

Aus der Klinik für Allgemeine, Unfall-, und Wiederherstellungschirurgie  
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Wolfgang Böcker

**Hyaluronan und Syndekan-1 als Marker des klinischen Verlaufs nach  
kardiopulmonaler Reanimation**

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

vorgelegt von

Livia Ocker

aus

Hamburg

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatterin: Priv. Doz. Dr. med. Viktoria Bogner-Flatz

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Jens Michael Heyn

Priv. Doz. Dr. med. Thomas R. Niethammer

Mitbetreuung durch die

promovierte Mitarbeiterin:

Dr. med. Mareen Braunstein

Dekan:

Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung:

28.02.2019

Meinen Eltern und Wolf-Hartmut in Dankbarkeit

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 HERZKREISLAUFSTILLSTAND UND REANIMATION .....	1
1.1.1 Epidemiologie .....	1
1.1.2 Prognose .....	1
1.2 DAS POSTREANIMATIONSSYNDROM .....	2
1.2.1 Die Phasen des Postreanimationssyndroms .....	3
1.2.2 Die Pathophysiologie des Postreanimationssyndroms .....	4
1.3 DIE ENDOTHELIALE GLYKOKALYX .....	9
1.3.1 Hauptkomponenten der endothelialen Glykokalyx .....	10
1.3.2 Physiologische Bedeutung .....	11
1.3.2.1 Vaskuläre Permeabilität .....	11
1.3.2.2 Zellinteraktion .....	12
1.3.2.3 Kontrollzentrum des Mikroumfelds .....	13
1.3.3 Shedding der endothelialen Glykokalyx .....	14
1.3.3.1 Shedding und Inflammation .....	14
1.3.3.2 Shedding und Ischämie/Reperfusion .....	15
1.3.4 Das Postreanimationssyndrom, induziert durch Glykokalyxshedding.....	16
<b>2. ZIELSETZUNG .....</b>	<b>17</b>
<b>3. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>20</b>
3.1 PATIENTENKOLLEKTIV .....	20
3.2 BLUTENTNAHME UND KONSERVIERUNG.....	21
3.3 BESTIMMUNG DER GLYKOKALYXBESTANDTEILE .....	22
3.3.1 Hyaluronanbestimmung .....	22
3.3.2 Syndekan-1-Bestimmung .....	25
3.4 MULTIORGANVERSAGEN .....	28
3.5 ÜBERLEBEN .....	30
3.6 STATISTIK .....	30
<b>4. ERGEBNISSE .....</b>	<b>31</b>
4.1 PATIENTENKOLLEKTIV .....	31
4.2 KONZENTRATIONSDYNAMIK FÜR HYALURONAN UND SYNDEKAN-1 .....	33
4.2.1 Hyaluronan .....	34
4.2.2 Syndekan-1 .....	35

4.3 KORRELATION DER SERUMKONZENTRATIONEN MIT KLINISCHEN PARAMETERN .....	36
4.3.1 Hyaluronan und Multiorganversagen .....	36
4.3.2 Hyaluronan und Überleben .....	37
4.3.3 Syndekan-1 und Multiorganversagen.....	39
4.3.4 Syndekan-1 und Überleben .....	40
<b>5. DISKUSSION .....</b>	<b>42</b>
5.1 METHODIK.....	44
5.1.1 Studiendesign .....	44
5.1.2 Studienkollektiv .....	46
5.1.3 Messmethode zur Bestimmung der Blutserumwerte.....	47
5.1.4 Bestimmung des Multiorganversagens anhand des MOF-Scores .....	50
5.2 MESSRESULTATE .....	51
5.2.1 Die Dynamik der Serummesswerte .....	51
5.2.2 Besonderheit der Nullstundenwerte .....	58
5.2.3 Korrelation der Serumkonzentrationsdynamik mit klinischen Parametern .....	59
5.3 AUSBLICK/ KLINISCHE RELEVANZ .....	63
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>65</b>
<b>7. LITERATURNACHWEIS .....</b>	<b>68</b>
<b>8. DANKSAGUNG .....</b>	<b>82</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Phasen des Postreanimationssyndroms .....	4
Abbildung 2: Die endotheliale Glykokalyx übernommen aus: The structure and function of the endothelial glycocalyx layer (62). .....	10
Abbildung 3: Schematische Darstellung der kompetitiven ELISA-Messung von Hyaluronan .....	24
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Sandwich-ELISA zur Messung von Syndekan-1 .....	27
Abbildung 5: Die Altersverteilung der Studienpatienten .....	31
Abbildung 6: Serumkonzentration von Hyaluronan innerhalb der ersten 48h nach Herz-Kreislauf-Stillstand.....	34
Abbildung 7: Serumkonzentration von Syndekan-1 innerhalb der ersten 48h nach Herz-Kreislauf-Stillstand.....	36
Abbildung 8: Korrelation der Serumhyaluronanwerte mit der Entwicklung eines Multiorganversagens innerhalb der ersten 48h nach Herz-Kreislauf-Stillstand .....	37
Abbildung 9: Serumhyaluronanwerte in Bezug auf das Outcome innerhalb der ersten 48h nach Herz-Kreislauf-Stillstand .....	38
Abbildung 10: Korrelation der Serumsyndekan-1-Werte mit der Entwicklung eines Multiorganversagens innerhalb der ersten 48h nach Herz-Kreislauf-Stillstand .....	40
Abbildung 11: Serumsyndekan-1-Werte in Bezug auf das Outcome innerhalb der ersten 48h nach Herz-Kreislauf-Stillstand .....	41
Abbildung 12: Serumsyndekan-1-Werte in Bezug auf das Outcome innerhalb der ersten 48h nach Herz-Kreislauf-Stillstand .....	60

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ablauf Hyaluronan Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kit .....	25
Tabelle 2: Ablauf Human sCD138 (Syndecan-1) ELISA-Kit .....	28
Tabelle 3: Der Multiple Organ Failure Score (MOF Score) aus Lefering et al. (94).....	30
Tabelle 4: Epidemiologische Daten des untersuchten Patientenkollektivs .....	33
Tabelle 5: Serumkonzentrationen von Hyaluronan in ng/ml .....	34
Tabelle 6: Serumkonzentrationen von Syndekan-1 in ng/ml .....	35
Tabelle 7: Ergebnisse multivariate Analyse Hyaluronan und MOF-Score .....	36
Tabelle 8: Mann-Whitney-U-Test: Serumkonzentration von Hyaluronan.....	38
Tabelle 9: Ergebnisse multivariate Analyse Hyaluronan und Überleben .....	39
Tabelle 10: Ergebnisse multivariate Analyse Syndekan-1 und MOF-Score.....	39
Tabelle 11: Mann-Whitney-U-Test: Serumkonzentration Syndekan-1 Mittelwerte.....	41

# **1. Einleitung**

## **1.1 Herzkreislaufstillstand und Reanimation**

### *1.1.1 Epidemiologie*

Der plötzliche Herztod ist eine der häufigsten Todesursachen weltweit (1). In Europa und den USA versterben etwa 822.000 Patienten pro Jahr an einem plötzlichen Herztod (1, 2). Laut dem deutschen Reanimationsregister der Deutschen Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin lag die Inzidenz von außerklinischen Herz-Kreislauf-Stillständen 2013 bei 82,1 Fällen pro 100.000 Einwohner in Deutschland (3). Dabei sind etwa 82% der Herz-Kreislauf-Stillstände kardial bedingt (4). Mit dem Anstieg der Inzidenz von Herzkreislauferkrankungen in westlichen Industrienationen wächst auch die Zahl an Patienten, die infolge eines akuten Herz-Kreislauf-Stillstands reanimiert werden müssen. 2013 wurden insgesamt 46,1 außerklinische Reanimationen pro 100.000 Einwohner erfasst (3).

### *1.1.2 Prognose*

Die Morbidität und Mortalität nach einem Herz-Kreislauf-Stillstand bleiben trotz erheblicher Verbesserung der Reanimationstechniken und fortwährenden Weiterentwicklungen in der modernen Intensivmedizin weiterhin hoch (5, 6). Etwa 350 000 Patienten werden pro Jahr in der Europäischen Union nach prähospitalen Herz-Kreislauf-Stillstand wiederbelebt (7). Bei bis zu der Hälfte dieser Patienten kann der Kreislauf wiederhergestellt werden „Return of spontaneous circulation“ (ROSC) (8). Allerdings versterben immer noch bis zu 70 % dieser Patienten in der unmittelbaren Postreanimationsphase (7).



Die Ursachen hierfür sind vielfältig. Pell et al. konnten zeigen, dass die Ätiologie des Herzkreislaufstillstands einen Einfluss auf die Prognose hat. Nach kardial bedingtem Herzkreislauf-Stillstand lag die 1-Jahres-Überlebensrate bei 6%. Reanimationen infolge einer nicht-kardial bedingten Ursache hingegen zeigten nur eine 1-Jahres-Überlebensrate von 2% (4). Das schlechte Langzeit-Outcome bei Patienten, welche die initiale Phase der präklinischen Versorgung überleben, ist durch komplexe pathophysiologische Prozesse mit Beteiligung multipler Organe geprägt (9, 10). Neben der Ganzkörperischämie, die einen globalen Gewebe- und Organschaden verursacht, kommt es durch die nachfolgende Reperfusion zu einer erneuten Gewebebeeinträchtigung (11, 12).

Diese pathophysiologischen Prozesse werden unter dem Begriff des Postreanimationssyndroms zusammengefasst und prägen neben den Vorerkrankungen und der Grunderkrankung, die ursprünglich zum Herzkreislaufstillstand geführt hat, das klinische Bild des Patienten nach erfolgreicher Reanimation (10).

## **1.2 Das Postreanimationssyndrom**

Nach einem Herz-Kreislauf-Stillstand und kardiopulmonaler Reanimation mit anschließendem „Return of spontaneous circulation“ (ROSC) kommt es zu einem Ischämie-Reperfusionssyndrom des gesamten Körpers (13). Einerseits kommt es hierbei zu einer lokalisierten Gewebeschädigung, wobei die Hirnschädigung eine vornehmliche Rolle spielt (13). Andererseits imponieren systemische Schäden, die durch eine generalisierte Inflammationsreaktion, eine Endothelaktivierung und die Beeinflussung des Gerinnungssystems erklärt sind (10). Damit gleicht die Pathophysiologie des Postreanimationssyndroms in zahlreichen Aspekten der einer Sepsis und wird vielfach auch als „sepsis-like syndrome“ bezeichnet (13, 14). Die systemische Inflammation verstärkt die Organschädigung durch Mikro- und Makrozirkulationsstörungen, durch Stoffwechselfysbalancen und infolge direkter Leukozyten-vermittelter Gewebsschädigung

(10, 13). In einer Untersuchung von Geppert et al. konnten bei 66% der Patienten nach Herz-Kreislauf-Stillstand und ROSC die Kriterien eines „systemic inflammatory response syndrome“ (SIRS) nachgewiesen werden (15).

### *1.2.1 Die Phasen des Postreanimationssyndroms*

Ähnlich wie bei einem SIRS beschreiben Nolan et al. in ihrer Arbeit einen phasenhaften Verlauf des Postreanimationssyndroms, wobei die ersten 72 Stunden nach Herz-Kreislauf-Stillstand und ROSC die pathophysiologisch bedeutende Phase darstellen (10). Insgesamt teilt sich das Postreanimationssyndrom in vier Phasen auf.

Die ersten 20 Minuten nach einem ROSC werden als sofortige Postreanimationsphase zusammengefasst. Danach folgt die frühe Postreanimationsphase, die 6 bis 12 Stunden anhält. Zu diesem Zeitraum kommt es im Rahmen der systemischen Inflammationsreaktion zu einer ausgeprägten Gewebeschädigung. Die intermediäre Phase beginnt 12 Stunden nach einem Wiedererlangen des Spontankreislaufs und hält bis zu 72 Stunden nach ROSC an. Auch hier sind Prozesse, die eine weitere Organschädigung hervorrufen, noch aktiv. An diese Phase schließen sich letztlich die Erholungs- und Rehabilitationsphasen an. Ab diesem Zeitpunkt sind Prognosen verlässlicher und das spätere Outcome möglicherweise vorhersehbar (10).

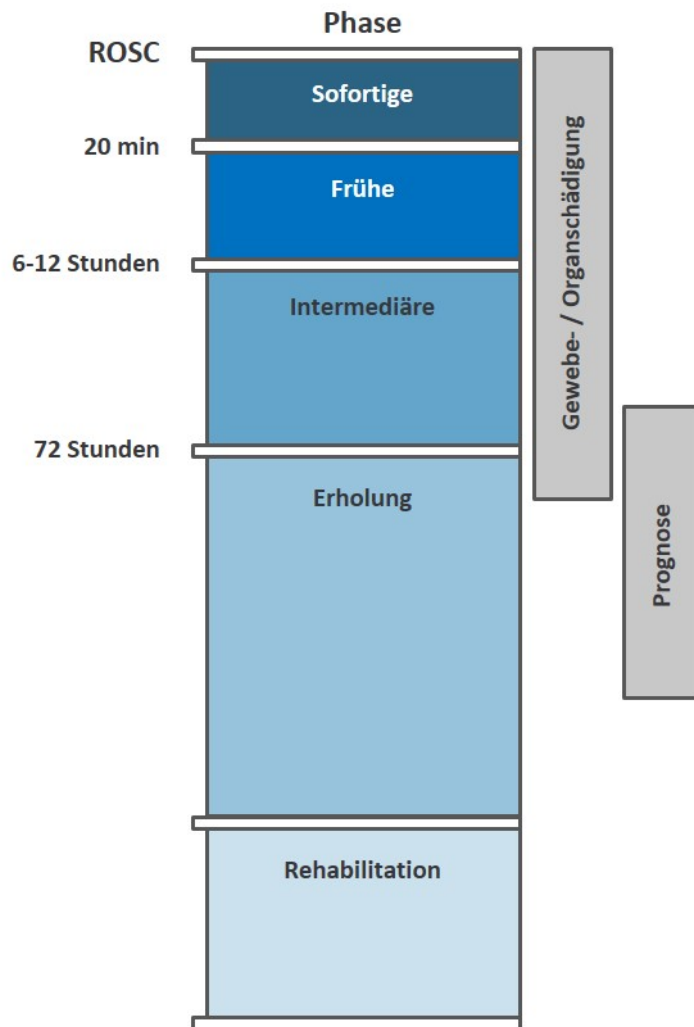


Abbildung 1: Die Phasen des Postreanimationssyndroms aus Nolan et al. (10).

### 1.2.2 Die Pathophysiologie des Postreanimationssyndroms

Das Postreanimationssyndrom ist durch eine vielschichtige Kombination pathophysiologischer Prozesse geprägt und weist die folgenden Hauptkomponenten auf: neurologische Schädigung, Myokarddysfunktion, Ursache des Herz-Kreislaufstillstands und systemisches Ischämie-Reperfusionssyndrom (10).

Aufgrund seiner komplexen pathophysiologischen Abläufe ist das Postreanimationssyndrom jedoch im Detail bis heute nicht vollständig verstanden. Entscheidend für die Pathophysiologie scheint neben der globalen Gewebeschädigung durch das Ischämie-Reperfusionssyndrom vor allem die unspezifische zelluläre Aktivierung im Rahmen der systemischen Inflammationsreaktion zu sein (10, 14, 16).

### *Das Ischämie-Reperfusionssyndrom*

Während des Herz-Kreislauf-Stillstands („No-flow“-Phase) führt die Hypoxie bei Überschreiten der gewebsabhängigen Ischämietoleranz nachweislich zu irreversiblen Zellschäden bis hin zur Gewebsnekrose (14). Pathophysiologisch wird aufgrund des Sauerstoffmangels die oxydative Phosphorylierung in den Mitochondrien gehemmt und es kommt zur Umstellung auf einen anaeroben Zellstoffwechsel mit einem Abbau des ATP-Vorrats in der Zelle und einem Anstieg von Hypoxanthin als ein zentrales Abbauprodukt (16, 17, 18). Der ATP-Abfall führt außerdem zu einer Plasmamembrandepolarisierung, dem Öffnen von spannungsabhängigen Calcium-Kanälen und einer Akkumulation von intrazellulärem Calcium, woraufhin verschiedene degenerative Prozesse induziert werden (16, 18). Der intrazelluläre Calciumüberschuss und der Anstieg von Hypoxanthin führen ferner zu einer Umwandlung des Enzyms Xanthindehydrogenase zu Xanthinoxidase (18). Mit Hilfe der Xanthinoxidase wird Hypoxanthin über Xanthin zu Harnsäure oxidiert, wobei es zur Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies wie Hyperoxid-Anion ( $O_2^-$ ), Wasserstoffperoxide ( $H_2O_2$ ) und Hydroxyl-Radikale (HO) kommt (16, 18). Im Rahmen der partiellen Reperfusion („Low-flow“-Phase), entweder spontan entwickelt oder hervorgerufen durch die Thoraxkompressionen im Rahmen der kardiopulmonalen Reanimation, führen die reaktiven Sauerstoffspezies über eine Cytochrominaktivierung, eine Lipidperoxidation der Zellmembranen und die Regulierung von Transmembranproteinen zur weiteren Zellschädigung (16). Huet et al. konnten diesbezüglich aufzeigen, dass Plasma von Patienten nach Herz-Kreislauf-Stillstand und ROSC eine hochgradige Endothelzellschädigung über pro-oxidative Mechanismen und Störung der Atmungskette in den Mitochondrien an humanen Umbilikalvenen hervorrief (19). Die generalisierte Endothelschädigung durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) spielt eine vornehmliche Rolle in der Entwicklung der systemischen Inflammationsreaktion im Rahmen des Postreanimationssyndroms (14, 16).

### *Die systemische Inflammationsreaktion*

Die weitere Pathophysiologie des Postreanimationssyndroms zeichnet sich durch eine Endothel-vermittelte systemische Inflammationsreaktion aus, welche das Risiko für die Entwicklung einer Multiorgandysfunktion und eines konsekutiven Multiorganversagens begünstigt sowie zu einer erhöhten Anzahl an Infektionen führt und damit die hohe Morbidität und Mortalität nach erfolgreicher Reanimation erklärt (14, 16, 20, 21, 22, 23).

Bereits drei Stunden nach kardiopulmonaler Reanimation fanden Adrie et al. einen deutlichen Anstieg der Interleukine IL-6, IL-8 und IL-10 im Blut. In den folgenden 48 Stunden fielen die Konzentrationen dann wieder ab (23). Die Zytokine IL-6 und IL-8 werden im Rahmen einer Inflammationsreaktion gebildet und spielen eine wichtige proinflammatorische Rolle (24, 25). IL-6 wirkt vornehmlich über eine Aktivierung der Synthese von Akute-Phase-Proteinen und stimuliert ferner T- und B-Zellen (24). Außerdem induziert IL-6 die Expression von Selektinen auf der Endotheloberfläche, so dass eine Leukozytenadhäsion begünstigt wird. IL-8 hingegen fungiert als Chemokin durch die Rekrutierung und Aktivierung vor allem neutrophiler Granulozyten im Entzündungsgewebe (25). Beide Interleukine waren in den Plasmamessungen von Adrie und Kollegen zu den frühen Messpunkten drei Stunden nach Reanimation bei Patienten mit negativen Outcome signifikant höher als bei Patienten, die überlebten (23).

Auch das vornehmlich antiinflammatorische Zytokin IL-10 reguliert über die Inhibition der Aktivierung von NK-Zellen, TH1-Zellen und Makrophagen die akute und chronische Immunantwort (26). Bei Patienten mit negativen Outcome waren die Plasmakonzentrationen von IL-10 in der genannten Studie signifikant erhöht (23).

Der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF- $\alpha$ ) stellt ein weiteres wichtiges proinflammatorisches Zytokin dar und weist ebenfalls eine Korrelation mit dem Überleben nach kardiopulmonaler Reanimation und ROSC auf (23). TNF- $\alpha$  spielt eine vornehmliche Rolle bei der Initiierung

der Inflammationsreaktion (13). Die lokale Produktion führt, wie auch durch IL-6, unter anderem zu einer Einwanderung von Leukozyten (15, 23, 27, 28). Die Leukozyten binden vorerst über Selektine locker an das Endothel, dieser Prozess wird als „rolling“ bezeichnet (13). Nach der Leukozytenaktivierung kommt es zu einem festen Anheften an das vaskuläre Endothel. Dieses wird durch den Rezeptor CD18 ( $\beta_2$ -Integrin) und dem zugehörigen endothelialen Liganden „intercellular adhesion molecule 1“ (ICAM-1) vermittelt und als „sticking“ bezeichnet (13, 21). Interleukine wie beispielsweise TNF- $\alpha$  und IL-1 induzieren hierbei die endothelialen Adhäsionsmoleküle (13). Schließlich treten die Leukozyten ins Gewebe über (21).

Über diverse Prozesse schädigen die Leukozyten das Gewebe, sie setzen freie Radikale und gewebsschädigende Enzyme wie die Elastase frei (28, 29, 30, 31). In verschiedenen Studien kam es bereits während der kardiopulmonalen Reanimation zu einem nachweisbaren Anstieg der Leukozytenelastase im Plasma (28, 29, 30, 31).

Auch die Aktivierung des Komplementsystems führt zu einer nachweisbaren Gewebeschädigung durch Leukozytenaktivierung sowie Zytokinausschüttung (30). Ein durch Komplementfaktorspaltung entstandener zytotoxischer Membranangriffskomplex induziert durch Perforation der Zellmembran die Lyse der Zielzellen. (30, 32, 33) Außerdem werden mittels Komplementaktivierung proinflammatorische Peptidfragmente (C3a + C5a) freigesetzt, welche unter anderem eine Aktivierung sowie ein Anhaften von Leukozyten an der endothelialen Oberfläche induzieren (30, 32, 33). Die Komplementaktivierung führt zudem zu einer endothelialen Translokation und Expression der oben genannten Adhäsionsmoleküle „P-Selektine“ sowie der interzellulären Adhäsionsmoleküle (ICAM-1) (30). Im Rahmen dieser endothelialen Entzündungsreaktion führt die Zellschädigung zu einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität mit Extravasation von Kolloiden und Ödembildung (27, 34).

Während des Postreanimationssyndroms kommt es außerdem zu einer Aktivierung der Blutgerinnung (13). Bereits wenige Minuten nach kardiopulmonaler Reanimation wird die plasmatische Gerinnung in Gang gesetzt, es bilden sich Thrombin-Antithrombin(TAT)-Komplexe und Fibrinmonomere aus (35, 36). Außerdem werden Thrombozyten aktiviert, Plättchenfaktor 4 und Thromboxan A<sub>2</sub> sind erhöht messbar (35, 36). Die endogene Fibrinolyse ist hingegen nicht kompensatorisch erhöht, sodass eine Dysbalance von Blutgerinnung und Fibrinolyse entsteht (37, 38). Ein wichtiger Grund hierfür ist, dass durch eine Ausschüttung von Inhibitoren wie Plasminogenaktivatorinhibitor Typ 1 (PAI-1) im Rahmen der akuten Entzündungsreaktion und der Endothelschädigung die Fibrinolyse gehemmt wird (38). Die Aktivierung von Blutgerinnung und Inflammation sind eng miteinander verbunden (13). Neben Leukozyten werden auch Thrombozyten über P-Selektin aktiviert (13, 39). TNF- $\alpha$  wirkt zudem am Gefäßendothel prokoagulatorisch, indem es Thromboplastin induziert (13). Über eine Induktion von PAI-1 hemmt es zudem die Fibrinolyse (40). Dies führt beispielsweise im Gehirn trotz adäquater systemischer Kreislaufverhältnisse zu regionalen Reperfusionstörungen auf mikrozirkulatorischer Ebene (13, 41, 42).

Einen ersten Schlüsselschritt in der Entwicklung der systemischen, Endothel-vermittelten Inflammationsreaktion im Rahmen des Postreanimationssyndroms stellt die Schädigung der endothelialen Glykokalyx dar. Aufgrund ihrer Lage zwischen dem Gefäßendothel und dem Intravasalraum hat die endotheliale Glykokalyx einen wichtigen Einfluss auf viele molekulare und zelluläre Interaktionen und spielt somit eine große Rolle in verschiedensten pathophysiologischen Abläufen (43). Rubio-Gayosso et al. konnten nachweisen, dass im Rahmen von Ischämie und Reperfusion reaktive Sauerstoffspezies auch zu einer Schädigung der endothelialen Glykokalyx führen (44). Außerdem konnte in dieser Studie gezeigt werden,

dass es zu einer lokalen Freisetzung von Sauerstoffradikalen kommt, welche über die an die Glykokalyx gebundene Xanthinoxidoreduktase vermittelt wird.

### **1.3 Die endotheliale Glykokalyx**

Die endotheliale Glykokalyx besteht aus einem Netzwerk transmembranöser und membrangebundener Moleküle und kleidet die vaskulären Endothelzellen im menschlichen Körper aus (43, 45). Diese luminale Schicht schützt das Endothel und bildet eine vaskuläre Barrierefunktion mit vielfältigen physiologischen Funktionen, die im Weiteren näher erläutert werden. (43, 45).

Die Glykokalyx ist ca. 0,5µm dick und besteht aus einem Geflecht membrangebundener Proteoglykane und Glykoproteine, die das Grundgerüst bilden und gemeinsam mit löslichen Bestandteilen wie Glykosaminoglykanketten und Plasmaproteinen eine dynamische Oberflächenschicht, welche auch als endothelial surface layer (ESL) bezeichnet wird, bilden (43, 46, 47, 48).

Der endothelial surface layer misst eine Höhe von ca. 1 µm und ist damit sogar höher als die anliegenden Endothelzellen (43, 47, 48). Ein dynamisches Gleichgewicht zwischen dem ESL und dem fließenden Blut sorgt für eine kontinuierliche Veränderung der Höhe und der Zusammensetzung (43). So befindet sich die endotheliale Glykokalyx in einem permanenten Auf- und Abbau, hervorgerufen unter anderem durch das Enzym-getriggerte oder durch Schubspannung („shear stress“) ausgelöste „Shedding“, worunter man ein Abspalten einzelner Glykokalyxbestandteile von dem Netzwerk oder der Endothelmembran versteht. Diese komplexe Dynamik ist bisher allerdings noch nicht vollständig geklärt (43, 49).



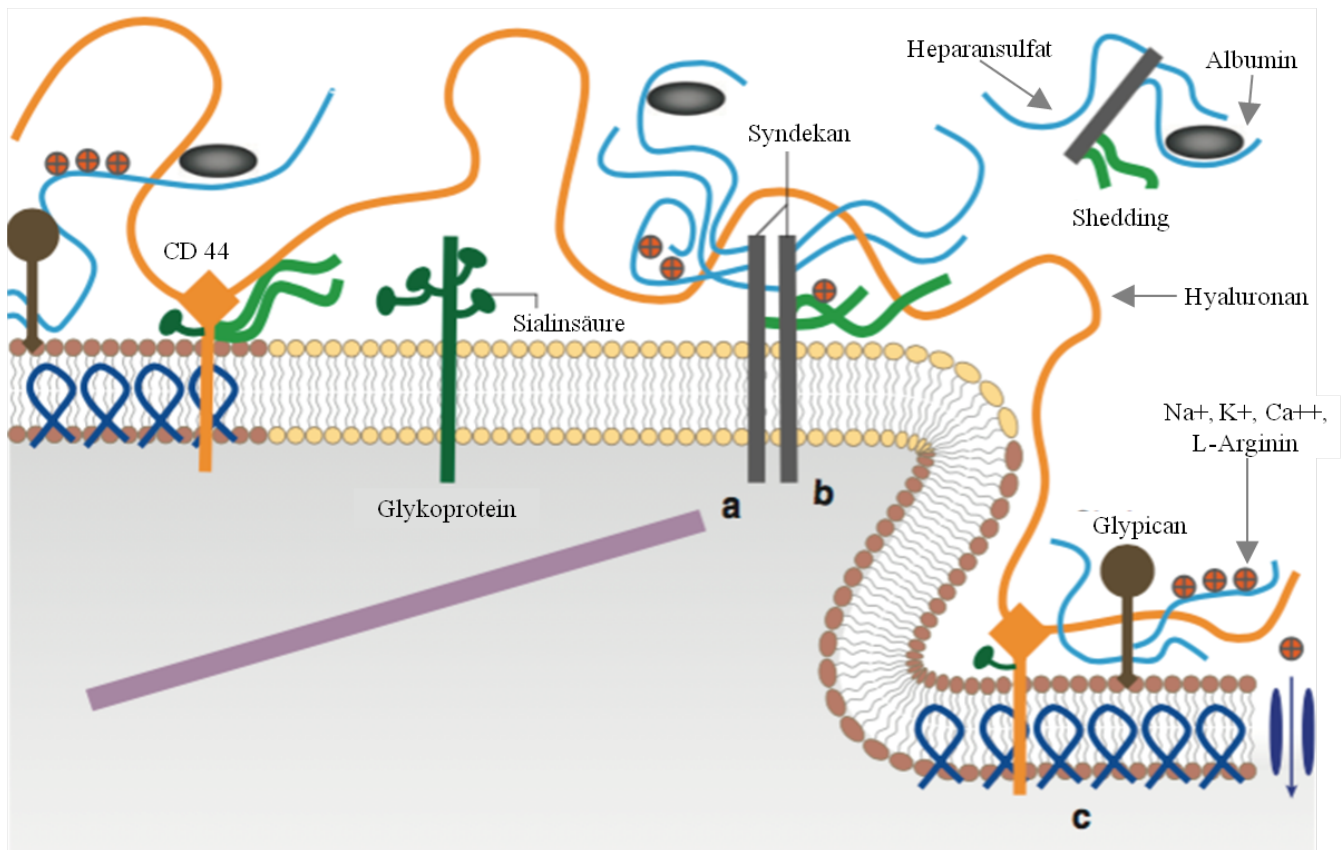


Abbildung 2: Die endotheliale Glykokalyx übernommen aus: *The structure and function of the endothelial glycocalyx layer* (62).

### 1.3.1 Hauptkomponenten der endothelialen Glykokalyx

Proteoglykane bilden neben den Glykoproteinen ein wichtiges Fundament der Glykokalyx (45). Sie bestehen aus einem Kernprotein, an welches eine oder mehrere Glykosaminoglykan-Seitenketten gebunden sind. Die Kernproteine variieren in ihrer Größe, der Anzahl gebundener Glykosaminoglykan-Seitenketten und der Art der Verankerung mit der Zellmembran. Sie können aber auch als lösliche Bestandteile vorliegen. Die wichtigsten Vertreter der membrangebundenen Kernproteine sind Syndekane und Glypicane. Die Proteoglykanexpression wird durch verschiedenste Stimuli gesteuert und ist daher sehr variabel (50). So werden Syndekane beispielsweise durch ein genau reguliertes Expressionsmuster bestimmt, welches durch Endothelzellaktivierung und unterschiedliche Chemokine reguliert ist (51). Glykosaminoglykanketten (GAG-Seitenketten) bestehen aus linearen Disaccharid-Polymeren unterschiedlicher Länge, die durch Sulfonierung und

(De-)acetylierung modifiziert werden können (45). Es sind fünf verschiedene Arten von Glykosaminoglykanketten beschrieben: Heparansulfat, Chondroitinsulfat, Dermatansulfat, Keratansulfat und Hyaluronan. Ein zentrales Glykosaminoglykan ist Hyaluronan. Es unterscheidet sich allerdings von den anderen Glykosaminoglykanen durch die fehlende Bindung an ein Kernprotein (45). Die konkrete Verankerung von Hyaluronan mit der Zellmembran konnte bisher nicht erforscht werden. Es ist lediglich bekannt, dass Hyaluronan an den CD44-Rezeptor bindet und über diesen mit Hyaluronan-Synthasen, welche sich auf der zytosolischen Seite der Zellmembran befinden, verbunden ist (52, 53). Es ist auch möglich, dass Hyaluronan, zumindest teilweise, nicht an der Zellmembran verankert ist (45). Da Hyaluronan die Möglichkeit besitzt, miteinander stabile Komplexe zu bilden, schreibt man diesem sehr großen, linearen Molekül eine wichtige Rolle für die Ausbildung von Kreuzverbindungen und die daraus resultierende Stabilität in dem labilen Glykokalyx-Netzwerk zu (45, 54, 55). Die Glykosaminoglykanketten weisen zudem verschiedene spezifische Bindungsstellen für Plasmaproteine auf und haben somit einen wesentlichen Einfluss auf die lokale Proteinbindung, -aktivität, und -funktion sowie die Gefäßpermeabilität. Bereits geringe Modifizierungen der Seitenketten führen daher zu maßgeblichen Konsequenzen für die komplexe physiologische Funktion der endothelialen Glykokalyx (45).

### *1.3.2 Physiologische Bedeutung*

Die endotheliale Glykokalyx ist aufgrund ihrer Lage zwischen Endothel und Intravasalraum Stellwerk vieler molekularer und zellulärer Interaktionen, verschiedenste wichtige physiologische Abläufe werden hier beeinflusst (43).

#### *1.3.2.1 Vaskuläre Permeabilität*

Die endotheliale Glykokalyx fungiert zum einen als ein wichtiger Regulator der Gefäßpermeabilität (43). Bisher wurde die vaskuläre Barrierefunktion über eine Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Gradienten zwischen Intravasalraum (hoher

kolloidosmotischer Druck) und interstitiellem Kompartiment (niedriger kolloidosmotischer Druck) erklärt (56). Dieses klassische Modell, das Ernest Starlin 1896 erstmals beschrieb, konnte nun teilweise widerlegt werden (43). Neuere Studien zeigten in den letzten Jahren mehrfach, dass interstitielle und intravasale Proteinkonzentrationen nahezu gleich sind und dass trotzdem eine vaskuläre onkotische Barriere existiert (57, 58, 59, 60). Es konnte belegt werden, dass neben den Endothelzellen auch die endotheliale Glykokalyx dem Auswärtsstrom von Kolloiden und flüssigen Bestandteilen aus dem Gefäßsystem entgegenwirkt (60). Die endotheliale Glykokalyx bindet auswärts strömende Kolloide und fungiert somit als „Kolloidfilter“ (61). Durch die Bindung der Plasmaproteine, hierunter vor allem das Albumin, wird die Glykokalyx zum ESL und stellt durch seine hohe kolloidosmotische Konzentration eine suffiziente Barrierefunktion gegen eine Extravasation dar (58). Daher bildet sich der Konzentrationsgradient nicht zwischen dem intravasalen und dem interstitiellen Kompartiment, sondern zwischen der Glykokalyx und dem luminal gelegenen Raum, der unterhalb der Glykokalyx liegt und proteinfrei ist (61). Konsequenz daraus ist, dass eine Alteration des ESL mit einem Flüssigkeits- und Proteinshift in das Interstitium einhergeht, welches zu dem oben genannten Kapillarlecksyndrom mit generalisierter Ödembildung führt (43).

#### *1.3.2.2 Zellinteraktion*

Neben der Regulation der vaskulären Permeabilitätsbarriere und Erhaltung des kolloidosmotischen Gradienten hat die Glykokalyx einen wesentlichen Einfluss auf die Interaktion zwischen den Zellen des Blutsystems und den vaskulären Endothelzellen (45, 62). Die endotheliale Glykokalyx wirkt wie eine Art Schutzschicht über der Endotheloberfläche, sodass zirkulierende Blutzellen normalerweise kaum Kontakt zur Endothelzelloberfläche haben (62). Vinc et al. konnten aufzeigen, dass eine Alterierung der endothelialen Glykokalyx mit einer vermehrten Thrombozytenadhäsion einhergeht (63). Die Rolle der Glykokalyx bei der Interaktion zwischen Leukozyten und der Gefäßwand scheint konträr zu sein: Zum einen

bindet die endotheliale Glykokalyx Adhäsionsmoleküle wie P-Selektine, ICAM-1 und VCAM-1 (45); über diese können zirkulierende Blutzellen an das Endothel binden. Zum anderen wird durch das kompakte Netz aus Glykoproteinen und Proteoglykanen, in welchem sich die Adhäsionsmoleküle dann umhüllt befinden, eine mögliche Leukozytenbindung verringert (43). Eine Verletzung dieser Schutzschicht führt daher zum Freilegen der Adhäsionsmoleküle und es kommt zum oben genannten „rolling“ und Anheften der Leukozyten an das Gefäßendothel (64, 65).

#### *1.3.2.3 Kontrollzentrum des Mikroumfelds*

Aufgrund der strukturellen Vielfalt der Glykosaminoglykan-Seitenketten, an welche Plasmamoleküle binden, tragen Proteoglykane wesentlich zu der funktionellen Bedeutung der Glykokalyx bei (45). Durch die Bindung von Plasmamolekülen wie Rezeptoren, Enzymen und deren Liganden kommt es zu einem lokalen Konzentrationsanstieg dieser Substanzen. Damit beeinflusst die Glykokalyx unterschiedlichste Signalwege und enzymatische Reaktionen. Eine Interaktion von Ligand und Rezeptor mit der Glykokalyx ist beispielsweise Voraussetzung für eine Signalübertragung des Fibroblast growth factors (FGF) (66, 67).

Die endotheliale Glykokalyx spielt über ihren Einfluss auf das plasmatische Gerinnungssystem eine zentrale vaskuloprotektive Rolle (68, 69). Wichtige antikoagulatorisch wirkende Mediatoren wie Antithrombin III, Heparin Co-Faktor II, Thrombomodulin und Tissue factor pathway inhibitor binden an die Glykokalyx (45, 68, 70). Antithrombin III inhibiert beispielsweise prokoagulatorische Enzyme wie Thrombin und die aktivierten Faktoren IX und X (FIXa, FXa) (71). Durch eine Bindung an spezifische Regionen im Heparansulfat der Glykokalyx kann die antikoagulatorische Aktivität des Antithrombin III sogar erhöht werden (68). Zudem schützt Antithrombin III vor enzymatischer Schädigung der endothelialen Glykokalyx durch TNF- $\alpha$  (72).

Neben der Hemmung fehlgeleiteter Gerinnungsaktivierung schützt die endotheliale Glykokalyx die Gefäßwände vor oxidativem Stress, indem sie antioxidativ wirkende Enzyme,

wie die Superoxiddismutase (SOD) bindet (73). Die endotheliale Glykokalyx moduliert außerdem über eine Bindung von Zytokinen und eine Verhinderung einer Zytokin-Endothelzell-Interaktion die Immunantwort (45). Ein Abspalten von Heparansulfat aus der Glykokalyx führt somit zu einer erhöhten Endothelzellaktivierung durch Zytokine (74).

### *1.3.3 Shedding der endothelialen Glykokalyx*

Verschiedene exogene und endogene Faktoren beeinflussen den Aufbau der endothelialen Glykokalyx (43). Sie stellt ein labiles Gebilde dar, sodass ein Ablösen einzelner spezifischer Strukturen („Shedding“) zu einem Verlust der physiologisch relevanten Funktion führen kann (75).

#### *1.3.3.1 Shedding und Inflammation*

Momentan ist noch wenig über die Regulation des Gleichgewichts zwischen Synthese und Abbau der endothelialen Glykokalyx bekannt (76). Nachweislich sind aber die unterschiedlichen Mechanismen einer lokalen oder generalisierten Inflammationsreaktion in der Lage, die endotheliale Glykokalyx zu alterieren (43). Nelson et al. wiesen beispielsweise erhöhte Werte zirkulierender Glykokalyxbestandteile im Plasma bei Patienten im septischen Schock nach (77). Das Ausmaß des Sheddings von Glykokalyxbestandteilen korrelierte hierbei mit erhöhten Komplikationsraten und Mortalität. Durch die Freisetzung verschiedener Entzündungsmediatoren wie beispielsweise TNF- $\alpha$  kommt es zu einem Abbau der Glykokalyx (65). TNF- $\alpha$  aktiviert außerdem Mastzellen, welche selbst neben Histamin, verschiedene Zytokine und Enzyme wie Heparanase und diverse Proteasen ausschütten (78, 79, 80, 81). Mulivor et al. konnten zudem belegen, dass in Folge einer Entzündungsreaktion ein Abbau der endothelialen Glykokalyx durch intrazelluläre oder membrangebundene Proteasen und Lyasen, welche über G-Proteine ausgeschüttet und aktiviert werden, erfolgt (82). Die Enzyme, welche in der Lage sind einzelne Komponenten der Glykokalyx abzuspalten, werden als „Sheddasen“ bezeichnet (76).

Des Weiteren konnten erhöhte Konzentrationen von abgelösten Glykokalyxbestandteilen im Plasma bei kritisch kranken Patienten mit respiratorischer Insuffizienz, nach akutem Myokardinfarkt oder nach schwerem Trauma gemessen werden (83, 84, 85).

### *1.3.3.2 Shedding und Ischämie/Reperfusion*

Experimentelle Studien der letzten Jahre bewiesen außerdem eine relevante Schädigung der endothelialen Glykokalyx im Rahmen einer partiellen oder globalen Ischämie und wiedereinsetzenden Reperfusion (76, 82, 86, 87). Pathophysiologisch kommt es durch die initiale Ischämie sowie durch oxidativen Stress, Mikrozirkulationsstörungen, und die Aktivierung der Blutgerinnung während der Reperfusion nachweislich zu einem Abbau der endothelialen Glykokalyx (5, 43, 82, 87, 88). Chappell et al. beobachteten nach warmer Ischämiezeit von 20 Minuten einen nahezu vollständigen Abbau der Glykokalyx an isolierten Meerschweinchenherzen sowie die Ausbildung eines erheblichen interstitiellen Ödems (88). Die Ischämietoleranz und das damit verbundene Ausmaß der Schädigung scheinen dabei von dem betroffenen Gewebe abzuhängen. Im Darm zeigte sich hierbei erst nach einer Ischämiezeit von 60 Minuten ein nachweislich ausgeprägter Glykokalyxschaden (82).

Das Shedding von Glykokalyxbestandteilen nach Ischämie und Reperfusion ist bis dato im Menschen noch nicht vollständig ergründet. Als eine der ersten Arbeitsgruppen konnten Rehm et al. einen Glykokalyxabbau im menschlichen Körper nachweisen (87). Blutuntersuchungen an gefäßchirurgischen Patienten mit regionaler und globaler Ischämie zeigten nach Reperfusion eine Erhöhung der Glykokalyxbestandteile Syndekan-1 und Heparansulfat im Plasma. Der Glykokalyxschaden entsprach hierbei proportional der Dauer und dem Ausmaß der Ischämie.

Eine weitere Arbeitsgruppe um Grundmann und Kollegen belegte in ihren Untersuchungen außerdem einen Glykokalyxschaden nach globaler Ischämie und Reperfusion bei Zustand

nach Herz-Kreislauf-Stillstand und erfolgreicher Reanimation (5). Im Vergleich zu den Kontrollpatienten zeigten Plasmamessungen von reanimierten Patienten signifikant höhere Konzentrationen von Syndekan-1, Heparansulfat und Hyaluronan. Es war zudem eine Korrelation der Konzentration von Syndekan-1 und Heparansulfat im Plasma und dem Überleben festzustellen.

#### *1.3.4 Das Postreanimationssyndrom, induziert durch Glykokalyxshedding*

Das Freilegen des Gefäßendothels durch die Ischämie- und Reperfusionen-getriggerte Schädigung der endothelialen Glykokalyx führt zu der in 1.2.2 erläuterten systemischen, Endothel-vermittelten Inflammationsreaktion, welche im Rahmen des Postreanimationssyndroms im Multiorganversagen resultieren kann und die hohe Morbidität und Mortalität nach Herz-Kreislauf-Stillstand und ROSC bedingt (5, 10, 89, 90).

Bro-Jeppesen et al. untersuchten diesen Zusammenhang zwischen der Glykokalyx- bzw. Endothelschädigung, der systemischen Inflammationsreaktion und der Schwere des Postreanimationssyndroms nach Herz-Kreislauf-Stillstand und erfolgreicher Reanimation (90). IL-6, als Maß der systemischen Inflammation, zeigte eine positive Korrelation mit dem Glykokalyxshedding, abgebildet durch erhöhte Syndekan-1-Messwerte, sowie eine positive Korrelation mit der Endothelaktivierung und -schädigung. Außerdem konnte eine positive Korrelation zwischen der Endothelschädigung und der Schwere des Postreanimationssyndroms festgestellt werden. Bezüglich des Überlebens ergab sich in dieser Studie allerdings kein „unabhängiger Zusammenhang“ mit der Endothelschädigung.

## 2. Zielsetzung

Die Entwicklung des Postreanimationssyndroms nach Ganzkörperischämie und -reperfusion während eines Herz-Kreislauf-Stillstands und nach ROSC ist mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität assoziiert (10). Hervorgerufen durch den globalen Ischämie- und Reperfusionsschaden, kommt es zu der Sepsis-ähnlichen Aktivierung einer systemischen Inflammationsreaktion, die zu Multiorganversagen führen kann und die Schwere des Postreanimationssyndroms vornehmlich bedingt (10, 13, 90). Pathophysiologisch spielt hierbei die Aktivierung und die Schädigung des Gefäßendothels durch eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität und die Leukozytenadhäsion am Endothel eine zentrale Rolle (10, 13, 14, 28, 90). Die Interaktionen zwischen der endothelialen Schädigung, der systemischen Inflammationsreaktion und einer Organschädigung sind allerdings nicht vollständig geklärt (90). Neueren Studien zufolge scheint die Verletzung der endothelialen Glykokalyx durch das Freilegen und die Aktivierung des Gefäßendothels einen ersten Schlüsselschritt im Rahmen der systemischen Inflammationsreaktion darzustellen (89).

Grundlegende Vorarbeiten der vorliegenden Studie konnten nach 20-minütiger Hypoxie/Ischämie mit anschließender Reperfusion an isolierten Meerschweinchenherzen eine vermehrte Freisetzung verschiedener Glykokalyxbestandteile im Sinne eines Sheddings nachweisen (76). Untersuchungen des koronarvenösen Effluats zeigten nach Reoxygenierung oder Reperfusion eine signifikante Erhöhung der Glykokalyxbestandteile Syndekan-1 und Heparansulfat im Blut. Rehm und Kollegen wiesen dann als erste Arbeitsgruppe einen Glykokalyxabbau nach Ischämie und Reperfusion im menschlichen Körper nach (87). Bei gefäßchirurgischen Patienten, die im Rahmen der Operation entweder einer regionalen oder einer globalen Ischämie ausgesetzt waren, zeigten die Aufarbeitungen der Serumproben eine



Erhöhung der Glykokalyxbestandteile Syndekan-1 und Heparansulfat. Die indirekt gemessene Glykokalyxschädigung entsprach proportional dem Ausmaß und der Dauer der Ischämie.

Um das Phänomen des Sheddings nach Ischämie und Reperfusion am Menschen besser zu verstehen zu können, war es eines der Ziele dieser Arbeit, die Glykokalyxschädigung im Rahmen der Ganzkörperischämie und -reperfusion nach Herz-Kreislauf-Stillstand und Wiedererlangen eines Spontankreislaufs genauer zu untersuchen. Zur Quantifizierung des Ausmaßes des Glykokalyxschadens erfolgte – auf Basis der Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Annecke et al. – die Messung der abgespaltenen Glykokalyxbestandteile Hyaluronan und Syndekan-1 im Serum der Patienten (76, 91, 92). Da für die Entwicklung des Postreanimationssyndroms die frühe und die intermediäre Phase einen bedeutenden Zeitraum darstellen, wurden die ersten 48 Stunden nach Reanimation untersucht (10).

Des Weiteren galt es den Zusammenhang der Glykokalyxschädigung und der Entwicklung des Postreanimationssyndroms nachzuweisen, so dass in einem weiteren Schritt die Korrelation der Serumkonzentrationen mit den klinischen Parametern Multiorganversagen und Überleben erfolgte. Ein besonderer Fokus dieser Arbeit wurde auf den ersten Serummesswert, den Nullstundenwert (0h), gelegt, welcher durch eine sehr aufwendige initiale Blutentnahme direkt vom behandelnden Notarzt oder bei Ankunft im Schockraum der Zielklinik dokumentiert werden konnte. Dieser „native“ Wert ist von besonderem Interesse, da sich so bereits initiale Veränderungen der Glykokalyx untersuchen lassen, die nicht durch eine eingeleitete Therapie beeinflusst werden. Die von uns untersuchten Parameter könnten daher möglicherweise als „Biomarker“ für die frühe Phase nach Reanimation dienen. Es ist von großem klinischen Interesse, eine zuverlässige Auskunft über den individuellen Status eines reanimierten Patienten zu erhalten und so die individuelle Gefährdung für die Entwicklung eines schweren Ischämie-Reperfusionssyndroms eines jeden Einzelnen

abschätzen zu können. Dabei könnte ein „Serummonitoring“ unter Umständen dazu beitragen, diese besonders gefährdeten Patienten frühzeitig zu erkennen und so die Folgen eines schweren Ischämie-Reperfusionssyndroms unter Umständen abzumildern.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es herauszuarbeiten,

- ob und wie sich die Serumkonzentrationen der beiden Glykokalyxbestandteile im zeitlichen Verlauf der frühen und intermediären Postreanimationsphase verändern,
- ob es bereits möglich ist, initiale Veränderungen der Serumkonzentrationen von Hyaluronan und Syndekan-1 nach ROSC zu evaluieren und mit dem Outcome zu korrelieren,
- ob ein Zusammenhang zwischen den Serumkonzentrationsdynamiken von Hyaluronan und Syndekan-1 und den klinischen Variablen „Multiorganversagen“ und „Überleben“ besteht.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Patientenkollektiv**

In diese prospektive Studie wurden Patienten nach Herz-Kreislauf-Stillstand und Wiedererlangung eines Spontankreislaufs eingeschlossen, bei denen eine Blutentnahme direkt vor Ort durch den behandelnden Notarzt oder spätestens innerhalb von 60 Minuten nach ROSC erfolgte. Die Patienten wurden über die Schockräume der folgenden Kliniken aufgenommen: 1.) Medizinische Klinik und Poliklinik IV, Campus Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München, 2.) Klinikum Rechts der Isar der Technischen Universität München und 3.) Klinikum Schwabing, München. Eine Genehmigung durch die lokale Ethikkommission liegt unter dem Aktenzeichen (282/01) vor. Die prospektive Studie erfolgte in Übereinstimmung mit der aktuellen Revision der Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes (World Medical Association, WMA) sowie mit der EU-Richtlinie zur Good Clinical Practice (GCP).

Die relevanten präklinischen Daten wurden nach Vorgabe des Utstein-Style-Protokolls erfasst (93). Dies beinhaltete unter anderem eine Dokumentation der Daten bezüglich des Herzkreislaufstillstandes, des initialen Herzrhythmus, des Vorliegens eines beobachteten Herzstillstands, der Zeit bis zum Beginn der kardiopulmonalen Reanimation, des eventuellen Vorliegens einer Laienreanimation und der Zeit bis zum ROSC.

Eine schriftliche Einverständniserklärung entsprechend den Richtlinien der Ethikkommission erfolgte, wann immer möglich, nach Zurückerlangen des Bewusstseins des Patienten. War dies nicht möglich, so wurde die Erklärung durch den gesetzlichen Vertreter eingeholt. Im Folgenden sind die Ein- und Ausschlusskriterien detailliert aufgeführt:

### **Einschlusskriterien:**

- Zustand nach kardiopulmonaler Reanimation
- Wiedererlangung eines Spontankreislaufs
- Alter über 18 Jahre
- Eintreffen in der Zielklinik innerhalb von 60 Minuten

### **Ausschlusskriterien:**

- Akute Infektion
- Immunsuppressive Therapie
- Schwangerschaft
- Polytrauma
- Refraktärer kardiogener Schock bei Aufnahme
- Einsatz einer intraaortalen Ballonpumpe
- Einsatz eines linksventrikulären Herzunterstützungssystems

## **3.2 Blutentnahme und Konservierung**

Die vorliegende Studie beinhaltet die Bestimmung der Glykokalyxbestandteile Hyaluronan und Syndekan-1 im Patientenserum zu insgesamt fünf sequentiellen Zeitpunkten. Die initiale Blutentnahme erfolgte nach Wiedererlangung des Spontankreislaufs durch den behandelnden Notarzt bzw. bei Aufnahme der Patienten im Schockraum. Diese wird im Folgenden als 0h bezeichnet und erfolgte innerhalb der ersten 60 Minuten nach ROSC. Weitere Abnahmen folgten nach 6, 12, 24, bzw. 48 Stunden (6h, 12h, 24h, 48h). Als Referenzpunkt für die Bestimmung der Blutentnahmezeitpunkte wurde die vom Rettungsdienst dokumentierte Zeit des Kreislaufstillstands festgelegt. Für die Blutentnahmen wurden Vacutainer-Röhrchen (Beckton Dickinson, Heidelberg) verwendet. Unmittelbar im Anschluss an die Blutentnahme

erfolgte die 10-minütige Zentrifugation der Serumröhrchen. Das überstehende Serum wurde in 2ml Eppendorf-Röhrchen aliquotiert. Diese wurden schlussendlich bei -80°C konserviert.

### **3.3 Bestimmung der Glykokalyxbestandteile**

Die Serumkonzentrationen von Hyaluronan und Syndekan-1 wurden mittels Enzyme-Linked-Immunoabsorbent-Assay (ELISA) bestimmt (Firma Echelon Biosciences Inc./ Firma Diaclone SAS).

#### *3.3.1 Hyaluronanbestimmung*

Zum quantitativen Nachweis der Hyaluronan-Konzentrationen im Serum der Patienten wurde das Hyaluronan Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kit (HA-ELISA) (K-1200; Echelon Biosciences Inc., Salt Lake City, UT, USA) der Firma Echelon Biosciences Inc. verwendet. Der Ablauf dieser ELISA-Messungen wird im Folgenden dargestellt:

Der HA-ELISA ist ein quantitativer Enzym-gebundener Immunoassay, welcher für die *in-vitro* Messungen von Hyaluronan-Konzentrationen in menschlichen oder tierischen biologischen Flüssigkeiten verwendet wird. Beim HA-ELISA handelt es sich um einen kompetitiven ELISA, das Farbsignal ist indirekt proportional zu der Hyaluronankonzentration der Probe. Die zu messenden Proben werden zunächst mit einem HA-Detector gemischt, woraufhin es zu einer kompetitiven Bindung zwischen HA-Detector und Hyaluronan (Antigen) der Serumprobe kommt. Im Anschluss wird das Gemisch auf die HA-ELISA-Detektionsplatte aufgetragen und ein freier, bislang nicht Antigen-gebundener HA-Detector bindet an die Platte. Wie viel HA-Detector an die Platte gebunden ist, wird mit Hilfe einer Enzym-Substrat-Reaktion kolorimetrisch gemessen. Die Farbintensität wird bei einer Wellenlänge von 405nm gemessen. Die Konzentration von Hyaluronan in der zu messenden

Probe wird abschließend mit Hilfe einer Eichkurve, die anhand der Standardverdünnungsreihe erstellt wird, abgelesen.

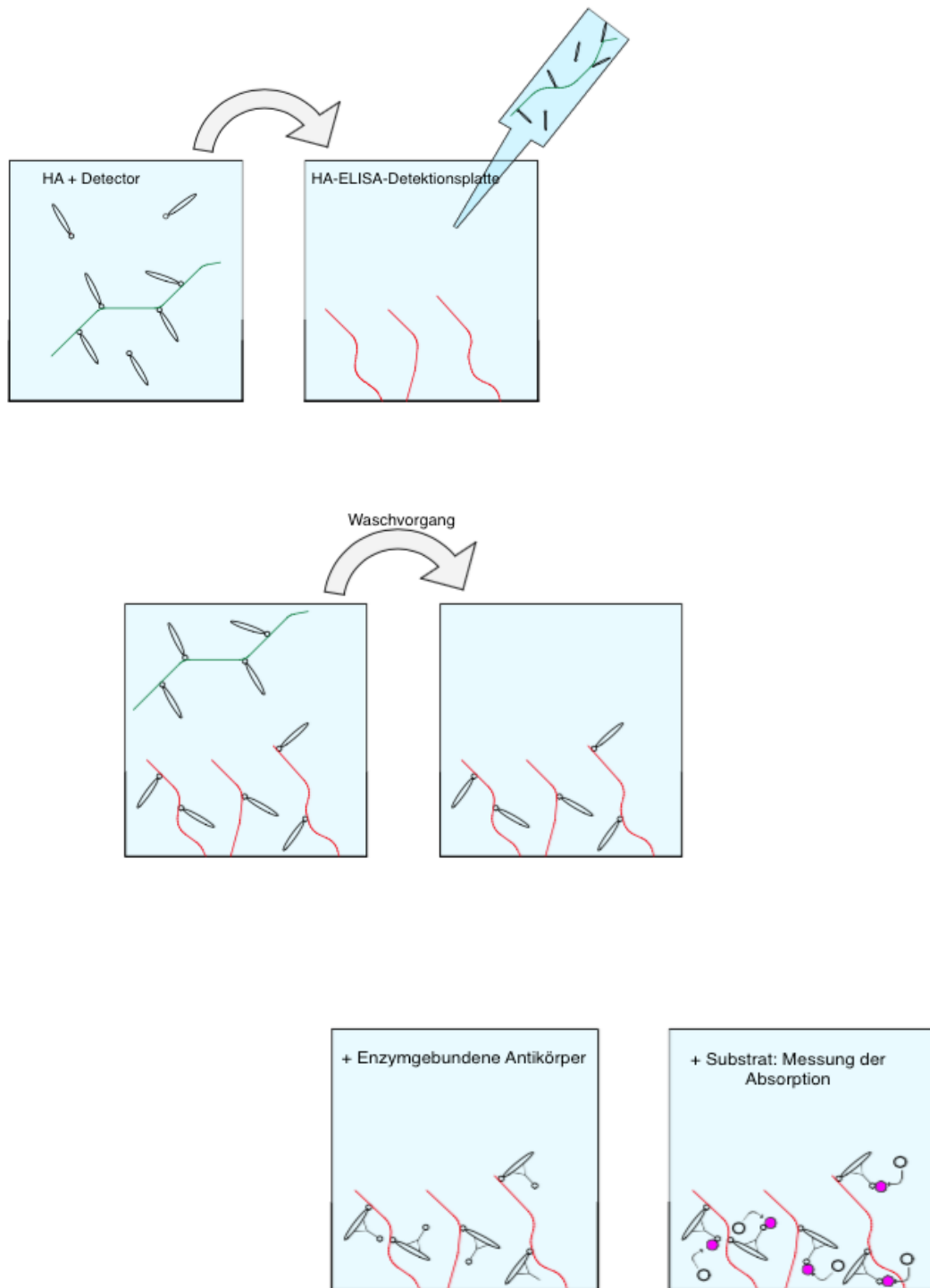


Abbildung 3: Schematische Darstellung der kompetitiven ELISA-Messung von Hyaluronan

Vorbereitung der Standardverdünnungsreihe, (2-fache Verdünnung von 1600 ng/ml - 50 ng/ml) Null-, Leerproben anhand der Herstellerangaben	
1:	Inkubationsplatte: a) Hinzufügen von 100µl Standard-/ Serumproben pro Well b) 150µl Diluent für die Leerprobe, 100µl Diluent für die Nullprobe c) Hinzufügen von 50µl HA Detector pro Well (außer Leerprobe)
2:	Inkubation bei 37°C für 1 h
3:	Übertragen von 100µl der Standard-/ Serumproben auf die Detektionsplatte
4:	Inkubation bei 4°C für 30min
5:	3x Waschen, Entleeren der Wells
6:	Hinzufügen von 100µl working Enzyme pro Well
7:	Inkubation bei 37°C für 30min
8:	3x Waschen, Entleeren der Wells
9:	Hinzufügen von 100µl working Substrate Solution pro Well
10:	Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln
11:	Messung der Absorption bei 405nm Wellenlänge ab T=15min (angemessene Inkubationszeit: O.D. zeroHA/O.D. 1600 standard > 3)
12:	Hinzufügen von 50µl Stopplösung pro Well

*Tabelle 1: Ablauf Hyaluronan Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kit*

### 3.3.2 Syndekan-1-Bestimmung

Zum quantitativen Nachweis der Syndekan-1-Konzentration im Serum der Patienten wurde das Human sCD138 (Syndecan-1) ELISA-Kit (950.640; Diaclone SAS, Besancon Cedex, Frankreich) der Firma Diaclone SAS verwendet. Die detaillierte Beschreibung dieser ELISA-Messung wird im Folgenden aufgeführt: Der Capture Antibody, der Syndekan-1 (Antigen) spezifisch bindet, ist bereits an die Mikrotiterplatte (feste Phase) gebunden. Bei Zugabe des Patientenserums in die Wells erfolgt die Bindung von Syndekan-1. Im nächsten Schritt wird ein zweiter, Biotin-gebundener Antikörper (detection antibody), welcher Syndecan-1 an einem weiteren Epitop bindet, hinzugefügt. Es erfolgt die erste Inkubation, ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex entsteht. Im folgenden Schritt wird die Platte gewaschen und



überschüssige, nicht gebundene Antikörper werden entfernt. Anschließend erfolgt die Inkubation mit Streptavidin-HRP. Im nächsten Schritt wird TMB-Substratlösung hinzugefügt. Das oben genannte Enzym, Streptavidin-HRP, katalysiert daraufhin eine Substratreaktion, die sich durch einen Farbumschlag zeigt, welcher photometrisch gemessen werden kann. Als letztes erfolgt die Zugabe von H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, einer Stopplösung, um die Farbreaktion zu beenden. Die Absorptionen können mit Hilfe eines Spektrophotometers bei einer primären Wellenlänge von 450nm abgelesen werden. Die Farbintensität ist direkt proportional zu der Serumkonzentration von Syndekan-1, welche in ng/ml angegeben wird. Anhand einer Eichgeraden, die mit Hilfe einer Standardverdünnungsreihe erstellt werden konnte, lässt sich die Konzentration von Syndekan-1 ablesen.

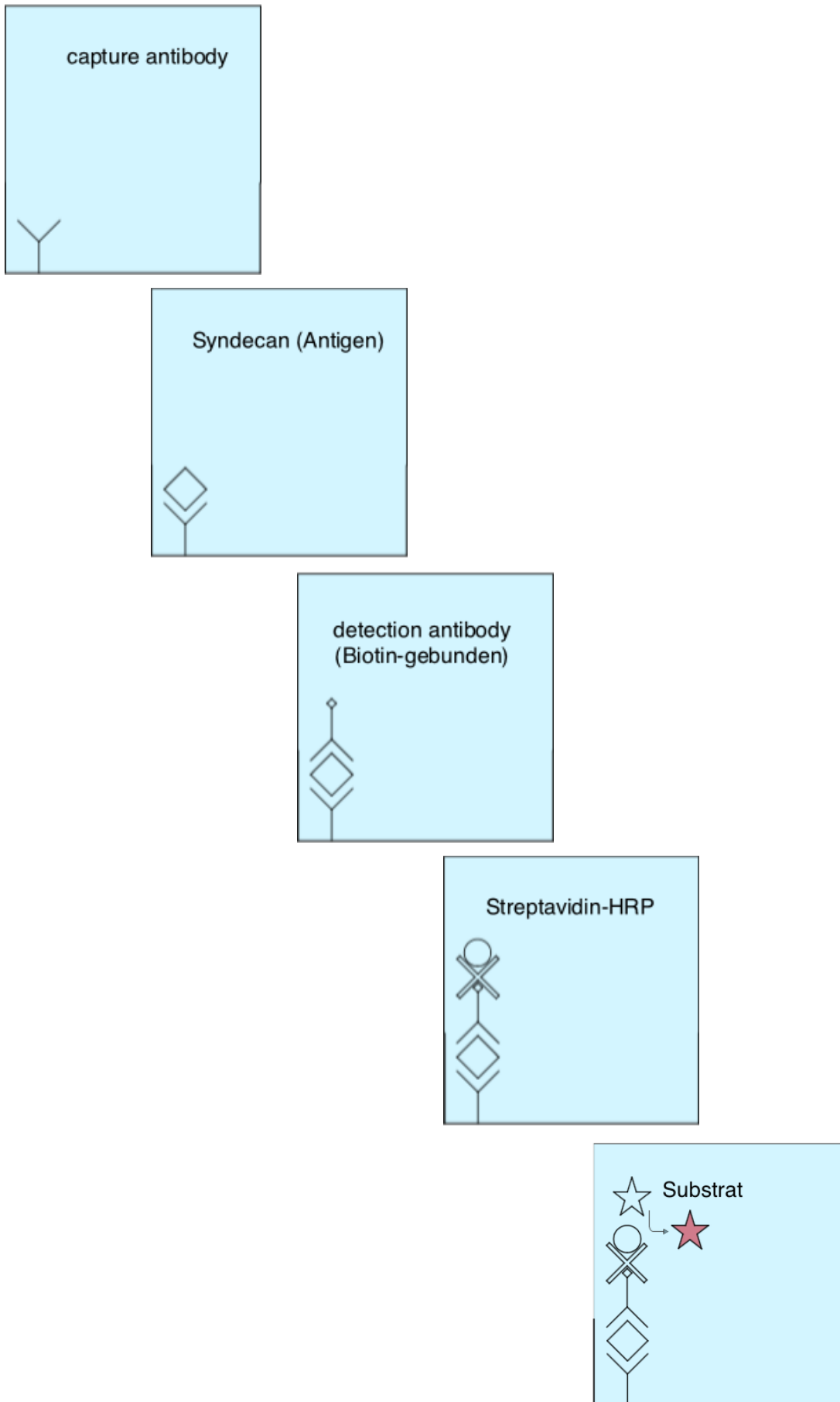


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Sandwich-ELISA zur Messung von Syndecan-1

Vorbereitung der Standardverdünnungsreihe (1:1-Verdünnung von 256 ng/ml - 8 ng/ml), Null- und Kontrollproben anhand der Herstellerangaben	
1:	Hinzufügen von 100µl Standard-, Serum-, Null- und Kontrollproben in vorgesehene Wells
2:	Hinzufügen von 50µl biotinylated anti-CD138 pro Well
3:	Inkubation bei Raumtemperatur für 1h
4:	3x Waschen mit 0,3ml Waschlösung
5:	Hinzufügen von 100µl Streptavidin-HRP pro Well
6:	Inkubation bei Raumtemperatur für 30min
7:	3x Waschen mit 0,3ml Waschlösung
8:	Hinzufügen von 100µl TMB Substrate Solution pro Well
9:	Inkubation bei Raumtemperatur für 12-15min im Dunkeln
10:	Hinzufügen von 100µl H2SO4-Stopplösung pro Well
11:	Messung der Absorption bei 450nm Wellenlänge mittels Spectrophotometer

*Tabelle 2: Ablauf Human sCD138 (Syndecan-1) ELISA-Kit*

### **3.4 Multiorganversagen**

Um das Organversagen in der Postreanimationsphase objektiv quantifizieren zu können, wurden zu jedem Blutabnahmezeitpunkt (0h, 6h, 12h, 24h, 48h) die entsprechenden klinischen Parameter der Patienten dokumentiert und der Multiple Organ Failure Score (MOF-Score) entsprechend der Einteilung nach Goris et al. in der Modifikation nach Lefering et al. berechnet (94). Nur Patienten mit komplettem Datensatz wurden für diese Subgruppenanalyse verwendet. Anhand des MOF-Scores erfolgte retrospektiv die Gruppenbildung entsprechend des Median. Ein MOF-Score > 6 entsprach einem Multiorganversagen.

#### *Der Multiple Organ Failure Score (MOF-Score)*

Der Multiple Organ Failure Score (MOF-Score) nach Goris et al. in der Modifikation nach Lefering et al. bietet die Möglichkeit, Organdysfunktionen bzw. -versagen bei

Intensivpatienten objektiv zu quantifizieren (94). Im Rahmen dieses Punktesystems werden die vitalen Funktionen der fünf Organe

1. Herz/Kreislauf
2. Lunge
3. Niere
4. Leber
5. Blut

erfasst, wobei jedes Organsystem mit einem Einzelpunktwert zwischen 0 bis 2 Punkten versehen wird.

0 Punkte entsprechen einer uneingeschränkten Funktion bzw. einer minimalen Organdysfunktion. Ein Punkt wird für einen systolischen Blutdruck  $\geq 100\text{mmHg}$  unter maximal geringen Dosen vasoaktiver Substanzen, für eine maschinelle Beatmung bis zu einem Positiv Endexpiratorischem Druck (PEEP)  $\leq 10\text{mmHg}$  und einem inspiratorischen Sauerstoffpartialdruck ( $\text{FiO}_2$ )  $\leq 0,4$ , sowie für Serumkreatininwerte  $\geq 2\text{mg/dl}$ , SGOT  $\geq 25\text{ U/l}$  bzw. Bilirubin  $\geq 2\text{mg/dl}$ , für Leukozyten  $\geq 30.0000/\mu\text{l}$  und Thrombozyten  $\leq 50.000/\mu\text{l}$  vergeben.

Das Maximum von 2 Punkten entspricht einer hochgradigen Organdysfunktion: systolische Blutdruckphasen  $< 100\text{mmHg}$  und/oder die Notwendigkeit hochdosierter vasoaktiver Medikamente, eine maschinelle Beatmung mit einem Positiv endexpiratorischem Druck (PEEP)  $> 10\text{mmHg}$  oder einem inspiratorischen Sauerstoffpartialdruck ( $\text{FiO}_2$ )  $> 0,4$ , sowie Dialysepflichtigkeit, SGOT  $\geq 50\text{U/l}$  bzw. Bilirubin  $\geq 6\text{mg/dl}$ , Leukozytose  $\geq 60.0000/\mu\text{l}$  oder Leukopenie  $\leq 2500/\mu\text{l}$ .

Bei fünf verschiedenen Einzelpunktwerten zwischen 0 bis 2 Punkten ergibt sich eine Wertespanne des MOF-Scores von 0 bis maximal 10 Punkten.

	Normale Organfunktion 0 Punkt	Organdysfunktion 1 Punkt	Organversagen 2 Punkte
Herz	Normwertiger Blutdruck	BP(syst.) $\geq 100$ mmHg unter geringdosiert vasoaktiven Medikamenten	BP(syst.) $< 100$ mmHg und/oder hochdosiert vasoaktive Medikamenten
Lunge	Keine mechanische Beatmung	mechanische Beatmung mit PEEP $\leq 10$ mmHg und FiO <sub>2</sub> $\leq 0,4$	mechanische Beatmung mit PEEP $> 10$ mmHg oder FiO <sub>2</sub> $> 0,4$
Niere	Serumkreatinin $< 2$ mg/dl	Serumkreatinin $\geq 2$ mg/dl	Hämodialyse, Peritonealdialyse
Leber	SGOT und Bilirubin normwertig	SGOT $\geq 25$ U/l bzw. Bilirubin $\geq 2$ mg/dl	SGOT $\geq 50$ U/l bzw. Bilirubin $\geq 6$ mg/dl
Blut	Leukozyten-, Thrombozytenzahlen normwertig	Leukozyten $\geq 30.000/\mu\text{l}$ und Thrombozyten $\leq 50.000/\mu\text{l}$	Leukozyten $\geq 60.000/\mu\text{l}$ oder $< 2500/\mu\text{l}$

*Tabelle 3: Der Multiple Organ Failure Score (MOF Score) aus Lefering et al. (94).*

### 3.5 Überleben

Als Endpunkt zur Feststellung des Outcomes legten wir ein 30-Tage-Überleben fest.

### 3.6 Statistik

Alle statistischen Analysen wurden mit Hilfe der Software SPSS Statistics Version 22.0 (IBM Corporation; Armonk, NY, USA) durchgeführt. Es wurde eine multivariate Varianzanalyse für Untersuchungen mit Messwiederholungen durchgeführt (SPSS General Linear Model, repeated measures MANOVA). Zur unabhängigen Variable „Zeit“ kamen zur jeweiligen Auswertung die Parameter „Überleben“ und „Multiorganversagen“ hinzu und wurden gegenüber den abhängigen Konzentrationsvariablen von Hyaluronan und Syndekan-1 untersucht. Als Signifikanzniveau wurde  $p = 0,05$  gewählt. Der MOF-Score wurde entsprechend des Medians in zwei Gruppen klassiert. Nachfolgend wurden bei signifikantem Einfluss der unabhängigen Faktoren die einzelnen Zeitpunkte mit dem Mann-Whitney-U-Test näher untersucht, um dezidierte Aussagen zur Konzentrationsdynamik zu treffen. Ein Unterschied von  $p \leq 0,05$  wurde als statistisch signifikant bewertet.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Patientenkollektiv

Insgesamt wurden entsprechend der erwähnten Kriterien 15 Patienten in einem Zeitraum von Oktober 2003 bis Juni 2012 in die vorliegende Studie eingeschlossen. Unter den 15 eingeschlossenen Patienten waren drei (20%) weibliche und 12 (80%) männliche Patientinnen/Patienten. Das Alter der Patienten lag zwischen 34 und 90 Jahren, das mittlere Alter bei 61,73 Jahren ( $\pm 14,93$  SD). Die Verteilung der Stichprobe bezüglich des Alters ist nach dem Kolmogorov-Smirnov-Test hochsignifikant normalverteilt.

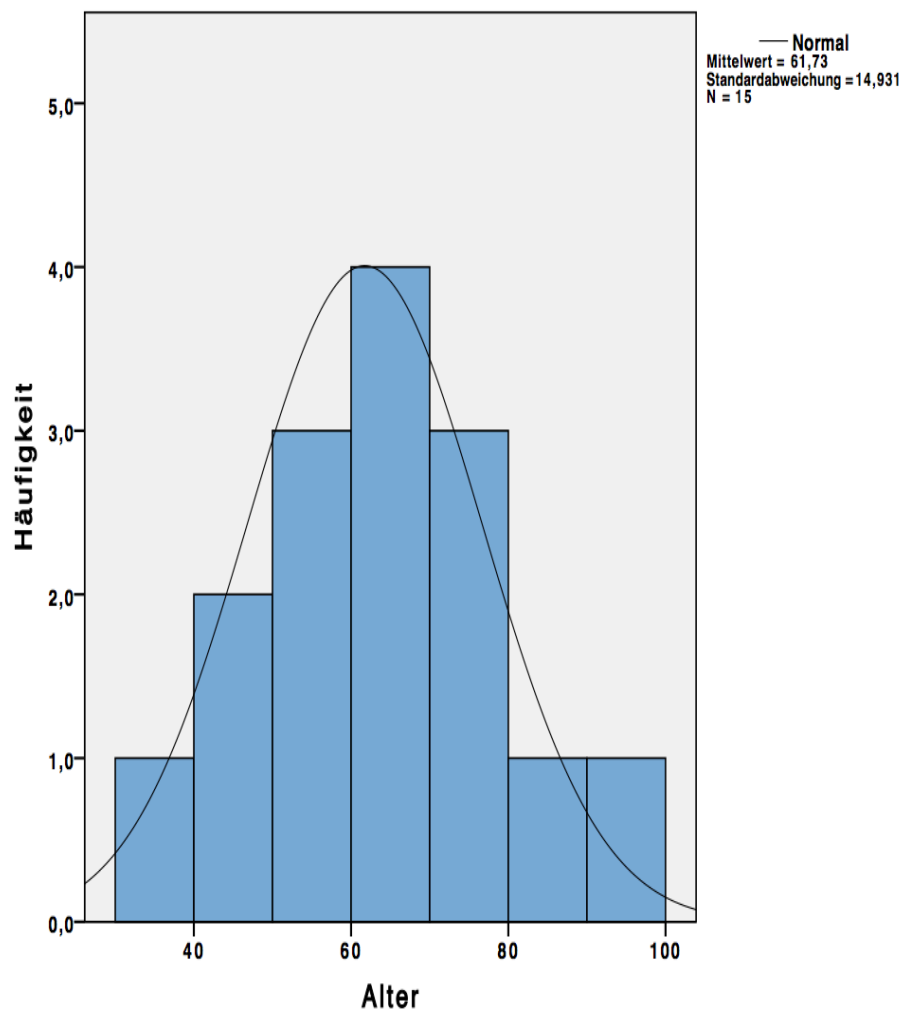


Abbildung 5: Die Altersverteilung der Studienpatienten

Aufgrund fehlender klinischer Daten konnte bei zwei Patienten der MOF-Score nicht berücksichtigt werden. Insgesamt entwickelten vier Patienten (30,8 %) innerhalb der ersten 48 nach Reanimation ein Multiorganversagen (davon 0 % Frauen und 100 % Männer). Der Median des MOF-Scores betrug  $6 (\pm \sigma)$ , Mindestpunktwert war 4, maximal wurden 8 Punkte berechnet. In der Postreanimationsphase von 30 Tagen verstarben 6 Patienten, 9 Patienten überlebten diesen Zeitraum. Damit liegt der Anteil an verstorbenen Patienten bei 40% (davon 16,7 % Frauen und 83,3 % Männer). Der durchschnittliche MOF-Score lag bei Patienten, die innerhalb von 30 Tagen nach Reanimation verstarben, bei 6,67 Punkten. Bei Patienten mit positivem Outcome lag dieser Wert bei 5,29. Patienten, die die Reanimation überlebten, waren im Durchschnitt 60 Jahre alt. Der Altersdurchschnitt des Patientenkollektivs, die innerhalb von 30 Tagen nach Reanimation verstarben, lag bei 64,3 Jahren. In Tabelle 4 findet sich eine detaillierte Übersicht der klinischen Patientendaten.

	Alter	Geschlecht	Verstorben	Todeszeitpunkt	MOV
1	56	M			
2	45	M			
3	70	M	X	72h	
4	62	M			
5	72	W			
6	54	M	X	8 Tage	X
7	61	M			X
8	90	M			
9	51	M			
10	62	W	X	7 Tage	
11	69	W			
12	72	M	X	11 Tage	X
13	45	M	X	29h	X
14	83	M	X	4 Tage	
15	34	M			

*Tabelle 4: Epidemiologische Daten des untersuchten Patientenkollektivs*

#### **4.2 Konzentrationsdynamik für Hyaluronan und Syndekan-1**

Die Serumkonzentrationen von Hyaluronan und Syndekan-1 werden in ng/ml angegeben. Es wird jeweils der Mittelwert der gemessenen Werte mit Standardfehler ( $\pm 1$  SE) grafisch dargestellt. Den Tabellen 5 und 6 sowie den zugehörigen Abbildungen 6 und 7 sind die gemessenen Werte für Hyaluronan und Syndekan-1 zu entnehmen.



#### 4.2.1 Hyaluronan

Die Werte der Hyaluronankonzentration im Serum reichen von 60,94ng/ml bis 10100,70ng/ml. Zu den fünf Messzeitpunkten lagen die Mittelwerte von Hyaluronan bei 309,6ng/ml ( $\pm 243,6$ ), 137,1ng/ml ( $\pm 68,9$ ), 256,9ng/ml ( $\pm 276,9$ ), 1039,7ng/ml ( $\pm 1940,9$ ) und 1174,1ng/ml ( $\pm 2737,5$ ). Die erhobenen Daten zeigen eine signifikant aufsteigende Dynamik über die Zeit (siehe Tabelle 5 und Abbildung 6) (p-Wert: 0,043).

	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standartabweichung
Hyaluronan 0h	67,9	898,5	309,6	243,6
Hyaluronan 6h	76,0	302,9	137,1	68,9
Hyaluronan 12h	60,9	1032,5	256,9	276,9
Hyaluronan 24h	70,9	5741,9	1039,7	1940,9
Hyaluronan 48h	105,2	10100,7	1174,1	2737,5

Tabelle 5: Serumkonzentrationen von Hyaluronan in ng/ml

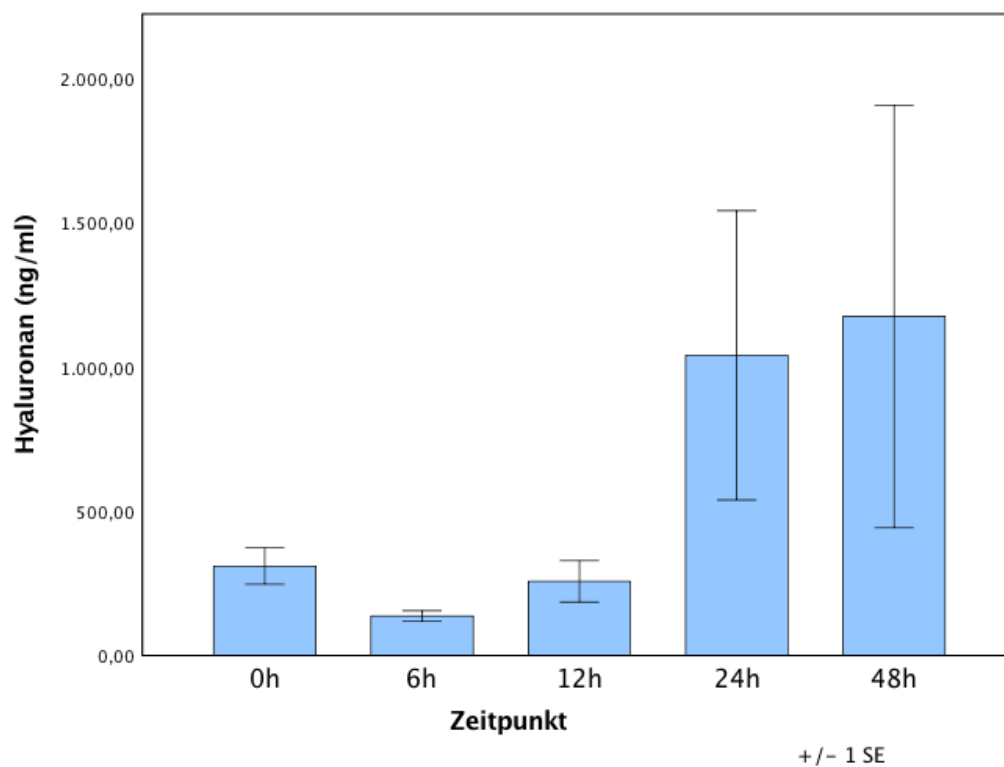


Abbildung 6: Serumkonzentration von Hyaluronan innerhalb der ersten 48h nach Herz-Kreislauf-Stillstand

#### 4.2.2 Syndekan-1

Die Werte der gemessenen Serumkonzentrationen von Syndekan-1 reichen von 42,94ng/ml bis 43017,50ng/ml. Die Mittelwerte von Syndekan-1 zu den fünf untersuchten Abnahmezeitpunkten ergeben 855,5ng/ml ( $\pm 2081,9$ ), 2845,8ng/ml ( $\pm 6320,9$ ), 2368,4ng/ml ( $\pm 6449,2$ ), 4199,0ng/ml ( $\pm 11364,5$ ) und 1029,4ng/ml ( $\pm 2079,2$ ). Im Gegensatz zu den Messungen von Hyaluronan zeigte sich keine Korrelation zwischen den Serumkonzentrationswerten von Syndekan-1 und fortschreitendem Zeitverlauf (siehe Tabelle 6 und Abbildung 7) (p-Wert 0,907).

	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
Syndekan-1 0h	68,8	8264,2	855,6	2081,9
Syndekan-1 6h	42,9	24678,9	2845,9	6320,9
Syndekan-1 12h	52,9	25430,6	2368,4	6449,2
Syndekan-1 24h	46,6	43017,5	4199,0	11364,5
Syndekan-1 48h	54,7	7884,8	1029,5	2079,2

*Tabelle 6: Serumkonzentrationen von Syndekan-1 in ng/ml*

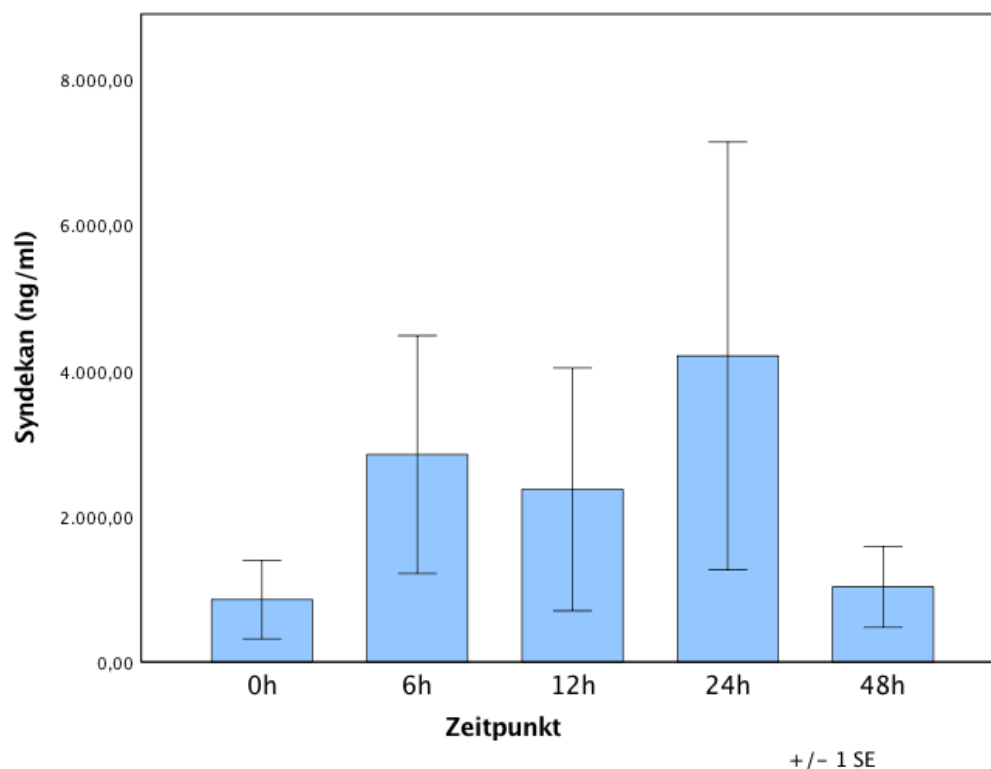


Abbildung 7: Serumkonzentration von Syndekan-1 innerhalb der ersten 48h nach Herz-Kreislauf-Stillstand

### 4.3 Korrelation der Serumkonzentrationen mit klinischen Parametern

#### 4.3.1 Hyaluronan und Multiorganversagen

Die multivariate Analyse mit Messwiederholungen mit den unabhängigen Variablen „Zeit“ und „MOF-Score“ zeigte einen signifikanten Unterschied der Dynamik (Wilks-Lambda=0,267 F=4,817; p=0,035) der Serumkonzentration von Hyaluronan zwischen den Patientengruppen mit maximalem MOF-Wert  $\leq 6$  und  $> 6$ .

	F	Wilks' Lambda	p
Zeit	12,348	0,124	<b>0,003**</b>
Zeit*MOF-Score	4,817	0,267	<b>0,035*</b>

Tabelle 7: Ergebnisse multivariate Analyse Hyaluronan und MOF-Score; Signifikanz  $p < 0,05$

Es ist somit zusammenfassend festzustellen, dass Patienten mit hohem MOF-Score erhöhte Werte der Serumkonzentration von Hyaluronan zeigten. Dies lässt sich auch in Abbildung 8 nachvollziehen:

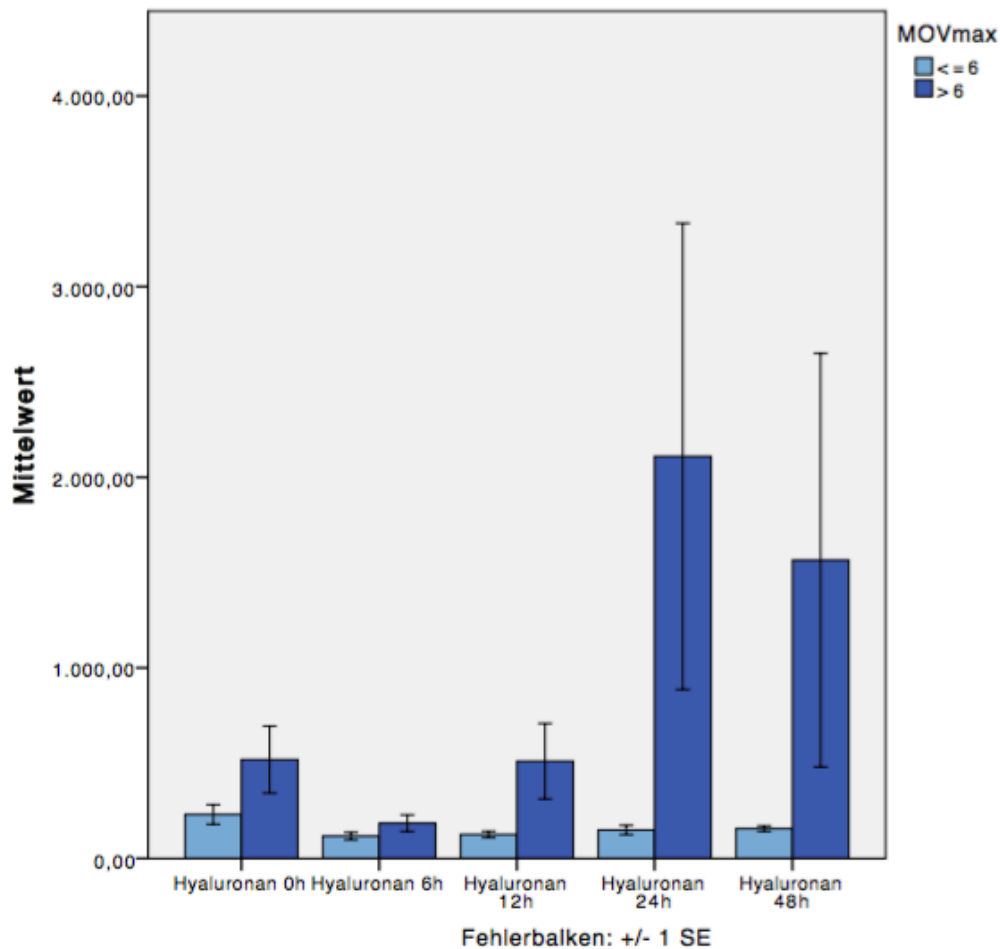


Abbildung 8: Korrelation der Serumhyaluronanwerte mit der Entwicklung eines Multiorganversagens innerhalb der ersten 48h nach Herz-Kreislauf-Stillstand

#### 4.3.2 Hyaluronan und Überleben

Über den Verlauf von 0h bis 24h zeigte sich eine erhöhte Serumkonzentration von Hyaluronan bei Patienten, die innerhalb von 30 Tagen nach Reanimation verstarben. Dies ist in Abbildung 9 graphisch dargestellt. Mittels Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben ergaben sich signifikante p-Werte für 0h, 6h, 12h und 24h und somit signifikante

Unterschiede des Hyaluronanwertes zwischen den Patientengruppen. Nur bei 48h zeigte sich kein signifikanter Unterschied (p-Wert: 0,438).

	0h	6h	12h	24h	48h
Überlebt	186,15	104,73	168,86	750,91	1282,67
Verstorben	494,73	185,71	389,19	1472,90	978,57
p-Wert	<b>0,012*</b>	<b>0,018*</b>	<b>0,036*</b>	<b>0,036*</b>	0,438

Tabelle 8: Mann-Whitney-U-Test: Serumkonzentration von Hyaluronan; Mittelwerte in ng/ml

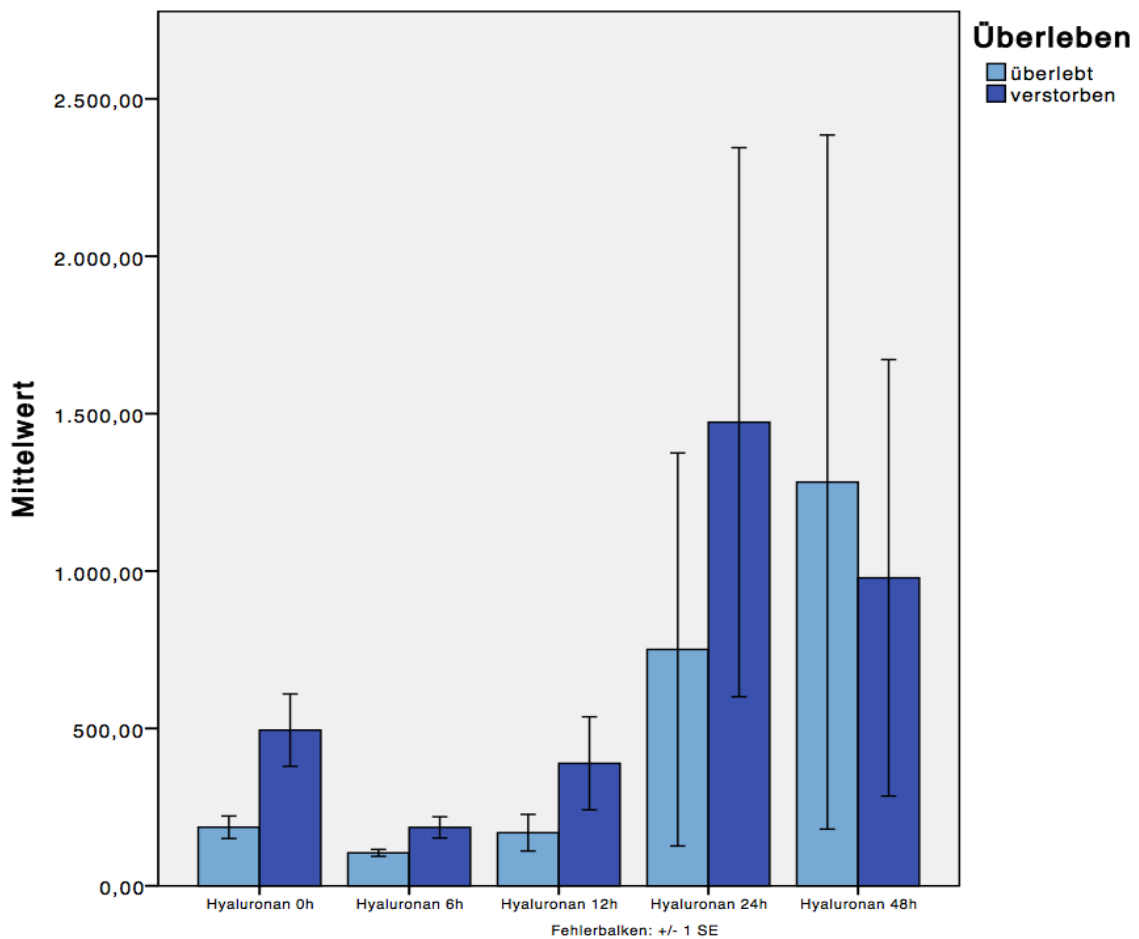


Abbildung 9: Serumhyaluronanwerte in Bezug auf das Outcome innerhalb der ersten 48h nach Herz-Kreislauf-Stillstand

	F	Wilks' Lambda	p
Zeit	6,732	0,250	<b>0,009**</b>
Zeit*Überleben	5,098	0,306	<b>0,02*</b>

*Tabelle 9: Ergebnisse multivariate Analyse Hyaluronan und Überleben; Signifikanz  $p < 0,05$*

In der multivariaten Analyse mit Messwiederholungen mit den unabhängigen Variablen „Zeit“ und „Überleben“ zeigte sich eine signifikant unterschiedliche Dynamik (Wilks-Lambda=0,306 F=5,098;  $p=0,02$ ) der Serumkonzentrationen von Hyaluronan im Hinblick auf das Überleben mit stärkerem Anstieg der Werte bei verstorbenen Patienten.

#### *4.3.3 Syndekan-1 und Multiorganversagen*

In der multivariaten Analyse mit Messwiederholungen mit den unabhängigen Variablen „Zeit“ und „MOF-Score“ zeigte sich ein hochsignifikanter Unterschied der Dynamik (Wilks-Lambda=0,017 F=101,7;  $p < 0,001$ ) der Serumkonzentration von Syndekan-1 zwischen den Patientengruppen mit maximalem MOF-Wert  $\leq 6$  und  $> 6$ .

	F	Wilks' Lambda	p
Zeit	88,9	0,019	<b>&lt;0,001***</b>
Zeit*MOF-Score	101,7	0,017	<b>&lt;0,001***</b>

*Tabelle 10: Ergebnisse multivariate Analyse Syndekan-1 und MOF-Score; Signifikanz  $p < 0,05$*

Es lässt sich somit zusammenfassend feststellen, dass Patienten mit hohem MOF-Score erhöhte Werte der Serumkonzentration von Syndekan-1 zeigten. Dieses ist auch in Abbildung 10 nachzuvollziehen:

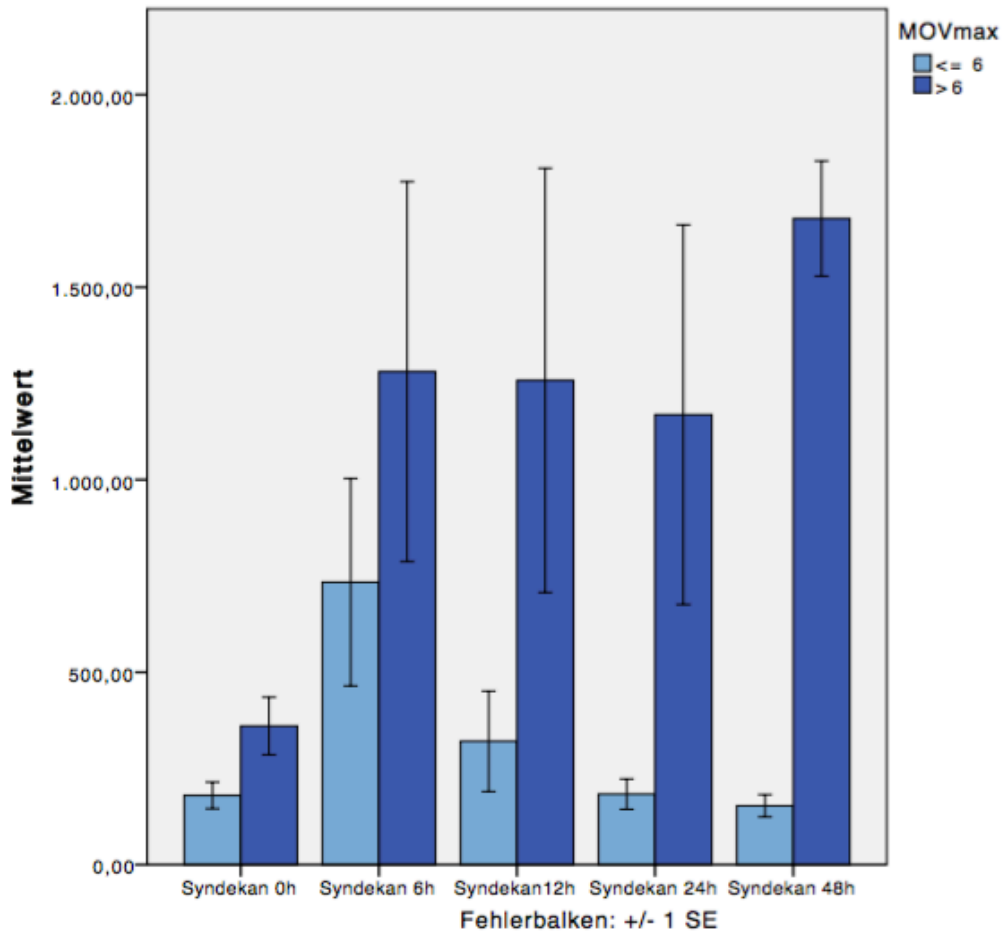


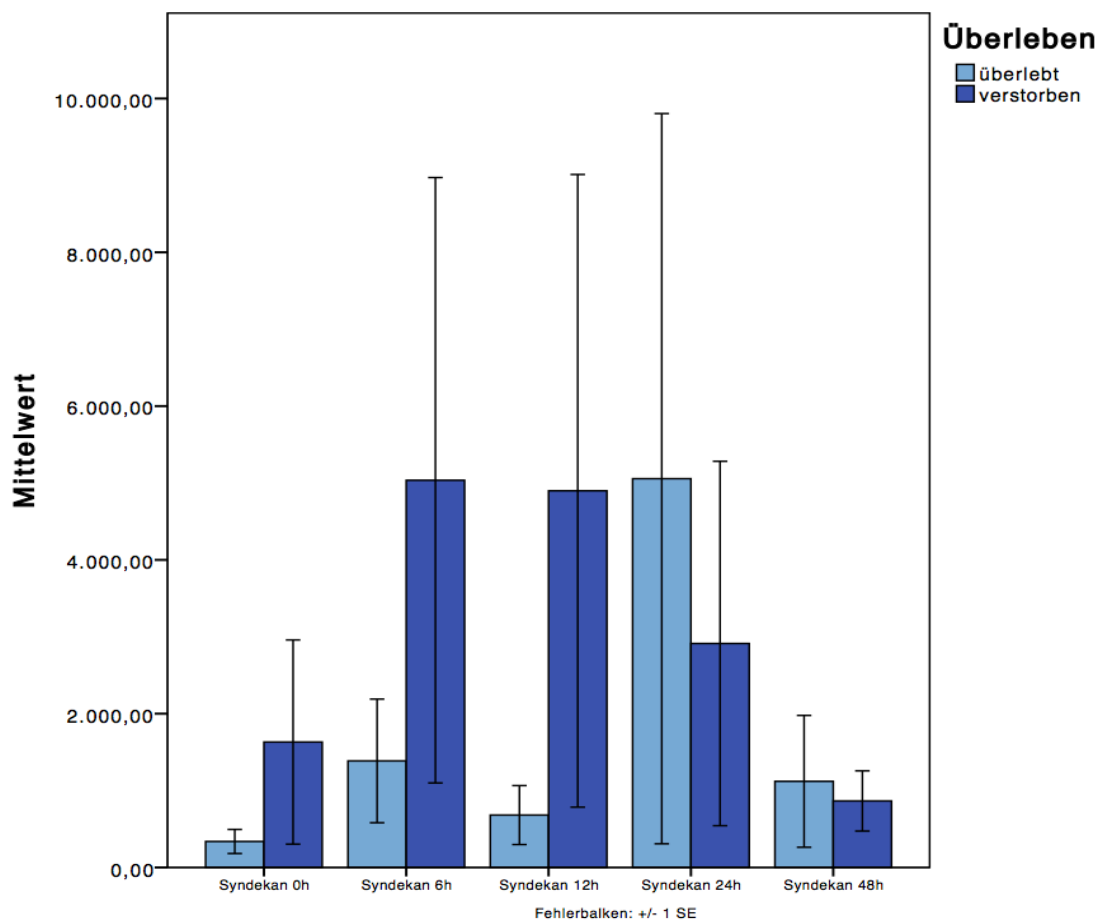
Abbildung 10: Korrelation der Serumsyndekan-1-Werte mit der Entwicklung eines Multiorganversagens innerhalb der ersten 48h nach Herz-Kreislauf-Stillstand

#### 4.3.4 Syndekan-1 und Überleben

Mittels Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben ergaben sich nicht-signifikante p-Werte für 0h, 6h, 12h und 24h und 48h und somit im Gegenteil zur Hyaluronan keine signifikanten Unterschiede des Syndekan-1-Wertes bezüglich des Überlebens. Dies ist in Tabelle 11 dargestellt.

	<b>0h</b>	<b>6h</b>	<b>12h</b>	<b>24h</b>	<b>48h</b>
überlebt	338,3	1385,8	681,6	5056,4	1120,6
verstorben	1631,4	5035,9	4898,6	2913,0	865,3
p-Wert	0,181	0,145	0,066	0,088	0,112

*Tabelle 11: Mann-Whitney-U-Test: Serumkonzentration Syndekan-1 Mittelwerte in ng/ml*



*Abbildung 11: Serumsyndekan-1-Werte in Bezug auf das Outcome innerhalb der ersten 48h nach Herz-Kreislauf-Stillstand*



## 5. Diskussion

Trotz großer Erfolge in der Verbesserung von Reanimationsabläufen und der Versorgung reanimierter Patienten auf der Intensivstation bleiben Morbiditäts- und Mortalitätsraten nach einem Herz-Kreislauf-Stillstand weiterhin hoch (6, 7). Etwa 70% der initial stabilisierten Patienten versterben in der Postreanimationsphase auf Intensivstation (13). Die hohe Letalität ist neben der Grunderkrankung durch die systemische Inflammationsreaktion im Rahmen des Postreanimationssyndroms erklärt (10, 13, 14, 90). Nach einem Herz-Kreislauf-Stillstand mit anschließendem Return of spontaneous circulation (ROSC) kommt es zu einem Ischämie-Reperfusionssyndrom des gesamten Körpers (13, 16). Hierbei entwickelt sich eine lokalisierte Gewebeschädigung, wobei die zerebrale Schädigung eine vornehmliche Rolle spielt (10). Des Weiteren zeigen sich systemische Schäden, die durch eine generalisierte Inflammationsreaktion, eine Endothelaktivierung und die Beeinflussung des Gerinnungssystems erklärt sind (13, 16). Einen Schlüsselschritt in der Entwicklung der systemischen Inflammationsreaktion im Rahmen des Postreanimationssyndroms stellt die durch Ischämie- und Reperfusion getriggerte Schädigung der endothelialen Glykokalyx dar, welche zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität, einer Leukozytenadhäsion am Endothel und somit zu einer Endothel-vermittelten Immunreaktion führt (5, 43, 82, 89, 90). Um den Zusammenhang zwischen der Glykokalyxschädigung und dem Postreanimationssyndrom genauer beurteilen zu können, wurden die abgespaltenen Glykokalyxbestandteile Hyaluronan und Syndekan-1 als Maß einer Glykokalyxschädigung im zeitlichen Verlauf nach erfolgreicher Reanimation untersucht und in einem weiteren Schritt mit den definierten klinischen Parametern „Multiorganversagen“ und „Überleben“ korreliert. Ein besonderer Fokus wurde hierbei auf die „nativen“ Serummesswerte zur Nullstunde, die nur durch Erstmaßnahmen beeinflusst waren, gelegt.

Unsere Ergebnisse zeigten zunächst einen charakteristischen Verlauf der Serumkonzentrationen von Hyaluronan innerhalb der ersten 48h nach erfolgreicher Reanimation. Dieser war durch eine signifikant vermehrte Freisetzung von Hyaluronan aus der endothelialen Glykokalyx über die Zeit charakterisiert. Zwischen den Syndekan-1-Serumwerten und dem fortschreitenden Zeitverlauf zeigte sich hingegen keine signifikante Korrelation. Betrachtet man den Nullstundenzeitpunkt, so konnten wir einen signifikanten Zusammenhang zwischen den initialen Hyaluronanmesswerten bei 0h und einem negativen Outcome feststellen. Patienten, die innerhalb der ersten 30 Tage nach Reanimation verstarben, wiesen bereits zum Nullstundenzeitpunkt eine signifikant höhere Hyaluronankonzentration auf als solche, die diesen Zeitraum überlebten. Für Syndekan-1 wurde zur Nullstunde jedoch keine signifikante Korrelation gemessen.

Zudem konnten wir eine positive Korrelation der Konzentrationsdynamik von Hyaluronan mit den untersuchten klinischen Parametern „Multiorganversagen“ und „negativem Outcome“ nachweisen. Patienten, die innerhalb der ersten 48h nach Reanimation ein MOV entwickelten, wiesen eine signifikant erhöhte Serumkonzentration von Hyaluronan im zeitlichen Verlauf von 48h auf. Auch bei Patienten, die innerhalb von 30 Tagen nach Reanimation verstarben, zeigte sich eine signifikant unterschiedliche Dynamik mit signifikant stärkerem Anstieg der Hyaluronan-Messwerte. Die Konzentrationsdynamik von Syndekan-1 war bei Patienten, die ein Multiorganversagen entwickelten und damit einen kritischeren klinischen Verlauf hatten, ebenfalls signifikant erhöht. Bezüglich des Überlebens ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der Syndekan-1-Werte.

Im Folgenden sollen die Ergebnisse unserer Studie detailliert diskutiert werden.

## **5.1 Methodik**

### *5.1.1 Studiendesign*

In unsere Studie wurden entsprechend den oben genannten Kriterien nur Patienten eingeschlossen, die innerhalb von 60 Minuten nach Herzstillstand und ROSC aufgenommen wurden. Dieses Studiendesign ergab sich aus der Überlegung, die Serumkonzentrationen der freigesetzten Glykokalyxbestandteile Hyaluronan und Syndekan-1 insbesondere in dem klinisch kritischen Intervall während der initialen Postreanimationsphase als Nullstundenwert zu messen (10).

Um eine Verfälschung der Serummesswerte zu vermeiden, wurden Patienten mit schweren chronischen Erkrankungen, akuten Infektionen und malignen Tumorerkrankungen von unserer Studie ausgeschlossen. Grund für diese Ausschlusskriterien waren die oben bereits detailliert aufgeführten Nachweise der Glykokalyxschädigung als Folge einer lokalen wie auch systemischen Inflammationsreaktion (43, 77, 78, 82, 83). Darüber hinaus konnten Patienten mit einer vorbestehenden immunsupprimierenden Therapie nicht in die Studie aufgenommen werden, da eine systemische Glukokortikoidtherapie durch eine Suppression der Zytokinproduktion eine Inflammationsreaktion hemmt (95). Untersuchungen hierzu konnten belegen, dass Hydrokortison an isolierten Herzmodellen zu einer signifikant verringerten Schädigung der endothelialen Glykokalyx nach Ischämie und Reperfusion führt (88).

Entscheidend für die Auswahl der Blutentnahmezeitpunkte war eines der wesentlichen Ziele dieser Arbeit, die unmittelbare Phase nach Herz-Kreislauf-Stillstand und initial erfolgreicher Reanimation abbilden zu können. Diesbezüglich konnten Nolan et al. aufzeigen, dass die initiale, frühe und intermediäre Postreanimationsphasen, die sich bis zu 72 Stunden nach

kardiopulmonaler Reanimation erstrecken, eine wesentliche Bedeutung für die Ausbildung und Ausprägung von Gewebe- und Organschädigung im Rahmen des Postreanimationssyndroms haben (10). Zur Dokumentation der Serumkonzentrationsdynamik der Glykokalyxbestandteile während dieser pathophysiologisch und klinisch relevanten Postreanimationsphasen wurden die Messungen an seriellen, in regelmäßigen Intervallen gewonnenen Serumproben durchgeführt. Hierzu wurden in unserer Studie die Serumproben nach Wiedererlangung des Spontankreislaufs durch den behandelnden Notarzt bzw. bei Aufnahme der Patienten im Schockraum innerhalb von 60 Minuten nach ROSC (0 Stunde) sowie erneut nach 6, 12, 24 und 48 Stunden gewonnen. In der neueren Literatur rücken insbesondere die sehr frühen Veränderungen einer systemischen Inflammationsreaktion, welche durch die Nullstunden-Abnahme (prähospitaler Blutentnahme) repräsentiert werden, zunehmend in den Fokus (96). Hazeldine und Kollegen untersuchten diesbezüglich Serumproben von Traumapatienten, die innerhalb der ersten Stunde nach Trauma gewonnen werden konnten (96). Die Auswertungen der Blutuntersuchungen ergaben eine ausgeprägte Leukozytose, erhöhte Zytokin-Werte sowie den Nachweis einer Immunzellaktivierung, welche die Initiierung einer systemischen Inflammationsreaktion in der ersten Stunde nach Trauma belegen.

Auch weil es zu diesem frühen Zeitpunkt innerhalb der ersten Stunde nach Trauma oder Reanimation noch zu keiner wesentlichen therapeutischen Beeinflussung untersuchter Parameter gekommen ist, gilt diesen Veränderungen ein besonderes klinisches Interesse. Im Gegensatz zu vielen Reanimationsstudien erfolgte die erste Abnahme in unserer Untersuchung unter hohem logistischen Aufwand ebenfalls bereits durch den behandelnden Notarzt, um initiale Veränderungen der Glykokalyxintegrität zu erfassen (5, 90, 97, 98).

### *5.1.2 Studienkollektiv*

Insgesamt wurden 15 Patienten nach erfolgreicher kardiopulmonaler Reanimation in die vorliegende Studie eingeschlossen. Das Alter der Patienten lag zwischen 34 und 90 Jahren, das mittlere Alter bei 61,7 Jahren. Die Stichprobe zeigte bezüglich des Alters eine hochsignifikant Normalverteilung. Unter den 15 eingeschlossenen Patienten befanden sich 12 (80%) männliche und drei (20%) weibliche Patienten/Patientinnen.

Die Auswertung des deutschen Reanimationsregisters der Deutschen Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin, die 2330 außerklinische Reanimationen von 2006 bis 2009 umfasste, ergab in ihrem Kollektiv ein Durchschnittsalter von 67,1 Jahren (99). 66,9% der in dieser Studie eingeschlossenen Patienten waren männlich. Jung et al. gaben bezüglich des Patientenkollektivs in ihrer Arbeit zum Glykokalyxshedding nach kardiogenem Schock ein Durchschnittsalter von 71 Jahren an. Auch hier war ein Großteil der Patienten männlich (69%) (100). Beide Untersuchungen zeigten damit hinsichtlich der epidemiologischen Daten ein vergleichbares Patientenkollektiv. In der von Grundmann et al. durchgeführten Studie lag das mittlere Alter (66,2 Jahre) der eingeschlossenen Reanimationspatienten zwar etwas über dem durchschnittlichen Alter unseres Patientenkollektivs, aber die Geschlechterverteilung dieser Studie entsprach in etwa der Verteilung unserer Stichprobe (5). Es wurden 4:1 männliche zu weibliche Patienten/Patientinnen eingeschlossen.

Sowohl die limitierte Anzahl der in unserer Studie eingeschlossenen Patienten als auch die große Zeitspanne der Probengewinnung (von Oktober 2003 bis Juni 2012) sind bei der Bewertung der Ergebnisse zu berücksichtigen. Mit insgesamt 15 Patienten basieren unsere Ergebnisse auf einem relativ kleinen Studienkollektiv. Dies liegt vor allem daran, dass die Studie ein sehr vulnerables Patientenkollektiv in der initialen und damit höchst kritischen Phase direkt nach Reanimation und ROSC umfasst. Die Patientenrekrutierung, die eine erste Blutabnahme innerhalb weniger Minuten nach Reanimation bedingt, war mit einem

erheblichen logistischen Aufwand verbunden. Zudem wurden die Patienten im Anschluss an die präklinische Stabilisierung in drei unterschiedliche Kliniken verlegt, so dass auch die folgenden Blutentnahmen bis zu 48h nach Reanimation mit einem erheblichen personellen und organisatorischen Aufwand verbunden waren.

### *5.1.3 Messmethode zur Bestimmung der Blutserumwerte*

Um die Schädigung der Glykokalyx *in vivo* zu quantifizieren, wurden in der vorliegenden Studie die freien Glykokalyxbestandteile Hyaluronan und Syndekan-1 im Patientenserum gemessen. Die endotheliale Glykokalyx besteht aus einem Netzwerk transmembranöser und membrangebundener Moleküle und kleidet alle gesunden Endothelzellen von luminal im menschlichen Körper aus (43, 45). Wichtige Hauptbestandteile der endothelialen Glykokalyx sind neben den Glykoproteinen die Proteoglykane, welche aus Kernproteinen und gebundenen Glykosaminoglykan-Seitenketten bestehen (45). Syndekan-1 ist ein relevanter Vertreter der membrangebundenen Kernproteine, wohingegen das Hyaluronan unter die Gruppe der Glykosaminoglykane ohne Bindung an ein Kernprotein fällt (45). Kommt es zu einem Abspalten einzelner spezifischer Glykokalyxproteine, sind diese dann frei im Serum messbar und liefern indirekt eine Information über die entstandene Schädigung. Diese indirekte Messmethode ist ein bereits etabliertes Verfahren und wurde in vorausgegangenen Studien vielfach angewandt (5, 84, 85, 86, 88). Bereits nach metabolischen (Diabetes), vaskulären (Arteriosklerose) und hypoxämischen Schäden sowie nach Traumata konnte wiederholt eine Erhöhung der Blutkonzentrationen der Glykokalyxbestandteile als Maß für die Glykokalyxschädigung nachgewiesen werden (63, 85, 87, 101, 102, 103).

Das entnommene Patientenserum wurde in der vorliegenden Untersuchung entsprechend laborchemischer Standards durch Zentrifugierung von zellulären Bestandteilen getrennt, um anschließend die Konzentrationen von Hyaluronan und Syndekan-1 mittels kompetitivem ELISA beziehungsweise Sandwich-ELISA zu quantifizieren. Die ELISA-Methode stellt seit

Jahrzehnten eine verlässliche Methode des quantitativen Nachweises von Proteinen dar (104). Dennoch handelt es sich hierbei um eine indirekte Messmethode. Es konnten deswegen keine exakten Kenntnisse erhalten werden, ob lokale Unterschiede der Glykokalyxschädigung vorlagen (101).

Zu berücksichtigen ist außerdem, dass sowohl der Nachweis von Hyaluronan als auch von Syndekan-1 nicht notwendigerweise ausschließlich auf ein Shedding aus der endothelialen Glykokalyx zurückzuführen ist. Hyaluronan ist als Glykosaminoglykan ein wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix des Bindegewebes (105). Aus dem Bindegewebe freigesetzt, wird Hyaluronan über das Lymphsystem ins Blut aufgenommen und in der Leber (90%) sowie in der Niere (10%) abgebaut (106). Exemplarisch konnten erhöhte Hyaluronan-Messwerte bei Patienten mit einer rheumatoiden Arthritis bestimmt werden (106, 107).

Auch Syndekan-1 findet sich außerhalb der endothelialen Glykokalyx. So wird Syndekan-1 auf der Oberfläche von Epithelzellen, Plasmazellen wie auch von unreifen B-Zellen exprimiert (108). Von der Zellmembran gelöst, ist Syndekan-1 dann bei chronisch entzündlichen Erkrankungen wie Morbus Crohn, bei Autoimmunerkrankungen wie einem systemischen Lupus erythematoses und im Rahmen von malignen Erkrankungen wie Lungenkarzinom, Multiplem Myelom, und chronisch lymphatischer Leukämie im Serum freimessbar (108, 109, 110, 111, 112, 113).

Eine weitere indirekte Messmethode zur Abschätzung des Glykokalyxabbaus durch Ermittlung ihres Gesamtvolumens. Dieses Volumen errechnet sich aus der Differenz zwischen dem zirkulierenden intravasalen Volumen und dem intravasalen Verteilungsvolumen eines Glykokalyx-permeablen Tracers mittels direkter Double-Tracer-Blutvolumenmessung (78, 102, 103). Auch dieses Verfahren gibt lediglich Aufschluss über das systemische Glykokalyxvolumen und erlaubt somit keine Hinweise auf lokale Unterschiede des Aufbaus und ihrer Hauptbestandteile (101). Außerdem kamen Michel et al.

zu dem Schluss, dass diese Methode für klinische Untersuchungen durch eine nicht ausreichende Genauigkeit nicht zu empfehlen ist, weshalb sie in der vorliegenden Studie keine Anwendung gefunden hat (114).

Die endotheliale Glykokalyx stellt ein äußerst fragiles dreidimensionales Gebilde dar und wird durch herkömmliche Gewebefixierung bereits vollständig abgebaut (43, 101). Eine exakte, direkte Visualisierung der endothelialen Glykokalyx stellte daher in der Vergangenheit eine große Herausforderung dar. Durch moderne Markierungstechnik auf Lanthanbasis ist es letztlich gelungen, eine intakte endotheliale Glykokalyx elektronenmikroskopisch abzubilden (43, 60, 88, 115). Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich, die Ladung, die Zusammensetzung und die Struktur der endothelialen Glykokalyx darzustellen (101). Nachteilig hierbei ist jedoch, dass sich die Ergebnisse aufgrund unterschiedlicher Fixierungs- und Färbemethoden unterscheiden und dass diese Visualisierungsmethode in vivo nicht angewendet werden kann (116).

Des Weiteren ist es möglich, die endotheliale Glykokalyx mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie direkt und in vivo darzustellen (101, 117). Aus physikalischen Gründen (schwierige Bildauflösung) ist dieses Verfahren auf eine Eindringtiefe von  $<15\mu\text{m}$  limitiert (117). Eine zu hohe Lichtintensität bei der Intravitalmikroskopie kann die endotheliale Glykokalyx zudem schädigen und somit zu verzerrten Ergebnissen führen (43). In geringerem Maße sind diese technologischen Limitierungen des Auflösungsverlustes in der Eindringtiefe von  $>40\mu\text{m}$  und der Phototoxizität auch in der Konfokalmikroskopie, die eine alternative in vitro Visualisierungsmethode darstellt, gegeben (101). Aus diesen Gründen wurden die alternativen Visualisierungsmethoden für dieses Studiendesign verworfen.

In Anbetracht der dargelegten Literatur stellt daher die von uns gewählte Methode der Messung der freien Glykokalyxbestandteile im Patientenserum mittels ELISA eine



zuverlässige Möglichkeit dar, um Hyaluronan- und Syndekan-1-Konzentrationen zu ermitteln und so das Ausmaß der Glykokalyxschädigung zu erfassen.

#### *5.1.4 Bestimmung des Multiorganversagens anhand des MOF-Scores*

In der vorliegenden Studie verwendeten wir den Multiple Organ Failure Score (MOF-Score) nach Goris et al. in der Modifikation nach Lefering et al. zur objektiven Dokumentation der Organdysfunktion bzw. des Organversagens (94). Neben der quantitativen Erfassung des postischämischen Organversagens war es hiermit möglich unser Patientenkollektiv in zwei klinische Gruppen einzuteilen (MOF  $\leq$ 6 Punkte, MOF  $>$ 6 Punkte).

Der MOF-Score wird allerdings in der vorhandenen Literatur kontrovers diskutiert (118). In die Berechnung des MOF-Scores fließen einige Parameter ein, welche unter Umständen durch intensivmedizinische Maßnahmen wie beispielsweise Katecholamingaben und eine Analgosedierung für die maschinelle Beatmung beeinflusst werden und verfälschen damit möglicherweise das Ergebnis. Die angesprochenen intensivmedizinischen Maßnahmen finden vor allem in der initialen Phase auf der Intensivstation Anwendung. Kontrovers wird daher in der Literatur diskutiert, ab welchem Zeitpunkt von einem Multiorganversagen gesprochen werden kann. Einige Autoren sprechen erst ab 48 Stunden nach kardiopulmonaler Reanimation von einem verwertbarem MOF-Score (119). Da es das Ziel der vorliegenden Studie war, pathophysiologische Mechanismen der Inflammationsreaktion in dem Zeitraum der frühen Postreanimationsphase zu identifizieren und alle eingeschlossenen Patienten intensivmedizinische Interventionen erfuhren, ist der MOF-Score in diesem Zusammenhang ein geeignetes Punktesystem, um unser Patientenkollektiv bezüglich der Schwere des klinischen Zustands in zwei Gruppen zu unterteilen.

Aufgrund des kleinen Patientenkollektivs konnten wir die einzelnen Einflussfaktoren statistisch nicht bereinigen. Das eingeschlossene Studienkollektiv wies allerdings aufgrund

von standardisierten Behandlungsstrukturen annähernd die gleichen Grundvoraussetzungen auf. Die Stichprobe war somit trotz iatrogenen Störfaktoren wie Beatmung und Medikation vergleichbar.

## **5.2 Messresultate**

### *5.2.1 Die Dynamik der Serummesswerte*

Die vorliegende Arbeit untersuchte als erstes die Serumkonzentrationsdynamik der Glykokalyxbestandteile Hyaluronan und Syndekan-1 über die Zeit von 48 Stunden nach erfolgreicher Reanimation mit Wiedererlangung eines Spontankreislaufs.

Bei den Messungen der Hyaluronan-Konzentrationen an unserem Patientenkollektiv fand sich ein signifikant positiv-dynamischer Verlauf über den Beobachtungszeitraum. Betrachtet man die Resultate der einzelnen Messzeitpunkte, so zeigte sich eine initial (0h) hohe Hyaluronan-Konzentration unmittelbar nach Herz-Kreislauf-Stillstand, gefolgt von einem Konzentrationsabfall nach 6 und 12 h. Anschließend kam es zu einem erneuten Anstieg der Hyaluronan-Serumkonzentration (24 und 48h).

Die Syndekan-1-Serumwerte zeigten keine Korrelation zum fortschreitenden Zeitverlauf bis 48h. Betrachtet man hier die einzelnen Messzeitpunkte, so zeigte sich für die Syndekan-1-Serumkonzentrationen ein undulierender Verlauf. Beginnend mit niedrigen Konzentrationen kam es zunächst zu einem Anstieg von Syndekan-1, gefolgt von einem erneuten Abfall 12h nach Reanimationsbeginn. Auffällig ist der Nachweis eines deutlichen Peaks der Serummesswerte bei 24h, danach fielen die Werte bis zum 48h-Messzeitpunkt erneut stark ab. Die Endothelaktivierung und die Schädigung der endothelialen Glykokalyx führen bereits in den ersten Stunden nach Herz-Kreislauf-Stillstand klinisch zu einem Kapillarlecksyndrom und einer Vasodilatation und weisen damit eindeutige Parallelen zum klinischen Bild einer

Sepsis auf (5, 23, 89, 90, 98). Daher ist dieser frühen Postreanimationsphase ein besonderes pathophysiologisches Interesse zu widmen.

Bei der Suche nach vergleichbaren Studien fällt auf, dass bislang nur wenige Arbeiten eine Glykokalyschädigung nach Ganzkörperischämie und -reperfusion im Rahmen des Herz-Kreislauf-Stillstands und anschließendem ROSC in einem ähnlich aufwendigen klinischen Setting untersucht haben. Eine der wesentlichen Arbeit stammt von Grundmann und Kollegen, die als erste Arbeitsgruppe die Dynamik der Glykokalysbestandteile Hyaluronan, Syndekan-1 und Heparansulfat bei Patienten nach kardiopulmonaler Reanimation beschrieben (5). Es wurden jeweils zwei Messzeitpunkte (binnen 6 Stunden nach Herz-Kreislauf-Stillstand und nach 48 - 72 Stunden) untersucht. Sowohl Hyaluronan als auch Syndekan-1 waren hier über die ersten 48 - 72 Stunden als Zeichen einer Schädigung der endothelialen Glykokalys nachweisbar, zeigten aber jeweils einen unterschiedlichen Konzentrationsverlauf über den Beobachtungszeitraum. Bereits zum Zeitpunkt der initialen Aufnahme fielen in dieser Studie signifikant erhöhte Syndekan-1-Messwerte auf. In der zweiten Blutuntersuchung nach 48 - 72 Stunden war dann ein relativer Abfall von Syndekan-1 festzustellen.

Auch Bro-Jeppesen und Kollegen untersuchten die Konzentrationsdynamik von Syndekan-1 in der frühen Postreanimationsphase (90). In dieser Studie wurden vier Messzeitpunkte festgelegt (nach Klinikaufnahme und Einschluss in die Studie sowie nach 24, 48 und 72 Stunden). Es zeigte sich eine ähnliche Dynamik wie bei Grundmann et al. mit erhöhten Syndekan-1-Messwerten in der initialen Blutentnahme bei Aufnahme (5, 90). Nach 24 Stunden fielen die Messwerte wieder ab und stagnierten bis zum Zeitpunkt nach 72 Stunden auf diesem Niveau (90). Dieser zeitliche Verlauf, der sich durch den Abfall zunächst erhöhter Syndekan-1-Werte nach 24 - 48 Stunden auszeichnet, ließ sich interessanterweise auch an Patienten nach kardiogenem Schock beobachten (100).

Da das von der endothelialen Glykokalyx abgespaltene und frei zirkulierende Syndekan-1 grundsätzlich schnell abgebaut wird, ist ein direkter Vergleich der von uns untersuchten Serumkonzentrationsdynamik von Syndekan-1 mit den Ergebnissen von Grundmann und Kollegen sowie Bro-Jeppesen et al. deutlich erschwert (5, 100, 120). Bruegger et al. konnten unter anderem aufzeigen, dass bei koronarchirurgischen Patienten bereits eine Stunde nach Beendigung des kardiopulmonalen Bypasses eine Normalisierung der zunächst erhöhten Plasmakonzentration von Syndekan-1 vorlag (120). Diese Daten weisen darauf hin, dass zeitliche Messabweichungen bereits von einer Stunde deutlich unterschiedliche Messergebnisse generieren können. Im vorliegenden Vergleich konnten Grundmann und Kollegen eine initiale Blutentnahme erst innerhalb von sechs Stunden nach Herz-Kreislauf-Stillstand erreichen (5). In der Arbeit von Bro-Jeppesen et al. wurde der Zeitpunkt der Nullstundenabnahme hingegen nicht genau präzisiert und erfolgte laut der Studienbeschreibungen nach Aufnahme in der Zielklinik und Einschluss in die Studie (90). Da die initiale Blutentnahme in unserer Untersuchung deutlich früher entweder durch den behandelnden Notarzt oder innerhalb von 60 Minuten nach ROSC erfolgte, lassen sich die Nullstundenwerte, auch in Korrelation zum weiteren zeitlichen Verlauf, nur eingeschränkt mit denen von Grundmann et al. und Bro-Jeppesen und Kollegen beschriebenen vergleichen (5, 90). Des Weiteren erfolgten in den beiden genannten Studien die weiteren Blutentnahmen erst nach 24 bzw. 48 - 72 Stunden, während unsere Studie innerhalb von 24 Stunden bereits vier Messzeitpunkte umfasste (5, 90).

Grundsätzlich haben alle drei Studien gemein, dass Syndekan-1 als Zeichen der Schädigung der endothelialen Glykokalyx während der ersten 48 Stunden nach Reanimation nachweisbar ist. Abhängig von den untersuchten Messzeitpunkten zeigten sich allerdings unterschiedliche Peaks der Serumkonzentration von Syndekan-1, wobei auffällt, dass in allen drei Studien die höchsten Serumwerte innerhalb der ersten 24 Stunden zu finden ist (5, 90). Einzig der Trend zwischen den Messzeitpunkten von 24 und 48 Stunden in der Arbeit von Bro-Jeppesen ist

direkt mit unseren Messresultaten in diesem Zeitraum vergleichbar (90). In der genannten Studie stagnierten die Syndekan-1-Messwerte von 24 bis 48 Stunden auf gleichem Niveau, während unsere Ergebnisse einen deutlichen Abfall der Syndekan-1-Messwerte zeigten.

Pathophysiologisch spielt die Ischämie-getriggerte Glykokalyxschädigung im Rahmen der systemischen Inflammationsreaktion, welche unter anderem durch die Zytokine IL-6 und TNF- $\alpha$  gesteuert wird, eine zentrale Rolle (89, 121). In der Studie von Bro-Jeppesen und Kollegen konnte eine Korrelation von IL-6 und Syndekan-1 sowie Thrombomodulin als Zeichen einer Endothelschädigung nachgewiesen werden (90). Durch die Freilegung der Endotheloberfläche nach Glykokalyxshedding kommt es in der Folge zu einer Leukozytenadhäsion und -translokation sowie zur Exponierung von endothelialen Zytokinrezeptoren (90). Gando und Kollegen wiesen diesbezüglich erhöhte Gewebethromboplastin-Messwerte in den ersten Stunden nach Herz-Kreislauf-Stillstand und Reanimation nach (122). Andere Untersuchungen fanden ferner erhöhte Nachweise endothelialer Zelladhäsionsmoleküle wie VCAM-1 und ICAM-1 sowie transmembranöser Proteine (Thrombomodulin) innerhalb der ersten 6 - 24 Stunden nach Reanimation (28, 37, 89). Damit zeigen sich deutliche Parallelen zur Pathophysiologie der Sepsis sowie zur Inflammationsreaktion nach Trauma und Verbrennung (89, 90, 123, 124).

Neben der Aktivierung der Blutgerinnung, die wiederum zu einer Freisetzung von Gewebethromboplastin führt, induziert die durch Inflammation getriggerte Glykokalyxschädigung zusätzlich das Freisetzen zirkulierender Zytokine (23, 38, 89, 122, 125, 126). Durch die Leukozytenadhäsion am Endothel kommt es außerdem zu einer Aktivierung der Endothelzellen, so dass diese weitere Oberflächenrezeptoren exprimieren (89). Im Rahmen dieser „Endothelitis“ vermuten Callaway und Kollegen, dass aktivierte Leukozyten dann zu einer exzessiven Freisetzung von Interleukinen führen (89).

Blutuntersuchungen zu zirkulierenden Interleukinen zeigen im Rahmen des Postreanimationssyndroms insgesamt einen ähnlichen zeitlichen Konzentrationsverlauf wie Syndekan-1 in unserer Untersuchung. So konnten Adrie und Kollegen als eine der ersten Arbeitsgruppen eine deutliche Erhöhung relevanter Zytokine (IL-1Ra, IL-6, IL8, IL-10) im Serum innerhalb der ersten drei Stunden nach Reanimation nachweisen (23). Diese Beobachtungen ließen sich in einer weiteren Studie von Peberdy et al. bestätigen (98). Bei allen Patienten nach Herz-Kreislauf-Stillstand und Reanimation wurde eine signifikante Erhöhung der Zytokine (IL-1Ra, IL-6, IL8, IL-10) in der initialen Blutentnahme bei Klinikaufnahme gemessen. Die IL-6-Messwerte stagnierten sowohl in der Studie von Adrie et al. als auch von Peberdy und Kollegen bis zur zweiten Blutentnahme nach 24 Stunden auf hohem Niveau und korrelierten jeweils mit dem Überleben (23, 98).

IL-6 scheint vornehmlich in den ersten 24 Stunden nach Reanimation erhöht zu sein und dient damit als Inflammationsmarker der initialen Postreanimationsphase (23, 98). Bro-Jeppesen et al. untersuchten in diesem Zusammenhang einen Zeitraum bis 72 Stunden nach Herz-Kreislauf-Stillstand (97). Auch in dieser Arbeit fand sich das Peak der IL-6-Messwerte nach 24 Stunden, anschließend fielen die Werte dann wieder ab, so dass festzustellen ist, dass IL-6 und die Syndekan-1-Messwerte unserer Studie eine ähnliche Dynamik in der frühen Postreanimationsphase zeigen.

Die systemische Entzündungsreaktion schreitet trotz des Rückgangs von IL-6 zu diesem Zeitpunkt aber noch weiter voran, so dass Peberdy und Kollegen diskutierten, dass die Zytokine das Postreanimationssyndrom möglicherweise initiieren, aber für eine weitere Aufrechterhaltung der systemischen Inflammationsreaktion nicht ursächlich sind (98). Einen möglichen Hinweis für das weitere Voranschreiten der Inflammationsreaktion über die Zeit nach 24 Stunden ergeben sich aus den Messungen der Syndekan-1-Serumwerte bis 48 bzw. 72 Stunden nach Herz-Kreislaufstillstand. Auch zu diesen Zeitpunkten war Syndekan-1 noch

im Blut nachweisbar und korrelierte in der Studie von Grundmann und Kollegen mit dem Überleben (5).

Untersuchungen von Procalcitoninmesswerten im zeitlichen Verlauf nach Reanimation und ROSC ergaben einen weiteren Hinweis für eine fortwährende Inflammationsreaktion (127). Procalcitonin als weiterer wichtiger Entzündungsmarker, der mit der Schwere des Postreanimationssyndroms und dem Outcome korrelierte, wurde bereits innerhalb der ersten Stunden nach Herzkreislauf-Stillstand und ROSC ausgeschüttet und stieg im Rahmen der systemischen Inflammationsreaktion protrahiert an (127, 128). Die Höchstwerte wurden bei Patienten mit negativem Outcome erst nach 24 bis 48 Stunden erreicht.

In unseren Untersuchungen zeigte sich außerdem ein fortschreitender Nachweis einer endothelialen Glykokalyxalteration durch den signifikanten Anstieg von Hyaluronan über die Zeit bis 48 Stunden. Diese Beobachtungen eines deutlich verzögerten Anstiegs während der intermediären Postreanimationsphase lassen sich nicht allein auf dem Boden eines durch die initiale Ischämie und Reperfusion entstandenen Schadens erklären, sondern sind wahrscheinlich vielmehr durch ein Voranschreiten der Glykokalyxschädigung im Rahmen der fortlaufenden systemischen Inflammationsreaktion bedingt. Zu diesem Schluss kamen bereits Grundmann und Kollegen, die in ihrer Studie eine ähnliche Dynamik der Hyaluronanmesswerte nachwiesen (5). Anders als in unserer Studie war die Konzentration von Hyaluronan zwar in der frühen Postreanimationsphase (6 Stunden nach Herz-Kreislauf-Stillstand) zunächst nicht signifikant erhöht. Es zeigte sich allerdings während der intermediären Phase (48 Stunden bis 72 Stunden nach Herz-Kreislauf-Stillstand) auch in dieser Studie ein Anstieg der Hyaluronan-Messwerte mit signifikantem Unterschied zu den Kontrollpatienten (5).

Peberdy und Kollegen diskutierten diesbezüglich, dass es möglich sei, dass es im Rahmen des Postreanimationssyndroms zu zwei begleitenden inflammatorischen Ereignissen kommt: einer kurzweiligen heftigen Immunantwort, welche durch die initiale Ischämie- und Reperfusionreaktion bedingt ist und einer zweiten subtilen Entzündungsreaktion, die eine initial erfolgte Schädigung weiter beeinflusst (98). Allerdings bleibt bisher ungeklärt, welche Trigger die protrahierte Entzündungsreaktion des Postreanimationssyndroms aufrechterhalten. Die sekundäre Immunantwort, Lipopolysaccharidtranslokationen im Darm sowie Infektionen können möglicherweise hierbei eine Rolle spielen (98).

Für die detaillierte Interpretation der Ergebnisse ist außerdem zu berücksichtigen, dass es durch die therapeutischen Maßnahmen auf der Intensivstation zu einer iatrogenen Beeinflussung der Glykokalyxschädigung kommt. Die exogene Applikation hoher Katecholamindosen führt beispielsweise zu einer Schädigung des Gefäßendothels (129, 130). Bereits eine Aktivierung des sympatho-adrenalen Systems, welche mit einem Anstieg zirkulierender Katecholamine einhergeht, führt bei kritisch kranken Patienten zu dosisabhängigen Schäden am Endothel (131). Die Katecholamine induzieren über die Schädigung der endothelialen Glykokalyx einen Zusammenbruch der Gefäßbarriere und führen zu einem Ausbilden eines Kapillarlecks sowie einer mikrozirkulatorischen Koagulopathie, so dass es zur Nekrose und letztlich zum Organversagen kommt (132). Ostrowski et al. konnten in diesem Zusammenhang eine Korrelation von zirkulierenden Katecholaminen und einer Schädigung der endothelialen Glykokalyx belegen (84). Bei Patienten mit ST-Hebungsinfarkt (STEMI) korrelierten zirkulierende Katecholaminkonzentrationen (Adrenalin und Noradrenalin) im Blut mit den Plasmakonzentrationen von Syndekan-1. Die stärkste Korrelation der Katecholamine mit Syndekan-1 wurde bei Patienten mit kardiogenem Schock nachgewiesen.



Auch die Wahl des Narkotikums scheint einen Einfluss auf die Strukturveränderung der endothelialen Glykokalyx zu haben. In Tiermodellen konnte eine protektive Wirkung von Sevofluran auf die endotheliale Glykokalyx nachgewiesen werden (91, 92). Unter der Gabe des volatilen Anästhetikums Sevofluran hatte sich eine signifikant geringere Schädigung der endothelialen Glykokalyx nach Ischämie und Reperfusion im Vergleich zu den Kontrollmessungen ergeben. Nach Propofolgabe hingegen war dies nicht nachzuweisen, es war also kein Einfluss im Sinne einer Protektion festzustellen (92).

### *5.2.2 Besonderheit der Nullstundenwerte*

Wie oben bereits ausführlich dargestellt, kommt es durch unterschiedliche Therapiemaßnahmen zu ausgeprägten Shedding-Vorgängen der endothelialen Glykokalyx (91, 92, 129, 130). So können die detektierten Veränderungen der Konzentrationsverläufe von Hyaluronan und Syndekan-1 letztlich nicht eindeutig nur der pathologischen Postreanimationsreaktion zugeordnet werden. Aufgrund der nur sehr geringen iatrogenen Beeinflussung gilt der initiale Messzeitpunkt bei 0h in diesem Zusammenhang als klinisch höchst bedeutsam. Unsere Ergebnisse konnten in diesem Zusammenhang eine signifikante Korrelation zwischen den Hyaluronanmesswerten bei 0h und einem negativen Outcome nachweisen. Dieses Ergebnis ist von herausragendem Interesse. Es zeigt, dass es bereits unmittelbar nach erlittenem Herz-Kreislauf-Stillstand und initial erfolgreicher Reanimation bei Patienten, die einen kritischen klinischen Verlauf nehmen, zu einer signifikant erhöhten Hyaluronanfreisetzung kommt. Hier scheint es schon unmittelbar nach Wiedererlangung des Spontankreislaufs zu einer Weichenstellung für das Ausmaß des nachfolgenden Ischämie-Reperfusionssyndroms zu kommen. Außerdem können unsere Ergebnisse möglicherweise einen ersten Hinweis dafür bieten, dass Hyaluronan einen potentiellen Marker darstellt, um besonders gefährdete Patienten möglichst früh zu identifizieren. Dieses Ergebnis rechtfertigt

aus unserer Sicht unbedingt Folgestudien, die anhand eines größeren Patientenkollektivs Hyaluronan als potentiellen Biomarker nach ROSC weiter untersuchen.

### *5.2.3 Korrelation der Serumkonzentrationsdynamik mit klinischen Parametern*

Unseren Ergebnissen zufolge wiesen Patienten, die im weiteren Verlauf ein Multiorganversagen entwickelten, eine im Vergleich zu Patienten mit niedrigeren MOF-Werten ( $\text{MOF} \leq 6$ ) signifikant unterschiedliche Dynamik der Serumkonzentrationen von Hyaluronan und Syndekan-1 auf. Patienten mit hohen MOF-Score-Werten zeigten signifikant erhöhte Hyaluronan- und Syndekan-1-Werte. Außerdem ergab sich eine positive Korrelation der Serumkonzentrationsdynamiken von Hyaluronan und einem negativen Outcome. Diesbezüglich konnte keine signifikant unterschiedliche Dynamik der Serummesswerte von Syndekan-1 festgestellt werden. Allerdings ergaben sich in der unmittelbaren Postreanimationsphase (0h-12h) deutlich höhere Syndekan-1-Konzentrationen bei den verstorbenen Patienten. Es zeigt sich somit der gleiche Trend hinsichtlich der Überlebensrate wie bei Hyaluronan, allerdings ohne statistische Signifikanz. Dies könnte an der geringen Fallzahl und der relativen Heterogenität des Patientenkollektiv (Reanimationspatienten) liegen, denn die Daten zeigen eine große Streubreite. In der folgenden Abbildung 12 sind die hohen Standardabweichungen der Ergebnisse deutlich zu erkennen:

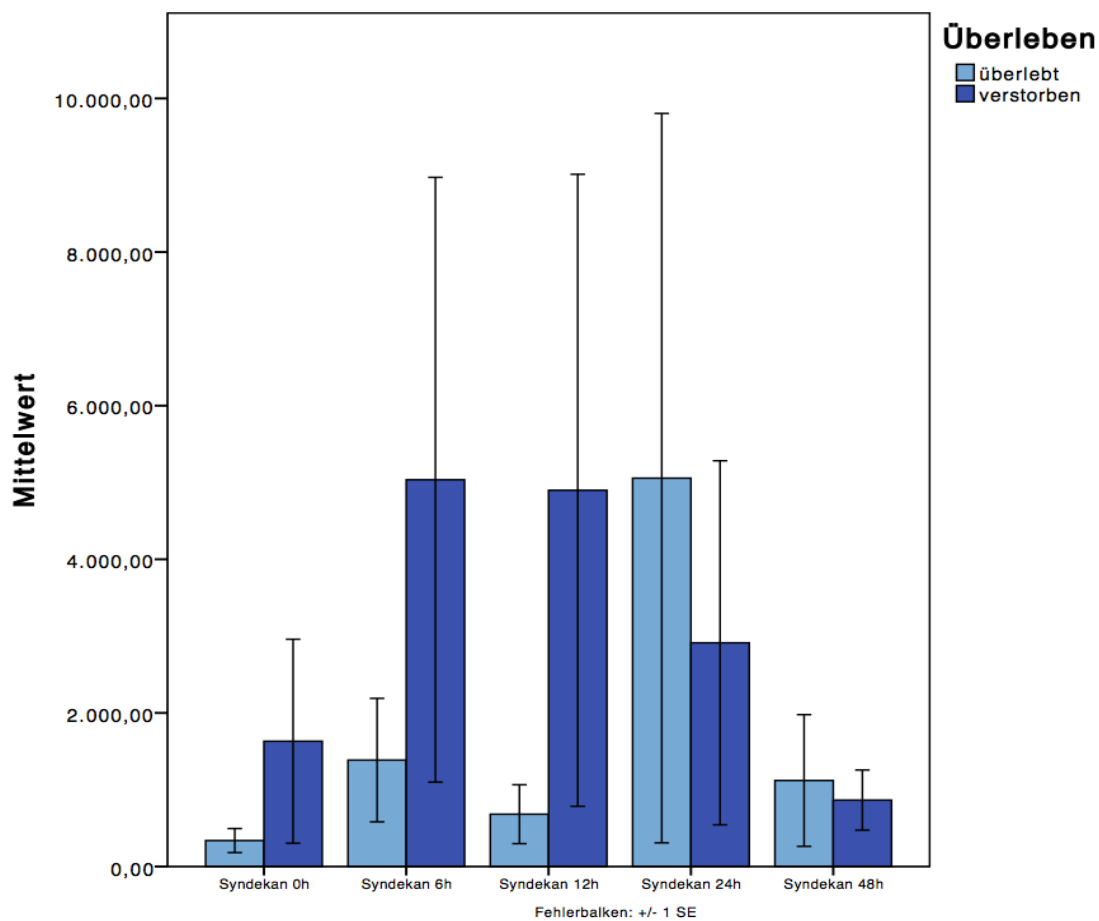


Abbildung 12: Serumsyndekan-1-Werte in Bezug auf das Outcome innerhalb der ersten 48h nach Herz-Kreislauf-Stillstand

Es folgt aus unseren Ergebnissen, dass eine hohe Konzentration der Glykokalyxbestandteile im Serum, welche durch eine Integritätsverletzung der endothelialen Glykokalyx mit Freisetzung ihrer Bestandteile Hyaluronan und Syndekan-1 bedingt ist, mit einem schweren klinischen Verlauf (abgebildet durch den hohen MOF-Score und einem negativen Outcome) einhergeht. Erklärt wird dieser Zusammenhang durch das Freilegen des Gefäßendothels infolge der durch Ischämie und Reperfusion bedingten Schädigung der Glykokalyx (5, 79, 89). Hierdurch kommt es zu einer Aktivierung der Endothel-vermittelten, systemischen

Inflammationsreaktion, welche zu einem Multiorganversagen führen kann und die hohe Mortalität des Postreanimationssyndroms erklärt (5, 10, 43, 89, 90).

Der Zusammenhang zwischen dem Glykokalyxshedding und der Schwere des klinischen Verlaufs konnte bereits mehrfach nach ähnlich verlaufenden pathologischen Prozessen wie beispielsweise Sepsis oder Verbrennung gezeigt werden und lässt sich auch hier durch die zentrale Rolle der endothelialen Glykokalyx im Rahmen der systemischen Inflammation erklären (77, 85, 123, 124). Im Rahmen der systemischen Entzündungsreaktion nach Sepsis und Trauma führen die Entzündungsmediatoren wie TNF- $\alpha$  sowie bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) zu einem Abbau der endothelialen Glykokalyx (78). TNF- $\alpha$  unterstützt die Einwanderung von Leukozyten und aktiviert Mastzellen, welche wiederum selbst Histamin, verschiedene Zytokine und Enzyme wie Proteasen und Heparanase ausschütten, die die endotheliale Glykokalyx zusätzlich angreifen (78, 79, 80, 81). Weiterhin führt das Zytokin-vermittelte Shedding der endothelialen Glykokalyx über eine Leukozytenadhäsion und -translokation zu einer Endothelaktivierung und damit zu weiteren Unterhaltung der systemischen Inflammation (64, 65). Nelson et al. wiesen in ihrer Studie diesbezüglich eine erhöhte Konzentration von Glykokalyxbestandteilen im Blut von Patienten im septischen Shock nach (77). Die zirkulierenden Glykokalyxbestandteile zeigten außerdem eine positive Korrelation mit einem negativen Outcome. Auch bei Traumapatienten ließ sich eine Korrelation von Syndekan-1-Werten mit zirkulierenden Zytokinen (IL-6 und IL-10) sowie einer erhöhten Sterberate nachweisen (85).

Bro-Jeppesen et al. bestätigten in ihren Untersuchungen erneut den Zusammenhang zwischen einer Endothelschädigung, der systemischen Inflammationsreaktion und der Schwere des Postreanimationssyndroms nach Herz-Kreislauf-Stillstand und erfolgreicher Reanimation (90). IL-6 zeigte als Maß der systemischen Inflammation eine positive Korrelation mit dem

Glykokalyxshedding (erhöhte Syndekan-1-Werte) sowie mit der Endothelaktivierung und -schädigung. Außerdem konnte eine weitere positive Korrelation zwischen Endothelschädigung und der Schwere des Postreanimationssyndroms festgestellt werden. Bezüglich der Überlebensrate ergab sich in dieser Studie allerdings kein „unabhängiger“ Zusammenhang mit der Endothelschädigung (90).

Auch Grundmann et al. untersuchten in ihrer Studie den Zusammenhang zwischen Hyaluronan und Syndekan-1 und dem Outcome, wobei allerdings deutliche Unterschiede zu unseren Ergebnissen festzustellen waren (5). Weder in der frühen noch in der intermediären Postreanimationsphase ergab sich in der Arbeit von Grundmann et al. ein signifikanter Unterschied der Hyaluronankonzentrationen zwischen Patienten mit positivem und negativem Outcome. Syndekan-1 zeigte hingegen in der intermediären Phase (24 - 48 Stunden nach Reanimation) eine signifikante Korrelation mit einem negativen Outcome (5). Grundmann und Kollegen gingen davon aus, dass der geringe initiale Anstieg von Hyaluronan und Syndekan-1 durch den relativ späten Zeitpunkt der ersten Blutabnahme (1 bis 6 Stunden nach Herz-Kreislauf-Stillstand) erklärt ist, was wiederum die Relevanz unserer Nullstundenergebnisse unterstreicht. Wir fanden allerdings im Gegensatz zu Grundmann et al. nicht nur zur Nullstunde, sondern auch nach 24 Stunden eine signifikante Korrelation der Hyaluronan-Messwerte mit dem negativen Outcome. Der Nachweis erhöhter Hyaluronanbestandteile im Serum, welcher mit einem schlechteren klinischen Verlauf und einem negativem Outcome einhergeht, lässt sich damit nach 24 Stunden eher nicht als Residuum des initialen Ischämie-Reperfusionsschadens, sondern vielmehr im Rahmen der weiter fortschreitenden systemischen Inflammationsreaktion erklären.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind aufgrund der prinzipiellen Einschränkungen einer Beobachtungsstudie, der geringen Fallzahl (15 Patienten) und der Heterogenität der Studienpopulation limitiert, so dass einzelne Fragestellungen sich nicht kausal beantworten lassen. Insgesamt bestätigt aber die vorhandene Studie aufgrund signifikanter Ergebnisse die

These, dass die Schädigung der endothelialen Glykokalyx dem Ausmaß der Schwere des klinischen Verlaufs nach erfolgreicher kardiopulmonaler Reanimation entspricht und mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität einhergeht.

### **5.3 Ausblick/ Klinische Relevanz**

Anhand der Ergebnisse der vorliegenden Studie und der vorhandenen Literatur lässt sich feststellen, dass eine Zerstörung der endothelialen Glykokalyx bereits in der unmittelbaren Postreanimationsphase auftritt und mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität assoziiert ist. Grundmann et al. diskutierten bereits in ihrer Arbeit die Möglichkeit frei zirkulierende Glykokalyxbestandteile als Biomarker einer Endothelschädigung im Rahmen des Postreanimationssyndroms zu messen (5). Mit dem von uns erbrachten Nachweis einer positiven Korrelation von Hyaluronanmesswerten zur Nullstunde und einem negativen Outcome wird diesbezüglich die prognostische Relevanz von Hyaluronan in der initialen Postreanimationsphase deutlich. Diese Ergebnisse rechtfertigen Folgestudien mit höheren Patientenzahlen, um Hyaluronan zukünftig als frühen Biomarker für besonders gefährdete Patienten nach Herz-Kreislaufstillstand und ROSC einzusetzen.

Zukünftig wird außerdem die Protektion und Therapie der geschädigten endothelialen Glykokalyx bei Patienten nach erfolgreicher Reanimation eine zunehmend bedeutendere Aufgabe in der intensivmedizinischen Therapie darstellen (43, 45). Obwohl die komplexen Wirkmechanismen bisher nur ansatzweise geklärt sind, konnte bereits nachgewiesen werden, dass Hydrokortison und Antithrombin offensichtlich einen schützenden Einfluss auf die endothelialen Glykokalyx haben (43, 86, 88). Es zeigte sich eine signifikant verringerte Schädigung der endothelialen Glykokalyx durch Hydrokortison-Applikation an perfundierten Meerschweinchenherzen nach Ischämie und Reperfusion (88). Hydrokortison führt insgesamt zu einer Mastzellstabilisierung und verhindert damit die weitere Aktivierung proteolytischer

Kaskaden (78). Antithrombin III hingegen dient vornehmlich als physiologischer Inhibitor von Serinproteasen wie Thrombin und Elastase und hemmt somit neben der plasmatischen Gerinnung die Inflammationsreaktion (78, 133). Anhand tierexperimenteller Studien konnte eine signifikante Protektion der endothelialen Glykokalyx nach Ischämie und Reperfusion nach Antithrombin III-Applikation nachgewiesen werden (86). Anderen Studien zufolge könnten sowohl TNF- $\alpha$ -Blocker als auch Antioxidantien weitere Möglichkeiten einer Shedding-Inhibition darstellen (134, 135). Letztlich ist auch eine direkte Substitution von einzelnen Glykokalyxbestandteilen zur Wiederherstellung des Netzwerks denkbar. Nach Applikation von Hyaluronan konnte ein unter Ischämie und Reperfusion entstandener Glykokalyxschaden im Mausmodell verringert und die endotheliale Glykokalyx teilweise sogar vollständig wiederaufgebaut werden (44).

## 6. Zusammenfassung

Trotz großer Erfolge in der Verbesserung von Reanimationsabläufen und der Versorgung reanimierter Patienten auf der Intensivstation bleiben Morbiditäts- und Mortalitätsraten nach einem Herz-Kreislauf-Stillstand mit ROSC weiterhin auf einem hohen Niveau (10, 13, 98). Etwa 70% der initial stabilisierten Patienten versterben in der Postreanimationsphase auf Intensivstation (7). Die hohe Letalität ist durch die Entwicklung des Postreanimationssyndroms erklärt (10, 13). Hervorgerufen durch die globale Ischämie und anschließende Reperfusion entwickelt sich einerseits eine lokalisierte Gewebeschädigung, wobei die zerebrale Schädigung eine vornehmliche Rolle spielt (10). Andererseits zeigen sich bereits in den ersten Stunden nach kardiopulmonaler Reanimation systemische Schäden, die durch eine generalisierte Inflammationsreaktion, die Beeinflussung des Gerinnungssystems und eine Endothelschädigung mit generalisierter Ödembildung erklärt sind und im Multiorganversagen resultieren können (90). Das Postreanimationssyndrom wird daher vielfach auch als „sepsis-like syndrome“ bezeichnet (14).

Die Interaktionen zwischen der endothelialen Schädigung, der systemischen Inflammationsreaktion und einer Organschädigung sind bislang allerdings nicht vollständig geklärt (90). Neueren Studien zufolge scheint die Verletzung der endothelialen Glykokalyx durch das Freilegen und die Aktivierung des Gefäßendothels jedoch einen ersten Schlüsselschritt im Rahmen der systemischen Inflammationsreaktion darzustellen (89, 90).

In diesem Kontext wurden in der vorliegenden Arbeit Serummesswerte der frei zirkulierenden Glykokalyxproteine Hyaluronan und Syndekan-1 während der frühen und der intermediären Postreanimationsphase untersucht, um indirekt das Ausmaß der Glykokalyxschädigung nach Ischämie und Reperfusion am Menschen zu quantifizieren. Um den Zusammenhang zwischen



dem Glykokalyxshedding und dem Postreanimationssyndrom genauer beurteilen zu können, wurden die Serummesswerte zusätzlich mit klinischen Parametern korreliert.

Insgesamt wurden 15 Patienten nach kardiopulmonaler Reanimation mit ROSC in die Studie eingeschlossen. Die Serumproben wurden jeweils nach Wiedererlangung des Spontankreislaufs durch den behandelnden Notarzt bzw. bei Aufnahme der Patienten im Schockraum (0 Stunden) sowie erneut nach 6, 12, 24 und 48 Stunden gewonnen. Die freien Glykokalyxbestandteile Hyaluronan und Syndekan-1 wurden dann mittels ELISA bestimmt. Untersuchte klinische Parameter waren der Multiple Organ Failure-Score (MOF-Score) nach Goris et al. in der Modifikation nach Lefering et al. und das Outcome im Sinne eines 30-Tage Überlebens.

Unsere Ergebnisse zeigten einen charakteristischen Konzentrationsverlauf der Serumkonzentrationen von Hyaluronan innerhalb der ersten 48h nach erfolgreicher Reanimation. Dieser war durch eine signifikant vermehrte Freisetzung von Hyaluronan aus der endothelialen Glykokalyx über die Zeit charakterisiert. Zwischen Syndekan-1-Serumwerten und dem fortschreitenden Zeitverlauf zeigte sich hingegen keine Korrelation.

Des Weiteren konnten wir einen signifikanten Zusammenhang zwischen den initialen Hyaluronanmesswerten bei 0h und einem negativen Outcome feststellen. Patienten, die innerhalb der ersten 30 Tage nach Reanimation verstarben, wiesen bereits zum Nullstundenzeitpunkt eine signifikant höhere Hyaluronankonzentration auf als solche, die diesen Zeitraum überlebten. Für Syndekan-1 wurde zur Nullstunde keine signifikante Korrelation gemessen.

Anhand unserer Daten ließ sich außerdem eine positive Korrelation der Konzentrationsdynamik von Hyaluronan mit den untersuchten klinischen Parametern

Multiorganversagen und negativem Outcome nachweisen. Patienten, die innerhalb der ersten 48h nach Reanimation ein Multiorganversagen entwickelten, wiesen eine signifikant erhöhte Serumkonzentration von Hyaluronan über die Zeit auf. Auch bei Patienten, die innerhalb von 30 Tagen nach Reanimation verstarben, zeigte sich eine signifikant unterschiedliche Dynamik mit stärkerem Anstieg der Messwerte. Es ließ sich außerdem feststellen, dass die Patienten, die ein Multiorganversagen entwickelten und damit einen kritischeren klinischen Verlauf aufwiesen, signifikant höhere Syndekan-1-Werte zeigten. Bezüglich des klinischen Parameters Outcome ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der Syndekan-1-Messwerte.

Wir konnten zusammenfassend nachweisen, dass eine hohe Konzentration der Glykokalyxbestandteile im Serum, welche durch eine Integritätsverletzung der endothelialen Glykokalyx mit einer Freisetzung ihrer Bestandteile bedingt ist, mit einem schweren klinischen Verlauf (abgebildet durch den hohen MOF-Score) und einem negativen Outcome einhergeht.

Mit dem von uns erbrachten Nachweis einer positiven Korrelation von erhöhten Hyaluronanmesswerten zur Nullstunde und einem negativen Outcome wird zudem die prognostische Relevanz von Hyaluronan in der initialen Postreanimationsphase deutlich. Aufgrund der nur sehr geringen iatrogenen Beeinflussung ist dieser initiale Messpunkt klinisch von hohem Interesse. Hier scheint es schon unmittelbar nach Wiedererlangung des Spontankreislaufs zu einer Weichenstellung für das Ausmaß des nachfolgenden Ischämie-Reperfusionssyndroms zu kommen. So könnte Hyaluronan als potentieller Marker dienen, besonders gefährdete Patienten möglichst früh zu identifizieren. Dieses vielversprechende Ergebnis rechtfertigt aus unserer Sicht unbedingt Folgestudien, die diesen Zusammenhang anhand eines größeren Patientenkollektivs evaluieren, um so Hyaluronan als potentiellen Biomarker nach Herz-Kreislauf-Stillstand und ROSC weiter zu validieren.

## 7. Literaturnachweis

1. Gräsner JT, Seewald S, Bohn A, Fischer M, Messelken M, Jantzen T, Wnent J. Deutsches Reanimationsregister. *Anaesthesist*. 2014;63:470-476.
2. Berdowski J, Berg RA, Tijssen JG, Koster RW. Global incidences of out-of-hospital cardiac arrest and survival rates: systematic review of 67 prospective studies. *Resuscitation*. 2010 Nov;81(11):1479-1487.
3. Jahresbericht Präklinik 2013, Deutsches Reanimationsregister, unter: <https://www.reanimationsregister.de/downloads/jahrestreffen-2014/73-jahrestreffen-2014-jahresbericht-pra-klinik/file.html> (abgerufen am 24.04.2016).
4. Pell JP, Sirel JM, Marsden AK, Ford I, Walker NL, Cobbe SM. Presentation, management, and outcome of out of hospital cardiopulmonary arrest: comparison by underlying aetiology. *Heart*. 2003 Aug;89(8):839-842.
5. Grundmann S, Fink K, Rabadzhieva L, Bourgeois N, Schwab T, Moser M, Bode C, Busch HJ. Perturbation of the endothelial glycocalyx in post cardiac arrest syndrome. *Resuscitation*. 2012 Jun;83(6):715-720.
6. van Tulder R, Holzer M. Intensivtherapie in der Postreanimationsphase. *Intensivmed*. 2011;48:254-258.
7. Schneider A, Popp E, Böttiger BW. Postreanimationstherapie: Therapiekonzepte und Prognosestellung. *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*. 2007 Jun;42(6):408-414.
8. Böttiger BW, Grabner C, Bauer H, Bode C, Weber T, Motsch J, Martin E. Long-term outcome after out-of-hospital cardiac arrest with physician staffed emergency medical services: the Utstein style applied to a midsized urban/suburban area. *Heart* 1999;82:674–9.
9. Kuilman M, Bleeker JK, Hartman JA, Simoons ML. Long-term survival after out-of-hospital cardiac arrest: an 8-year follow-up. *Resuscitation*. 1999 Jun;41(1):25-31.
10. Nolan JP, Neumar RW, Adrie C, Aibiki M, Berg RA, Böttiger BW, Callaway C, Clark RS, Geocadin RG, Jauch EC, Kern KB, Laurent I, Longstreth WT, Merchant RM, Morley P, Morrison LJ, Nadkarni V, Peberdy MA, Rivers EP, Rodriguez-Nunez A, Sellke FW, Spaulding C, Sunde K, Hoek TV. Post-cardiac arrest syndrome: epidemiology, pathophysiology, treatment, and prognostication. A Scientific Statement from the International Liaison Committee on Resuscitation; the American Heart Association Emergency Cardiovascular Care

Committee; the Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; the Council on Cardiopulmonary, Perioperative, and Critical Care; the Council on Clinical Cardiology; the Council on Stroke. *Resuscitation*. 2008 Dec;79(3):350-379.

11. Opie LH. Reperfusion injury and its pharmacologic modification. *Circulation*. 1989 Oct;80(4):1049-1062.
12. White BC, Grossman LI, Krause GS. Brain injury by global ischemia and reperfusion: a theoretical perspective on membrane damage and repair. *Neurology*. 1993 Sep;43(9):1656-1665.
13. Schneider A, Albertsmeier M, Böttiger BW, Teschendorf P. Postreanimationssyndrom; Rolle der Entzündung nach Herz-Kreislauf-Stillstand. *Anaesthesist*. 2012;61:424-436.
14. Adrie C, Laurent I, Monchi M, Cariou A, Dhainaou JF, Spaulding C. Postresuscitation disease after cardiac arrest: a sepsis-like syndrome? *Curr Opin Crit Care*. 2004 Jun;10(3):208-212.
15. Geppert A, Zorn G, Karth GD, Haumer M, Gwechenberger M, Koller-Strametz J, Heinz G, Huber K, Siostrzonek P. Soluble selectins and the systemic inflammatory response syndrome after successful cardiopulmonary resuscitation. *Crit Care Med*. 2000 Jul;28(7):2360-2365.
16. Mongardon N, Dumas F, Ricome S, Grimaldi D, Hissem T, Pène F, Cariou A. Postcardiac arrest syndrome: from immediate resuscitation to long-term outcome. *Ann Intensive Care*. 2011 Nov 3;1(1):45.
17. Domański L, Safranow K, Dołęgowska B, Różański J, Myślak M, Ciechanowski K, Jakubowska K, Dziedziejko V, Romanowski M, Sulikowski T, Sieńko J, Kamiński M, Ostrowski M, Domański M, Pawlik A, Rać ME, Chlubek D. Hypoxanthine as a graft ischemia marker stimulates catalase activity in the renal vein during reperfusion in humans. *Transplant Proc*. 2006 Jan-Feb;38(1):35-8.
18. Gourdin MJ, Bree B, De Kock M. The impact of ischaemia-reperfusion on the blood vessel. *Eur J Anaesthesiol*. 2009 Jul;26(7):537-47.
19. Huet O, Dupic L, Batteux F, Matar C, Conti M, Chereau C, Lemiale V, Harrois A, Mira JP, Vicaut E, Cariou A, Duranteau J. Postresuscitation syndrome: potential role of hydroxyl radical-induced endothelial cell damage. *Crit Care Med*. 2011 Jul;39(7):1712-20.
20. Cerchiari EL, Safar P, Klein E, Diven W. Visceral, hematologic and bacteriologic changes and neurologic outcome after cardiac arrest in dogs. The visceral post-resuscitation syndrome. *Resuscitation*. 1993 Apr;25(2):119-136.

21. Adams JA. Endothelium and cardiopulmonary resuscitation. *Crit Care Med.* 2006 Dec;34(12 Suppl):S458-465.
22. Esmon CT. Coagulation and inflammation. *J Endotoxin Res.* 2003;9(3):192-198.
23. Adrie C, Adib-Conquy M, Laurent I, Monchi M, Vinsonneau C, Fitting C, Fraisse F, Dinh-Xuan A T, Carli P, Spaulding C, Dhainaut JF, Cavaillon JM. Successful cardiopulmonary resuscitation after cardiac arrest as a “sepsis-like” syndrome. *Circulation.* 2002 Jul 30;106(5):562-568.
24. Nishimoto N, Kishimoto T. Interleukin 6: from bench to bedside. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2006 Nov;2(11):619-26
25. Bickel M. The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation. *J Periodontol.* 1993 May;64(5 Suppl):456-60.
26. Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol.* 2008 May 1;180(9):5771-7.
27. Caceres MJ, Schleien CL, Kuluz JW, Gelman B, Dietrich WD. Early endothelial damage and leukocyte accumulation in piglet brains following cardiac arrest. *Acta Neuropathol.* 1995;90(6):582-591.
28. Gando S, Nanzaki S, Morimoto Y, Kobayashi S, Kemmotsu O. Out-of- hospital cardiac arrest increases soluble vascular endothelial adhesion molecules and neutrophil elastase associated with endothelial injury. *Intensive Care Med.* 2000 Jan;26(1):38-44.
29. Gando S, Nanzaki S, Morimoto Y, Kobayashi S, Kemmotsu O. Alterations of soluble L- and P-selectins during cardiac arrest and CPR. *Intensive Care Med.* 1999 Jun;25(6):588-593.
30. Böttiger BW, Motsch J, Braun V, Martin E, Kirschfink M. Marked activation of complement and leukocytes and an increase in the concentrations of soluble endothelial adhesion molecules during cardiopulmonary resuscitation and early reperfusion after cardiac arrest in humans. *Crit Care Med.* 2002 Nov;30(11):2473-2480.
31. Mussack T, Biberthaler P, Gippner-Steppert C, Kanz KG, Wiedemann E, Mutschler W, Jochum M. Early cellular brain damage and systemic inflammatory response after cardiopulmonary resuscitation or isolated severe head trauma: a comparative pilot study on common pathomechanisms. *Resuscitation.* 2001 May;49(2):193-199.

32. Jenei ZM, Zima E, Csuka D, Munthe-Fog L, Hein E, Széplaki G, Becker D, Karádi I, Prohászka Z, Garred P, Merkely B. Complement activation and its prognostic role in post-cardiac arrest patients. *Scand J Immunol*. 2014 Jun;79(6):404-9.
33. Dunkelberger JR, Song WC. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res* 2010;20:34–50.
34. Teschendorf P, Padosch SA, del Valle Y Fuentes D, Peter C, Fuchs A, Popp E, Spöhr F, Böttiger BW, Walther A. Effects of activated protein C on post cardiac arrest microcirculation: an in vivo microscopy study. *Resuscitation*. 2009 Aug;80(8):940-945.
35. Gando S, Kameue T, Nanzaki S, Igarashi M, Nakanishi Y. Platelet activation with massive formation of thromboxane A2 during and after cardiopulmonary resuscitation. *Intensive Care Med*. 1997 Jan;23(1):71-76.
36. Böttiger BW, Böhrer H, Böker T, Motsch J, Aulmann M, Martin E. Platelet factor 4 release in patients undergoing cardiopulmonary resuscitation – can reperfusion be impaired by platelet activation? *Acta Anaesthesiol Scand*. 1996 May;40(5):631-635.
37. Adrie C, Monchi M, Laurent I, Um S, Yan SB, Thuong M, Cariou A, Charpentier J, Dhainaut JF. Coagulopathy after successful cardiopulmonary resuscitation following cardiac arrest: implication of the protein C anticoagulant pathway. *J Am Coll Cardiol*. 2005 Jul 5;46(1):21-28.
38. Böttiger BW, Motsch J, Böhrer H, Böker T, Aulmann M, Nawroth PP, Martin E. Activation of blood coagulation after cardiac arrest is not balanced adequately by activation of endogenous fibrinolysis. *Circulation*. 1995 Nov 1;92(9):2572-2578.
39. Palabrica T, Lobb R, Furie BC, Aronovitz M, Benjamin C, Hsu YM, Sajer SA, Furie B. Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets. *Nature*. 1992 Oct 29;359(6398):848-851.
40. Martin NB, Jamieson A, Tuffin DP. The effect of interleukin-4 on tumor necrosis factor-alpha induced expression of tissue factor and plasminogen activator inhibitor-1 in human umbilical vein endothelial cells. *Thromb Haemost*. 1993 Dec 20;70(6):1037-1042.
41. Ames A III, Wright RL, Kowada M, Thurston JM, Majno G. Cerebral ischemia. II. The no-reflow phenomenon. *Am J Pathol*. 1968 Feb; 52(2): 437–453.
42. Fischer M, Hossmann KA. No-reflow after cardiac arrest. *Intensive Care Med*. 1995 Feb;21(2):132-141.

43. Chappell D, Jacob M, Becker B.F, Hofmann-Kiefer K, Conzen P, Rehm M. Expedition Glykokalyx. Ein neu entdecktes „Great Barrier Reef“. *Anaesthesist* 2008; 57:959–969.
44. Rubio-Gayosso I, Platts SH, Duling BR. Reactive oxygen species mediate modification of glycocalyx during ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006 Jun;290(6):H2247-56.
45. Reitsma S, Slaaf DW, Vink H, van Zandvoort MAMJ, oude Egbrink MGA. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflugers Arch.* 2007 Jun; 454(3): 345–359.
46. Van Teeffelen JW, Brands J, Stroes ES, Vink H. Endothelial glycocalyx: sweet shield of blood vessels. *Trends Cardiovasc Med.* 2007 Apr;17(3):101-5.
47. Pries AR, Kuebler WM. Normal endothelium. *Handb Exp Pharmacol.* 2006;(176 Pt 1):1-40.
48. Pries AR, Secomb TW, Gaehtgens P. The endothelial surface layer. *Pflugers Arch.* 2000 Sep;440(5):653-666.
49. Lipowsky HH. Microvascular rheology and hemodynamics. *Microcirculation.* 2005 Jan-Feb;12(1):5-15.
50. Rapraeger A. Transforming growth factor (type beta) promotes the addition of chondroitin sulfate chains to the cell surface proteoglycan (syndecan) of mouse mammary epithelia. *J Cell Biol.* 1989 Nov;109(5):2509-2518.
51. Tkachenko E, Rhodes JM, Simons M. Syndecans: new kids on the signaling block. *Circ Res.* 2005 Mar 18;96(5):488-500.
52. Nandi A, Estess P, Siegelman MH. Hyaluronan anchoring and regulation on the surface of vascular endothelial cells is mediated through the functionally active form of CD44. *J Biol Chem.* 2000 May 19;275(20):14939-14948.
53. Weigel PH, Hascall VC, Tammi M. Hyaluronan synthases. *J Biol Chem.* 1997 May 30;272(22):13997-14000.
54. Scott JE, Heatley F. Hyaluronan forms specific stable tertiary structures in aqueous solution: a <sup>13</sup>C NMR study. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Apr 27;96(9):4850-4855.
55. Scott JE, Thomlinson AM, Prehm P. Supramolecular organization in streptococcal pericellular capsules is based on hyaluronan tertiary structures. *Exp Cell Res* 2003;285(1):1–8.
56. Starling E. On the absorption of fluid from the connective tissue spaces. *J Physiol.* 1896 May 5; 19(4): 312–326.

57. Adamson RH, Lenz JF, Zhang X, Adamson GN, Weinbaum S, Curry FE. Oncotic pressures opposing filtration across non-fenestrated rat microvessels. *J Physiol*. 2004 Jun 15; 557(Pt 3): 889–907.
58. Jacob M, Bruegger D, Rehm M, Stoeckelhuber M, Welsch U, Conzen P, Becker BF. The endothelial glycocalyx affords compatibility of Starling's principle and high cardiac interstitial albumin levels. *Cardiovasc Res*. 2007 Feb 1;73(3):575-586.
59. Jacob M, Bruegger D, Rehm M, Welsch U, Conzen P, Becker BF. Contrasting effects of colloid and crystalloid resuscitation fluids on cardiac vascular permeability. *Anesthesiology*. 2006 Jun;104(6):1223-1231.
60. Rehm M, Zahler S, Lötsch M, Welsch U, Conzen P, Jacob M, Becker BF. Endothelial glycocalyx as an additional barrier determining extravasation of 6% hydroxyethyl starch or 5% albumin solutions in the coronary vascular bed. *Anesthesiology*. 2004 May;100(5):1211-1223.
61. Jacob M, Chappell D, Hofmann-Kiefer K, Conzen P, Peter K, Rehm M. Determinants of insensible fluid loss. Perspiration, protein shift and endothelial glycocalyx. *Anaesthetist*. 2007 Aug;56(8):747-58, 760-764.
62. Weinbaum S, Tarbell JM, Damiano ER. The structure and function of the endothelial glycocalyx layer. *Annu Rev Biomed Eng*. 2007;9:121-167.
63. Vink H, Constantinescu AA, Spaan JA. Oxidized lipoproteins degrade the endothelial surface layer: implications for platelet–endothelial cell adhesion. *Circulation*. 2000 Apr 4;101(13):1500-2.
64. Constantinescu AA, Vink H, Spaan JA. Endothelial cell glycocalyx modulates immobilization of leukocytes at the endothelial surface. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003 Sep 1;23(9):1541-1547.
65. Henry CB, Duling BR. TNF-alpha increases entry of macromolecules into luminal endothelial cell glycocalyx. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000 Dec;279(6):H2815-2823.
66. Allen BL, Filla MS, Rapraeger AC. Role of heparan sulfate as a tissue-specific regulator of FGF-4 and FGF receptor recognition. *J Cell Biol*. 2001 Nov 26;155(5):845-858.
67. Fromm JR, Hileman RE, Weiler JM, Linhardt RJ. Interaction of fibroblast growth factor-1 and related peptides with heparan sulfate and its oligosaccharides. *Arch Biochem Biophys*. 1997 Oct 15;346(2):252-262.



68. Shimada K, Kobayashi M, Kimura S, Nishinaga M, Takeuchi K, Ozawa T. Anticoagulant heparin-like glycosaminoglycans on endothelial cell surface. *Jpn Circ J*. 1991 Oct;55(10):1016-1021.
69. Egbrink MG, Van Gestel MA, Broeders MA, Tangelder GJ, Heemskerk JM, Reneman RS, Slaaf DW. Regulation of microvascular thromboembolism in vivo. *Microcirculation*. 2005 Apr-May;12(3):287-300.
70. Tovar AM, de Mattos DA, Stelling MP, Sarcinelli-Luz BS, Nazareth RA, Mourao PA. Dermatan sulfate is the predominant antithrombotic glycosaminoglycan in vessel walls: implications for a possible physiological function of heparin cofactor II. *Biochim Biophys Acta*. 2005 Apr 15;1740(1):45-53.
71. Quinsey NS, Greedy AL, Bottomley SP, Whisstock JC, Pike RN. Antithrombin: in control of coagulation. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Mar;36(3):386-389.
72. Chappel D, Hofmann-Kiefer K, Jacob M, Rehm M, Briegel J, Welsch U, Conzen P, Becker BF. TNF- $\alpha$  induced shedding of the endothelial glycocalyx is prevented by hydrocortisone and antithrombin. *Basic Res Cardiol*. 2009 Jan;104(1):78-89.
73. Li Q, Bolli R, Qiu Y, Tang XL, Murphree SS, French BA. Gene therapy with extracellular superoxide dismutase attenuates myocardial stunning in conscious rabbits. *Circulation*. 1998 Oct 6;98(14):1438-1448.
74. Bode L, Murch S, Freeze HH. Heparan sulfate plays a central role in a dynamic in vitro model of protein-losing enteropathy. *J Biol Chem*. 2006 Mar 24;281(12):7809-7815.
75. Tarbell JM, Weinbaum S, Kamm RD. Cellular fluid mechanics and mechanotransduction. *Ann Biomed Eng*. 2005 Dec;33(12):1719-1723.
76. Annecke T, Fischer J, Hartmann H, Tschoep J, Rehm M, Conzen P, Sommerhoff C P, Becker BF. Shedding of the coronary endothelial glykokalyx: effects of hypoxia/reoxygenation vs ischaemia/ reperfusion. *Br J Anaesth*. 2011 Nov;107(5):679-686.
77. Nelson A, Berkestedt I, Schmidtchen A, Ljunggren L, Bodelsson M. Increased levels of glycosaminoglycans during septic shock: relation to mortality and the anti-bacterial actions of plasma. *Shock*. 2008 Dec;30(6):623-627.
78. Becker B, Chapell D, Bruegger D, Annecke T, Jacob M. Therapeutic strategies targeting the endothelial glycocalyx: acute deficits, but great potential. *Cardiovasc Res*. 2010 Jul 15;87(2):300-310.

79. Chappell D, Westphal M, Jacob M. The impact of the glycocalyx on microcirculatory oxygen distribution in critical illness. *Curr Opin Anaesthesiol*. 2009 Apr;22(2):155-62.
80. Pejler G, Abrink M, Ringvall M, Wernersson S. Mast cell proteases. *Adv Immunol*. 2007;95:167-255.
81. Reil JC, Gilles S, Zahler S, Brandl A, Drexler H, Hültner L, Matrisian LM, Welsch U, Becker BF. Insights from knock-out models concerning postischemic release of TNFalpha from isolated mouse hearts. *J Mol Cell Cardiol*. 2007 Jan;42(1):133-41. Epub 2006 Nov 13.
82. Mulivor AW, Lipowsky HH. Inflammation- and ischemia-induced shedding of venular glycocalyx. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004 May;286(5):H1672-1680.
83. Schmidt EP, Li G, Li L, Fu L, Yang Y, Overdier KH, Douglas IS, Linhardt RJ. The circulating glycosaminoglycan signature of respiratory failure in critically ill adults. *J Biol Chem*. 2014 Mar 21;289(12):8194-8202.
84. Ostrowski SR, Pedersen SH, Jensen JS, Mogelvang R, Johansson PI. Acute myocardial infarction is associated with endothelial glycocalyx and cell damage and a parallel increase in circulating catecholamines. *Crit Care*. 2013 Feb 22;17(1):R32.
85. Johansson PI, Stensballe J, Rasmussen LS, Ostrowski SR. A high admission syndecan-1 level, a marker of endothelial glycocalyx degradation, is associated with inflammation, protein C depletion, fibrinolysis, and increased mortality in trauma patients. *Ann Surg*. 2011 Aug;254(2):194-200.
86. Chappell D, Jacob M, Hofmann-Kiefer K, Rehm M, Welsch U, Conzen P, Becker BF. Antithrombin reduces shedding of the endothelial glycocalyx following ischaemia/reperfusion. *Cardiovasc Res*. 2009 Jul 15;83(2):388-396.
87. Rehm M, Bruegger D, Christ F, Conzen P, Thiel M, Jacob M, Chappell D, Stoekelhuber M, Welsch U, Reichart B, Peter K, Becker BF. Shedding of the endothelial glycocalyx in patients undergoing major vascular surgery with global and regional ischemia. *Circulation*. 2007 Oct 23;116(17):1896-1906.
88. Chappell D, Jacob M, Hofmann-Kiefer K, Bruegger D, Rehm M, Conzen P, Welsch U, Becker BF. Hydrocortisone preserves the vascular barrier by protecting the endothelial glycocalyx. *Anesthesiology*. 2007 Nov;107(5):776-784.
89. Callaway CW. Endothelial damage after cardiac arrest--"endotheliitis". *Resuscitation*. 2012 Jun;83(6):667-8.

90. Bro-Jeppesen J, Johansson PI, Hassager C, Wanscher M, Ostrowski SR, Bjerre M, Kjaergaard J. Endothelial activation/injury and associations with severity of post-cardiac arrest syndrome and mortality after out-of-hospital cardiac arrest. *Resuscitation*. 2016 Oct;107:71-9.
91. Annecke T, Chappell D, Chen C, Jacob M, Welsch U, Sommerhoff CP, Rehm M, Conzen PF, Becker BF. Sevoflurane preserves the endothelial glycocalyx against ischaemia-reperfusion injury. *Br J Anaesth*. 2010 Apr;104(4):414-21.
92. Annecke T1, Rehm M, Bruegger D, Kubitz JC, Kemming GI, Stoeckelhuber M, Becker BF, Conzen PF. Ischemia-reperfusion-induced unmeasured anion generation and glycocalyx shedding: sevoflurane versus propofol anesthesia. *J Invest Surg*. 2012 Jun;25(3):162-8. Erratum in: *J Invest Surg*. 2014 Oct;27(5):317.
93. Cummins RO, Chamberlain DA, Abramson NS, Allen M, Baskett P, Becker L, Bossaert L, Deloos H, Dick W, Eisenberg M, et al. Recommended guidelines for uniform reporting of data from out-of-hospital cardiac arrest: the Utstein Style. Task Force of the American Heart Association, the European Resuscitation Council, the Heart and Stroke Foundation of Canada, and the Australian Resuscitation Council. *Ann Emerg Med*. 1991 Aug;20(8):861-74.
94. Lefering R, Goris RJ, van Nieuwenhoven EJ, Neugebauer E. Revision of the multiple organ failure score. *Langenbecks Arch Surg*. 2002 Apr;387(1):14-20.
95. Keh D, Boehnke T, Weber-Cartens S, Schulz C, Ahlers O, Bercker S, Volk HD, Doecke WD, Falke KJ, Gerlach H. Immunologic and hemodynamic effects of "low-dose" hydrocortisone in septic shock: a double-blind, randomized, placebo-controlled, crossover study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Feb 15;167(4):512-20.
96. Hazeldine J, Naumann DN, Toman E, Davies D, Bishop JRB, Su Z, Hampson P, Dinsdale RJCrombie N, Duggal NA, Harrison P, Belli A, Lord JM. Prehospital immune responses and development of multiple organ dysfunction syndrome following traumatic injury: A prospective cohort study. *PLoS Med*. 2017 Jul 18;14(7):e1002338.
97. Bro-Jeppesen J, Kjaergaard J, Wanscher M, Nielsen N, Friberg H, Bjerre M, Hassager C. The inflammatory response after out-of-hospital cardiac arrest is not modified by targeted temperature management at 33 °C or 36 °C. *Resuscitation*. 2014 Nov;85(11):1480-7.
98. Peberdy MA, Andersen LW, Abbate A, Thacker LR, Gaieski D, Abella BS, Grossestreuer AV, Rittenberger JC, Clore J, Ornato J, Cocchi MN, Callaway C, Donnino M; National Post Arrest Research Consortium (NPARC) Investigators. Inflammatory markers following resuscitation

- from out-of-hospital cardiac arrest-A prospective multicenter observational study. *Resuscitation*. 2016 Jun;103:117-124.
99. Neukamm J, Gräsner JT, Schewe JC, Breil M, Bahr J, Heister U, Wnent J, Bohn A, Heller G, Strickmann B, Fischer H, Kill C, Messelken M, Bein B, Lukas R, Meybohm P, Scholz J, Fischer M. The impact of response time reliability on CPR incidence and resuscitation success: a benchmark study from the German Resuscitation Registry. *Crit Care*. 2011;15(6):R282.
100. Jung C, Fuernau G, Muench P, Desch S, Eitel I, Schuler G, Adams V, Figulla HR, Thiele H. Impairment of the endothelial glycocalyx in cardiogenic shock and its prognostic relevance. *Shock* 2015 May;43(5):450-455.
101. Kolářová H, Ambrůzová B, Švihálková Šindlerová L, Klinke A, Kubala L. Modulation of Endothelial Glycocalyx Structure under Inflammatory Conditions. *Mediators of Inflammation*, vol. 2014, Article ID 694312, 17 pages.
102. Nieuwdorp M, Mooij HL, Kroon J, Atasever B, Spaan JA, Ince C, Holleman F, Diamant M, Heine RJ, Hoekstra JB, Kastelein JJ, Stroes ES, Vink H. Endothelial glycocalyx damage coincides with microalbuminuria in type 1 diabetes. *Diabetes*. 2006 Apr;55(4):1127-1132.
103. Nieuwdorp M, van Haeften TW, Gouverneur MC, Mooij HL, van Lieshout MH, Levi M, Meijers JC, Holleman F, Hoekstra JB, Vink H, Kastelein JJ, Stroes ES. Loss of endothelial glycocalyx during acute hyperglycemia coincides with endothelial dysfunction and coagulation activation in vivo. *Diabetes*. 2006 Feb;55(2):480-486.
104. Leng SX, McElhaney JE, Walston JD, Xie D, Fedarko NS, Kuchel GA. ELISA and multiplex technologies for cytokine measurement in inflammation and aging research. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2008 Aug;63(8):879-84.
105. Scott JE. Extracellular matrix, supramolecular organisation and shape. *J Anat*. 1995 Oct;187 (Pt 2):259-69.
106. Laurent TC, Laurent UB, Fraser JR. Serum hyaluronan as a disease marker. *Ann Med*. 1996 Jun;28(3):241-53.
107. Engström-Laurent A, Hällgren R. Circulating hyaluronate in rheumatoid arthritis: relationship to inflammatory activity and the effect of corticosteroid therapy. *Ann Rheum Dis*. 1985 Feb;44(2):83-8.
108. Palaiologou M, Delladetsima I, Tiniakos D. CD138 (syndecan-1) expression in health and disease. *Histol Histopathol*. 2014 Feb;29(2):177-89.

109. Zhang S, Qing Q, Wang Q, Xu J, Zhi F, Park PW, Zhang Y, Chen Y. Syndecan-1 and heparanase: potential markers for activity evaluation and differential diagnosis of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2013 Apr;19(5):1025-33.
110. Minowa K, Amano H, Nakano S, Ando S, Watanabe T, Nakiri Y, Amano E, Tokano Y, Morimoto S, Takasaki Y. Elevated serum level of circulating syndecan-1 (CD138) in active systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity*. 2011 Aug;44(5):357-62.
111. Joensuu H, Anttonen A, Eriksson M, Mäkitaro R, Alfthan H, Kinnula V, Leppä S. Soluble syndecan-1 and serum basic fibroblast growth factor are new prognostic factors in lung cancer. *Cancer Res*. 2002 Sep 15;62(18):5210-7.
112. Seidel C, Sundan A, Hjorth M, Turesson I, Dahl IM, Abildgaard N, Waage A, Borset M. Serum syndecan-1: a new independent prognostic marker in multiple myeloma. *Blood*. 2000 Jan 15;95(2):388-92.
113. Molica S, Vitelli G, Mirabelli R, Digiesu G, Giannarelli D, Cuneo A, Ribatti D, Vacca A. Serum levels of syndecan-1 in B-cell chronic lymphocytic leukemia: correlation with the extent of angiogenesis and disease-progression risk in early disease. *Leuk Lymphoma*. 2006 Jun;47(6):1034-40.
114. Michel CC, Curry FR. Glycocalyx volume: a critical review of tracer dilution methods for its measurement. *Microcirculation*. 2009 Apr;16(3):213-9.
115. Chappell D, Jacob M, Rehm M, Stoeckelhuber M, Welsch U, Conzen P, Becker BF. Heparinase selectively sheds heparan sulphate from the endothelial glycocalyx. *Biol Chem*. 2008 Jan;389(1):79-82.
116. Savery MD, Jiang JX, Park PW, Damiano ER. The endothelial glycocalyx in syndecan-1 deficient mice. *Microvasc Res*. 2013 May;87:83-91.
117. Torres Filho I, Torres LN, Sondeen JL, Polykratis IA, Dubick MA. In vivo evaluation of venular glycocalyx during hemorrhagic shock in rats using intravital microscopy. *Microvasc Res*. 2013 Jan;85:128-133.
118. Cryer HG, Leong K, McArthur DL, Demetriades D, Bongard FS, Fleming AW, Hiatt JR, Kraus JF. Multiple organ failure: by the time you predict it, it's already there. *J Trauma*. 1999 Apr;46(4):597-604.
119. Ciesla DJ, Moore EE, Johnson JL, Sauaia A, Cothren CC, Moore JB, Burch JM. Multiple organ dysfunction during resuscitation is not postinjury multiple organ failure. *Arch Surg*. 2004 Jun;139(6):590-4.

120. Bruegger D, Schwartz L, Chappell D, Jacob M, Rehm M, Vogeser M, Christ F, Reichart B, Becker BF. Release of atrial natriuretic peptide precedes shedding of the endothelial glycocalyx equally in patients undergoing on- and off-pump coronary artery bypass surgery. *Basic Res Cardiol.* 2011 Nov;106(6):1111-1121.
121. Liao JK. Linking endothelial dysfunction with endothelial cell activation. *J Clin Invest.* 2013 Feb;123(2):540-1.
122. Gando S, Nanzaki S, Morimoto Y, Kobayashi S, Kemmotsu O. Tissue factor and tissue factor pathway inhibitor levels during and after cardiopulmonary resuscitation. *Thromb Res.* 1999 Oct 15;96(2):107-13.
123. Sallisalmi M, Tenhunen J, Yang R, Oksala N, Pettilä V. Vascular adhesion protein-1 and syndecan-1 in septic shock. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2012 Mar;56(3):316-22.
124. Osuka A, Kusuki H, Yoneda K, Matsuura H, Matsumoto H, Ogura H, Ueyama M. Glycocalyx Shedding is Enhanced by Age and Correlates with Increased Fluid Requirement in Patients with Major Burns. *Shock.* 2017 Oct 11.
125. Gando S, Kameue T, Nanzaki S, Nakanishi Y. Massive fibrin formation with consecutive impairment of fibrinolysis in patients with out-of-hospital cardiac arrest. *Thromb Haemost.* 1997 Feb;77(2):278-82.
126. Hostler D, Callaway CW, Newman DH, D'Cruz B. Thrombin-antithrombin appearance in out-of-hospital cardiac arrest. *Prehosp Emerg Care.* 2007 Jan-Mar;11(1):9-13.
127. Bro-Jeppesen J, Kjaergaard J, Wanscher M, Nielsen N, Friberg H, Bjerre M, Hassager C. Systemic Inflammatory Response and Potential Prognostic Implications After Out-of-Hospital Cardiac Arrest: A Substudy of the Target Temperature Management Trial. *Crit Care Med.* 2015 Jun;43(6):1223-32.
128. Annborn M, Dankiewicz J, Erlinge D, Hertel S, Rundgren M, Smith JG, Struck J, Friberg H. Procalcitonin after cardiac arrest - an indicator of severity of illness, ischemia-reperfusion injury and outcome. *Resuscitation.* 2013 Jun;84(6):782-7.
129. Makhmudov RM, Mamedov Y, Dolgov VV, Repin VS. Catecholamine-mediated injury to endothelium in rabbit perfused aorta: a quantitative analysis by scanning electron microscopy. *Cor Vasa.* 1985;17:456-463.
130. Kristova V, Kriska M, Canova R, Hejdova E, Kobzova D, Dobrocky P. Endothelial changes following repeated effect of vasoconstrictive substances in vitro. *Acta Physiol Hung.* 1993;17:363-370.

131. Triposkiadis F, Karayannis G, Giamouzis G, Skoularigis J, Louridas G, Butler J. The sympathetic nervous system in heart failure physiology, pathophysiology, and clinical implications. *J Am Coll Cardiol.* 2009;17:1747–1762.
132. Dunser MW, Hasibeder WR. Sympathetic overstimulation during critical illness: adverse effects of adrenergic stress. *J Intensive Care Med.* 2009;17:293–316.
133. Afshari A, Wetterslev J, Brok J, Møller AM. Antithrombin III for critically ill patients. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008 Jul 16;(3):CD005370.
134. Nieuwdorp M, Meuwese MC, Mooij HL, van Lieshout MH, Hayden A, Levi M, Meijers JC, Ince C, Kastelein JJ, Vink H, Stroes ES. Tumor necrosis factor-alpha inhibition protects against endotoxin-induced endothelial glycocalyx perturbation. *Atherosclerosis.* 2009 Jan;202(1):296-303.
135. Nieuwdorp M, van Haeften TW, Gouverneur MC, Mooij HL, van Lieshout MH, Levi M, Meijers JC, Holleman F, Hoekstra JB, Vink H, Kastelein JJ, Stroes ES. Loss of endothelial glycocalyx during acute hyperglycemia coincides with endothelial dysfunction and coagulation activation in vivo. *Diabetes.* 2006 Feb;55(2):480-6.





## **8. Danksagung**

An erster Stelle gebührt mein ausdrücklicher Dank Frau PD Dr. Viktoria Bogner-Flatz für die Überlassung meines Dissertationsthemas, die persönliche und herzliche Betreuung, sowie die zeitnahe Verfügbarkeit für Gespräche und Korrekturen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. med. Mareen Braunstein für die wissenschaftliche und fachliche Betreuung meiner Promotion. Sie hat mir mit sehr viel Herzblut und Genauigkeit gezeigt, wie man wissenschaftlich arbeitet und die Dinge immer auf den Punkt gebracht. Auch für ihre freundschaftliche und herzliche Betreuung möchte ich mich ausdrücklich bedanken.

Besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Thomas Kusmenkov für die Unterstützung in der Auswertungsphase dieser Studie bedanken. Mein ausdrücklicher Dank gilt außerdem Herrn Prof. Dr. med. Thorsten Annecke für die wissenschaftliche Kooperation. Ebenso danke ich dem anästhesiologischen Forschungslabor der LMU München, hier stellvertretend Frau Gabriele Gröger, für die Unterstützung und Durchführung der labortechnischen Untersuchungen.

Ein großer Dank gilt außerdem meiner Co-Doktorandin, Kathrin Frey, für ihre Teamfähigkeit und Freundschaft nicht nur während der Labor- und Auswertungsphase unserer Dissertationen.

Des Weiteren möchte ich meinem Mentor Herrn PD Dr. med. Wolf-Hartmut Meyer-Moldenhauer dafür danken, dass er immer ein offenes Ohr für mich hat und mich stets beruflich wie auch persönlich berät und unterstützt.

Mein abschließender und größter Dank gilt meinen Eltern, Elisabeth und Matthias, meinem Bruder Leopold und Jan-Philip, dem Mann an meiner Seite, für ihren bedingungslosen und liebevollen Rückhalt während meines Studiums und insbesondere bei der Fertigstellung dieser Arbeit.



## Eidesstattliche Versicherung

Ocker, Livia Elisabeth

---

Name, Vorname

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

*Hyaluronan und Syndekan-1 als Marker des klinischen Verlaufs nach kardiopulmonaler Reanimation*

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.

Berlin, 01.03.2019

---

Ort, Datum

Livia Ocker

---