

Aus dem Institut für Kardiovaskuläre Physiologie und Pathophysiologie  
(im Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin, WBex)  
Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München  
kommis. Vorstand: Prof. Dr. med. Markus Sperandio

Die endotheliale Glykokalyx im Endotoxinmodell des  
isolierten Meerschweinchenherzens -  
der Einfluss des volatilen Anästhetikums Sevofluran

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

vorgelegt von

Hildegard Hartmann

aus

Erded

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. habil. Dr. rer. nat. Bernhard F. Becker
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Daniel Chappell PD Dr. Sebastian Michel
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Prof. Dr. med. Thorsten Annecke
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	09.05.2019

# Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG .....	1
1.1	DIE ENDOTHELIALE GLYKOKALYX .....	1
1.1.1	AUFBAU .....	2
1.1.2	FUNKTION .....	4
1.1.3	SCHÄDIGUNG .....	9
1.1.4	REGENERATION .....	11
1.1.5	PROTEKTION .....	12
1.1.6	PROTEKTION DURCH SEVOFLURAN .....	13
1.2	SEPSIS .....	16
1.2.1	DEFINITION .....	16
1.2.2	EPIDEMIOLOGIE .....	17
1.2.3	THERAPIE .....	17
1.2.4	PATHOPHYSIOLOGIE .....	18
1.2.5	IMMUNOLOGIE .....	19
1.2.6	DAS ENDOTHEL UND DIE GLYKOKALYX IN DER SEPSIS .....	20
1.3	FRAGESTELLUNG/ HYPOTHESE .....	22
2	MATERIAL UND METHODEN .....	23
2.1	VERSUCHE AM ISOLIERTEN MEERSCHWEINCHENHERZEN .....	23
2.1.1	VERSUCHSTIERE .....	23
2.1.2	HERZPRÄPARATION .....	24
2.1.3	LANGENDORFF VERSUCHSAUFBAU .....	24
2.1.4	PERFUSAT .....	27
2.1.5	VERSUCHSPROTOKOLL UND VERSUCHSGRUPPEN .....	28
2.2	BESTIMMUNG VON GLYKOKALYXBESTANDTEILEN .....	32
2.3	BESTIMMUNG HÄMODYNAMISCHER PARAMETER .....	34
2.4	BESTIMMUNG DER GEFÄßPERMEABILITÄT .....	34
2.4.1	TRANSSUDAT/ EFFLUAT VERHÄLTNIS .....	34
2.4.2	HYDROXYETHYLSTÄRKE (HAES) .....	34
2.5	BESTIMMUNG VON METABOLITEN .....	36
2.5.1	HISTAMIN .....	36
2.5.2	LAKTAT, PURINE, HARNSÄURE .....	36
2.6	IMMUNHISTOCHEMIE .....	38
2.7	STATISTISCHE METHODEN .....	39

3	ERGEBNISSE.....	40
3.1	GLYKOKALYXBESTANDTEILE.....	40
3.2	HÄMODYNAMISCHE PARAMETER.....	41
3.3	GEFÄßPERMEABILITÄT.....	42
3.3.1	TRANSSUDAT/EFFLUAT VERHÄLTNIS .....	42
3.3.2	HYDROXYETHYLSTÄRKE (HAES).....	45
3.4	METABOLITE.....	46
3.4.1	HISTAMIN.....	46
3.4.2	LAKTAT, HARNsäURE, PURINE .....	47
3.5	IMMUNHISTOCHEMIE.....	48
4	DISKUSSION.....	49
4.1	DISKUSSION DER METHODEN.....	49
4.1.1	ISOLIERTES LANGENDORFF HERZMODELL.....	49
4.1.2	TIERISCHES SEPSISMODELL.....	51
4.2	DISKUSSION DER ERGEBNISSE.....	52
4.2.1	GLYKOKALYXSHEDDING .....	52
4.2.2	MECHANOTRANSDUKTION.....	53
4.2.3	PERMEABILITÄT .....	54
4.2.4	FOLGEN UND MECHANISMEN DER GLYKOKALYXSCHÄDIGUNG.....	58
4.2.5	SEVOFLURAN .....	62
4.3	AUSBLICK UND KLINISCHE RELEVANZ.....	64
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	66
6	ANHANG.....	68
6.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	68
6.2	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	69
6.3	TABELLENVERZEICHNIS .....	69
6.4	LITERATURVERZEICHNIS.....	70
6.5	DANKSAGUNG.....	85
6.6	EIDESSTÄTTLICHE VERSICHERUNG.....	86

# 1 EINLEITUNG

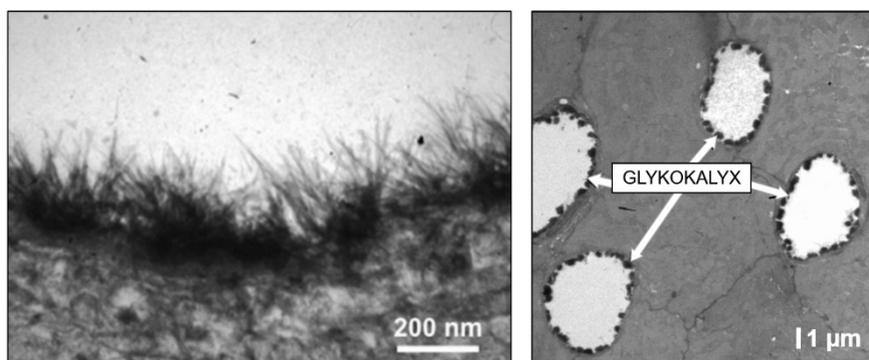
---

## 1.1 DIE ENDOTHELIALE GLYKOKALYX

Ausgehend von der Entdeckung der Blut- und Mikrozirkulation durch Harvey und Malpighi im siebzehnten Jahrhundert, beobachteten Reckinghausen und His zwei Jahrhunderte später eine Zellschicht, die das Innere von Gefäßen auskleidet und beschrieben sie als Endothel (Eliseyeva, PhD & ScD, 2013; His, 1865) Längst wird dieses Endothel nicht mehr als inaktive Schicht verstanden, sondern als komplexes Organ, das mit seiner Umwelt interagieren kann (Page & Liles, 2013). Das Verständnis von Aufbau des Endothels und damit der Gefäßbarriere wurde erst vor Kurzem um die Komponente der Glykokalyx erweitert. Sie befindet sich im gesamten Gefäßsystem an der Schnittstelle von zirkulierendem Blut und Endothelzellen (Becker, Chappell & Jacob, 2010b; Pries, Secomb & Gaehtgens, 2000).

Das Konzept einer zellfreien Schicht, die die Endothelzellen überzieht, fand 1940 erstmalig Erwähnung (Danielli, 1940). Es dauerte aber noch einige Jahrzehnte bis sie licht- (Copley, 1974) und elektronenmikroskopisch (Luft, 1966) rudimentär dargestellt werden konnte. Bennet benannte diese Struktur 1963 nach ihrem vorherrschenden Polysaccharidanteil „Glykokalyx“ (Bennett, 1963). Lange Zeit fehlten verlässliche Techniken zur Erforschung dieser fragilen, dynamischen Grenzschicht. Dies führte dazu, dass sie an Größe und Bedeutung unterschätzt wurde. Erst durch die Weiterentwicklung konservativer Fixierungsmethoden konnte die Glykokalyx experimentell erhalten und in ihrer physiologischen Form visualisiert werden (Pries et al., 2000).

Die in der Literatur beschriebene Glykokalyxdicke schwankt je nach verwendeter Fixierungs- oder Darstellungstechnik sowie zwischen Spezies und Organen (Bashandy, 2015). Im Verlauf des Gefäßsystems kann sie von ein paar hundert Nanometern bis hin zu mehreren Mikrometern reichen (Ushiyama, Kataoka & Iijima, 2016). Damit überragt die Glykokalyx in vielen Gefäßen die Dimension der Endothelzellen um ein Vielfaches (Weinbaum, Tarbell & Damiano, 2007).



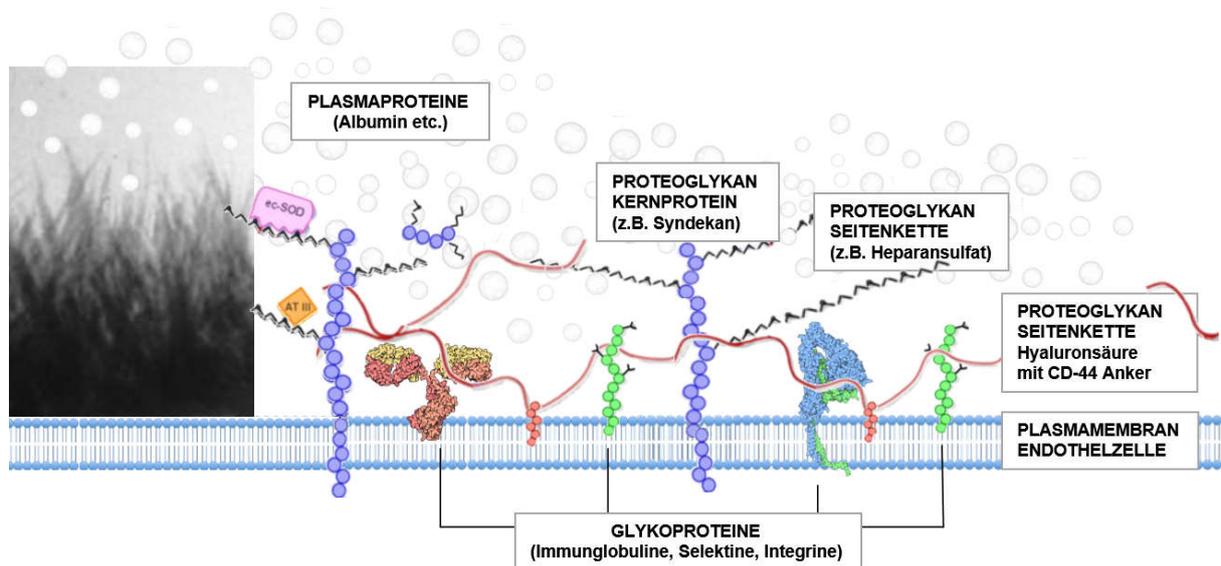
**Abbildung 1**

Elektronenmikroskopische Aufnahme der Glykokalyx nach Fixierung mit Lanthannitrat-/Glutaraldehydlösung, links einer humanen Brustwandarterie (Becker, Jacob, Leipert, Salmon & Chappell, 2015); rechts von koronaren Kapillaren eines Meerschweinchenherzens (Rehm et al., 2004)

### 1.1.1 AUFBAU DER ENDOTHELIALEN GLYKOKALYX

Nicht nur die Dicke der Glykokalyx ist sehr variabel, auch ihre Zusammensetzung fällt sehr heterogen aus (Dane et al., 2015). Eine Ursache dieser Fluktuationen ist das dynamische Gleichgewicht in dem sich die Glykokalyx befindet. Komponenten werden kontinuierlich abgetragen und von Endothelzellen neu synthetisiert (Ushiyama et al., 2016). Dabei regulieren Endothelzellen Zusammensetzung und Eigenschaften der Glykokalyx im Rahmen von Adaptationsvorgängen beispielsweise an lokale hämodynamische Bedingungen und Plasmakomposition (Reitsma, Slaaf, Vink, van Zandvoort & oude Egbrink, 2007).

Das Grundgerüst der Glykokalyx setzt sich aus membrangebundenen Proteoglykanen und Glykoproteinen zusammen. Diese werden über die Glykosaminoglykan-Seitenketten der Proteoglykane miteinander vernetzt (Chappell et al., 2008a).



**Abbildung 2**

*Aufbau der endothelialen Glykokalyx, [nicht maßstabsgetreu, modifiziert nach (Reitsma et al., 2007) mit Immunglobulin und Integrin aus der Protein Data Bank (Goodsell, 2001, 2011a), links im Bild eine elektronenmikroskopische Aufnahme der Glykokalyx einer koronaren Kapillare eines Meerschweinchenherzens (Chappell et al., 2009b)]*

### PROTEOGLYKANE

Hauptbestandteil der Glykokalyx sind Proteoglykane. Sie verankern die Glykokalyx in der Endothelzellmembran (Pries et al., 2000) und sind wesentlich für deren Form und Funktion verantwortlich. Proteoglykane bestehen aus einem membrangebundenen Kernprotein an das Glykosaminoglykane als Seitenketten kovalent gebunden sind (Reitsma et al., 2007).

Die transmembranen Kernproteine wie Syndekan und Glypikan unterscheiden sich in ihrer Größe, der Anzahl und Art der gebundenen Glykosaminoglykane und ihrer Verbindung zum Zytoskelett (Reitsma et al., 2007).

Die Glykosaminoglykan-Seitenketten sind lineare Disaccharidpolymere, die aus hunderten bis zu tausenden von Disacchariduntereinheiten aufgebaut sein können (Tarbell & Cancel, 2016). Je nach Disaccharid ergeben sich Heparansulfat, Chondroitinsulfat und Hyaluronsäure. Sulfatierung, Carboxylierung und eine Reihe weiterer Modifikationen bei der Polymerisation der Glykosaminoglykane führen zu einer Fülle potentieller Proteinbindungsstellen. So entsteht eine Vielfalt aus strukturell und funktionell heterogenen Glykosaminoglykanen. Endothelzellen können die Glykokalyx über diese Modifikationsmuster an veränderte Umweltbedingungen anpassen (Reitsma et al., 2007).

Das mit Heparin verwandte Heparansulfat macht bis zu 90 % der Glykosaminoglykan-Seitenketten aus (Pries et al., 2000). Es ist aufgrund seiner Carboxyl- und Sulfatgruppen negativ geladen und reich an Proteinbindungsstellen (Van Teeffelen, Brands, Stroes & Vink, 2007).

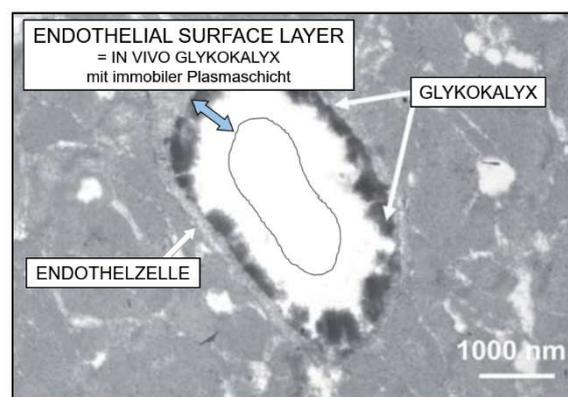
Hyaluronsäure ist die einzige Glykosaminoglykan-Seitenkette, die nicht über ein Kernprotein, sondern über den CD-44 Rezeptor mit der Endothelzellmembran verbunden ist (Becker et al., 2015). Weitere Besonderheit ist der Mangel an Proteinbindungsstellen infolge fehlender Sulfatierung. Dennoch trägt Hyaluronsäure durch seine Moleküllänge von bis zu mehreren Mikrometern und durch seine außergewöhnliche Wasserbindungsfähigkeit maßgeblich zur Stabilisierung und Quervernetzung der Glykokalyx bei (Broekhuizen et al., 2009; Van Teeffelen et al., 2007).

## **GLYKOPROTEINE**

Glykoproteine sind durch ihren hohen Proteinanteil gekennzeichnet. Sie haben nur kurze verzweigte Kohlenhydratseitenketten (Pries et al., 2000; Reitsma et al., 2007). Durch ihre kleine Größe (10-20 nm) sind sie in die tieferen, zellnahen Schichten der bis zu 2000 nm hohen Glykokalyx eingebettet (Chappell et al., 2011; Ushiyama et al., 2016). Einige Glykoproteine sind endotheliale Zelladhäsionsmoleküle. Ihre Expression auf der endothelialen Zellmembran kann durch Zellaktivierung und -stimulation verändert werden (Reitsma et al., 2007). Drei Gruppen von Zelladhäsionsmolekülen wurden innerhalb der Glykokalyx nachgewiesen: Selektine, Integrine und Immunglobuline (siehe Abbildung 2). Diese endothelialen Zelladhäsionsmoleküle bilden die immunologische Schnittstelle zwischen Blut und umgebendem Gewebe. Dabei sind sie Teil von inflammatorischen und koagulatorischen Signalkaskaden (Bashandy, 2015; Reitsma et al., 2007). Eine strukturell geschädigte Glykokalyx exponiert Zelladhäsionsmoleküle und ermöglicht so deren Interaktion mit Leukozyten bzw. Thrombozyten. Auf diesem Weg wird die Rekrutierung von Leukozyten aus der Blutbahn und deren Migration ins Interstitium initiiert (Chappell et al., 2011).

## ENDOTHELIAL SURFACE LAYER

Das Netzwerk aus Glykoproteinen, Proteoglykanen und Glykosaminoglykan-Seitenketten formt den Rahmen in den Moleküle plasmatischen oder endothelialen Ursprungs eingebettet sind (Chappell et al., 2008a). Die Interaktion mit Plasmabestandteilen, insbesondere Albumin, ist strukturell stabilisierend und führt zur Bildung der physiologischen Form der Glykokalyx. Diese wird als Endothelial Surface Layer (ESL) bezeichnet (Reitsma et al., 2007). Bis zu 25 % des Intravasalraums werden von der ESL eingenommen (Becker, Chappell, Bruegger, Annecke & Jacob, 2010a). Mit Hilfe von intravitalmikroskopischen Methoden wie Sidestream Darkfield Imaging kann diese dynamische Schicht in vivo als Lücke zwischen Erythrozyten und Endothelzellen dargestellt werden (Bashandy, 2015).



**Abbildung 3**

*Endothelial Surface Layer in der elektronenmikroskopischen Aufnahme einer koronaren Kapillare eines Meerschweinchenherzens, [modifiziert nach (Becker et al., 2010a) und (Van Teeffelen et al., 2007)]*

### 1.1.2 FUNKTION DER ENDOTHELIALEN GLYKOKALYX

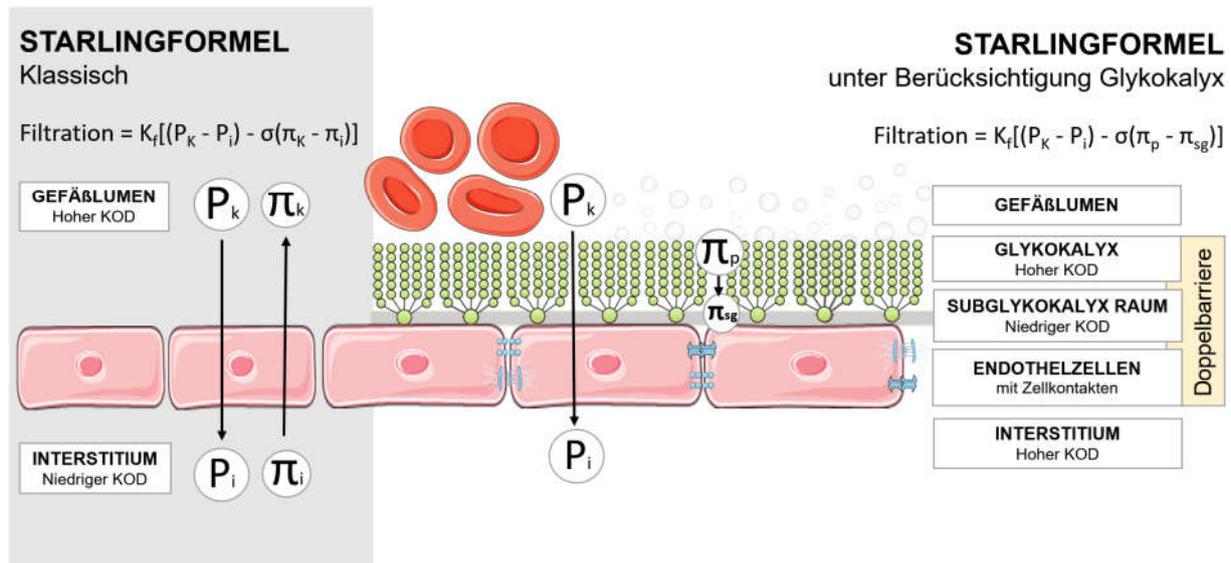
Schlechte Fixierungstechniken führten dazu, dass die physiologische Rolle der Glykokalyx über Jahrzehnte unerkannt blieb. Allenfalls indirekt sind Erkenntnisse ihrer Funktion zusammengetragen worden. Beispielsweise führt das Vorhandensein dieser Schicht zu einer zentralen Bewegung der Erythrozyten in den Kapillaren, weil sie Erythrozyten auf Abstand zu den Endothelzellen hält. Dadurch sinkt der Hämatokrit und die Blutviskosität in den Kapillaren. Dieser Effekt wurde schon 1931 von Fåhræus und Lindqvist beobachtet, aber damals noch rein fluidmechanisch erklärt (Fåhræus & Lindqvist, 1931). Die entscheidende Rolle der Glykokalyx an diesem mikrozirkulatorischen Effekt wurde belegt, indem er durch ihre selektive Schädigung aufgehoben wurde (Desjardins & Duling, 1990). Der Kapillarhämatokrit gleicht sich ohne Glykokalyx dem systemischen an und der durch die Viskositätssteigerung erhöhte Kapillarwiderstand führt zu einer erschwerten Kapillarpassage des Blutes. Folge ist eine verschlechterte periphere Perfusion (Chappell et al., 2008a; Jung & Rampling, 2016; Vincent, 2011).

Auch heute noch erschwert die fragile Struktur der Glykokalyx Forschungsarbeiten, sodass sich das wachsende Verständnis ihrer Funktion und Bedeutung weiterhin im Wandel befindet. Die strategisch signifikante Position an der Grenze zwischen Blut und Endothelzellen deutet auf eine Schlüsselrolle in vielen (patho-)physiologischen Prozessen (Becker et al., 2015; Broekhuizen et al., 2009).

### **BARRIEREFUNKTION**

Eine der Aufgaben der Mikrozirkulation ist die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der Körperzellen. Die kapilläre Diffusion und Flüssigkeitsfiltration erfüllen diese Funktion. Zusätzlich nehmen diese beiden Prozesse Einfluss auf das vorhandene intravasale Plasmavolumen, welches nach dem Frank-Starling-Mechanismus wiederum kardiale Füllungsdrücke und Schlagvolumina mitbestimmt. Das Kapillarendothel begünstigt durch seine große Gesamtfläche und aufgrund der geringen Strömungsgeschwindigkeit Diffusion und Filtration (Levick & Michel, 2010; Pries et al., 2000).

Schon 1896 beschrieb Starling die osmotischen und hydrostatischen Kräfte, die die Filtrationsmenge regeln. Dabei dient das Endothel als semipermeable Membran, die durch ihre verminderte Proteinpermeabilität den kolloidosmotischen Gradienten zwischen interstitiellem Raum mit niedrigem kolloidosmotischen Druck und intravaskulärem Raum mit hohem kolloidosmotischen Druck aufrechterhält. Dieser kolloidosmotische Gradient wirkt dem hydrostatischen Filtrationsdruck entgegen (Starling, 1896). Was die semipermeable Membran passieren kann, wird durch den molekularen Aufbau und die elektrostatische Ladung der Glykokalyx vorgegeben. Sie wirkt so als makromolekulares Sieb für Teilchen bestimmter Ladung und Größe (Pries et al., 2000). Tatsächliche Messungen der kolloidosmotischen Drücke in einer neueren Arbeit von Adamson et al. zeigten entgegen dem Starlingmodell nahezu identische intravaskuläre und interstitielle kolloidosmotische Drücke. Dass es dennoch nicht zu einer massiven Flüssigkeitsfiltration ins Interstitium kommt, konnte durch eine Umformulierung der Starlingformel unter Berücksichtigung der Glykokalyx erklärt werden. Die Glykokalyx bindet Plasmaproteine und erhöht so den kolloidosmotischen Druck auf ihrer plasmatischen Seite. Nur ein schmaler Raum unterhalb der Glykokalyx bleibt proteinfrei. Der kolloidosmotische Druckgradient verläuft damit entlang der Glykokalyx und nicht zwischen Plasma und Interstitium. Das Prinzip aus entgegengesetzten hydrostatischen und osmotischen Kräften von Starling bleibt erhalten. Neu definiert wurde, wo sich der kolloidosmotische Druckgradient bildet (Adamson et al., 2004; Chappell et al., 2008a; Vincent, 2011).



**Abbildung 4**

Klassische Starlingformel und Starlingformel unter Berücksichtigung der Glykokalyx, KOD Kolloidosmotischer Druck,  $K_f$  Filtrationskoeffizient,  $P_k$  Hydrostatischer Druck in Kapillaren,  $P_i$  Hydrostatischer Druck im Interstitium,  $\sigma$  Reflexionskoeffizient,  $\pi_i$  onkotischer Druck im Interstitium,  $\pi_k$  onkotischer Druck in Kapillare,  $\pi_p$  onkotischer Druck an Plasmaseite der Glykokalyx,  $\pi_{sg}$  onkotischer Druck im Subglykokalyx Raum, KOD Kolloidosmotischer Druck (Alphonsus & Rodseth, 2014; Chappell et al., 2008a; Starling, 1896)

[Glykokalyx schematisch dargestellt nach (Mitchell & King, 2013), Zugriff online unter <https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpcell.00285.2013>, Verwendung mit einer Creative Commons Attribution CC BY 3.0 Lizenz, abrufbar unter [https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.en\\_US](https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.en_US)

Die Abbildung enthält modifizierte Elemente von Servier Medical Art (<http://smart.servier.com/>), mit einer Creative Commons Attribution CC BY 3.0 Lizenz, abrufbar unter <https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/#>

Auch neu verstanden wurde der Aufbau der vaskulären Barriere als Doppelbarriere, bestehend aus der Endothelzellschicht mit Zellkontakten und der Glykokalyx (Becker et al., 2010b; Chappell et al., 2008a; Rehm et al., 2004). Aus der Revision der Starlingformel wird deutlich, dass die Bindung von Plasmaproteinen wie Albumin über die Bildung des kolloidosmotischen Gradienten Voraussetzung für die Barrierefunktion der Glykokalyx ist (Chappell et al., 2008a; Jacob et al., 2007). Eine Hypoalbuminämie kann dementsprechend die Barrierefunktion der Glykokalyx beeinträchtigen und Ursache einer erhöhten Permeabilität sein. Gleichzeitig kann eine Hypoalbuminämie aber auch eine erhöhte Permeabilität durch einen Glykokalyxschaden zum Ausdruck bringen (Rodriguez et al., 2017; Wang, Ye, Su & Yang, 2017b). In klinischen Studien ist ein vermindertes Plasmaalbumin mit schlechteren Outcomeparametern assoziiert worden (Goldwasser & Feldman, 1997; Jellings, Henriksen, Hallas & Brabrand, 2014)

## MECHANOTRANSDUKTION

Ein Anstieg des Herzzeitvolumens mit erhöhten regionalen Blutflüssen ist die Antwort des Organismus auf einen vermehrten Sauerstoff- und Nährstoffbedarf von Organen. Beispielsweise bei muskulärer Anstrengung oder auch bei Entzündungsprozessen ist der Sauerstoffverbrauch  $VO_2$  des Organismus erhöht.  $VO_2$  gibt die zelluläre metabolische Aktivität wieder und ergibt sich nach dem inversen Fickschen-Prinzip durch das Produkt aus Herzzeitvolumen und arteriovenösen Sauerstoffgehaltsdifferenz  $avDO_2$  (McLellan & Walsh, 2004; Pinsky & Schlichtig, 1990).

$$VO_2 = HZV \times avDO_2$$

Am Endothel hat der Anstieg des Blutflusses mehr Scherstress zur Folge (Ait-Oufella, Maury, Lehoux, Guidet & Offenstadt, 2010; Tarbell, 2010). Scherstress verändert Volumen, Dichte und Zusammensetzung der Glykokalyx. Durch diese Adaptation sind hämodynamische Zustände mit der molekularen Struktur und Dimension der Glykokalyx gekoppelt (Gouverneur, Spaan, Pannekoek, Fontijn & Vink, 2006; Pries et al., 2000).

Neben der makrozirkulatorischen Anhebung des Sauerstoffangebotes über Steigerung des Herzzeitvolumens können mikrozirkulatorische Anpassungsvorgänge einen steigenden Sauerstoffverbrauch kompensieren. Diese Anpassungsvorgänge verbessern die periphere Sauerstoffextraktion (Pinsky & Schlichtig, 1990). Die Modulation der Glykokalyx könnte mit dadurch mehr funktionell perfundierten Kapillaren und einer vergrößerten Austauschfläche zu dieser Verbesserung beitragen (Van Teeffelen et al., 2007). Hauptverantwortlich ist jedoch eine optimierte Mikrozirkulation durch präkapilläre Vasodilatation und damit einhergehendes kapilläres Rekrutment (Fry, Roy & Secomb, 2013). Die Glykokalyx dient dabei als Mechanosensor, der Veränderungen im Blutfluss erfasst und über seine transmembranen Kernproteine an die Endothelzellen und deren Zytoskelett weiterleitet. Es folgt ein Umbau des Zytoskeletts und der nachgeschalteten Zellkontakte, einhergehend mit Veränderungen der Gefäßpermeabilität. Gleichzeitig kommt es zur Umwandlung des mechanischen Reizes in ein biochemisches Signal, das letztlich die Aktivierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) zur Folge hat. Scherstress triggert so über die Glykokalyx als Mechanotransduktor die Synthese und Ausschüttung des Vasodilatators NO (Reitsma et al., 2007; Tarbell & Pahakis, 2006). Proinflammatorische Zytokine können über eine Induktion der endothelialen iNOS ebenfalls zu einer Bildung von NO und einer ausgeprägten Vasodilatation führen (Ait-Oufella et al., 2010). Da in Abwesenheit von Heparansulfat oder Hyaluronsäure deutlich niedrigere NO Konzentrationen gemessen wurden, geht man davon aus, dass diese Glykosaminoglykan-Seitenketten maßgeblich an der Mechanotransduktion beteiligt sind (Reitsma et al., 2007). Durch die enge strukturelle Verbindung der Glykokalyx mit Albumin wird auch diesem Plasmaprotein eine Rolle bei der Weiterleitung der Scherkräfte an die endotheliale Oberfläche zugeschrieben (Jacob et al., 2007).

## GEFÄßPROTEKTION

Durch die Interaktion mit Proteinen und Molekülen ergeben sich weitere Funktionen der Glykokalyx. Diese Proteine und Moleküle können über Rezeptoren oder durch Wechselwirkung mit Glykosaminoglykanen, vor allem Heparansulfat, an die Glykokalyx gebunden sein (Kolarova, Ambruzova, Svihalkova Sindlerova, Klinke & Kubala, 2014). Zahlreiche und vielfältige Bindungsmöglichkeiten sind eine der definierenden Eigenschaften der Glykokalyx. Dabei gibt es Bindungen, beispielweise zu Albumin, die für die Stabilität und Struktur der Glykokalyx essentiell sind (Tarbell & Pahakis, 2006). Die Glykokalyx kann die Funktion von gebundenen Liganden ermöglichen, verstärken oder blockieren (Becker et al., 2015).

Die an die Glykokalyx gebundenen Proteine und Enzyme sind durch ihre vaskuloprotektiven Eigenschaften charakterisiert. Sie fördern die funktionelle und strukturelle Integrität von Gefäßwand und Glykokalyx und vermitteln die Reaktion auf schädliche Reize. Dies erfolgt über Regulation des Lipoprotein Stoffwechsels (Lipoprotein Lipase), Regulation der Endothelzellproliferation und Angiogenese über Wachstumsfaktoren (Fibroblast Growth Factor) sowie durch Reduzierung von oxidativem Stress über an Heparansulfat gebundene Superoxid-Dismutase (Broekhuizen et al., 2009; Tarbell & Pahakis, 2006).

Eine intakte Glykokalyx wirkt zudem antikoagulatorisch. Nicht nur die Bindungsstellen für Thrombozyten werden maskiert, sondern gerinnungshemmende Regulatoren der Fibrinolyse, des Komplementsystems, der Protein C Kaskade und Antithrombin III befinden sich innerhalb des Netzwerkes der Glykokalyx (Dane et al., 2015; Pries et al., 2000). Antithrombin III wird durch elektrostatische Interaktion mit Heparansulfat in seiner antithrombotischen Wirkung verstärkt (Ait-Oufella et al., 2010). Zusammenbruch und Verlust der Glykokalyx führen zu Thrombozytenadhäsion und zu einer thrombogenen Endothelzelloberfläche (Nieuwdorp et al., 2005; Tuma, Canestrini, Alwahab & Marshall, 2016). Damit wird die Thrombenbildung auf Bereiche mit Gefäß- und damit Glykokalyxläsion konzentriert (Ince et al., 2016).

Letztlich kann eine intakte Glykokalyx als antiinflammatorische endotheliale Schutzschicht gefäßprotektiv wirken (Tarbell & Pahakis, 2006). Sie überdeckt Zelladhäsionsmoleküle und vermindert dadurch deren Kontakt mit Leukozyten. Die Aktivierung des Immunsystems wird auf diesem Weg gehemmt und damit einhergehende Schäden begrenzt (Reitsma et al., 2007). Gleichzeitig übernimmt Heparansulfat regulatorische proinflammatorische Aufgaben, beispielsweise bei der Rekrutierung von Leukozyten durch Chemokine. Diese Signalmoleküle werden durch Heparansulfat gebunden und in Gradienten am Endothel organisiert und Leukozyten präsentiert. Auch bei der anschließenden Leukozytenadhäsion und -transmigration spielen Interaktionen mit Heparansulfat eine Rolle (Li & Vlodavsky, 2009).

### 1.1.3 SCHÄDIGUNG DER ENDOTHELIALEN GLYKOKALYX

Die wachsenden Erkenntnisse von Aufbau, Größe und Funktion der Glykokalyx sowie verbesserte Untersuchungsmethoden führen zu einem zunehmenden Interesse an möglichen Ursachen und Konsequenzen ihrer Schädigung (Oshima, Haeger, Hippensteel, Herson & Schmidt, 2018).

Der Verlust von Glykokalyxbestandteilen (Shedding) kann je nach Auslöser nur die oberflächlichen Anteile wie Heparansulfat oder Hyaluronsäure tangieren oder bis zur Endothelzelle reichen und dann auch Kernproteine wie Syndekan betreffen (Chelazzi, Villa, Mancinelli, De Gaudio & Adembri, 2015; Wang, Wu & Wu, 2017a). Die abgetragenen Proteoglykanfragmente zirkulieren dann systemisch als Biomarker des Endothelschadens. Zusätzlich können sie in lokalen und systemischen Signalkaskaden als Mediatoren wirken (Oshima et al., 2018; Yang et al., 2017).

Ein gewisses Maß an Glykokalyxshedding ist im Rahmen von Anpassungsvorgängen, beispielsweise an erhöhten Scherstress, physiologisch (Mulivor & Lipowsky, 2004).

Die charakteristischen Kennzeichen intensivmedizinischer Krankheitsbilder (Ödeme, Vasoplegie, Inflammation etc.) könnten durch eine gestörte Funktion der Glykokalyx erklärt werden (Oshima et al., 2018). Tatsächlich ist bei einem breiten Spektrum von Intensivpatienten ein Shedding von Glykokalyxbestandteilen, insbesondere von Syndekan, festgestellt worden (Nelson, Johansson, Tyden & Bodelsson, 2017). Gleiches gilt für größere Eingriffe in der Bauch- (Steppan et al., 2011), Leber- (van Golen et al., 2014) und Lungenchirurgie (Arthur et al., 2016; Wang et al., 2017a).

Elektrolyt- und Wasserhaushalt haben auch Einfluss auf die Integrität der Glykokalyx. Nicht nur Hybernatriämie (Martin, Liberati & Diebel, 2018), sondern auch Hypervolämie scheint die Glykokalyx negativ zu beeinflussen. Tierexperimentell kommt es im Rahmen von hypervolämen Zuständen durch eine erhöhte Wandspannung in den kardialen Vorhöfen zur Freisetzung von atrialem natriuretischem Peptid (ANP) mit anschließendem Abbau der Glykokalyx (Bruegger et al., 2005; Jacob et al., 2013). Eine Hypervolämie mit vermehrter ANP Sekretion bei laparoskopischen Cholezystektomien konnte gleichermaßen mit einem vermehrten Shedding von Glykokalyxbestandteilen korreliert werden (Belavic et al., 2018). Die Rolle der natriuretischen Peptide an den negativen Effekten einer Hypervolämie ist jedoch nicht eindeutig, denn klinisch werden sowohl natriuretische Peptide, wie rekombinantes BNP (Netiritide) und ANP (Carperitide), als auch Abbauhemmer natriuretischer Peptide (Sacubitril) zur Verbesserung einer Herzinsuffizienz eingesetzt. Während eine aktuelle Metaanalyse für rekombinantes BNP keine Mortalitätsverbesserung bei dekompensierter Herzinsuffizienz zeigte, konnte die PARADIGM Studie einen deutlichen Outcomevorteil für die Herzinsuffizienztherapie mit Sacubitril nachweisen (Gong, Wu & Li, 2016; McMurray et al., 2014). Die akut schädigende Wirkung natriuretischer Peptide auf die Glykokalyx muss folglich von längerfristigen Effekten abgegrenzt werden (Becker et al., 2015).

Die hier skizzierten pathophysiologischen Überlegungen zum Hypervolämie-induzierten Shedding der Glykokalyx bilden die Grundlage der rationalen perioperativen Volumentherapie (Chappell, Jacob, Hofmann-Kiefer, Conzen & Rehm, 2008b). Selbst in der Transfusionstherapie könnten Glykokalyxmarker zur Abschätzung von Transfusionsrisiken an Bedeutung gewinnen. Zirkulierende Heparansulfate als Zeichen einer Glykokalyxschädigung waren bei blutenden Patienten mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten einer Transfusions-assoziierten Lungeninsuffizienz (TRALI) verbunden (Schmidt et al., 2013).

Eine Vielzahl experimenteller Untersuchungen belegen, dass ein Shedding der Glykokalyx als Folge von Ischämie-/ Reperfusionprozessen auftreten kann (Annecke et al., 2010; Beresewicz, Czarnowska & Maczewski, 1998; Chappell et al., 2006; Chappell et al., 2009b; Mulivor & Lipowsky, 2004). Klinisch konnte dieses Glykokalyxshedding bei einer Reihe von Operationen, in deren Verlauf es zu Ischämie-/Reperfusionsschäden kommt, bestätigt werden, beispielsweise in der Herz- und Gefäßchirurgie (Bruegger et al., 2015; Rehm et al., 2007; Svennevig et al., 2008) oder im Bereich der Transplantationschirurgie (Casanova et al., 2016; Schiefer et al., 2015; Snoeijs et al., 2010).

Der alleinige Sauerstoffmangel bei erhaltenem Fluss hat im Modell des isoliert schlagenden Meerschweinchenherzens gleiche destruktive Auswirkungen (Annecke et al., 2011). Klinisch ist Ischämie sowohl in Form von Schockzuständen kardialer (Jung et al., 2015), septischer (siehe 1.2.3) oder traumatologischer (Haywood-Watson et al., 2011) Genese als auch beim akuten Myokardsyndrom (Kojima et al., 2001) mit einem Glykokalyxshedding vergesellschaftet.

Akute Organdysfunktionen wie die akute Niereninsuffizienz (Neves et al., 2015) oder das ARDS (Singleton & Lennon, 2011) konnten ebenso wie chronische Organerkrankungen, beispielsweise chronische Nieren- (Padberg et al., 2014) oder Herzinsuffizienz (Takahashi et al., 2011), mit erhöhten Plasmaspiegeln von Glykokalyxbestandteilen assoziiert werden. Takahashi et al. zeigten bei Herzinsuffizienzpatienten einen Zusammenhang zwischen Syndekankonzentrationen und dem Ausmaß der Pumpfunktionseinschränkung (Takahashi et al., 2011).

Kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Hyperlipidämie, Hyperglykämie und arterielle Hypertonie verringern ebenfalls die Dicke der Glykokalyx (Tarbell & Cancel, 2016). Gleichzeitig führen sie über chronische Inflamationsprozesse zur Entstehung von Atherosklerose (Libby, 2012). Veränderungen der Glykokalyx werden als Ausgangspunkt dieser Inflammation diskutiert (Curry & Adamson, 2012).

#### 1.1.4 REGENERATION DER ENDOTHELIALEN GLYKOKALYX

Die Glykokalyx befindet sich in einem dynamischen Gleichgewicht zwischen Biosynthese und Abbau. Dieses Gleichgewicht ist bedingt durch die Anpassung an kontinuierlich veränderte Umgebungsbedingungen (Zeng, Ebong, Fu & Tarbell, 2012) und führt zu einem hohen Umsatz an Glykokalyxbestandteilen. Beispielsweise wird ein Drittel der in der Glykokalyx vorhandenen Hyaluronsäure täglich abgetragen und neu aufgebaut (Song et al., 2017).

Den zahlreichen Studien zu potentiell Glykokalyx-schädigenden Mechanismen steht noch ein bruchstückhaftes Verständnis ihrer Regeneration entgegen. Welche Faktoren die Synthese und Zusammensetzung der Glykokalyx regulieren, ist noch weitgehend unklar (Savery, Jiang, Park & Damiano, 2013). Im Sinne des dynamischen Gleichgewichts induzieren Abbauprodukte der Glykokalyx deren Reparatur. Es gibt Hinweise auf einen über den Wachstumsfaktor FGF vermittelten Mechanismus (Yang et al., 2017). Auch die Adaptation an lokale Scherkräfte (Reitsma et al., 2007) und oxidativen Stress (Mulivor & Lipowsky, 2004) führt zu einer veränderten Zusammensetzung der Glykokalyx. Weitere mutmaßliche Regulatoren der Glykokalyx-Regeneration sind Sphingosin-1-Phosphat (Zeng, Adamson, Curry & Tarbell, 2014) und inflammatorische Mediatoren wie Zytokine. Diese verändern die Endothelzellaktivierung und darüber deren Expression von Glykokalyxbestandteilen (Nieuwdorp et al., 2005).

Die Integrität der Endothelzellen ist Voraussetzung für die Funktion und Reparatur der Gefäßbarriere, nicht nur weil Endothelzellen die Komponenten der Glykokalyx synthetisieren, sondern weil sie selbst Teil der Gefäßbarriere sind (Ye, Mao, Liu & Liu, 2014).

Wie schnell sich die zerstörte Glykokalyx des Menschen erneuert, ist bislang nicht bekannt (Becker et al., 2010a). Die Funktion der Glykokalyx erholt sich bei septischen Patienten mit erfolgreicher Therapie innerhalb weniger Tage (Becker et al., 2010b). Dies entspricht Zellkultur und Tierexperimenten wo es nach Degradation durch Heparinase, TNF $\alpha$  oder Lipopolysaccharid innerhalb von zwölf Stunden (Giantsos-Adams et al., 2013) zu einer Regeneration der Funktion und Struktur der Glykokalyx kam (Inagawa et al., 2018; Potter, Jiang & Damiano, 2009; Ye et al., 2014). Da die Biosynthese von Glykokalyxkomponenten schneller abläuft und zusätzlich intrazelluläre Caveolae mit Glykokalyxbestandteilen zur Verfügung stehen (Becker et al., 2015), geht man von einem grundsätzlich kürzeren Zeitraum aus. Es wird vermutet, dass inflammatorische Prozesse die Wiederherstellung der Glykokalyx hemmen und so die verlängerte Erholungszeit verursachen (Potter et al., 2009; Yang et al., 2017).

Die Rekonstitution der Glykokalyx konnte bislang experimentell nur über die Zufuhr ihrer Abbauprodukte gefördert werden, beispielsweise durch die Gabe von Heparansulfat (Becker et al., 2010b), dessen Vorläufer Sulodexid (Song et al., 2017) oder Hyaluronsäure (Becker et al., 2010a). Es sind keine Substanzen bekannt, die die Glykokalyxsynthese spezifisch induzieren (Becker et al., 2010a).

### 1.1.5 PROTEKTION DER ENDOTHELIALEN GLYKOKALYX

Eine adäquate Volumentherapie kann durch Vermeiden einer Hypervolämie mit ANP Ausschüttung zur Protektion der Glykokalyx beitragen (Becker et al., 2015). Auch die Auswahl des verwendeten Volumenersatzes könnte Einfluss auf die Integrität der Glykokalyx haben. Negativ geladenes Albumin bindet elektrostatisch an die in vivo mit positiv geladenen Calciumionen angereicherte Glykokalyx und stabilisiert diese (Becker et al., 2015). Eine ausreichende Plasmaproteinkonzentration sollte demnach protektiv auf die Glykokalyx wirken (Bashandy, 2015). Experimentelle Studien bestätigen diesen Effekt für Albumin (Jacob et al., 2006; Jacob et al., 2009) und Plasmaersatz in Form von Fresh Frozen Plasma (Haywood-Watson et al., 2011). Der Einsatz von Albumin als Volumenersatz führte in einer Metaanalyse von septischen Patienten hingegen nicht zu einem Mortalitätsvorteil (Patel, Laffan, Waheed & Brett, 2014). Dies könnte mit einer bei dieser Patientenpopulation bereits geschädigten Glykokalyx erklärt werden (Chappell et al., 2008b; Mythen, 2012).

Die schädigende Wirkung von Hyperlipidämie und Hyperglykämie auf die Glykokalyx wurde im Tiermodell durch Statine (Meuwese et al., 2009) bzw. Metformin (Eskens, Zuurbier, van Haare, Vink & van Teeffelen, 2013) gemindert.

Welche molekularen Mechanismen und Signalkaskaden für das Glykokalyxshedding in Ischämie, Hypoxie und Inflammation verantwortlich sind, ist Schwerpunkt aktueller Forschungsarbeiten und wird auch eine der Fragestellungen dieser Arbeit sein.

Oxidativer Stress verbraucht die antioxidativen Reserven der Glykokalyx und könnte so ursächlich an der Destruktion der Glykokalyx in diesen Szenarien beteiligt sein. Die positiven Ergebnisse der Therapie mit Antioxidantien wie ACC (Nieuwdorp et al., 2006) und Superoxid-Dismutase (SOD) (Berezewicz et al., 1998) bestärken diese Theorie.

Eine Reihe von Proteasen sind als mögliche „Sheddasen“ der Glykokalyx identifiziert worden (Becker et al., 2015). Diese Enzyme bauen die Glykokalyx ab, indem sie Glykokalyxkomponenten voneinander oder von der Zellmembran trennen. Die direkte Inhibition der Sheddasen hat vielen Substanzen einen protektiven Einfluss auf die Glykokalyx nachweisen können. Beispiele hierfür sind Antikoagulantien wie Antithrombin (Chappell et al., 2009a; Chappell et al., 2009b) und Heparin (Schmidt et al., 2012). Antithrombin bindet an Heparansulfat, schirmt die Glykokalyx so von Proteasen ab und inhibiert diese zusätzlich. Matrix-Metalloprotease-Inhibitoren wie Sphingosin-1-Phosphat (Zeng et al., 2014), Sulodexid (Song et al., 2017) oder Doxycyclin (Mulivor & Lipowsky, 2009) reduzieren das Shedding von Syndekan. Über die Hemmung von Matrix-Metalloproteasen wird auch ein bei Zellkulturen beschriebener, protektiver Effekt von Tranexamsäure auf die Glykokalyx erklärt (Diebel, Martin, Liberati & Diebel, 2018).

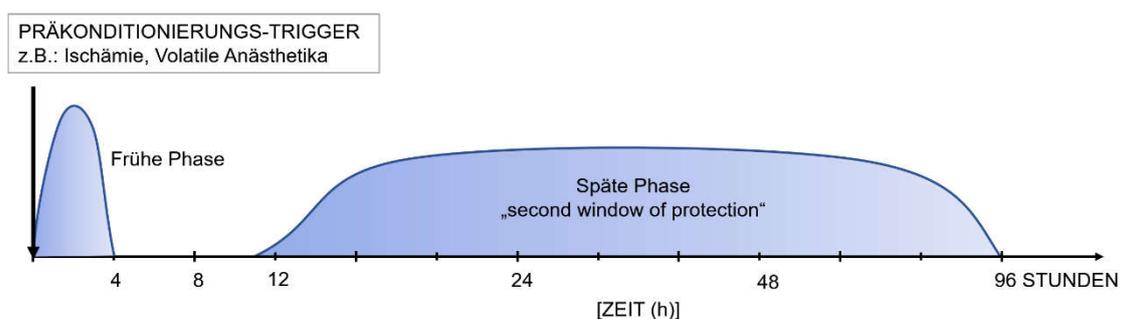
Indirekt könnten antiinflammatorische Substanzen Freisetzung und Aktivierung von Sheddasen herabsetzen, zum Beispiel durch Mastzellstabilisierung oder über eine verminderte Ausschüttung und Produktion von Zytokinen (Alphonsus & Rodseth, 2014; Rancan et al., 2018). Im Modell des isolierten Meerschweinchenherzens unserer Arbeitsgruppe reduzierte Hydrocortison den Glykokalyxverlust, sowohl bei Ischämie/Reperfusion als auch nach Inflammation durch TNF $\alpha$  (Chappell et al., 2009a; Chappell et al., 2006). Dies korreliert mit Daten aus der Herzchirurgie, wo es durch Steroidgabe zu einer reduzierten Glykokalyxschädigung kam (Brettner et al., 2018; Pesonen et al., 2016). Der klinische Nutzen von Steroiden ist allerdings sowohl in der Herzchirurgie (Kilger et al., 2003; Whitlock et al., 2015) als auch bei Sepsispatienten (Rhodes et al., 2017) umstritten.

### 1.1.6 PROTEKTION DURCH SEVOFLURAN

Sevofluran gehört als halogenierter Methylisopropylether zu den volatilen Anästhetika. Es wird klinisch routinemäßig zur Einleitung und Aufrechterhaltung einer Narkose oder seltener auch als Sedativum auf Intensivstationen eingesetzt (Hofstetter et al., 2007).

Die ischämische Präkonditionierung (IPC) ist ein Adaptationsmechanismus. Durch einen kurzen ischämischen Insult werden molekulare Mechanismen initiiert, die protektiv auf weitere Ischämien wirken (Loveridge & Schroeder, 2010). Erstmals beschrieben wurde dies 1986 von Murry et al. (Murry, Jennings & Reimer, 1986). Zhao et al. folgten 2003 mit der Darstellung der ischämischen Postkonditionierung (IPoC), bei der der Reperfusionsschaden nach einer initialen Ischämie durch kurze ischämische Phasen in der Reperfusion reduziert werden konnte (Zhao et al., 2003).

Die protektive Wirkung der Präkonditionierung ist zeitlich beschränkt und hat einen zweiphasigen Verlauf (siehe Abbildung 5). Die frühe Phase beginnt Minuten nach dem initialen Auslöser. Der hier induzierte ausgeprägt protektive Effekt lässt jedoch nach wenigen Stunden nach. Durch transkriptionelle Veränderungen der Genexpression kommt es nach 12 bis 24 Stunden zur späten Phase der Protektion. Die Schutzwirkung der späten Phase ist in ihrem Ausmaß geringer, hält aber einige Tage an (Huffmyer & Raphael, 2009; Lucchinetti et al., 2007; Zaugg, Lucchinetti, Behmanesh & Clanachan, 2014).

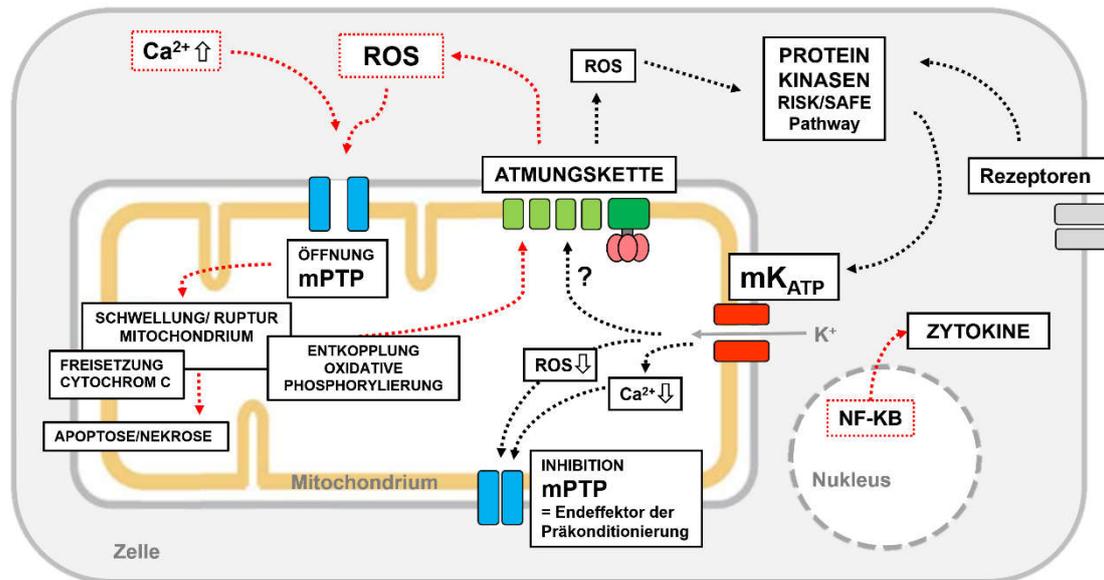


**Abbildung 5**  
Zeitverlauf der Präkonditionierung, modifiziert nach (Huffmyer & Raphael, 2009)

Noch vor der Entdeckung der ischämischen Prä- bzw. Postkonditionierung gab es bereits Hinweise auf einen kardioprotektiven Effekt von volatilen Anästhetika (Bland & Lowenstein, 1976). Mittlerweile ist aus vielfachen experimentellen Daten bekannt, dass die protektiven Mechanismen der ischämischen Prä- und Postkonditionierung pharmakologisch über volatile Anästhetika wie Sevofluran getriggert werden können (Landoni et al., 2009; Sergeev et al., 2004). Demnach ist die Anästhetika-induzierte Präkonditionierung (APC) die Initiierung von Toleranz gegen Ischämie/ Reperfusionsschäden durch die vorherige Applikation von volatilen Anästhetika. Werden volatile Anästhetika erst in der Reperfusionsphase nach Ischämie zugeführt, bezeichnet man die dadurch induzierte Protektion als Anästhetika-induzierte Postkonditionierung (APoC). Man geht davon aus, dass sich die Mechanismen der Prä- und Postkonditionierung überschneiden (Mio, Uezono & Kitahata, 2014).

Die Mechanismen der Präkonditionierung sind noch nicht vollständig verstanden (Chai et al., 2015). Zum gegenwärtigen Zeitpunkt geht man davon aus, dass Mitochondrien Ziel und Vermittler des Präkonditionierungseffektes sind. In der Reperfusionsphase nach Ischämie öffnet sich ausgelöst durch eine übermäßige Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und durch eine Kalziumüberladung die mitochondriale Permeabilitätspore (mPTP). Dies hat vielfache deletäre Folgen für die Zelle: Die Aufhebung des mitochondrialen Membranpotentials zieht den Abbruch der oxidativen Phosphorylierung und damit den Zusammenbruch des Energiestoffwechsels der Zelle nach sich. Zusammen mit einer osmotisch bedingten Schwellung und Ruptur von Mitochondrien führt dies zum nekrotischen bzw. apoptotischen Zelltod. Im Rahmen der ischämischen und Anästhetika-induzierten Präkonditionierung kommt es infolge einer initialen geringen Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) über intrazelluläre Signaltransduktionswege zur Öffnung mitochondrialer ATP-abhängiger Kaliumkanäle (mK<sub>ATP</sub>-Kanäle). Der geöffnete Zustand dieser Kaliumkanäle stellt die Adaptation der Präkonditionierung dar. Ausgehend hiervon kommt es im Zeitfenster des protektiven Effektes zu einer verringerten ROS Produktion und Kalziumlast. Endeffektor ist die mitochondriale Permeabilitätspore (mPTP) über deren Inhibition die Erhaltung der Integrität und Funktion der Mitochondrien erreicht und der Reperfusionsschaden gemindert wird (Hanley & Daut, 2005; Mio et al., 2014).

In der zweiten Phase der ischämischen oder Anästhetika-induzierten Protektion kommt es durch die verminderte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB und der konsekutiv herabgesetzten Synthese von Zytokinen (IL-6, TNF-α etc.) zu einer Reduktion von Leukozyten-Endothel-Interaktionen und zur Abschwächung des inflammatorisch bedingten Reperfusionsschadens (Chappell et al., 2011; Rodriguez-Gonzalez et al., 2013; Wang et al., 2010).



**Abbildung 6**

Mechanismen der Präkonditionierung (schwarz gestrichelt), Mediatoren und Signalwege des Ischämie-/Reperfusionsschadens (rot gestrichelt) werden durch Präkonditionierung gehemmt, modifiziert nach (Hanley & Daut, 2005). Ausgangspunkt der Präkonditionierung ist eine geringe Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die über nachgeschaltete Signaltransduktionswege (Proteinkinasen des RISK und SAFE Pathway) zur Öffnung von ATP-abhängigen mitochondrialen Kaliumkanälen ( $mK_{ATP}$ ) führt. Ob die initiale ROS Produktion selbst durch die Öffnung dieser Kaliumkanäle ausgelöst sein könnte, wird noch untersucht. Endeffektor der Öffnung der ATP-abhängigen Kaliumkanäle und damit der Präkonditionierung ist die Inhibition der mitochondrialen Permeabilitätspore (mPTP) und die damit einhergehende Erhaltung der mitochondrialen Integrität und Funktion (Mio et al., 2014).

Ischämie-/ Reperfusionsversuche am isolierten Meerschweinchenherzen zeigten weiterhin eine protektive Wirkung von Sevofluran auf die Glykokalyx (Annecke et al., 2010; Chappell et al., 2011; Chen et al., 2016). Auch Ischämie-/ Reperfusionsmodelle der Lunge und Leber wiesen ein reduziertes Glykokalyxshedding unter Sevofluran auf (Casanova et al., 2016; Li, Yuan, Zhao, Lv & Liu, 2016).

## 1.2 SEPSIS

### 1.2.1 DEFINITION

Erstmalige Erwähnung findet das septische Syndrom in einem ägyptischen Papyrustext (ca. 1600 v. Chr.). Der Begriff „Sepsis“ selbst wird auf Hippokrates (ca. 460 – 370 v. Chr.) zurückgeführt, der das „Faulen“ (griechisch σήπω) von Wunden beschrieb. Galen (ca. 130 – 200 n. Chr.) definierte dann erstmals die fünf charakteristischen Zeichen einer lokalen Entzündung mit Fieber (calor), Rötung durch Vasodilatation (rubor), Schmerz (dolor), Ödem durch erhöhte Kapillarpermeabilität (tumor) und Organdysfunktion (functio laesa). Aber erst mit Begründung der Mikrobiologie im neunzehnten Jahrhundert durch Semmelweis, Pasteur und Koch waren wissenschaftliche, pathophysiologische Erklärungsversuche der Sepsis möglich. Nach deren Verständnis führte die systemische Infektion (lat. Ansteckung) des Körpers mit Erregern zur Blutvergiftung mit dem typischen septischen Krankheitsbild. Diese Theorie hatte durch die nachfolgende Implementierung aseptischer Techniken und die damit verbundene Reduktion chirurgischer Wundinfektionen enorme Bedeutung für die moderne Medizin. Mit der Entdeckung von Antibiotika im Verlauf des letzten Jahrhunderts wurden jedoch Lücken in diesem Verständnis von Sepsis deutlich, denn die alleinige Eradikation des Infektionserregers war in der Therapie von vielen Sepsispatienten nicht suffizient. Zunehmend wuchs das Wissen um die wesentliche pathophysiologische Bedeutung der Immunantwort des Organismus. 1992 und 2003 wurde Sepsis folglich im internationalen Konsens als systemische Immunreaktion (SIRS) auf eine Infektion mit unterschiedlichen Schweregraden definiert (Angus & van der Poll, 2013; Botero & Perez, 2012; Vincent, Opal, Marshall & Tracey, 2013).

Die geforderten systemischen Inflammationszeichen erwiesen sich aber durch ihre hohe Sensitivität und unzureichende Spezifität immer problematischer für die Diagnosestellung. Diese Nachteile und ein verbessertes Verständnis der septischen Pathophysiologie führten 2016 mit der dritten internationalen Konsensusdefinition zur Revision der Sepsisdefinition. Hier wird Sepsis als lebensbedrohliche Organdysfunktion definiert, die durch eine dysregulierte Immunantwort auf einen Erreger verursacht wird. Diese Organdysfunktion kann über den Sepsis-related Organ Failure Assessment Score (SOFA-Score) quantifiziert werden. Falls trotz adäquater Flüssigkeitsgabe Vasopressoren notwendig werden um einen ausreichenden Perfusionsdruck aufrechtzuerhalten und das Laktat  $> 2$  mmol/L ansteigt, wird dies als septischer Schock bezeichnet. Mit dieser Definition ist das Ausmaß des Gewebes Schadens als Folge der dysregulierten Immunantwort, erkennbar über die Organdysfunktion, in den Vordergrund gerückt. Die möglicherweise adaptiven Zeichen der Aktivierung des Immunsystems (Fieber, Leukozytose, Tachykardie etc.) sind nicht mehr Teil der Sepsiskriterien (Singer et al., 2016). Die wechselnden Definitionen verdeutlichen insgesamt, dass sich das Verständnis der Sepsis im Wandel befindet

und dass Sepsis als klinisches Syndrom weiterhin schwer einzugrenzen ist (Martin, Kocera, Zechendorf & Schuerholz, 2016).

### **1.2.2 EPIDEMIOLOGIE**

Jährlich sind bis zu 19 Millionen Menschen weltweit und um die 700.000 in Deutschland von Sepsis betroffen (Fleischmann et al., 2015; Marik, 2014), mit steigender Tendenz (Angus, 2011; Iwashyna, Ely, Smith & Langa, 2010; Kaukonen, Bailey, Suzuki, Pilcher & Bellomo, 2014). Begründet wird die Zunahme der Inzidenz durch eine alternde Bevölkerung mit mehr Komorbiditäten, durch mehr immunsupprimierte Patienten und multiresistente Keime, ebenso wie iatrogen durch wechselnde Definitionen und eine stärkere Sensibilisierung für diese Erkrankung (Opal, Dellinger, Vincent, Masur & Angus, 2014; Singer et al., 2016). Die lebensbedrohliche Einschränkung der Organfunktion macht Sepsis zusätzlich zu einem der häufigsten Gründe für die Notwendigkeit einer intensivmedizinischen Therapie (Marik, 2014). Sepsis ist damit eines der großen Probleme der Medizin und des Gesundheitswesens. Die Gesamtbehandlungskosten stiegen im Jahr 2012 in Deutschland auf etwa 8 Milliarden Euro bzw. 3 % des Gesundheitsetats (Fleischmann et al., 2015). Die Mortalität von Sepsispatienten hat in den letzten Jahrzehnten dabei abgenommen (Friedman, Silva & Vincent, 1998; Kaukonen et al., 2014), bleibt aber mit 25 % und im septischen Schock bis über 40 % auf einem hohen Niveau (Rhodes et al., 2017). Dadurch ist Sepsis eine der Hauptursachen für Todesfälle auf Intensivstationen (Henrich, Gruss & Weigand, 2010) und allgemein nach Herz- und Tumorerkrankungen dritthäufigste Todesursache (Marik, 2014). Zur Mortalität der akuten Sepsiserkrankung kommen chronische Erkrankungen bei Überlebenden mit reduzierter Lebensqualität und eine erhöhte Fünf-Jahres-Mortalität von 75% (Iwashyna et al., 2010; Marik, 2014).

### **1.2.3 THERAPIE**

Forschungsbemühungen der letzten Jahrzehnte haben zwar zu einem verbesserten pathophysiologischen Verständnis der Sepsis geführt, konnten bislang jedoch keinen kausalen Therapieansatz mit einem klinischen Benefit finden. Grundlage der Sepsisbehandlung sind weiterhin frühe Diagnosestellung und Therapie. Die Bekämpfung der zugrundeliegenden Infektion mittels kalkulierter Antibiotikatherapie und Fokussanierung sowie erweiterte supportive Therapiemöglichkeiten bis hin zu Organersatzverfahren sind für die reduzierte Mortalität von Sepsispatienten verantwortlich (Cohen et al., 2015). Evidenzbasierte internationale Leitlinien der Surviving Sepsis Campaign erleichtern zudem das klinische Management dieser Patienten und tragen zur Vereinheitlichung der Sepsistherapie bei (Rhodes et al., 2017).

#### 1.2.4 PATHOPHYSIOLOGIE

Die pathophysiologischen Mechanismen einer Sepsis sind äußerst komplex. Zusammengefasst führen dysregulierte Immunantwort, Endothelläsion, Veränderungen der Makro- und Mikrozirkulation sowie mitochondriale Störungen zur Organdysfunktion (Chelazzi et al., 2015).

Mikrozirkulatorische Defizite korrelieren bei septischen Patienten mit Organversagen und Mortalität (Ince et al., 2016). Dabei kann die endotheliale Dysfunktion für mehrere Aspekte dieser Mikrozirkulationsstörung verantwortlich gemacht werden. Zunächst induziert die Schädigung des Endothels durch Verlust ihrer Barrierefunktion ein Kapillarleck. Diese erhöhte Gefäßpermeabilität und die damit einhergehenden für septische Patienten charakteristischen Ödeme nehmen eine Schlüsselrolle im septischen Krankheitsbild ein (Marik, 2014). Weiterhin kommt es über proinflammatorische Zytokine zur ausgeprägten Vasodilatation durch Induktion der endothelialen iNOS mit bis zu hundertfach erhöhten NO Konzentrationen (Ait-Oufella et al., 2010). Die resultierende verminderte Vasoreaktivität führt durch die dysregulierte Verteilung des Blutflusses zu einer sehr heterogenen Perfusion der Mikrozirkulation. Mitverantwortlich an der Mikrozirkulationsstörung sind letztlich kapilläre Verschlüsse durch Mikrothromben. Sie entstehen durch unkontrollierte Aktivierung von Gerinnungskaskaden. Kausal beteiligt ist auch hier die endotheliale Dysfunktion (Chelazzi et al., 2015).

Auf makrozirkulatorischer Ebene vermindern Kapillarleck und Vasoplegie die kardiale Vorlast, mit der Folge eines distributiven Schocks. Zusätzlich kann das kardiale Schlagvolumen durch eine septische Kardiomyopathie mit verminderter myokardialer Kontraktilität kompromittiert sein. Bakterielle Bestandteile, allen voran Endotoxine, und zelluläre Alarmsignale wie reaktive Sauerstoffspezies (ROS) greifen dabei über Toll-Like-Rezeptoren (TLR) in den Kalziumhaushalt ein und beeinträchtigen die myofilamentäre Integrität. Einschränkungen der kardialen Funktion werden aber über einen niedrigen systemischen Widerstand maskiert. Der Versuch den Verlust an Herzzeitvolumen mit einem Anstieg der Herzfrequenz zu kompensieren, prägt die typische hyperdynamie Kreislaufkonstellation der Sepsis (Martin, Derwall, Thiemermann & Schurholz, 2017).

Auf zellulärem Niveau ist Sepsis mit einer mitochondrialen Dysfunktion verbunden. Neben der verminderten Organperfusion aufgrund von Störungen der Makro- und Mikrozirkulation stellt dies eine der Mechanismen dar, die zur Entwicklung des septischen Multiorganversagens beitragen. Der Grad der mitochondrialen Dysfunktion korreliert in klinischen Studien mit Outcomeparametern. Sauerstoff kann als Konsequenz der Mitochondriopathie nicht verwertet werden. Die dementsprechend eingeschränkte Sauerstoffextraktion fällt klinisch mit einer pathognomonisch hohen zentralvenösen Sättigung auf (Chappell, Westphal & Jacob, 2009d; Zanotti-Cavazzoni & Hollenberg, 2009). Die mitochondriale Dysfunktion wird als adaptive Schutzfunktion an eine

dysregulierte Immunantwort diskutiert. Sie könnte nach dieser Theorie einen metabolischen Ruhezustand mit vermindertem Sauerstoff- und Energieverbrauch darstellen, der den individuellen Zelltod durch Ischämie und Hypoxie hinauszögert. Dies würde erklären, warum trotz kritisch reduzierter Perfusion histologisch kaum nekrotische Areale in septischen Organen nachweisbar sind und sich Organe im Verlauf regenerieren können. Die Erhaltung der Integrität einzelner Zellen geht nach diesem Modell jedoch auf Kosten der Organfunktion. Da Zellen im beschriebenen Hibernationszustand nicht ihre komplexen, koordinierten Funktionen wahrnehmen können, ist ein Organversagen die Folge (Cohen et al., 2015; Singer, 2017).

### **1.2.5 IMMUNOLOGIE**

Das Wissen um die Bedeutung der körpereigenen Immunantwort hat das Verständnis der Sepsis grundlegend verändert. Weit über die intrinsisch toxische Aktivität von Mikroorganismen hinaus, führt die Aktivierung des angeborenen Immunsystems als vorderste Front der Immunabwehr zu kollateralen Organschäden (Marshall, 2014). Dabei agieren die Zellen des angeborenen Immunsystems, beispielsweise Granulozyten, Makrophagen und Endothelzellen, weniger unspezifisch als lange angenommen. Mit Hilfe von Pattern-Recognition-Rezeptoren (PRR), allen voran Toll-Like-Rezeptoren (TLR), erkennen selbige Abwehrzellen molekulare mikrobiologische Strukturen, insbesondere Endotoxine wie Lipopolysaccharid. Diese Pathogen-Associated-Molecular-Patterns (PAMPs) können aufgrund ihrer essentiellen Funktion durch Mikroorganismen nur begrenzt verändert werden und dienen dem angeborenen Immunsystem dadurch als universelle Muster für Pathogene. Eine ganze Reihe unterschiedlicher Toll-Like-Rezeptoren (TLR) sind mittlerweile bekannt. Ihre Expression an der Zelloberfläche variiert je nach Pathogen und Sepsisstadium (Akira, Uematsu & Takeuchi, 2006; Chousterman, Swirski & Weber, 2017). Die Interaktion von Toll-Like-Rezeptoren (TLR) und deren Liganden ermöglicht die Migration des zytosolischen Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in den Zellkern, wo es die Synthese inflammatorischer Zytokine und Adhäsionsmoleküle induziert (Celes, Prado & Rossi, 2013). Zytokine wie TNF- $\alpha$  sind die zentralen Mediatoren der Immunantwort. Sie potenzieren die NF- $\kappa$ B Aktivität und sind essentieller Bestandteil inflammatorischer Signaltransduktionswege. Zudem rekrutieren sie Immunzellen und fördern so die weitere Aktivierung des Immunsystems (Aird, 2003; Schutze, Wiegmann, Machleidt & Kronke, 1995). Neben proinflammatorischen Mediatoren werden zeitgleich auch antiinflammatorische Mediatoren freigesetzt. Sie sollen die Immunreaktion und die damit verbundenen Gewebeschäden limitieren. Charakteristisch für die septische Immunantwort ist das dysregulierte Gleichgewicht dieser Mediatoren. Eine initial überschießend proinflammatorische Phase wird von einer prolongierten antiinflammatorischen Phase abgelöst (Angus & van der Poll, 2013; Cohen et al., 2015). Die konsekutive Immunsuppression kann sich in einer erhöhten

Anfälligkeit für Sekundärinfektionen manifestieren und wird über antiinflammatorische Zytokine wie IL-10, eine Beeinträchtigung der Leukozytenfunktion und über die Apoptose von Lymphozyten vermittelt (Angus & van der Poll, 2013; Chousterman et al., 2017; Ward & Bosmann, 2012).

Was Erforschung und Verständnis der molekularen Abläufe erschwert, ist die zeitliche Dynamik und Komplexität der septischen Immunantwort mit tausenden transkriptionell veränderten Genen und einem außerordentlich großen Netzwerk von interagierenden Mediatoren und Zellen (Calvano et al., 2005; Chousterman et al., 2017). Hinzu kommt, dass die Immunantwort je nach auslösendem Keim, genetischen Faktoren und Vorerkrankungen sehr variabel ausfallen kann (Angus & van der Poll, 2013).

Die im Rahmen dieser immunologischen Prozesse zerstörten Zellen setzen endogene Alarmsignale (Alarmine) frei. Zusammen mit den Pathogen-Associated-Molecular-Patterns (PAMPs) gehören Alarmine zur Gruppe der Damage-Associated-Molecular-Patterns (DAMPs). Auch sie werden über Pattern-Recognition-Rezeptoren wie TLR erkannt. Folglich aktivieren exogene und endogene Gefahrensignale das angeborene Immunsystem unter Einsatz des gleichen Mechanismus. Die Immunreaktion ist nicht für Infektionen spezifisch (Celes et al., 2013; Marshall, 2014).

### **1.2.6 DAS ENDOTHEL UND DIE GLYKOKALYX IN DER SEPSIS**

Das Endothel verhindert als natürliche Barriere das Eindringen von Mikroorganismen (Paulus, Jennewein & Zacharowski, 2011). Neben dieser passiven Aufgabe ist das Endothel als Teil des angeborenen Immunsystems aktiv an Pathogenerkennung und Bildung inflammatorischer Mediatoren beteiligt. Die damit einhergehende Rekrutierung von Leukozyten erfolgt unter Mitwirkung der Glykokalyx. Das inflammatorisch aktivierte Endothel synthetisiert mehr Adhäsionsmoleküle (Chousterman et al., 2017; Li & Vlodavsky, 2009). Kommt es zum Verlust von Glykokalyxbestandteilen, dann können Leukozyten an diesen Adhäsionsmolekülen binden (Chappell et al., 2011). Tatsächlich bestätigen klinische Untersuchungen, dass die verstärkte Leukozytenadhäsion bei Sepsispatienten mit einer Glykokalyxschädigung erklärt werden kann (Donati et al., 2013). Durch Vasodilatation und Permeabilitätssteigerung wird den Leukozyten zusätzlich der Zugang ins entzündete Gewebe vereinfacht. Eine parallel vermehrte mikrovaskuläre Thrombusbildung soll die Verbreitung von Pathogenen und Entzündungsreaktion lokal begrenzen (Singer, 2014). Deletäre Folge der beschriebenen inflammatorischen Anpassungsvorgänge ist eine Mikrozirkulationsstörung. Diese manifestiert sich nach Endotoxämie in einer Abnahme der Kapillardichte und konnte im Zusammenhang mit einer Glykokalyxläsion beobachtet werden (Cabrales, Vazquez, Tsai & Intaglietta, 2007; Marechal et al., 2008; Nieuwdorp et al., 2009).

Immer mehr experimentelle Untersuchungen deuten auf eine Rolle der Glykokalyx an der septischen Pathophysiologie. Auffällig ist auch die charakteristische Symptomatik der Sepsis mit Vasoplegie, Ödembildung und Aktivierung des Immun- und Gerinnungssystems, entsprechend den Folgen einer funktionell geschädigten Glykokalyx. Weshalb man als Ausgangspunkt der verminderten Vasoreaktivität, erhöhten Permeabilität sowie der prokoagulatorischen und inflammatorischen Endotheloberfläche eine septisch bedingte Dysfunktion des Endothels, insbesondere der Glykokalyx, vermutet (Becker et al., 2015; Chelazzi et al., 2015).

Eine ganze Reihe klinischer Studien konnte inzwischen das Shedding der Glykokalyx bei septischen Patienten belegen. Dies gilt sowohl für die Glykokalyxbestandteile Heparansulfat und Hyaluronsäure (Anand, Ray, Srivastava & Bhargava, 2016; Nelson, Berkestedt & Bodelsson, 2014; Steppan et al., 2011) als auch für Syndekan-1 (Johansen et al., 2015; Nelson, Berkestedt, Schmidtchen, Ljunggren & Bodelsson, 2008). Darüber hinaus sind Plasmakonzentrationen von Glykokalyxkomponenten als diagnostische Biomarker der Sepsis im Gespräch, da sie mit Veränderungen der klassischen Inflammationsmarker CRP, Procalcitonin und IL-6 korrespondieren (Köhler et al., 2011; Nelson et al., 2014; Pesonen et al., 2018; Steppan et al., 2011). Mehr noch als rein diagnostisch könnten Sheddingdaten prognostisch hilfreich sein oder Risikopatienten identifizieren, denn sie korrelieren zusätzlich mit Mortalität und Ausmaß der Organdysfunktion (Johansen et al., 2015; Köhler et al., 2011; Smart et al., 2017).

Auch Adhäsionsmoleküle, wie Integrine und Selektine, als Biomarker der Endothelzellaktivierung korrelieren mit Schwere und Mortalität der Sepsiserkrankung. Die inflammatorische Endothelzellaktivierung führt zudem zu morphologisch veränderten und apoptotischen Endothelzellen ohne Barrierefunktion (Ait-Oufella et al., 2010; Skibsted et al., 2013; Xing, Murthy, Liles & Singh, 2012). Damit sind beide Schichten des Endothels von der endothelialen Dysfunktion betroffen.

Der Zusammenhang der Sheddingdaten mit Mortalität und Organdysfunktion deutet auf die maßgebliche Beteiligung der endothelialen Dysfunktion an der Ausbildung des septischen Multiorganversagens (Aird, 2003; Lee & Liles, 2011). Umso umfassender das Endothel im Rahmen inflammatorischer Prozesse stimuliert und geschädigt wird, umso mehr ist es Verstärker septischer Signalkaskaden. Das Resultat ist eine generalisierte, vom Auslöser unabhängige Aktivierung inflammatorischer Mediatoren und Zellen. Diese dysregulierte Immunantwort führt, verbunden mit dem endothelialen Funktionsverlust, zum unkontrollierten Fortschreiten der septischen Erkrankung (Chappell et al., 2009d; Chousterman et al., 2017; Page & Liles, 2013).

### 1.3 FRAGESTELLUNG/ HYPOTHESE

Die Glykokalyx nimmt wie in den vorangegangenen Kapiteln dargelegt in der Pathophysiologie systemischer Inflammationsreaktionen und der Sepsis eine zentrale Rolle ein und wird hierbei geschädigt. Die Mechanismen der inflammatorischen Glykokalyxschädigung sind in diesem Zusammenhang noch unzureichend untersucht.

Im Fall von Ischämie-/Reperfusionsschäden konnte gezeigt werden, dass Sevofluran protektiv auf die Glykokalyx wirkt. Im Fall von inflammationsbedingten Schäden der Glykokalyx ist dies noch unklar.

Unsere Hypothese lautet:

Auch im Fall der im Endotoxinmodell durch Lipopolysaccharid induzierten Veränderungen der endothelialen Glykokalyx im isoliert schlagenden Meerschweinchenherzen wirkt Sevofluran protektiv.

## **2 MATERIAL UND METHODEN**

---

Zur Beantwortung unserer Fragestellung und Hypothese wählten wir das etablierte Modell des isoliert schlagenden Meerschweinchenherzens, welches eine Analyse des Zustandes der endothelialen Glykokalyx und der vaskulären Barrierefunktion erlaubt.

Zur Simulation eines septischen Schadens verwendeten wir Lipopolysaccharid als Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien.

Bei der Untersuchung der Mechanismen der inflammatorischen Glykokalyxschädigung legten wir unseren Fokus auf die Abgrenzung einer indirekten von einer direkten Lipopolysaccharidwirkung. Potentielle Mediatoren der Glykokalyxschädigung wie reaktive Sauerstoffspezies (ROS), Purine und Gewebsmastzellen wurden hierfür untersucht.

### **2.1 VERSUCHE AM ISOLIERTEN MEERSCHWEINCHENHERZEN**

Die tierexperimentellen Versuche wurden im März bis September 2009 im Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin München, dem ehemals Physiologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München (Vorstand Prof. Dr. med. Ulrich Pohl) in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. habil. Dr. rer. nat. Bernhard F. Becker und Prof. Dr. med. Thorsten Annecke durchgeführt. Die nach dem deutschen Tierschutzgesetz erforderliche Genehmigung der zuständigen Regierung von Oberbayern lag vor (Aktenzeichen 209.1/211-2531.3-3/99).

#### **2.1.1 VERSUCHSTIERE**

Es wurden zwei bis vier Wochen alte, zwischen 200-500g schwere, männliche Albino-Kurzhaar-Meerschweinchen der Versuchstierzucht Winkelmann Harlan GmbH Borcheln, Deutschland verwendet. Die Haltung und Pflege im Tierstall des Physiologischen Instituts entsprach den Vorgaben des deutschen Tierschutzgesetzes. Vor Versuchsbeginn konnten sich die Versuchstiere über mindestens zwei Wochen bei adäquaten Licht- und Raumklimaverhältnissen adaptieren. Dabei erhielten sie Standardtrockenfutter und freien Zugang zu Wasser.

### **2.1.2 HERZPRÄPARATION**

Für die Präparation zur Herzentnahme wurden die Versuchstiere mit einem Schlag auf die Hinterkopf- und Nackenregion betäubt, bevor nach Fixierung auf einem Präparationstisch die Halsschlagadern beidseits durchtrennt wurden und so der rasche Hirntod gewährleistet war.

Der Thorax wurde vom Xyphoid ausgehend an der Rippengrenze entlang und durch mediale Sternotomie eröffnet. Das dann freiliegende Herz wurde sofort kontinuierlich mit isotoner 4°C kalter Natriumchloridlösung gekühlt. So wurde die Stoffwechselaktivität und Herzfrequenz des Herzens verlangsamt und der Ischämieschaden bis zur Reperfusion auf das Mindeste begrenzt. Der knöcherne ventrale Thorax mit Rippen und Sternum wurde entfernt und der Lungenhilus auf beiden Seiten durchtrennt. Damit war nicht nur ein Entfernen beider Lungenflügel möglich, sondern auch die Dissektion der Pulmonalarterien und Pulmonalvenen erfolgt. Das Perikard wurde eröffnet und vom Herzmuskel getrennt. Anschließend konnte die Aorta ascendens vom umgebenden Bindegewebe stumpf freipräpariert und ein Faden hinter der Aorta vorgelegt werden. Die Inzision der Aorta ascendens erfolgte in ausreichendem Abstand zu den Koronarien. Die bereits perfundierte und entlüftete Aortenkanüle des Langendorff-Apparates wurde dann in die Aorta ascendens eingeführt und befestigt. Auch hierbei wurde auf einen ausreichenden Abstand zu Koronarien und Klappenebene geachtet. Damit war die Ischämiezeit beendet und die Perfusion des Herzens über den Langendorff-Apparat sichergestellt. In allen gewerteten Versuchen konnte die ischämische Präparation in unter drei Minuten durchgeführt werden.

Nach Durchtrennung der Venae cavae inferior und superior ließ sich das Herz vollständig aus dem Thorax herauslösen und in die Langendorff-Apparatur überführen. Abschließend mussten noch die Venae cavae inferior und superior sowie die Pulmonalvenen ligiert und die vor der Bifurkation durchtrennte Pulmonalarterie kanüliert werden.

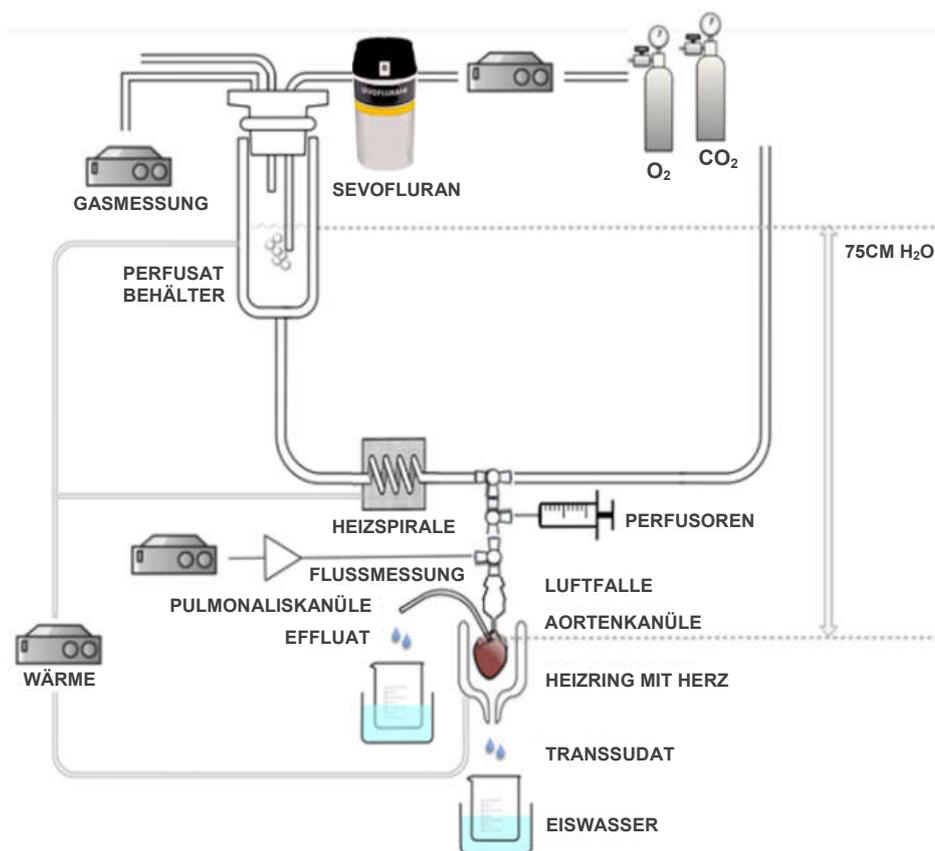
### **2.1.3 LANGENDORFF VERSUCHSAUFBAU**

In dem verwendeten modifizierten Langendorff-Modell des isoliert schlagenden Säugetierherzens (Döring, 1985; Langendorff, 1895) werden die Koronarien orthograd und passiv über eine in der Aorta liegende Kanüle perfundiert. Als Perfusionslösung dient ein modifizierter Krebs-Henseleit-Puffer (siehe 2.1.4).

Über das Koronarsystem versorgt diese Nährlösung zunächst das Myokard und gelangt dann venös in den Sinus coronarius des rechten Vorhofes. Von dort aus wird sie durch den rechten Ventrikel in die Pulmonalarterie gepumpt und als Effluat gesammelt. Da die Venae cavae ligiert wurden, entspricht das Effluat der Flussmenge über die Koronararterien.

Bei der flusskonstanten Perfusionsmethode werden koronare Autoregulationsmechanismen übergangen (Skrzypiec-Spring, Grotthus, Szelag & Schulz, 2007), weswegen die physiologischere druckkonstante Perfusion zum Einsatz kam. Die druckkonstante Perfusion des Herzens wurde durch kontinuierliches Nachfüllen der Perfusatlösung auf eine Höhe von 75cm H<sub>2</sub>O erreicht. Dies liegt mit etwa 55mmHg nur gering unter der physiologischen Nachlast eines in Ruhe befindlichen Meerschweinchenherzens (Flynn, Dengerink & Wright, 1988).

Der retrograde Fluss und konstante Druck in der Aorta führen zu einem Schluss der Aortenklappe. Das Perfusat gelangt somit nicht in den linken Ventrikel, sondern nur in die Koronarien. Über die ligierten Pulmonalvenen kommt es zu keiner Rezirkulation. Der damit leere linke Ventrikel generiert weder einen Auswurf, noch verrichtet er äußere Herzarbeit. Im Gegensatz zum arbeitenden Herzmodell, bei dem eine zusätzliche Kanüle in den linken Vorhof eingebracht wird und so über Volumenzufuhr Vorlast geboten und die Herzfunktion untersucht werden kann, sind in diesem Modell nur Aussagen über die Koronargefäße möglich.



**Abbildung 7**  
Langendorff-Apparat Versuchsaufbau, [modifiziert nach (Liao, Podesser & Lim, 2012)]

Die überschüssige lymphatische und interstitielle Flüssigkeit der epikardialen Herzoberfläche floss an der Herzspitze zusammen, tropfte ab und wurde als Transsudat gesammelt. Das Transsudat entspricht der Nettofiltration des Koronarbettes. Versuche wurden gewertet, wenn die Transsudatmenge initial nicht auf über 10% des Effluates stieg. Transsudat- und Effluatproben wurden kontinuierlich auf Eis gekühlt, gewogen (Feinwaage PC 440, Mettler, Gießen, Deutschland) und schnellstmöglich eingefroren. Wie in Abbildung 7 dargestellt, gelangte das Perfusat aus dem Behälter über Leitungen nach Durchlaufen einer Heizspirale zu einer Hahnenbank. An dieser war ein Dreiwegehahn zur Abnahme von Perfusatproben oder zum Anschluss von Perfusorspritzen zwischengeschaltet. Dahinter befand sich eine Flussmesssonde (T106, Transonic Systems, Ithaca, New York, USA), durch die der variable Fluss kontinuierlich angezeigt wurde. Abschließend floss das Perfusat durch eine Luftfalle und gelangte dann über die Aortenkanüle zum Herzen.

Insgesamt wurde auf streng luftfreie Leitungen geachtet. Zusammen mit der Luftfalle wurde so Glykokalyx-schädigenden Luftembolien vorgebeugt. Das Perfusat wurde im Behälter mit einer Wärmepumpe (Colora Messtechnik GmbH, Lorch/Württemberg) auf 37°C geheizt. Dies entspricht der normalen Temperatur von Meerschweinchen (Gross, 2009). Die Temperatur wurde vor Versuchsbeginn gemessen und konstant gehalten. Die Wärmepumpe versorgte auch die Heizspirale und den Heizring. Die Heizspirale sollte Wärmeverluste in den Leitungen entgegenwirken, der um das Herz herum angebrachte Heizring das Herz wärmen und so ein Auskühlen verhindern. Ziel all dieser Maßnahmen war das Erreichen einer konstanten physiologischen Temperatur, da das isolierte Herz sehr sensibel auf Temperaturschwankungen reagiert (Gross, 2009).

Verunreinigungen durch Mikropartikel und Bakterien sind die häufigste Ursache für ein Versagen des isolierten Herzmodells (Sutherland & Hearse, 2000). Um dem vorzubeugen, wurden die Komponenten der Versuchsanordnung am Ende eines Versuchstages ausgiebig mit destilliertem Wasser und regelmäßig mit einer Dekontaminationslösung behandelt.

Am Ende des Versuchsprotokolls wurden die Herzen aus dem Langendorff-Apparat entnommen. Die Vorhöfe wurden abgeschnitten, die Ventrikel eröffnet und hier vorhandenes Perfusat bzw. Koagel entfernt. Im nächsten Schritt wurde das Feuchtgewicht der Herzen ermittelt (Feinwaage PC 440, Mettler, Gießen, Deutschland). Nach 24 - 72 Stunden Trocknen bei 60°C (Wärmeschrank Heraeus T5042, Hanau, Deutschland) konnte das Trockengewicht der Herzen gemessen werden. Im Effluat bzw. Transsudat bestimmte Substanzmengen werden in Bezug auf dieses Trockengewicht der Herzen angegeben.

### 2.1.4 PERFUSAT

Das Perfusat wurde in der modifizierten Zusammensetzung nach Krebs-Henseleit (Krebs & Henseleit, 1932) am jeweiligen Versuchstag aus gekühlten (8°C) Stammlösungen neu angesetzt und in das gewärmte doppelwandige Perfusatgefäß gefüllt. Tabelle 1 führt die Zusammensetzung des Puffers auf. Vor jeder Versuchsreihe wurde eine Perfusatprobe entnommen und durch ein Blutgasanalysegerät (Rapidpoint, Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Eschborn, Deutschland) kontrolliert ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ , pH,  $\text{PCO}_2$ ,  $\text{PO}_2$ ,  $\text{HCO}_3^-$ , Glukose).

Diese Nährlösung übernimmt drei wesentliche Aufgaben des Blutes. Zunächst wird durch die physiologische Elektrolytzusammensetzung das Transmembranpotential stabilisiert und aufrechterhalten (Gross, 2009). Zweitens wird die Versorgung des Metabolismus mit ausreichend Sauerstoff übernommen (Gross, 2009). Dafür begaste eine Gasmischpumpe (Fa. Wösthoff, Bochum, Deutschland) das Perfusat kontinuierlich mit 94,4 % Sauerstoff und 5,6 % Kohlenstoffdioxid (Linde, Höllriegelskreuth, Deutschland). Das Mischverhältnis konnte über eine Kapnometriemessung (Capnomax Ultima, Datex, Helsinki, Finnland) kontinuierlich kontrolliert werden. Der hohe Sauerstoffanteil ermöglicht die adäquate Oxygenierung des Herzens auch in kristalloiden Lösungen ohne Sauerstoffträger nur über den physikalisch gelösten Sauerstoff. Um eine hypoxische Schädigung des Herzens zu vermeiden, ist aber auch bei dem vorausgesetzten  $\text{PO}_2 > 500\text{mmHg}$  ein Vielfaches der physiologischen koronaren Flüsse notwendig (Gross, 2009). Die Begasung des Bikarbonatpuffers mit Kohlenstoffdioxid führt zum gewünschten pH von 7,4. Letztlich müssen für die kontraktile und Stoffwechselfunktion des Myokards Energiesubstrate bereitgestellt werden (Gross, 2009). Als Energiesubstrate dienten hier Glukose und Pyruvat. Zur effizienteren Glukoseverwertung wurde Insulin verwendet.

Kalzium wurde dem Perfusat in der modifizierten, geringeren Konzentration zugefügt. Die ursprüngliche Empfehlung von Krebs und Henseleit hatte nicht berücksichtigt, dass große Teile des Kalziums im Blut an Proteine gebunden vorliegen. Um Kalziumphosphat-Niederschläge zu verhindern, wurde Kalzium erst nach Begasung des Puffers und damit bei niedrigerem pH zugegeben.

**Tabelle 1**

Zusammensetzung Modifizierter Krebs-Henseleit-Puffer

SUBSTANZ	c(mmol/l)	HERSTELLER
Natriumchlorid (NaCl)	116	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	3,6	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kalziumchlorid ( $\text{CaCl}_2$ )	1,2	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	1,16	Merck, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumsulfat ( $\text{MgSO}_4$ )	0,58	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )	23	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glukose	5,4	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumpyruvat	0,3	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Insulin (Rinderpankreas)	2,8 I.E./l	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

**2.1.5 VERSUCHSPROTOKOLL UND VERSUCHSGRUPPEN**

Nach der Herzpräparation folgte eine 15-minütige Stabilisierungsphase. Dieses Intervall ist notwendig um eine normale Herzfunktion nach Herzpräparation zu gewährleisten. Vor dem eigentlichen Versuchsbeginn kann sich das Herz so von Ischämie/Reperfusion und anderen Irritationen der Präparation erholen und in einen Gleichgewichtszustand gelangen.

Anschließend wurden Transsudat und Effluat über 15 Minuten gesammelt und die basalen Referenzwerte ermittelt (E0, T0). Über festgelegte Zeitintervalle (1-8) in Kontroll- und Interventionsgruppen wurde das Auffangen von Transsudat (T) und Effluat (E) kontinuierlich fortgesetzt.

Während der letzten 20 Minuten des Versuches wurde dem Perfusat herznah Hydroxyethylstärke (HAES 6 % 130/0,4, Fresenius Kabi, Deutschland) infundiert. Die Rate der Haesinfusion entsprach dabei einem Drittel des aktuellen Koronarflusses. Mit der Haesinfusion wurde eine kolloidale Lösung zugeführt und der kolloidosmotische Druck im Perfusat erhöht. Dadurch sollten Effekte der Interventionen auf die Gefäßpermeabilität verdeutlicht werden.

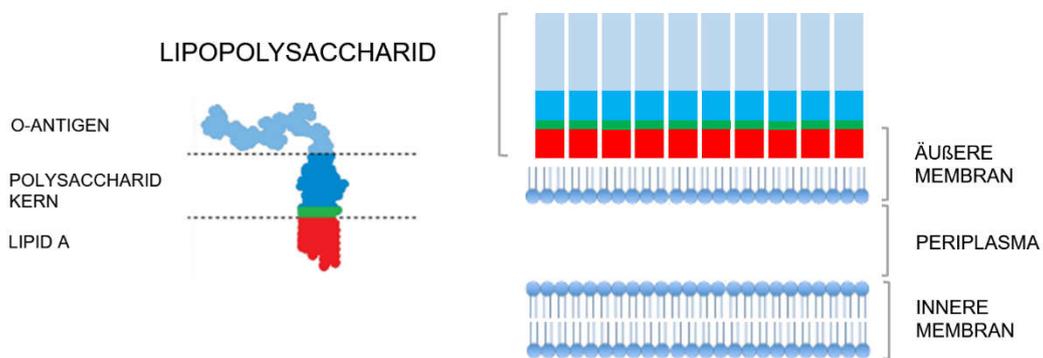
Das zeitliche Versuchsprotokoll variierte nicht zwischen den einzelnen Gruppen. Die Gesamtlänge des Versuches war auf 125 Minuten festgesetzt. Abbildung 8 veranschaulicht das Vorgehen in der Gruppe A (Kontrollgruppe, n = 6).

<b>PRÄPARATION</b>	<b>STABIL.</b>	<b>BASALWERT</b>							<b>HAES INFUSION</b>	
	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>20 MINUTEN</b>
		T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
		E0	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8

**Abbildung 8**  
Versuchsprotokoll Gruppe A (Kontrollgruppe)

**LIPOPOLYSACCHARID (LPS)**

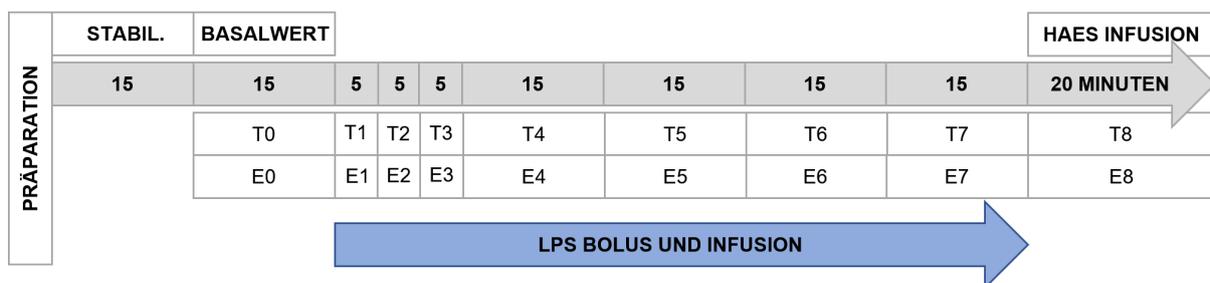
Lipopolysaccharid ist Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien und aus drei strukturellen Untereinheiten aufgebaut. Verantwortlich für die endotoxischen Eigenschaften von Lipopolysaccharid ist Lipid A. An dieses Endotoxin sind Polysaccharidkern und O-Antigen gebunden. Lipopolysaccharid ist das potenteste aller PAMPs (Pathogen-Associated-Molecular-Patterns) (Celes et al., 2013). Viele Kennzeichen der septischen Erkrankung können mit Hilfe von Lipopolysaccharid abgebildet werden. Dies macht es zum häufig verwendeten induzierenden Agens in septischen Tiermodellen. Inflammatorische Kaskaden werden durch die Bindung von Lipopolysaccharid und seinem Kofaktor CD-14 an Toll-Like-Rezeptoren (TLR-4) angestoßen (Marshall, 2005; Vincent & Abraham, 2006).



**Abbildung 9**

Lipopolysaccharid, rechts ist die Zellwand von gramnegativen Bakterien dargestellt, links die Komponenten des Lipopolysaccharids, [modifiziert nach (DeFranco, Locksley & Robertson, 2007)]

In den Lipopolysaccharidgruppen erfolgte nach Messung der Basalwerte eine 5-minütige Bolusinjektion von 5 mg Lipopolysaccharid (Escherichia coli Lipopolysaccharid 055:B5; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) / kg Körpergewicht des Tieres. Dem schloss sich eine 75-minütige Infusion von 25 mg/kg\*h Lipopolysaccharid an. Die Dosierungen richteten sich nach Werten in gängigen Tierversuchen. Gleichzeitig musste die fehlende Rezirkulation und der damit einhergehende Verlust von Lipopolysaccharid miteinkalkuliert werden. Die beschriebene Lipopolysaccharidinfusion war in allen Lipopolysaccharidgruppen identisch: Gruppe B (LPS, n = 6), Gruppe C (LPS + Sevofluran), Gruppe F (Heparinase + LPS) und Gruppe G (Heparinase + LPS + Sevofluran).



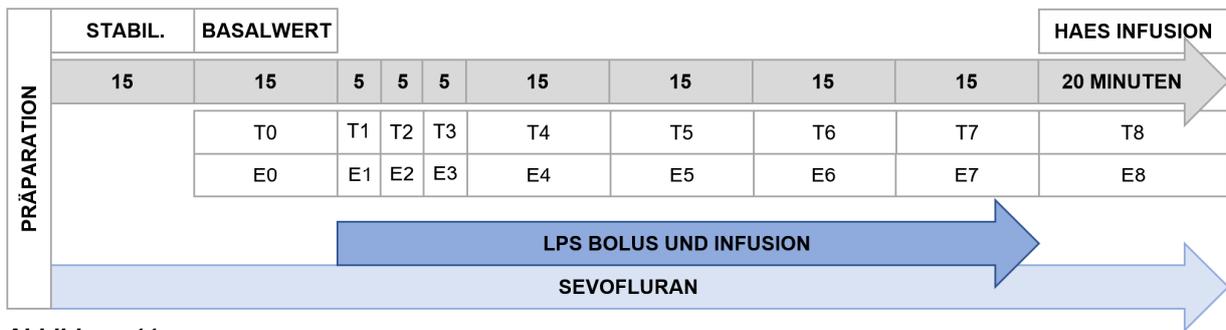
**Abbildung 10**

Versuchsprotokoll Gruppe B (LPS)

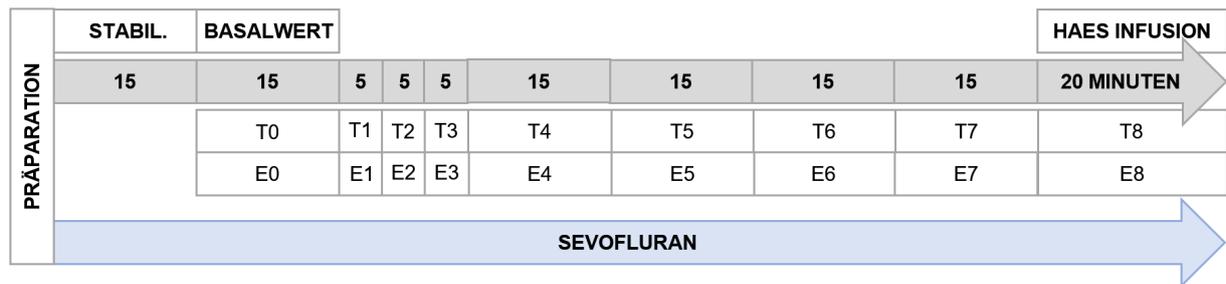
**SEVOFLURAN**

In den Sevoflurangruppen wurde der Puffer von Beginn an über einen kalibrierten Verdampfer (Vapor 19.3, Draeger, Deutschland) mit 2 Vol% Sevofluran begast. Ein kontinuierliches Messen der Zielkonzentration erfolgte durch einen Atemgasmonitor (Capnomax Ultima, Datex, Helsinki, Finnland). Die Versuche begannen erst mit Erreichen der Zielkonzentration. Die Beimischung von Sevofluran wurde über das gesamte Versuchsprotokoll hinweg fortgesetzt. Dadurch sollten prä- und postkonditionierende Mechanismen induziert werden. De Hert et al. zeigten bei herzchirurgischen Bypasseingriffen, dass die kontinuierliche Gabe von Sevofluran im Vergleich zu Prä- oder Postkonditionierung allein über synergistische Effekte den besten protektiven Effekt hatte (De Hert et al., 2004).

Die Sevofluranapplikation betraf die Gruppen C (LPS + Sevofluran, n = 6), D (Sevoflurankontrolle, n = 6) und G (Heparinase + LPS + Sevofluran).



**Abbildung 11**  
Versuchsprotokoll Gruppe C (LPS + Sevofluran)

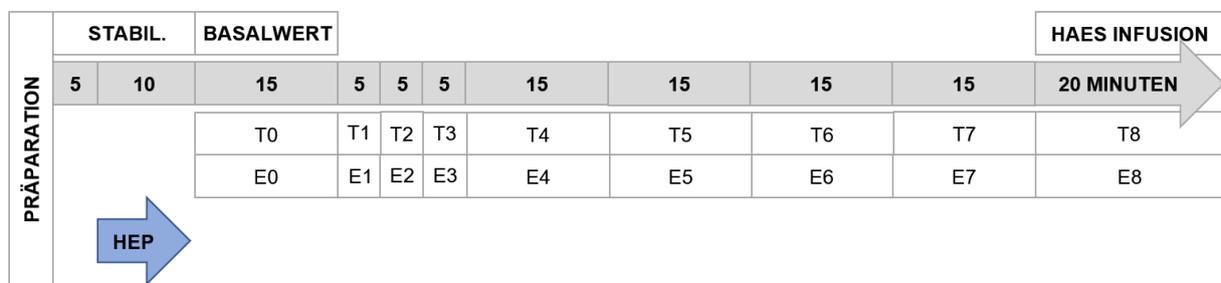


**Abbildung 12**  
Versuchsprotokoll Gruppe D (Sevoflurankontrolle)

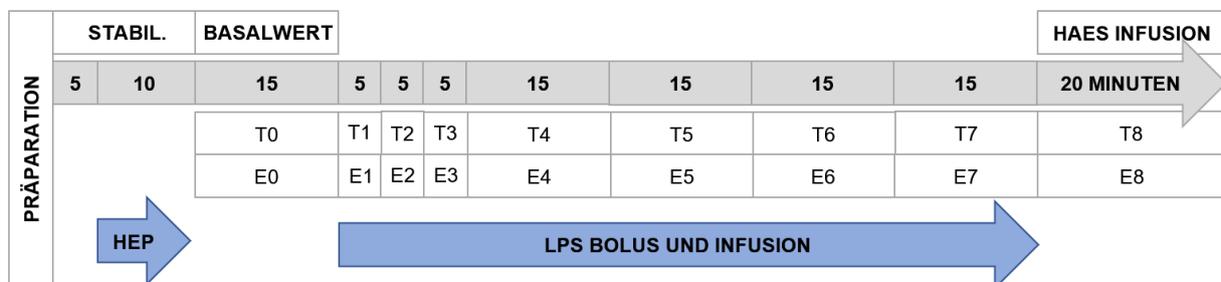
**ZUSATZVERSUCHE MIT HEPARINASE**

Heparinase ist das bakterielle Äquivalent zur mastzelleigenen Heparanase. Es kennzeichnet sich durch ein selektives Shedding von Heparansulfat aus (Chappell et al., 2008c). Durch Vorbehandlung der Herzen mit Heparinase wird ein Endothelmodell geschaffen, in welchem die Glykokalyx bereits im Vorfeld geschädigt ist.

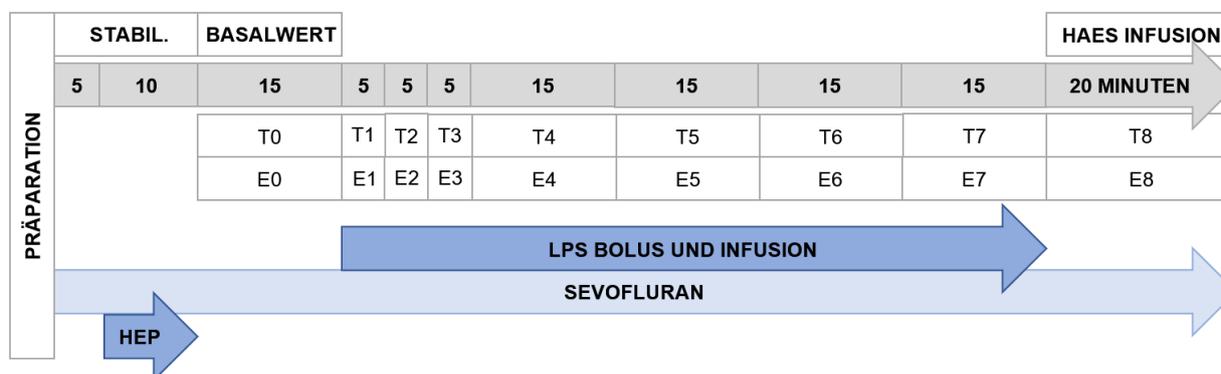
Nach der Herzpräparation und einer kurzen Stabilisierungsphase wurde das Enzym Heparinase (Heparinase Typ I, Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland) über einen Zeitraum von 10 Minuten vor Messung der Basalwerte in einer Dosierung von 10 U/ml herznah in die Perfusionslösung infundiert. Das weitere Vorgehen verlief identisch zu den Versuchsgruppen A bis C. Damit ergeben sich die Versuchsgruppen E (Heparinasekontrolle, n = 5), F (Heparinase + LPS, n = 6) und G (Heparinase + LPS + Sevofluran, n = 6).



**Abbildung 13**  
Versuchsprotokoll Gruppe E (Heparinasekontrolle)



**Abbildung 14**  
Versuchsprotokoll Gruppe F (Heparinase + LPS), HEP = Heparinase



**Abbildung 15**  
Versuchsprotokoll Gruppe G (Heparinase + LPS + Sevofluran), HEP = Heparinase

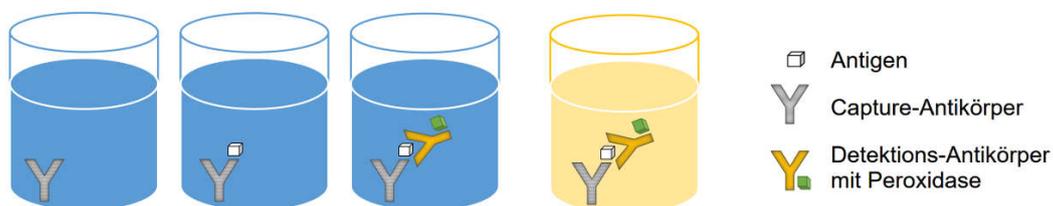
## 2.2 BESTIMMUNG VON GLYKOKALYXBESTANDTEILEN

Syndekan-1, Heparansulfat und Hyaluronsäure wurden als Bestandteile der endothelialen Glykokalyx im koronaren Effluat gemessen. Die hierfür notwendigen ELISA Analysen erfolgten durch das anästhesiologische Forschungslabor der Klinik der Universität München Großhadern.

Für jeden Versuch wurde das Gemisch der Effluate der Messzeitpunkte E1-E4 untersucht. Aufgrund der erwartungsgemäß niedrigen Konzentrationen der Glykokalyxbestandteile mussten die Proben zunächst konzentriert werden. Zu diesem Zweck wurden 4 ml der kombinierten Effluate mit 10 kDa Ultrafiltern (Millipore, Carrigtwohill, Irland) über 45 Minuten zentrifugiert.

Der ELISA Assay (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) ist ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren, das mit einer Farbreaktion gekoppelt ist. Diese Farbreaktion kann photometrisch quantifiziert werden und ermöglicht über das Lambert-Beersche-Gesetz (siehe 2.4.2) Rückschlüsse auf die Substanzkonzentration.

Die Methode der Sandwich ELISA kommt beim Nachweis für Syndekan-1 (Diacclone, Besancon, Frankreich) und Heparansulfat (Seikagaku Corporation, Tokyo, Japan) zum Einsatz. Dabei wird das gesuchte Antigen zwischen zwei Lagen von Antikörpern gebunden. Durch die doppelte Antikörperbindung ist diese Messung sehr sensibel und spezifisch für das Antigen. Geringe Konzentrationen können bestimmt werden und die Proben müssen präanalytisch nicht aufgereinigt werden.

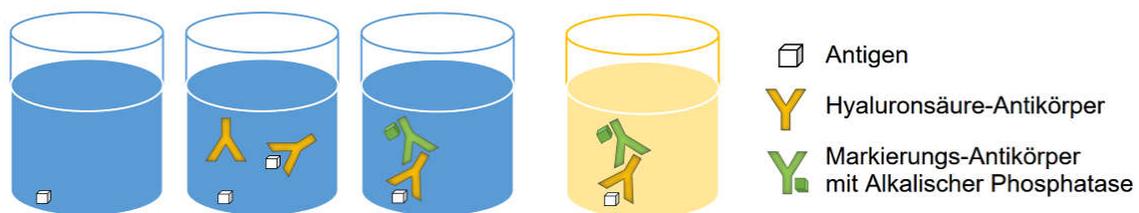


**Abbildung 16**  
Sandwich ELISA, [modifiziert nach (Bio-Rad Laboratories, 2018)]

Proben und Standards wurden auf eine mit dem Antikörper B-B4 beschichtete Mikrotiterplatte pipettiert. B-B4 bindet spezifisch Syndekan-1. Als nächstes wurde der biotinylierte Detektionsantikörper B-D30 zugegeben und mit Streptavidin-Meerrettichperoxidase markiert. Dieses Enzym startet mit dem Chromogen Tetramethylbenzidin die Farbreaktion. Die resultierende Farbintensität ist direkt proportional zur Syndekan-1 Konzentration. Nach Beenden der Reaktion mit Schwefelsäure ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) wird die Absorption photometrisch bei 450 nm gemessen (Varian Cary 100 Bio, Melbourne, Australien). Anhand einer Standardkurve konnten Syndekan-1 Konzentrationen ermittelt werden.

Die Heparansulfatmessung verlief analog dazu mit zwei spezifischen monoklonalen Antikörpern. Der Herstellerempfehlung entsprechend war zusätzlich eine Aufbereitung mit einer Proteinase (Aktinase E) notwendig. Dies sollte Kreuzreaktionen mit Serumproteinen minimieren.

Hyaluronsäure wurde mit einem kompetitiven ELISA nachgewiesen (Echelon, Salt Lake City, USA). Hierbei mussten die Proben mit einem Hyaluronsäure-Antikörper gemischt werden. Die ELISA Mikrotiterplatte ist mit Hyaluronsäure beschichtet. Bei Zugabe der Antikörperprobenmischung können nur die ungebundenen Antikörper an die Hyaluronsäure der Platte binden. Daraus ergibt sich das Prinzip der kompetitiven ELISA. Ein zweiter Antikörper, der mit dem Enzym Alkalische Phosphatase konjugiert ist, markiert im nächsten Schritt den an die Platte gebundenen Hyaluronsäure-Antikörper. Die Farbreaktion beginnt nach Addition des Chromogens pNPP (p-Nitrophenylphosphat). Das Farbsignal ist dabei umgekehrt proportional zur Hyaluronmenge der Probe. Es folgte das Beenden der Reaktion mit Säure, die photometrische Absorptionsmessung bei 405 nm und die Ermittlung der Hyaluronsäurekonzentrationen mithilfe einer Standardkurve.



**Abbildung 17**  
Kompetitive ELISA, [modifiziert nach (Bio-Rad Laboratories, 2018)]

Nach Herstellerangaben erkennt dieser Assay Hyaluronsäuremoleküle unabhängig von ihrer Größe. Da nur ein Hyaluronsäure-Antikörper verwendet wird, können auch kleinste Moleküle detektiert werden.

### **2.3 BESTIMMUNG HÄMODYNAMISCHER PARAMETER**

Der Koronarfluss wurde kontinuierlich mit einer Ultraschall-Flussmesssonde (T106; Transonic Systems Inc., Ithaca, NY) erfasst. Im vorliegenden druckkonstanten Perfusionsmodell erlauben Veränderungen des Koronarflusses Rückschlüsse auf die Vasoreaktivität.

### **2.4 BESTIMMUNG DER GEFÄßPERMEABILITÄT**

#### **2.4.1 TRANSSUDAT/ EFFLUAT VERHÄLTNIS**

Die Transsudatmenge ist in Abhängigkeit vom Koronarfluss Indikator der Gefäßpermeabilität. Dies wird im Transsudat/Effluat Verhältnis erfasst. Effekte von Lipopolysaccharid, Sevofluran und Heparinase auf die Gefäßpermeabilität können so untersucht werden. Darüber hinaus gibt das Transsudat/Effluat Verhältnis der Kontrollgruppe Aufschluss über eine möglicherweise durch das Versuchsmodell bzw. Perfusat verursachte Permeabilitätsstörung.

#### **2.4.2 HYDROXYETHYLSTÄRKE (HAES)**

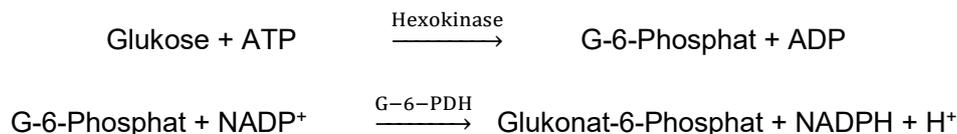
Das künstliche Plasmaersatzmittel Hydroxyethylstärke ist strukturell ein Abkömmling des Amylopektins. Dieses ist Hauptbestandteil von Stärke und ein mit Glykogen verwandtes verzweigt-kettiges Glukosepolysaccharid. Durch die Substitution von Hydroxyethylgruppen an den Hydroxygruppen der Glukosereste wird der Abbau durch Amylasen verzögert und die Wasserbindungsfähigkeit um ein Vielfaches erhöht (Forster, Wicarkzyk & Dudziak, 1981).

Die Integrität der Glykokalyx ist Voraussetzung einer intakten Gefäßschranke. Damit ist die Glykokalyx auch Barriere für Kolloide wie Hydroxyethylstärke. Der Volumeneffekt von Hydroxyethylstärke beruht auf dieser Impermeabilität. Kommt es zu einer Schädigung der Glykokalyx, kann mehr Hydroxyethylstärke die Gefäßbarriere überwinden und ins Interstitium gelangen (Rehm et al., 2004).

Zur Bestimmung der Hydroxyethylstärkekonzentrationen in Transsudat und Effluat wurde die Methode von Forster (Forster et al., 1981) modifiziert nach Rehm (Rehm et al., 2004) auf Basis der Glukosebestimmung nach Schmidt (Schmidt, 1961) angewendet.

Zunächst wurden die Proben mit Kalilauge aufgereinigt. Dazu wurden 0,5 ml der Proben mit 0,25 ml einer 35-prozentigen Kalilauge (KOH 35%) vortexgemischt und über 45 Minuten in einem Heißblock bei 100°C inkubiert. Durch diese alkalische Vorbehandlung werden Monosaccharide und Proteine der Probe zerstört, sodass nur die zu analysierenden Polysaccharide in der Probe verbleiben. Nach Abkühlen der Proben wurden 7,5 ml von 100-prozentigem Ethanol zugegeben,

mit den Proben vermischt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Durch den hochprozentigen Alkohol kommt es zur Ausfällung der Polysaccharide in der Probe. Dieser Niederschlag wurde bei 4°C über eine Stunde bei 3500 rpm (Heraeus Zentrifuge 3.0R, Hanau, Deutschland) abzentrifugiert. Die Proben wurden dekantiert, der Überstand verworfen. Den verbleibenden Polysaccharid Pellets wurden 2,5 ml einer 2-molaren Salzsäure (HCl 2M) zugefügt. Diese Mischung wurde über 120 Minuten in einem Heißblock bei 100°C inkubiert. Bei dieser Reaktion kommt es durch die Salzsäure zu einer Hydrolyse der Polysaccharide zu Glukose. Das abgekühlte Hydrolysat wurde mit 2,5 ml 2-molarer NaOH in 10 ml Glaskölbchen überführt. Die Pellettröhrchen wurden mit destilliertem Wasser gespült, mit welchem die Glaskölbchen anschließend zu 10ml aufgefüllt wurden. Für die Glukosebestimmung wurde zuerst insgesamt 0,5 ml der hydrolysierten Probe in eine Küvette umgefüllt. Nach Zugabe von 2 ml der Gluco-quant I Lösung (TRIS Puffer/ ATP/ NADP) (Boehringer, Mannheim, Deutschland) wurde die Referenz-Extinktion der Probe (E1) mit dem Spektrophotometer (Varian Cary 100 Bio, Melbourne, Australien) bei 340nm gemessen. Dann wurde die Glukosereaktion durch Zugabe von 0,04 ml der Gluco-quant II Lösung (Hexokinase/Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, Boehringer, Mannheim, Deutschland) gestartet.



Hexokinase katalysiert die Phosphorylierung von Glukose zu Glukose-6-Phosphat durch ATP. Im nächsten Schritt der Reaktion wird Glukose-6-Phosphat mit NADP<sup>+</sup> durch Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase zu Glukonat-6-Phosphat, NADPH und H<sup>+</sup> oxidiert. Die Bildung von NADPH ist dabei direkt proportional zur Glukosekonzentration und kann photometrisch bestimmt werden. Dafür wurde nach 10 Minuten bei 340 nm die Extinktion (E2) gemessen. Die photometrische Messung beruht auf dem Lambert-Beerschen-Gesetz, wonach die Extinktion E von Strahlung durch eine absorbierende Substanz von der Konzentration c der Substanz abhängt.

$$E = c d \varepsilon \quad \text{mit Extinktionskoeffizient } \varepsilon \text{ und Küvettendicke } d$$

Damit ist  $\Delta E = E2 - E1$  proportional zur NADPH-Konzentration und folglich zur Glukose- bzw. Hydroxyethylstärkekonzentration. Die Berechnung der Hydroxyethylstärkekonzentration erfolgte mit Hilfe von zwei Standardproben mit Konzentrationen von jeweils 1,2 g/dl und 2,4 g/dl.

$$c(\text{Probe}) = f * \Delta E(\text{Probe}) \quad \text{mit } f = \frac{c(\text{Standard})}{\Delta E(\text{Standard})}$$

## 2.5 BESTIMMUNG VON METABOLITEN

### 2.5.1 HISTAMIN

Durch die Messung der Histaminkonzentrationen im Transsudat sollte eine mögliche Aktivierung von Gewebsmastzellen erkannt werden. Der dafür verwendete Enzym Immunoassay (Spi-Bio, Montigny le Bretonneux, Frankreich) ist eine antikörperbasierte kompetitive Nachweismethode. Als erstes wurde das Histamin der Proben in ein Histaminderivat umgewandelt. Dieses hat eine höhere Affinität zum Histamin-Antikörper und erhöht so die Sensitivität des Assays. Die Mikrotiterplatte ist mit diesem Histamin-Antikörper beschichtet. An Acetylcholinesterase gebundenes Histamin und die behandelten Proben wurden auf die Mikrotiterplatte gegeben. Umso mehr Histamin die Proben enthalten, umso weniger Acetylcholinesterase-gebundenes Histamin kann an die Platte binden. Dies konnte durch das Chromogen DTNB (Ellmans Reagenz) und dessen Farbumschlag quantifiziert und photometrisch bei 412 nm gemessen werden. Die Konzentrationen wurden anhand einer Standardkurve bestimmt.

### 2.5.2 LAKTAT, PURINE, HARNSÄURE

Die HPLC Analysen zur Messung der Laktat-, Harnsäure-, und Purinkonzentrationen wurden durch das Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin des Klinikums der Universität München unter Leitung von Prof. Dr. med. Ulrich Pohl zusammengestellt.

Das im anaeroben Stoffwechsel anfallende Laktat ist Hinweis auf das Ausmaß der Sauerstoffunterversorgung.

Purine sind Abbauprodukte von energiereichen Nukleotiden bzw. Nucleosiden. Die anfallenden Purine korrelieren mit dem Energieverbrauch einer Zelle. Harnsäure ist das Endprodukt dieses Purinstoffwechsels. Bei oxidativem Stress sinkt die Harnsäurekonzentration, da Harnsäure als Antioxidans verbraucht wird. Ein hoher Purin/Harnsäure Quotient signalisiert somit oxidativen Stress (Becker, 1993). Sowohl Purine als auch Harnsäure werden darüber hinaus bei Zellerfall freigesetzt und können als DAMP (Damage-Associated-Molecular-Pattern) proinflammatorisch wirken (Bianchi, 2007; van Golen, Reiniers, Olthof, van Gulik & Heger, 2013).

Bei der HPLC (High Performance Liquid Chromatography) werden Komponenten einer Mischung in einer biphasischen Trennsäule voneinander isoliert. Die stationäre Phase der Trennsäule besteht aus festen Teilchen. Die mobile Phase ist flüssig und wird mit einer Hochdruckpumpe gegen den Widerstand der stationären Phase über die Trennsäule gepresst. Je geringer das Ausmaß der Wechselwirkung zwischen stationärer Phase und Substanz, desto schneller tritt jene in die mobile Phase über. Auf dieser Interaktion beruht der Trenneffekt der Chromatographie. Die

Substanzen werden dann photometrisch über ihre UV-Licht Absorption detektiert. Das erhaltene Chromatogramm lässt über die Position der Spitzen auf die Substanz und über die Fläche der Spitzen auf die Konzentration der Stoffe schließen.

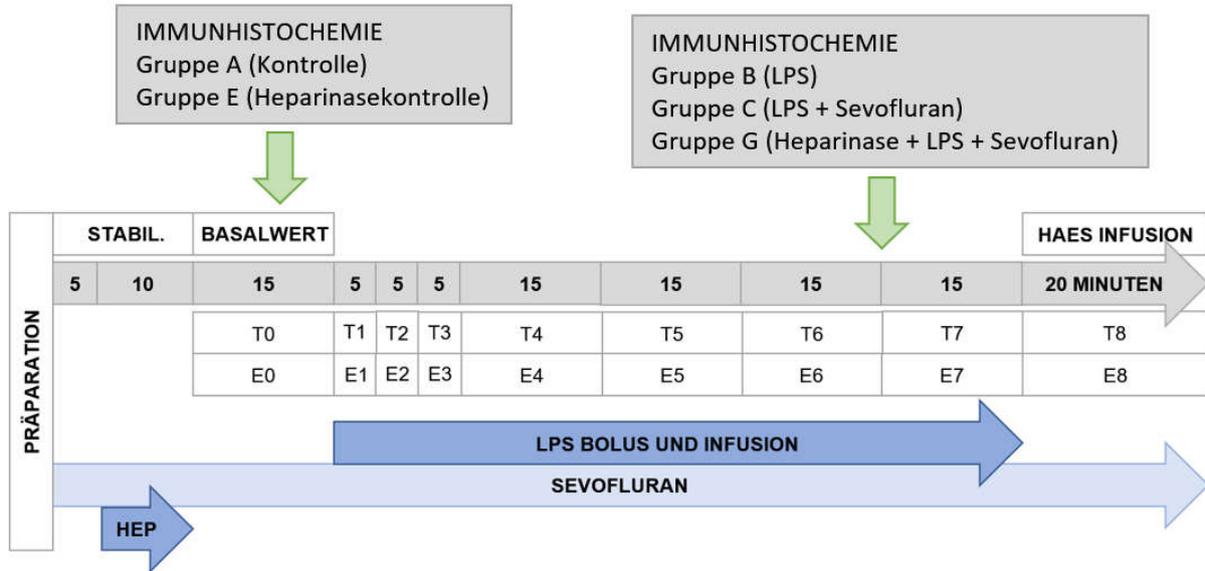
Für die Laktatbestimmung wurden 10 µl einer Effluatprobe zur stationären Phase (Kieselgel Nucleosil 100-5 NH<sub>2</sub>, Macherey-Nagel, Dueren, Deutschland) mit einer Partikelgröße von 5 µm und Porenweite von 10 nm gegeben. Ammoniumdihydrogenphosphat (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10mM, pH 3,5) diente als mobile Phase. Laktat wurde nach seinem UV-Absorptionsspektrum bei 210 nm photometrisch registriert.

Die Harnsäurebestimmung verlief analog mit Kieselgel als stationäre Phase (Nucleosil 100-5 C<sub>18</sub>, Partikelgröße 5 µm, Porenweite 10 nm, Macherey-Nagel, Dueren, Deutschland). Die mobile Phase war hier ein Gemisch aus Perchlorsäure (HClO<sub>4</sub>, pH 2) und Methanol (60%) in einem Verhältnis von 9:1. Die UV-Absorptionsmessung erfolgte bei 280 nm.

Alle Purine wurden zunächst enzymatisch zu Harnsäure konvertiert. Die Harnsäurekonzentrationen wurden wie beschrieben gemessen. Die Purinkonzentration ergab sich nach Abzug der Harnsäurekonzentration der jeweiligen Probe vor Konversion.

**2.6 IMMUNHISTOCHEMIE**

Die Fixierungen und Aufnahmen der Immunhistochemie wurden in Zusammenarbeit mit dem anatomischen Institut der LMU München unter Leitung von Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Ulrich Welsch durchgeführt.



**Abbildung 18**  
Zeitpunkte der immunhistochemischen Fixierung

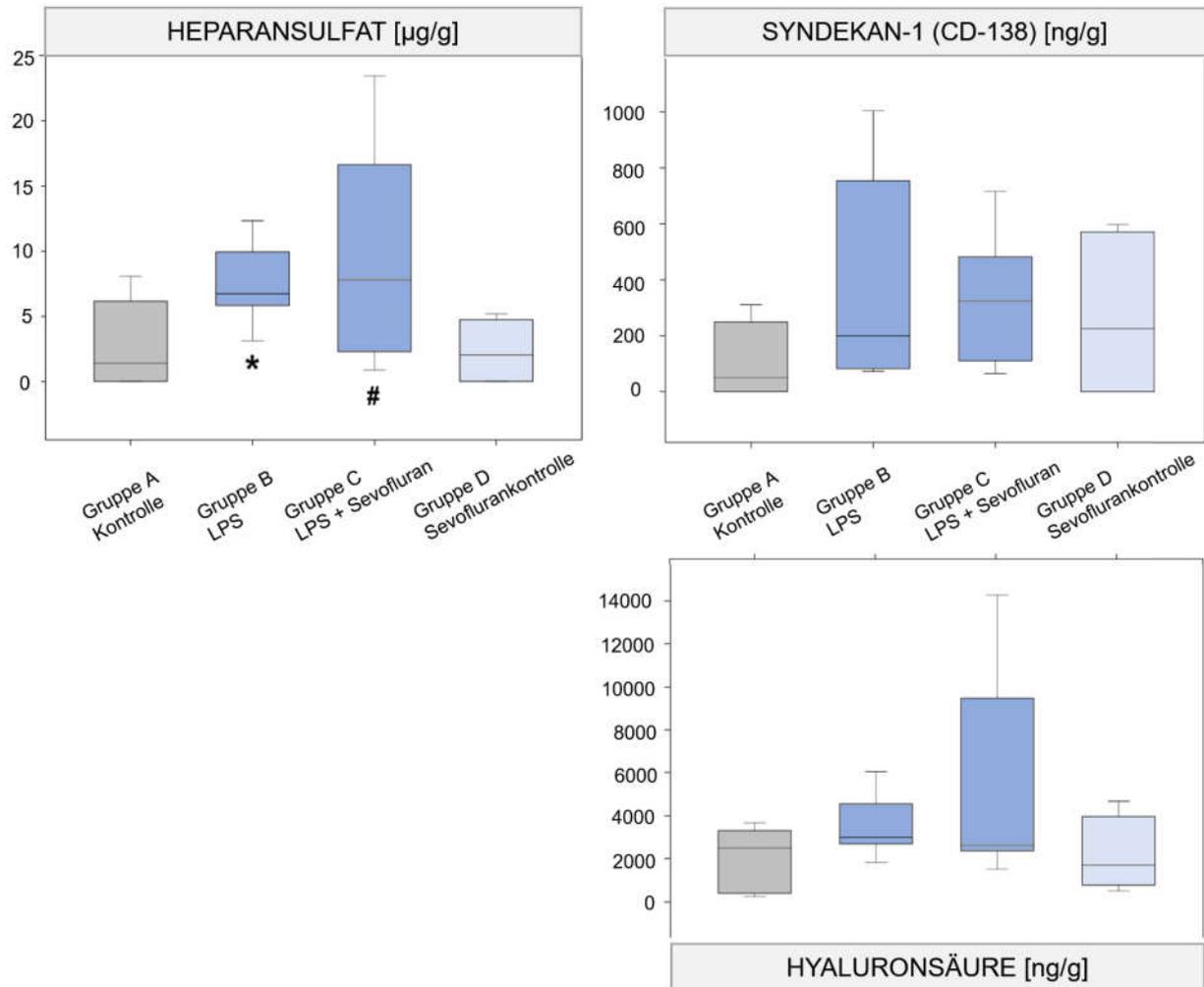
Zu definierten Zeitpunkten (siehe Abbildung 18) des Versuchsprotokolles wurden Herzen unterschiedlicher Versuchsgruppen für die immunhistochemische Analyse fixiert. Dafür wurde der Perfusionslösung Formalin mit einer resultierenden Gesamtkonzentration von 4% beigemischt. Nach der Fixierung wurden die Herzen aus dem Langendorff Apparat entfernt, in drei Scheiben geteilt und über 24 Stunden in einer 1%igen Formaldehydlösung aufbewahrt. Die Proben wurden in Paraffin eingebettet, in 5 µm dicke Schichten geschnitten und immunhistochemisch mit einem Lipid A - Antikörper (ab20001, Abcam, Cambridge, UK) gefärbt. Dieser primäre polyklonale Ziegen-Antikörper gegen das Lipid A des bakteriellen Lipopolysaccharids wurde in einer Verdünnung von 1:150 über eine Reaktionszeit von einer Stunde verwendet. Als sekundärer Antikörper diente ein Kaninchen Anti-Ziegen Antikörper (Abcam, Cambridge, UK).

## 2.7 STATISTISCHE METHODEN

Für die statistischen Auswertungen wurde das Programm SigmaStat (Systat Software, Richmond, Virginia, USA) verwendet. Bisherige Versuche am isolierten Meerschweinchenherzen zeigten, dass statistisch signifikante Effekte bereits ab einer Anzahl von  $n = 5$  Versuchen pro Versuchsgruppe gemessen werden können. Aufgrund der kleinen Stichprobengröße wurde keine Normalverteilung angenommen. Eine Analyse von Unterschieden von mehr als drei Versuchsgruppen zu einem bestimmten Versuchszeitpunkt erfolgte mittels unidirektionaler Kruskal-Wallis-ANOVA. Dieser wurde mit einem Student-Newman-Keul-Test oder Bonferroni-Test ergänzt. Vergleiche von zwei Gruppen zu einem bestimmten Zeitpunkt erfolgten durch den Mann-Whitney-Rank-Sum-Test. Zwei unterschiedliche Versuchszeitpunkte innerhalb derselben Versuchsgruppe wurden ebenfalls mit Hilfe eines Mann-Whitney-Rank-Sum-Testes verglichen. Die Friedman-Repeated-Measures-ANOVA suchte relevante Veränderungen im Verlauf der Versuchsdauer. Angegeben sind Medianwerte mit Interquartilsabstand. Ab einem  $p < 0,05$  wurden Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen als signifikant eingestuft.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 GLYKOKALYXBESTANDTEILE



**Abbildung 19**

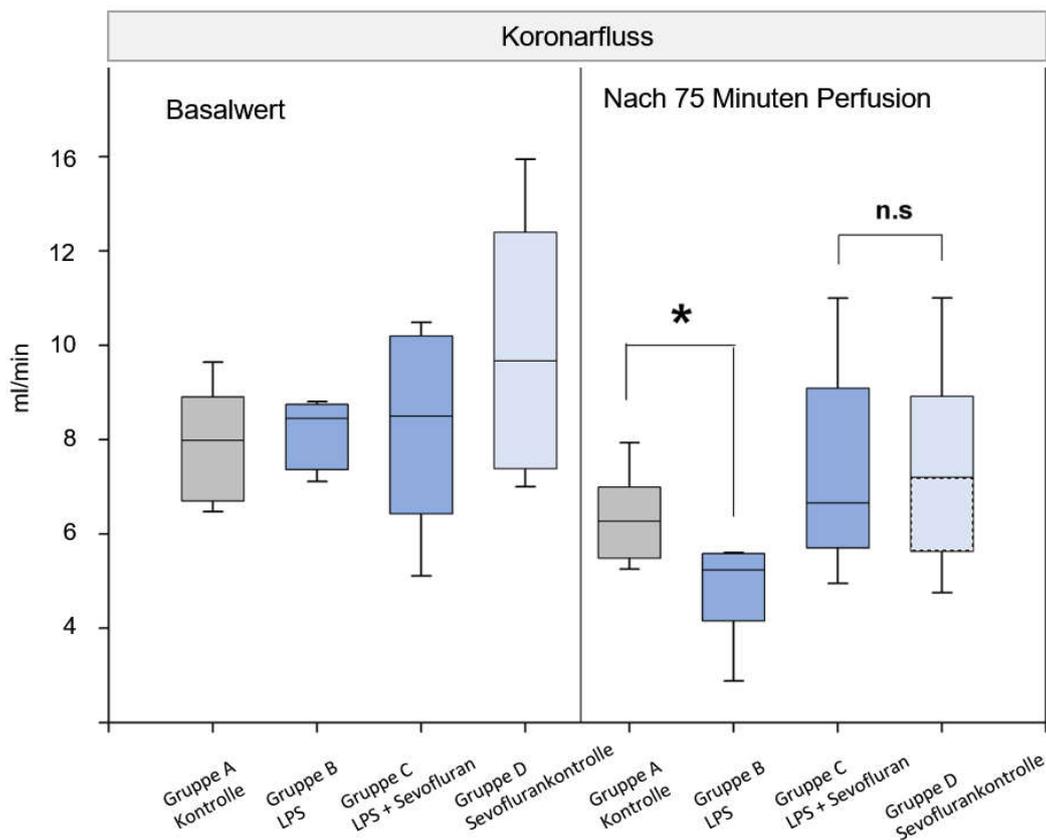
Sheddingdaten von Heparansulfat, Syndekan-1 (CD-138) und Hyaluronsäure pro Gramm Trockengewicht im Koronareffluat über 30min Perfusion in den jeweiligen gewerteten Versuchsgruppen. Daten sind als Mediane, Interquartilsabstand (Boxen) und Gesamtbereich angegeben;  $n = 6$  für die Gruppen A und D und  $n = 8$  für die Gruppen B und C.

Für Heparansulfat gilt: \*  $p < 0,05$  Gruppe A (Kontrolle) versus Gruppe B (LPS) und #  $p < 0,05$  Gruppe C (LPS + Sevofluran) versus Gruppe D (Sevoflurankontrolle). Es waren keine signifikanten Unterschiede des Syndekan- und Hyaluronsäuresheddings zwischen den Gruppen messbar.

Die über 30 Minuten Perfusion akkumulierte Freisetzung von Heparansulfat, Syndekan-1 und Hyaluronsäure wurde im Koronareffluat der einzelnen Versuche untersucht. Die Ergebnisse sind auf das Trockengewicht der Herzen bezogen und als Mediane mit 1. und 3. Quartile der jeweiligen Versuchsgruppen angegeben. In diesem Zeitraum konnte durch Lipopolysaccharid nur für Heparansulfat ein im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöhtes Shedding nachgewiesen werden mit \*  $p < 0,05$  für Gruppe A (Kontrolle) versus Gruppe B (LPS). Diese im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöhte Abgabe von Heparansulfat nach Lipopolysaccharid war auch in

Kombination mit Sevofluran zu beobachten mit #  $p < 0,05$  für Gruppe C (LPS + Sevofluran) versus Gruppe D (Sevoflurankontrolle). Lipopolysaccharid führte im Vergleich zur Kontrolle nicht zu einem signifikanten Abbau von Syndekan-1 oder Hyaluronsäure.

### 3.2 HÄMODYNAMISCHE PARAMETER



**Abbildung 20**

Koronarfluss in ml/min der jeweiligen Versuchsgruppen zu Beginn und nach 75 Minuten Perfusion. Daten sind als Mediane, Interquartilsabstand (Boxen) und Gesamtbereich angegeben;  $n = 6$  für alle Gruppen.

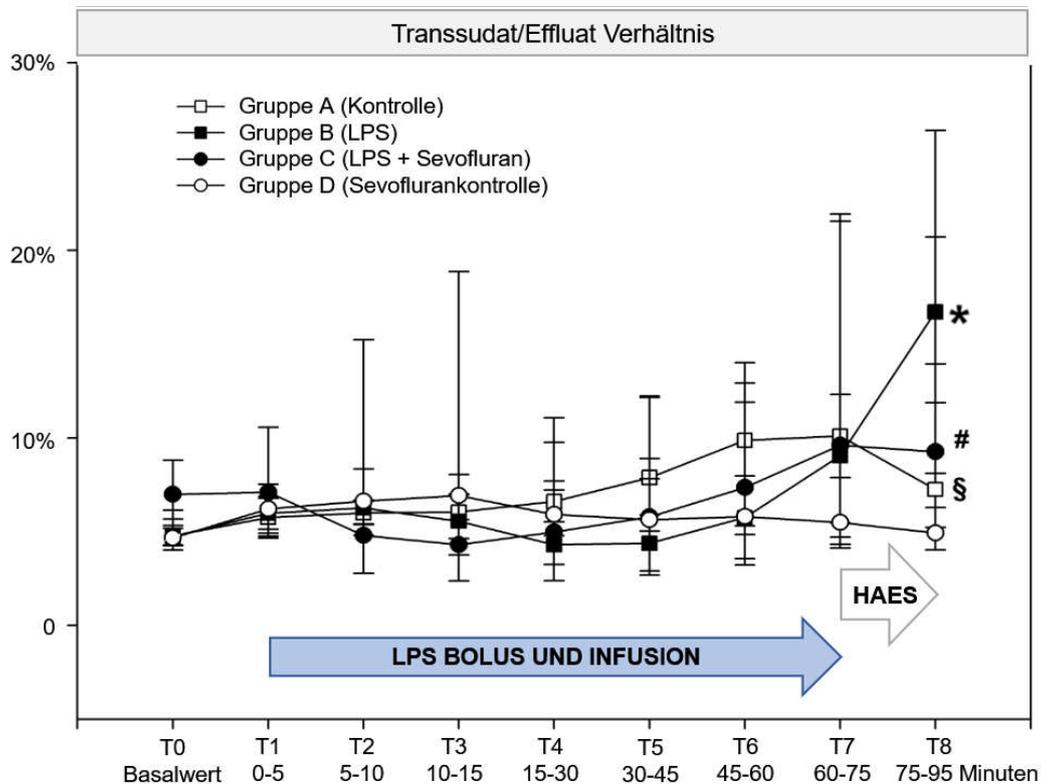
\*  $p < 0,05$  Gruppe A (Kontrolle) versus Gruppe B (LPS),

Die Flussmessung nach 75 Minuten Perfusion ergab in der LPS-Gruppe eine deutliche Reduktion des Koronarflusses im Vergleich zur Kontrollgruppe mit \*  $p > 0,05$  für Gruppe A (Kontrolle) versus Gruppe B (LPS). Die Abnahme des Flusses entspricht in diesem druckkonstanten Modell einer Vasokonstriktion.

Diese vasokonstriktorische Wirkung von Lipopolysaccharid wurde durch Sevofluran aufgehoben. Zwischen den Koronarflüssen der Sevoflurangruppen (Gruppen C und D) bestand kein signifikanter Unterschied.

### 3.3 GEFÄßPERMEABILITÄT

#### 3.3.1 TRANSSUDAT/EFFLUAT VERHÄLTNIS



**Abbildung 21**

Filtration im Verlaufe des Versuchsprotokolles angegeben über das Transsudat/Effluat Verhältnis der jeweiligen Versuchsgruppen. Daten sind als Mediane und Interquartilsabstand angegeben;  $n = 6$  für alle Gruppen. Erst durch Zugabe des Kolloids HAES waren signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen nachweisbar:

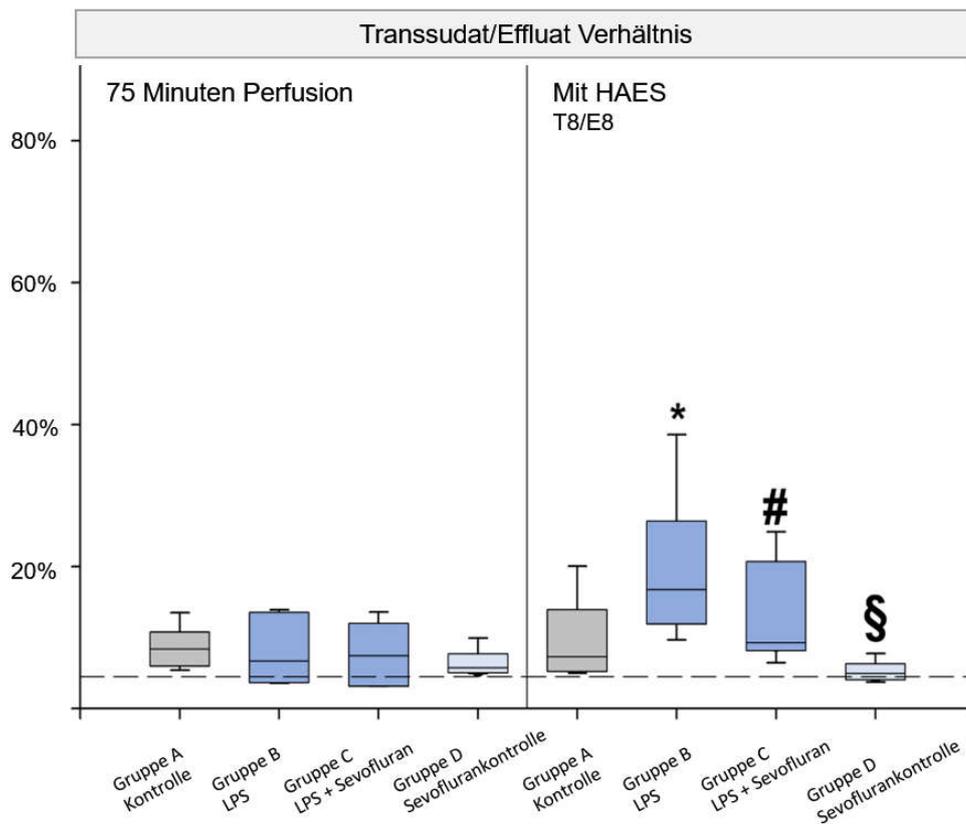
\*  $p < 0,05$  Gruppe B (LPS) versus Gruppe A (Kontrolle),  
versus Gruppe C (LPS + Sevofluran) und  
versus Gruppe D (Sevoflurankontrolle)

#  $p < 0,05$  Gruppe C (LPS + Sevofluran) versus Gruppe D (Sevoflurankontrolle)

§  $p < 0,05$  Gruppe D (Sevoflurankontrolle) versus Gruppe A (Kontrolle)

In den Kontrollgruppen A und D war im Verlaufe des Versuchsprotokolles trotz insgesamt 125 Minuten Perfusion keine relevante Zunahme des Gewebeödems zu erheben.

Wie die Daten in Abbildungen 21 und 22 zeigen, konnte während der 75-minütigen Perfusion mit kristalloider Lösung in keiner Gruppe eine Steigerung der Flüssigkeitsextravasation nachgewiesen werden. Alle Gruppen blieben auf dem Niveau der Kontrollgruppe. Erst mit Zugabe des Kolloids HAES kam es in den Lipopolysaccharidgruppen (Gruppen B und C) im Vergleich zu den Kontrollgruppen (Gruppen A und D) zur signifikanten Extravasation ins Interstitium, mit einem \*  $p < 0,05$  für Gruppe B (LPS) versus Gruppe A (Kontrolle) und für Gruppe B (LPS) versus Gruppe D (Sevoflurankontrolle) sowie #  $p < 0,05$  für Gruppe C (LPS + Sevofluran) versus Gruppe D (Sevoflurankontrolle). Das Transsudat betrug in der Lipopolysaccharidgruppe bis zu maximal 38 % der Effluatmenge (siehe Abbildungen 21 und 22).



**Abbildung 22**

Filtration, angegeben über das kumulierte Transsudat/Effluat Verhältnis während 75 Minuten Perfusion oder mit HAES Infusion (T8/E8) der jeweiligen Versuchsgruppen. Daten sind als Mediane, Interquartilsabstand (Boxen) und Gesamtbereich angegeben; n = 6 für alle Gruppen. Die gestrichelte Linie repräsentiert den medianen Basalwert des Transsudat/Effluat Verhältnisses aller Herzen (T0/E0).

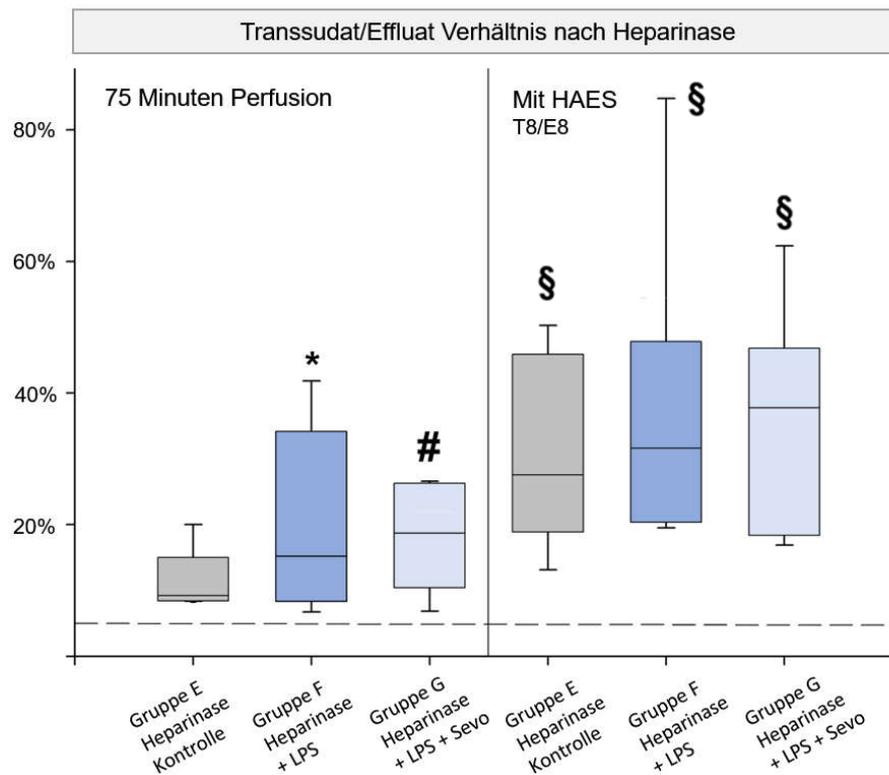
\*  $p < 0,05$  Gruppe B (LPS) versus Gruppe A (Kontrolle),  
versus Gruppe C (LPS + Sevofluran) und  
versus Gruppe D (Sevoflurankontrolle)

#  $p < 0,05$  Gruppe C (LPS + Sevofluran) versus Gruppe D (Sevoflurankontrolle)

§  $p < 0,05$  Gruppe D (Sevoflurankontrolle) versus Gruppe A (Kontrolle)

Die Sevofluranbeimischung (Gruppe C) schwächte die Lipopolysaccharid-induzierte Extravasation deutlich ab. Es gilt \*  $p < 0,05$  für Gruppe C (LPS + Sevofluran) versus Gruppe B (LPS).

Bereits das Transsudat/Effluat Verhältnis der Kontrollgruppe konnte durch Sevofluran erheblich reduziert werden: §  $p < 0,05$  für Gruppe D (Sevoflurankontrolle) versus Gruppe A (Kontrolle). Die Gefäßpermeabilität der Sevoflurankontrolle verblieb in etwa auf Höhe des medianen Basalwertes aller Herzen (T0/E0).



**Abbildung 23**

Filtration nach Heparinase, angegeben über das kumulierte Transsudat/Effluat Verhältnis während 75 Minuten Perfusion oder mit HAES Infusion (T8/E8) der jeweiligen Versuchsgruppen.

Daten sind als Mediane, Interquartilsabstand (Boxen) und Gesamtbereich angegeben;  $n = 5$  für die Gruppe E und  $n = 6$  für die Gruppen F und G. Die gestrichelte Linie repräsentiert den medianen Basalwert des Transsudat/Effluat Verhältnisses aller Herzen (T0/E0).

\*  $p < 0,05$  Gruppe F (Heparinase + LPS) versus medianen Basalwert

#  $p < 0,05$  Gruppe G (Heparinase + LPS + Sevofluran) versus medianen Basalwert

§  $p < 0,05$  Gruppen E (Heparinasekontrolle), F (Heparinase + LPS) und G (Heparinase + LPS + Sevofluran) versus medianen Basalwert

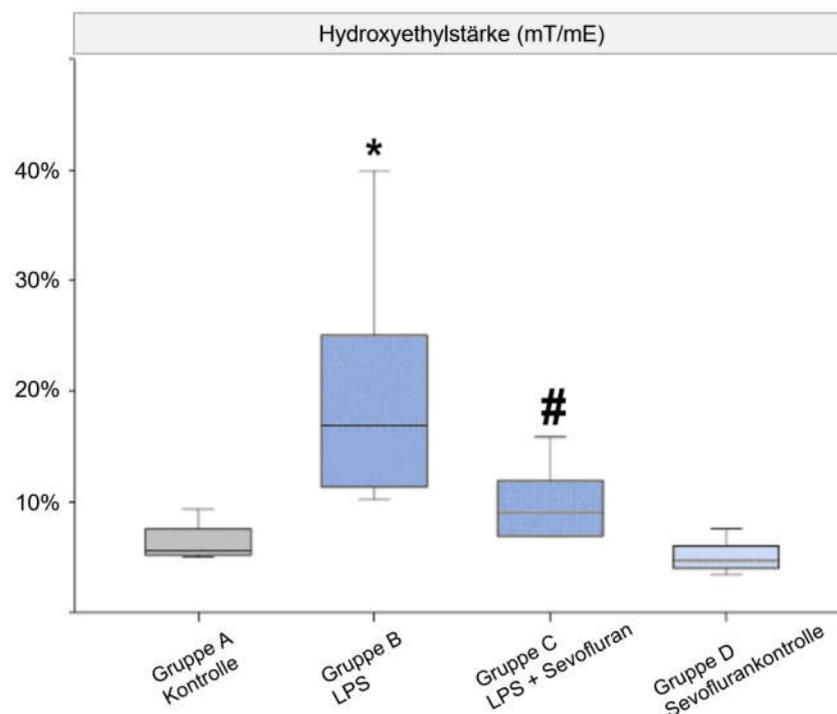
Die Heparinasevorbereitung selbst (Gruppe E) führte während der 75 Minuten Flüssigkeitsperfusion nicht zu einer relevanten Steigerung der Permeabilität. Das Transsudat/Effluat Verhältnis war nahe am medianen Basalwert aller Herzen.

Das kapilläre Leck durch Lipopolysaccharid war nach Heparinasegabe während der HAES-Infusion nicht nur vorhanden (Gruppen F und G), sondern schon während der 75 Minuten Flüssigkeitsperfusion zu sehen. Die Steigerung der Permeabilität durch Lipopolysaccharid fiel nach Heparinasevorbereitung damit ausgeprägter aus als in den Gruppen B (LPS) und C (LPS + Sevofluran). Beide Lipopolysaccharidgruppen hatten in den Heparinase-Zusatzversuchen im Vergleich zum medialen Basalwert signifikant erhöhte Transsudat/Effluat Verhältnisse mit einem \*  $p < 0,05$  für Gruppe F (Heparinase + LPS) versus medialen Basalwert und #  $p < 0,05$  für Gruppe G (Heparinase + LPS + Sevofluran) versus medialen Basalwert.

Die durch Sevofluran verminderte Gefäßpermeabilität nach Lipopolysaccharidinfusion konnte nach Heparinasegabe nicht mehr beobachtet werden. Das Transsudat/Effluat Verhältnis von Gruppe G (Heparinase + LPS + Sevofluran) war im Vergleich zur Gruppe F (Heparinase + LPS) nicht signifikant erniedrigt.

Interessanterweise kam es nach Heparinasebehandlung in Gegenwart von HAES zu einer dramatischen Zunahme der Nettofiltration (Abbildung 23), die durch Lipopolysaccharid nicht weiter gesteigert wurde und durch Applikation von Sevofluran nicht gehemmt werden konnte.

### 3.3.2 HYDROXYETHYLSTÄRKE (HAES)



**Abbildung 24**

Hydroxyethylstärke zum Zeitpunkt T8/E8 als Verhältnis der Mengen im Transsudat und Effluat mT/mE [%].

Daten sind als Mediane, Interquartilsabstand (Boxen) und Gesamtbereich angegeben;

$n = 5$  für die Gruppe A und  $n = 6$  für die Gruppen B, C und D.

\*  $p < 0,05$  Gruppe B (LPS) versus Gruppe A (Kontrolle),  
versus Gruppe C (LPS + Sevofluran) und  
versus Gruppe D (Sevoflurankontrolle)

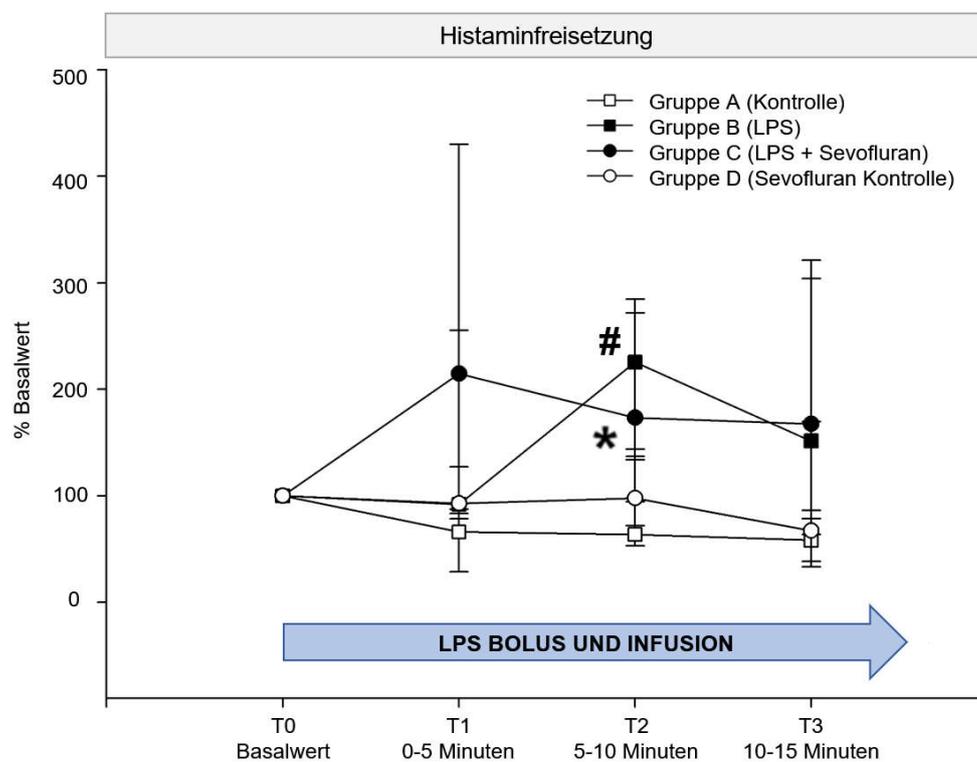
#  $p < 0,05$  Gruppe C (LPS + Sevofluran) versus Gruppe D (Sevoflurankontrolle)

Nur geringe Mengen des Kolloids HAES traten unter Kontrollbedingungen vom Intravasalraum (Effluat) in den interstitiellen Raum (Transsudat) über. Dieses Verhältnis wurde durch Gabe von Lipopolysaccharid dramatisch verschoben, zu hohen Permeabilitätswerten (Abbildung 24). Sevofluran (2 Vol%) vermochte das Leck zu verringern, aber nicht auf Basalwerte zu reduzieren. Die Kolloidextravasation war in den Lipopolysaccharidgruppen erhöht mit \*  $p < 0,05$  für Gruppe B (LPS) im Vergleich zur Gruppe A (Kontrolle) und Gruppe D (Sevoflurankontrolle) sowie mit

#  $p < 0,05$  für Gruppe C (LPS + Sevofluran) versus Gruppe D (Sevoflurankontrolle). Sevofluran verminderte den Lipopolysaccharid-induzierten Übertritt von Hydroxyethylstärke ins Interstitium und damit ins Transsudat: Für Gruppe B (LPS) im Vergleich zu Gruppe C (LPS + Sevofluran) gilt \*  $p < 0,05$ . Die signifikanten Ergebnisse der Hydroxyethylstärkemengen im Transsudat im Verhältnis zum Effluat (T8/E8) sind nahezu identisch zum Resultat der Permeabilitätsmessung anhand des Transsudat/Effluat Verhältnis nach Kolloidgabe (siehe Abbildungen 21 und 22).

### 3.4 METABOLITE

#### 3.4.1 HISTAMIN



**Abbildung 25**

Histaminfreisetzung im Transsudat in Prozent der basalen Histaminmenge. Daten sind als Mediane mit 1. und 3. Quartile angegeben;  $n = 6$  für alle Gruppen.

\*  $p < 0,05$  Gruppe C (LPS + Sevofluran) versus Gruppe A (Kontrolle)

#  $p < 0,05$  Gruppe B (LPS) versus Gruppe A (Kontrolle)

Die Histaminfreisetzung im Transsudat wird als Hinweis auf eine Mastzellaktivierung gewertet. Die gemessenen Histaminkonzentrationen wurden mit der Transsudatmenge multipliziert um die Gesamtmenge der Histaminausschüttung in den jeweiligen Zeitintervallen (T0, T1, T2 und T3) zu erhalten. Ergebnisse sind auf das Trockengewicht der Herzen bezogen und als Mediane mit Interquartilsabstand angegeben. Nach zehn Minuten Lipopolysaccharidinfusion kam es zu einem

signifikanten Anstieg ( $p < 0,05$ ) der Histaminausschüttung in den Lipopolysaccharidgruppen (Gruppen B und C) im Vergleich zu Basalwerten (Gruppe A). Sevofluran konnte diese Wirkung von Lipopolysaccharid nicht abschwächen. Die Histaminwerte in Gruppe C (LPS + Sevofluran) waren nicht relevant niedriger als in Gruppe B (LPS). In den Kontrollgruppen (Gruppen A und D) waren erhöhte Histaminmengen zu keinem Zeitpunkt zu beobachten.

### 3.4.2 LAKTAT, HARNSÄURE, PURINE

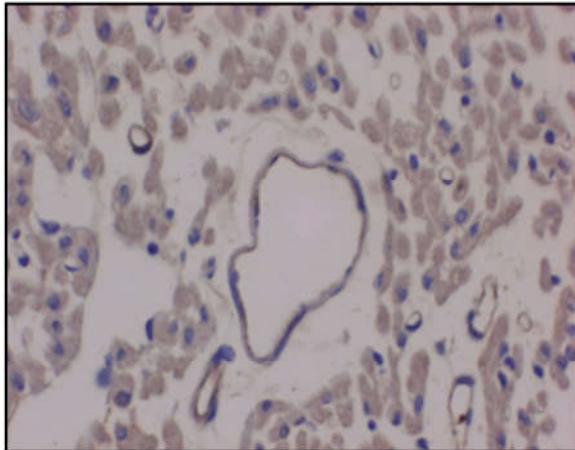
Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Laktatmengen im Effluat zwischen den Versuchsgruppen. Dementsprechend kam es nach Lipopolysaccharidgabe im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht zu einem Laktatanstieg. Gleiches galt für die bestimmten Harnsäure- und Purinmengen. Relevante Unterschiede des Purin/Harnsäure Quotienten im Sinne von oxidativem Stress waren ebensowenig feststellbar.

Metabolitfreisetzung				
GRUPPE PARAMETER	A Kontrolle (n=6)	B LPS (n=6)	C LPS + Sevo (n=6)	D Sevokontrolle (n=5)
Laktat [ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ ]	10,7 (9,5/11,6)	10,8 (10,1/11,3)	6,9 (5,1/10,8)	6,7 (5,4/10,8)
Harnsäure [nmol/min/g]	14,5 (12,2/14,9)	18,8 (17,9/19,8)	18,2 (14,8/21,3)	17,5 (17,1/19,4)
Purine [nmol/min/g]	17,9 (15,9/21,3)	28,6 (25,6/31,1)	17,4 (13,2/28,4)	24,6 (17,5/24,6)
Purin/Harnsäure Quotient	1,4 (1,2/1,5)	1,5 (1,4/1,6)	1,0 (0,8/1,3)	1,2 (0,8/1,4)

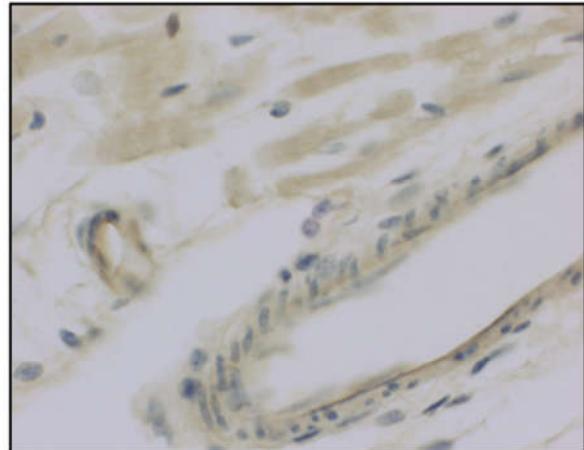
**Tabelle 2**

Metabolitfreisetzung der gewerteten Versuche der Versuchsgruppen über den Zeitraum E1-E5 auf das Trockengewicht bezogen. Daten sind als Mediane (1./3. Quartile) angegeben.

### 3.5 IMMUNHISTOCHEMIE



GRUPPE C  
(LPS + SEVOFLURAN)



GRUPPE G  
(HEPARINASE + LPS + SEVOFLURAN)

**Abbildung 26**

*Exemplarische Immunhistochemie mit Lipid A - Antikörpern an einem Herzen der Gruppe C (LPS + Sevofluran) (600-fache Vergrößerung) und einem Herzen der Gruppe G (Heparinase + LPS + Sevofluran) (1000-fache Vergrößerung)*

In Sevofluran-exponierten Herzen der Gruppen C (LPS + Sevofluran) und F (Heparinase + LPS + Sevofluran) wurde die Lipopolysaccharidausbreitung mittels Antikörpern gegen das Lipid A des Lipopolysaccharids immunhistochemisch untersucht. Ohne Heparinasevorbehandlung blieb Lipopolysaccharid hochkonzentriert als brauner luminaler Saum am Endothel (Gruppe C), genau in dem Bereich, in dem man die Glykokalyx erwarten würde. Wurde die Glykokalyx primär durch Heparinase geschädigt, dann konnte Lipopolysaccharid weiter ins Gewebe vordringen (Gruppe G). Die Kapillaren haben einen verwaschenen Saum und sind kaum noch vom umliegenden Gewebe abgrenzbar.

## 4 DISKUSSION

---

### 4.1 DISKUSSION DER METHODEN

#### 4.1.1 ISOLIERTES LANGENDORFF HERZMODELL

Die erste Beschreibung dieser Technik geht auf Elias Cyon zurück. 1866 entwickelte er unter der Leitung von Carl Ludwig am physiologischen Institut der Universität Leipzig die Präparation des isoliert perfundierten Froschherzens. Frösche sind im Vergleich zu Säugetieren Kaltblüter und haben kein Koronarsystem (Skrzypiec-Spring et al., 2007), sodass das erste isolierte, retrograd perfundierte Säugetierherz von Langendorff 1897 eine bedeutende Weiterentwicklung darstellte. Dieses Modell wurde ausgiebig in der kardialen physiologischen Forschung herangezogen und führte unter anderem zu Erkenntnissen im Bereich des Koronarsystems, der kardialen Elektrophysiologie und Arrhythmieentwicklung sowie zur Entdeckung der Bedeutung von Vor- und Nachlast auf die Herzfunktion. Das grundlegende Prinzip des Langendorff Modells blieb erhalten, auch wenn es heute in modifizierter Form angewendet wird (Gross, 2009).

Was das isolierte Herzmodell von Langendorff so wertvoll macht, ist der vergleichsweise geringe Aufwand der schnell erlernbaren, einfach konzipierten Technik, bei dennoch physiologisch aussagekräftigen, reproduzierbaren Daten. Für die Forschung an der Glykokalyx ist die Arbeit an einem funktionsfähigen Organ mit intakter Gefäßversorgung besonders vorteilhaft. Im Gegensatz zur Zellkultur, bei der die Integrität der Glykokalyx umstritten ist, kann man hier unter physiologischen Bedingungen von einer intakten Glykokalyx ausgehen (Chappell et al., 2009c). Allerdings könnten durch die Präparation des Herzens im Rahmen der Ischämie bis zur Reperfusion Veränderungen der Glykokalyx induziert werden. Um diesen Effekt so gering wie möglich zu halten, wurde auf kurze Präparationszeiten geachtet.

Im Langendorff-Modell lässt sich das Herz isoliert untersuchen. Es unterliegt keiner neuralen oder humoralen Regulation und kann separat ohne den Einfluss anderer Organe betrachtet werden. Interventionen können gezielt auf ihre Wirkung am Herzen analysiert werden. Dieser Vorteil des isolierten Herzens schränkt aber die Übertragbarkeit auf den Gesamtorganismus ein. Dies gilt insbesondere für das septische Krankheitsbild als Multiorganerkrankung. Systemische Konsequenzen einer lokalen endotoxinbedingten Schädigung der Glykokalyx können ebenfalls nicht untersucht werden.

Weitere Limitationen des verwendeten Modells ergeben sich vor allem durch die Zusammensetzung der Krebs-Henseleit-Perfusionslösung. Fettsäuren beispielsweise sind in vivo Hauptenergielieferant des Herzens. Aufgrund von erschwerter Löslichkeit und Schaumbildung sind Fettsäuren jedoch nicht in der Perfusionslösung enthalten. Obwohl das Herz Substrate wie

Glukose zur effizienten Energiegewinnung heranziehen kann, stellt dies eine Abweichung zu in vivo Verhältnissen dar (Sutherland & Hearse, 2000). Allerdings bietet die Zugabe von Pyruvat zum Perfusat eine wertvolle, physiologische Energiequelle.

Albumin und andere onkotisch wirksame Substanzen sind ebenfalls nicht Bestandteil des Perfusats. Speziell unter Berücksichtigung der grundlegenden Bedeutung von Plasmaproteinen für strukturelle und funktionelle Eigenschaften der Glykokalyx müssen die gewonnenen Daten kritisch betrachtet werden. Diese hypoosmotische Lösung ist zudem mitverantwortlich für das charakteristische Ödem des isoliert perfundierten Herzmodells (Sutherland & Hearse, 2000). Der Mangel an Kolloiden führt auch zu einer, gegenüber in vivo Bedingungen, erhöhten Nettofiltration im Gefäßbett. Dies gewinnt besonders bei langen Versuchen an Relevanz. In der Kontrollgruppe konnte im zeitlichen Rahmen des Versuchsprotokolles keine signifikante weitere Zunahme der Transsudatmenge und damit der Gefäßpermeabilität festgestellt werden. Um eine erhöhte Transsudatbildung durch unzureichende Ligaturen der Venae cavae oder primär bei der Präparation geschädigten Herzen auszuschließen, wurden Herzen mit einer erhöhten initialen Transsudatmenge (Transsudat/Effluat >10%) nicht verwertet.

Die zellfreie Beschaffenheit des Perfusats bedingt höhere koronare Flüsse. Auch die niedrigere Sauerstofftransportkapazität des kristalloiden Perfusats muss durch höhere Koronarflüsse kompensiert werden (Gross, 2009). Der vermehrte Scherstress am Endothel könnte für sich genommen schon eine Veränderung der Glykokalyx nach sich ziehen.

Die Wahl eines blutzell- und plasmafreien Perfusats ist insbesondere für die Anwendung in einem Inflammationsmodell kritisch zu bewerten. Einerseits können Fragestellungen gezielt auf Einflüsse des Endothels untersucht werden, andererseits fehlen wichtige Komponenten der Inflammationskaskade. Nicht nur Bluteukozyten und plasmatische Mediatoren werden nicht berücksichtigt, sondern auch das gesamte Koagulationssystem mitsamt Thrombozyten findet keine Berücksichtigung. Gleichzeitig wird die vorhandene Endothelreaktion durch die fehlende Rezirkulation in ihrem Ausmaß verändert. Die Übertragung der gewonnenen Ergebnisse auf Entzündungsprozesse in einem komplexen Organismus ist damit nur eingeschränkt möglich.

#### 4.1.2 TIERISCHES SEPSISMODELL

Schwächen und Limitationen von tierischen Sepsismodellen werden für das jahrzehntelange Scheitern neuer Therapieansätze in klinischen Studien verantwortlich gemacht (Deitch, 1998). Auch das verwendete Endotoxinmodell kann viele Aspekte des septischen Krankheitsbildes des Menschen nicht wiedergeben:

Das heterogene Patientenkollektiv wird nicht abgebildet. Die Versuchstiere sind allesamt jung, männlich und haben keine Begleiterkrankungen. Diese homogene Gruppe soll Variablen vermindern und pathophysiologische Zusammenhänge leichter zugänglich machen. Gleiches gilt für die einheitliche Intervention. Es wird nur ein durch Endotoxin ausgelöstes, gramnegatives Sepsismodell untersucht. Beim Menschen hingegen variieren Infektionsweg, -ausmaß und auslösendes Pathogen deutlich zwischen Patienten (Deitch, 1998). Mögliche Interaktionen der etablierten Antibiotika- und supportiven Sepsistherapie mit Immunantwort oder Glykokalyx werden ebenso vernachlässigt, sodass insgesamt die Komplexität der klinischen septischen Pathophysiologie im Tiermodell nicht wiedergespiegelt wird.

Die zeitliche Dynamik des Endotoxinmodells entspricht nicht dem Verlauf beim Menschen. Die häufigste Todesursache von Sepsiserkrankten ist ein Multiorganversagen, das sich Tage bis Wochen nach dem klinischen Auslöser entwickelt (Opal et al., 2014). Im Endotoxinmodell dagegen wird mit einem intravenösen Bolus bei Versuchstieren bzw. -organen ein Endotoxinschock ausgelöst. Durch eine akute überschießende Antwort des angeborenen Immunsystems kommt es zu einer umfassenden Verschlechterung der kardiovaskulären Funktion mit fulminantem Verlauf (Deitch, 1998). Mögliche Veränderungen der Zytokinantwort durch Interventionen wie Sevofluran könnten in diesem Schockmodell überschätzt werden. Alternativ zum Endotoxinmodell hätte das tierische Sepsismodell der zökalen Ligatur und Punktion (CLP) verwendet werden können. Es liefert eine natürlichere Progression von lokal induzierter bakterieller Infektion zu systemischer Sepsis und kommt so dem zeitlichen Verlauf beim Menschen näher (Deitch, 1998). Im Hinblick auf die beschränkte Zeit der Funktionsstabilität des isolierten Herzens im Langendorff-Apparat wurde dennoch das Endotoxinmodell mit seiner unmittelbaren Reaktion herangezogen.

Grundsätzlich ist fraglich, ob tierische Entzündungsmodelle überhaupt mit dem des Menschen vergleichbar sind. Beispielsweise ergab die Analyse von Genexpressionsprofilen nach Endotoxämie fast keine Korrelation zwischen Mäusen und Menschen (Seok et al., 2013). Mäuse und Kleintiere reagieren auch weniger empfindlich auf Endotoxine als Menschen und müssen deutlich höhere Dosierungen erhalten (Fink, 2014). Tiere, die dem Menschen verwandter sind, werden aus ethischen und finanziellen Gründen seltener verwendet (Opal et al., 2014). Zusammenfassend kann man keine klinischen Empfehlungen aus dem verwendeten Endotoxinmodell ableiten, aber pathophysiologische Mechanismen können erschlossen werden und trotz vielfältiger Limitationen Impulse für klinische Studien liefern.

## 4.2 DISKUSSION DER ERGEBNISSE

### 4.2.1 GLYKOKALYXSHEDDING

Das Shedding von Heparansulfat in Endotoxinmodellen (Colburn, Kobayashi & Buonassisi, 1994; Hofmann-Kiefer et al., 2009) und damit die Schädigung der Glykokalyx kann nach Lipopolysaccharidgabe am isolierten Meerschweinchenherzen bestätigt werden. Der Abbau von Heparansulfat lässt dabei auf die Mitbeteiligung einer Heparanase schließen, welche vor allem durch Mastzelldegranulierung freigesetzt worden sein könnte. Erhöhte Histaminwerte im Transsudat der Lipopolysaccharidgruppen verifizieren die postulierte Mastzelldegranulation.

Marechal et al. zeigten im Gegensatz zu den hier erhobenen Daten im Rattenmodell nach Lipopolysaccharid zudem ein Shedding von Hyaluronsäure (Marechal et al., 2008). In diesem systemischen Versuchsansatz bleibt es ungeklärt, aus welchen Strukturen die freigesetzte Hyaluronsäure stammt, denn Hyaluronan kommt nicht ausschließlich am vaskulären Endothel vor. Ein vorzeitiger Verlust von Hyaluronsäure aus dem Herzen, welcher durch die fehlende Rezirkulation nicht erfasst wurde, könnte zudem Grund dieser Diskrepanz sein. Hyaluronsäure gilt als frühester Marker des Glykokalyxschadens (M. Nieuwdorp et al., 2006). Durch Ischämie-/ Reperfusionsschäden im Rahmen der Herzpräparation ist trotz kurzer Präparationszeiten ein gewisses Maß an Shedding zu erwarten. Möglicherweise ist dies bei Hyaluronsäure stärker ausgeprägt, da es nur durch CD-44 Rezeptorinteraktion und nicht kovalent über ein Kernprotein an der Endothelzellmembran verankert ist. Basal erhöhte Hyaluronsäurekonzentrationen sind entsprechend im isolierten Meerschweinchenherzmodell beschrieben (Chen et al., 2016), wurden hier jedoch nicht evaluiert.

Während wir auch keinen Abbau von Syndekan-1 nachweisen konnten, ist dieser nach intraperitonealer Injektion von Lipopolysaccharid im Mausmodell beschrieben (Hayashida, Parks & Park, 2009; Inagawa et al., 2018). Auch hier liegt ein systemischer Versuchsansatz vor, im Gegensatz zum isolierten Organ.

Sevofluran hatte in unserem Endotoxinmodell keinen nachweisbaren Einfluss auf das Ausmaß der Glykokalyxschädigung. Der protektive Effekt von Sevofluran auf den Glykokalyxbestandteil Heparansulfat aus dem Ischämie-/ Reperfusionsmodell (Anneck et al., 2010; Chappell et al., 2011; Chen et al., 2016) ist hiernach nicht auf Lipopolysaccharid-induziertes Heparansulfatshedding übertragbar. Ursache könnten abweichende oder zusätzliche inflammatorische Mechanismen der Glykokalyxschädigung sein. Diese sind eventuell nicht, beziehungsweise nicht vollständig durch Sevofluran blockierbar. In diesem Sinne kam es zu keiner Reduktion der kardialen Histaminfreisetzung durch Sevofluran in unserer Studie.

Insgesamt ist die Qualität der Sheddingdaten durch die für die Konzentration der Proben notwendige Verwendung von Ultrafiltern limitiert. Über die Ultrafilter könnte es zu einem Verlust

von Glykokalyxfragmenten gekommen sein. Hierfür spricht, dass die Konzentration der Glykokalyxfragmente bei einigen Proben unterhalb der Nachweisgrenze lag. Solch niedrige Werte sind jedoch selbst unter basalen Bedingungen nicht zu erwarten (Chappell et al., 2009b; Chen et al., 2016).

#### **4.2.2 MECHANOTRANSDUKTION**

Die in der Literatur beschriebene initiale vasokonstriktorische Wirkung von Lipopolysaccharid (Bateman, Sharpe & Ellis, 2003) tritt auch im Rahmen dieser Arbeit im Modell des isolierten Meerschweinchenherzens auf. Unter der verwendeten druckkonstanten Perfusion ist dies an der deutlichen Abnahme des Koronarflusses 75 Minuten nach Lipopolysaccharidgabe erkennbar. Dieser unmittelbare Effekt wird durch die Blockade der endothelialen eNOS und damit NO Produktion begründet. Erst im weiteren Verlauf induzieren proinflammatorische Zytokine die endotheliale iNOS und bewirken so die ausgeprägte Vasoplegie der Sepsis (Ait-Oufella et al., 2010; Ince et al., 2016). Eine gestörte Mechanotransduktorfunktion durch strukturelle Glykokalyxschäden wird als Ursache dieser Veränderungen der Vasoreaktivität diskutiert (Chelazzi et al., 2015). Ein möglicher Zusammenhang zwischen inflammatorischem Shedding und pathologischer Vasomotorik wird auch im eingesetzten Modell angedeutet.

Sevofluran verhindert die beschriebene Vasokonstriktion durch Lipopolysaccharid. Eine Hemmung der Lipopolysaccharidwirkung könnte dies erklären. Außerdem wäre eine entgegengesetzte, gefäßerweiternde Wirkung von Sevofluran als Mechanismus denkbar. Für Letzteres spricht, dass Sevofluran als volatiles Anästhetikum potenter koronarer Vasodilatator ist. Die Öffnung ATP-abhängiger Kaliumkanäle durch Sevofluran führt zur Membranhyperpolarisation. Diese wiederum inhibiert spannungsabhängige Kalziumkanäle. Die resultierende verminderte intrazelluläre Kalziumkonzentration der glatten Gefäßmuskulatur hat eine Vasodilatation zur Folge (Bulte, Boer & Loer, 2015; Pagel & Crystal, 2018). Der Koronarfluss in der Sevoflurangruppe war im Vergleich zur Kontrollgruppe von der Tendenz, allerdings nicht signifikant, erhöht.

### 4.2.3 PERMEABILITÄT

Die Gabe von Lipopolysaccharid führte im Koronarbett des isolierten Meerschweinchenherzens zu einer erhöhten Permeabilität. Diese Störung der Barrierefunktion demaskierte sich allerdings erst nach Kolloidgabe. Die charakteristische septische Erhöhung der Gefäßpermeabilität konnte damit im vorliegenden Endotoxinmodell am koronaren Endothel reproduziert werden. Dies entspricht Arbeiten von Kandasamy et al. und Schmidt et al., die im Rattenmodell nach Lipopolysaccharid eine Permeabilitätssteigerung der pulmonalen bzw. mesenterialen Gefäßbarriere zeigen konnten (Kandasamy, Escue, Manna, Adebisi & Parthasarathi, 2015; Schmidt et al., 2017; Schmidt et al., 2015).

Die Permeabilitätssteigerung hat wichtige klinische Bedeutung, denn das interstitielle Ödem ist maßgeblich an der Entwicklung des Organversagens in der Sepsis beteiligt. Einerseits kommt es durch Flüssigkeitsverschiebungen ins Gewebe zum intravasalen Volumenmangel. Neben der dadurch verminderten Vorlast ist das kardiale Schlagvolumen zusätzlich durch eine eingeschränkte myokardiale Compliance aufgrund des Gewebeödems reduziert. Andererseits erschwert das perikapillär geschwollene Interstitium die Diffusion von Sauerstoff und anderen Nährsubstanzen (Becker et al., 2010b; Radeva & Waschke, 2017).

Es gibt widersprüchliche Daten dazu, inwieweit die endotoxämische Permeabilitätssteigerung über Leukozyten vermittelt wird (Walther et al., 2000). In unserem Modell konnte die Leckage im plasmazell- und damit leukozytenfreien Modell bestimmt werden, ein eindeutiger Hinweis auf einen, zumindest partiell, leukozytenunabhängigen Mechanismus.

Aus vielen Studien beispielsweise zur Ischämie/Reperfusion geht hervor, dass die Schädigung der Glykokalyx mit einem Anstieg der vaskulären Permeabilität assoziiert ist (Becker et al., 2010b). Dies hat zur Anerkennung der Glykokalyx als integralen Bestandteil der Gefäßbarriere beigetragen und die Revision der Starlingformel zur Folge gehabt. Ob der Verlust einer speziellen Komponente der Glykokalyx dabei eine entscheidende Rolle spielt, ist noch unklar. Bisher weiß man, dass eine Hyperpermeabilität durch selektives Syndekanshedding (Peng et al., 2013) oder Hyaluronsäureshedding zustande kommen kann (Henry & Duling, 1999; van den Berg, Vink & Spaan, 2003). Wir haben gezeigt, dass alleiniges Heparansulfatshedding durch Lipopolysaccharid ebenfalls mit einer erhöhten Kolloidpermeabilität verbunden ist.

Heparinase bedingt ein selektives Shedding von Heparansulfat (Chappell et al., 2008c). Daher ist nach Heparinasevorbehandlung von einer partiellen Glykokalyxschädigung auszugehen. Eine signifikante Erhöhung des Transsudat/Effluat Verhältnisses in der Heparinasegruppe war im Vergleich zu Basalwerten erst in Anwesenheit von Hydroxyethylstärke messbar. Die nur partielle Schädigung der Glykokalyx durch Heparinase könnte dafür verantwortlich gemacht werden.

Heparinase reduzierte die Glykokalyxdicke in Studien nur etwa auf die Hälfte. Eine Kombination aus Heparinase mit weiteren Sheddasen hingegen verkleinerte die Glykokalyx bis auf 10% der Ausgangsdicke (Curry & Adamson, 2012). Wie es zu einer signifikanten Zunahme der Gefäßpermeabilität kommt, wurde durch Rehm et al. mit dem Modell der Doppelbarriere erklärt. Hiernach wird die vaskuläre Barriere als Doppelbarriere definiert, bestehend aus der Endothelzellschicht und der endothelialen Glykokalyx. Rehm et al. postulierten weiter, dass nur eine Schädigung beider Anteile eine signifikante Permeabilitätssteigerung zur Folge hat (Rehm et al., 2004). Lipopolysaccharid führt auch ohne Heparinasevorbereitung zur erhöhten Kolloidpermeabilität und muss nach dieser Theorie sowohl die Glykokalyx als auch die Endothelzellbarriere nachteilig beeinflussen. Die Heparinasevorbereitung vor Endotoxingabe verstärkt diesen Effekt. Hier manifestiert sich die inflammatorische Permeabilitätssteigerung nicht erst nach Kolloidgabe, sondern ist direkt zu sehen.

Mehrere Faktoren sind an der Beeinträchtigung der Integrität und damit der Barrierefunktion der Endothelzellschicht involviert. Veränderungen der Form und strukturellen Anordnung der Endothelzellen sowie eine in Inflammation häufig nachgewiesene Apoptose und Nekrose von Endothelzellen lösen die Kontinuität der Endothelzellschicht auf. Die entstehenden Spalten zwischen den Endothelzellen korrelieren mit einem Anstieg der Gefäßpermeabilität (Chelazzi et al., 2015; Lee & Liles, 2011). Diese Interzellulärspalten können gleichermaßen durch die Lockerung bzw. Dysfunktion von Endothelzellkontakten, wie Tight Junctions und Adherens Junctions, verursacht werden. Auch hierdurch wird eine verstärkte parazelluläre Flüssigkeitsfiltration ausgelöst (Chai et al., 2015; Ince et al., 2016; Radeva & Waschke, 2017). Die Stabilität der Zellkontakte basiert auf ihrer Verbindung zum Zytoskelett (Chai et al., 2015; Radeva & Waschke, 2017; Schnoor et al., 2017). Dieses ist wiederum mit Komponenten der Glykokalyx verbunden (Reitsma et al., 2007).

Zellkontakte sind Angriffspunkt von oxidativem Stress (ROS), Scherstress und Inflammation (Ince et al., 2016; Radeva & Waschke, 2017). Für die wichtigsten septischen Mediatoren Endotoxin, TNF- $\alpha$  und den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B ist eine über das Zytoskelett vermittelte Destabilisierung von Zellkontakten mit konsekutiver Erhöhung der parazellulären Permeabilität beschrieben (Kandasamy et al., 2015; Schnoor et al., 2017). Weiterhin wurde ein Shedding der Glykokalyx, insbesondere von Heparansulfat, mit einer Reorganisation und Dysfunktion von Zellkontakten assoziiert (Henrich et al., 2010; Mensah et al., 2017). Eine Glykokalyxschädigung könnte folglich nicht nur über den Verlust eines Teils der Doppelbarriere zur gestörten Gefäßpermeabilität beitragen. Die Verbindung der Glykokalyx zum Zytoskelett deutet zusätzlich auf eine Beeinflussung von Zellkontakten (Curry & Adamson, 2012). Die Schädigung eines Teils der Doppelbarriere wäre

damit an die Dysfunktion des anderen Teils gekoppelt. Bekannt ist, dass sich Endothelzell- und Glykokalyxdysfunktion gegenseitig verstärken (Ostrowski & Johansson, 2012; Zhang et al., 2018).

Nach dem Prinzip der Doppelbarriere sollte durch den Anstieg der Kolloidpermeabilität in den Endotoxingruppen sowohl ein Glykokalyxschaden als auch ein Verlust der Endothelzellbarriere gegeben sein. Lipopolysaccharid könnte die Desintegration der Endothelzellschicht direkt oder sekundär über ein Heparansulfatshedding-induziertes Auflösen der Zellkontakte bewirken.

### **SEVOFLURAN UND PERMEABILITÄT**

Ischämie-/ Reperusionsversuche unserer und anderer Arbeitsgruppen belegen, dass Sevofluran das Ischämie-/ Reperusionsödem relevant reduzieren kann (Annecke et al., 2010; Chai et al., 2015; Chappell et al., 2011; Chen et al., 2016; Liu, Ishibe & Ueda, 2000). Diese protektive Sevofluranwirkung nach Ischämie/Reperfusion konnte an dieser Stelle nochmals validiert werden, da Sevofluran den Anstieg der Permeabilität nach der Herzpräparation in den durchgeführten Versuchen abschwächt. Die Herzen der Sevoflurangruppe weisen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant niedrigere Kolloidextravasation auf.

Der Ischämie-/ Reperusionschaden wird unter anderem über inflammatorische Prozesse vermittelt (Wang et al., 2010; Zhong, Zhou & Liu, 2004). Entsprechend konnte die prä- und postkonditionierende Wirkung von Sevofluran zumindest teilweise auf antiinflammatorische Mechanismen zurückgeführt werden (siehe 4.2.5). Eine protektive Sevofluranwirkung im Inflammationsmodell wäre daher naheliegend.

Es gibt jedoch kaum Daten, die zeigen inwieweit Sevofluran das inflammatorische Ödem mildern kann. Bei Huang et al. verhinderte Sevofluran im Zellkulturmodell die durch Lipopolysaccharid hervorgerufene Permeabilitätszunahme (Huang, Tan, Chen, Cao & Li, 2015). Im Rattenmodell konnte nach Lipopolysaccharidinhalation ebenfalls ein protektiver Effekt von Sevofluran auf die vaskuläre Barrierefunktion nachgewiesen werden (Voigtsberger et al., 2009). Das Verifizieren dieser Befunde war im Endotoxinmodell des isolierten Meerschweinchenherzens möglich. Die Sevofluranadministration führte zu einer deutlich verringerten Kolloidpermeabilität nach Lipopolysaccharidexposition.

Dieses Ergebnis wird nicht von einer reduzierten Histaminausschüttung in der Sevoflurangruppe begleitet. Ein Mastzell-hemmender Mechanismus der beobachteten Schutzwirkung von Sevofluran ist damit unwahrscheinlich. Ischämie-/ Reperusionsversuche mit protektivem Sevofluraneffekt hatten ähnliche Resultate zur Histaminausschüttung (Annecke et al., 2010). Ein Hemmeffekt von Sevofluran auf irgendeine enzymatisch aktive Komponente, die von Mastzellen freigesetzt wird, ist

nicht ausgeschlossen, ebensowenig wie die Inhibition einer inflammatorischen Signalkette, die von Mastzellen angestoßen wird.

Der Sevofluraneffekt geht verloren, wenn die Glykokalyx durch Heparinase vorgeschädigt ist. Nach Heparinasevorbehandlung ist durch Sevofluran im Vergleich zur Lipopolysaccharidgruppe keine Herabsetzung der kapillären Kolloidfiltration nachweisbar. Die protektive Wirkung von Sevofluran scheint auf eine (teil-)intakte Glykokalyx angewiesen zu sein.

Dabei ist hier nicht differenzierbar, ob die beschriebene Schutzfunktion von Sevofluran über die Glykokalyx selbst oder indirekt über eine Protektion von Zellkontakten zustande kommt. Für Letzteres sprechen Daten aus dem Inflammationsmodell von Huang et al. und aus dem Ischämie/Reperusionsmodell von Chai et al., die Sevofluran positive Effekte auf Zellkontakte zuweisen konnten (Chai et al., 2015; Huang et al., 2015).

#### 4.2.4 FOLGEN UND MECHANISMEN DER GLYKOKALYXSCHÄDIGUNG

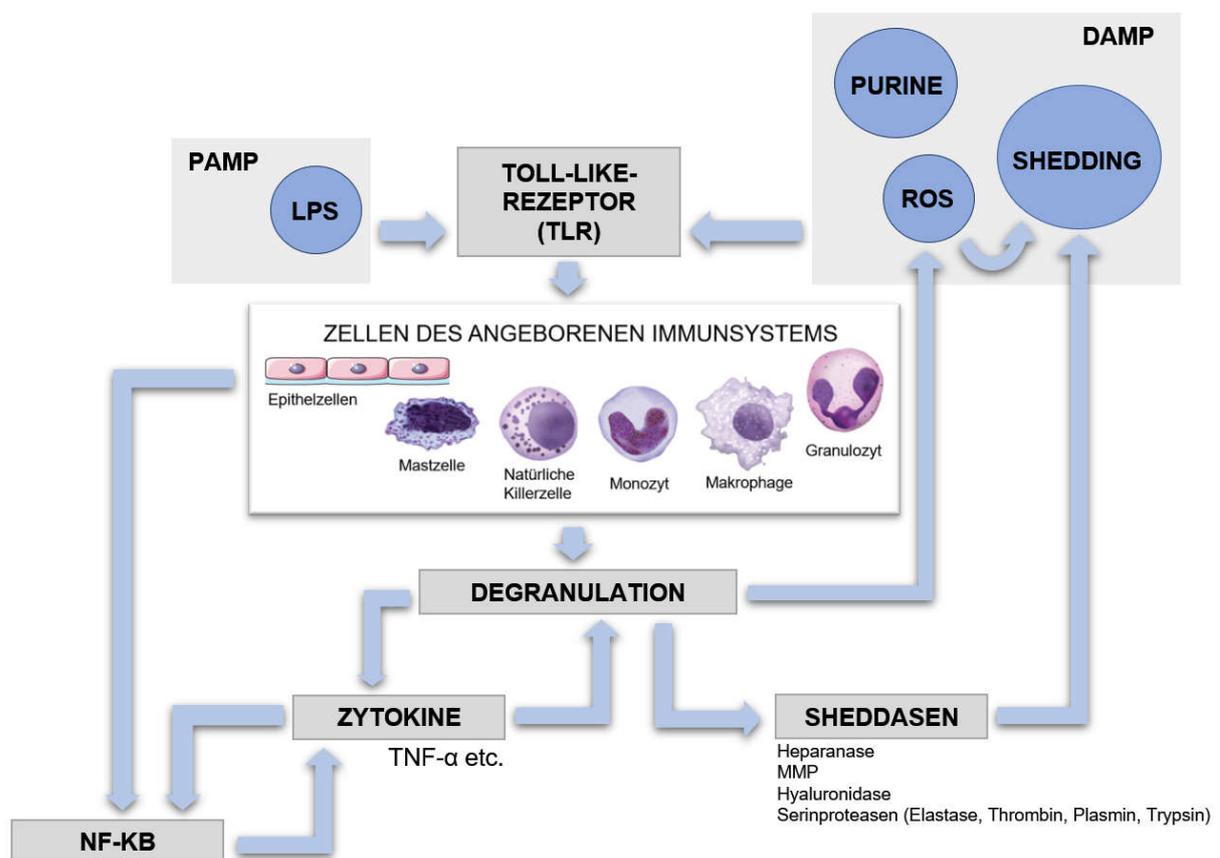
Ein proinflammatorisches, prokoagulatorisches Endothel mit limitierter antioxidativer Reserve sowie eine gestörte Mikrozirkulation sind die weitreichenden Folgen einer Glykokalyxschädigung (Becker et al., 2015; Schmidt et al., 2012). Bereits die Abtragung einzelner Komponenten soll die Funktion der gesamten Schicht beeinträchtigen. Dies ist der synergistischen Interaktion einzelner Glykokalyxkomponenten geschuldet (Reitsma et al., 2007). Das vorliegende Modell bekräftigt diese Aussage. Das alleinige Shedding von Heparansulfat durch Lipopolysaccharid resultiert in einem Funktionsverlust der Glykokalyx. Zudem ist der Glykokalyxverlust wahrscheinlich mit Endothelzellschäden und einer Dysfunktion der Zellkontakte gekoppelt (siehe 4.2.3) (Ostrowski & Johansson, 2012; Zhang et al., 2018). Dadurch kann die endotheliale Barrierefunktion nicht mehr aufrechterhalten werden und es kommt zu einer vermehrten Kolloidextravasation.

Je nach Ausprägung des Insults werden nur oberflächliche Glykokalyxanteile wie Heparansulfat und Hyaluronsäure oder Kernproteine wie Syndekan angegriffen (Chelazzi et al., 2015; Stepan et al., 2011; Wang et al., 2017b). Das Shedding von Heparansulfat scheint Syndekan anfälliger für Proteasen zu machen (Ramani, Pruett, Thompson, DeLucas & Sanderson, 2012). In unseren Versuchen war das Heparansulfatshedding wahrscheinlich nicht ausreichend um diesen Einfluss demonstrieren zu können.

Erst seit Kurzem ist bekannt, dass die Abbauprodukte der Glykokalyx nicht nur als Biomarker dienen können. Die Fragmente fungieren zusätzlich als DAMP (Damage-Associated-Molecular-Pattern), die Toll-Like-Rezeptoren (TLR) stimulieren können. Dies macht sowohl Syndekan und Hyaluronsäure (Savery et al., 2013; van Golen et al., 2013) als auch Heparansulfat zu inflammatorischen Mediatoren (Goldberg et al., 2013; Johnson, Brunn, Kodaira & Platt, 2002). Der lokale Glykokalyxschaden hat also noch nicht näher erforschte systemische Konsequenzen und potenziert die Immunantwort (Oshima et al., 2018; van Golen et al., 2014), welche wiederum zu einer weiteren Glykokalyxschädigung führt. Das Modell des isolierten Meerschweinchenherzens eignet sich nicht zum Herausarbeiten der systemischen Auswirkungen des stattgehabten Heparansulfatsheddings. Dies ist auf die fehlende Rezirkulation des Koronareffluates zurückzuführen. Genausowenig ist eruiert ob ein Heparansulfatshedding, wie in der Literatur diskutiert (Chen et al., 2017; Li & Vlodavsky, 2009; Vlodavsky et al., 2016), Voraussetzung für chemotaktische Akkumulation und Transmigration von Leukozyten ist. Das plasmafreie Perfusat schließt Aussagen hierzu aus.

Unklar ist bislang, welche Mechanismen für die Glykokalyxschädigung verantwortlich sind. Zwar konnte das Shedding der Glykokalyx bereits in experimentellen Endotoxinmodellen nachgewiesen werden, aber die verwendeten Modelle waren in ihrer Aussagefähigkeit bezüglich Pathomechanismen der Lipopolysaccharidwirkung deutlich eingeschränkt. Zum Beispiel ist umstritten,

inwiefern Zellkulturexperimente für pathophysiologische Überlegungen herangezogen werden können (Colburn et al., 1994; Wang et al., 2016; Wiesinger et al., 2013). Zu unsicher ist, ob der physiologische Zustand der Glykokalyx abgebildet wird (Chappell et al., 2009c). In vivo Experimente hingegen sind durch ihre Komplexität nicht geeignet spezifische pathophysiologische Fragestellungen zu beantworten. Auch wenn in vivo Endotoxinmodelle von Ratte (Marechal et al., 2008), Maus (Hayashida et al., 2009; Inagawa et al., 2018; Schmidt et al., 2012) und Schwein (Hofmann-Kiefer et al., 2009) den klinischen Glykokalyxschaden bereits imitieren konnten. Das in der vorliegenden Arbeit herangezogene Modell des isolierten Meerschweinchenherzens erlaubte ein Minimieren von Störfaktoren. Die Glykokalyx wurde hier an einem isolierten Organ, in einem blutzell- und plasmafreien Umfeld untersucht. Damit konnte die Endotoxinwirkung fokussiert auf endotheliale Effekte erforscht werden und die Evaluation potentieller Mediatoren des Lipopolysaccharid-induzierten Glykokalyxsheddings wurde ermöglicht.



**Abbildung 27**

*Mechanismen der inflammatorischen Glykokalyxschädigung (Shedding). Sowohl PAMPs (Pathogen-Associated-Molecular-Patterns) wie Lipopolysaccharid (LPS) als auch DAMPs (Damage-Associated-Molecular-Patterns) wie Purine, ROS und Glykokalyxfragmente, können über Aktivierung der Toll-Like-Rezeptoren (TLR) zu einer Degranulation von Zellen des angeborenen Immunsystems führen. Zytokine wie TNF-α induzieren NF-κB und verstärken die Zelldegranulation. Die freigesetzten Sheddasen haben ebenso wie reaktive Sauerstoffspezies (ROS) ein Shedding der Glykokalyx zur Folge.*

*[Zellen des angeborenen Immunsystems sind modifiziert entnommen aus (Molnar & Gair, 2013), Zugriff über <https://opentextbc.ca/biology/>, mit einer Creative Commons Attribution CC BY 4.0 Lizenz, abrufbar unter <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>*

*Epithelzellen nach Servier Medical Art (<http://smart.servier.com/>), über eine Creative Commons Attribution CC BY 3.0 Lizenz, abrufbar unter <https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/#>]*

Eine ganze Reihe von potentiell Glykokalyx-schädigenden Substanzen sind an der Immunantwort beteiligt (siehe Abbildung 27). Dazu zählen oxidativer Stress in Form von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), Zytokine und unterschiedliche Sheddase (Liu et al., 2018). Sie werden nachfolgend als potentielle Mediatoren des Lipopolysaccharid-induzierten Glykokalyxabbaus besprochen.

Die Glykokalyx reagiert allgemein sehr empfindlich auf reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Sinkt der oxidative Stress, dann fällt die Abnahme der Glykokalyxdicke geringer aus (Liu et al., 2018; Marechal et al., 2008). Die Wirkung von ROS kann direkt zustande kommen oder indirekt über die Freisetzung von Sheddase vermittelt sein (van Golen et al., 2014). Bei Letzterem agieren reaktive Sauerstoffspezies als DAMP und aktivieren über den TLR-Signalweg NF- $\kappa$ B und weitere inflammatorische Mediatoren (Ait-Oufella et al., 2010; Pahwa, Nallasamy & Jialal, 2016). Hauptquelle von ROS sind Leukozyten und in geringerem Ausmaß Endothelzellen (Ait-Oufella et al., 2010; van Golen et al., 2014). Das Fehlen von Leukozyten im isolierten Meerschweinchenherzmodell könnte erklären, warum nach Endotoxingabe kein relevanter oxidativer Stress anhand des Purin/Harnsäure Quotienten nachgewiesen werden konnte. Ebenso wenig waren Kennzeichen einer Sauerstoffschuld in Form von Laktatbildung (anaerobe Glykolyse) festzustellen. Eine Glykokalyxschädigung muss jedoch nicht zwangsläufig mit einer Ischämie zusammenhängen. Donati et al. fanden an septischen Intensivpatienten keine Korrelation zwischen Laktatwerten und Glykokalyxdicke (Donati et al., 2013).

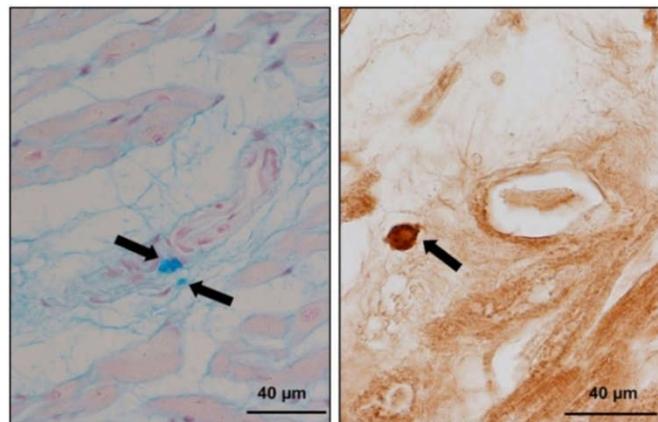
Endotoxin führt zu einer Aktivierung von Mastzellen (Sandig & Bulfone-Paus, 2012). Zu sehen ist dies im Versuch an der verstärkten Histaminausschüttung in den Lipopolysaccharidgruppen. Mediatoren der Mastzellaktivierung sind Liganden der Toll-Like-Rezeptoren: Lipopolysaccharid selbst als PAMP (Pathogen-Associated-Molecular-Pattern) oder DAMPs (Damage-Associated-Molecular-Patterns) wie Purine und ROS (Annecke et al., 2011; Sandig & Bulfone-Paus, 2012). Ein vermehrtes Aufkommen von Purinen war hier jedoch nicht messbar. Dies steht im Kontrast zur Ischämie-induzierten Mastzellaktivierung im isolierten Meerschweinchenherzmodell, die mit erhöhten Purinkonzentrationen einherging (Annecke et al., 2011). Die Degranulation von Mastzellen setzt eine ganze Bandbreite an Endoglykosidasen frei. Beispiele dieser Sheddase sind Hyaluronidase, Heparanase und Matrix-Metalloproteinasen sowie die Serinproteasen Thrombin, Elastase und Tryptase (Becker et al., 2015).

Die inflammatorischen Mediatoren CRP (Devaraj, Yun, Adamson, Galvez & Jialal, 2009) und TNF- $\alpha$  sowie der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B sind mit einem verstärkten Glykokalyxshedding verbunden (Chappell et al., 2009a; Liu et al., 2018; Schmidt et al., 2012). Diese Wirkung wird vermutlich über die Freisetzung von Sheddase erzielt (Kolarova et al., 2014).

Heparanase kommt im Herzen des Menschen nur in perivaskulären Mastzellen vor (siehe Abbildung 28) und ist einzige Sheddase von Heparansulfat (Becker et al., 2010b; Chappell et al., 2008c; Goldberg et al., 2013). Dementsprechend verminderte die Inhibition der Heparanase in Studien den Abbau der Glykokalyx (Schmidt et al., 2012; Wang et al., 2016). Das Shedding von Heparansulfat nach Endotoxingabe in unserem Modell lässt somit auf die Beteiligung einer Heparanase schließen. Im Tierexperiment korreliert die Heparanasekonzentration mit der Schwere der septischen Erkrankung und auch septische Patienten weisen eine verstärkte Heparanaseaktivität auf (Chen et al., 2017; Martin et al., 2015; Schmidt et al., 2012).

**Abbildung 28**

*Mastzellen und Heparanase des humanen Myokards in Fixierungen von Becker et al. Links sind perivaskuläre Mastzellen (Pfeile) in einer Alcianblaufärbung zu sehen. Rechts ist eine immunhistochemische Fixierung abgebildet. Nur im Bereich der Mastzellen kommt es zur dunkelbraunen Färbung von Heparanase durch die Antikörper (Becker et al., 2010b).*



Matrix-Metalloproteasen (MMP) sind Zink-abhängige Proteasen, die von Endothelzellen ausgeschüttet werden. Sie sind an Umbauprozessen des Bindegewebes involviert (Kolarova et al., 2014; Lipowsky, 2012). Immer mehr Anzeichen deuten darauf hin, dass Matrix-Metalloproteasen für das Shedding von Syndekan verantwortlich sind (Becker et al., 2015; Kolarova et al., 2014), vor allem weil ihre Blockade den Erhalt von Syndekan ermöglicht (Chen et al., 2017; Jacob et al., 2013; Mulivor & Lipowsky, 2009; Zeng et al., 2014). Obwohl erhöhte Mengen von Matrix-Metalloproteasen aus inflammatorischen in vivo Modellen bekannt sind (Chen et al., 2017; Hayashida et al., 2009), wurde im vorliegenden Versuch mit Endotoxin kein vermehrtes Syndekanshedding ausgelöst. Möglicherweise ist die fehlende Aktivierung der Endothelzellen durch Leukozyten ausschlaggebend.

Zusammenfassend können wir eine inflammatorische Glykokalyxschädigung belegen, die zumindest teilweise über eine Mastzelldegranulation vermittelt wird. Die dadurch freigesetzte Heparanase spaltete Heparansulfat ab. Oxidativer Stress war hier nicht relevant. Da Sevofluran die Histaminfreisetzung nicht reduzieren konnte, ist nachvollziehbar warum das Glykokalyxshedding erhöht blieb. Eine zusätzliche direkte Wirkung von Lipopolysaccharid auf die Glykokalyx ist nicht auszuschließen. Weitere Versuche wären von Nöten um dies zu klären.

#### 4.2.5 SEVOFLURAN

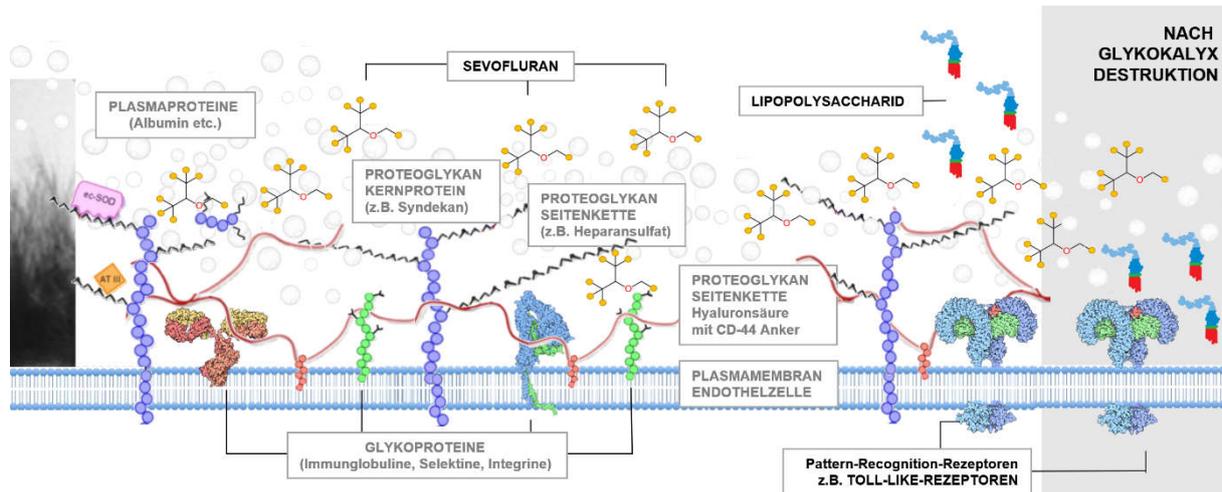
Die genauere Evaluation der Anästhetika-induzierten Prä- und Postkonditionierung (APC und APoC) ergibt eine Reihe von Mechanismen, die protektiv auf die Glykokalyx wirken könnten. Zunächst verfügt Sevofluran über antioxidative Eigenschaften. Es milderte den myokardialen oxidativen Stress von herzchirurgischen Patienten erheblich (Ballester et al., 2011). Ferner sind eine Vielzahl antiinflammatorischer Wirkungen einer Sevoflurantherapie sowohl im Ischämie/Reperfusion- als auch im Inflammationsmodell erforscht. Sevofluran reduziert experimentell die Freisetzung von Mediatoren wie IL-6 und TNF- $\alpha$  und die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B (Hofstetter et al., 2007; Rodriguez-Gonzalez et al., 2013; Wang et al., 2010). Diese verminderte Freisetzung inflammatorischer Mediatoren durch Sevofluran ist auch klinisch beschrieben, beispielsweise nach herz- und thoraxchirurgischen Eingriffen (De Conno et al., 2009; Kawamura et al., 2006). Darüber hinaus wird die Aktivierung von Leukozyten und deren Interaktion mit dem Endothel durch Sevofluran inhibiert (Chappell et al., 2011; Granja et al., 2016; Steurer et al., 2009; Suter et al., 2007). Schließlich haben einzelne Studien auch eine verringerte Ausschüttung von Proteasen belegen können (Annecke et al., 2010; Steurer et al., 2009).

Weniger Aktivierung und Freisetzung von Sheddasen und die antioxidative, antiinflammatorische Wirkweise von Sevofluran implizieren, dass es einen schützenden Einfluss auf die endotheliale Glykokalyx haben sollte. Experimentelle Daten hierzu fehlten bislang. Durch die Analyse unserer Sheddingdaten konnte dieser hypothetische Sevofluraneffekt nicht bestätigt werden: Der Lipopolysaccharid-induzierte Abbau von Heparansulfat wurde nicht nachweislich verhindert. Eine Abschwächung der funktionellen Effekte der Glykokalyxschädigung ist jedoch möglich: Die Permeabilitätserhöhung der vaskulären Barriere und die Kolloidextravasation nach Endotoxin waren mit Sevofluran weniger ausgeprägt.

Diese festgestellte funktionelle Schutzwirkung und die verminderte Leukozytenadhäsion durch Sevofluran in anderen Inflammationsmodellen (Steurer et al., 2009; Suter et al., 2007) deuten trotz unserer „negativen“ Sheddingdaten auf einen protektiven Sevofluraneffekt. Dabei ist die Reduktion der Leukozytenadhäsion Hinweis auf eine verminderte Schädigung der Glykokalyx: Umso besser die Integrität der Glykokalyx erhalten ist, umso weniger haben Leukozyten Zugang zu Zelladhäsionsmolekülen.

Weiteres Indiz für diesen protektiven Sevofluraneffekt sind die angefertigten immunhistochemischen Fixierungen. Nach Lipopolysaccharidgabe ohne Heparinase, wo die Glykokalyx zumindest noch teilweise erhalten ist, bleibt Lipopolysaccharid hochkonzentriert dort in den Kapillaren hängen, wo wir die Glykokalyx erwarten. Wird die Glykokalyx durch Heparinase vorgeschädigt, ist dies nicht mehr zu beobachten. Lipopolysaccharid kann weiter ins Endothel und Gewebe vordringen. Folglich kann Sevofluran, solange eine (teil-)intakte Glykokalyx vorhanden ist,

nicht nur die Kolloidpermeabilität senken, sondern auch das Übertreten von Lipopolysaccharid ins Interstitium und an die Rezeptoren der Endothelzellmembran verhindern. Dies wird in Abbildung 29 veranschaulicht. In welchem Umfang Sevofluran dabei die möglicherweise inhärente Barrierefunktion der Glykokalyx verstärkt, muss in kommenden Studien noch untersucht werden. Auch die Rolle einer partiell geschädigten Glykokalyx ist noch zu prüfen (Chappell et al., 2009d).



**Abbildung 29**

Die endotheliale Glykokalyx mit Sevofluran als Barriere für Lipopolysaccharid. Rechts im Bild kann Lipopolysaccharid nach Glykokalyxdestruktion weiter ans Endothel und die Toll-Like-Rezeptoren vordringen.

[Glykokalyx modifiziert nach (Reitsma et al., 2007), mit Immunglobulin, Integrin und Toll-Like-Rezeptoren aus der Protein Data Bank (Goodsell, 2001, 2011a, 2011b), Lipopolysaccharid modifiziert nach (DeFranco et al., 2007), links im Bild eine elektronenmikroskopische Aufnahme der Glykokalyx einer koronaren Kapillare eines Meerschweinchenherzes (Chappell et al., 2009b)]

Dass die endotheliale Glykokalyx Adhäsionsmoleküle abschirmt und auf diesem Weg anti-inflammatorische Merkmale besitzt, ist hinlänglich bekannt. Vorliegende Ergebnisse weisen unter Mitwirkung von Sevofluran auf einen weiteren potentiellen antiinflammatorischen Mechanismus: Die Separierung von Lipopolysaccharid von seinem Toll-Like-Rezeptor (TLR-4). In vivo und in vitro Versuche von Menon et al. und Brunn et al. bestätigen diese Hypothese. Beispielsweise am Kornealepithel wurde gezeigt, dass das Vorhandensein von Glykokalyxbestandteilen die Aktivierung von Toll-Like-Rezeptoren limitiert. Brunn et al. postulieren, dass die Destruktion der Glykokalyx Ausgangspunkt der Immunantwort ist, indem dadurch die Interaktion von Endotoxin mit seinem Rezeptor ermöglicht wird. Die Glykokalyx wäre so an der Schnittstelle zwischen Blut und Gewebe Sensor für exogene und endogene Gefahren (Brunn, Bungum, Johnson & Platt, 2005; Menon, Kaiser-Marko, Spurr-Michaud, Tisdale & Gipson, 2015).

### 4.3 AUSBLICK UND KLINISCHE RELEVANZ

Nach Jahrzehnten der produktiven Sepsisforschung beruht die Sepsistherapie neben der frühen Diagnose und antibiotischen Therapie weiterhin nur auf supportiven Maßnahmen. Kausale Therapieansätze haben sich bislang in klinischen Studien nicht durchsetzen können (Cohen et al., 2015; Schnoor et al., 2017). Lücken im Verständnis der septischen Pathophysiologie oder auch Probleme wissenschaftlicher Methoden (Tierexperimente, klinische Studien) könnten dafür verantwortlich sein (Chousterman et al., 2017; Opal et al., 2014). Bisher konzentrierten sich Studien auf die Inhibition bzw. Eliminierung einzelner inflammatorischer Mediatoren: Lipopolysaccharid, Toll-Like-Rezeptoren, TNF $\alpha$ -, NF- $\kappa$ B usw. (Aird, 2003; Ait-Oufella et al., 2010; Chousterman et al., 2017; Martin et al., 2017). Die fehlenden protektiven Ergebnisse dieser Methodik zeigen, dass es nicht ausreichend ist, einen einzigen Signalweg zu blockieren. Die septische Pathophysiologie ist ein komplexes Netzwerk von Mediatoren, Zellen und Signaltransduktionswegen. Dieses Netzwerk selbst könnte potentieller Angriffspunkt effektiverer Therapien sein (Aird, 2003; Crouser & Matthay, 2017). Das Endothel steht im Zentrum dieses Netzwerkes, denn es ist zentral an der Initiierung und Disseminierung der Immunantwort beteiligt (Aird, 2003). Ein besseres Verständnis der inflammatorischen Einflüsse auf diese Schicht könnte zu neuen Therapieansätzen führen (Chousterman et al., 2017; Lee & Slutsky, 2010). Die in der vorliegenden Arbeit begonnene Betrachtung der Mechanismen der inflammatorischen Glykokalyschädigung sollte daher fortgeführt werden.

In Bezug auf das Shedding der Glykokalyx sind weiterhin eine Reihe von Fragen offen: Die genaue Rolle des inflammatorischen Abbaus von Glykokalyxbestandteilen muss noch geklärt werden. Unklar ist, ob lediglich eine Korrelation mit inflammatorischen Ereignissen besteht oder ob das Glykokalyxshedding tatsächlich kausal an pathophysiologischen Zusammenhängen beteiligt ist. Fest steht, dass der Glykokalyxverlust die inflammatorischen, koagulatorischen und mikrozirkulatorischen Störungen der Sepsis potenziert (Becker et al., 2015; van den Berg & Vink, 2006). Auf der anderen Seite gibt es Hinweise, dass das Shedding der Glykokalyx eine inflammationslimitierende Funktion erfüllen könnte (Hayashida et al., 2009; Haywood-Watson et al., 2011). Im Übrigen ist auch nicht bekannt, welche Auswirkungen eine partiell geschädigte Glykokalyx hat und wie schnell sie sich regenerieren kann (Chappell et al., 2009d).

Ungeachtet seiner pathophysiologischen Bedeutung wird die endotheliale Dysfunktion klinisch nicht routinemäßig evaluiert (Ait-Oufella et al., 2010). Marker der Glykokalyschädigung könnten dies, eventuell sogar patientennah, leisten und frühzeitig diagnostische und prognostische Daten liefern (Page & Liles, 2013; Rovas et al., 2018). Zudem könnte die Stabilisierung und Abschirmung der Glykokalyx mittels synthetischer Substanzen in Zukunft Leukozyten-Endothel-Interaktionen und die Aktivierung von Toll-Like-Rezeptoren limitieren und so eine überschießende Immunantwort verhindern (Aird, 2003; Giantsos-Adams et al., 2011; Martin et al., 2016).

Untersuchungen zu einem Outcomevorteil durch Sedierung mit Sevofluran bei septischen Intensivpatienten fehlen bislang. Im tierischen Sepsismodell konnte Sevofluran die Mortalität senken (Bedirli et al., 2012; Herrmann et al., 2013). Ob dies mit einer protektiven Wirkung auf die Glykokalyx zusammenhängt, ist noch offen. Die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene anti-inflammatorische Schutzwirkung von Sevofluran muss noch validiert und auf mögliche Mechanismen untersucht werden. Falls diese Ergebnisse auf den Menschen übertragbar sind, hätte das eine mögliche Ausweitung der Indikationen der Sevoflurantherapie zur Folge. Septische Intensivpatienten könnten von diesem Inhalationsanästhetikum profitieren. Jedoch würde nur eine prophylaktische kontinuierliche Therapie das experimentelle Modell mit Sevoflurangabe bereits vor und während des inflammatorischen Insults abbilden. Ob die alleinige Präkonditionierung mit Sevofluran und die dadurch ausgelösten mittelfristigen Adaptationsvorgänge die beschriebene Schutzwirkung replizieren kann oder eine Postkonditionierung nach Diagnosestellung im Hinblick auf die Glykokalyx noch wirksam ist, muss erst noch geklärt werden. Möglicherweise ist die Glykokalyxschädigung klinisch bei Diagnosestellung bereits erfolgt und kann deshalb durch protektive Substanzen nicht mehr verhindert werden (Chappell et al., 2009d). Alternativ könnte man bei Sepsispatienten versuchen, die Neubildung der Glykokalyx zu fördern (Burke-Gaffney & Evans, 2012), zumal die Regeneration der Glykokalyx inflammatorisch verzögert sein könnte (Yang et al., 2017). Der Wiederaufbau der Glykokalyx mit dem Heparansulfat-verwandten Enoxaparin hatte im Tiermodell antiinflammatorische Effekte (Becker et al., 2010a; Floer et al., 2010).

Im Rahmen von Ischämie-/Reperusionsversuchen ist ein protektiver Effekt von Sevofluran auf die Glykokalyx belegt. Für die koronare Bypasschirurgie gibt es entsprechend immer mehr Ergebnisse aus Datenbank- und Metaanalysen, die auf eine Reduktion der Mortalität durch volatile Anästhetika hindeuten (Bignami et al., 2009; Jakobsen, Berg, Hindsholm, Faddy & Sloth, 2007; Uhlig et al., 2016). Ein kausaler Zusammenhang dieser Mortalitätsreduktion mit protektiven Effekten an der Glykokalyx ist nicht erwiesen. Außerhalb der koronaren Bypasschirurgie zeigten volatile Anästhetika allerdings bislang keinen Outcomevorteil, werden aber weiterhin für Risikopatienten empfohlen (Fleisher et al., 2007; Lurati Buse et al., 2012; Uhlig et al., 2016). Neben Sevofluran haben auch etablierte Interventionen der Sepsistherapie (Blutzuckerkontrolle, Steroide, Albumin) erwiesenermaßen protektive Effekte auf die Glykokalyx. Diese Wirkung konnte aber bislang ebenfalls nicht mit einem vorteilhaften Outcome bei Patienten korreliert werden (Becker et al., 2010a; Burke-Gaffney & Evans, 2012). Grundsätzlich muss der Nachweis des klinischen Benefits einer Glykokalyxprotektion erst noch erbracht werden.

Es bleiben insgesamt viele offene Fragen, die die Forschung an der Glykokalyx in der Sepsis auch weiterhin faszinierend und vielversprechend machen.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

---

Die endotheliale Glykokalyx ist ein Netzwerk aus membrangebundenen Proteoglykanen und Glykoproteinen, welches die Innenseite von Gefäßen überzieht. Gemeinsam mit Endothelzellen bildet die Glykokalyx die vaskuläre Gefäßbarriere. Nachdem sie lange Zeit nicht beachtet wurde, steigt zunehmend die Erkenntnis der Bedeutung und das Interesse an dieser endothelialen Grenzschicht. Die molekulare Struktur und die vielfältigen Funktionen der Glykokalyx waren in den letzten Jahrzehnten Gegenstand zahlreicher Forschungsarbeiten. Potentielle Auslöser einer Glykokalyxschädigung wurden ebenso evaluiert wie mögliche protektive Substanzen. Die Mechanismen sowohl der Glykokalyxschädigung als auch der Glykokalyxprotektion sind dabei noch nicht genau geklärt.

Eine Mikrozirkulationsstörung mit Vasoplegie und Gewebeödem sowie ein proinflammatorisch und prokoagulatorisch verändertes Endothel kennzeichnen das septische Krankheitsbild. Auffällig ist, dass diese Symptome genau die Folgen einer Glykokalyxschädigung abbilden. Dies lässt auf eine septisch bedingte Dysfunktion der Glykokalyx schließen. Auch immer mehr experimentelle und klinische Studien deuten auf diesen Zusammenhang.

Im Endotoxinmodell des isolierten Meerschweinchenherzens konnte ein selektiver Abbau von Heparansulfat, einem Bestandteil der Glykokalyx, bestimmt werden. Damit verbunden war eine funktionelle Störung der Glykokalyx, die sich durch eine erhöhte Kolloidpermeabilität und gestörte Vasoreaktivität manifestierte. Die in der Literatur beschriebene strukturelle und funktionelle inflammatorische Schädigung der Glykokalyx wurde damit im verwendeten Modell bestätigt.

Bei der genaueren Betrachtung der eingeschränkten endothelialen Barrierefunktion ist zusätzlich von einer Auflockerung der Endothelzellbarriere auszugehen. Dementsprechend induziert Lipopolysaccharid als Endotoxin das vaskuläre Leck vermutlich auch über eine Dysfunktion von Zellkontakten. Inwieweit dies indirekt über die Schädigung der Glykokalyx erfolgt, muss noch geklärt werden.

Bei der Suche nach dem Mechanismus der Glykokalyxschädigung konnte der Verlust an Glykokalyxbestandteilen im vorliegenden Endotoxinmodell mit einer Mastzellaktivierung in Zusammenhang gebracht werden. Der fehlende Nachweis von oxidativem Stress macht hier durch Mastzelldegranulation freigesetzte Proteasen und Lyasen zu den wahrscheinlichsten Vermittlern des Glykokalyxabbaus.

Es wurde zudem untersucht, ob die Gabe des volatilen Anästhetikums Sevofluran die Lipopolysaccharidwirkung verändert. Gezeigt werden konnte, dass Sevofluran die Zunahme der Gefäßpermeabilität vermindert, das Shedding von Glykokalyxbestandteilen dabei allerdings nicht limitiert. Der nachgewiesene funktionell protektive Effekt von Sevofluran erforderte im Modell eine

(teil-)intakte Glykokalyx und war nicht über eine reduzierte Mastzelldegranulation vermittelt. Es bleibt damit die Frage, wie Sevofluran die vaskuläre Barrierefunktion erhält. Eine mögliche Schutzwirkung auf die Glykokalyx selbst oder eine indirekte Protektion von Zellkontakten wären mögliche Mechanismen. Letztlich konnte eine (teil-)intakte endotheliale Glykokalyx unter Einfluss von Sevofluran als Barriere für Lipopolysaccharid beobachtet werden.

Diese potentielle und andere bereits bekannte antiinflammatorische Funktionen der Glykokalyx sowie die zentrale Beteiligung der Glykokalyx an der septischen Pathophysiologie machen diese Schicht zum vielversprechenden Angriffspunkt zukünftiger Sepsisforschung. Zumal die bislang frustrane Suche nach einer kausalen Sepsistherapie eine neue Herangehensweise an die komplexe septische Pathophysiologie und Immunologie erfordert. Allerdings gibt es noch keinen Hinweis auf den klinischen Outcomevorteil einer Glykokalyxprotektion.

Die Interpretation der vorliegenden Ergebnisse sollte unter Berücksichtigung der Grenzen der verwendeten Methode des isolierten Meerschweinchenherzens und der kleinen Fallzahlen erfolgen. Dennoch sind einige Impulse für weitere Forschungsarbeiten gegeben.

## 6 ANHANG

---

### 6.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACC	Acetylcystein
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
APC/ ApoC	Anästhetika-induzierte Präkonditionierung/ Postkonditionierung
avDO <sub>2</sub>	Arteriovenöse Sauerstoffgehaltsdifferenz
BNP	B-Typ natriuretisches Peptid
CLP	Cecal Ligation and Puncture
CRP	C-reaktives Protein
DAMP	Damage-Associated-Molecular-Pattern
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
eNOS	Endotheliale NO-Synthase
ESL	Endothelial Surface Layer
FGF	Fibroblastic Growth Factor
HAES	Hydroxyethylstärke
HEP	Heparinase
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HZV	Herzzeitvolumen
IL-6	Interleukin 6
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
IPC/ IPoC	Ischämische Präkonditionierung/ Postkonditionierung
LPS	Lipopolysaccharid
mK <sub>ATP</sub>	Mitochondrialer ATP-abhängiger Kaliumkanal
MMP	Matrix-Metalloprotease
mPTP	Mitochondriale Permeabilitätspore
NF-κB	Nuclear Factor - Kappa B
NO	Stickstoffmonoxid
PAMP	Pathogen-Associated-Molecular-Pattern
PRR	Pattern-Recognition-Rezeptor
ROS	Reactive Oxygen Species/ Reaktive Sauerstoffspezies
SEVO	Sevofluran
SOD	Superoxid-Dismutase
SOFA-Score	Sepsis-related Organ Failure Assessment Score
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
TLR	Toll-Like-Rezeptor
TNF-α	Tumornekrosefaktor α
VO <sub>2</sub>	Sauerstoffverbrauch

## 6.2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<b>Abbildung 1</b>	Elektronenmikroskopische Aufnahme der Glykokalyx .....	1
<b>Abbildung 2</b>	Aufbau der endothelialen Glykokalyx.....	2
<b>Abbildung 3</b>	Endothelial Surface Layer .....	4
<b>Abbildung 4</b>	Klassische Starlingformel und Starlingformel unter Berücksichtigung der Glykokalyx ....	6
<b>Abbildung 5</b>	Zeitverlauf der Präkonditionierung.....	13
<b>Abbildung 6</b>	Mechanismen der Präkonditionierung .....	15
<b>Abbildung 7</b>	Langendorff-Apparat Versuchsaufbau .....	25
<b>Abbildung 8</b>	Versuchsprotokoll Gruppe A (Kontrollgruppe).....	28
<b>Abbildung 9</b>	Lipopolysaccharid.....	29
<b>Abbildung 10</b>	Versuchsprotokoll Gruppe B (LPS).....	29
<b>Abbildung 11</b>	Versuchsprotokoll Gruppe C (LPS + Sevofluran).....	30
<b>Abbildung 12</b>	Versuchsprotokoll Gruppe D (Sevoflurankontrolle).....	30
<b>Abbildung 13</b>	Versuchsprotokoll Gruppe E (Heparinasekontrolle).....	31
<b>Abbildung 14</b>	Versuchsprotokoll Gruppe F (Heparinase + LPS) .....	31
<b>Abbildung 15</b>	Versuchsprotokoll Gruppe G (Heparinase + LPS + Sevofluran).....	31
<b>Abbildung 16</b>	Sandwich ELISA .....	32
<b>Abbildung 17</b>	Kompetitive ELISA .....	33
<b>Abbildung 18</b>	Zeitpunkte der immunhistochemischen Fixierung.....	38
<b>Abbildung 19</b>	Sheddingdaten von Heparansulfat, Syndekan-1 (CD-138) und Hyaluronsäure .....	40
<b>Abbildung 20</b>	Koronarfluss .....	41
<b>Abbildung 21</b>	Filtration im Verlauf des Versuchsprotokolles .....	42
<b>Abbildung 22</b>	Filtration .....	43
<b>Abbildung 23</b>	Filtration nach Heparinase .....	44
<b>Abbildung 24</b>	Hydroxyethylstärke zum Zeitpunkt T8/E8 .....	45
<b>Abbildung 25</b>	Histaminfreisetzung im Transsudat .....	46
<b>Abbildung 26</b>	Exemplarische Immunhistochemie mit Lipid A - Antikörpern .....	48
<b>Abbildung 27</b>	Mechanismen der inflammatorischen Glykokalyxschädigung .....	59
<b>Abbildung 28</b>	Mastzellen und Heparinase des humanen Myokards.....	61
<b>Abbildung 29</b>	Die endotheliale Glykokalyx mit Sevofluran als Barriere für Lipopolysaccharid.....	63

## 6.3 TABELLENVERZEICHNIS

<b>Tabelle 1</b>	Zusammensetzung Modifizierter Krebs-Henseleit-Puffer .....	27
<b>Tabelle 2</b>	Metabolitfreisetzung.....	47

## 6.4 LITERATURVERZEICHNIS

- Adamson, R.H., Lenz, J.F., Zhang, X., Adamson, G.N., Weinbaum, S. & Curry, F.E. (2004). Oncotic pressures opposing filtration across non-fenestrated rat microvessels. *J Physiol*, 557(Pt 3), 889-907. doi:10.1113/jphysiol.2003.058255
- Aird, W.C. (2003). The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood*, 101(10), 3765-3777. doi:10.1182/blood-2002-06-1887
- Ait-Oufella, H., Maury, E., Lehoux, S., Guidet, B. & Offenstadt, G. (2010). The endothelium: physiological functions and role in microcirculatory failure during severe sepsis. *Intensive Care Medicine*, 36(8), 1286-1298. doi:10.1007/s00134-010-1893-6
- Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4), 783-801. doi:10.1016/j.cell.2006.02.015
- Alphonsus, C.S. & Rodseth, R.N. (2014). The endothelial glycocalyx: a review of the vascular barrier. *Anaesthesia*, 69(7), 777-784. doi:10.1111/anae.12661
- Anand, D., Ray, S., Srivastava, L.M. & Bhargava, S. (2016). Evolution of serum hyaluronan and syndecan levels in prognosis of sepsis patients. *Clin Biochem*, 49(10-11), 768-776. doi:10.1016/j.clinbiochem.2016.02.014
- Angus, D.C. (2011). The search for effective therapy for sepsis: back to the drawing board? *Jama*, 306(23), 2614-2615. doi:10.1001/jama.2011.1853
- Angus, D.C. & van der Poll, T. (2013). Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*, 369(9), 840-851. doi:10.1056/NEJMra1208623
- Annecke, T., Chappell, D., Chen, C., Jacob, M., Welsch, U., Sommerhoff, C.P., . . . Becker, B.F. (2010). Sevoflurane preserves the endothelial glycocalyx against ischaemia-reperfusion injury. *British Journal of Anaesthesia*, 104(4), 414-421. doi:10.1093/bja/aeq019
- Annecke, T., Fischer, J., Hartmann, H., Tschoep, J., Rehm, M., Conzen, P., . . . Becker, B.F. (2011). Shedding of the coronary endothelial glycocalyx: effects of hypoxia/reoxygenation vs ischaemia/reperfusion. *Br J Anaesth*, 107(5), 679-686. doi:10.1093/bja/aer269
- Arthur, A., McCall, P.J., Jolly, L., Kinsella, J., Kirk, A. & Shelley, B.G. (2016). Endothelial glycocalyx layer shedding following lung resection. *Biomark Med*, 10(10), 1033-1038. doi:10.2217/bmm-2016-0163
- Ballester, M., Llorens, J., Garcia-de-la-Asuncion, J., Perez-Griera, J., Tebar, E., Martinez-Leon, J., . . . Juez, M. (2011). Myocardial oxidative stress protection by sevoflurane vs. propofol: a randomised controlled study in patients undergoing off-pump coronary artery bypass graft surgery. *Eur J Anaesthesiol*, 28(12), 874-881. doi:10.1097/EJA.0b013e32834bea2a
- Bashandy, G.M. (2015). Implications of recent accumulating knowledge about endothelial glycocalyx on anesthetic management. *J Anesth*, 29(2), 269-278. doi:10.1007/s00540-014-1887-6
- Bateman, R.M., Sharpe, M.D. & Ellis, C.G. (2003). Bench-to-bedside review: Microvascular dysfunction in sepsis – hemodynamics, oxygen transport, and nitric oxide. *Critical Care*, 7(5), 359. doi:10.1186/cc2353
- Becker, B.F. (1993). Towards the physiological function of uric acid. *Free Radic Biol Med*, 14(6), 615-631.
- Becker, B.F., Chappell, D., Bruegger, D., Annecke, T. & Jacob, M. (2010a). Therapeutic strategies targeting the endothelial glycocalyx: acute deficits, but great potential. *Cardiovasc Res*, 87(2), 300-310. doi:10.1093/cvr/cvq137
- Becker, B.F., Chappell, D. & Jacob, M. (2010b). Endothelial glycocalyx and coronary vascular permeability: the fringe benefit. *Basic Research in Cardiology*, 105(6), 687-701. doi:10.1007/s00395-010-0118-z

- Becker, B.F., Jacob, M., Leipert, S., Salmon, A.H. & Chappell, D. (2015). Degradation of the endothelial glycocalyx in clinical settings: searching for the sheddases. *Br J Clin Pharmacol*, *80*(3), 389-402. doi:10.1111/bcp.12629
- Bedirli, N., Demirtas, C.Y., Akkaya, T., Salman, B., Alper, M., Bedirli, A. & Pasaoglu, H. (2012). Volatile anesthetic preconditioning attenuated sepsis induced lung inflammation. *J Surg Res*, *178*(1), e17-23. doi:10.1016/j.jss.2011.12.037
- Belavic, M., Sotosek Tokmadzic, V., Fisic, E., Brozovic Krijan, A., Strikic, N., Loncaric Katusin, M. & Zunic, J. (2018). The effect of various doses of infusion solutions on the endothelial glycocalyx layer in laparoscopic cholecystectomy patients. *Minerva Anesthesiol*. doi:10.23736/s0375-9393.18.12150-x
- Bennett, H.S. (1963). MORPHOLOGICAL ASPECTS OF EXTRACELLULAR POLYSACCHARIDES. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, *11*(1), 14-23. doi:10.1177/11.1.14
- Beresewicz, A., Czarnowska, E. & Maczewski, M. (1998). Ischemic preconditioning and superoxide dismutase protect against endothelial dysfunction and endothelium glycocalyx disruption in the postischemic guinea-pig hearts. *Mol Cell Biochem*, *186*(1-2), 87-97.
- Bianchi, M.E. (2007). DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol*, *81*(1), 1-5. doi:10.1189/jlb.0306164
- Bignami, E., Biondi-Zoccai, G., Landoni, G., Fochi, O., Testa, V., Sheiban, I., . . . Zangrillo, A. (2009). Volatile anesthetics reduce mortality in cardiac surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, *23*(5), 594-599. doi:10.1053/j.jvca.2009.01.022
- Bio-Rad Laboratories, I. (2018). ELISA Types. Retrieved 24.03.2018 <https://static.bio-rad-antibodies.com/2017/an-introduction-to-elisa/fig4-overview-of-direct-sandwich-elisa.png>
- Bland, J.H. & Lowenstein, E. (1976). Halothane-induced decrease in experimental myocardial ischemia in the non-failing canine heart. *Anesthesiology*, *45*(3), 287-293.
- Botero, J.H. & Perez, M.C.F. (2012). The History of Sepsis from Ancient Egypt to the XIX Century. doi:10.5772/51484
- Brettner, F., Chappell, D., Nebelsiek, T., Hauer, D., Schelling, G., Becker, B.F., . . . Weis, F. (2018). Preinterventional hydrocortisone sustains the endothelial glycocalyx in cardiac surgery. *Clin Hemorheol Microcirc*. doi:10.3233/ch-180384
- Broekhuizen, L.N., Mooij, H.L., Kastelein, J.J.P., Stroes, E.S.G., Vink, H. & Nieuwdorp, M. (2009). Endothelial glycocalyx as potential diagnostic and therapeutic target in cardiovascular disease. *Current Opinion in Lipidology*, *20*(1), 57-62. doi:10.1097/MOL.0b013e328321b587
- Bruegger, D., Brettner, F., Rossberg, I., Nussbaum, C., Kowalski, C., Januszewska, K., . . . Chappell, D. (2015). Acute degradation of the endothelial glycocalyx in infants undergoing cardiac surgical procedures. *Ann Thorac Surg*, *99*(3), 926-931. doi:10.1016/j.athoracsur.2014.10.013
- Bruegger, D., Jacob, M., Rehm, M., Loetsch, M., Welsch, U., Conzen, P. & Becker, B.F. (2005). Atrial natriuretic peptide induces shedding of endothelial glycocalyx in coronary vascular bed of guinea pig hearts. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, *289*(5), H1993-H1999. doi:10.1153/ajpheart.00218.2005
- Brunn, G.J., Bungum, M.K., Johnson, G.B. & Platt, J.L. (2005). Conditional signaling by Toll-like receptor 4. *Faseb j*, *19*(7), 872-874. doi:10.1096/fj.04-3211fje
- Bulte, C.S., Boer, C. & Loer, S.A. (2015). Perioperative myocardial perfusion: an anesthesiologists' concern? *Curr Opin Anaesthesiol*, *28*(1), 101-106. doi:10.1097/aco.0000000000000145
- Burke-Gaffney, A. & Evans, T.W. (2012). Lest we forget the endothelial glycocalyx in sepsis. *Crit Care*, *16*(2), 121. doi:10.1186/cc11239
- Cabrales, P., Vazquez, B.Y., Tsai, A.G. & Intaglietta, M. (2007). Microvascular and capillary perfusion following glycocalyx degradation. *J Appl Physiol (1985)*, *102*(6), 2251-2259. doi:10.1152/jappphysiol.01155.2006

- Calvano, S.E., Xiao, W., Richards, D.R., Felciano, R.M., Baker, H.V., Cho, R.J., . . . Lowry, S.F. (2005). A network-based analysis of systemic inflammation in humans. *Nature*, *437*(7061), 1032-1037. doi:10.1038/nature03985
- Casanova, J., Simon, C., Vara, E., Sanchez, G., Rancan, L., Abubakra, S., . . . Garutti, I. (2016). Sevoflurane anesthetic preconditioning protects the lung endothelial glycocalyx from ischemia reperfusion injury in an experimental lung autotransplant model. *J Anesth*, *30*(5), 755-762. doi:10.1007/s00540-016-2195-0
- Celes, M.R.N., Prado, C.M. & Rossi, M.A. (2013). Sepsis: Going to the Heart of the Matter. *Pathobiology*, *80*(2), 70-86.
- Chai, J., Long, B., Liu, X., Li, Y., Han, N., Zhao, P. & Chen, W. (2015). Effects of sevoflurane on tight junction protein expression and PKC- $\alpha$  translocation after pulmonary ischemia-reperfusion injury. *Experimental & Molecular Medicine*, *47*, e167. doi:10.1038/emm.2015.27
- Chappell, D., Heindl, B., Jacob, M., Annecke, T., Chen, C., Rehm, M., . . . Becker, B.F. (2011). Sevoflurane Reduces Leukocyte and Platelet Adhesion after Ischemia-Reperfusion by Protecting the Endothelial Glycocalyx. *Anesthesiology*, *115*(3), 483-491. doi:10.1097/ALN.0b013e3182289988
- Chappell, D., Hofmann-Kiefer, K., Jacob, M., Rehm, M., Briegel, J., Welsch, U., . . . Becker, B.F. (2009a). TNF-alpha induced shedding of the endothelial glycocalyx is prevented by hydrocortisone and antithrombin. *Basic Research in Cardiology*, *104*(1), 78-89. doi:10.1007/s00395-008-0749-5
- Chappell, D., Jacob, M., Becker, B.F., Hofmann-Kiefer, K., Conzen, P. & Rehm, M. (2008a). Expedition glycocalyx. A newly discovered "Great Barrier Reef". *Anaesthetist*, *57*(10), 959-969. doi:10.1007/s00101-008-1445-4
- Chappell, D., Jacob, M., Hofmann-Kiefer, K., Conzen, P. & Rehm, M. (2008b). A rational approach to perioperative fluid management. *Anesthesiology*, *109*(4), 723-740. doi:10.1097/ALN.0b013e3181863117
- Chappell, D., Jacob, M., Hofmann-Kiefer, K., Rehm, M., Conzen, P., Welsch, U. & Becker, B.F. (2006). Hydrocortisone preserves the vascular barrier by protecting the endothelial glycocalyx. *Journal of Vascular Research*, *43*(6), 563-564.
- Chappell, D., Jacob, M., Hofmann-Kiefer, K., Rehm, M., Welsch, U., Conzen, P. & Becker, B.F. (2009b). Antithrombin reduces shedding of the endothelial glycocalyx following ischaemia/reperfusion. *Cardiovasc Res*, *83*(2), 388-396. doi:10.1093/cvr/cvp097
- Chappell, D., Jacob, M., Paul, O., Rehm, M., Welsch, U., Stoeckelhuber, M., . . . Becker, B.F. (2009c). The glycocalyx of the human umbilical vein endothelial cell: an impressive structure ex vivo but not in culture. *Circ Res*, *104*(11), 1313-1317. doi:10.1161/circresaha.108.187831
- Chappell, D., Jacob, M., Rehm, M., Stoeckelhuber, M., Welsch, U., Conzen, P. & Becker, B.F. (2008c). Heparinase selectively sheds heparan sulphate from the endothelial glycocalyx. *Biological Chemistry*, *389*(1), 79-82. doi:10.1515/bc.2008.005
- Chappell, D., Westphal, M. & Jacob, M. (2009d). The impact of the glycocalyx on microcirculatory oxygen distribution in critical illness. *Current Opinion in Anesthesiology*, *22*(2), 155-162. doi:10.1097/ACO.0b013e328328d1b6
- Chelazzi, C., Villa, G., Mancinelli, P., De Gaudio, A.R. & Adembri, C. (2015). Glycocalyx and sepsis-induced alterations in vascular permeability. *Crit Care*, *19*, 26. doi:10.1186/s13054-015-0741-z
- Chen, C., Chappell, D., Annecke, T., Conzen, P., Jacob, M., Welsch, U., . . . Becker, B.F. (2016). Sevoflurane mitigates shedding of hyaluronan from the coronary endothelium, also during ischemia/reperfusion: an ex vivo animal study. *Hypoxia (Auckl)*, *4*, 81-90. doi:10.2147/HP.S98660

- Chen, S., He, Y., Hu, Z., Lu, S., Yin, X., Ma, X., . . . Jin, G. (2017). Heparanase Mediates Intestinal Inflammation and Injury in a Mouse Model of Sepsis. *J Histochem Cytochem*, 22155417692536. doi:10.1369/0022155417692536
- Chousterman, B.G., Swirski, F.K. & Weber, G.F. (2017). Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. *Semin Immunopathol*, 39(5), 517-528. doi:10.1007/s00281-017-0639-8
- Cohen, J., Vincent, J.L., Adhikari, N.K., Machado, F.R., Angus, D.C., Calandra, T., . . . Pelfrene, E. (2015). Sepsis: a roadmap for future research. *Lancet Infect Dis*, 15(5), 581-614. doi:10.1016/s1473-3099(15)70112-x
- Colburn, P., Kobayashi, E. & Buonassisi, V. (1994). Depleted level of heparan sulfate proteoglycan in the extracellular matrix of endothelial cell cultures exposed to endotoxin. *J Cell Physiol*, 159(1), 121-130. doi:10.1002/jcp.1041590116
- Copley, A.L. (1974). Hemorheological aspects of the endothelium-plasma interface. *Microvasc Res*, 8(2), 192-212.
- Crouser, E.D. & Matthay, M.A. (2017). Endothelial Damage During Septic Shock: Significance and Implications for Future Therapies. *Chest*, 152(1), 1-3. doi:10.1016/j.chest.2017.02.016
- Curry, F.E. & Adamson, R.H. (2012). Endothelial glycocalyx: permeability barrier and mechanosensor. *Ann Biomed Eng*, 40(4), 828-839. doi:10.1007/s10439-011-0429-8
- Dane, M.J.C., van den Berg, B.M., Lee, D.H., Boels, M.G.S., Tiemeier, G.L., Avramut, M.C., . . . Rabelink, T.J. (2015). A microscopic view on the renal endothelial glycocalyx. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 308(9), F956.
- Danielli, J.F. (1940). Capillary permeability and oedema in the perfused frog. *J Physiol*, 98(1), 109-129.
- De Conno, E., Steurer, M.P., Wittlinger, M., Zalunardo, M.P., Weder, W., Schneiter, D., . . . Beck-Schimmer, B. (2009). Anesthetic-induced improvement of the inflammatory response to one-lung ventilation. *Anesthesiology*, 110(6), 1316-1326. doi:10.1097/ALN.0b013e3181a10731
- De Hert, S.G., Van der Linden, P.J., Cromheecke, S., Meeus, R., Nelis, A., Van Reeth, V., . . . Rodrigus, I.E. (2004). Cardioprotective properties of sevoflurane in patients undergoing coronary surgery with cardiopulmonary bypass are related to the modalities of its administration. *Anesthesiology*, 101(2), 299-310.
- DeFranco, A.L., Locksley, R.M. & Robertson, M. (2007). *Immunity : the immune response in infectious inflammatory disease*. Oxford: Oxford University Press.
- Deitch, E.A. (1998). Animal models of sepsis and shock: a review and lessons learned. *Shock*, 9(1), 1-11.
- Desjardins, C. & Duling, B.R. (1990). Heparinase treatment suggests a role for the endothelial cell glycocalyx in regulation of capillary hematocrit. *Am J Physiol*, 258(3 Pt 2), H647-654.
- Devaraj, S., Yun, J.M., Adamson, G., Galvez, J. & Jialal, I. (2009). C-reactive protein impairs the endothelial glycocalyx resulting in endothelial dysfunction. *Cardiovasc Res*, 84(3), 479-484. doi:10.1093/cvr/cvp249
- Diebel, M.E., Martin, J.V., Liberati, D.M. & Diebel, L.N. (2018). The temporal response and mechanism of action of tranexamic acid in endothelial glycocalyx degradation. *J Trauma Acute Care Surg*, 84(1), 75-80. doi:10.1097/ta.0000000000001726
- Donati, A., Damiani, E., Domizi, R., Romano, R., Adrario, E., Pelaia, P., . . . Singer, M. (2013). Alteration of the sublingual microvascular glycocalyx in critically ill patients. *Microvasc Res*, 90, 86-89. doi:10.1016/j.mvr.2013.08.007
- Döring, H.D., H. (1985). Das isolierte perfundierte Warmblüter-Herz nach Langendorff. *Biomesstechnik-Verlag*.
- Eliseyeva, M.R., PhD & ScD. (2013). Endothelium: A Long Road from Mystery to Discovery. *International Journal of BioMedicine*.

- Eskens, B.J., Zuurbier, C.J., van Haare, J., Vink, H. & van Teeffelen, J.W. (2013). Effects of two weeks of metformin treatment on whole-body glycocalyx barrier properties in db/db mice. *Cardiovasc Diabetol*, 12, 175. doi:10.1186/1475-2840-12-175
- Fåhræus, R. & Lindqvist, T. (1931). THE VISCOSITY OF THE BLOOD IN NARROW CAPILLARY TUBES. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 96(3), 562-568. doi:10.1152/ajplegacy.1931.96.3.562
- Fink, M.P. (2014). Animal models of sepsis. *Virulence*, 5(1), 143-153. doi:10.4161/viru.26083
- Fleischmann, C., Hartmann, M., Hartog, C.S., Welte, T., Heublein, S., Thomas-Rueddel, D., . . . Reinhart, K. (2015). Epidemiology of Sepsis in Germany: Incidence, Mortality And Associated Costs of Care 2007-2013. *Intensive Care Med Exp*, 3(Suppl 1), A50. doi:10.1186/2197-425X-3-S1-A50
- Fleisher, L.A., Beckman, J.A., Brown, K.A., Calkins, H., Chaikof, E., Fleischmann, K.E., . . . Yancy, C.W. (2007). ACC/AHA 2007 guidelines on perioperative cardiovascular evaluation and care for noncardiac surgery: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 2002 Guidelines on Perioperative Cardiovascular Evaluation for Noncardiac Surgery): developed in collaboration with the American Society of Echocardiography, American Society of Nuclear Cardiology, Heart Rhythm Society, Society of Cardiovascular Anesthesiologists, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society for Vascular Medicine and Biology, and Society for Vascular Surgery. *Circulation*, 116(17), e418-499. doi:10.1161/circulationaha.107.185699
- Floer, M., Gotte, M., Wild, M.K., Heidemann, J., Gassar, E.S., Domschke, W., . . . Kucharzik, T. (2010). Enoxaparin improves the course of dextran sodium sulfate-induced colitis in syndecan-1-deficient mice. *Am J Pathol*, 176(1), 146-157. doi:10.2353/ajpath.2010.080639
- Flynn, A.J., Dengerink, H.A. & Wright, J.W. (1988). Blood pressure in resting, anesthetized and noise-exposed guinea pigs. *Hear Res*, 34(2), 201-205.
- Forster, H., Wicarkzyk, C. & Dudziak, R. (1981). [Determination of the plasma elimination of hydroxyethyl starch and dextran using improved analytical methods]. *Infusionsther Klin Ernahr*, 8(2), 88-94.
- Friedman, G., Silva, E. & Vincent, J.L. (1998). Has the mortality of septic shock changed with time. *Crit Care Med*, 26(12), 2078-2086.
- Fry, B.C., Roy, T.K. & Secomb, T.W. (2013). Capillary recruitment in a theoretical model for blood flow regulation in heterogeneous microvessel networks. *Physiological Reports*, 1(3), e00050. doi:10.1002/phy2.50
- Giantsos-Adams, K., Lopez-Quintero, V., Kopeckova, P., Kopecek, J., Tarbell, J.M. & Dull, R. (2011). Study of the therapeutic benefit of cationic copolymer administration to vascular endothelium under mechanical stress. *Biomaterials*, 32(1), 288-294. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.08.092
- Giantsos-Adams, K.M., Koo, A.J., Song, S., Sakai, J., Sankaran, J., Shin, J.H., . . . Dewey, C.F., Jr. (2013). Heparan Sulfate Regrowth Profiles Under Laminar Shear Flow Following Enzymatic Degradation. *Cell Mol Bioeng*, 6(2), 160-174. doi:10.1007/s12195-013-0273-z
- Goldberg, R., Meirovitz, A., Hirshoren, N., Bulvik, R., Binder, A., Rubinstein, A.M. & Elkin, M. (2013). Versatile role of heparanase in inflammation. *Matrix Biol*, 32(5), 234-240. doi:10.1016/j.matbio.2013.02.008
- Goldwasser, P. & Feldman, J. (1997). Association of serum albumin and mortality risk. *J Clin Epidemiol*, 50(6), 693-703.

- Gong, B., Wu, Z. & Li, Z. (2016). Efficacy and safety of nesiritide in patients with decompensated heart failure: a meta-analysis of randomised trials. *BMJ Open*, 6(1), e008545. doi:10.1136/bmjopen-2015-008545
- Goodsell, D. (2001). Molecule of the Month, Antibodies (Publication no. doi:10.2210/rcsb\_pdb/mom\_2001\_9). Retrieved 24.03.2018 <http://pdb101.rcsb.org/motm/21>
- Goodsell, D. (2011a). Molecule of the Month, Integrin (Publication no. doi:10.2210/rcsb\_pdb/mom\_2011\_2). Retrieved 24.03.2018 <http://pdb101.rcsb.org/motm/134>
- Goodsell, D. (2011b). Molecule of the Month, Toll-like Receptors (Publication no. 10.2210/rcsb\_pdb/mom\_2011\_11). Retrieved 26.03.2018 <http://pdb101.rcsb.org/motm/143>
- Gouverneur, M., Spaan, J.A., Pannekoek, H., Fontijn, R.D. & Vink, H. (2006). Fluid shear stress stimulates incorporation of hyaluronan into endothelial cell glycocalyx. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 290(1), H458-452. doi:10.1152/ajpheart.00592.2005
- Granja, T.F., Kohler, D., Schad, J., de Oliveira, C.B., Konrad, F., Hoch-Gutbrod, M., . . . Straub, A. (2016). Adenosine Receptor Adora2b Plays a Mechanistic Role in the Protective Effect of the Volatile Anesthetic Sevoflurane during Liver Ischemia/Reperfusion. *Anesthesiology*, 125(3), 547-560. doi:10.1097/aln.0000000000001234
- Gross, D. (2009). *Animal models in cardiovascular research*: Springer Science & Business Media.
- Hanley, P.J. & Daut, J. (2005). K(ATP) channels and preconditioning: a re-examination of the role of mitochondrial K(ATP) channels and an overview of alternative mechanisms. *J Mol Cell Cardiol*, 39(1), 17-50. doi:10.1016/j.yjmcc.2005.04.002
- Hayashida, K., Parks, W.C. & Park, P.W. (2009). Syndecan-1 shedding facilitates the resolution of neutrophilic inflammation by removing sequestered CXC chemokines. *Blood*, 114(14), 3033-3043. doi:10.1182/blood-2009-02-204966
- Haywood-Watson, R.J., Holcomb, J.B., Gonzalez, E.A., Peng, Z.L., Pati, S., Park, P.W., . . . Kozar, R.A. (2011). Modulation of Syndecan-1 Shedding after Hemorrhagic Shock and Resuscitation. *Plos One*, 6(8). doi:10.1371/journal.pone.0023530
- Henrich, M., Gruss, M. & Weigand, M.A. (2010). Sepsis-Induced Degradation of Endothelial Glycocalyx. *ScientificWorldJournal*, 10, 917-923. doi:10.1100/tsw.2010.88
- Henry, C.B.S. & Duling, B.R. (1999). Permeation of the luminal capillary glycocalyx is determined by hyaluronan. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 277(2), H508-H514.
- Herrmann, I.K., Castellon, M., Schwartz, D.E., Hasler, M., Urner, M., Hu, G., . . . Beck-Schimmer, B. (2013). Volatile anesthetics improve survival after cecal ligation and puncture. *Anesthesiology*, 119(4), 901-906. doi:10.1097/ALN.0b013e3182a2a38c
- His, W. (1865). *Die Häute und Höhlen des Körpers*. Basel: Schwighauser.
- Hofmann-Kiefer, K.F., Kemming, G.I., Chappell, D., Flondor, M., Kisch-Wedel, H., Hauser, A., . . . Rehm, M. (2009). Serum heparan sulfate levels are elevated in endotoxemia. *Eur J Med Res*, 14, 526-531.
- Hofstetter, C., Boost, K.A., Flondor, M., Basagan-Mogol, E., Betz, C., Homann, M., . . . Zwissler, B. (2007). Anti-inflammatory effects of sevoflurane and mild hypothermia in endotoxemic rats. *Acta Anaesthesiol Scand*, 51(7), 893-899. doi:10.1111/j.1399-6576.2007.01353.x
- Huang, Y., Tan, Q., Chen, R., Cao, B. & Li, W. (2015). Sevoflurane prevents lipopolysaccharide-induced barrier dysfunction in human lung microvascular endothelial cells: Rho-mediated alterations of VE-cadherin. *Biochem Biophys Res Commun*, 468(1-2), 119-124. doi:10.1016/j.bbrc.2015.10.150

- Huffmyer, J. & Raphael, J. (2009). Physiology and pharmacology of myocardial preconditioning and postconditioning. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth*, *13*(1), 5-18. doi:10.1177/1089253208330709
- Inagawa, R., Okada, H., Takemura, G., Suzuki, K., Takada, C., Yano, H., . . . Ogura, S. (2018). Ultrastructural Alteration of Pulmonary Capillary Endothelial Glycocalyx During Endotoxemia. *Chest*, *154*(2), 317-325. doi:10.1016/j.chest.2018.03.003
- Ince, C., Mayeux, P.R., Nguyen, T., Gomez, H., Kellum, J.A., Ospina-Tascon, G.A., . . . Workgroup, A.X. (2016). The Endothelium in Sepsis. *Shock*, *45*(3), 259-270. doi:10.1097/SHK.0000000000000473
- Iwashyna, T.J., Ely, E.W., Smith, D.M. & Langa, K.M. (2010). Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. *Jama*, *304*(16), 1787-1794. doi:10.1001/jama.2010.1553
- Jacob, M., Bruegger, D., Rehm, M., Welsch, U., Conzen, P. & Becker, B.F. (2006). Contrasting effects of colloid and crystalloid resuscitation fluids on cardiac vascular permeability. *Anesthesiology*, *104*(6), 1223-1231.
- Jacob, M., Paul, O., Mehringer, L., Chappell, D., Rehm, M., Welsch, U., . . . Becker, B.F. (2009). Albumin Augmentation Improves Condition of Guinea Pig Hearts After 4 hr of Cold Ischemia. *Transplantation*, *87*(7), 956-965. doi:10.1097/TP.0b013e31819c83b5
- Jacob, M., Rehm, M., Loetsch, M., Paul, J.O., Bruegger, D., Welsch, U., . . . Becker, B.F. (2007). The endothelial glycocalyx prefers albumin for evoking shear stress-induced, nitric oxide-mediated coronary dilatation. *Journal of Vascular Research*, *44*(6), 435-443. doi:10.1159/000104871
- Jacob, M., Saller, T., Chappell, D., Rehm, M., Welsch, U. & Becker, B.F. (2013). Physiological levels of A-, B- and C-type natriuretic peptide shed the endothelial glycocalyx and enhance vascular permeability. *Basic Res Cardiol*, *108*(3), 347. doi:10.1007/s00395-013-0347-z
- Jakobsen, C.J., Berg, H., Hindsholm, K.B., Faddy, N. & Sloth, E. (2007). The influence of propofol versus sevoflurane anesthesia on outcome in 10,535 cardiac surgical procedures. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, *21*(5), 664-671. doi:10.1053/j.jvca.2007.03.002
- Jellinge, M.E., Henriksen, D.P., Hallas, P. & Brabrand, M. (2014). Hypoalbuminemia is a strong predictor of 30-day all-cause mortality in acutely admitted medical patients: a prospective, observational, cohort study. *Plos One*, *9*(8), e105983. doi:10.1371/journal.pone.0105983
- Johansen, M.E., Johansson, P.I., Ostrowski, S.R., Bestle, M.H., Hein, L., Jensen, A.L., . . . Jensen, J.U. (2015). Profound endothelial damage predicts impending organ failure and death in sepsis. *Semin Thromb Hemost*, *41*(1), 16-25. doi:10.1055/s-0034-1398377
- Johnson, G.B., Brunn, G.J., Kodaira, Y. & Platt, J.L. (2002). Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4. *J Immunol*, *168*(10), 5233-5239.
- Jung, C., Fuernau, G., Muench, P., Desch, S., Eitel, I., Schuler, G., . . . Thiele, H. (2015). Impairment of the endothelial glycocalyx in cardiogenic shock and its prognostic relevance. *Shock*, *43*(5), 450-455. doi:10.1097/SHK.0000000000000329
- Jung, F. & Rampling, M. (2016). Role of blood viscosity in the microcirculation. *Clin Hemorheol Microcirc*, *64*(3), 251-254. doi:10.3233/ch-168108
- Kandasamy, K., Escue, R., Manna, J., Adebisi, A. & Parthasarathi, K. (2015). Changes in endothelial connexin 43 expression inversely correlate with microvessel permeability and VE-cadherin expression in endotoxin-challenged lungs. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, *309*(6), L584-L592. doi:10.1152/ajplung.00211.2014

- Kaukonen, K.M., Bailey, M., Suzuki, S., Pilcher, D. & Bellomo, R. (2014). Mortality related to severe sepsis and septic shock among critically ill patients in Australia and New Zealand, 2000-2012. *Jama*, 311(13), 1308-1316. doi:10.1001/jama.2014.2637
- Kawamura, T., Kadosaki, M., Nara, N., Kaise, A., Suzuki, H., Endo, S., . . . Inada, K. (2006). Effects of sevoflurane on cytokine balance in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 20(4), 503-508. doi:10.1053/j.jvca.2006.01.011
- Kilger, E., Weis, F., Briegel, J., Frey, L., Goetz, A.E., Reuter, D., . . . Peter, K. (2003). Stress doses of hydrocortisone reduce severe systemic inflammatory response syndrome and improve early outcome in a risk group of patients after cardiac surgery. *Crit Care Med*, 31(4), 1068-1074. doi:10.1097/01.ccm.0000059646.89546.98
- Köhler, M., Kaufmann, I., Briegel, J., Jacob, M., Goeschl, J., Rachinger, W., . . . Rehm, M. (2011). The endothelial glycocalyx degenerates with increasing sepsis severity. *Critical Care*, 15(Suppl 3), P22-P22. doi:10.1186/cc10391
- Kojima, T., Takagi, A., Maeda, M., Segawa, T., Shimizu, A., Yamamoto, K., . . . Saito, H. (2001). Plasma levels of syndecan-4 (ryudocan) are elevated in patients with acute myocardial infarction. *Thromb Haemost*, 85(5), 793-799.
- Kolarova, H., Ambrozova, B., Svihalkova Sindlerova, L., Klinke, A. & Kubala, L. (2014). Modulation of endothelial glycocalyx structure under inflammatory conditions. *Mediators Inflamm*, 2014, 694312. doi:10.1155/2014/694312
- Krebs, H.A. & Henseleit, K. (1932). Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. II. *Klinische Wochenschrift*, 11(27), 1137-1139. doi:10.1007/BF01758220
- Landoni, G., Fochi, O., Tritapepe, L., Guarracino, F., Belloni, I., Bignami, E. & Zangrillo, A. (2009). Cardiac protection by volatile anesthetics. A review. *Minerva Anestesiol*, 75(5), 269-273.
- Langendorff, O. (1895). Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 61(6), 291-332.
- Lee, W.L. & Liles, W.C. (2011). Endothelial activation, dysfunction and permeability during severe infections. *Curr Opin Hematol*, 18(3), 191-196. doi:10.1097/MOH.0b013e328345a3d1
- Lee, W.L. & Slutsky, A.S. (2010). Sepsis and endothelial permeability. *N Engl J Med*, 363(7), 689-691. doi:10.1056/NEJMcibr1007320
- Levick, J.R. & Michel, C.C. (2010). Microvascular fluid exchange and the revised Starling principle. *Cardiovasc Res*, 87(2), 198-210. doi:10.1093/cvr/cvq062
- Li, J., Yuan, T., Zhao, X., Lv, G.Y. & Liu, H.Q. (2016). Protective effects of sevoflurane in hepatic ischemia-reperfusion injury. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 29(2), 300-307. doi:10.1177/0394632016638346
- Li, J.P. & Vlodaysky, I. (2009). Heparin, heparan sulfate and heparanase in inflammatory reactions. *Thrombosis and Haemostasis*, 102(5), 823-828. doi:10.1160/th09-02-0091
- Liao, R., Podesser, B.K. & Lim, C.C. (2012). The continuing evolution of the Langendorff and ejecting murine heart: new advances in cardiac phenotyping. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 303(2), H156-167. doi:10.1152/ajpheart.00333.2012
- Libby, P. (2012). History of Discovery: Inflammation in Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 32(9), 2045-2051. doi:10.1161/ATVBAHA.108.179705
- Lipowsky, H.H. (2012). The endothelial glycocalyx as a barrier to leukocyte adhesion and its mediation by extracellular proteases. *Ann Biomed Eng*, 40(4), 840-848. doi:10.1007/s10439-011-0427-x
- Liu, R., Ishibe, Y. & Ueda, M. (2000). Isoflurane-sevoflurane administration before ischemia attenuates ischemia-reperfusion-induced injury in isolated rat lungs. *Anesthesiology*, 92(3), 833-840.

- Liu, X.-Y., Xu, H.-X., Li, J.-K., Zhang, D., Ma, X.-H., Huang, L.-N., . . . Wang, X.-Z. (2018). Neferine Protects Endothelial Glycocalyx via Mitochondrial ROS in Lipopolysaccharide-Induced Acute Respiratory Distress Syndrome. *Frontiers in Physiology*, *9*, 102. doi:10.3389/fphys.2018.00102
- Loveridge, R. & Schroeder, F. (2010). Anaesthetic preconditioning. *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain*, *10*(2), 38-42. doi:10.1093/bjaceaccp/mkq005
- Lucchinetti, E., Aguirre, J., Feng, J., Zhu, M., Suter, M., Spahn, D.R., . . . Zaugg, M. (2007). Molecular evidence of late preconditioning after sevoflurane inhalation in healthy volunteers. *Anesth Analg*, *105*(3), 629-640. doi:10.1213/01.ane.0000278159.88636.aa
- Luft, J.H. (1966). Fine structures of capillary and endocapillary layer as revealed by ruthenium red. *Fed Proc*, *25*(6), 1773-1783.
- Lurati Buse, G.A., Schumacher, P., Seeberger, E., Studer, W., Schuman, R.M., Fassel, J., . . . Seeberger, M.D. (2012). Randomized comparison of sevoflurane versus propofol to reduce perioperative myocardial ischemia in patients undergoing noncardiac surgery. *Circulation*, *126*(23), 2696-2704. doi:10.1161/circulationaha.112.126144
- Marechal, X., Favory, R., Joulin, O., Montaigne, D., Hassoun, S., Decoster, B., . . . Neviere, R. (2008). Endothelial glycocalyx damage during endotoxemia coincides with microcirculatory dysfunction and vascular oxidative stress. *Shock*, *29*(5), 572-576. doi:10.1097/SHK.0b013c318157e926
- Marik, P.E. (2014). Early management of severe sepsis: concepts and controversies. *Chest*, *145*(6), 1407-1418. doi:10.1378/chest.13-2104
- Marshall, J.C. (2005). Lipopolysaccharide: An Endotoxin or an Exogenous Hormone? *Clinical Infectious Diseases*, *41*(Supplement\_7), S470-S480. doi:10.1086/432000
- Marshall, J.C. (2014). Why have clinical trials in sepsis failed? *Trends Mol Med*, *20*(4), 195-203. doi:10.1016/j.molmed.2014.01.007
- Martin, J.V., Liberati, D.M. & Diebel, L.N. (2018). Excess sodium is deleterious on endothelial and glycocalyx barrier function: A microfluidic study. *J Trauma Acute Care Surg*. doi:10.1097/ta.0000000000001892
- Martin, L., De Santis, R., Koczera, P., Simons, N., Haase, H., Heinbockel, L., . . . Schuerholz, T. (2015). The Synthetic Antimicrobial Peptide 19-2.5 Interacts with Heparanase and Heparan Sulfate in Murine and Human Sepsis. *Plos One*, *10*(11), e0143583. doi:10.1371/journal.pone.0143583
- Martin, L., Derwall, M., Thiemermann, C. & Schurholz, T. (2017). [Heart in sepsis : Molecular mechanisms, diagnosis and therapy of septic cardiomyopathy]. *Anaesthesist*, *66*(7), 479-490. doi:10.1007/s00101-017-0329-x
- Martin, L., Koczera, P., Zechendorf, E. & Schuerholz, T. (2016). The Endothelial Glycocalyx: New Diagnostic and Therapeutic Approaches in Sepsis. *Biomed Res Int*, *2016*, 3758278. doi:10.1155/2016/3758278
- McLellan, S.A. & Walsh, T.S. (2004). Oxygen delivery and haemoglobin. *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain*, *4*(4), 123-126. doi:10.1093/bjaceaccp/mkh033
- McMurray, J.J., Packer, M., Desai, A.S., Gong, J., Lefkowitz, M.P., Rizkala, A.R., . . . Zile, M.R. (2014). Angiotensin-neprilysin inhibition versus enalapril in heart failure. *N Engl J Med*, *371*(11), 993-1004. doi:10.1056/NEJMoa1409077
- Menon, B.B., Kaiser-Marko, C., Spurr-Michaud, S., Tisdale, A.S. & Gipson, I.K. (2015). Suppression of Toll-like receptor-mediated innate immune responses at the ocular surface by the membrane-associated mucins MUC1 and MUC16. *Mucosal Immunol*, *8*(5), 1000-1008. doi:10.1038/mi.2014.127

- Mensah, S.A., Cheng, M.J., Homayoni, H., Plouffe, B.D., Coury, A.J. & Ebong, E.E. (2017). Regeneration of glycocalyx by heparan sulfate and sphingosine 1-phosphate restores inter-endothelial communication. *Plos One*, 12(10), e0186116. doi:10.1371/journal.pone.0186116
- Meuwese, M.C., Mooij, H.L., Nieuwdorp, M., van Lith, B., Marck, R., Vink, H., . . . Stroes, E.S. (2009). Partial recovery of the endothelial glycocalyx upon rosuvastatin therapy in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. *J Lipid Res*, 50(1), 148-153. doi:10.1194/jlr.P800025-JLR200
- Mio, Y., Uezono, S. & Kitahata, H. (2014). Anesthetic cardioprotection in relation to mitochondria: basic science. *Curr Pharm Des*, 20(36), 5673-5680.
- Mitchell, M. & King, M. (2013). *Theme: Physical Biology in Cancer. 3. The role of cell glycocalyx in vascular transport of circulating tumor cells* (Vol. 306).
- Molnar, C. & Gair, J. (2013). *Concepts of Biology: First Canadian Edition*.
- Mulivor, A.W. & Lipowsky, H.H. (2004). Inflammation- and ischemia-induced shedding of venular glycocalyx. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 286(5), H1672-H1680. doi:10.1152/ajpheart.00832.2003
- Mulivor, A.W. & Lipowsky, H.H. (2009). Inhibition of Glycan Shedding and Leukocyte-Endothelial Adhesion in Postcapillary Venules by Suppression of Matrixmetalloprotease Activity with Doxycycline. *Microcirculation*, 16(8), 657-666. doi:10.3109/10739680903133714
- Murry, C.E., Jennings, R.B. & Reimer, K.A. (1986). Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 74(5), 1124-1136.
- Mythen, M.G. (2012). The Glycocalyx and Colloids: Startling News or Sigma by Another Name? *Journal of the Intensive Care Society*, 13(3), 191-192. doi:10.1177/175114371201300303
- Nelson, A., Berkestedt, I. & Bodelsson, M. (2014). Circulating glycosaminoglycan species in septic shock. *Acta Anaesthesiol Scand*, 58(1), 36-43. doi:10.1111/aas.12223
- Nelson, A., Berkestedt, I., Schmidtchen, A., Ljunggren, L. & Bodelsson, M. (2008). Increased levels of glycosaminoglycans during septic shock: relation to mortality and the antibacterial actions of plasma. *Shock*, 30(6), 623-627. doi:10.1097/SHK.0b013e3181777da3
- Nelson, A., Johansson, J., Tyden, J. & Bodelsson, M. (2017). Circulating syndecans during critical illness. *Apmis*. doi:10.1111/apm.12662
- Neves, F.M., Meneses, G.C., Sousa, N.E., Menezes, R.R., Parahyba, M.C., Martins, A.M. & Liborio, A.B. (2015). Syndecan-1 in Acute Decompensated Heart Failure--Association With Renal Function and Mortality. *Circ J*, 79(7), 1511-1519. doi:10.1253/circj.CJ-14-1195
- Nieuwdorp, A., Melawese, M.C., Mooij, H.L., van Lieshout, M.H.P., Hayden, A., Levi, M., . . . Stroes, E.S.G. (2009). Tumor necrosis factor-alpha inhibition protects against endotoxin-induced endothelial glycocalyx perturbation. *Atherosclerosis*, 202(1), 296-303. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2008.03.024
- Nieuwdorp, M., Meuwese, M.C., Vink, H., Hoekstra, J.B.L., Kastelein, J.J.P. & Stroes, E.S.G. (2005). The endothelial glycocalyx: a potential barrier between health and vascular disease. *Current Opinion in Lipidology*, 16(5), 507-511. doi:10.1097/01.mol.0000181325.08926.9c
- Nieuwdorp, M., van Haften, T.W., Gouverneur, M.C., Mooij, H.L., van Lieshout, M.H., Levi, M., . . . Stroes, E.S. (2006). Loss of endothelial glycocalyx during acute hyperglycemia coincides with endothelial dysfunction and coagulation activation in vivo. *Diabetes*, 55(2), 480-486.
- Opal, S.M., Dellinger, R.P., Vincent, J.L., Masur, H. & Angus, D.C. (2014). The next generation of sepsis clinical trial designs: what is next after the demise of recombinant human activated protein C?\*. *Crit Care Med*, 42(7), 1714-1721. doi:10.1097/ccm.0000000000000325
- Oshima, K., Haeger, S.M., Hippensteel, J.A., Herson, P.S. & Schmidt, E.P. (2018). More than a biomarker: the systemic consequences of heparan sulfate fragments released during

- endothelial surface layer degradation (2017 Grover Conference Series). *Pulm Circ*, 8(1), 2045893217745786. doi:10.1177/2045893217745786
- Ostrowski, S.R. & Johansson, P.I. (2012). Endothelial glycocalyx degradation induces endogenous heparinization in patients with severe injury and early traumatic coagulopathy. *J Trauma Acute Care Surg*, 73(1), 60-66. doi:10.1097/TA.0b013e31825b5c10
- Padberg, J.S., Wiesinger, A., di Marco, G.S., Reuter, S., Grabner, A., Kentrup, D., . . . Kumpers, P. (2014). Damage of the endothelial glycocalyx in chronic kidney disease. *Atherosclerosis*, 234(2), 335-343. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2014.03.016
- Page, A.V. & Liles, W.C. (2013). Biomarkers of endothelial activation/dysfunction in infectious diseases. *Virulence*, 4(6), 507-516. doi:10.4161/viru.24530
- Pagel, P.S. & Crystal, G.J. (2018). The Discovery of Myocardial Preconditioning Using Volatile Anesthetics: A History and Contemporary Clinical Perspective. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 32(3), 1112-1134. doi:10.1053/j.jvca.2017.12.029
- Pahwa, R., Nallasamy, P. & Jialal, I. (2016). Toll-like receptors 2 and 4 mediate hyperglycemia induced macrovascular aortic endothelial cell inflammation and perturbation of the endothelial glycocalyx. *J Diabetes Complications*, 30(4), 563-572. doi:10.1016/j.jdiacomp.2016.01.014
- Patel, A., Laffan, M.A., Waheed, U. & Brett, S.J. (2014). Randomised trials of human albumin for adults with sepsis: systematic review and meta-analysis with trial sequential analysis of all-cause mortality. *BMJ*, 349, g4561. doi:10.1136/bmj.g4561
- Paulus, P., Jennewein, C. & Zacharowski, K. (2011). Biomarkers of endothelial dysfunction: can they help us deciphering systemic inflammation and sepsis? *Biomarkers*, 16 Suppl 1, S11-21. doi:10.3109/1354750X.2011.587893
- Peng, Z., Pati, S., Potter, D., Brown, R., Holcomb, J.B., Grill, R., . . . Kozar, R.A. (2013). Fresh frozen plasma lessens pulmonary endothelial inflammation and hyperpermeability after hemorrhagic shock and is associated with loss of syndecan 1. *Shock*, 40(3), 195-202. doi:10.1097/SHK.0b013e31829f91fc
- Pesonen, E., Keski-Nisula, J., Andersson, S., Palo, R., Salminen, J. & Suominen, P.K. (2016). High-dose methylprednisolone and endothelial glycocalyx in paediatric heart surgery. *Acta Anaesthesiol Scand*, 60(10), 1386-1394. doi:10.1111/aas.12785
- Pesonen, E., Passov, A., Andersson, S., Suojäranta, R., Niemi, T., Raivio, P., . . . Schramko, A. (2018). Glycocalyx Degradation and Inflammation in Cardiac Surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. doi:10.1053/j.jvca.2018.04.007
- Pinsky, M.R. & Schlichtig, R. (1990). Regional oxygen delivery in oxygen supply-dependent states. *Intensive Care Medicine*, 16(2), S169-S171. doi:10.1007/BF01785248
- Potter, D.R., Jiang, J. & Damiano, E.R. (2009). The Recovery Time Course of the Endothelial Cell Glycocalyx In Vivo and Its Implications In Vitro. *Circulation Research*, 104(11), 1318-1325. doi:10.1161/circresaha.108.191585
- Pries, A.R., Secomb, T.W. & Gaehtgens, P. (2000). The endothelial surface layer. *Pflugers Arch*, 440(5), 653-666. doi:10.1007/s004240000307
- Radeva, M.Y. & Waschke, J. (2017). Mind the gap: mechanisms regulating the endothelial barrier. *Acta Physiologica*, n/a-n/a. doi:10.1111/apha.12860
- Ramani, V.C., Pruett, P.S., Thompson, C.A., DeLucas, L.D. & Sanderson, R.D. (2012). Heparan sulfate chains of syndecan-1 regulate ectodomain shedding. *J Biol Chem*, 287(13), 9952-9961. doi:10.1074/jbc.M111.330803
- Rancan, L., Simon, C., Sanchez Pedrosa, G., Aymonnier, K., Shahani, P.M., Casanova, J., . . . Vara, E. (2018). Glycocalyx Degradation after Pulmonary Transplantation Surgery. *Eur Surg Res*, 59(3-4), 115-125. doi:10.1159/000489492

- Rehm, M., Bruegger, D., Christ, F., Conzen, P., Thiel, M., Jacob, M., . . . Becker, B.F. (2007). Shedding of the endothelial glycocalyx in patients undergoing major vascular surgery with global and regional ischemia. *Circulation*, *116*(17), 1896-1906. doi:10.1161/circulationaha.106.684852
- Rehm, M., Zahler, S., Lotsch, M., Welsch, U., Conzen, P., Jacob, M. & Becker, B.F. (2004). Endothelial glycocalyx as an additional barrier determining extravasation of 6% hydroxyethyl starch or 5% albumin solutions in the coronary vascular bed. *Anesthesiology*, *100*(5), 1211-1223.
- Reitsma, S., Slaaf, D.W., Vink, H., van Zandvoort, M.A. & oude Egbrink, M.G. (2007). The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflugers Arch*, *454*(3), 345-359. doi:10.1007/s00424-007-0212-8
- Rhodes, A., Evans, L.E., Alhazzani, W., Levy, M.M., Antonelli, M., Ferrer, R., . . . Dellinger, R.P. (2017). Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Intensive Care Med*. doi:10.1007/s00134-017-4683-6
- Rodriguez-Gonzalez, R., Baluja, A., Veiras Del Rio, S., Rodriguez, A., Rodriguez, J., Taboada, M., . . . Alvarez, J. (2013). Effects of sevoflurane postconditioning on cell death, inflammation and TLR expression in human endothelial cells exposed to LPS. *J Transl Med*, *11*, 87. doi:10.1186/1479-5876-11-87
- Rodriguez, E.G., Cardenas, J.C., Lopez, E., Cotton, B.A., Tomasek, J.S., Ostrowski, S.R., . . . Wade, C.E. (2017). Early Identification of the Patient with Endotheliopathy of Trauma by Arrival Serum Albumin. *Shock*. doi:10.1097/shk.0000000000001036
- Rovas, A., Lukasz, A.H., Vink, H., Urban, M., Sackarnd, J., Pavenstadt, H. & Kumpers, P. (2018). Bedside analysis of the sublingual microvascular glycocalyx in the emergency room and intensive care unit - the GlycoNurse study. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med*, *26*(1), 16. doi:10.1186/s13049-018-0483-4
- Sandig, H. & Bulfone-Paus, S. (2012). TLR signaling in mast cells: common and unique features. *Frontiers in Immunology*, *3*(185). doi:10.3389/fimmu.2012.00185
- Savery, M.D., Jiang, J.X., Park, P.W. & Damiano, E.R. (2013). The endothelial glycocalyx in syndecan-1 deficient mice. *Microvasc Res*, *87*, 83-91. doi:10.1016/j.mvr.2013.02.001
- Schiefer, J., Leberherz-Eichinger, D., Erdoes, G., Berlakovich, G., Bacher, A., Krenn, C.G. & Faybik, P. (2015). Alterations of Endothelial Glycocalyx During Orthotopic Liver Transplantation in Patients With End-Stage Liver Disease. *Transplantation*, *99*(10), 2118-2123. doi:10.1097/tp.0000000000000680
- Schmidt, E.P., Barthel, L., Kelher, M., Perez, M.J., Smith, L.P., Silliman, C.C., . . . Janssen, W.J. (2013). Endothelial glycocalyx degradation predisposes for transfusion-associated acute lung injury. *The FASEB Journal*, *27*(1 Supplement), 724.721-724.721.
- Schmidt, E.P., Yang, Y., Janssen, W.J., Gandjeva, A., Perez, M.J., Barthel, L., . . . Tuder, R.M. (2012). The pulmonary endothelial glycocalyx regulates neutrophil adhesion and lung injury during experimental sepsis. *Nat Med*, *18*(8), 1217-1223. doi:10.1038/nm.2843
- Schmidt, F.H. (1961). Die enzymatische Bestimmung von Glucose und Fructose nebeneinander. *Klinische Wochenschrift*, *39*(23), 1244-1247. doi:10.1007/BF01506150
- Schmidt, K., Bhakdisongkham, S., Uhle, F., Philipsen, C., Zivkovic, A.R., Brenner, T., . . . Hofer, S. (2017). GTS-21 reduces microvascular permeability during experimental endotoxemia. *Microvasc Res*. doi:10.1016/j.mvr.2017.08.002
- Schmidt, K., Hernekamp, J.F., Doerr, M., Zivkovic, A.R., Brenner, T., Walther, A., . . . Hofer, S. (2015). Cytidine-5-diphosphocholine reduces microvascular permeability during experimental endotoxemia. *BMC Anesthesiol*, *15*, 114. doi:10.1186/s12871-015-0086-9
- Schnoor, M., Garcia Ponce, A., Vadillo, E., Pelayo, R., Rossaint, J. & Zarbock, A. (2017). Actin dynamics in the regulation of endothelial barrier functions and neutrophil recruitment during

- endotoxemia and sepsis. *Cell Mol Life Sci*, 74(11), 1985-1997. doi:10.1007/s00018-016-2449-x
- Schutze, S., Wiegmann, K., Machleidt, T. & Kronke, M. (1995). TNF-induced activation of NF-kappa B. *Immunobiology*, 193(2-4), 193-203.
- Seok, J., Warren, H.S., Cuenca, A.G., Mindrinos, M.N., Baker, H.V., Xu, W., . . . Tompkins, R.G. (2013). Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(9), 3507-3512. doi:10.1073/pnas.1222878110
- Sergeev, P., da Silva, R., Lucchinetti, E., Zaugg, K., Pasch, T., Schaub, M.C. & Zaugg, M. (2004). Trigger-dependent gene expression profiles in cardiac preconditioning: evidence for distinct genetic programs in ischemic and anesthetic preconditioning. *Anesthesiology*, 100(3), 474-488.
- Singer, M. (2014). The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure. *Virulence*, 5(1), 66-72. doi:10.4161/viru.26907
- Singer, M. (2017). Critical illness and flat batteries. *Crit Care*, 21(Suppl 3), 309. doi:10.1186/s13054-017-1913-9
- Singer, M., Deutschman, C.S., Seymour, C.W., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., . . . Angus, D.C. (2016). The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *Jama*, 315(8), 801-810. doi:10.1001/jama.2016.0287
- Singleton, P.A. & Lennon, F.E. (2011). Acute Lung Injury Regulation by Hyaluronan. *J Allergy Ther, Suppl 4*. doi:10.4172/2155-6121.s4-003
- Skibsted, S., Jones, A.E., Puskarich, M.A., Arnold, R., Sherwin, R., Trzeciak, S., . . . Shapiro, N.I. (2013). Biomarkers of endothelial cell activation in early sepsis. *Shock*, 39(5), 427-432. doi:10.1097/SHK.0b013e3182903f0d
- Skrzypiec-Spring, M., Grotthus, B., Szelag, A. & Schulz, R. (2007). Isolated heart perfusion according to Langendorff - Still viable in the new millennium. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 55(2), 113-126. doi:10.1016/j.vascn.2006.05.006
- Smart, L., Macdonald, S.P.J., Burrows, S., Bosio, E., Arendts, G. & Fatovich, D.M. (2017). Endothelial glyocalyx biomarkers increase in patients with infection during Emergency Department treatment. *J Crit Care*, 42, 304-309. doi:10.1016/j.jcrc.2017.07.001
- Snøeijns, M.G., Vink, H., Voesten, N., Christiaans, M.H., Daemen, J.W., Peppelenbosch, A.G., . . . van Heurn, L.W. (2010). Acute ischemic injury to the renal microvasculature in human kidney transplantation. *Am J Physiol Renal Physiol*, 299(5), F1134-1140. doi:10.1152/ajprenal.00158.2010
- Song, J.W., Zullo, J.A., Liveris, D., Dragovich, M., Zhang, X.F. & Goligorsky, M.S. (2017). Therapeutic Restoration of Endothelial Glyocalyx in Sepsis. *J Pharmacol Exp Ther*. doi:10.1124/jpet.116.239509
- Starling, E.H. (1896). On the Absorption of Fluids from the Connective Tissue Spaces. *J Physiol*, 19(4), 312-326.
- Steppan, J., Hofer, S., Funke, B., Brenner, T., Henrich, M., Martin, E., . . . Weigand, M.A. (2011). Sepsis and Major Abdominal Surgery Lead to Flaking of the Endothelial Glyocalyx. *Journal of Surgical Research*, 165(1), 136-141. doi:10.1016/j.jss.2009.04.034
- Steurer, M., Schlapfer, M., Steurer, M., Z'Graggen B, R., Booy, C., Reyes, L., . . . Beck-Schimmer, B. (2009). The volatile anaesthetic sevoflurane attenuates lipopolysaccharide-induced injury in alveolar macrophages. *Clin Exp Immunol*, 155(2), 224-230. doi:10.1111/j.1365-2249.2008.03807.x
- Suter, D., Spahn, D.R., Blumenthal, S., Reyes, L., Booy, C., Z'Graggen B, R. & Beck-Schimmer, B. (2007). The immunomodulatory effect of sevoflurane in endotoxin-injured alveolar epithelial cells. *Anesth Analg*, 104(3), 638-645. doi:10.1213/01.ane.0000255046.06058.58

- Sutherland, F.J. & Hearse, D.J. (2000). The isolated blood and perfusion fluid perfused heart. *Pharmacological Research*, 41(6), 613-627. doi:10.1006/phrs.1999.0653
- Svennevig, K., Hoel, T.N., Thiara, A.S., Kolset, S.O., Castelheim, A., Mollnes, T.E., . . . Svennevig, J.L. (2008). Syndecan-1 plasma levels during coronary artery bypass surgery with and without cardiopulmonary bypass. *Perfusion-Uk*, 23(3), 165-171. doi:10.1177/0267659108098215
- Takahashi, R., Negishi, K., Watanabe, A., Arai, M., Naganuma, F., Ohyama, Y. & Kurabayashi, M. (2011). Serum syndecan-4 is a novel biomarker for patients with chronic heart failure. *J Cardiol*, 57(3), 325-332. doi:10.1016/j.jjcc.2011.01.012
- Tarbell, J.M. (2010). Shear stress and the endothelial transport barrier. *Cardiovasc Res*, 87(2), 320-330. doi:10.1093/cvr/cvq146
- Tarbell, J.M. & Cancel, L.M. (2016). The glycocalyx and its significance in human medicine. *J Intern Med*, 280(1), 97-113. doi:10.1111/joim.12465
- Tarbell, J.M. & Pahakis, M.Y. (2006). Mechanotransduction and the glycocalyx. *Journal of Internal Medicine*, 259(4), 339-350. doi:10.1111/j.1365-2796.2006.01620.x
- Tuma, M., Canestrini, S., Alwahaab, Z. & Marshall, J. (2016). Trauma and Endothelial Glycocalyx: The Microcirculation Helmet? *Shock*, 46(4), 352-357. doi:10.1097/shk.0000000000000635
- Uhlig, C., Bluth, T., Schwarz, K., Deckert, S., Heinrich, L., De Hert, S., . . . Gama de Abreu, M. (2016). Effects of Volatile Anesthetics on Mortality and Postoperative Pulmonary and Other Complications in Patients Undergoing Surgery A Systematic Review and Meta-analysis. *Anesthesiology*, 124(6), 1230-1245. doi:10.1097/ALN.0000000000001120
- Ushiyama, A., Kataoka, H. & Iijima, T. (2016). Glycocalyx and its involvement in clinical pathophysiologicals. *J Intensive Care*, 4(1), 59. doi:10.1186/s40560-016-0182-z
- van den Berg, B. & Vink, H. (2006). Glycocalyx perturbation: cause or consequence of damage to the vasculature? *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 290(6), H2174-2175. doi:10.1152/ajpheart.00197.2006
- van den Berg, B.M., Vink, H. & Spaan, J.A.E. (2003). Hyaluronan of the capillary endothelial glycocalyx protects against myocardial tissue edema in rats. *Faseb Journal*, 17(4), A136-A136.
- van Golen, R.F., Reiniers, M.J., Olthof, P.B., van Gulik, T.M. & Heger, M. (2013). Sterile inflammation in hepatic ischemia/reperfusion injury: present concepts and potential therapeutics. *J Gastroenterol Hepatol*, 28(3), 394-400. doi:10.1111/jgh.12072
- van Golen, R.F., Reiniers, M.J., Vriskoop, N., Zuurbier, C.J., Olthof, P.B., van Rheenen, J., . . . Heger, M. (2014). The mechanisms and physiological relevance of glycocalyx degradation in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Antioxid Redox Signal*, 21(7), 1098-1118. doi:10.1089/ars.2013.5751
- Van Teeffelen, J.W., Brands, J., Stroes, E.S. & Vink, H. (2007). Endothelial glycocalyx: sweet shield of blood vessels. *Trends Cardiovasc Med*, 17(3), 101-105. doi:10.1016/j.tcm.2007.02.002
- Vincent, J.L. (2011). *Annual update in intensive care and emergency medicine 2011*. Berlin: Springer-Verlag.
- Vincent, J.L. & Abraham, E. (2006). The last 100 years of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*, 173(3), 256-263. doi:10.1164/rccm.200510-1604OE
- Vincent, J.L., Opal, S.M., Marshall, J.C. & Tracey, K.J. (2013). Sepsis definitions: time for change. *Lancet*, 381(9868), 774-775. doi:10.1016/s0140-6736(12)61815-7
- Vlodavsky, I., Singh, P., Boyango, I., Gutter-Kapon, L., Elkin, M., Sanderson, R.D. & Ilan, N. (2016). Heparanase: From basic research to therapeutic applications in cancer and inflammation. *Drug Resist Updat*, 29, 54-75. doi:10.1016/j.drug.2016.10.001
- Voigtsberger, S., Lachmann, R.A., Leutert, A.C., Schlapfer, M., Booy, C., Reyes, L., . . . Beck-Schimmer, B. (2009). Sevoflurane ameliorates gas exchange and attenuates lung damage in

- experimental lipopolysaccharide-induced lung injury. *Anesthesiology*, 111(6), 1238-1248. doi:10.1097/ALN.0b013e3181bdf857
- Walther, A., Weihrauch, M., Schmidt, W., Gebhard, M.M., Martin, E. & Schmidt, H. (2000). Leukocyte-independent plasma extravasation during endotoxemia. *Crit Care Med*, 28(8), 2943-2948.
- Wang, C., Xie, H., Liu, X., Qin, Q., Wu, X., Liu, H. & Liu, C. (2010). Role of nuclear factor-kappaB in volatile anaesthetic preconditioning with sevoflurane during myocardial ischaemia/reperfusion. *Eur J Anaesthesiol*, 27(8), 747-756. doi:10.1097/EJA.0b013e32833bb3ba
- Wang, J., Wu, A. & Wu, Y. (2017a). Endothelial Glycocalyx Layer: A Possible Therapeutic Target for Acute Lung Injury during Lung Resection. *Biomed Res Int*, 2017, 5969657. doi:10.1155/2017/5969657
- Wang, L., Huang, X., Kong, G., Xu, H., Li, J., Hao, D., . . . Wang, X. (2016). Ulinastatin attenuates pulmonary endothelial glycocalyx damage and inhibits endothelial heparanase activity in LPS-induced ARDS. *Biochem Biophys Res Commun*, 478(2), 669-675. doi:10.1016/j.bbrc.2016.08.005
- Wang, L., Ye, Y., Su, H.B. & Yang, J.P. (2017b). The anesthetic agent sevoflurane attenuates pulmonary acute lung injury by modulating apoptotic pathways. *Braz J Med Biol Res*, 50(3), e5747. doi:10.1590/1414-431x20165747
- Ward, P.A. & Bosmann, M. (2012). A historical perspective on sepsis. *Am J Pathol*, 181(1), 2-7. doi:10.1016/j.ajpath.2012.05.003
- Weinbaum, S., Tarbell, J.M. & Damiano, E.R. (2007). The structure and function of the endothelial glycocalyx layer. *Annu Rev Biomed Eng*, 9, 121-167. doi:10.1146/annurev.bioeng.9.060906.151959
- Whitlock, R.P., Devereaux, P.J., Teoh, K.H., Lamy, A., Vincent, J., Pogue, J., . . . Yusuf, S. (2015). Methylprednisolone in patients undergoing cardiopulmonary bypass (SIRS): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*, 386(10000), 1243-1253. doi:10.1016/s0140-6736(15)00273-1
- Wiesinger, A., Peters, W., Chappell, D., Kentrup, D., Reuter, S., Pavenstadt, H., . . . Kumpers, P. (2013). Nanomechanics of the endothelial glycocalyx in experimental sepsis. *Plos One*, 8(11), e80905. doi:10.1371/journal.pone.0080905
- Xing, K., Murthy, S., Liles, W.C. & Singh, J.M. (2012). Clinical utility of biomarkers of endothelial activation in sepsis--a systematic review. *Crit Care*, 16(1), R7. doi:10.1186/cc11145
- Yang, Y., Haeger, S.M., Suflita, M.A., Zhang, F., Dailey, K.L., Colbert, J.F., . . . Schmidt, E.P. (2017). Fibroblast Growth Factor Signaling Mediates Pulmonary Endothelial Glycocalyx Reconstitution. *Am J Respir Cell Mol Biol*. doi:10.1165/rcmb.2016-0338OC
- Ye, X., Mao, S.-z., Liu, G. & Liu, S.F. (2014). Resident Endothelial Cells Repair Endothelial Barrier Function Following Endotoxemic Lung Injury A98. *ENDOTHELIAL BARRIER DYNAMICS: REGULATORS OF PERMEABILITY AND REPAIR* (pp. A2212-A2212): American Thoracic Society.
- Zanotti-Cavazzoni, S.L. & Hollenberg, S.M. (2009). Cardiac dysfunction in severe sepsis and septic shock. *Curr Opin Crit Care*, 15(5), 392-397. doi:10.1097/MCC.0b013e3283307a4e
- Zaugg, M., Lucchinetti, E., Behmanesh, S. & Clanachan, A.S. (2014). Anesthetic cardioprotection in clinical practice from proof-of-concept to clinical applications. *Curr Pharm Des*, 20(36), 5706-5726.
- Zeng, Y., Adamson, R.H., Curry, F.R. & Tarbell, J.M. (2014). Sphingosine-1-phosphate protects endothelial glycocalyx by inhibiting syndecan-1 shedding. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 306(3), H363-372. doi:10.1152/ajpheart.00687.2013

- Zeng, Y., Ebong, E.E., Fu, B.M. & Tarbell, J.M. (2012). The Structural Stability of the Endothelial Glycocalyx after Enzymatic Removal of Glycosaminoglycans. *Plos One*, 7(8), e43168. doi:10.1371/journal.pone.0043168
- Zhang, X., Sun, D., Song, J.W., Zullo, J., Lipphardt, M., Coneh-Gould, L. & Goligorsky, M.S. (2018). Endothelial cell dysfunction and glycocalyx - A vicious circle. *Matrix Biol.* doi:10.1016/j.matbio.2018.01.026
- Zhao, Z.Q., Corvera, J.S., Halkos, M.E., Kerendi, F., Wang, N.P., Guyton, R.A. & Vinten-Johansen, J. (2003). Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 285(2), H579-588. doi:10.1152/ajpheart.01064.2002
- Zhong, C., Zhou, Y. & Liu, H. (2004). Nuclear factor kappaB and anesthetic preconditioning during myocardial ischemia-reperfusion. *Anesthesiology*, 100(3), 540-546.

## 6.5 DANKSAGUNG

Diese Arbeit wäre ohne das außergewöhnliche Engagement und die ausdauernde Unterstützung durch meinen Betreuer Prof. Dr. med. Thorsten Annecke nicht möglich gewesen. Daher gilt ihm und seinem "roten Faden" mein ganz besonderer Dank.

Ein großes Dankeschön geht auch an meinen Doktorvater Prof. Dr. med. habil. Dr. rer. nat. Bernhard F. Becker. Er hat durch fachliche Unterstützung und hilfreiche Gespräche sowohl bei der Durchführung der Versuche als auch bei der Fertigstellung dieser Arbeit wesentlich zu deren Gelingen beigetragen.

Dora Kiesel aus dem Walter-Brendel-Institut für Experimentelle Medizin gebührt ein Dank für die Anleitung und Hilfe während der experimentellen Phase und für die Durchführung der HPLC Messungen. Darüber hinaus bedanke ich mich bei Gabriele Gröger mit ihrem Team aus dem Labor der Klinik für Anästhesiologie für die Messung der Glykokalyxbestandteile, Congcong Chen für die Einführung in die Bestimmung der Hydroxyethylstärke und Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Ulrich Welsch mit seinem Team aus der Anatomie für die Anfertigung der lichtmikroskopischen Aufnahmen der Immunhistochemie.

Letztlich gilt mein Dank meinen Eltern, meiner Schwester und Ludwig, die mich immer unterstützt und mir Rückhalt gegeben haben, Sofia, die mir Mut gemacht hat, sowie all denen, die an mich geglaubt haben.

## 6.6 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Hartmann, Hildegard

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Die endotheliale Glykokalyx im Endotoxinmodell des isolierten  
Meerschweinchenherzens -  
der Einfluss des volatilen Anästhetikums Sevofluran**

selbständig 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.

München, 03.11.2018

---

Ort, Datum

---

Unterschrift Doktorandin/Doktorand