten Blutentnahmen aus einer bereits liegenden arteriellen Kanüle vorgenommen (Abbildung 5):

- T0 : vor Narkoseeinleitung mit Abnahme der Blutgasanalyse
- T1 : nach Narkoseeinleitung mit Bestimmung der „activated clotting time“ (ACT)
- T2 : zu Beginn der HLM-Phase (HLM-Methode) / bzw. bei der ersten Stabilisierung des Herzens (OPCAB-Methode)
- T3 : beim Nähen der zentralen Anastomose, nach Öffnen der Aortenklemme
- T4 : zu Beginn der Blutstillung
- T5 : eine Stunde nach Beginn der Blutstillung oder während der Hautnaht

Dabei wurden pro Messzeitpunkt Serum für die Glykokalyxbestandteile (Syndecan-1, Heparansulfat und Hyaluron) und die Zytokine (Interleukin-6, -8 und -10) und Plasma für das ANP abgenommen.

Abbildung 5

HLM-Methode**OPCAB-Methode**

Schematische Darstellung der Messzeitpunkte T0-T5 der HLM- und der OPCAB-Methode.

ACT: activated clotting time; HLM: Herz-Lungen-Maschine.

2.3 Operationscharakteristika

2.3.1 Infusions- und Transfusionsregime

Die Flüssigkeits- und Volumentherapie wurde intraoperativ vom zuständigen Anästhesisten durchgeführt und durch die Studie nicht beeinflusst. Dabei richtete er sich nach den klinischen Kriterien Blutdruck, Herzfrequenz, zentralvenösem Druck (ZVD) und Urinausscheidung. Dafür wurden, je nach Entscheidung des zuständigen Arztes, kristalloide Lösungen oder kolloidale Plasmaersatzmittel substituiert. Als kristalloide Lösung kam Ringer-Acetat-Lösung zum Einsatz. Als kolloidale Lösung wurde Hydroxyethylstärkelösung (HES 6% 130/0,4) verwendet. Mit einem sogenannten „Cell Saver“ wurde bei allen Patienten eine maschinelle Autotransfusion zur Vermeidung einer Fremdbluttransfusion durchgeführt. Dabei wurde das aus dem Operationsgebiet abgesaugte heparinisierte Blut aufgefangen. Nach Zentrifugation und Waschvorgang konnte das so gewonnene Konzentrat aus Eigenblut dem Patienten wieder rücktransfundiert werden. Eine zusätzliche Fremdbluttransfusion war nicht notwendig.

2.3.2 Operation mit extrakorporaler Zirkulation (HLM-Methode)

Um suffiziente Anastomosen im Bereich der Koronararterien nähen zu können und um Blutverluste aus den eröffneten Gefäßen zu vermeiden, wurden die Patienten der HLM-Methode im Herzstillstand operiert. Dazu wurde die Perfusion des großen Kreislaufes für die Dauer der peripheren Koronaranastomosen von einer HLM übernommen. Um Zugang zum Blutkreislauf zu erhalten, wurden der rechte Vorhof sowie der Aortenbogen kanüliert. Über den Zugang zum rechten Atrium fließt das venöse Blut passiv, der Schwerkraft folgend in das tiefer liegende Reservoir der HLM. Nach der Aufbereitung des Blutes wird dieses über den Zugang zur Aorta wieder aktiv mittels Rollerpumpen an den Patienten zurückgegeben, wodurch eine ständige Durchblutung des großen Kreislaufes aufrechterhalten werden kann. Das Herz sowie die Lungenstrombahn sind für die Dauer der extrakorporalen Zirkulation bei geklemmter Aorta nicht durchblutet.

Bei der für die Operation im Herzstillstand verwendeten HLM handelte es sich um eine Jostra HL30 in Verbindung mit der Heiz-Kühl-Einheit Jostra HCU30 (Maquet AG, Hirrlingen, Deutschland) (Abbildung 6).

Abbildung 6



Die bei den Operationen verwendete Herz-Lungen-Maschine Jostra HL30 in Verbindung mit der Heiz-Kühl-Einheit Jostra HCU30 (Maquet AG, Hirrlingen, Deutschland).

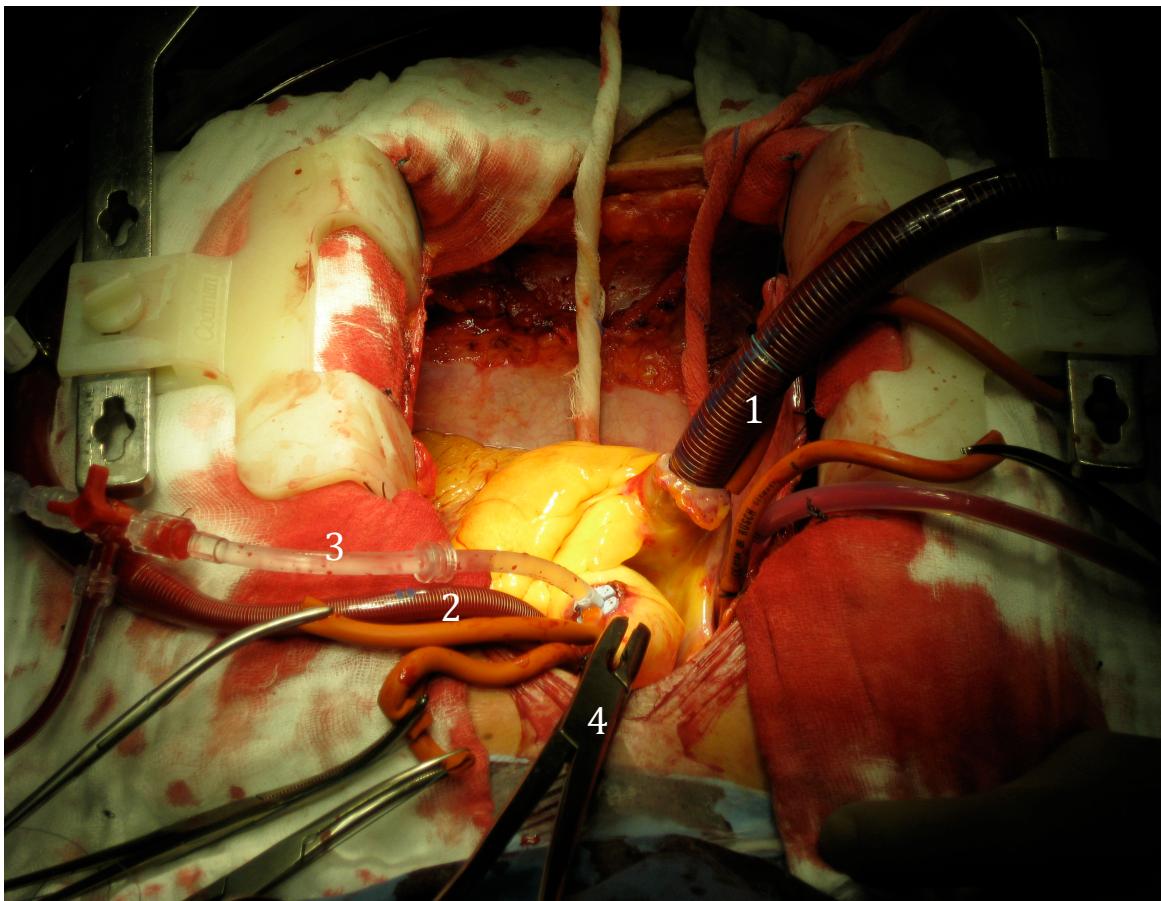
Da die HLM für das durch sie fließende Blut eine große Fremdoberfläche darstellt, wurde vor der Kanülierung der Gefäße ein Bolus von 400 IE/kg Körpergewicht

Heparin zur systemischen Antikoagulation injiziert. Dabei war das Ziel, die „activated clotting time“ (ACT) über 480 Sekunden zu halten, um eine adäquate Heparinisierung zu gewährleisten und Fibrinbildung zu verhindern [53]. Die Patienten wurden auf eine moderate Hypothermie von 32°C gekühlt, wodurch der Sauerstoffbedarf des Gewebes vermindert wird. Bei Erreichen der gewünschten Körperkerntemperatur wurde die Aorta ascendens proximal der Kanülierung komplett abgeklemmt. Über eine weiter proximal davon platzierte Kanüle, den so genannten „needle-vent“, wurden daraufhin 800-1000 ml einer kalten, kaliumreichen Kardioplegeliösung (Brettscheiderlösung) über die Aortenwurzel in die Koronararterien infundiert, um einen reversiblen Herzstillstand auszulösen.

Zusätzlich zur Infusion der kalten Lösung in die Koronarien wurde das Myokard durch direktes Übergießen mit kalter Elektrolytlösung abgekühlt, um die Ischämietoleranz der Zellen weiter zu verbessern [19, 55]. Während des kardiopulmonalen Bypasses wurde ein arterieller Mitteldruck (MAP) von 60-70 mmHg angestrebt. Auch die Narkosegaszufuhr erfolgte in dieser Zeit über die HLM. Eventuell auftretende größere Abfälle des Blut-pH-Wertes wurden durch Natriumhydrogencarbonat ausgeglichen. Nach dem Nähen der peripheren Anastomosen wurde mit der Wiedererwärmung des Patienten begonnen. Nachdem die Herzkammern, die Koronartransplantate sowie die Aortenwurzel entlüftet waren, wurde die Aortenklemme wieder geöffnet und das Herz begann zu schlagen. In der nun folgenden Reperfusionsphase wurde die Körperkerntemperatur des Patienten durch den Wärmeaustauscher der HLM langsam wieder auf über 36°C angehoben [43]. Nach dem Nähen der zentralen Anastomosen und nach Erreichen der gewünschten Körperkerntemperatur wurde damit begonnen, das Herz von der extrakorporalen Zirkulation zu entwöhnen, indem das über die HLM laufende Blutvolumen konsekutiv verringert wurde. Nach Beendigung des kardiopulmonalen Bypasses und nach Dekanülierung des Herzens wurde im Verhältnis zum zuvor gegebenen Heparin 1:1 Protaminhydrochlorid appliziert, um damit die Blutgerinnung wiederherzustellen. Der Erfolg der Antagonisierung wurde mittels ACT kontrolliert [55].

Ein typischer Operationssitus ist in Abbildung 7 dargestellt (HLM-Methode).

Abbildung 7



Offener Situs während der Operation mit HLM-Methode. 1: venöse Kanüle im rechten Vorhof; 2: arterielle Kanüle in der Aorta ascendens; 3: „Needle-Vent“ 4: Aortenklemme.

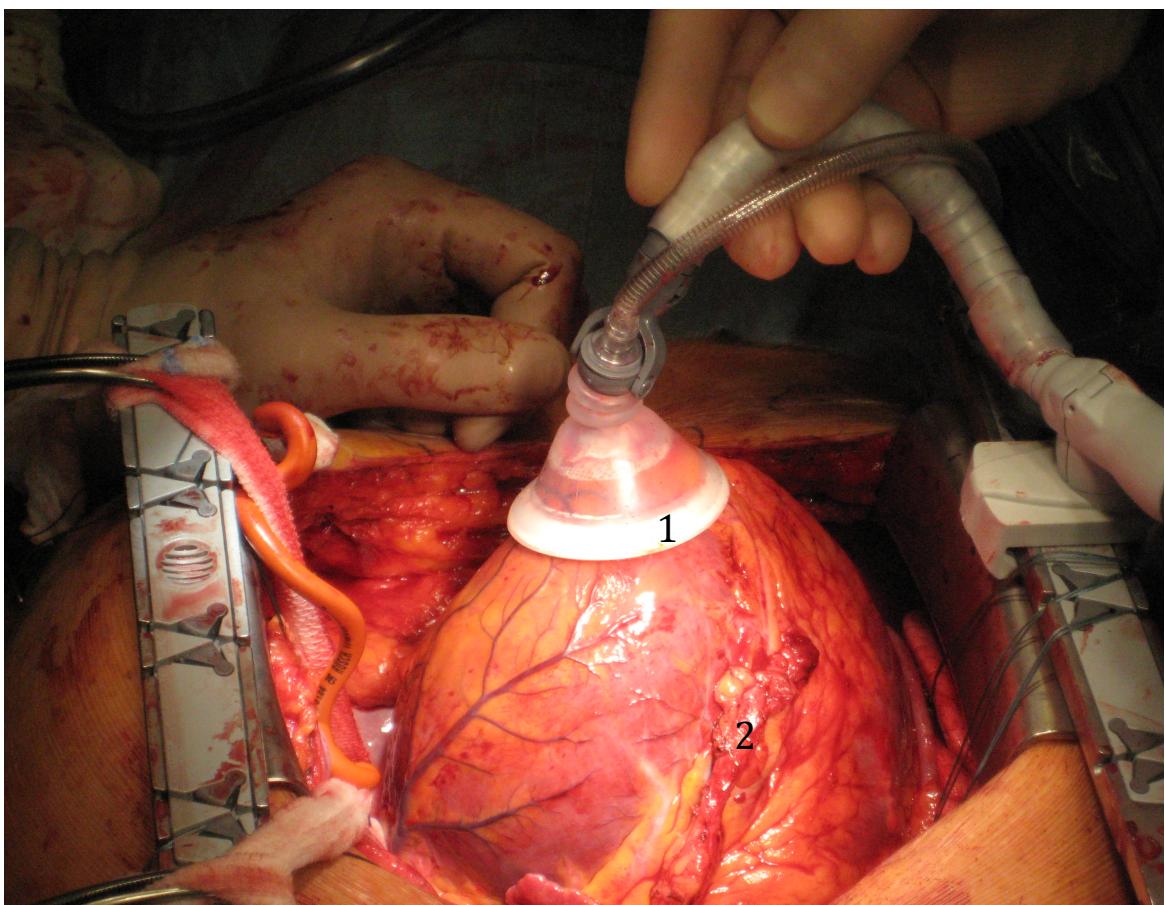
2.3.3 Operation am schlagenden Herzen (OPCAB-Methode)

Um suffiziente Anastomosen im Bereich der Koronararterien nähen zu können, wurde bei den Patienten, die mit der OPCAB-Methode operiert wurden, der Bereich des Epikards, in welchem die Anastomose genäht werden sollte, durch einen Octopus Stabilisierungsarm (Medtronic Inc., Minneapolis, MN, USA) fixiert (Abbildung 8). Bei unphysiologischer Stellung des Herzens, die der operative Zugangsweg teils notwendig machte, wurde das Herz durch den Starfish Positionierungsarm (Medtronic Inc., Minneapolis, MN, USA) in der richtigen Position gehalten.

Für das Nähen der Bypässe wurde ein Intrakoronarshunt (Medtronic Inc., Minneapolis, MN, USA) in das Gefäß eingebracht, welcher nur den für die zu nähenden Anastomosen wichtigen Bereich von der Durchblutung abtrennte. Es wurde darauf geachtet, während des gesamten Verfahrens die Körperkerntemperatur aufrecht zu erhalten.

Auch bei dieser Operationstechnik war eine Vollheparinisierung des Patienten notwendig. Es wurden ebenfalls 400 IE/kg Körpergewicht Heparin appliziert. Antagonisiert wurde das Heparin mit Protaminhydrochlorid nach Nähen der zentralen Anastomosen [55].

Abbildung 8



Offener Situs während der Operation mit der OPCAB-Methode. 1: Positionierungsarm an der Herzspitze; 2: aufgenähter Bypass.

2.4 Bestimmung von Glykokalyxbestandteilen

Alle Blutproben wurden sofort nach der Entnahme 10 Minuten bei 2000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und anschließend bei -80°C tiefgefroren. Im Labor der Klinik für Anaesthesiologie wurden die Glykokalyxbestandteile (Hyaluron, Syndecan-1 und Heparansulfat) mittels Enzyme-linked-immunoabsorbent-assay (ELISA) bestimmt.

2.4.1 Bestimmung von Hyaluron

Für die quantitative Bestimmung von Hyaluron wurde ein ELISA (Echelon Biosciences Incorporated, Salt Lake City, UT, USA) verwendet [31]. Zunächst wurden die Reagenzien gemäß der Herstellerangaben vorbereitet. Für die Hyaluronstandards wurde eine Verdünnungsreihe von 2:1 (1600 ng/ml - 50 ng/ml) erzeugt. Nun wurden die Proben im Verhältnis 1:2 mit Diluentlösung angesetzt. Dazu wurden je 100 µl Standardlösung jeder Verdünnungsreihe und 100 µl Serumproben in die Wells (Vertiefungen der Arbeitsplatte) gegeben. In die Blanks (Kontrollproben) wurde 150 µl Diluentlösung, zu der Null-Hyaluronreihe 100 µl gegeben. Danach wurden 50 µl des Detektors in alle Proben außer den Blanks pipettiert. Nun wurde die Platte unter sanftem Mischen für eine Stunde bei 37°C abgedeckt inkubiert. Nach der Inkubation wurden 100 µl der Kontrollen und der Proben auf die Detektionsplatte gegeben. Nach kurzem Mischen und Abdecken wurde sie bei 4°C für dreißig Minuten inkubiert. Die Detektionsplatte wurde danach ausgeschüttet und viermal mit 300 µl Waschkonzentrat ausgewaschen. Anschließend wurden 100 µl des Enzyms in jede Vertiefung gegeben und nach Mischen und Abdecken für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach wiederholtem Auswaschen, wie oben beschrieben, wurden je 100 µl der Substratlösung hinzugegeben. Bei einer OD₀/OD₁₆₀₀ Ratio über 3.0 und einer Absorption der Blanks unter 0.20 (nach ca. zwanzig Minuten) wurde die Farbreaktion durch 50 µl Stopplösung pro Probe beendet und die Absorption bei 405 nm abgelesen.

2.4.2 Bestimmung von Syndecan-1

Syndecan-1 wurde mit einem ELISA (Diacclone Research, Besançon, Frankreich) bestimmt [49]. Zur Vorbereitung der Reagenzlösungen wurden die Standards und Proben gemäß der Herstellerangaben verdünnt. Für die Standards wurde eine Verdünnungsreihe von 100 µl im Verhältnis 2:1 (256 ng/ml - 8 ng/ml) angesetzt. In die Probenwells wurden je 100 µl Serum, in die Kontrollen 100 µl Kontrolllösung und in die Blanks 100 µl Diluent gegeben. Zu diesen Reagenzien wurden 50 µl des verdünnten monoklonalen Biotinylat-Antikörpers, der gegen eine extrazelluläre Domäne des Syndecan-1 gerichtet ist, gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit der Waschlösung wurden 100 µl der Streptavidin-Peroxidase hinzugegeben und für dreißig Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach wiederholtem Waschen, um alle ungebundenen Enzyme zu beseitigen, wurden 100 µl der Fertiglösung Tetramethylbenzidin-Substrat (TMB) hinzugegeben und damit eine Farbreaktion ausgelöst. Nach 12-15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur und in Dunkelheit konnte man nach Zugabe von 100 µl Stopplösung H₂SO₄ bei 450 nm die Absorption ablesen. Die Intensität der Farbe war direkt proportional zur Syndecan-Konzentration der Blutproben.

2.4.3 Bestimmung von Heparansulfat

Zur Bestimmung der Heparansulfate wurde ein ELISA (Seikagaku Corporation, Tokyo, Japan) verwendet [60]. Zunächst mussten die Serumproben mit Actinaselösung zur Ausfällung der Proteine vorbehandelt werden. Dazu wurde ein Tris-HCl-Puffer erstellt und mit Actinase E (20 mg bei 1 ml Tris-HCl-Puffer) proportioniert. Proben und Puffer im Verhältnis 10:1 wurden bei 55°C im Thermoblock ca. 20 Stunden inkubiert. Nach fünfminütigem Kochen wurden die Proben bei Raumtemperatur zehn Minuten lang mit 3000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Nur der Überstand in einem Verdünnungsverhältnis von 1:1 wurde später für den ELISA verwendet. Nach der Präparation der Reagenzlösungen gemäß der Herstellerangaben wurden die Antikörperüberzogenen Mikrostrips fünf Mal mit der Waschlösung (300 µl) gewaschen und

danach je 100 µl des Reaktionspuffers hinzugegeben. Danach wurden je 20 µl der Heparansulfat-Standardlösung im Verhältnis 2:1 (8 µg/ml - 0,25 µg/ml), Kontrollproben (0 µg/ml) oder Proben hinzugefügt und nach leichtem Mischen 18-24 Stunden bei 2-8°C inkubiert. Nach Verwerfen der Lösungen und fünfmaligem Auswaschen mit 300 µl Waschlösung wurden 100 µl Horseradish Peroxidase Strepavidin (HRP, Meerrettich-Peroxidase) und 100 µl Biotinylat-Antikörper gleichzeitig in jedes Well gegeben. Nach weiterem Inkubieren für sechzig Minuten bei Raumtemperatur wurde die Multiwellplatte wiederholt ausgewaschen und nun 100 µl Tetramethylbenzidin-Substrat (TMB) hinzugegeben. Für dreißig Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, entwickelte sich eine Farbreaktion, die durch 100 µl Stopplösung beendet wurde. Innerhalb einer halben Stunde konnte nun bei 450 nm die Absorption abgelesen werden.

2.5 Bestimmung von Zytokinen

Die Zytokine Interleukin-6, -8 und -10 (IL-6, -8 und -10) wurden mit einem BioPlex Pro Assay der Luminex-Technologie, einem Bead-basierten Multiplex-Ansatz gemessen (BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland) [77]. Das Prinzip hinter dem Bead-basierten Assay ist ähnlich einem Sandwich-Immunoassay. Ein Capture-Antikörper gegen das gewünschte Zytokin ist kovalent an einen gefärbten Bead gebunden. Die gebundenen Beads reagieren mit den in den Proben enthaltenen Zytokinen. Nach einer Reihe von Waschungen, um ungebundenes Protein zu entfernen, wird ein biotinylierter Detektions-Antikörper zu der Reaktion hinzugegeben. Dieser erkennt ein anderes Epitop der Zytokine, als der Capture-Antikörper, sodass ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex entsteht. Streptavidin-Phycoerythrin (Streptavidin-PE) wird dann hinzugegeben, um an den biotinylierten Detektions-Antikörper auf der Oberfläche der Beads zu binden. Die Auswertung erfolgt unter Verwendung eines dualen Lasers (Flow-basiertes Mikroplatten-Reader-System). Die Laser-Optik erkennt die interne Fluoreszenz der einzelnen gefärbten Beads. Die Fluoreszenzintensität gibt die relative Menge der Zielmoleküle (Zytokine) in den getesteten Proben wieder.

2.6 Bestimmung von atrialem natriuretischen Peptid

Das atriale natriuretische Peptid (ANP) wurde im Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinikum der Universität München, bestimmt. Es wurde ein Sandwich-ELISA (USCN Life Science, Wuhan, China) verwendet. Die Reagenzlösungen wurden nach Angaben des Herstellers vorbereitet. Die Microtiterplatte war bereits mit einem ANP-spezifischen Antikörper beschichtet, bevor die Standard- und Probenwells mit einem Biotin-verknüpften polyklonalen Antikörper verbunden wurden. Nun wurde Avidin-verbundene Meerrettichperoxidase in jedes Well gegeben und inkubiert. Um eine Farbreaktion auszulösen wurde das Tetramethylbenzidin-Substrat (TMB) hinzugegeben. Um die Reaktion wieder zu stoppen wurde eine Schwefelsäurelösung beigefügt und die Farbänderung spektrometrisch bei 450 nm gemessen.

2.7 Statistik

Vor der Datenerhebung wurde in einer a priori Poweranalyse der Stichprobenumfang festgelegt. Vorausgegangene Messungen von ANP-Konzentrationen an fünf Patienten ergaben, dass die Differenzen der ANP-Werte der Messungen zum Zeitpunkt T0 sowie zu den Zeitpunkten T2, T3, T4 und T5 mindestens 42,2 pg/ml betrugen. Durch diese Differenz sowie die dazugehörigen Standardabweichungen ergab die Berechnung der Stichprobengröße mit einem zweiseitigen Konfidenzintervall von 0,95 und einer gewünschten Power von 0,8 einen Stichprobenumfang von 15 Patienten pro untersuchter Gruppe.

Angesichts der nicht gegebenen Normalverteilung vieler Variablen sind die Ergebnisse als Median und Differenz der Quartile Q3-Q1 angegeben. Vergleiche wurden mittels Varianzanalyse (ANOVA on ranks) und Wilcoxon Rangsummentest durchgeführt. Ergebnisse mit $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant eingestuft. Die Statistik wurde mit Sigma Stat (Systat Software, San Jose, CA, USA) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Demographische Daten und Operationscharakteristika

Die klinische Studie wurde an 30 Patienten der Herzchirurgischen Klinik und Poliklinik, Klinikum der Universität München, im Zeitraum von August 2009 bis November 2010 durchgeführt. Jeder Patient wurde sowohl herzchirurgisch als auch anästhesiologisch von dem jeweils zuständigen Arzt über den bevorstehenden Eingriff aufgeklärt. Zusätzlich wurden die Patienten anhand eines speziellen Patientenaufklärungsbogens (siehe Anhang) über Sinn und Zweck der Studie ausführlich informiert. Die Einwilligung der Patienten in die geplante Untersuchung wurde schriftlich dokumentiert.

Alle untersuchten Patienten wurden nach der Klassifikation der American Society of Anesthesiologists (ASA) präoperativ der ASA-Risikogruppe 3 zugeordnet. Intraoperativ wurden keine Komplikationen beobachtet.

Die demographischen Daten und die Operationscharakteristika beider Gruppen (HLM- und OPCAB-Methode) sind in Tabelle 1 dargestellt. Zwischen den Patienten beider Gruppen wurden keine signifikanten Unterschiede beobachtet.

Tabelle 1

	HLM (n=15)	OPCAB (n=15)
Alter (Jahre)	64 (60/71)	69 (64/73)
Größe (cm)	172 (169/180)	175 (165/179)
Gewicht (kg)	75 (68/88)	74 (63/85)
KOF (m ²)	1.9 (1.8/2.1)	1.9 (1.7/2.1)
LVEF (%)	58 (45/70)	60 (48/70)
Anzahl Bypassgrafts	2 (2/3)	2 (1/3)
Operationszeit (min)	259 (223/293)	246 (181/294)
Totaler Bypasszeit (min)	92 (75/117)	n.a.
Aortenklemmzeit (min)	63 (42/78)	n.a.

Demographische Daten und Operationscharakteristika. Die Daten sind als Median (1. Quartil/3. Quartil) angegeben.

LVEF: Linksventrikuläre Ejektionsfraktion; KOF: Körperoberfläche; Die Körperoberfläche wurde mit der Gehan-George-Formel berechnet; n.a.: nicht angegeben.

3.2 Volumensubstitution und Bilanzierung

Während des Eingriffes erhielt keiner der Patienten Blutprodukte in Form von Erythrozytenkonzentraten, Fresh Frozen Plasma (FFP) oder Thrombozytenkonzentraten.

In Tabelle 2 ist die Einfuhr, Ausfuhr und Gesamtbilanz zum Zeitpunkt T2 beider Gruppen (HLM- und OPCAB-Methode) gezeigt. Zwischen den beiden Gruppen gab es keine signifikanten Unterschiede.

Tabelle 2

	HLM (n=15)	OPCAB (n=15)
Kristalloide (ml)	2850 (2500/4000)	1750 (1250/2500)
Kolloide (ml)	1250 (1250/1250)	1500 (1000/1750)
Cellsaverblut (ml)	220 (0/350)	600 (0/1010)
Einfuhr gesamt (ml)	4550 (3750/5443)	4185 (2456/4900)
Blutverlust (ml)	2300 (1700/3300)	400 (0/2500)
Urin (ml)	1200 (940/1500)	750 (500/1650)
Ausfuhr gesamt (ml)	3800 (3050/4500)	1900 (650/3350)
Bilanz (ml)	550 (237/1700)	1285 (875/3100)

Einfuhr, Ausfuhr und Gesamtbilanz zum Zeitpunkt T2 vor Beginn des kardiopulmonalen Bypasses (HLM-Methode), bzw. vor der ersten Stabilisierung des Herzens (OPCAB-Methode). Die Daten sind als Median (1. Quartil/3. Quartil) angegeben.

3.3 Bestimmung der Glykokalyxbestandteile

Die Basalwerte (T0) von Syndecan-1, Heparansulfat und Hyaluron im Serum beider Gruppen (HLM- und OPCAB-Methode) unterschieden sich nicht signifikant voneinander (Tabelle 3).

Tabelle 3

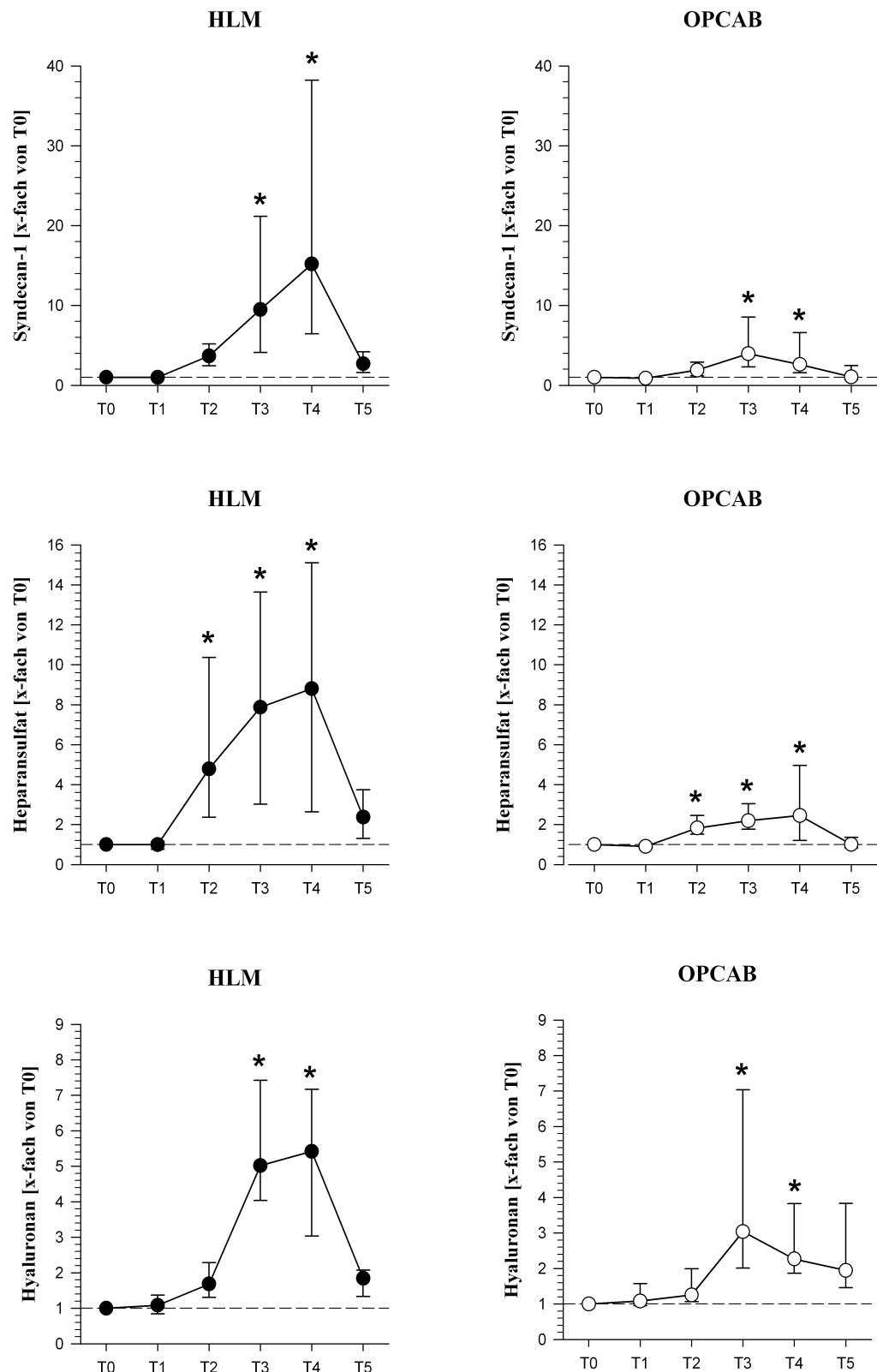
		HLM (n=15)	OPCAB (n=15)
Syndecan-1	(µg/g Albumin)	2,9 (2,0/4,9)	8,0 (2,7/14,4)
Heparansulfat	(µg/g Albumin)	446,4 (199,3/744,0)	1003,5 (522,4/2391,9)
Hyaluron	(µg/g Albumin)	3,0 (2,0/5,7)	3,4 (1,9/6,4)
Albumin	(g/dl)	4,2 (4,1/4,4)	4,0 (4,0/4,3)

Basalwerte zum Zeitpunkt T0 von Syndecan-1, Heparansulfat, Hyaluron und Albumin in beiden Gruppen. Die Daten sind als Median (1. Quartil/3. Quartil) angegeben. Um der individuellen intraoperativen Hämodilution Rechnung zu tragen, sind die Werte auf die jeweilige Albuminkonzentration korrigiert.

In Abbildung 9 sind die vom jeweiligen Basalwert ausgehenden x-fachen Anstiege der Glykokalyxbestandteile beider Patientengruppen dargestellt. Um die unterschiedliche Hämodilution während der Operation zu berücksichtigen, sind die individuellen Konzentrationen der Glykokalyxbestandteile auf die jeweilige Albuminkonzentration korrigiert.

Bei Patienten, die mit der HLM-Methode operiert wurden, verursachte die Narkoseeinleitung (T1) keine Veränderungen. Ein erster Anstieg aller drei Glykokalyxbestandteile erfolgte vor der HLM-Phase (T2). Zu maximalen Anstiegen kam es am Ende der HLM-Phase zum Zeitpunkt T4 (Syndecan-1: 15-fach, Heparansulfat: 9-fach, Hyaluron: 5-fach vom Basalwert). Eine Stunde nach Beginn der Blutstillung (T5) erreichte die Konzentration von Syndecan-1, Heparansulfat und Hyaluron bereits wieder präoperative Level (Abbildung 9).

Abbildung 9



Syndecan-1-, Heparansulfat- und Hyaluronkonzentrationen in beiden Gruppen (HLM-Methode, n=15 und OPCAB-Methode, n=15) zu den verschiedenen Messzeitpunkten. Dargestellt sind die vom jeweiligen Basalwert ausgehenden x-fachen Anstiege der Glykokalyxbestandteile. Um der individuellen intraoperativen Hämodilution Rechnung zu tragen, sind die Werte auf die jeweilige Albuminkonzentration korrigiert. Die Daten sind als Median (1. Quartil/3. Quartil) angegeben.
*Signifikant unterschiedlich von T0, p < 0,05.

Zum Zeitpunkt T1 bei Narkoseeinleitung waren auch bei Patienten, die mit der OPCAB-Methode operiert wurden, keine Anstiege der Glykokalyxbestandteile nachweisbar. Zeitgleich mit der ersten Stabilisierung des Herzens (T2) wurden in dieser Gruppe erste Veränderungen beobachtet. Maximale Anstiege wurden zum Zeitpunkt T3 (Syndecan-1: 4-fach, Hyaluron: 3-fach vom Basalwert), bzw. zum Zeitpunkt T4 (Heparansulfat: 2-fach vom Basalwert) nachgewiesen. Auch in dieser Gruppe fielen die Konzentrationen von Syndecan-1, Heparansulfat und Hyaluron zum Zeitpunkt T5 auf präoperative Werte.

Die maximalen Anstiege aller drei Glykokalyxbestandteile waren bei Patienten, die mit der HLM-Methode operiert wurden, deutlich höher, als bei Patienten, die mit der OPCAB-Methode operiert wurden (signifikante Unterschiede beider Kollektive für die maximalen Anstiege mit p < 0,01 für Syndecan-1, Heparansulfat und Hyaluron).

3.4 Bestimmung der Zytokine

In Tabelle 4 sind die Basalwerte (T0) von Interleukin-6, -8 und -10 beider Patientengruppen dargestellt.

Tabelle 4

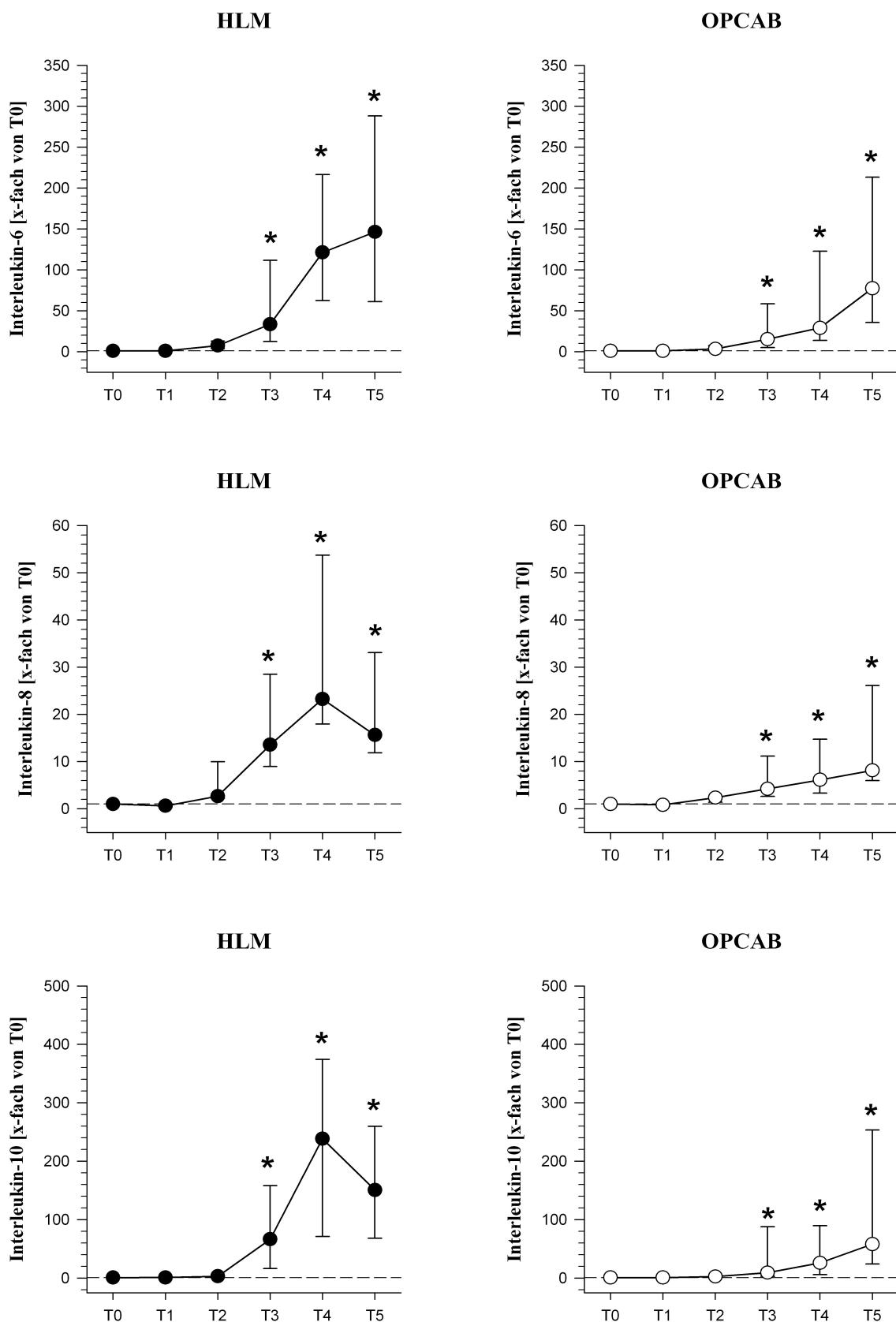
	HLM (n=15)	OPCAB (n=15)
Interleukin-6 (pg/g Albumin)	39,0 (27,6/75,7)	46,9 (23,0/118,8)
Interleukin-8 (pg/g Albumin)	49,7 (39,5/70,5)	44,0 (31,4/91,1)
Interleukin-10 (pg/g Albumin)	7,5 (4,3/12,2)	7,7 (2,2/9,5)
Albumin (g/dl)	4,2 (4,1/4,4)	4,0 (4,0/4,3)

Basalwerte der Zytokine Interleukin-6, -8 und -10 und des Albumins in beiden Gruppen. Die Daten sind als Median (1. Quartil/3. Quartil) angegeben. Um der individuellen intraoperativen Hämodilution Rechnung zu tragen, sind die Werte auf die jeweilige Albuminkonzentration korrigiert.

Abbildung 10 zeigt die vom jeweiligen Basalwert ausgehenden x-fachen Anstiege von Interleukin-6, -8 und -10 in beiden Patientengruppen. Bei Patienten, die mit der HLM-Methode operiert wurden, verursachte die Narkoseeinleitung (T1) und der Beginn der HLM-Phase (T2) keine Veränderungen. Ein erster Anstieg aller drei Zytokine erfolgte nach Öffnen der Aortenklemme (T3) (IL-6: 33-fach, IL-8: 14-fach, IL-10: 66-fach vom Basalwert). Zu maximalen Anstiegen kam es am Ende der HLM-Phase (T4) (IL-6: 121-fach, IL-8: 23-fach, IL-10: 238-fach vom Basalwert).

Zum Zeitpunkt der Narkoseeinleitung (T1) und zur ersten Stabilisierung des Herzens (T2) waren auch bei Patienten, die mit der OPCAB-Methode operiert wurden, keine Anstiege der Zytokine nachweisbar. Zeitgleich mit dem Öffnen der Aortenklemme (T3) wurde in dieser Gruppe eine erste Veränderung beobachtet (IL-6: 15-fach, IL-8: 4-fach, IL-10: 9-fach vom Basalwert). Es kam zu einem weiteren Anstieg zu Beginn der chirurgischen Hämostase (T4). Der maximale Anstieg war eine Stunde nach Beginn der Hämostase (T5) nachweisbar (IL-6: 77-fach, IL-8: 8-fach, IL-10: 58-fach vom Basalwert).

Abbildung 10



Zytokin-Konzentrationen in beiden Gruppen (HLM-Methode, n=15 und OPCAB-Methode, n=15) zu den verschiedenen Messzeitpunkten. Dargestellt sind die vom jeweiligen Basalwert ausgehenden x-fachen Anstiege der Zytokine Interleukin-6, -8 und -10. Um der individuellen intraoperativen Hämodilution Rechnung zu tragen, sind die Werte auf die jeweilige Albuminkonzentration korrigiert. Die Daten sind als Median (1. Quartil/3. Quartil) angegeben.

* Signifikant unterschiedlich von T0, p < 0,05.

Erwähnenswert ist, dass der Anstieg der Zytokine zeitlich versetzt zu dem Anstieg der Glykokalyxbestandteile und dem Anstieg des ANP in beiden Patientengruppen erfolgte. Dies verdeutlichen die Abbildungen 9, 10 und 11.

3.4 Bestimmung von atrialem natriuretischen Peptid

Die Basalwerte (T0) von ANP im Plasma beider Gruppen (HLM- und OPCAB-Methode) unterschieden sich nicht signifikant voneinander (Tabelle 5).

Tabelle 5

	HLM (n=15)	OPCAB (n=15)
ANP (ng/g Albumin)	7,1 (6,5/10,2)	9,4 (7,2/15,0)
Albumin (g/dl)	4,2 (4,1/4,4)	4,0 (4,0/4,3)

Basalwerte des atrialen natriuretischen Peptids und des Albumins in beiden Gruppen. Die Daten sind als Median (1. Quartil/3. Quartil) angegeben. Um der individuellen intraoperativen Hämodilution Rechnung zu tragen, sind die Werte auf die jeweilige Albuminkonzentration korrigiert. ANP: atriales natriuretisches Peptid.

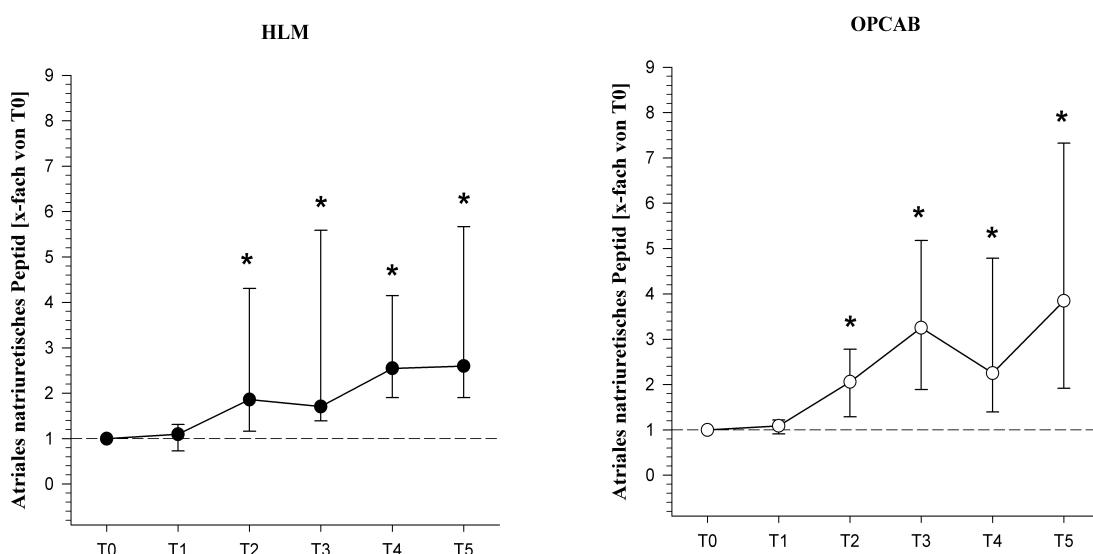
In Abbildung 11 sind die vom jeweiligen Basalwert ausgehenden x-fachen Anstiege des ANP beider Patientengruppen dargestellt. Bei Patienten, die mit der HLM-Methode operiert wurden, verursachte die Narkoseeinleitung (T1) keine Veränderungen. Ein erster Anstieg erfolgte vor der HLM-Phase (T2). Zu einem

maximalen Anstieg kam es am Ende der HLM-Phase (T4: 3-fach vom Basalwert). Auch eine Stunde nach Beginn der Blutstillung (T5) fiel die ANP-Konzentration nicht ab.

Zum Zeitpunkt der Narkoseeinleitung (T1) war auch bei Patienten, die mit der OPCAB-Methode operiert wurden, kein Anstieg des ANP nachweisbar. Zeitgleich mit der ersten Stabilisierung des Herzens (T2) wurde in dieser Gruppe eine erste Veränderung beobachtet. Maximale Anstiege wurden zum Zeitpunkt T3 (3-fach vom Basalwert), bzw. T5 (4-fach vom Basalwert) nachgewiesen.

Zu keinem Messzeitpunkt wurde ein signifikanter Unterschied der Ergebnisse zwischen den beiden Patientengruppen beobachtet.

Abbildung 11



Atriales natriuretisches Peptid in beiden Gruppen (HLM-Methode, n=15 und OPCAB-Methode, n=15) zu den verschiedenen Messzeitpunkten. Dargestellt sind die vom jeweiligen Basalwert ausgehenden x-fachen Anstiege des atrialen natriuretischen Peptids. Um der individuellen intraoperativen Hämodilution Rechnung zu tragen, sind die Werte auf die jeweilige Albuminkonzentration korrigiert. Die Daten sind als Median (1. Quartil/3. Quartil) angegeben.

* Signifikant unterschiedlich von T0, p < 0,05.

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurde bei koronarchirurgischen Patienten ein Glykokalyxshedding sowohl bei Patienten, die mit der HLM-Methode, als auch bei Patienten, die mit der OPCAB-Methode operiert wurden, festgestellt. Die Ergebnisse der aktuellen Studie stehen somit im Einklang mit einer Studie von Bruegger et al. Die Arbeitsgruppe demonstrierte, dass es bei koronarchirurgischen Patienten sowohl mit, als auch ohne kardiopulmonalem Bypass, zu einer Zerstörung der endothelialen Glykokalyx kommt [10]. Erstmals konnte in der vorliegenden Studie neben einem Shedding von Heparansulfat und Syndecan auch ein Shedding von Hyaluron, einer weiteren wichtigen Glykokalyxkomponente, gezeigt werden. In beiden Gruppen wurden deutliche Anstiege aller drei gemessenen Glykokalyxbestandteile ab dem Zeitpunkt T2 nachgewiesen (Abbildung 9). Es ist deutlich zu erkennen, dass es bei Patienten, die mit der HLM-Methode operiert wurden, insgesamt zu einem stärkeren Shedding kommt.

Im Verlauf der Operation wurde ein signifikanter Anstieg der drei Zytokine (Interleukin-6, -8, und -10) ab dem Zeitpunkt T3 in beiden Patientengruppen festgestellt. Auch hier waren bei Patienten, die mit der HLM-Methode operiert wurden, höhere Werte zu verzeichnen (Abbildung 10). Darüber hinaus wurde ein signifikanter Anstieg der ANP-Konzentration im Verlauf der Operationen ab dem Zeitpunkt T2 in beiden Patientengruppen nachgewiesen (Abbildung 11). Dieser Anstieg unterschied sich nicht signifikant in den beiden untersuchten Gruppen.

4.2 Potentielle Auslöser eines Glykokalyxsheddings

Im Folgenden werden mögliche Auslöser für das beobachtete Glykokalyxshedding diskutiert:

4.2.1 Ischämie/Reperfusion

Ischämie und Reperfusion kommen gerade bei Operationen am Herzen häufig und meist auch unvermeidbar vor. Paradoxerweise werden durch Ischämie entstandene Gewebeschäden während der wiedereinsetzenden Reperfusion noch weiter verstärkt [32, 66]. In der Initialphase der Reperfusion werden vermehrt Entzündungsmediatoren wie TNF- α freigesetzt und Zelladhäsionsmoleküle synthetisiert. Dadurch wird die Interaktion zwischen Endothelzellen und Leukozyten/Thrombozyten angeregt [28]. TNF- α zerstört die endotheliale Glykokalyx und induziert zudem noch die Expression leukozytärer und endothelialer Adhäsionsmoleküle [14, 42]. Chappell et al. konnten zeigen, dass die Glykokalyx bei isoliert perfundierten Meerschweinchenherzen schon nach 20-minütiger Ischämie nahezu komplett zerstört wird [16]. Mulivor et al. wiesen nach 60-minütiger Ischämie eine, durch Shedding der Glykosaminoglykan-Seitenketten bedingte, signifikante Abnahme der Glykokalyxdicke nach [50]. Bruegger et al. konnten tierexperimentell durch die Applikation von Stickstoffmonoxid (NO) während der Reperfusion eine deutliche Protektion der vaskulären Permeabilität durch Schutz der endothelialen Glykokalyx herbeiführen [11].

Der Ischämie-/Reperfusionsschaden wurde von Rehm et al. auch beim Menschen als wichtiger Auslöser eines Glykokalyxsheddings postuliert [60]. So konnte die Gruppe zeigen, dass es bei großen gefäßchirurgischen Operationen an der Aorta im Kreislaufstillstand oder bei erhaltenem Kreislauf durch die Herz-Lungen-Maschine und bei Patienten mit partieller Ischämie bei infrarenalem Aortenersatz zu einem hochsignifikanten Shedding von Glykokalyxbestandteilen im Serum der Patienten kommt. Von der Arbeitsgruppe wurde postuliert, dass die Zerstörung der endothelialen Glykokalyx im Zusammenhang mit einem Ischämie-/Reperfusionsschaden stehen könnte [60].

In der vorliegenden Studie konnte ein Shedding sowohl bei Patienten, die mit der HLM-Methode (mit Ischämie/Reperfusion von Herz und Lungen) als auch bei Patienten, die mit der OPCAB-Methode (ohne Ischämie/Reperfusion von Herz und Lungen) operiert wurden, beobachtet werden. Diese Beobachtung legt nahe, dass Ischämie/Reperfusion in der vorliegenden Studie nicht der alleinige Auslöser für

ein Glykokalyxshedding zu sein scheint. Folglich könnten andere mögliche Auslöser, wie erhöhte Konzentrationen von inflammatorischen Zytokinen oder eine vermehrte Freisetzung von ANP für das beobachtete Glykokalyxshedding verantwortlich sein.

4.2.2 Inflammatorische Zytokine

Inflammatorische Zytokine spielen in der Pathogenese eines Endothelzellschadens eine wichtige Rolle. TNF- α stimuliert die Produktion von freien Sauerstoffradikalen und greift in den Stickstoffmonoxid-Stoffwechselweg ein. Es aktiviert darüber hinaus Adhäsionsmoleküle der Endothelzellwand und verstärkt die Degranulation von Leukozyten [14]. Chappell et al. konnten bereits zeigen, dass die Applikation von TNF- α im Tiermodell zu einer Alteration der endothelialen Glykokalyx führt [14].

Beim Menschen wurde der septische Schock als ein Auslöser eines Glykokalyxsheddings postuliert. Nelson et al. konnten bei Patienten im septischen Schock erhöhte Glykosaminoglykan-Werte im Serum nachweisen [52]. Diese wurden als freigesetzte Bestandteile der beschädigten Glykokalyx interpretiert. Interessanterweise waren die Ergebnisse outcome-relevant: Die Arbeitsgruppe stellte bei nicht-überlebenden Patienten signifikant höhere Werte als bei überlebenden Patienten fest [52].

In der vorliegenden Studie konnte ein signifikanter Anstieg inflammatorischer Zytokine in beiden Patientengruppen nachgewiesen werden, die als möglicher Auslöser für das beobachtete Glykokalyxshedding in Frage kommen. Dies soll im Folgenden noch ausführlich diskutiert werden.

4.2.3 Atriales natriuretisches Peptid

ANP spielt bis heute eine noch nicht vollständig verstandene Rolle in der Regulation der kardiovaskulären Homöostase. Neben den gut erforschten diuretischen, natriuretischen und vasodilatierenden Effekten wirkt es auch als ein Modulator der mikrovaskulären Permeabilität [45]. Mehrere Studien konnten einen Anstieg der kapillaren Permeabilität für Wasser und Makromoleküle durch die Freisetzung von ANP zeigen [9, 33, 36, 64].

Huxley et al. gelang in einem tierexperimentellen Modell der Nachweis, dass durch die Applikation von ANP die kapilläre Permeabilität um ein Vielfaches erhöht wird [40]. Die Arbeitsgruppe stellte die Hypothese auf, dass ANP nicht nur über die Steigerung der renalen Diurese und Natriurese das intravasale Volumen reguliert, sondern auch eine direkte Wirkung auf das Endothel erzielt [40].

Bruegger et al. konnten erstmals am isoliert perfundierten Meerschweinchenherzen einen Zusammenhang zwischen der Modulation der Gefäßpermeabilität durch ANP und der Integrität der endothelialen Glykokalyx herstellen [9]. Bereits sechs Minuten nach ANP-Infusion konnte eine gesteigerte Freisetzung von Syndecan-1 im koronarvenösen Effluat nachgewiesen werden. Durch die Applikation von ANP konnte ein Anstieg der Gefäßpermeabilität und eine Extravasation von Kolloiden aus dem Gefäßbett in das interstitielle Gewebe gezeigt werden. Zudem konnte die Zerstörung der Glykokalyx mittels Elektronenmikroskopie visualisiert werden [9].

Beim Menschen liegen bis heute keine Untersuchungen vor, die einen Zusammenhang zwischen der Freisetzung von ANP und einem möglichen Glykokalyxshedding untersuchen. Der adäquate Reiz für eine Sekretion von ANP aus den Vorhöfen des Herzens ist eine Dehnung des Vorhofs [45]. In der vorliegenden Studie ist es denkbar, dass es operationsbedingt zu einer Freisetzung von ANP aus den Vorhöfen kommen könnte. Auch dies soll im Folgenden noch weiter diskutiert werden.

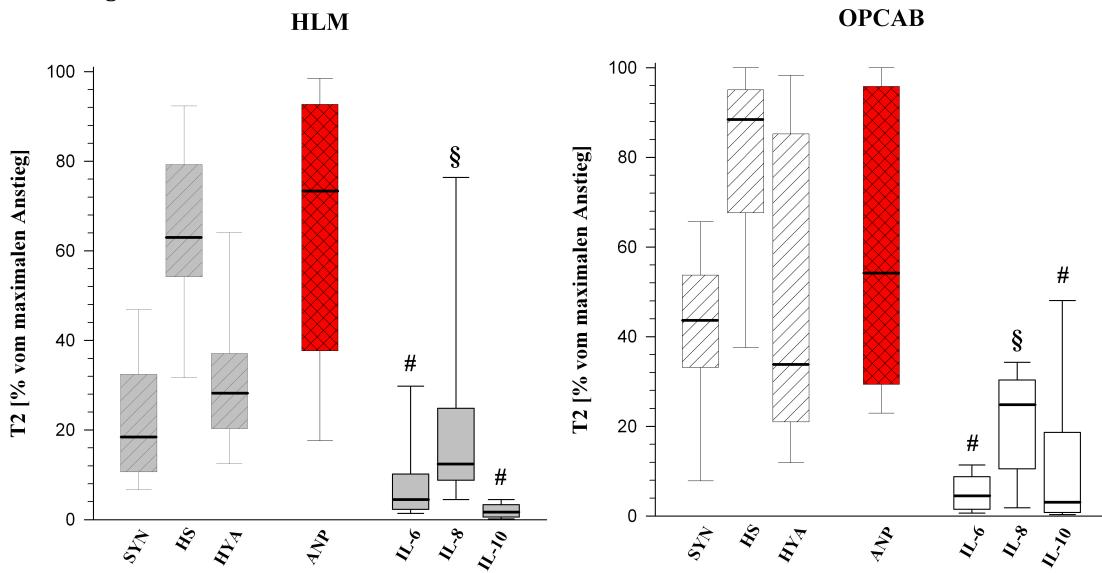
4.3 Zeitliche Korrelation zwischen Glykokalyxshedding, inflammatorischen Zytokinen und atrialem natriuretischem Peptid

Um einen möglichen kausalen Zusammenhang zwischen dem Shedding von Bestandteilen der Glykokalyx und möglichen Triggern (inflammatorische Zytokine und ANP) zu verdeutlichen, muss der zeitliche Verlauf des Glykokalyxsheddings mit dem zeitlichen Verlauf der möglichen Auslöser für dieses Shedding verglichen werden.

In der vorliegenden Studie kommt es nach Narkoseeinleitung (T1) in keiner der beiden Gruppen zu signifikanten Veränderungen der Glykokalyxkonzentrationen (Abbildung 9). Erste Veränderungen werden bei Patienten, die mit der HLM-Methode operiert wurden, nach der arteriellen/venösen Kanülierung und bei Patienten, die mit der OPCAB-Methode operiert wurden, nach der ersten Stabilisierung des Herzens zum Zeitpunkt T2 beobachtet. Zu diesem Zeitpunkt kann die mechanische Stimulation am Herzen zweifelsfrei ein Stimulus für die Freisetzung von ANP darstellen. Tatsächlich wird bei den ANP-Konzentrationen in beiden Patientengruppen bereits zum Zeitpunkt T2 ein signifikanter Anstieg der ANP-Konzentrationen beobachtet (Abbildung 11). Sowohl bei Patienten, die mit der HLM-Methode operiert wurden, als auch bei Patienten, die mit der OPCAB-Methode operiert wurden, bleiben die Konzentrationen von Interleukin-6, -8, und -10 hingegen bis zum Zeitpunkt T3 (HLM-Methode: Öffnen der Aortenklemme, OPCAB-Methode: Nähen der zentralen Anastomosen) nahezu unverändert (Abbildung 10).

Abbildung 12 illustriert den Anstieg der Glykokalyxbestandteile Syndecan-1, Heparansulfat und Hyaluron, des ANP und der drei gemessenen Zytokine zum Zeitpunkt T2. Sie verdeutlicht somit den Anstieg der untersuchten Komponenten im zeitlichen Verlauf. Die Werte sind als Prozentangabe des jeweiligen individuellen maximalen Anstiegs dargestellt. Zum Zeitpunkt T2 beträgt die ANP-Freisetzung bei Patienten, die mit der HLM-Methode operiert wurden, 73%, bei Patienten, die mit der OPCAB-Methode operiert wurden, 54% des maximal erreichten Anstiegs (Abbildung 12).

Abbildung 12



Ausmaß der Veränderungen der Glykokalyxbestandteile (Syndecan-1, Heparansulfat, Hyaluron), ANP, Interleukin-6, -8, und -10 zum Zeitpunkt T2 in beiden Gruppen (HLM-Methode, n= 15 und OPCAB-Methode, n=15), jeweils dargestellt als Boxplot in Prozent des maximalen Anstiegs.

§ p < 0,005 vs. ANP; # p < 0,001 vs. ANP. SYN: Syndecan-1; HS: Heparansulfat; HYA: Hyaluron; ANP: atriales natriuretisches Peptid; IL-6: Interleukin-6; IL-8: Interleukin-8; IL-10: Interleukin-10.

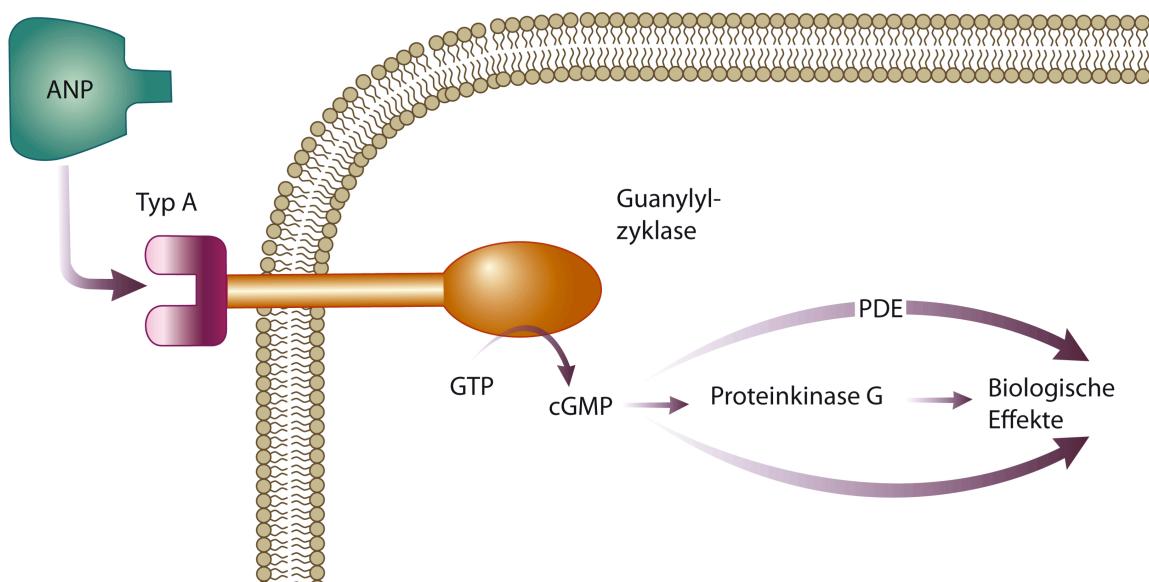
Die Zytokinkonzentrationen waren zu diesem Zeitpunkt in beiden Gruppen deutlich niedriger und die Anstiege unterschieden sich signifikant von denen des ANP. Da das Shedding von Glykokalyxbestandteilen bereits begonnen hatte, ist ein kausaler Zusammenhang mit den inflammatorischen Zytokinen zu diesem Zeitpunkt als unwahrscheinlich zu betrachten.

Zusammenfassend zeigt der Vergleich des zeitlichen Ablaufs der Anstiege von ANP und von inflammatorischen Zytokinen mit dem zeitlichen Ablauf des Sheddings der drei Glykokalyxkomponenten in beiden Patientengruppen ANP als den wahrscheinlichsten Auslöser für ein Glykokalyxshedding.

4.4 Möglicher Mechanismus eines ANP-induzierten Glykokalyxsheddings

In einer tierexperimentellen Studie konnte ANP bereits als Auslöser eines Glykokalyxsheddings identifiziert werden [9]. Bislang war unklar, ob ANP am Menschen die gleiche Wirkung erzielen kann. Die vorliegende Studie legt nun nahe, dass eine zeitliche Korrelation zwischen einer ANP-Freisetzung und einem Glykokalyxshedding besteht. Der Mechanismus, über den ANP ein Glykokalyxshedding auslösen kann, ist nicht geklärt. Die Signalkaskade des ANP wird vorrangig durch den ANP-Rezeptor Typ A vermittelt (Abbildung 13).

Abbildung 13



Signalkaskade des atrialen natriuretischen Peptids: ANP bindet vorrangig an den Typ-A-Rezeptor und bewirkt die Bildung von cGMP. Dieses vermittelt durch Bildung von Proteinkinase G die biologischen Effekte in der Zelle.

ANP: Atriales natriureisches Peptid; GTP: Guanosintriphosphat; cGMP: zyklisches Guanosinmonophosphat; PDE: Phosphodiesterase. Modifiziert nach Levin et al. [45].

Durch Bindung und Homodimerisierung von ANP am Typ-A-Rezeptor und Aktivierung von membranständigen Guanylylzyklasen wird ein Anstieg der intrazellulären Konzentration von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) ausgelöst [2, 22, 64]. Dieses fungiert als zellulärer Botenstoff (second messenger) und übermittelt die Signale in der Zelle (Abbildung 13).

Offensichtlich ist, dass ANP selbst keine eigene Enzymaktivität besitzt. In der vorliegenden Studie werden drei Komponenten der Glykokalyx (Syndecan-1, Heparansulfat und Hyaluron) abgespalten. Deswegen ist es unwahrscheinlich, dass ein einziges Enzym für das Shedding der drei Komponenten verantwortlich ist. Unterstützt wird diese These zudem durch den zeitlichen Verlauf des Sheddings. Denkbar ist, dass die Bildung von cGMP in der Endothelzelle der zugrunde liegende Mechanismus für das beobachtete Shedding sein könnte. Unterstützt wird diese Hypothese durch Untersuchungen von van Teeffelen et al., die nachweisen konnten, dass Bradykinin und Nitroprussidnatrium ein vaskuläres Leck verursachen [73]. Interessanterweise wirken diese beiden vasoaktiven Stoffe über die Bildung von cGMP. Dahingegen verursachte ein dritter vasoaktiver Stoff, das Prostazyklinanalogon Iloprost, keine Steigerung der vaskulären Permeabilität. Iloprost wirkt nicht über eine cGMP-vermittelte Signalkaskade. Seine Wirkung entfaltet sich über zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) [17].

Möglicherweise ist es postischämisch zu einer Degranulation von Mastzellen gekommen, und damit verbunden zu einer Freisetzung von Proteasen wie Tryptase und Cathepsin B, welche Syndecan-1 und Hyaluron von der Glykokalyx abspalten können [3]. Zudem könnte Heparanase, ein proteolytisches Enzym, das Heparansulfat von der endothelialen Glykokalyx abspaltet, freigesetzt worden sein. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass Heparanases in den Gewebemastzellen des Myokards vorkommen und dort postischämisch freigesetzt werden [6]. Durch die direkte Einwirkung von Heparanase auf die Glykokalyx könnte der schnelle Anstieg der Serumkonzentration von Heparansulfat, als die erste abgespaltene Komponente der Glykokalyx in unserer Studie, erklärt werden. Um den genauen Vorgang der Signaltransduktion von ANP auf zellulärer Ebene und den Pathomechanismus des Glykokalyxsheddings herauszufinden, werden zukünftig weitere experimentelle Studien benötigt.

4.5 Klinische Relevanz

Wie bereits eingangs erwähnt, spielt eine intakte Glykokalyx eine wichtige Rolle als kompetente Barriere gegen eine Extravasation von Flüssigkeit [61]. Zudem verhindert eine intakte Glykokalyx die Interaktion von Blutzellen (Leukozyten und Thrombozyten) mit dem Endothel [74]. Sie enthält Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 und VCAM-1, die ein Anlagern der Blutzellen an das Endothel ermöglichen. Diese sind in dem Maschenwerk aus Proteoglykanen und Glykoproteinen verborgen und können erst durch die Zerstörung der endothelialen Glykokalyx ihre Wirkung entfalten [21].

Bei einer Zerstörung der endothelialen Glykokalyx kommt es durch eine interstitielle Flüssigkeitsansammlung zu einem Gewebeödem und zu einer Invasion von Entzündungszellen. Dies konnte in mehreren Arbeiten beobachtet werden [16, 57, 60, 62]. Letztendlich kann daraus ein Multiorganversagen resultieren [60]. Erste humane Daten weisen darauf hin, dass eine Zerstörung der Glykokalyx tatsächlich mit einer erhöhten Letalität assoziiert ist [52].

Eine wichtige Aufgabe besteht daher in der Protektion der endothelialen Glykokalyx. Erste Ansätze gelangen hierbei Chappell et al. Die Arbeitsgruppe konnte in tierexperimentellen Studien eine Mastzellstabilisierung durch Applikation von Hydrokortison erreichen und dadurch die Freisetzung von Proteasen und Zytokinen verhindern [13, 14, 16, 18]. Wie oben schon erwähnt, wird vor allem Heparansulfat durch Proteasen abgespalten und dadurch die Glykokalyx geschädigt [16, 18]. Es konnte ein deutlich geringeres Glykokalyxshedding und eine geringere Leukozytenadhäsion am Gefäßendothel nach Applikation von Hydrokortison beobachtet werden [16]. Ebenso gelang der Arbeitsgruppe eine Protektion der Glykokalyx durch Applikation von Antithrombin III. Dieses Enzym ist ein physiologischer Inhibitor von Proteasen. Es entfaltet seine Wirkung durch direkte Bindung an Proteoglykane der Glykokalyx und hemmt so deren Zerstörung [14]. Interessanterweise konnten die protektiven Effekte von Hydrokortison und Antithrombin jeweils nur nach einer Ischämie beobachtet werden. Ohne Ischämie konnten keine protektiven Ergebnisse erzielt werden [13, 14, 16, 18].

Durch eine postischämische Applikation von Stickstoffmonoxid (NO) während der Reperfusion konnten Bruegger et al. in einem tierexperimentellen Modell eine Protektion des Endothels durch Schutz der Glykokalyx herbeiführen [11].

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie deuten darauf hin, dass die Freisetzung von ANP zu einem Glykokalyxshedding führt. Ein Anstieg des Peptidhormons sollte also nach Möglichkeit verhindert werden. Für die vorliegende Studie bedeutet dies konkret, dass eine Freisetzung von ANP durch einen behutsamen operativen Umgang mit dem Herzen vermieden werden sollte. Da eine Dehnung der Vorhöfe bekanntermaßen eine Freisetzung von ANP verursacht, sollte zudem eine restriktive Volumentherapie angestrebt werden.

Die Glykokalyx nimmt in der Pathogenese verschiedener Krankheitsbilder eine wichtige Rolle ein, die bisher noch nicht hinreichend erforscht ist. Sie bietet ein interessantes Forschungsgebiet mit möglicherweise weitreichenden therapeutischen Konsequenzen. Zukünftig könnte ihr präventiver Schutz die Entstehung von Krankheiten verhindern, bzw. ein besseres Outcome und geringere postoperative Komplikationen ermöglichen.

Ziel zukünftiger Studien sollte es daher sein, therapeutische Konzepte zum Schutz der endothelialen Glykokalyx zu untersuchen. Die Rolle des ANP als potentieller Auslöser für ein Glykokalyxshedding sollte Anlass für weitere tierexperimentelle und klinische Forschungsvorhaben sein.

5 Zusammenfassung

Ein gesundes vaskuläres Endothel ist extrazellulär mit membrangebundenen Molekülen ausgekleidet [53]. Dies sind zum einen Proteoglykane, die aus einem Kernprotein, beispielsweise Syndecan, und mehreren Glykosaminoglykan-Seitenketten, beispielsweise Heparansulfat oder Hyaluron, bestehen [62]. Neben den Proteoglykanen bilden Glykoproteine das Rückgrat dieser Struktur. Diese als „endothiale Glykokalyx“ bezeichnete Schicht kann mittels konfokaler Lasermikroskopie mit einer Dicke von bis zu 4 µm dargestellt werden. Bedingt durch die Lokalisation zwischen dem Blutstrom und den Endothelzellen ist die endothiale Glykokalyx ein essentieller Bestandteil der vaskulären Barriere. Sie beeinflusst die vaskuläre Permeabilität, moduliert Zellinteraktionen wie Leukozyten- und Thrombozytenadhäsion, vermittelt Schubspannung an das Endothel und wirkt vasoprotектив. Diese Eigenschaften gehen verloren, sobald die Glykokalyx zerstört wird.

Eine Destruktion der endothelialen Glykokalyx konnte tierexperimentell durch Ischämie/Reperfusion und durch die Applikation von TNF- α oder oxidierten Lipoproteinen ausgelöst werden. Darüber hinaus konnte durch Infusion von atrialem natriuretischen Peptid (ANP) ein Glykokalyxsheding (Abspaltung einzelner Glykokalyxbestandteile von der Endothelmembran) nachgewiesen werden.

Zum Shedding beim Menschen existieren bis heute wenige Daten. Bei gefäßchirurgischen Operationen an der Aorta mit globaler oder partieller Ischämie konnte erstmals eine Zerstörung der Glykokalyx während der Reperfusion gezeigt werden. Zudem wurden bei Patienten im septischen Schock erhöhte Glykosaminoglykanwerte nachgewiesen.

Ziel der vorliegenden Studie war es, mögliche Auslöser für ein Glykokalyxsheding beim Menschen zu untersuchen. Prinzipiell kamen die tierexperimentell untersuchten Noxen wie Ischämie/Reperfusion, Entzündungsmediatoren oder das ANP in Frage. Für die Untersuchung der Ischämie/Reperfusion boten sich Patienten, die sich einem koronarchirurgischen Eingriff unterziehen mussten, in besonderem Maße an, da die Patienten entweder am schlagenden Herzen (OPCAB-

Methode, ohne Ischämie von Herz und Lungen) oder unter Verwendung der Herz-Lungen-Maschine (HLM-Methode, mit Ischämie/Reperfusion von Herz und Lungen) operiert wurden.

In einer Beobachtungsstudie wurden bei 30 koronarchirurgischen Patienten Bestandteile der endothelialen Glykokalyx (Syndecan-1, Heparansulfat und Hyaluron) im Blut bestimmt. Die Patienten wurden entweder am schlagenden Herzen (OPCAB-Methode, n=15) oder unter Verwendung der Herz-Lungen-Maschine (HLM-Methode, n=15) operiert. Ferner wurden mögliche Auslöser für ein Glykokalyxsheding beim Menschen durch Zytokinbestimmungen (Interleukin-6, -8, und -10) und durch Bestimmung von ANP untersucht.

Sowohl bei Patienten, die mit der HLM-Methode operiert wurden, als auch bei Patienten, die mit der OPCAB-Methode operiert wurden, konnte ein signifikantes Shedding von Syndecan-1, Heparansulfat und Hyaluron beobachtet werden. In beiden Patientenkollektiven kam es im Verlauf der Operationen zu signifikanten Anstiegen der Zytokinkonzentrationen (Interleukin-6, -8, und -10) und der ANP Konzentrationen.

Da eine Zerstörung der Glykokalyx sowohl bei Patienten, die mit der OPCAB-Methode operiert wurden (ohne Ischämie von Herz und Lungen), als auch bei Patienten, die mit der HLM-Methode operiert wurden (mit Ischämie/Reperfusion von Herz und Lungen) beobachtet werden konnte, scheint Ischämie/Reperfusion im untersuchten Patientenkollektiv nicht der alleinige Auslöser eines Glykokalyxsheddings zu sein. Folglich könnten andere mögliche Trigger, wie eine vermehrte Freisetzung von ANP oder erhöhte Konzentrationen inflammatorischer Zytokine für das beobachtete Shedding verantwortlich sein.

Ein Vergleich des zeitlichen Ablaufs der Ansteige von ANP und von inflammatorischen Zytokinen als mögliche Auslöser für ein Glykokalyxsheding mit dem zeitlichen Ablauf des Sheddings der drei Glykokalyxkomponenten designierte in beiden Patientengruppen ANP als den wahrscheinlichen Auslöser.

Verdeutlicht man sich die physiologische Bedeutung der endothelialen Glykokalyx, scheint eine Protektion dieser vaskulären Struktur ein vielversprechendes Ziel zu sein. Für die vorliegende Studie bedeutet dies konkret, dass eine Vermeidung der Freisetzung von ANP durch einen behutsamen Umgang mit dem Herzen sinnvoll scheint.

6 Literaturverzeichnis

- [1] R. Adamson, J. Lenz, X. Zhang, G. Adamson, S. Weinbaum, F. Curry. Oncotic pressures opposing filtration across non-fenestrated rat microvessels. *The Journal of Physiology*, 557:889, 2004.
- [2] A. Ahluwalia, R.J. MacAllister, A.J. Hobbs. Vascular actions of natriuretic peptides. *Basic Research in Cardiology*, 99:83, 2004.
- [3] T. Annecke, D. Chappell, C. Chen, M. Jacob, U. Welsch, C. Sommerhoff, M. Rehm, P. Conzen, B.F. Becker. Sevoflurane preserves the endothelial glycocalyx against ischaemia/reperfusion injury. *British Journal of Anaesthesia*, 104:414, 2010.
- [4] A.L. Barker, O. Konopatskaya, C.R. Neal, J.V. Macpherson, J.L. Whatmore, C.P. Winlove, P.R. Unwin, A.C. Shore. Observation and characterisation of the glycocalyx of viable human endothelial cells using confocal laser scanning microscopy. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 6:1006, 2004.
- [5] G.F. Baxter. The natriuretic peptides. *Basic Research in Cardiology*, 99:71, 2004.
- [6] B.F. Becker, D. Chappell, M. Jacob. Endothelial glycocalyx and coronary vascular permeability: the fringe benefit. *Basic Research in Cardiology*, 105:687, 2010.
- [7] A. Blixt, M. Braide, R. Myrhage, U. Bagge. Vital microscopic studies on the capillary distribution of leukocytes in the rat cremaster muscle. *International Journal of Microcirculation, Clinical and Experimental*, 6:273, 1987.
- [8] T. Bombeli, B.R. Schwartz, J.M. Harlan. Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIbIIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), $\alpha v\beta 3$ integrin, and GPIba. *The Journal of Experimental Medicine*, 187:329, 1998.

- [9] D. Bruegger, M. Jacob, M. Rehm, M. Loetsch, U. Welsch, P. Conzen, B.F. Becker. Atrial natriuretic peptide induces shedding of endothelial glycocalyx in coronary vascular bed of guinea pig hearts. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*, 289:1993, 2005.
- [10] D. Bruegger, M. Rehm, J. Abicht, J.O. Paul, M. Stoeckelhuber, M. Pfirrmann, B. Reichart, B.F. Becker, F. Christ. Shedding of the endothelial glycocalyx during cardiac surgery: On-pump versus off-pump coronary artery bypass graft surgery. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 138:1445, 2009.
- [11] D. Bruegger, M. Rehm, M. Jacob, D. Chappell, M. Stoeckelhuber, U. Welsch, P. Conzen, B.F. Becker. Exogenous nitric oxide requires an endothelial glycocalyx to prevent postischemic coronary vascular leak in guinea pig hearts. *Critical Care*, 12:73, 2008.
- [12] R. Chambers, B.W. Zweifach. Intercellular cement and capillary permeability. *Physiological Reviews*, 27:436, 1947.
- [13] D. Chappell, N. Doerfler, M. Jacob, M. Rehm, U. Welsch, P. Conzen, B.F. Becker. Glycocalyx protection reduces leukocyte adhesion after ischemia/reperfusion. *Shock*, 34:133, 2010.
- [14] D. Chappell, K. Hofmann-Kiefer, M. Jacob, M. Rehm, J. Briegel, U. Welsch, P. Conzen, B.F. Becker. TNF- α induced shedding of the endothelial glycocalyx is prevented by hydrocortisone and antithrombin. *Basic Research in Cardiology*, 104:78, 2009.
- [15] D. Chappell, M. Jacob, B.F. Becker, K. Hofmann-Kiefer, P. Conzen, M. Rehm. Expedition Glykokalyx. *Der Anaesthetist*, 57:959, 2008.
- [16] D. Chappell, M. Jacob, K. Hofmann-Kiefer, D. Bruegger, M. Rehm, P. Conzen, U. Welsch, B.F. Becker. Hydrocortisone preserves the vascular barrier by protecting the endothelial glycocalyx. *Anesthesiology*, 107:776, 2007.
- [17] D. Chappell, M. Jacob, O. Paul, L. Mehringer, W. Newman, B.F. Becker. Impaired glycocalyx barrier properties and increased capillary tube haematocrit. *The Journal of Physiology*, 586:4585, 2008.

- [18] D. Chappell, M. Jacob, M. Rehm, M. Stoeckelhuber, U. Welsch, P. Conzen, B.F. Becker. Heparinase selectively sheds heparan sulphate from the endothelial glycocalyx. *Biological Chemistry*, 389:79, 2008.
- [19] J. Christenson, J. Maurice, F. Simonet, V. Velebit, M. Schmuziger. Normothermic versus hypothermic perfusion during primary coronary artery bypass grafting. *Cardiovascular Surgery*, 3:519, 1995.
- [20] M. Classen, V. Diehl, K. Kochsiek. *Innere Medizin*. Urban & Schwarzenberg, 1991.
- [21] A.A. Constantinescu, H. Vink, J.A.E. Spaan. Endothelial cell glycocalyx modulates immobilization of leukocytes at the endothelial surface. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23:1541, 2003.
- [22] F.R.E. Curry, C.B. Rygh, T. Karlsen, H. Wiig, R.H. Adamson, J.F. Clark, Y.C. Lin, B. Gassner, F. Thorsen, I. Moen. Atrial natriuretic peptide modulation of albumin clearance and contrast agent permeability in mouse skeletal muscle and skin: role in regulation of plasma volume. *The Journal of Physiology*, 588:325, 2010.
- [23] J.F. Danielli. Capillary permeability and oedema in the perfused frog. *The Journal of Physiology*, 98:109, 1940.
- [24] N.C. Davidson, A.D. Struthers. Brain natriuretic peptide. *Journal of Hypertension*, 12:329, 1994.
- [25] A.J. De Bold. Atrial natriuretic factor of the rat heart. Studies on isolation and properties. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine*, 170:133, 1982.
- [26] C. Desjardins, B.R. Duling. Heparinase treatment suggests a role for the endothelial cell glycocalyx in regulation of capillary hematocrit. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*, 258:647, 1990.

- [27] V.S. Dole, W. Bergmeier, H.A. Mitchell, S.C. Eichenberger, D.D. Wagner. Activated platelets induce Weibel-Palade-body secretion and leukocyte rolling in vivo: role of P-selectin. *Blood*, 106:2334, 2005.
- [28] M.J. Eppihimer, J. Russell, D.C. Anderson, B.A. Wolitzky, D.N. Granger. Endothelial cell adhesion molecule expression in gene-targeted mice. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*, 273:1903, 1997.
- [29] R. Fahraeus, T. Lindqvist. The viscosity of the blood in narrow capillary tubes. *American Journal of Physiology*, 96:562, 1931.
- [30] J.A. Florian, J.R. Kosky, K. Ainslie, Z. Pang, R.O. Dull, J.M. Tarbell. Heparan sulfate proteoglycan is a mechanosensor on endothelial cells. *Circulation Research*, 93:136, 2003.
- [31] M. Gouverneur, J.A.E. Spaan, H. Pannekoek, R.D. Fontijn, H. Vink. Fluid shear stress stimulates incorporation of hyaluronan into endothelial cell glycocalyx. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*, 290:458, 2006.
- [32] D.N. Granger. Ischemia-reperfusion: mechanisms of microvascular dysfunction and the influence of risk factors for cardiovascular disease. *Microcirculation*, 6:167, 1999.
- [33] L. Groban, A.W. Cowley Jr., T.J. Ebert. Atrial natriuretic peptide augments forearm capillary filtration in humans. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*, 259:258, 1990.
- [34] C. Henry, B.R. Duling. TNF- α increases entry of macromolecules into luminal endothelial cell glycocalyx. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*, 279:2815, 2000.
- [35] V.H. Huxley, F.E. Curry. Differential actions of albumin and plasma on capillary solute permeability. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*, 260:1645, 1991.

- [36] V.H. Huxley, V.L. Tucker, K.M. Verburg, R.H. Freeman. Increased capillary hydraulic conductivity induced by atrial natriuretic peptide. *Circulation Research*, 60:304, 1987.
- [37] N.S. Ihrcke, L.E. Wrenshall, B.J. Lindman, J.L. Platt. Role of heparan sulfate in immune system-blood vessel interactions. *Immunology Today*, 14:500, 1993.
- [38] M. Jacob, D. Bruegger, M. Rehm, U. Welsch, P. Conzen, B.F. Becker. Contrasting effects of colloid and crystalloid resuscitation fluids on cardiac vascular permeability. *Anesthesiology*, 104:1223, 2006.
- [39] M. Jacob, D. Chappell, K. Hofmann-Kiefer, P. Conzen, K. Peter, M. Rehm. Determinanten des insensiblen Flüssigkeitsverlustes. *Der Anaesthetist*, 56:747, 2007.
- [40] M. Jacob, M. Rehm, M. Loetsch, J.O. Paul, D. Bruegger, U. Welsch, P. Conzen, B.F. Becker. The endothelial glycocalyx prefers albumin for evoking shear stress-induced, nitric oxide-mediated coronary dilatation. *Journal of Vascular Research*, 44:435, 2007.
- [41] U. Jung, K. Ley. Regulation of E-selectin, P-selectin, and intercellular adhesion molecule 1 expression in mouse cremaster muscle vasculature. *Microcirculation*, 4:311, 1997.
- [42] V. Kainulainen, L. Nelimarkka, H. Järveläinen, M. Laato, M. Jalkanen, K. Elenius. Suppression of syndecan-1 expression in endothelial cells by tumor necrosis factor- α . *Journal of Biological Chemistry*, 271:18759, 1996.
- [43] M. Krane, R. Bauernschmitt, R. Lange. Die Herz-Lungen-Maschine. *Medizintechnik*, 1373, 2009.
- [44] J.R. Levick. Contributions of the lymphatic and microvascular systems to fluid absorption from the synovial cavity of the rabbit knee. *The Journal of Physiology*, 306:445, 1980.
- [45] E.R. Levin, D.G. Gardner, W.K. Samson. Natriuretic peptides. *New England Journal of Medicine*, 339:321, 1998.

- [46] H.R. Lijnen, D. Collen. Endothelium in hemostasis and thrombosis. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 39:343, 1997.
- [47] J.H. Luft. Fine structures of capillary and endocapillary layer as revealed by ruthenium red. *Federation Proceedings*, 25:1773, 1966.
- [48] S. Mochizuki, H. Vink, O. Hiramatsu, T. Kajita, F. Shigeto, J.A.E. Spaan, F. Kajiya. Role of hyaluronic acid glycosaminoglycans in shear-induced endothelium-derived nitric oxide release. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*, 285:722, 2003.
- [49] S. Molica, G. Vitelli, R. Mirabelli, G. Digiesu, D. Giannarelli, A. Cuneo, D. Ribatti, A. Vacca. Serum levels of syndecan-1 in B-cell chronic lymphocytic leukemia: Correlation with the extent of angiogenesis and disease-progression risk in early disease. *Leukemia and Lymphoma*, 47:1034, 2006.
- [50] A.W. Mulivor, H.H. Lipowsky. Inflammation-and ischemia-induced shedding of venular glycocalyx. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*, 286:1672, 2004.
- [51] A.M. Müller, M.I. Hermanns, C. Cronen, C.J. Kirkpatrick. Comparative study of adhesion molecule expression in cultured human macro-and microvascular endothelial cells. *Experimental and Molecular Pathology*, 73:171, 2002.
- [52] Nelson, I. Berkestedt, A. Schmidtchen, L. Ljunggren, M. Bodelsson. Increased levels of glycosaminoglycans during septic shock: relation to mortality and the antibacterial actions of plasma. *Shock*, 30:623, 2008.
- [53] M. Nieuwdorp, M.C. Meuwese, H. Vink, J.B.L. Hoekstra, J.J.P. Kastelein, E.S.G. Stroes. The endothelial glycocalyx: a potential barrier between health and vascular disease. *Current Opinion in Lipidology*, 16:507, 2005.
- [54] P.M. Oliver, S.W.M. John, K.E. Purdy, R. Kim, N. Maeda, M.F. Goy, O. Smithies. Natriuretic peptide receptor 1 expression influences blood pressures of mice in a dose-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95:2547, 1998.

- [55] M.M.T. Pfaffendorf. Zusammenhang zwischen Permeabilitätsänderungen peripherer und pulmonaler Kapillaren vor und nach coronaren Bypassoperationen unter Verwendung der Herzlungenmaschine im Vergleich zu Bypassoperationen am schlagenden Herzen. *PhD thesis*, Ludwig-Maximilians-Universität München, 2011.
- [56] K.C. Potger, D. McMillan, T. Connolly, J. Southwell, H. Dando, K. O'Shaughnessy. Coronary artery bypass grafting: an off-pump versus on-pump review. *The Journal of Extra-Corporeal Technology*, 34:260, 2002.
- [57] A.R. Pries, T.W. Secomb, P. Gaehtgens. The endothelial surface layer. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 440:653, 2000.
- [58] A.R. Pries, T.W. Secomb, M. Sperandio, P. Gaehtgens. Blood flow resistance during hemodilution: effect of plasma composition. *Cardiovascular Research*, 37:225, 1998.
- [59] N.S. Quinsey, A.L. Greedy, S.P. Bottomley, J.C. Whisstock, R.N. Pike. Antithrombin: in control of coagulation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36:386, 2004.
- [60] M. Rehm, D. Bruegger, F. Christ, P. Conzen, M. Thiel, M. Jacob, D. Chappell, M. Stoeckelhuber, U. Welsch, B. Reichart. Shedding of the endothelial glycocalyx in patients undergoing major vascular surgery with global and regional ischemia. *Circulation*, 116:1896, 2007.
- [61] M. Rehm, S. Zahler, M. Lötsch, U. Welsch, P. Conzen, M. Jacob, B.F. Becker. Endothelial glycocalyx as an additional barrier determining extravasation of 6% hydroxyethyl starch or 5% albumin solutions in the coronary vascular bed. *Anesthesiology*, 100:1211, 2004.
- [62] S. Reitsma, D.W. Slaaf, H. Vink, M.A.M.J. van Zandvoort, M.G.A. oude Egbrink. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 454:345, 2007.
- [63] Z.M. Ruggeri. Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 1:1335, 2003.

- [64] K. Sabrane, M.N. Kruse, L. Fabritz, B. Zetsche, D. Mitko, B.V. Skryabin, M. Zwiener, H.A. Baba, M. Yanagisawa, M. Kuhn. Vascular endothelium is critically involved in the hypotensive and hypovolemic actions of atrial natriuretic peptide. *Journal of Clinical Investigation*, 115:1666, 2005.
- [65] H. Schweitz, P. Vigne, D. Moinier, C. Frelin, M. Lazdunski. A new member of the natriuretic peptide family is present in the venom of the green mamba (*Dendroaspis angusticeps*). *Journal of Biological Chemistry*, 267:13928, 1992.
- [66] J.B. Seal, B.L. Gewertz. Vascular dysfunction in ischemia-reperfusion injury. *Annals of Vascular Surgery*, 19:572, 2005.
- [67] M. Sperandio. Selectins and glycosyltransferases in leukocyte rolling in vivo. *The FEBS Journal*, 273:4377, 2006.
- [68] E.H. Starling. On the absorption of fluids from the connective tissue spaces. *The Journal of Physiology*, 19:312, 1896.
- [69] S.V. Subramanian, M.L. Fitzgerald, M. Bernfield. Regulated shedding of syndecan-1 and -4 ectodomains by thrombin and growth factor receptor activation. *Journal of Biological Chemistry*, 272:14713, 1997.
- [70] T. Sudoh, N. Minamino, K. Kangawa, H. Matsuo. C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 168:863, 1990.
- [71] K. Svennevig, T.N. Hoel, A.S. Thiara, S.O. Kolset, A. Castelheim, T.E. Mollnes, F. Brosstad, E. Fosse, J.L. Svennevig. Syndecan-1 plasma levels during coronary artery bypass surgery with and without cardiopulmonary bypass. *Perfusion*, 23:165, 2008.
- [72] A.M.F. Tovar, D.A. de Mattos, M.P. Stelling, B.S.L. Sarcinelli-Luz, R.A. Nazareth, P.A.S. Mourão. Dermatan sulfate is the predominant antithrombotic glycosaminoglycan in vessel walls: implications for a possible physiological function of heparin cofactor II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1740:45, 2005.

- [73] J.W.G.E. VanTeeffelen, A.A. Constantinescu, J. Brands, J.A.E. Spaan, H. Vink. Bradykinin- and sodium nitroprusside-induced increases in capillary tube haematocrit in mouse cremaster muscle are associated with impaired glycocalyx barrier properties. *The Journal of Physiology*, 586:3207, 2008.
- [74] H. Vink, A.A. Constantinescu, J.A.E. Spaan. Oxidized lipoproteins degrade the endothelial surface layer: implications for platelet-endothelial cell adhesion. *Circulation*, 101:1500, 2000.
- [75] H. Vink, B.R. Duling. Identification of distinct luminal domains for macromolecules, erythrocytes, and leukocytes within mammalian capillaries. *Circulation Research*, 79:581, 1996.
- [76] P.H. Weigel, V.C. Hascall, M. Tammi. Hyaluronan synthases. *Journal of Biological Chemistry*, 272:13997, 1997.
- [77] H.L. Wong, R.M. Pfeiffer, T.R. Fears, R. Vermeulen, S. Ji, C.S. Rabkin. Reproducibility and correlations of multiplex cytokine levels in asymptomatic persons. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 17:3450, 2008.
- [78] T.G. Yandle. Biochemistry of natriuretic peptides. *Journal of Internal Medicine*, 235:561, 1994.

7 Anhang

7.1 Patienteneinwilligung



Klinikum der Universität München - Klinik für Anaesthesiologie
Marchioninistr. 15 · 81377 München

Dr. Dirk Brügger
Arzt für Anaesthesiologie

Telefon +49 (0)89 7095 - 0
Telefax +49 (0)89 7095 - 8886
Dirk.Bruenger@med.lmu.de

www.klinikum.uni-muenchen.de

Postanschrift:
Marchioninistr. 15
D-81377 München

Ihr Zeichen:

Unser Zeichen:

Einverständniserklärung: „Bestimmung von Glykokalyxbestandteilen und natriuretischen Peptiden bei koronarchirurgischen Patienten“

Leiter der Studie:

Dr. Dirk Brügger, Tel.: 089/7095-3404

Prof. Dr. Frank Christ, Tel.: 089/7095-3416

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

bei Ihnen ist in den nächsten Tagen eine herzchirurgische Operation geplant. Diese findet entweder am schlagenden Herzen (OPCAB-Methode) statt, oder es ist der Einsatz einer Herz-Lungenmaschine (HLM-Methode) zur Aufrechterhaltung Ihrer Kreislauffunktion notwendig.

Jedes gesunde Gefäß ist innen von einer Schicht ausgekleidet, der so genannten Glykokalyx. Bei herzchirurgischen Eingriffen ist es denkbar, dass es zu Veränderungen im Bereich der Glykokalyx der Blutgefäße im Körper kommen kann, welche bisher nur unzureichend untersucht sind. Diese Veränderungen könnten abhängig vom verwendeten Operationsverfahren (OPCAB vs. HLM Methode) sein. Um potentielle Auslöser für einen Abbau der Glykokalyx und mögliche Auswirkungen einer veränderten Glykokalyx besser zu verstehen, ist es wichtig, nähere Informationen über die Qualität und Quantität der abgelösten Bestandteile im Blut zu erhalten. Die Erkennung einer Störung oder Abnutzung der Glykokalyx kann zukünftig von Nutzen sein, da sie uns eine besser abgestimmte Therapie ermöglichen könnte.

In einer klinischen Beobachtungsstudie werden wir dazu während der Operation sechs Blutproben (insgesamt ca. 20 ml) aus einem der bereits bestehenden Katheter entnehmen.

Dies ist eine sehr geringe Menge und stellt für Sie keinerlei Risiko dar. Die medizinisch notwendige Behandlung wird durch diese Untersuchungen nicht verändert oder verzögert.

Die Teilnahme an der Studie ist freiwillig. Selbstverständlich entstehen Ihnen bei einer Nichtteilnahme keinerlei Nachteile. Sie können Ihre Einwilligung zu jedem Zeitpunkt und ohne Angabe von Gründen widerrufen, ohne dass Ihnen daraus Nachteile entstehen.

Bei dieser Studie werden die Vorschriften über die ärztliche Schweigepflicht und den Datenschutz eingehalten. Es werden persönliche Daten und Befunde über Sie erhoben, gespeichert und verschlüsselt (pseudoanonymisiert), d.h. weder Ihr Name noch Ihre Initialen oder das exakte Geburtsdatum werden weitergegeben. Im Falle Ihres Widerrufs der Einwilligung werden die verschlüsselt gespeicherten Daten vernichtet. Der Zugang zu den Originaldaten ist auf folgende Personen beschränkt: Dr. Dirk Brügger, Prof. Dr. Frank Christ.

Die Unterlagen werden im Klinikum der Universität München, Marchioninistr. 15, 81377 München, zehn Jahre lang aufbewahrt.

Im Falle von Veröffentlichungen der Studienergebnisse bleibt die Vertraulichkeit der persönlichen Daten ebenfalls gewährleistet.

Sollten Sie noch weitere Fragen haben, so wenden Sie sich bitte an uns.

Hiermit erkläre ich mich mit der Teilnahme an der klinischen Studie einverstanden. Die Studie wurde mir von Dr. ausführlich erklärt und ich habe keine weiteren Fragen bezüglich der Durchführung dieser Untersuchung.

Patient/in

(Unterschrift)

Arzt/Ärztin

(Unterschrift)

München, den

Ich bin mit der Erhebung und Verwendung persönlicher Daten und Befunddaten nach Maßgabe der Patienteninformation einverstanden.

Patient/in

(Unterschrift)

München, den

7.2 Publikation

Die vorliegende Arbeit wurde teilweise in folgender Originalarbeit publiziert:

D. Bruegger, L. Schwartz, D. Chappell, M. Jacob, M. Rehm, M. Vogeser, F. Christ, B. Rechert, B.F. Becker. Release of atrial natriuretic peptide precedes shedding of the endothelial glycocalyx equally in patients undergoing on-and off-pump coronary artery bypass surgery. *Basic Research in Cardiology*, 106:1111, 2011

8 Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei meinem Betreuer und Doktorvater **PD Dr. med. Dirk Brügger** bedanken, der mich immer mit viel Begeisterung und Geduld bei dieser Arbeit unterstützt und motiviert hat. Ohne ihn hätte ich diese Arbeit wahrscheinlich nie vollendet.

Danke auch an die Abteilungen für Anästhesie und Herzchirurgie, die mich immer unterstützt und informiert haben.

Ein großer Dank gilt auch dem Forschungslabor der Klinik für Anaesthesiologie der Universität München, und hier besonders Frau **Gabriele Gröger**, für ihre hervorragende Einarbeitung.

Der letzte ganz besondere Dank gilt meiner Familie, vor allem meinen Eltern **Carola** und **Jochen Schwartz** und meinem Bruder **Christian Schwartz** für die große Unterstützung und den Rückhalt, den ihr mir immer gegeben habt.

Eidesstattliche Versicherung

Schwartz, Lisa Caroline

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Bestimmung von Glykokalyxbestandteilen und atrialem natriuretischen Peptid bei koronarchirurgischen Patienten“

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.