

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital  
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. Dr. Christoph Klein

**Veränderungen der mikrovaskulären Glykokalyx und Perfusion bei  
Kindern nach Operationen mit kardiopulmonalem Bypass**

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

vorgelegt von  
Amelie Esther Haberer  
aus  
Dachau

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Orsolya Genzel-Boroviczény

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Nikolaus Haas  
PD Dr. Tobias Heer

Mitbetreuung durch die  
promovierte Mitarbeiterin: PD Dr. med. Claudia Nußbaum

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 06.06.2019

Meiner Familie

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht in:

Nussbaum C., Haberer A., Tiefenthaller A., Januszewska K., Chappell D., Brettner F., Mayer P., Dalla Pozza R., Genzel-Boroviczeny O. **Perturbation of the microvascular glycocalyx and perfusion in infants after cardiopulmonary bypass.** *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery.*, 150(6):1474-81.e1, 2015.

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>6</b>
1.1	Die Mikrozirkulation .....	6
1.1.1	Physiologische Grundlagen .....	6
1.1.2	Mikrozirkulatorische Veränderungen bei Krankheit.....	8
1.1.3	Diagnostische Möglichkeiten zur Beurteilung der Mikrozirkulation.....	9
1.1.3.1	Klinische Evaluation und Biomarker .....	10
1.1.3.2	Methoden zum Monitoring der Mikrozirkulation.....	10
1.1.3.3	OPS und SDF .....	11
1.2	Die Glykokalyx.....	13
1.2.1	Definition .....	13
1.2.2	Struktur.....	14
1.2.3	Funktionen.....	15
1.2.4	Pathologische Veränderungen.....	16
1.2.5	Diagnostik .....	18
1.2.6	Prävention.....	20
1.3	Herz-Lungen-Maschine .....	21
1.3.1	Funktionsprinzip.....	21
1.3.2	Pathophysiologische Auswirkungen .....	23
1.3.3	Einfluss der HLM auf die Mikrozirkulation und die endotheliale Glykokalyx .	24
1.4	Fragestellungen.....	26
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>28</b>
2.1	Rahmenbedingungen .....	28
2.2	Patientenkollektiv .....	28
2.3	Studiendesign.....	31
2.3.1	Gruppeneinteilung .....	31
2.3.2	Messzeitpunkte.....	32

2.3.3	Klinische und laborchemische Daten .....	33
2.4	Operation und perioperatives Management .....	34
2.4.1	Anästhesie und Operation .....	34
2.4.2	Postoperative Versorgung auf der Intensivstation .....	35
2.5	Untersuchung der Mikrozirkulation .....	36
2.5.1	Visualisierung der Mikrozirkulation .....	36
2.5.2	Versuchsaufbau .....	39
2.5.3	Durchführung der Mikrozirkulationsmessungen .....	40
2.6	Auswertung der Mikrozirkulationsuntersuchungen .....	41
2.6.1	Automated Vascular Analysis (AVA) Software .....	41
2.6.2	Messparameter der Mikrozirkulation .....	43
2.7	Untersuchung der Glykokalyx .....	44
2.7.1	Funktionsprinzip der Glykokalyxmessung .....	44
2.7.2	Versuchsaufbau .....	45
2.7.3	Durchführung der Glykokalyxmessungen .....	45
2.8	Auswertung der Glykokalyxuntersuchungen .....	46
2.8.1	Glycocheck Software .....	46
2.8.2	Messparameter .....	47
2.9	Diagnose eines Kapillarlecksyndroms .....	48
2.10	Statistische Auswertung .....	48
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>50</b>
3.1	Patienten-Charakteristika .....	50
3.2	Klinische und laborchemische Daten .....	51
3.3	Einfluss der herzchirurgischen Eingriffe mit HLM auf die mikrovaskuläre Glykokalyx .....	53
3.3.1	Vergleich der PBR zum Zeitpunkt T0 .....	53
3.3.2	Veränderung der PBR nach Einsatz der HLM .....	54
3.3.3	Betrachtung der Kontrollgruppen .....	54

3.3.4	Betrachtung der HLM-Untergruppen.....	55
3.4	Einfluss der herzchirurgischen Eingriffe mit HLM auf die mikrozykulatorischen Parameter.....	56
3.4.1	Betrachtung der HLM-Gruppe komplett.....	56
3.4.2	Betrachtung der Kontrollgruppen.....	58
3.4.3	Betrachtung der HLM-Untergruppen.....	60
3.5	Zusammenhang zwischen Veränderungen mikrozykulatorischer Parameter und dem postoperativen Outcome .....	62
3.5.1	Zusammenhang mit dem postoperativen Katecholaminbedarf.....	62
3.5.2	Zusammenhang mit der Notwendigkeit einer postoperativen mechanischen Beatmung .....	63
3.5.3	Zusammenhang mit der Entwicklung eines Kapillarlecksyndrom (KLS) .....	63
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>65</b>
4.1	Diskussion der Methodik.....	65
4.1.1	Studiendesign .....	65
4.1.2	Messungen.....	66
4.1.3	Auswertung .....	68
4.1.3.1	Mikrozirkulation .....	68
4.1.3.2	Glykokalyx.....	70
4.2	Diskussion der Ergebnisse.....	71
4.2.1	Veränderungen der Glykokalyx im Rahmen herzchirurgischer Operationen bei Kindern an der HLM .....	71
4.2.2	Veränderungen der Mikrozirkulation im Rahmen herzchirurgischer Operationen bei Kindern an der HLM .....	75
4.2.3	Mögliche Alterationen der Mikrozirkulation und der Glykokalyx abhängig von der Dauer der extrakorporalen Zirkulation während der Operation.....	78
4.2.4	Zusammenhang zwischen dem Verlust der Glykokalyx und den Veränderungen der Mikrozirkulation .....	80

4.2.5	Korrelation zwischen möglichen Veränderungen der Mikrozirkulation und der mikrovaskulären Glykokalyx mit dem postoperativen Verlauf der Kinder .....	81
4.2.6	Klinische Konsequenzen aus den vorliegenden Erkenntnissen .....	82
4.3	Kritik und Limitierungen .....	85
4.4	Ausblick .....	86
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>88</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>90</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>98</b>
7.1	Abkürzungsverzeichnis .....	98
7.2	Abbildungsverzeichnis .....	100
7.3	Tabellenverzeichnis .....	102
<b>8</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>103</b>
<b>9</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>104</b>

Aus Gründen der leichteren Lesbarkeit wird in der vorliegenden Dissertation die gewohnte männliche Sprachform bei personenbezogenen Substantiven und Pronomen verwendet. Dies impliziert jedoch keine Benachteiligung des weiblichen Geschlechts, sondern soll im Sinne der sprachlichen Vereinfachung als geschlechtsneutral zu verstehen sein.

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Mikrozirkulation

### 1.1.1 Physiologische Grundlagen

Die Mikrozirkulation ist die kleinste funktionelle Einheit des kardiovaskulären Kreislaufs, in der es zur Interaktion zwischen Blut und Gewebe kommt.<sup>56</sup> Eine der Hauptaufgaben der mikrozirkulatorischen Gefäße ist der Transport von Sauerstoff an den Zielort, um den Sauerstoffbedarf jeder Zelle des Organismus zu decken, sowie die Aufnahme von Kohlendioxid aus dem Gewebe. Eine weitere wichtige Funktion ist der Nährstoffaustausch mit den Zellen. Außerdem erfüllt sie immunologische Aufgaben und ist im Falle von Krankheit dafür zuständig, Medikamente an ihren Wirkungsort zu transportieren.<sup>78</sup>

Die Mikrozirkulation umfasst alle Gefäße mit einem Durchmesser kleiner als 100 µm, wozu Arteriolen, Kapillaren und Venolen gezählt werden. Aufgebaut sind diese kleinsten Gefäße aus verschiedenen Zellen wie Endothelzellen, welche die Gefäße von innen auskleiden, und glatten Muskelzellen, vor allem in den Arteriolen. Endothelzellen und glatte Muskelzellen interagieren direkt und indirekt mit Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten sowie mit Plasmabestandteilen. Diese kleinen Gefäße umfassen eine Oberfläche von etwa 4000-7000 m<sup>2</sup>, welche im Körper die größte endotheliale Oberfläche darstellt.<sup>15, 78</sup>

Für eine optimale Versorgung des Gewebes ist zum einen der architektonische Aufbau des Gefäßsystems von Bedeutung. Die häufigste Form, abgesehen von Ausnahmen in Leber und Niere, ist eine baumartige Verzweigung der Kapillaren. Diese gehen aus den immer kleiner werdenden Arteriolen hervor und sind vorrangig für die Diffusion von Sauerstoff und Kohlendioxid zuständig. Durch die Ausbildung eines möglichst dichten Gefäßnetzes wird sichergestellt, dass die Diffusionswege zu den zu versorgenden Zellen so kurz wie möglich gehalten werden. Zum anderen tragen auch die autoregulatorischen Mechanismen der Mikrozirkulation dazu bei, dass die Sauerstoffversorgung bedarfsabhängig gesteuert werden kann.<sup>5, 8</sup>

Die Arteriolen sind hauptsächlich für den Gefäßtonus verantwortlich, welcher von proximal nach distal abnimmt. Über die Regulierung des Widerstandes kann der Blutfluss und damit der Sauerstofftransport beeinflusst werden. Somit kann die Durchblutung in der Mikrozirkulation rasch an den Sauerstoffbedarf des jeweiligen Gewebes angepasst werden, indem bei erhöhtem Bedarf der Blutfluss ebenfalls erhöht wird.<sup>139</sup>

Hierbei spielen die Endothelzellen eine wichtige Rolle. Sie leiten vasodilatatorische Signale über Zell-Zell-Kontakte von kapillären Gefäßen und den nachgeschalteten postkapillären Venolen an die präkapillären, arteriolären Endothelzellen weiter. In der Folge kommt es durch Relaxation der glatten Muskelzellen in den Arteriolen zu einer Widerstandsreduktion und Kapillarrekrutierung und somit zu einer vermehrten Durchblutung. Über diesen Mechanismus kann die eigentlich durch die Arteriolen gesteuerte Perfusion auch durch lokale Einflüsse auf Ebene der Kapillaren oder Venolen reguliert werden.<sup>42, 134</sup>

Während Arteriolen als Widerstandsgefäße dienen und in den Kapillaren der Gasaustausch stattfindet, sind in den Venolen vor allem Leukozytenrollen, -adhäsion und -migration sowie Permeabilitätsänderungen zu beobachten.<sup>5</sup>

Grundsätzlich lassen sich die Regulationsmechanismen, welche die Mikrozirkulation beeinflussen, in myogene, metabolische und neurohumorale einteilen. Die myogenen Mechanismen steuern über den transmuralen Druck und die Wandspannung die Kontraktionen der glatten Muskelzellen. Eine metabolische Regulation findet lokal über Konzentrationsänderungen von Sauerstoff, Kohlendioxid, Laktat und Wasserstoffprotonen statt, während die neurohumorale Steuerung über das vegetative Nervensystem Einfluss auf den Vasotonus größerer Gefäße nimmt. Dadurch kann der globale Blutfluss in der Mikrozirkulation reguliert werden.<sup>155</sup>

Weiterhin Anteil an der Modulation des Gefäßtonus im Sinne von Vasodilatation haben das Stickmonoxid-(NO-)System und die induzierbare NO-Synthetase.<sup>28</sup>

Auch die Erythrozyten scheinen eine gewisse beeinflussende Funktion zu haben. Bei Hypoxie kommt es zur Freisetzung von Adenosintriphosphat (ATP) aus den Zellen, welches ebenfalls vasodilatatorisch wirkt.<sup>83</sup>

Abbildung 1 gibt einen Überblick über den schematischen Aufbau der Anatomie der Mikrozirkulation.

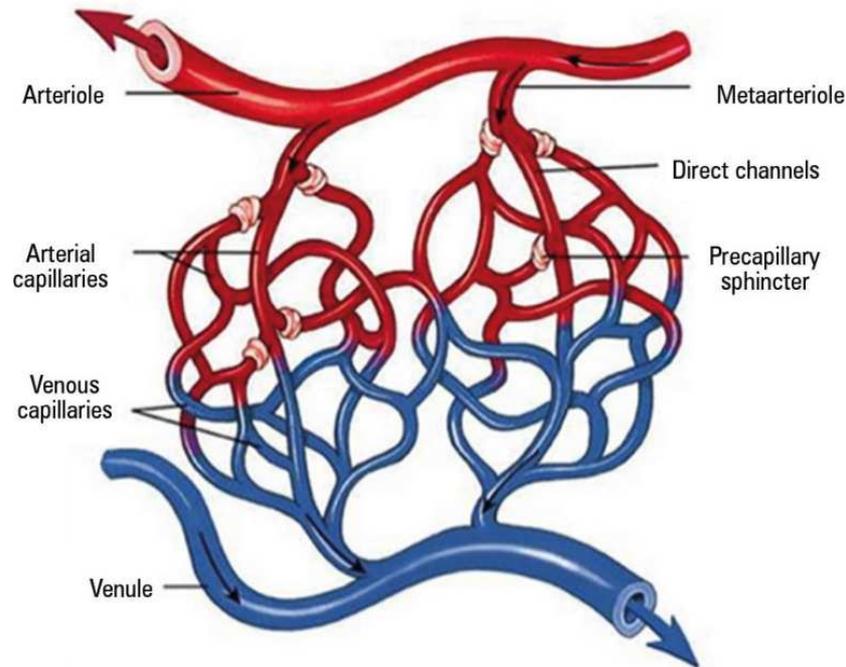


Abbildung 1: Die Anatomie der Mikrozirkulation <sup>148</sup>

### 1.1.2 Mikrozykulatorische Veränderungen bei Krankheit

Aus der essenziellen Rolle der Mikrozykulation in der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung des gesamten Organismus lässt sich auch eine entscheidende Bedeutung für die Pathogenese verschiedener Krankheiten ableiten.

Veränderungen der Mikrozykulation sind für chronische Erkrankungen mit Gefäßbeteiligung nachgewiesen, wie unter anderem Diabetes mellitus, metabolisches Syndrom, periphere arterielle Verschlusskrankheit und Bluthochdruck, bei welchen die mikrozykulatorische Kapazität zur Aufrechterhaltung einwandfreier Zellfunktionen beeinträchtigt ist. <sup>85, 107</sup>

Bei Patienten mit arterieller Hypertension konnte gezeigt werden, dass schon frühzeitig eine Ausdünnung der mikrovaskulären Gefäße nachweisbar ist. Außerdem kommt es durch die chronische Erhöhung des Blutdrucks zur Vasokonstriktion, wodurch eine Hypoxie des Gewebes und eine Abnahme von arteriolärer und kapillärer Gefäßdichte begünstigt werden.

52

Die mikrozykulatorischen Veränderungen bei Diabetes mellitus sind charakterisiert durch endotheliale Dysfunktion, erhöhte Thrombozytenaggregationsneigung, vermehrte Leukozytenadhäsion und gestörte Funktion der glatten Muskelzellen der Gefäßwand. <sup>118</sup> Außerdem kommt es auch bei Diabetes mellitus zu einer Minderperfusion mit Hypoxie des Gewebes. Einerseits wird dafür eine verminderte Verformbarkeit der Erythrozyten und eine

daraus folgende Passagebehinderung verantwortlich gemacht.<sup>39</sup> Andererseits kommt es auch hier zu einer Rarefizierung der kapillären Gefäße.<sup>9</sup>

Neben chronischen Erkrankungen ist die Rolle der Mikrozirkulation bei der Pathogenese der Sepsis ebenfalls Gegenstand intensiver Forschung.

Bauer et al. schreiben zu dieser Thematik in einem Übersichtsartikel, dass es durch die generalisierte inflammatorische Reaktion im Rahmen der Sepsis zu einer massiven Aktivierung und Dysfunktion von mikrovaskulären Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Leukozyten und Erythrozyten kommt. Zudem werden Veränderungen der Gerinnung beobachtet. Die Folge sind weitreichende Störungen der Mikrozirkulation.<sup>15</sup>

Besonders die in Punkt 1.1.1 beschriebenen Autoregulationsmechanismen sind massiv in ihrer Funktion beeinträchtigt, wodurch es zu einer inhomogenen Verteilung des Blutvolumens kommt.<sup>28</sup> Auch eine Aktivierung der Gerinnungskaskade und prokoagulatorische Eigenschaften des mikrovaskulären Endothels können zu Störungen der Perfusion und somit der Funktion der Mikrozirkulation bei Sepsis führen.<sup>6, 75</sup> Zudem kommt es durch eine Dysfunktion der Barriere der kleinen Gefäße mit vermehrter Filtration von Flüssigkeit in den Extravasalraum zu ausgedehnten Ödemen.<sup>41, 98</sup>

Mehrere experimentelle Studien haben gezeigt, dass es bei Sepsis zu einer Abnahme der funktionellen Gefäßdichte kommt.<sup>69</sup> Durch eine heterogene Kapillarperfusion während des Krankheitsgeschehens kommt es zur Unterversorgung mit Sauerstoff in bestimmten Regionen. Direkt benachbart gelegene Kapillaren können währenddessen durch abnormal hohen Blutfluss auffallen. Dies erklärt auch die höhere Sauerstoff-Ausschöpfung in den hypoxischen Gebieten.<sup>46, 64</sup>

### **1.1.3 Diagnostische Möglichkeiten zur Beurteilung der Mikrozirkulation**

Bis vor einigen Jahren war man bei der Diagnostik und Behandlung von den Kreislauf betreffenden Dysfunktionen vor allem auf sicht- und messbare Veränderungen von Parametern angewiesen, die indirekt Rückschlüsse auf die Kondition der Mikrozirkulation zulassen, wie z.B. Temperatur, kapilläre Füllungszeit, Ödeme, Herzfrequenz, Blutdruck und Blutwerte.<sup>56</sup>

In den letzten Jahren haben sich jedoch neue Möglichkeiten eröffnet, die die direkte Evaluation der Mikrozirkulation erlauben und somit einen Vorteil in Diagnostik und Therapie von Krankheiten verschaffen können. Der folgende Abschnitt gibt einen Überblick über lange Zeit gebräuchliche und neue Methoden zur Evaluation der Mikrozirkulation.

### 1.1.3.1 Klinische Evaluation und Biomarker

Rückschlüsse auf eine beeinträchtigte Mikrozirkulation lassen sich durch Beobachtung von klinischen Merkmalen ziehen. Marmorierte Haut, Akrozyanose, eine verlängerte kapilläre Füllungszeit und ein vergrößerter Temperaturgradient zwischen zentraler Körpertemperatur und am Zeh gemessener peripherer Temperatur sind Hinweise auf eine Dysfunktion der Hautperfusion. Allerdings mangelt es diesen klinischen Parametern, die Auskunft über zentralere Veränderungen geben sollen, an Spezifität und auch Sensitivität.<sup>84, 130</sup> Außerdem sind die Methoden z.T. sehr subjektiv.

Auch diverse biologische Marker können Auskunft über die Qualität der Mikrozirkulation geben. So sind beispielsweise steigende Laktat-Spiegel und auch Plasma-Hyaluron-Spiegel Indikatoren für ein Krankheitsgeschehen, das auch die Mikrozirkulation betrifft.<sup>133</sup>

### 1.1.3.2 Methoden zum Monitoring der Mikrozirkulation

Durch moderne Technologien kann heute die Mikrozirkulation direkt am Patienten beurteilt werden:<sup>15, 40, 135</sup> Die wichtigsten Methoden sollen in Kürze erläutert werden.

- Laser-Doppler-Fluxmetrie (LDF): Messung der Gewebepерfusion durch Emission von monochromatischem Laserlicht in zu untersuchendes Gewebe mit Änderung der Frequenz an bewegten Objekten wie Erythrozyten (Dopplereffekt). Nachteile: Geringe Eindringtiefe, große Variabilität der Messwerte, keine Absolutwerte.
- Nahinfrarotspektroskopie (NIRS): Messung von Sauerstoffsättigung im Gewebe anhand der relativen Absorption von Nahinfrarotlicht durch Hämoglobin in Abhängigkeit von Sauerstoff-Beladung. Nachteil: Variabilität der Messwerte, liefert nur Aussage über regionale Veränderungen und lässt keine Aussage auf Einzelgefäßebezug zu.
- Venöse Kompressionsplethysmographie (VKP): Untersuchung der mikrovaskulären Gefäßpermeabilität über die Messung der Umfangsänderungen einer Extremität nach venöser Stauung und Erhöhung des hydrostatischen Drucks. Nachteile: Lange Messdauer, keine Berücksichtigung regionaler Unterschiede möglich.
- pCO<sub>2</sub>-Tonometrie: Indirekte Bestimmung der lokalen Durchblutungsverhältnisse durch Messung des CO<sub>2</sub>-Partialdrucks intramukosal zum Beispiel im

Gastrointestinaltrakt. Nachteile: Keine Berücksichtigung regionaler Perfusionsunterschiede, Beeinflussung z.B. durch Ernährung.

- Intravitalmikroskopie: Darstellung des Gewebes mit Transillumination, Epiillumination oder Fluoreszenzfarbstoffen, auch Kapillarmikroskopie am Menschen v.a. am Nagelfalz. Nachteile: phototoxische Fluoreszenzfarbstoffe am Menschen nicht zugelassen.
- Laser Speckle Contrast Imaging (LSCI): Messung des mikrozirkulatorischen Blutflusses basierend auf dem konventionellen Laser-Doppler-Prinzip, jedoch mit höherer zeitlicher und räumlicher Auflösung, Eindringtiefe etwa 1 mm. Nachteile: Hohe Empfindlichkeit für Bewegungsartefakte.<sup>14</sup>
- Orthogonal Polarization Spectral (OPS) und Sidestream Dark Field (SDF) Imaging: Nicht-invasives Untersuchungsverfahren über transdermalen oder mukösen Zugangsweg zur in-vivo Darstellung der Mikrozirkulation. Nachteile: Geringe Eindringtiefe, Anwendung bei Erwachsenen nur an Schleimhäuten, Abhängigkeit von Erfahrung des Anwenders. Aufgrund der Relevanz dieser neueren Videomikroskopietechniken für die vorliegende Arbeit wird deren Funktionsweise in den Punkten 1.1.3.3 und 2.5.1 genauer dargestellt.
- Incident Dark Field Illumination (IDF): Weiterentwicklung von SDF mit besserer Bildqualität durch einen Computer-kontrollierten Bildsensor und spezielle Mikroskoplinsen für hochauflösende Bilder, dadurch Detektion von mehr Gefäßen.<sup>157</sup>

### 1.1.3.3 OPS und SDF

Orthogonal Spectral Polarization (OPS) Imaging und Sidestream Dark Field (SDF) Imaging sind videomikroskopische Techniken, die direkt am Patientenbett zum Einsatz kommen können und eine Visualisierung der Mikrozirkulation auf Einzelgefäßebene ermöglichen. Sie basieren beide auf dem Prinzip der Beleuchtung durch eine externe Lichtquelle, welche auf dem zu untersuchenden Gewebe aufgesetzt wird. Das entsendete Licht wird durch tiefere Schichten reflektiert und illuminiert so die oberflächlichen Schichten. Die Wellenlänge des emittierten Lichts beträgt 530 nm, was dem Absorptionsmaximum von Hämoglobin entspricht, sodass das Licht von dem in den Erythrozyten enthaltenen Hämoglobin unabhängig von dessen Oxygenierung absorbiert wird. Dadurch erscheinen die Erythrozyten auf dem Bildschirm dunkel, während das übrige Bild hell erleuchtet ist.<sup>50</sup>

Bei der OPS-Technik wird linear polarisiertes Licht aus der Lichtquelle entsendet, von einem sogenannten Beam Splitter um  $90^\circ$  umgelenkt und dann ins Gewebe geleitet. Das an den oberflächlichen Schichten reflektierte Licht bleibt polarisiert und wird von einem orthogonal stehenden Filter, der vor der Optik sitzt, gefiltert.<sup>68</sup> Das Licht, welches bis in die tiefen Schichten vorgedrungen ist, wurde mehrfach gestreut und hierdurch depolarisiert. Der depolarisierte Anteil des Lichts kann den orthogonalen Filter passieren und dient der Bilderzeugung (vgl. Abbildung 2).<sup>50</sup>

SDF Imaging basiert auf demselben Prinzip, hat aber im Vergleich zu OPS Imaging eine Verbesserung hinsichtlich der Bildqualität und Schärfe der Darstellung der Kapillaren erreicht.<sup>63</sup>

In Punkt 2.5.1 wird noch einmal genauer auf SDF Imaging eingegangen.

Bevorzugter Applikationsort beider Techniken beim erwachsenen Menschen ist die sublinguale Mukosa, welche gut zugänglich ist und auf welcher aufgrund der fehlenden Verhornung Kapillaren und Venolen besonders gut darstellbar sind.<sup>45,46</sup>

Bei Neugeborenen und Kleinkindern hat sich außerdem die Haut am Arm und an der Ohrmuschel als geeigneter Messort erwiesen. Grundsätzlich wäre eine Messung an der gesamten Epidermis möglich, da die Verhornung insgesamt noch nicht so weit fortgeschritten ist. Die Ohrmuschel ist auch bei angezogenen Kindern leicht zugänglich und die Innenseite des Oberarms etablierte sich vor allem bei Frühgeborenen, da hier wenig Lanugobehaarung vorhanden ist, welche die Messungen beeinträchtigt.<sup>59,60</sup>

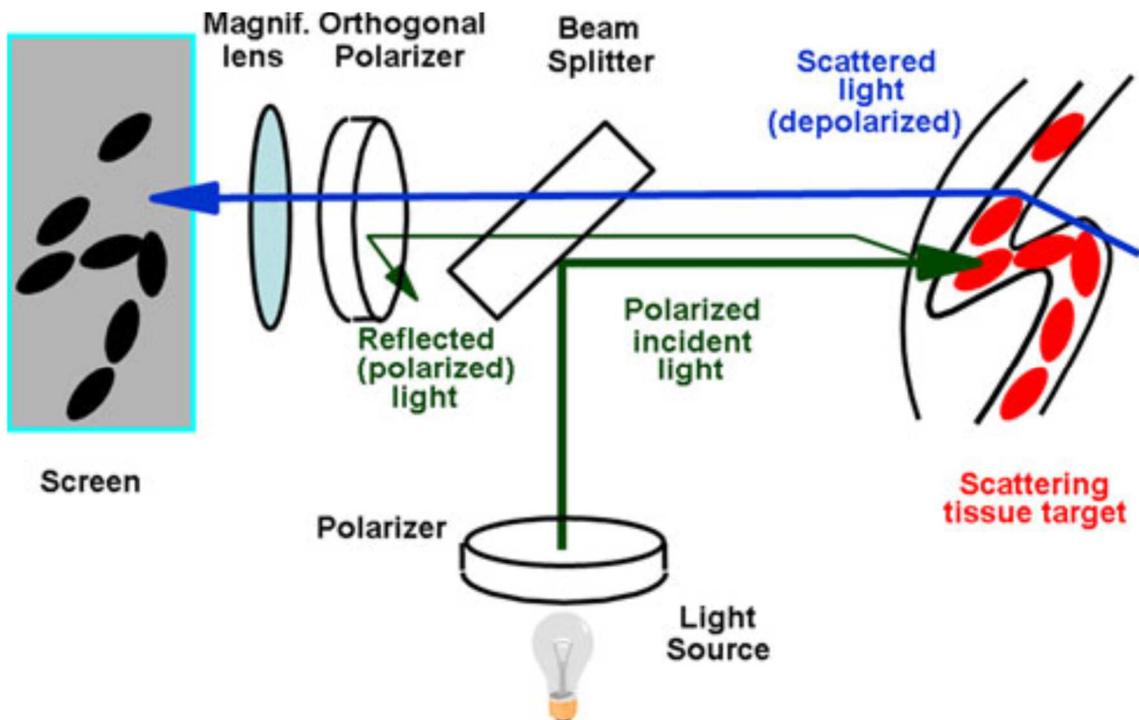


Abbildung 2: OPS Imaging: Polarisiertes Licht trifft auf das Gewebe. Das von den oberflächlichen Schichten reflektierte Licht ist immer noch polarisiert und kann den orthogonalen Filter nicht passieren. Das Licht, welches in tiefere Schichten vorgedrungen ist, wurde mehrfach gestreut und hat hierdurch die Polarisation verloren, sodass es den orthogonalen Filter passieren kann. Dieses Licht wird vom Hämoglobin der Erythrozyten absorbiert, sodass diese auf dem Bildschirm dunkel erscheinen. <sup>50</sup>

## 1.2 Die Glykokalyx

### 1.2.1 Definition

Schon vor etwa 50 Jahren wurde die Glykokalyx, eine auf den Endothelzellen lokalisierte Schicht aus Proteoglykanen, Glykosaminoglykanen und Glykoproteinen, zum ersten Mal sichtbar gemacht. Allerdings war damals nur eine Dicke von 20 nm darstellbar, weswegen man ihre Funktion in der (Patho)-Physiologie lange Zeit für vernachlässigbar hielt. <sup>100</sup>

In den letzten Jahren ist das Interesse an dieser Zuckerschicht und ihrer Rolle bei der Pathogenese verschiedener Krankheitsbilder, welche sich auch durch eine Beteiligung des vaskulären Systems auszeichnen (z.B. Diabetes, Sepsis, Arteriosklerose, Ischämie/Reperfusion, Tumormetastasierung), immer größer geworden.

Lokalisiert an der inneren Gefäßwand, interagiert die Glykokalyx kontinuierlich mit dem Blutfluss und stellt so einen wichtigen Kommunikator zwischen Blut und Endothel dar. <sup>97</sup>

### 1.2.2 Struktur

Die endotheliale Glykokalyx ist eine kohlenhydratreiche, negativ geladene Schicht, die das Lumen des gesamten Gefäßsystems auskleidet. Verankert im Endothel ist sie hauptsächlich durch Proteoglykane und Glykoproteine, welche zusammen mit Glykosaminoglykanen ein Geflecht bilden, in dem lösliche Moleküle aus dem Plasma oder dem Endothel gebunden werden. Je luminaler, desto höher ist der Anteil an löslichen Plasmakomponenten, die untereinander entweder direkt oder wiederum über Proteoglykane und Glykosaminoglykane verbunden sind. Die löslichen Komponenten, das fließende Blut und die verankerten Bestandteile stehen in einem dynamischen Gleichgewicht zueinander, wodurch sich die Dicke und die Zusammensetzung der Schicht ständig in Veränderung befinden. Außerdem steht die Glykokalyx kontinuierlich unter dem Einfluss von enzymatischem und durch Schubspannung induziertem „shedding“, was ein Abspalten von einzelnen Bestandteilen vom Gesamtgerüst bedeutet. Aufgrund der dynamischen Balance zwischen Neusynthese und „shedding“ kann von der Glykokalyx kein statisches Bild gezeichnet werden.<sup>33, 128</sup>

Die Glykokalyx bildet zusammen mit gebundenen Plasmaproteinen den sogenannten „endothelial surface layer“ (ESL) als Oberflächenschicht aus. Insgesamt beträgt deren Höhe etwa 1 µm und ist damit meist dicker als die Endothelzellen alleine.<sup>123</sup>

Andere Studien zeigen, dass mit dem Gefäßdurchmesser auch die Dicke des ESL zunimmt, von etwa 2-3 µm in kleinen Arterien bis zu 4,5 µm in den Arteriae carotides.<sup>104, 159</sup>

Es folgt ein kurzer Überblick über die Charakteristika der Hauptbestandteile:<sup>128</sup>

- Proteoglykane: „Rückgrat“ der Glykokalyx; Kernproteine, welche mit einem oder mehreren Glykosaminoglykanen verbunden sind, z.B. Syndecan, Glypican, Perlecan.
- Glykoproteine: ebenfalls Funktion als „Rückgrat“ der Glykokalyx, z.B. Integrine, Selektine, Immunglobuline.
- Glykosaminoglykane (GAG): als Ketten mit Proteoglykanen verbunden, z.B. Heparan- und Chondroitin-Sulfate, Hyaluronsäure.
- Lösliche Plasmaproteine, z.B. lösliche Proteoglykane, Albumin.

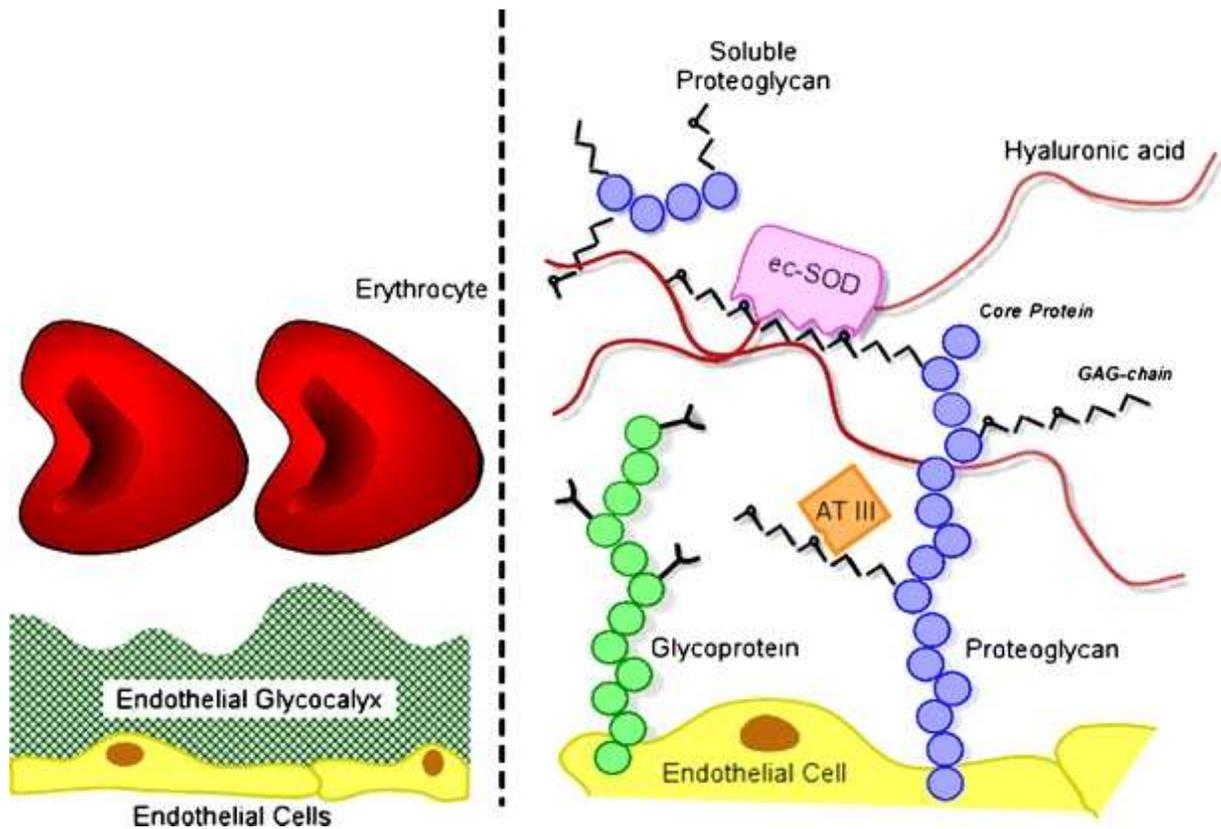


Abbildung 3: Die endotheliale Glykokalyx: Schemazeichnung der Hauptbestandteile (ec-SOD: extrazelluläre Superoxid-Dismutase, AT III: Antithrombin III)<sup>128</sup>

### 1.2.3 Funktionen

Die endotheliale Glykokalyx erfüllt durch ihre Position als luminale Grenzschicht eine essenzielle Funktion in der vaskulären Barrierefunktion.

Lange Zeit nahm man an, dass allein der kolloidosmotische Konzentrationsgradient zwischen Intra- und Extravasalraum für die Regulierung des Flüssigkeitshaushaltes in den Gefäßen verantwortlich ist. Ernest Starling beschrieb schon 1896, dass ein kolloidosmotisch höherer Druck im Intravasalraum Flüssigkeit in den Gefäßen zu halten vermag.<sup>145</sup> Er berücksichtigte jedoch in seiner Theorie die Glykokalyx nicht. In den letzten Jahren zeigten allerdings mehrere Studien, dass die Glykokalyx sehr wohl Anteil an der vaskulären Barriere haben muss, da diese Barrierefunktion trotz gleicher intravasaler und interstitieller Proteinkonzentration zu funktionieren schien. Die meisten Makromoleküle können die intakte Glykokalyx nicht passieren. Dadurch wird über die Glykokalyx ein einwärts gerichteter onkotischer Gradient aufgebaut, der Flüssigkeit trotz gleicher intra- und extravasaler Proteinkonzentration im Gefäß hält. Schließlich postulierten Rehm et al., dass die Glykokalyx mit ihrer negativen luminalen Ladung durch zahlreiche sulfatierte Glykosaminoglykanketten

<sup>158</sup> und Endothelzellen gemeinsam mit der Basalmembran die Schrankenfunktion erfüllen <sup>127</sup> und Adamson et al. integrierten das neue Konzept in die Starling-Theorie. <sup>3</sup>

Außerdem scheint die Glykokalyx an der Mediation von Schubspannung beteiligt zu sein und hier die Rolle eines Mechanotransduktors zu übernehmen. Dass Endothelzellen bei mechanischer Beanspruchung in der Lage sind, NO zu synthetisieren und damit den Vasotonus zu beeinflussen, war schon lange bekannt. <sup>132</sup> Tarbell und Pahakis haben 2006 zusammengefasst, dass die Kernproteine der Glykokalyx wahrscheinlich verantwortlich sind für die Umwandlung von „shear stress“ (wörtlich etwa Schubspannung) -Signalen in Zell-Signal-Prozesse, die zu NO-Produktion und zu einer Reorganisation der glykokalischen Strukturen führen. <sup>150</sup>

Zusätzlich spielt die Glykokalyx eine Rolle in der Leukozyten- und Thrombozytenadhäsion. Eine intakte Glykokalyx hat antiadhäsive Eigenschaften und verhindert das Anheften von Leukozyten und Thrombozyten. Bei Schäden an der Glykokalyx hingegen wurde eine vermehrte intravaskuläre Adhäsion von Leukozyten und Thrombozyten beobachtet. <sup>73, 161</sup> Die wiederholt beschriebene vermehrte Adhäsion im reperfundierten, post-ischämischen Koronarbett lässt sich ebenso dadurch erklären, dass die Glykokalyx generell während der Reperfusion beschädigt und abgebaut wird. <sup>16</sup>

In den kleinsten Kapillaren hält die Glykokalyx die Erythrozyten so auf Abstand, dass diese nur einzeln hindurch passen, was den im Vergleich zum Gesamtblut niedrigeren Kapillarhämatokrit erklärt. <sup>89</sup> Bei Schäden an der Glykokalyx steigt dann der Kapillarhämatokrit an, weil den Erythrozyten mehr Platz zur Verfügung steht, und nähert sich dem Gesamthämatokrit der großen Gefäße an. Dieser Zusammenhang wurde durch den Hämatokritanstieg nach Gabe des Enzymes Heparinase, welches Glykokalyx-Bestandteile abspaltet und somit eine Zerstörung der Glykokalyx initiiert, nachgewiesen. <sup>36, 53</sup>

#### **1.2.4 Pathologische Veränderungen**

Die möglichen Schäden an der Glykokalyx reichen von einer Beschädigung der oberflächlichen Anteile der ESL bis hin zur vollständigen Zerstörung der gesamten Glykokalyx. Bei geringerer Beschädigung können zum Beispiel Heparan- oder Chondroitinsulfat-Seitengruppen abgespalten worden sein, während schwere Schäden mit Verlust von ganzen Kernproteinen einhergehen können. <sup>16</sup>

Nachfolgend werden die am meisten untersuchten pathologischen Vorgänge, die mit Glykokalyx-Veränderungen assoziiert sind, kurz erörtert. <sup>16</sup>

- a) Ischämie/Reperfusion: Die Schäden, welche bei ischämischen Zuständen und nachfolgender Reperfusion insbesondere bei Operationen mit einem kardiovaskulären Umgehungskreislauf unter Einsatz der Herz-Lungen-Maschine entstehen, werden ausführlich in Punkt 1.3.3 erläutert.
- b) Inflammation und Trauma: Durch mikrobielle Invasion oder chirurgische Eingriffe kann es im Körper zu einer systemischen inflammatorischen Reaktion kommen, welche typischerweise zu einem Kapillarlecksyndrom mit interstitiellen Ödemen und schließlich einer gestörten Mikrozirkulation führt. Zudem werden hierbei eine verstärkte Rekrutierung von Leukozyten und eine Aktivierung des Gerinnungssystems beobachtet. Da sowohl vaskuläre Permeabilität als auch Leukozytenrekrutierung von der Glykokalyx reguliert werden, liegt es nahe, dass die Zerstörung der Glykokalyx durch Entzündungsmediatoren bei Inflammation und Trauma hier eine entscheidende Rolle zu spielen scheint.<sup>37</sup> So können beispielsweise Tumornekrosefaktor alpha (TNF- $\alpha$ ) und Lipopolysaccharide (LPS) aus Bakterien ein „shedding“ der Glykokalyx über Mastzell- und Heparinaseaktivierung induzieren.<sup>32</sup>
- c) Artherosklerose: Mehrere Beobachtungen führen zu der Annahme, dass die Glykokalyx Anteil an der Entstehung und Entwicklung von artherosklerotischen Prozessen hat. Zum einen haben Vink et al. beobachtet, dass erhöhte LDL-Spiegel eine Störung der mikrovaskulären Glykokalyx im Musculus cremaster des Hamsters hervorrufen und auch zu Thrombozyten-Adhäsion führen.<sup>161</sup> Zum anderen wurde gezeigt, dass eine fett- und cholesterinhaltige Ernährung zu einer Reduktion der Glykokalyx führt, und dass zwischen Glykokalyxdicke und Intima-Media-Ratio, einem Marker für frühzeitige Arteriosklerose, eine inverse Korrelation besteht.<sup>63</sup>
- d) Diabetes: Diabetes mellitus ist weithin bekannt für seine vaskulären Komplikationen, welche mikro- und makroangiopathische Schäden einschließen. Nieuwdorp et al. konnten zeigen, dass es bei Hyperglykämie zu einer Reduktion des Glykokalyx-Volumens und zusätzlich zu einer erhöhten vaskulären Permeabilität kommt. Dies galt besonders für Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 und einer vorbestehenden Mikroalbuminurie. Die vermehrten Schäden an der Glykokalyx korrelierten mit im Plasma nachweisbaren steigenden Konzentrationen von Hyaluronsäure und Hyaluronidase, welche direkt den Abbau anzeigen.<sup>113, 114</sup> Auch Nussbaum et al. haben gezeigt, dass bei Kindern mit Diabetes mellitus Typ 1 bereits vor dem Auftreten von klinisch sichtbaren vaskulären Komplikationen mikrovaskuläre Veränderungen und Glykokalyxverlust nachgewiesen werden können.<sup>116</sup>

- e) Hypervolämie: Lange Zeit wurde eine sehr liberale perioperative Flüssigkeitstherapie propagiert, um die Verluste während der Operation zu kompensieren. Neuere Studien zeigen jedoch, dass eine regelrechte Überflutung zu zahlreichen Komplikationen führt. Wahrscheinlich kommt es durch die intravasale Hypervolämie zu einer Ausschüttung von ANP (atriales natriuretisches Peptid), welches in der Lage zu sein scheint, die Glykokalyx zu beschädigen, und damit die Permeabilität auch für Kolloide zu erhöhen.<sup>30, 33</sup>

### 1.2.5 Diagnostik

Die direkte Visualisierung der Glykokalyx ist äußerst schwierig, da diese sich als sehr fragil erwiesen hat und bei der histologischen Präparation durch Dehydratation bereits vor Durchführung der Elektronenmikroskopie schnell zerstört wird. Schon bei Untersuchung mit zu hoher Lichtintensität bei Intravitalmikroskopie droht ihr ein Schaden. Die ersten Bilder der Glykokalyx wurden 1966 mittels TEM (Transmissionselektronenmikroskop) geliefert.<sup>100</sup> Hierbei war jedoch nur eine Darstellung in vitro möglich (vgl. Abbildung 4A und B). Neuere Präparations- und Mikroskopietechniken wie Konfokalmikroskopie erlaubten eine schonendere Darstellung, wodurch die wirkliche Dicke der Glykokalyx genauer ausgemessen werden konnte. Durch immunhistochemische Anfärbungen lassen sich die Hauptbestandteile der Glykokalyx wie Syndecan-1 und Heparansulfat nachweisen. Diese können auch nach Abbau im Blut gemessen werden und zeigen ein „shedding“ der Glykokalyx an.<sup>33, 128</sup>

Im Jahre 1996 wurde von Vink et al. erstmals die Intravitalmikroskopie als Methode zur indirekten Darstellung der Glykokalyx in vivo vorgestellt. Diese basiert auf der Beobachtung, dass Erythrozyten die intakte Glykokalyx nicht passieren können, wodurch eine „Lücke“ zwischen den fließenden Erythrozyten und dem Endothel entsteht. Diese sog. „erythrocyte-endothelial cell (ECC) gap“ kann intravitalmikroskopisch sichtbar gemacht und ausgemessen werden und gilt seither als Goldstandard zur Quantifizierung der Glykokalyxdicke in vitro.<sup>162</sup> Auf einem ähnlichen Ansatz basiert die in der vorliegenden Arbeit verwendete Messmethode, welche in Punkt 2.7.1 genauer erläutert wird.

Mit der „fluorescent microparticle image velocimetry“ (micro-PIV) beschreiben Potter et al. eine weitere Variation der Intravitalmikroskopie zur Darstellung der Glykokalyx in vivo. Hier wird die Schnelligkeit von fluoreszierenden Mikropartikeln über eine bestimmte Zeit mit einer Doppelpuls-Lasertechnik gemessen. Aus den in zeitlichem Abstand fotografierten Partikelpositionen können Bewegungsrichtung und -geschwindigkeit gemittelt werden.

Mithilfe von Geschwindigkeitsprofilen und der möglichen Flussrichtung der Mikropartikel kann die Glykokalyxdicke berechnet werden.<sup>122</sup>

Nieuwdorp et al. haben 2006 das Gesamtvolumen der Glykokalyx durch Injektion von Tracern gemessen. Das systemische Glykokalyxvolumen wurde hier bestimmt, indem bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 die intravaskuläre Verteilung eines Glykokalyx-permeablem Tracer mit der eines Glykokalyx-impermeablem Tracers verglichen wurde.<sup>113</sup>

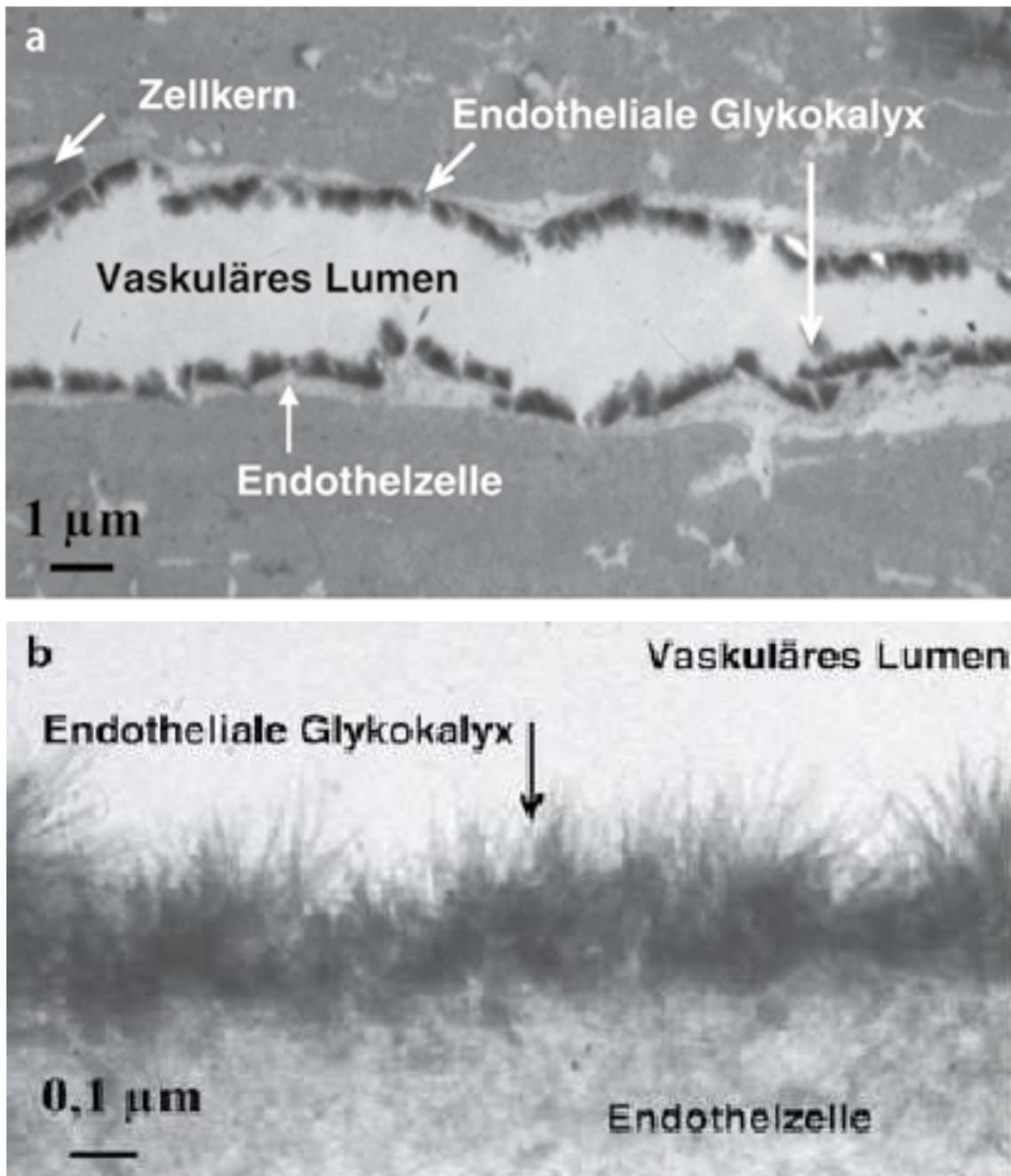


Abbildung 4 A und B: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der endothelialen Glykokalyx am Meerschweinchenherzen. Ausschnitt eines Koronargefäßes nach Anfärbung auf Lanthanbasis.<sup>33</sup>

### 1.2.6 Prävention

Es existieren verschiedene Ansätze, die die Degradation der Glykokalyx verhindern und den damit verbundenen Folgen vorbeugen sollen.

Prinzipiell kann zwischen Strategien unterschieden werden, welche den Wiederaufbau fördern, und solchen, welche den Abbau verhindern sollen.

Zu den Ansätzen, welche den Wiederaufbau der Glykokalyx fördern sollen, zählt die Gabe von Plasmaproteinen. Jacob et al. haben gezeigt, dass durch Verabreichung von Albumin der Glykokalyx-Aufbau gefördert und damit deren gestörter Integrität entgegengewirkt werden kann. Albumin weist nämlich positiv geladene Bindungsstellen auf und lagert sich so leichter an die vorwiegend negativ geladene Glykokalyx an als beispielsweise HES.<sup>80, 81</sup>

Die Verwendung von FFP im hämorrhagischen Schock hat ähnliche Effekte gezeigt. Peng et al. haben nachgewiesen, dass die Verabreichung von FFP nach hämorrhagischem Schock die Syndecan-1-Expression des pulmonalen Endothels wiederherstellt und außerdem die endotheliale Zellhyperpermeabilität und die Inflammation verringert.<sup>120</sup> So kann FFP zur Wiederherstellung einer intakten Glykokalyx und endothelialen Barriere beitragen.<sup>72, 120</sup>

Bei Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie wurde gezeigt, dass die unter dem Einfluss von Hyperlipidämie verminderte Glykokalyx durch Verabreichung von Statinen, hier Rosuvastatin, teilweise wiederhergestellt wurde.<sup>105</sup>

Auch die Verabreichung von Sulodexid, einem aus der Darmmukosa von Säugetieren extrahierten Glykosaminoglykan, konnte bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und konsekutiv gestörter Glykokalyxfunktion und erhöhter vaskulärer Permeabilität eine teilweise Wiederherstellung der Glykokalyx bewirken.<sup>21</sup>

In tierexperimentellen Studien konnte zudem gezeigt werden, dass der Endothelin-1-Rezeptor Antagonist Atrasentan den Glykokalyx-Abbau bei diabetischer Nephropathie vermindern kann, indem die Endothelin-1 induzierte Bildung von Heparanase gehemmt wird.<sup>27, 58</sup>

Zu den Strategien, welche den Glykokalyx-Abbau verhindern sollen, zählt die Verabreichung von Hydrokortison. Dieses kann als Antiphlogistikum durch Verhinderung der Degranulation von Mastzellen die Glykokalyx vor proteolytischem Abbau schützen, indem es die Freisetzung von Histamin, Zytokinen und anderen schädlichen Enzymen unterbricht.<sup>34</sup>

Als weitere therapeutische Ansätze können zum einen die direkte Inhibition von Faktoren, welche die Glykokalyx angreifen, angesehen werden. Hierzu gehört TNF- $\alpha$ , gegen welchen mit Eterncept ein Antikörper zur Verfügung steht, der in Studien schon eine Verminderung der Zerstörung der Glykokalyx bewirkt hat.<sup>112</sup> Zum anderen können auch

Vermeidungsstrategien wie das Anstreben von Normovolämie und Normoglykämie oder die Verabreichung von Antioxidantien zur Protektion der Glykokalyx beitragen.<sup>16</sup>

## **1.3 Herz-Lungen-Maschine**

### **1.3.1 Funktionsprinzip**

Der erste Einsatz einer extrakorporalen Zirkulation am Menschen datiert auf das Jahr 1953, als einer 18-jährigen Patientin mithilfe einer Herz-Lungen-Maschine (HLM) ein Vorhofseptumdefekt verschlossen wurde.<sup>62</sup>

Heute ist die HLM aus der Kardiochirurgie nicht mehr wegzudenken und unterliegt einer stetigen Optimierung. Das Grundprinzip ist über die Jahre jedoch gleich geblieben und soll im Folgenden kurz erläutert werden.

Meist wird das venöse Blut über eine Mehrstufenkanüle im rechten Vorhof, manchmal auch über die Vena cava superior und inferior, drainiert und mit Roller- oder Zentrifugalpumpen dem venösen Reservoir zugeführt. In Deutschland werden zumeist Rollerpumpen verwendet, welche einen nicht-pulsatilen Fluss erzeugen. Die Rückführung des Blutes nach Anreicherung mit Sauerstoff und Entfernung von Kohlendioxid im Oxygenator erfolgt meist über eine Kanüle in der Aorta ascendens (vgl. Abbildung 5).

Da das Blut an der HLM mit einer Fremdoberfläche in Berührung kommt, ist über die gesamte Zeit des Einsatzes eine Vollantikoagulation mit Heparin notwendig, welche über die „activated clotting time“ (ACT, Ziel > 450 s) gesteuert wird. Das Blut fließt an verschiedenen Sensoren und Filtern vorbei und kann dabei in seinem Fluss mittels Pumpen schrittweise auf ca. 2,2-2,4 l/min/m<sup>2</sup> KÖF beschleunigt werden.

Um trotz ausreichender Oxygenierung den Sauerstoffverbrauch des Körpers weiter zu reduzieren, kann die Operation auch in Hypothermie durchgeführt werden, da dies die Ischämietoleranz des Gewebes erhöht. Ermöglicht wird dies durch einen im Oxygenator integrierten Wärmeaustauscher, welcher den Körper auf eine voreingestellte Temperatur herunterkühlen kann. Man unterscheidet verschiedene Hypothermie-Abstufungen, von milder Hypothermie bei 32-34°C, über moderate Hypothermie bei 28-32°C, bis zu tiefer Hypothermie bei 18-28°C.<sup>136</sup> Letztere wird für Operationen mit totalem Kreislaufstillstand, wie zum Beispiel dem Aortenbogensersatz, benötigt.

Traditionell wird am nicht mehr schlagenden Herzen operiert. Erreicht wird der Herzstillstand durch eine hyperkaliämische Kardioplegielösung, welche meist in die Aorta ascendens injiziert wird und einen diastolischen Herzstillstand über Membrandepolarisation verursacht.

Nach Beendigung der Operation erfolgt die Aufhebung des Herzstillstandes durch Reperfusion der Koronargefäße nach Öffnen der Aortenklemme, welche zuvor das Herz von der extrakorporalen Zirkulation getrennt hat. Anschließend erfolgt die Wiederherstellung der Gerinnung durch Antagonisierung des Heparins mit Protamin.

Aktuell wird das traditionelle Verfahren zunehmend durch die sogenannten „off-pump“-Verfahren ersetzt, bei welchen das Herz mit einer Fixierungsvorrichtung stabilisiert wird und somit koronarchirurgische Eingriffe auch ohne Einsatz der HLM am schlagenden Herzen durchgeführt werden können. Außerdem gewinnen bei den Klappenersatzverfahren auch interventionelle Methoden ohne Sternotomie, wie transfemoraler oder transapikaler Aortenklappenersatz, immer mehr an Bedeutung, vor allem bei Hochrisikopatienten.<sup>13</sup>

Allerdings zeigen zum Beispiel Singh et al., dass das technische Verfahren, ob „off-pump“ oder „on-pump“, keinen signifikanten Einfluss auf die postoperative Nierenfunktion hat, obwohl man theoretisch einen Vorteil bei der „off-pump“-Chirurgie vermuten könnte.<sup>142</sup>

Auch Blackstone et al. haben nach Evaluation einiger großer Studien zum Vergleich von „on-pump“- versus „off-pump“-Chirurgie postuliert, dass für das Outcome der Patienten die Erfahrung und die Fertigkeiten des Chirurgen eine wesentlich größere Rolle spielen.<sup>17</sup>

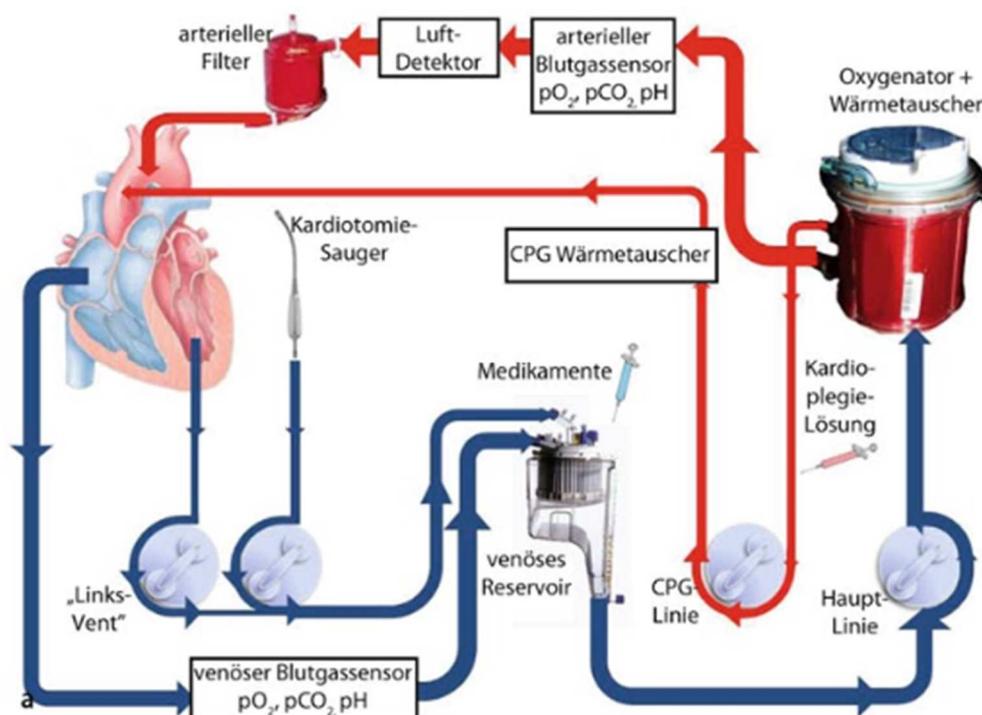


Abbildung 5: Aufbau der Herz-Lungen-Maschine: Schemazeichnung<sup>13</sup>

### 1.3.2 Pathophysiologische Auswirkungen

Eine häufige Komplikation nach Operationen unter Einsatz der HLM ist die Entwicklung eines sog. „systemic inflammatory response syndrome“ (SIRS). Diese überschießende Entzündungsreaktion ohne Keimnachweis kann einerseits durch Traumata, Verbrennungen oder große Operationen ausgelöst werden, wozu ein kardiochirurgischer Eingriff mit Sternotomie gezählt wird. Andererseits kann die HLM selbst an der Auslösung eines SIRS beteiligt sein, wobei die Pathogenese hierbei als multifaktoriell mit Beteiligung humoraler und zellulärer Faktoren beschrieben wird.<sup>164</sup> Dies ist besonders von Bedeutung, da die Letalität und postoperative Morbidität nach einer Herzoperation direkt durch das SIRS beeinflusst werden.<sup>99</sup>

Außerdem werden bei Verwendung der HLM verschiedene Kaskaden aktiviert, die weitere systemische Reaktionen auslösen. Diese Reaktionen können in zwei Phasen unterteilt werden, von denen die erste ein Resultat des Kontaktes von Blut mit nicht-endothelialen Oberflächen ist. Die zweite, spätere Phase ist geprägt von mikro- und makrozirkulatorischen Veränderungen. Zu diesen kommt es einerseits aufgrund einer Endotoxinämie durch eine intestinale Schrankenstörung mit Translokation von Darmbakterien sowie durch Ischämie-Reperfusionsschaden.<sup>87, 164</sup>

Wenn das Blut beim Einsatz der HLM mit Fremdoberflächen in Kontakt kommt, wird die Gerinnungskaskade über Faktor XII (intrinsische Aktivierung) und Faktor VII und III („tissue factor“, extrinsische Aktivierung) initiiert. Zugleich kann es während des kardiopulmonalen Bypasses aber auch zu einer überschießenden und kontinuierlichen Aktivierung der Fibrinolyse kommen, wodurch die Nachblutungsgefahr postoperativ steigt.<sup>13</sup>

Außerdem wird zusätzlich das Komplementsystem, ein humorales Protein-System zur Abwehr von Pathogenen, auf unterschiedlichen Wegen aktiviert. Dieses induziert durch den am Ende stehenden Membranangriffskomplex (MAC) die Lyse von fremden Zellen und die Aktivierung von Thrombozyten, Leukozyten und Endothelzellen.<sup>129</sup> Daneben kommt es aber auch durch weitere Auslöser wie Ischämie oder mechanische Affektion während der HLM zur Stimulation der genannten Zellen. Es ist mit zunehmender Bypasszeit ein Anstieg der Leukozytenzahl zu beobachten, welche bei Aktivierung proinflammatorische Botenstoffe freisetzen und ein Zusammenspiel mit Thrombozyten und Endothelzellen initiieren.<sup>125</sup> Dies resultiert letztendlich in einer vermehrten Leukozytendiapedese und -migration und einer gesteigerten Gefäßpermeabilität mit Ödemneigung.<sup>119</sup>

Infolge der beschriebenen Vorgänge sind häufig Organdysfunktionen nach einer Operation mit HLM zu beobachten. Besonders betroffen ist die Lunge, bei der es zu pulmonaler Dysfunktion mit Entwicklung von ALI („acute lung injury“) und ARDS („acute respiratory distress syndrome“) kommen kann.<sup>11</sup>

Am Herzen zeigen sich postoperativ erhöhte kardiale Enzyme, ein Reperfusionsschaden mit myokardialer Inflammation und eine relevante kardiale Dysfunktion.<sup>103</sup> Die Nieren sind durch hämodynamische, inflammatorische und nephrotoxische Einflüsse, wie zum Beispiel freigesetzte zelluläre Proteasen und toxische O<sub>2</sub>-Produkte, besonders gefährdet postoperativ einen klinisch relevanten Schaden zu erleiden.<sup>131</sup> Ebenfalls oft beobachtet nach kardiochirurgischen Interventionen wird eine Beeinträchtigung der kognitiven Funktionen, was von häufig auftretender vorübergehender kognitiver Dysfunktion bis zum Schlaganfall reicht.<sup>19, 111</sup>

Auch hier kann die HLM mit verantwortlich gemacht und Endotoxinämie und Ischämie-Reperfusionsschaden als Ursachen angegeben werden.<sup>102</sup>

### **1.3.3 Einfluss der HLM auf die Mikrozirkulation und die endotheliale Glykokalyx**

Wenn bei einer herzchirurgischen Operation die Herz-Lungen-Maschine zum Einsatz kommt, bedeutet dies einen tiefen Einschnitt in die Physiologie des Körpers und in unserem Fall des kindlichen Körpers. Das Blut kommt mit Fremdmaterial in Berührung, der Blutfluss erfolgt häufig nicht-pulsatil, es wird ein kardioplegischer Herzstillstand induziert und die Körpertemperatur wird um einige Grade gesenkt.

Es liegt nahe, dass ein so komplizierter Eingriff mit extrakorporaler Zirkulation ebenfalls Einfluss auf die Mikrozirkulation und die Glykokalyx hat.

Nach der Ischämiezeit an der HLM folgt die Reperfusion des Gewebes, welche die Schäden daran sogar noch verstärken kann. Ein häufiger Teilaspekt der hier ablaufenden pathologischen Prozesse ist die mikrozirkulatorische Dysfunktion. Eine wichtige Rolle spielt dabei die ungleich verteilte Fähigkeit der Arteriolen zur Vasodilatation, welche durch eine gestörte NO-Produktion verursacht wird. Außerdem kommt es im Rahmen eines sog. Kapillarlecksyndroms zu einer verstärkten Flüssigkeitsfiltration und zur vermehrten Durchlässigkeit der Gefäße für Proteine, wodurch die Entstehung von interstitiellen Ödemen begünstigt wird. Auch die vermehrte Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen mit erschwerter Kapillarpassage tragen zu den pathologischen Veränderungen der Mikrozirkulation bei. Einen weiteren Beitrag zur Störung der mikrozirkulatorischen Integrität

leisten die Freisetzung von Entzündungsmediatoren und die gesteigerte Expression von Adhäsionsmolekülen, wodurch die zuvor beschriebenen inflammatorischen und koagulatorischen Kaskaden aktiviert werden. Dies kann letztlich in einem Verschluss der Kapillaren resultieren (sog. „capillary plugging“) <sup>67, 138</sup> und in den betroffenen Regionen zum sogenannten „no reflow“-Phänomen führen, welches den Schaden am Gewebe noch aggraviert. <sup>153</sup>

Den Endothelzellen kommt hierbei insgesamt eine zentrale Rolle zu. Sie können sich durch ödematöse Quellung von der Basalmembran ablösen <sup>67</sup> und stehen besonders in den postkapillären Venolen unter oxidativem Stress. <sup>96</sup> Die inflammatorische Aktivierung des Endothels und die gestörte endotheliale Integrität führen zu vermehrter Leukozytenrekrutierung und erhöhter vaskulärer Permeabilität mit Gewebsödem. <sup>82</sup>

Koning et al. zeigten, dass die genannten Prozesse vor allem bei herzchirurgischen Operationen mit Einsatz der HLM zu beobachten sind. Mittels SDF Imaging wurde nachgewiesen, dass bei extrakorporaler Zirkulation die sog. „perfused vessel density“, d.h. die Dichte der durchbluteten Gefäße pro Gewebereinheit um 20% abnahm, während sie bei „off-pump“-Verfahren stabil blieb. <sup>91</sup>

Auch die Glykokalyx scheint bei herzchirurgischen Operationen an der HLM einen relevanten Schaden zu erleiden.

Zunächst haben tierexperimentelle Untersuchungen gezeigt, dass Ischämie und Reperfusion die endotheliale Glykokalyx beschädigen. <sup>106, 121</sup> Unter anderem haben Chappell et al. am isolierten Meerschweinchenherzen die Fragilität der Glykokalyx demonstriert: Eine warme Ischämiezeit von 20 Minuten reichte hier aus, um die Glykokalyx komplett zu zerstören. Dies führte zu einem Gewebsödem mit daraus folgender Organdysfunktion. <sup>34</sup>

Im Jahre 2007 konnten diese Beobachtungen in die Klinik übertragen werden. Rehm et al. zeigten, dass nach großen gefäßchirurgischen Operationen mit regionaler und globaler Ischämie erhöhte Konzentrationen der Glykokalyx-Bestandteile Syndecan-1 und Heparansulfat im Plasma nachweisbar waren. Hier waren die intraoperativen Plasmalevel direkt proportional zur Ischämiedauer. <sup>126</sup> Auch Svennevig et al. bestätigten dies 2008 in einer klinischen Studie. <sup>147</sup>

Außerdem zeigte sich anhand erhöhter Plasmalevel, dass es zu einem ausgedehnteren „shedding“ der Glykokalyx kommt bei Operationen mit Einsatz der HLM („on-pump“) als bei „off-pump“-Operationen. <sup>26</sup>

Auch bei Kindern, welche sich aufgrund von angeborenen Herzfehlern Operationen mit kardiopulmonalem Bypass unterziehen müssen, wurden viele der bereits erwähnten

Komplikationen in Studien beschrieben. Dazu gehört zum einen die Entstehung eines postoperativen Kapillarlecksyndroms mit generalisierten Ödemen.<sup>110, 140</sup> Zum anderen wurde auch bei Kindern eine systemische inflammatorische Reaktion mit Aktivierung von Kaskaden des Komplementsystems und der Gerinnung<sup>146</sup> sowie von Thrombozyten<sup>76</sup>, Endothelzellen<sup>18</sup> und Leukozyten beobachtet, was zu einer systemischen Freisetzung von Entzündungsmediatoren führt.<sup>61</sup>

Kinder scheinen insgesamt noch empfindlicher auf die Nebeneffekte der HLM zu reagieren als erwachsene Patienten. Vor allem Neugeborene und Kleinkinder sind besonders gefährdet nach dem Eingriff unter erhöhter vaskulärer Permeabilität und einem Kapillarlecksyndrom zu leiden.<sup>140, 146</sup>

2015 haben Bruegger et al. bei Kindern während und nach kardiochirurgischen Eingriffen an der HLM Glykokalyx-Abbauprodukte im Blut nachgewiesen und damit gezeigt, dass es dabei zu einem „shedding“ der endothelialen Glykokalyx kommt.<sup>23</sup>

Angesichts der zentralen Rolle der Glykokalyx für die vaskuläre Integrität legen die zuvor beschriebenen Beobachtungen nahe, dass eine Beschädigung der endothelialen Glykokalyx einer der zugrunde liegenden Mechanismen der Pathogenese postoperativer Komplikationen nach Einsatz der HLM sein könnte.

## 1.4 Fragestellungen

Wie zuvor dargestellt, sind Kinder in besonderem Maße gefährdet, nach Operationen an der Herz-Lungen-Maschine Komplikationen wie ein SIRS oder ein Kapillarlecksyndrom zu entwickeln. Deswegen ist es von besonderem Interesse, den postoperativen Verlauf so schonend und optimal wie möglich zu gestalten und eventuellen Komplikationen, die den Genesungsprozess verzögern können, zuvorzukommen. Hierfür ist es wichtig, die pathogenetischen Faktoren besser zu verstehen, welche zur Entstehung HLM-assoziiertes Komplikationen beitragen.

In den letzten Jahrzehnten ist das wissenschaftliche Interesse an Veränderungen der Mikrozirkulation und der Glykokalyx und deren Rolle bei der Krankheitsentstehung gestiegen und folglich hat sich auch das Wissen darüber vergrößert.

Beim Erwachsenen wurden Mikrozirkulations-Veränderungen und Glykokalyx-Verlust nach Operationen an der Herz-Lungen-Maschine, wie oben beschrieben, beobachtet.<sup>91, 126</sup>

Auch bei Kindern liefern erhöhte Spiegel von Glykokalyx-Abbauprodukten im Serum einen indirekten Hinweis auf eine Beschädigung der Glykokalyx nach Operationen mit Einsatz der HLM.<sup>23</sup>

Durch SDF Imaging ist es möglich, die Mikrozirkulation und die Glykokalyx prä- und postoperativ einfach und nicht-invasiv zu beurteilen und Veränderungen frühzeitig zu erkennen. Dies könnte in der Zukunft für Interventionen und Therapie von Bedeutung sein.

Nach unserem Kenntnisstand existiert bis jetzt jedoch keine Studie, die direkt die möglichen Veränderungen von Mikrozirkulation und Glykokalyx bei Kindern nach Operationen an der HLM untersucht. Deshalb war es Ziel der vorliegenden Arbeit diese bei Neugeborenen und Kleinkindern mit angeborenen Herzfehlern im prä- und postoperativen Verlauf von kardiochirurgischen Operationen mit extrakorporaler Zirkulation zu untersuchen und mit dem postoperativen Verlauf der Kinder zu korrelieren.

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden daher folgende Fragestellungen im Detail untersucht:

- a) Treten bei Kindern mit angeborenen Herzfehlern im Rahmen von herzchirurgischen Operationen an der Herz-Lungen-Maschine messbare Veränderungen der Mikrozirkulation auf?
- b) Kommt es im Rahmen von herzchirurgischen Operationen an der Herz-Lungen-Maschine zu einem Verlust der mikrovaskulären Glykokalyx („shedding“)?
- c) Sind mögliche Alterationen der Mikrozirkulation und der Glykokalyx abhängig von der Dauer der extrakorporalen Zirkulation während der Operation?
- d) Besteht eine Korrelation zwischen möglichen Veränderungen der Mikrozirkulation und der mikrovaskulären Glykokalyx mit dem postoperativen Verlauf der Kinder?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Rahmenbedingungen

Die Untersuchungen wurden in Einklang mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt und waren von der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München im Vorfeld genehmigt.

Die in-vivo-Messungen fanden in der kinder-kardiologischen Abteilung des Universitätsklinikums Großhadern in München im Zeitraum von November 2011 bis September 2012 statt.

Voraussetzung für die Teilnahme der Kinder an der Studie war die schriftliche Einwilligung mindestens eines Elternteils oder Erziehungsberechtigten. Aufgeklärt wurden diese von den zuständigen Stationsärzten und/oder den behandelnden Kardiochirurgen.

### 2.2 Patientenkollektiv

An der Studie haben insgesamt 40 Neugeborene und Kleinkinder mit angeborenen Herzfehlern in einem medianen Alter von 6,25 Monaten (zwischen 5 Tagen und 31 Monaten) teilgenommen. 36 dieser Kinder mussten sich einer Operation mit Einsatz der Herz-Lungen-Maschine unterziehen, bei vier von ihnen kam diese nicht zum Einsatz.

Tabelle 1 liefert eine Übersicht über die Diagnosen und Operationsverfahren der eingeschlossenen Patienten.

Patient	Diagnose	Operationsverfahren	Kommentar
01	TGA, CoA, ASD, VSD, PDA	Arterielle Switch-Operation, CoA-Resektion, ASD/VSD- Verschluss, PDA-Ligatur	
02	ASD, VSD, PDA	ASD/VSD-Verschluss, PDA- Ligatur	
03	HLHS (Z.n. Norwood)	Bidirektionale Glenn- Operation	
04	Double-chambered right ventricle, VSD	Resektion von fibromuskulärem Gewebe, VSD-Verschluss	

05	VSD, Trisomie 21	VSD-Verschluss	
06	Criss-cross heart, TGA, PA, ASD, VSD (Z.n. Glenn)	Fontan-Operation	
07	IAA, VSD, ASD, PDA	Rekonstruktion des Aortenbogen, PDA-Ligatur, PA-Banding	
08	TAPVR, ASD, PDA	Korrektur TAPVR, ASD-Verschluss	
09	HRHS, ASD, VSD (Z.n. Glenn)	Fontan-Operation	
10	HLHS (Z.n. Glenn)	Fontan-Operation	
11	Heterotaxie, common inlet DORV, PS, APVR, ASD	Bidirektionale Glenn-Operation	
12	Sinus venosus ASD	Sinus venosus ASD-Verschluss	
13	TOF	Komplette TOF-Korrektur	
14	Dextrokardie, TA, PS, ASD, VSD	Modifizierter Blalock-Taussig-Shunt	Ohne HLM
15	HLHS (Z.n. Fontan)	Glenn-Operation	
16	AVSD	AVSD-Verschluss	
17	HLHS (Z.n. Norwood)	Bidirektionale Glenn-Operation	
18	DORV, hypoplastischer LV, MA, LSVC	Atrioseptektomie, PA-Banding	
19	HLHS, CoA (Z.n. Fontan und CoA Dilatation), re-CoA	Stentimplantation in den Aortenisthmus in Hybridtechnik	Ohne HLM
20	DORV, ASD, VSD, LSVC	RVOT-Rekonstruktion, ASD/VSD-Verschluss	
21	AVSD, Trisomie 21	AVSD-Korrektur	
22	AVSD, Trisomie 21	AVSD-Korrektur	
23	HLHS (Z.n. Glenn)	Fontan-Operation	
24	HLHS (Z.n. Glenn)	Fontan-Operation	
25	HLHS (Z.n. Norwood)	Bidirektionale Glenn-Operation	
26	DORV, ASD, VSD	RVOT-Rekonstruktion, ASD/VSD-Verschluss	
27	AVSD	AVSD-Korrektur	

28	IAA, VSD, ASD	Rekonstruktion des Aortenbogen, ASD/VSD-Verschluss	
29	HRHS	Glenn-Operation	
30	VSD	VSD-Verschluss	
31	HLHS, ASD	Bilaterales PA-Banding	Ohne HLM
32	CoA	CoA-Resektion, End-zu-End-Anastomose	Ohne HLM
33	TGA, ASD; PDA	Arterielle Switch-Operation, ASD-Verschluss, PDA-Ligatur	
34	TOF	Komplette TOF-Korrektur	
35	TA, ASD, VSD (Z.n. PA-Banding)	Glenn-Operation	
36	HLHS (Z.n. Glenn), Trikuspidalinsuffizienz	Rekonstruktion der Trikuspidalklappe	
37	PA, VSD (Z.n. modifiziertem Blalock-Taussig-Shunt)	RVOT-Rekonstruktion, VSD-Verschluss	
38	TGA, ASD, PDA	Arterielle Switch-Operation, ASD-Verschluss, PDA-Ligatur	
39	HLHS (Z.n. Norwood)	Bidirektionale Glenn-Operation	
40	HLHS	Norwood-Operation	

**Tabelle 1: Übersicht über Diagnosen und Operationsverfahren**

**APVR, Anormaler Pulmonalvenenrückfluss, ASD, Atriumseptumdefekt, AVSD, Atrioventrikulärer Septumdefekt, CoA, Aortenisthmusstenose, DORV, Double Outlet Right Ventricle, HLHS/HRHS, Hypoplastisches Links/Rechtsherzsyndrom, HLM, Herzlungenmaschine, IAA, Unterbrochener Aortenbogen, LSVC, Linke obere Hohlvene, LV, Linker Ventrikel, MA, Mitralklappenatresie, PA, Pulmonalarterie, PDA, Persistierender Ductus arteriosus, PS, Pulmonalstenose, RVOT, Rechtsventrikulärer Ausflusstrakt, TA, Trikuspidalatresie, TAPVR, Vollständig anormaler Pulmonalvenenrückfluss, TGA, Transposition der großen Arterien, TOF, Fallot'sche Tetralogie, VSD, Ventrikelseptumdefekt, Z.n., Zustand nach.**

Einschlusskriterien waren neben der Einverständniserklärung der Eltern ein angeborener Herzfehler, der einen Eingriff mit Einsatz der Herz-Lungen-Maschine notwendig machte. Kinder, die sich einem operativen Eingriff ohne Einsatz der HLM unterziehen mussten, wurden als Kontrollen gemessen.

Ausschlusskriterien waren Notfalloperationen, lebensbedrohliche Erkrankungen, die nicht direkt mit der Herzerkrankung vergesellschaftet sind, und ein Alter über drei Jahre, da die Qualität der transdermalen Messung mit zunehmender Hautdicke stark nachlässt.

Wenn aufgrund klinischer oder organisatorischer Bedingungen eine Fortführung der Messungen nicht möglich war, ein Kind beispielsweise zu instabil war, wurden die Messungen ausgesetzt.

Außerdem wurde bei sechs der oben genannten 40 herzchirurgisch zu versorgenden Kindern präoperativ eine Herzkatheteruntersuchung unter Allgemeinanästhesie durchgeführt, welche ebenfalls vor und nach diesem Eingriff von uns als Kontrollkinder untersucht wurden.

Zusätzlich schlossen wir eine Kontrollgruppe ein, die aus neun Kindern bestand, welche aufgrund einer Lippen-Kiefer-Gaumenspalte in der Abteilung für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie der Ludwig-Maximilians-Universität München unter Allgemeinanästhesie operiert wurden.

## **2.3 Studiendesign**

Als Studiendesign wurde eine prospektive Single Center Studie gewählt.

Die Durchführung der Messungen erfolgte nicht verblindet, da Operateure, aber auch behandelndes Team der Intensivstation über das operative Vorgehen informiert sein mussten und der Einsatz der HLM aus der unmittelbaren perioperativen Versorgung evident wurde. Die Auswertung der Videofiles erfolgte jedoch verblindet bezüglich Diagnose, Operationsart und Zeitpunkt der Messung, da die Patienten-Videos pseudonymisiert waren und somit bei einzelnen Videosequenzen unklar war, welcher Patient zu welchem Zeitpunkt und mit welchem Eingriff ausgewertet wurde.

### **2.3.1 Gruppeneinteilung**

Um die Effekte der Herz-Lungen-Maschine auf die Mikrozirkulation und die mikrovaskuläre Glykokalyx zu untersuchen und die o.g. Fragestellungen zu klären, wurden verschiedene Untersuchungsgruppen betrachtet und verglichen.

Als eigentliche Versuchsgruppe dienten **36 Kinder**, die sich einer Operation mit Einsatz der HLM unterziehen mussten.

Als Kontrollgruppen dienten:

- **4 Kinder** mit angeborenen Herzfehlern, bei denen ein Einsatz der HLM während der Operation nicht notwendig war.
- **6 Kinder** mit diagnostischer Herzkatheteruntersuchung.
- **9 Kinder** mit Operation einer Lippen-Kiefer-Gaumenspalte (nur Messungen der sog. Perfused Boundary Region).

Aufgrund von strengeren Qualitätsanforderungen an die Mikrozirkulationsmessungen konnten für die Glykokalyx-Untersuchungen letztlich die Daten von 21 Kindern mit angeborenen Herzfehlern und Operation an der HLM verwendet werden.

Innerhalb des Kollektivs von Kindern mit Operation an der HLM wurden verschiedene Gruppen miteinander verglichen und dabei folgende Unterteilungen verwendet:

- **HLM (n=11):** Kinder, welche unter Einsatz der HLM nach arterieller und venöser Kanülierung ohne Herzstillstand in Normothermie operiert wurden.
- **HLM + Aortenklemmzeit (AK) (n=17):** Kinder, welche unter Einsatz der HLM mit Aortenklemmzeit operiert wurden. Hier wurde nach arterieller und bicavaler venöser Kanülierung die Aorta abgeklemmt, die HLM gestartet, der kardioplegische Herzstillstand induziert und bei einer Körperkerntemperatur zwischen 28 und 32°C operiert. Hierdurch waren Herz und Lunge einer Ischämie ausgesetzt.
- **HLM + AK + tiefer hypothermischer Herzkreislaufstillstand (DHCA) (n=8):** Kinder, welche unter Einsatz der HLM mit Aortenklemmung und in tiefer Hypothermie operiert wurden. Hier wurde nach Kanülierung, Abklemmung und Start der HLM vorübergehend ein kompletter Herzkreislaufstillstand mit Ganzkörperischämie bei einer Körperkerntemperatur von 18°C induziert.

### 2.3.2 Messzeitpunkte

Pro Kind waren im Studienprotokoll je nach Gruppe zwei bis fünf SDF-Messzyklen vorgesehen. Die festgelegten Messzeitpunkte orientierten sich an den Operationsterminen und liefen nach folgendem Schema ab:

Kinder mit angeborenem Herzfehler und kardiochirurgischen Eingriffen:

- **T0:** Präoperative Messung (Baseline) am nicht narkotisierten oder sedierten Kind, i.d.R. am Abend vor der Operation, da im schlafenden Zustand die besten Messbedingungen herrschen.
- **T1:** Postoperative Messung innerhalb einer Stunde nach Aufnahme auf der Intensivstation in Absprache mit OP-Team und Station, nach Durchführung der notwendigen Prozeduren wie EKG und Röntgen-Thorax, aber vor Einleitung der Extubation noch unter Rest-Narkose; **T1** entspricht in der Kontrollgruppe mit präoperativer Herzkatheteruntersuchung auch der postinterventionellen Messung nach dem Eingriff.
- **T2:** Messung 24h postoperativ, möglichst am schlafenden Kind, deswegen variable Messzeitpunkte, im Ausnahmefall am weiter intubierten und sedierten Kind.
- **T3:** Messung 7d postoperativ, ebenfalls möglichst am schlafenden Kind, im Ausnahmefall am weiter intubierten und sedierten Kind.

Kinder aus der Kontrollgruppe mit Lippen-Kiefer-Gaumenspalte:

- **T0:** Präoperative Messung im Operationsraum unter Allgemeinanästhesie.
- **T1:** Postoperative Messung im Operationsraum unter Allgemeinanästhesie.

### 2.3.3 Klinische und laborchemische Daten

Neben operationsspezifischen Daten wie Dauer, Zeit an der HLM und Aortenklemmzeit wurden parallel zu den SDF-Messungen zu jedem Messzeitpunkt festgelegte klinische und laborchemische Daten erhoben.

Hierzu gehörten allgemeine Informationen wie Alter und aktuelles Gewicht, außerdem Vitalparameter wie Herzfrequenz, Blutdruck mit Systole, Diastole und Mitteldruck, Sauerstoffsättigung, Temperatur und Atemfrequenz. Auch die Art der Ernährung sowie Wasser- und Volumenbilanz wurden dem Pflegebogen entnommen. Darüber hinaus wurden klinisch erkennbare Ödeme notiert.

Die aktuelle Medikation inklusive Dauerinfusionen und eventuelle Transfusionen von Blutprodukten sowie die letzte Blutgasanalyse (pH, pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, BE, Laktat,

Blutzucker) waren wichtiger Bestandteil der Dokumentation zu jedem Messzeitpunkt. Aus dem jeweils aktuellsten Labor wurden Blutbild, Entzündungsparameter wie C-reaktives Protein und Interleukin-6 und Myokardläsionsparameter wie Gesamt-CK und CK-MB entnommen.

Außerdem wurden, falls vorhanden, die Beatmungsparameter wie Beatmungsform, Sauerstoff-Zufuhr, PIP, PEEP, Frequenz und Tidalvolumina zu jedem Messzyklus dokumentiert.

Zusätzlich erhobene Outcome-Parameter waren die Dauer des Katecholaminbedarfs, die Notwendigkeit einer invasiven Beatmung und die Parameter für ein Kapillarlecksyndrom (Anasarka, Pleuraergüsse, Aszites und der Thoraxquotient nach Sonntag(vgl. Punkt 2.9)<sup>144</sup>).

## **2.4 Operation und perioperatives Management**

### **2.4.1 Anästhesie und Operation**

Keines der Kinder erhielt präoperativ anti-inflammatorische Medikamente (z.B. Kortikosteroide, NSARs) oder Katecholamine. Vier Kinder mit angeborenen Herzfehlern waren mit einer kontinuierlichen Prostaglandin E1-Infusion versorgt und eines davon erhielt Natrium-Nitroprussid. Ein Kind war mechanisch beatmet. Alle Kinder erhielten eine perioperative antibiotische Prophylaxe mit Cefuroxim.

Zur Prämedikation vor der Operation erhielten die Kinder Midazolam-Saft per os in einer Dosierung von 0,5 mg/kgKG. Im Operationssaal erfolgte die Einleitung inhalativ mit Sevofluran und auch die Narkose wurde in Form einer balancierten Anästhesie mit Sevofluran weitergeführt und gewährleistete eine durchgehende Hypnose. Zur Analgesie während der Operation wurde Sufentanil i.v. (etwa 0,20 µg/kgKG) verabreicht. Zusätzlich wurde mit Rocuronium i.v. (etwa 0,50 mg/kgKG) eine Relaxation erreicht, die die nasotracheale Intubation erleichterte.

Die Beatmung erfolgte mit einer FiO<sub>2</sub> von 1,0, die Einstellung der Beatmungsmaschine orientierte sich am expiratorisch gemessenen Kohlendioxid-Partialdruck (pCO<sub>2</sub>), der idealerweise zwischen 34 und 45 mmHg liegt.

Zum perioperativen Monitoring gehörten weiterhin ein Zwei-Lumen-ZVK, meist in der rechten Vena jugularis interna, für Volumentherapie und Medikamente sowie eine invasive Blutdruck-Messung mittels einer arteriellen Kanüle in einer der Arteriae radiales, welche auch

für Blutgaskontrollen genutzt wurde. Außerdem wurden die Kinder mit einem Blasendauerkatheter und einer nasalen Magensonde versorgt.

Es wurde anschließend eine mediane Sternotomie durchgeführt und die zu operierenden Strukturen freipräpariert. Vor Start der Herz-Lungen-Maschine erfolgte immer die Antikoagulation mit Heparin, um die ACT über 450 Sekunden zu halten. Während der Operation kam zudem eine kardioplegische Lösung, meistens Brettschneider nach Körpergewicht, zum Einsatz. Nach Beendigung des Einsatzes der Herz-Lungen-Maschine wurde die Blutverdünnung mit Protamin antagonisiert.

Die Transfusion von Blutprodukten wie EK, TK, FFP, PPSB und Humanalbumin erfolgte nach Ermessen des zuständigen Anästhesisten. In der Regel war dies bei ausgedehnten Operationen an der HLM notwendig.

Grundsätzlich lassen sich die Operationsmethoden an der Herz-Lungen-Maschine je nach zu operierendem Herzfehler in drei Kategorien unterteilen (siehe auch Gruppeneinteilung Punkt 2.3.1):

- Herz-Lungen-Maschine (HLM) am schlagenden Herzen ohne Klemmung der Aorta in Normothermie
- HLM mit Klemmung der Aorta in milder Hypothermie bei einer Körperkerntemperatur zwischen 28 und 32°C
- HLM mit Aortenklammung und komplettem Kreislaufstillstand bei einer Körperkerntemperatur von 18°C (tiefe Hypothermie)

#### **2.4.2 Postoperative Versorgung auf der Intensivstation**

Nach der Operation erfolgte die Verlegung der noch beatmeten Kinder unter auslaufender Narkose auf die Intensivstation, wo die weitere Behandlung nach Standardprotokollen für pädiatrische Intensivmedizin verlief. Das Monitoring umfasste Herzfrequenz, Atemfrequenz, Temperatur, arteriellen und venösen Blutdruck, Flüssigkeitsbilanz, arterielle Blutgasanalysen und Blutbildkontrollen engmaschig direkt nach der Operation und dann nach Bedarf.

Bei hypovolämen Zuständen wurde Volumen i.d.R. in Form von Humanalbumin 5% substituiert.

Die Katecholamintherapie wurde zunächst aus dem OP übernommen und schließlich nach Bedarf, gemessen an klinischem Zustand, echokardiografischer Beurteilung und Hämodynamik, angepasst.

Außerdem wurde, je nach Operationsmethode, mit einer prophylaktischen oder therapeutischen gewichtsadaptierten Heparin-gabe begonnen, unter der Voraussetzung, dass keine Zeichen einer aktiven Blutung vorhanden waren.

## 2.5 Untersuchung der Mikrozirkulation

### 2.5.1 Visualisierung der Mikrozirkulation

Die Darstellung der Mikrozirkulation erfolgte mittels Sidestream Dark Field (SDF) Imaging wie in Punkt 1.1.3.3 ausführlich beschrieben. Hierfür wurde das tragbare MicroScan Videomikroskop der Firma MicroVision Medical (Amsterdam, Niederlande) verwendet, welches nicht invasiv ein bewegtes in-vivo-Bild des Gefäßnetzes und der Mikrozirkulation liefert.<sup>20, 78</sup>



Abbildung 6: Videomikroskop mit LED-Beleuchtung der Firma MicroVision Medical<sup>1</sup>

Als Lichtquelle dienen Leuchtdioden am Ende der optischen Einheit, welche sich ringförmig um einen zentralen Lichtleiter gruppieren. Über einen Drehknopf lässt sich die Lichtintensität regulieren, wodurch eine Überbelichtung verhindert werden kann. Zusätzlich kann durch ein ringförmiges Drehelement die Fokussierung verändert werden.

Durch die räumliche Trennung der Lichtquelle von der optischen Einheit nehmen störende Oberflächenreflexionen nicht an der Bilderzeugung teil, wodurch die Bildqualität im Vergleich zu OPS Imaging verbessert wird (vgl. Abbildung 7).

Die Bilderzeugung und Vergrößerung erfolgt anhand des in den tieferen Schichten reflektierten und depolarisierten Lichts, welches durch ein in das Videomikroskop integriertes 5-fach Objektiv auf eine Videokamera projiziert wird. Über einen Analog-Digital Konverter (vgl. Punkt 2.5.2) entsteht so eine negativ-kontrastierte Darstellung der Mikrozirkulation in 325-facher Vergrößerung auf dem Bildschirm (720x576 Pixel).<sup>50</sup>

Die Kalibrierung der SDF-Kamera erfolgte mithilfe eines Micrometer-Maßstabs und ergab eine Auflösung von 1 Pixel  $\sim$  1  $\mu\text{m}$  x 1  $\mu\text{m}$ .

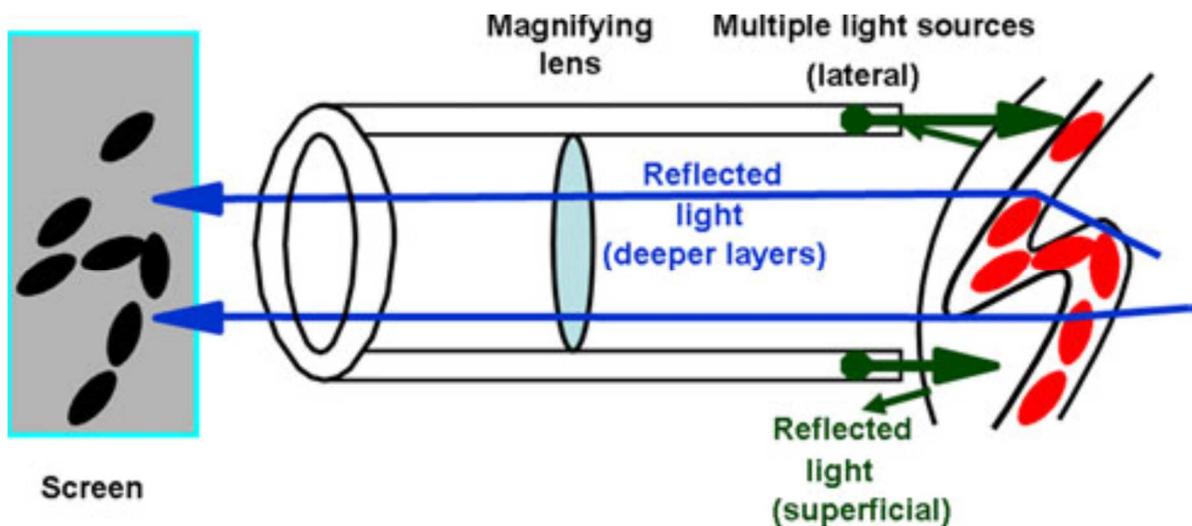


Abbildung 7: SDF Imaging: Grünes Licht wird von den lateral gelegenen Leuchtdioden des Geräts emittiert. Das von den oberflächlichen Gewebeschichten reflektierte Licht kann das Zentrum des Geräts, wo sich die Optik befindet, nicht erreichen. Das von den tiefen Gewebeschichten reflektierte Licht aber erreicht das Zentrum. Dieses Licht wird vom Hämoglobin der Erythrozyten absorbiert, sodass sich diese auf dem Bildschirm dunkel abbilden, während die Umgebung hell erscheint.<sup>50</sup>

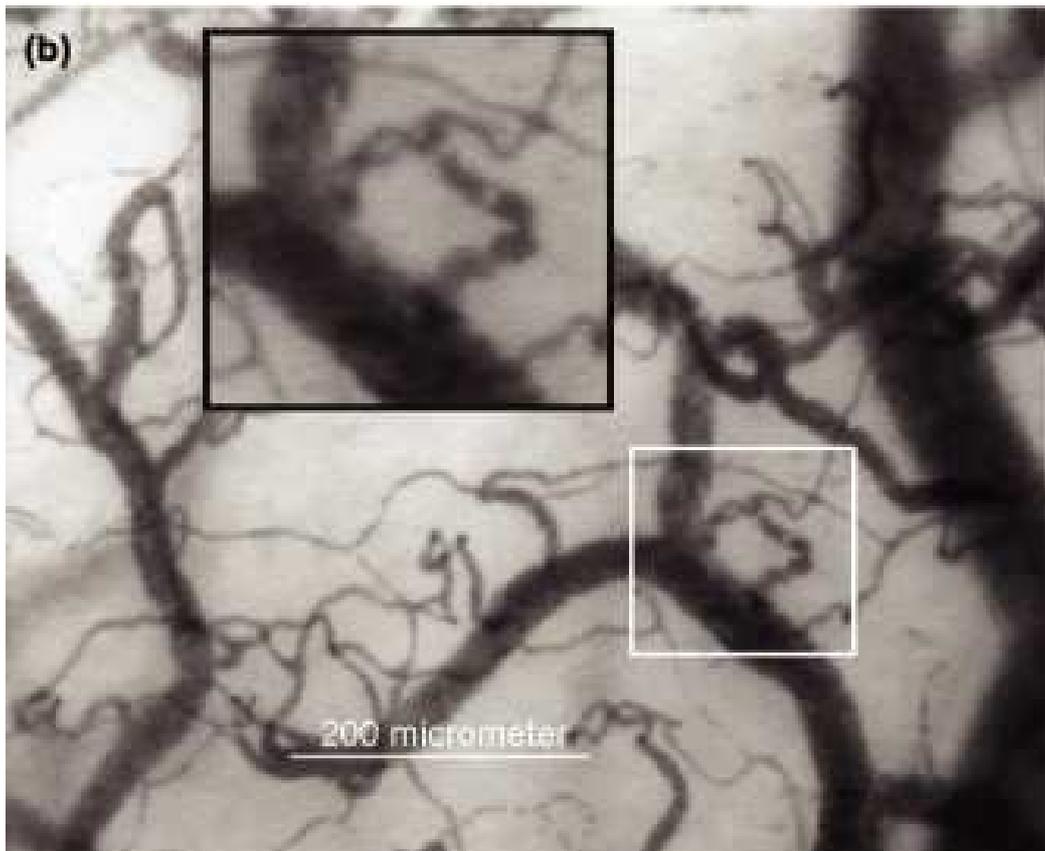
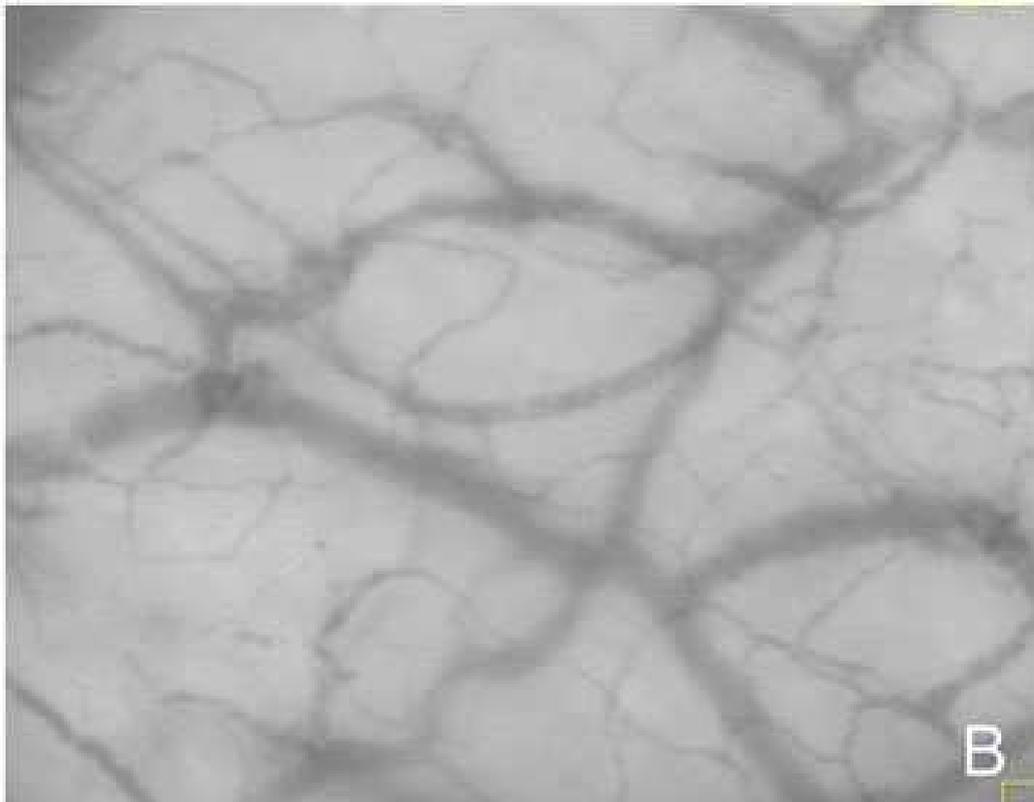


Abbildung 8: Mikrozirkulationsdarstellung mittels SDF Imaging: Das emittierte Licht wird durch das Hämoglobin der Erythrozyten absorbiert. Deswegen erscheinen perfundierte Gefäße dunkel. <sup>65, 78</sup>

## 2.5.2 Versuchsaufbau

Die komplette Versuchseinheit mit Videomikroskop und Notebook ist in Abbildung 9 dargestellt und wie folgt aufgebaut:

- Tragbares Videomikroskop von MicroVision Medical mit Kunststoffkappe auf der Linse für Schutz und Sterilität
- Batterieeinheit zur Energieversorgung des Videomikroskops während der Messungen
- Adapter zur Videokonvertierung
- Notebook
- Verbindungskabel

Das Videomikroskop als zentrale Einheit, welche direkt mit dem Kind in Berührung kommt, wird zum Schutz der Optik und zum Erhalt der Sterilität mit einer auswechselbaren Plastikkappe bedeckt. Verbunden wird die Kamera durch ein Kabel mit der Batterieeinheit.

Die Batterieeinheit ist über ein weiteres Verbindungskabel mit dem Adapter Canopus ADVC110 (Thomson Inc dba Grass Valley, Kobe, Japan) konnektiert, der die analog-digitale Videokonvertierung vornimmt. Der Adapter wiederum ist mit einem Notebook (Fujitsu Lifebook, Modell E-8310, Fujitsu Siemens GmbH, München, Deutschland) verbunden und ermöglicht so die Visualisierung und Sicherung der Videos im AVI-Format.

Der gesamte Versuchsaufbau war auf einem fahrbaren kleinen Wagen positioniert, sodass dieser jederzeit direkt am Patientenbett zum Einsatz kommen konnte.

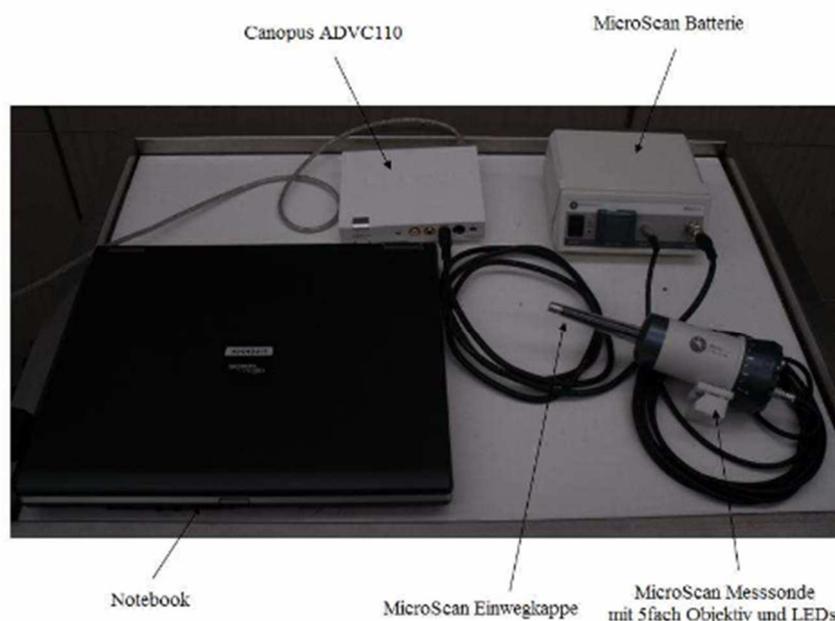


Abbildung 9: Direkte Digitalisierung der Mikrozirkulationsaufnahmen mittels der MicroScan Imaging Unit <sup>1</sup>

### 2.5.3 Durchführung der Mikrozirkulationsmessungen

Die Messzyklen fanden in Abhängigkeit von den Operationsterminen zu den festgelegten Zeitpunkten statt. Bei T0 und T1 schliefen die Kinder meist schon oder befanden sich noch unter postoperativer Sedierung. Dahingegen waren die Messungen an T2 und T3 oft schwierig, da die Kinder aufgrund der besonderen Umstände auf der Intensivstation und auch zum Beispiel bei Schmerzen leicht erregbar, empfindlich und unregelmäßig schlafend vorgefunden wurden.

Die SDF-Messungen wurden in der Fossa triangularis der Ohrmuschel schmerzfrei und nicht-invasiv durchgeführt, auch bei Neonaten, bei denen prinzipiell andere Messorte möglich sind, um möglichst gleiche Messbedingungen zu schaffen. An der Ohrmuschel lassen sich auch über die Neonatalperiode hinaus mittels SDF Imaging Gefäße in ausreichender Qualität nachweisen trotz zunehmender Dicke der Haut. <sup>8</sup>

Vor Beginn der Messung wurde die ausgewählte Stelle vorsichtig mit einem Tupfer (B.Braun, Melsungen, Deutschland) und dem Desinfektionsmittel Cutasept® (Bode Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland) gereinigt, um eventuelle Verschmutzungen zu beseitigen. Hierbei war besonders darauf zu achten, durch übermäßiges Reiben keine Hyperämie herzustellen, um das Messergebnis nicht zu verfälschen. Im Laufe der verschiedenen Messungen wurde, wenn möglich, das gleiche Ohr beibehalten, um Vergleichbarkeit innerhalb einer Messreihe zu garantieren.

Zunächst wurde eine sterile Schutzkappe auf das Videomikroskop aufgesetzt und anschließend mit einem Tropfen Aqua ad iniectabilia (B.Braun, Melsungen, Deutschland) Kontakt zwischen der Haut und dem Kunststoff hergestellt, um ein optimales Bildergebnis zu gewährleisten. Dies konnte im Laufe des Messzyklus mehrmals wiederholt werden. Nach Aufsetzen der Kamera auf die Ohrmuschel konnte man mittels zwei verschiedener Regler Fokus und Helligkeit einstellen und unter ständiger visueller Kontrolle zur Vermeidung von Druckartefakten, Überstrahlung und Luftblasen einen geeigneten Ort aufsuchen. Druckartefakte lassen sich durch verminderten Blutfluss detektieren, der bei Lockerung des Drucks auf die Haut an Geschwindigkeit zunimmt. Hatte man eine zufriedenstellende Qualität erreicht, startete man die Aufnahme. Hierbei war eine absolut ruhige Haltung zur Vermeidung von Bewegungsartefakten besonders wichtig. Dies wurde vorher in einigen Testreihen geübt, war aber auch danach situationsabhängig. Bei guten Messbedingungen und ruhigem Kind dauerte ein Messzyklus circa 25 Minuten. Manchmal erforderten klinische Zwischenfälle und Instabilität der Kinder vor allem an T1 direkt postoperativ kurzzeitige Unterbrechungen.

Pro Messung wurden je nach Qualität und Messbedingungen bis zu 20 Videosequenzen à zehn Sekunden aufgezeichnet und gespeichert, um sicherzustellen, dass genügend verwertbare Sequenzen für die spätere off-line Analyse zur Verfügung stehen.

## **2.6 Auswertung der Mikrozirkulationsuntersuchungen**

Von den gesammelten Untersuchungsvideos wurden jeweils pro Messzeitpunkt die drei qualitativ besten Aufnahmen ausgewählt, sodass bei durchschnittlich vier Messzeitpunkten pro Kind insgesamt zwölf Videos zur Analyse bereitstanden.

Alle Videodateien wurden für die Auswertung anhand eines numerischen Codes pseudonymisiert, um eine Verblindung des Untersuchers bei der Analyse zu garantieren. Der Untersucher hatte somit bei der Auswertung keine Kenntnis über die Kinder und den Messzeitpunkt. Im Anschluss an die Erhebung der Mikrozirkulationsparameter erfolgte die Entblindung durch Rückcodierung der Videosequenzen.

Die gesamte Auswertung erfolgte durch einen Untersucher, wodurch eine „Interrater“-Variabilität vermieden wurde.

### **2.6.1 Automated Vascular Analysis (AVA) Software**

Die Auswertung der Mikrozirkulationsvideos erfolgte mit dem halbautomatischen Programm „Automated Vascular Analysis“ Version 3.0, entwickelt im Academic Medical Center der Universität von Amsterdam in Zusammenarbeit mit MicroVision Medical (Copyright 2007).

Das Programm ist in der Lage, automatisch Gefäße (dunkel) anhand des Kontrastunterschiedes zur Umgebung (hell) zu detektieren und somit Angaben über die Gefäßdichte (vessel density) und die Verteilung der Durchmesser der Gefäße (diameter distribution) zu machen.

Vor Beginn der Auswertung muss der Untersucher bestimmte Einstellungen selbst vornehmen. Dazu gehört vor allem die Einteilung und Farbcodierung der Gefäßgrößen, welche das Programm automatisch kategorisiert und farblich markiert und somit einen schnellen Überblick verschafft. In dieser Arbeit wurden folgende Einteilung und Farbcodierung der Gefäße gewählt:

<b>Small: 0-10 <math>\mu\text{m}</math> (gelb)</b>
<b>Medium : 10-20 <math>\mu\text{m}</math> (rot)</b>
<b>Large: 20-100 <math>\mu\text{m}</math> (blau)</b>
<b>Very large: &gt;100 <math>\mu\text{m}</math> (grün)</b>

**Tabelle 2: Gefäßeinteilung nach Größe und Farbe**

In der vorliegenden Studie wurden zusätzlich bei jeder Datei die folgenden Funktionen genutzt:

- „background correction“ verbessert die Schärfe des Bildes und den Kontrast.
- „stabilize video“ legt alle Bilder einer Aufnahme übereinander und reduziert die Videosequenz auf den Bildausschnitt, der in allen Frames abgebildet ist. Hierdurch werden Bewegungsartefakte aufgehoben, allerdings wird der resultierende Bildausschnitt v.a. bei bewegungsreichen Aufnahmen z.T. deutlich reduziert.
- „use averaged frames“ (averaging tool) mittelt per Einstellung der „reference frames“ die angegebene maximale Anzahl an bewegten Bildausschnitten „frames“ (hier 1000) auf ein Standbild. Damit ist sichergestellt, dass das Programm möglichst viele auf verschiedenen Videoabschnitten zu sehende Gefäße detektiert und markiert.

Das Auswertungs-Procedere läuft wie folgt ab:

Zunächst wird die Datei im AVI-Format in das AVA-Programm eingelesen. Der qualitativ beste Ausschnitt des Videos mit möglichst ruhiger Kameraführung und scharfem Fokus, welcher mindestens 100 gute Fragments betragen sollte, wird ausgewählt und weiter bearbeitet, zuerst mit den oben genannten Einstellungen. Anschließend wird die automatische Gefäßanalyse begonnen, bei der das Programm die Gefäße je nach Durchmesser automatisch auf dem Bild mit Linien in den vorher definierten Farben markiert. Gleichzeitig werden die Gefäßdichte und Verteilung berechnet.

Der Untersucher hat an dieser Stelle die Möglichkeit, von Hand Korrekturen an den Markierungen vorzunehmen. Entfernt werden augenscheinlich offensichtliche Artefakte wie Gefäßmarkierungen bei Haaren oder Lufteinschlüssen, die dann auch nicht mehr an der Auswertung teilnehmen und das Ergebnis nicht verfälschen. In der vorliegenden Studie wurde beschlossen, grundsätzlich fehlende Markierungen nicht mit der Hand nachzuzeichnen, um einer subjektiven Beeinflussung der Auswertung durch den Untersucher vorzubeugen.

Danach erfolgt die Quantifizierung der Blutflussgeschwindigkeit (Microcirculatory Flow Index, MFI) nach der Klassifikation von Boerma.<sup>20</sup> Hierfür teilt das Programm den gesamten Bildausschnitt in vier Quadranten, welche der Untersucher der Reihe nach beurteilt.

Hierbei wird pro Quadrant jeder Gefäßkategorie eine Flussqualität zugeordnet und mit einem Punktwert versehen. Der Score definiert sich wie folgt:

<b>hyperdynamic (=4), hyperdynamischer Blutfluss</b>
<b>continous (=3), kontinuierlicher Blutfluss</b>
<b>sluggish (=2), träger Blutfluss</b>
<b>intermittent (=1), intermittierender Blutfluss</b>
<b>no flow (=0), kein Blutfluss</b>

Tabelle 3: Klassifizierung des MFI

Daraus berechnet das Programm später den Microcirculatory Flow Index als Mittelwert aus den vier Quadranten.

Am Ende kann man die gesammelten ausgewerteten Daten in einem „microcirculatory report“ ansehen, exportieren und weiter bearbeiten.

## 2.6.2 Messparameter der Mikrozirkulation

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die folgenden Parameter genauer untersucht:

- **Total Vessel Density (TVD)**: mm/mm<sup>2</sup>. Gesamtlänge des Gefäßnetzes in mm pro Fläche des Bildausschnittes in mm<sup>2</sup>.
- **(Continuously) Perfused Vessel Density (PVD)**: mm/mm<sup>2</sup>. Länge der Gefäße mit MFI  $\geq 3$  pro Bildausschnitt.
- **Vessel Diameter Distribution**: %. Klassifizierung der Gefäße nach ihrem Durchmesser in  $\mu\text{m}$  in klein, mittelgroß und groß (vgl. Punkt 2.6.1) und Angabe des prozentualen Anteils der jeweiligen Gefäßklasse an der Gesamtlänge aller Gefäße.
- **Microcirculatory Flow Index (MFI)**: Durchschnittliche Qualität des Blutflusses (vgl. Punkt 2.6.1). Die Berechnung erfolgt sowohl für alle Gefäße insgesamt (MFI all vessels) als auch für Kapillaren (MFI small vessels) und die übrigen Gefäße (other vessels).

## 2.7 Untersuchung der Glykokalyx

### 2.7.1 Funktionsprinzip der Glykokalyxmessung

Die Untersuchung der Glykokalyx basiert im Prinzip ebenfalls auf der Methode des SDF Imaging (vgl. Punkt 1.1.3.3 und 2.5). Die Messmethode beruht hierbei, wie die Bestimmung der sog. „erythrocyte-endothelial cell gap“ (vgl. Punkt 1.2.5), auf der Beobachtung, dass Erythrozyten die intakte Glykokalyx nicht vollständig penetrieren können. Mit SDF Imaging ist aber eine direkte Messung der EEC gap nicht möglich, da die Endothelzellen nicht dargestellt werden können. Stattdessen wird mit Hilfe einer speziellen Software (GlycoCheck B.V., Maastricht, Niederlande) die sog. Perfused Boundary Region (PBR) als Maß für die funktionelle Glykokalyxdicke ermittelt (vgl. Abbildung 10 und Punkt 2.8.2).<sup>97</sup>

Hierfür wird über den Vorgang der Intravitalmikroskopie die Breite der Erythrozytensäule an verschiedenen Stellen in den Gefäßen über die Zeit gemessen.<sup>97</sup> Die genaue Vorgehensweise der Software wird in Punkt 2.8.1 näher beschrieben.

Die PBR repräsentiert den äußeren Teil der ESL, in welchen die Erythrozyten eindringen können, während die tieferen Schichten der Glykokalyx für Erythrozyten nicht zugänglich sind. Dies bedeutet, dass nach außen gerichtete Schwankungen in der Breite der Erythrozytensäule (red blood cell = RBC) durch eine intakte Glykokalyx limitiert werden. Kommt es zu einer Schädigung der Glykokalyx oder zu „shedding“ können die Erythrozyten weiter in Richtung Gefäßwand vordringen. Dadurch nimmt die Variabilität der Breite der Erythrozytensäule und somit die PBR zu. Eine Zunahme der Schwankungen und somit mehr Spielraum für die Erythrozyten lässt daher indirekt Rückschlüsse auf die Dicke der Glykokalyx zu.<sup>97</sup>

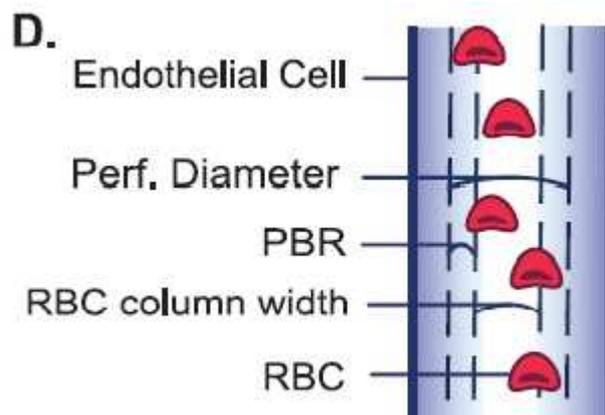


Abbildung 10: PBR: Schemazeichnung über das Konzept der Perfused Boundary Region repräsentiert durch die laterale Erythrozytenbewegung als indirektes Maß für die Glykokalyxdicke, Perfused Diameter entspricht der maximalen Breite der Erythrozytensäule<sup>97</sup>

## 2.7.2 Versuchsaufbau

Auch hier bestand die Versuchseinheit aus Videokamera und PC nach folgendem Schema:

- Tragbares Videomikroskop von MicroVision Medical mit Kunststoffkappe auf der Linse für Schutz und Sterilität
- Batterieeinheit
- Computer mit vorinstallierter GlycoCheck Software

Dies war ebenfalls auf einem fahrbaren Wagen positioniert und konnte so direkt am Patienten eingesetzt werden.

## 2.7.3 Durchführung der Glykokalixmessungen

Auch bei den Messungen für die Bestimmung der Perfused Boundary Region orientierten sich die Messzeitpunkte an den Operationsterminen. Durchführung, Handhabung und Rahmenbedingungen für Messungen mit einer SDF-Kamera, wie sie auch hier verwendet wurde, sind im Punkt 2.5.3 ausführlich beschrieben

Mit der Glycocheck Software läuft ein Messvorgang wie folgt ab:

Nach Öffnen der Glycocheck Software verlangt das Programm zunächst eine Kalibrierung, dies muss bei jedem Start neu durchgeführt werden. Nach automatischer vertikaler und horizontaler Kalibrierung mithilfe der „Calibration Unit“, welche zur Ausstattung des MicroScan Videomikroskopes gehört, kann die eigentliche Messung begonnen werden.

Innerhalb eines Zeitrahmens von fünf Minuten hat der Untersucher Zeit, eine vorgegebene Anzahl an qualitativ ausreichenden Videoausschnitten zu generieren, sodass das Programm die notwendige Anzahl an Messungen durchführen kann. Schafft es der Untersucher innerhalb der fünf Minuten nicht, Sequenzen mit ausreichender Bildqualität zu erzeugen, kann ein neuer Durchgang gestartet werden. Um eine ausreichende Bildqualität zu gewährleisten, startet die Aufnahme nur, wenn sich die Werte für Kamerabewegung („Motion“), Lichtintensität („Intensity“) und Fokus („Focus“) innerhalb eines vom Programm festgelegten Bereiches bewegen (vgl. Abbildung 11). Dies lässt sich durch manuelle Veränderung der Kameraeinstellungen für Licht und Fokus sowie das Handling beeinflussen. Wenn das Programm genügend Messpunkte für die Auswertung gewonnen hat, wird die automatische Datenakquisition beendet und es erfolgt die Kalkulation der PBR, welche innerhalb weniger

Minuten abrufbar ist. Die Ergebnisse können dann unmittelbar betrachtet oder es können weitere Messungen vorgenommen werden.



**Abbildung 11: Benutzeroberfläche der Glycocheck Software während eines Messvorgangs: Rot umkreist sind links der vom Programm festgelegte Bereich für den Fokus des Bildes und rechts der mögliche Messzeitraum von fünf Minuten.<sup>2</sup>**

Da an den Messzeitpunkten T0, T2 und T3 die Messungen ohne Anästhesie stattfanden und das Programm minimale Bewegungen während der Aufnahme erfordert, konnten wir nur von 25 aus 40 Kindern PBR-Werte auswerten.

## 2.8 Auswertung der Glykokalyxuntersuchungen

### 2.8.1 Glycocheck Software

Für die indirekte Messung der Glykokalyxdicke anhand des Durchmessers der Erythrozytensäule führt das Programm folgende Schritte durch:

Zunächst werden passende Gefäßabschnitte nach verschiedenen Kriterien wie Größe, Kontrast, Bewegung und Fokus identifiziert und alle 10  $\mu\text{m}$  mit senkrechten Linien belegt und somit in Segmente eingeteilt. Jedes Segment wird nochmals alle 0,5  $\mu\text{m}$  unterteilt und enthält somit 21 Messlinien, an welchen über die Dauer von 40 Videoframes der Durchmesser der Erythrozytensäule ermittelt wird, d.h. pro Gefäßsegment werden 840 Messungen durchgeführt. Es folgt eine Qualitätsprüfung des gesammelten Materials auf zum Beispiel Kontrast und Perfusion. Nur diejenigen Segmente, die in mehr als 60% der 21 Marker ausreichenden Kontrast und somit Perfusion bieten, werden als „valid vascular segments“

erfasst. Das Programm wiederholt den Vorgang an verschiedenen Stellen bis insgesamt 3000 Segmente vermessen wurden.<sup>97</sup> Aus den Messungen berechnet das Programm die im folgenden Punkt dargestellten Parameter.

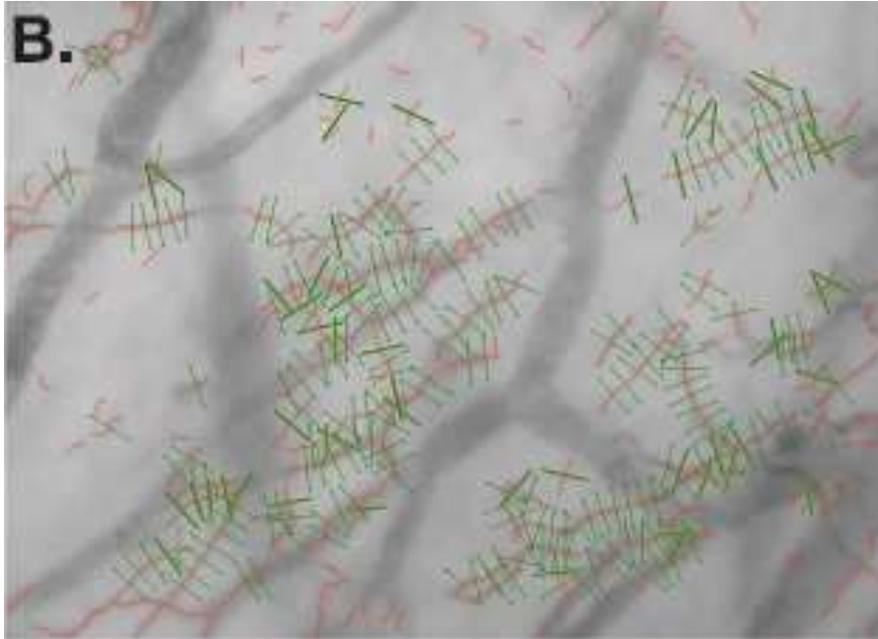


Abbildung 12: Glykocheck Software: Die Software platziert automatisch die Linien (grün), die die zu beurteilenden Gefäßabschnitte (schwarzer Kontrast) in 10 µm Segmente unterteilen.<sup>97</sup>

### 2.8.2 Messparameter

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Parameter betrachtet und zur Beantwortung der Fragestellungen verwendet:

- **P50:** entspricht der medianen Breite der Erythrozytensäulen und gibt die Aufenthaltswahrscheinlichkeit der Erythrozyten in 50% der Fälle an.
- **Perfused Diameter:** entspricht der maximalen Breite der Erythrozytensäule, welche durch die Dicke der Glykokalyx bestimmt wird. Bei Schädigung der Glykokalyx können sich die Erythrozyten weiter in Richtung Endothelzellen bewegen, wodurch der Perfused Diameter zunimmt.
- **Perfused Boundary Region (PBR):** definiert als Abstand zwischen medianer Erythrozytensäulenbreite und Perfused Diameter [ $PBR = (Perfused\ Diameter - P50)/2$ ] in µm. Eine Zunahme der PBR entspricht einer Abnahme der endothelialen Glykokalixdicke und umgekehrt.<sup>93</sup> In der vorliegenden Arbeit wurde die PBR für Gefäße mit einer Größe zwischen 5-25 µm verwendet.

## 2.9 Diagnose eines Kapillarlecksyndroms

Für die Diagnose eines postoperativen Kapillarlecksyndroms haben wir zusätzlich zu nichtkardialen Ödemen, Pleuraergüssen und Aszites einen Weichteil-Thorax-Quotienten (WTQ), wie von Sonntag et al. beschrieben, bestimmt.<sup>144</sup> Hierfür wurden prä- und postoperative Röntgen-Thoraxaufnahmen herangezogen und die Weichteildicke in horizontaler Verlängerung des knöchernen Thoraxdurchmessers auf Höhe der achten Rippe bis zur Haut als Gesamtdurchmesser bestimmt. Der Weichteil-Thorax-Quotient errechnet sich nach folgender Formel und beschreibt den prozentualen Anteil der Weichteile am Gesamthoraxdurchmesser:

$$WTQ[\%] = \frac{\text{Gesamthoraxdurchmesser} - \text{knöcherner Thoraxdurchmesser}}{\text{Gesamthoraxdurchmesser}} * 100$$

Dies kann als Maß für die Ödembildung gesehen werden.<sup>144</sup>

Sonntag et al. haben einen WTQ von 12,6% als Grenzwert für ein systemisches Kapillarlecksyndrom festgelegt. Ihnen schien damit eine einfache und objektive Messung des KLS möglich.<sup>144</sup>

Wir haben diesen Grenzwert zur Beurteilung eines postoperativen KLS bei den untersuchten Kindern verwendet.

## 2.10 Statistische Auswertung

Die statistische Datenanalyse und Graphenerstellung erfolgte mit GraphPad 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

Experimentelle Daten werden als Median, Interquartilsabstand und Minimum/Maximum dargestellt (Boxplot). Klinische Daten werden als Mittelwert, Standardfehler des Mittelwertes und Spannweite angegeben.

Zum Vergleich von experimentellen Daten über die Zeit wurde eine repeated measure ANOVA mit einem Dunn's posthoc Test (mehr als zwei Gruppen) oder ein Wilcoxon signed rank Test verwendet (zwei Gruppen). Für den Vergleich von zwei oder mehr verschiedenen experimentellen Gruppen wurde ein Wilcoxon rank sum Test oder eine ANOVA benutzt.

Für den Vergleich von klinischen Daten zwischen verschiedenen Gruppen wurde eine ANOVA verwendet. Für den Vergleich über die Zeit von klinischen Daten wurde eine repeated measure ANOVA oder ein paired t test (bei zwei Zeitpunkten) verwendet.

Zuletzt wurde für die Korrelation zwischen zwei Variablen der Pearson-Korrelationskoeffizient berechnet.

Zur Hypothesenprüfung wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% vorausgesetzt. Entsprechend wurden Ergebnisse mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  als statistisch signifikant gewertet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Patienten-Charakteristika

Die Tabelle 4 zeigt die demographischen Charakteristika der verschiedenen Patientengruppen. Es zeigten sich keine signifikante Unterschiede zwischen den Kindern mit Herzoperationen an der HLM im Gesamten und den Kontrollgruppen was Alter und Gewicht betrifft ( $p = 0,19$  und  $p = 0,25$ ). Etwas älter waren jedoch die Kinder in der Herzkathetergruppe und etwas jünger jene in der LKG-Spalten-Gruppe.

	Eingriffe mit HLM	Eingriffe ohne HLM	Herzkatheter- untersuchungen	LKG-Spalten- Eingriffe
<b>Anzahl</b>	36	4	6	9
<b>Geschlecht (männlich %)</b>	56	25	67	44
<b>Alter (Monate)</b>	8,9 (0,2-29)	9,0 (0,2-31)	15,4 (5,2-29)	5,2 (3,2-13,5)
<b>Gewicht (kg)</b>	6,8 (2,9-14)	5,9 (3-11,3)	9,2 (4,8-12,8)	6,5 (5,1-8,5)

Tabelle 4: Demografische Charakteristika, Werte angegeben als Mittelwert und Spannweite.

Tabelle 5 zeigt die Unterteilung der Kinder mit Operation an der HLM nach operationstechnischen Gesichtspunkten in die verschiedenen Untergruppen HLM, HLM+AK und HLM+AK+DHCA. Wie erwartet fanden wir aufgrund der zugrunde liegenden Herzfehler und den daraus folgenden verschiedenen herzchirurgischen Interventionen signifikante Unterschiede bei Alter ( $p = 0,0053$ ), Gewicht ( $p = 0,004$ ), HLM-Zeit ( $p < 0,001$ ) und AK-Zeit ( $p = 0,049$ ) zwischen den einzelnen Gruppen mit einer inversen Korrelation zwischen Alter und HLM-Dauer ( $r = -0,45$ ,  $p = 0,005$ ).

	HLM	HLM+AK	HLM+AK+DHCA
<b>Anzahl</b>	11	17	8
<b>Alter (Monate)</b>	13,7 (1-29)	9,3 (2-24)	1,6 (0,2-7)
<b>Gewicht (kg)</b>	8,3 (4,3-14)	7,1 (4,1-12,7)	3,8 (2,9-6,3)
<b>HLM Zeit (Minuten)</b>	42 (18-65)	82 (28-127)	136 (87-183)
<b>AK Zeit (Minuten)</b>	-	46 (9-73)	71 (45-91)
<b>DHCA Zeit (Minuten)</b>	-	-	31 (15-56)

Tabelle 5: Operationstechnische Charakteristika, Werte angegeben als Mittelwert und Spannweite.

### 3.2 Klinische und laborchemische Daten

Tabelle 6 und 7 zeigen einen Überblick über die zu den jeweiligen Messzeitpunkten erhobenen klinischen und laborchemischen Parameter.

Innerhalb der HLM-Gruppe zeigten sich bei der Herzfrequenz signifikante Unterschiede zu den Zeitpunkten T1 und T2 im Vergleich zu T0. Die Atemfrequenz war nur an T1 signifikant verändert im Vergleich zu T0. Der systolische, der diastolische und der mittlere arterielle Blutdruck waren zum Zeitpunkt T1 postoperativ signifikant niedriger als zum Zeitpunkt T0. Bei der Sauerstoffsättigung zeigten sich an T1 und T2 signifikante Veränderungen im Vergleich zu T0.

Der pH war zu den Zeitpunkten T2 und T3 signifikant höher als an T0. Postoperativ zum Zeitpunkt T1 war der pO<sub>2</sub> signifikant höher als präoperativ zum Zeitpunkt T0. Der Hb und der Hkt waren zu den Zeitpunkten T1, T2 und T3 signifikant niedriger als zum Zeitpunkt T0. Diese Ergebnisse stellen die typischen Auswirkungen des operativen Eingriffs auf die Kreislaufverhältnisse und die damit zusammenhängenden Änderungen der Vitalparameter dar.

<b>Kinder mit Einsatz der HLM (n = 36)</b>				
	<b>T0</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>
<b>HF</b>	124±4	136±4 *	136±4 *	122±3
<b>AF</b>	46±5	25±1 *	37±2	47±5
<b>RR (mmHg)</b>				
<b>Systolisch</b>	90±3	80±2 *	92±4	93±3
<b>Diastolisch</b>	54±2	44±1 *	51±2	51±1
<b>MAD</b>	65±2	58±2 *	67±2	67±2
<b>SO<sub>2</sub> (%)</b>	87±2	93±1 *	92±2 *	92±1
<b>pH</b>	7,37±0,01	7,38±0,01	7,41±0,01 *	7,44±0,01 *
<b>pO<sub>2</sub> (mmHg)</b>	40±3	115±13 *	58±6	44±6
<b>pCO<sub>2</sub> (mmHg)</b>	39±2	37±1	40±1	41±2
<b>Hb (g/dl)</b>	14,8±0,6	12,1±0,3 *	11,7±0,2 *	12,4±0,4 *
<b>Hkt (%)</b>	46±2	37±1 *	36±1 *	38±1 *

**Tabelle 6: Klinische und laborchemische Parameter der HLM-Gruppe komplett zu den Messzeitpunkten, \*p < 0,05 versus T0, Werte angegeben als Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes.**

Bei den Kontrollgruppen wurde nicht routinemäßig bei allen Kindern eine aktuelle BGA oder ein prä- und postoperatives Labor abgenommen, weswegen wir keinen kompletten Datensatz erheben konnten und daher die Werte nicht berücksichtigt haben.

Auch gab es zu den Kontrollgruppen HK und LKG-OP nur prä- und postoperative bzw. postinterventionelle Messungen, sodass hier die zwei Messzeitpunkte miteinander und mit den jeweiligen Werten der HLM-Gruppe verglichen werden.

**Kontrollkinder mit HK (n = 6), Operationen ohne Einsatz der HLM (n = 4) und LKG-Operationen (n = 9)**

	HK		OP ohne HLM		LKG-OP	
	T0	T1	T0	T1	T0	T1
<b>HF</b>	104±5 #	110±45 #	125±17	160±9 #	138±3	124±5 *
<b>AF</b>	31±11	30±12	40±17	26±2	27±1 #	27±2
<b>RR (mmHg)</b>						
<b>Systolisch</b>	104±6 #	96±39 #	89±11	85±8	84±2	79±5
<b>Diastolisch</b>	67±4 #	44±18 *	58±11	49±4	41±2 #	39±3
<b>MAD</b>	76±3	64±26	70±11	64±5	58±2	52±3 *
<b>SO2 (%)</b>	82±0	82±0 #	94±3	91±5	100±0 #	99±0 #

**Tabelle 7: Klinische Parameter der Kontrollgruppen zu den Messzeitpunkten, \*p < 0,05 versus T0 der eigenen Gruppe, #p < 0,05 versus HLM-Gruppe komplett zum entsprechenden Zeitpunkt, Werte angegeben als Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes.**

### 3.3 Einfluss der herzchirurgischen Eingriffe mit HLM auf die mikrovaskuläre Glykokalyx

Um den Einfluss von Operationen mit HLM auf die endotheliale Glykokalyx bewerten zu können, wurde die Perfused Boundary Region (PBR) in der kutanen Mikrozirkulation der Ohrmuschel bestimmt.

Aufgrund von strengeren Qualitätsanforderungen an die Mikrozirkulationsmessungen konnten für die Glykokalyx-Untersuchungen letztlich die Daten von 21 Kindern mit angeborenen Herzfehlern und Operation an der HLM verwendet werden.

#### 3.3.1 Vergleich der PBR zum Zeitpunkt T0

Der Ausgangswert der PBR zum Zeitpunkt T0 zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen experimentellen Gruppen (vgl. Abbildung 13).

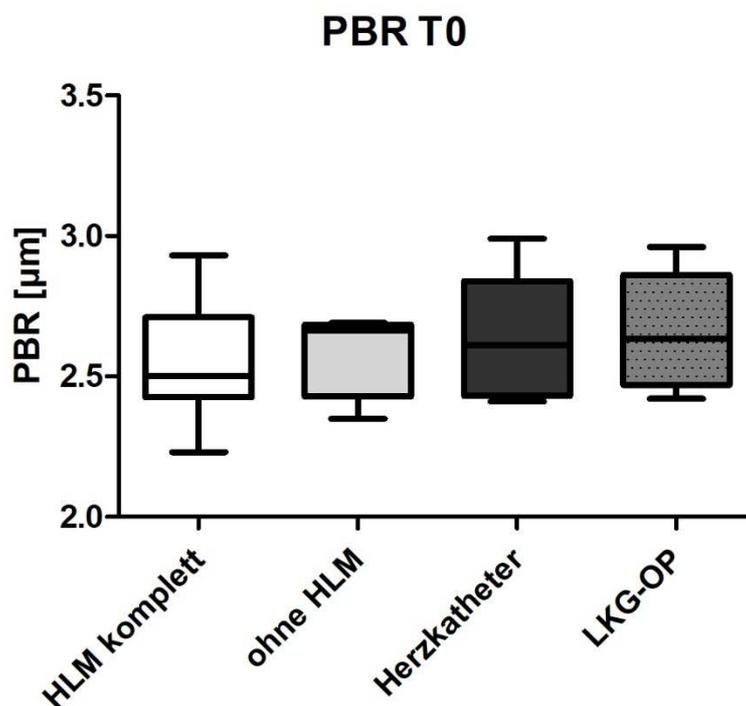


Abbildung 13: PBR in den verschiedenen experimentellen Gruppen zum Zeitpunkt T0, Darstellung als Boxplot mit Minimum und Maximum.

### 3.3.2 Veränderung der PBR nach Einsatz der HLM

Nach herzchirurgischen Operationen mit Einsatz der HLM war die PBR zum Zeitpunkt T1 (2,69  $\mu\text{m}$ , angegeben als Median) jedoch signifikant erhöht verglichen mit den Ausgangswerten an T0 (2,50  $\mu\text{m}$ , angegeben als Median), was einen akuten postoperativen Verlust der Glykokalyx abbildet (vgl. Abbildung 14). Die Zunahme der PBR und somit die Abnahme der Glykokalyxdicke betrug rund 0,2  $\mu\text{m}$  und kehrte bis zu T3 schrittweise annähernd zu den Ausgangswerten zurück.

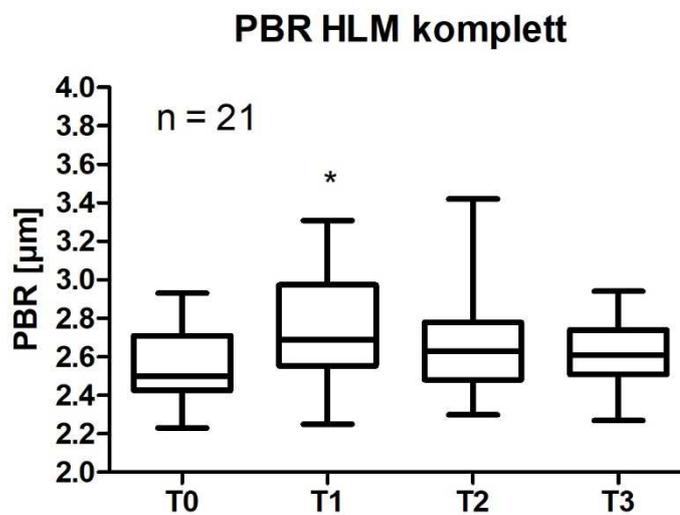


Abbildung 14: Betrachtung der PBR bei allen Eingriffen mit Einsatz der HLM, \* $p < 0,05$  versus T0, Darstellung als Boxplot mit Minimum und Maximum.

### 3.3.3 Betrachtung der Kontrollgruppen

In den Kontrollgruppen nach Herzkatheter, Herzoperation ohne HLM und Lippen-Kiefer-Gaumenspaltenoperationen änderte sich postoperativ der T1-Wert nicht signifikant im Vergleich zu T0 (vgl. Abbildung 15).

### PBR Kontrollgruppen

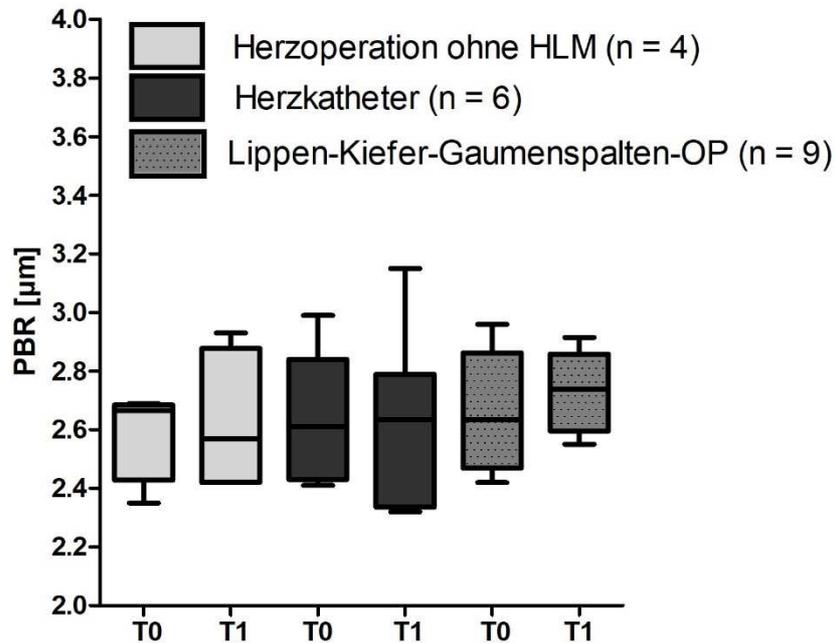


Abbildung 15: PBR prä- und postoperativ in den Kontrollgruppen, Darstellung als Boxplot mit Minimum und Maximum.

#### 3.3.4 Betrachtung der HLM-Untergruppen

Um genauer zu untersuchen, welche Rolle die Ischämie während des Eingriffs bei der Vergrößerung der PBR und demnach bei dem Verlust der Glykokalyx spielt, wurden die verschiedenen Operationsgruppen getrennt voneinander betrachtet. Während in der HLM-Gruppe ohne kardioplegischen Herzstillstand keine längere Ischämiephase auftritt, sind bei den Operationen mit Aortenklemmzeit (HLM+AK-Gruppe) Herz und Lunge der Kinder ischämischem Stress ausgesetzt. Die HLM+AK+DHCA-Gruppe wurde hier nicht berücksichtigt, da aufgrund von unzureichender Bildqualität leider nur bei drei Kindern eine erfolgreiche PBR-Messung möglich war. Die Ausgangswerte der PBR waren in der HLM- und der HLM+AK-Gruppe vergleichbar. Postoperativ kam es in beiden Gruppen zu einem signifikanten Anstieg der PBR. Dieser war jedoch in beiden Gruppen identisch, was für einen Effekt spricht, der unabhängig von Ischämie und darauf folgender Reperfusion auftritt (vgl. Abbildung 16).

Zwischen den postoperativen T1-Werten der beiden Gruppen bestand auch kein Zusammenhang zur Dauer der HLM ( $r = 0,06$ ,  $p = 0,78$ ). Das gleiche gilt für die intra- und

postoperativ gemessenen Körpertemperaturen, auch hier konnte keine signifikante Relation nachgewiesen werden ( $r = 0,27$ ,  $p = 0,34$  und  $r=0,18$ ,  $p = 0,4$ ).

### PBR-Vergleich HLM und HLM+AK postoperativ

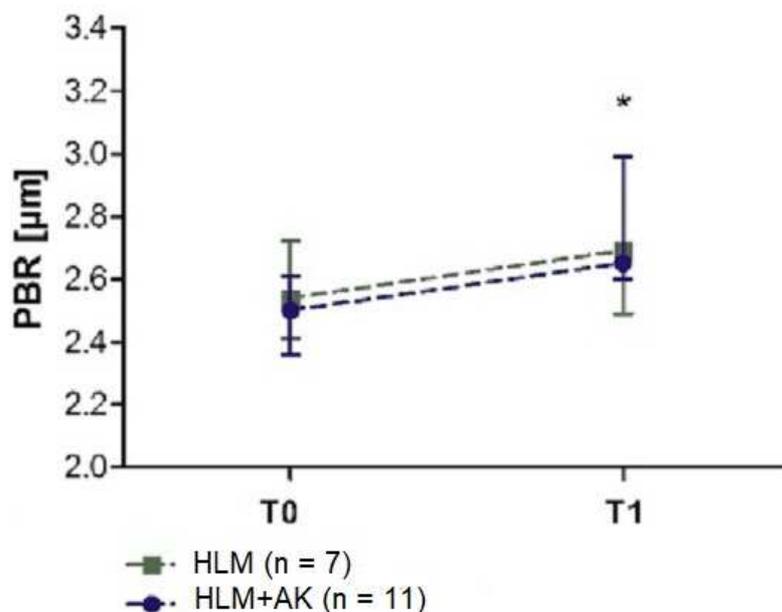


Abbildung 16: PBR-Vergleich der Untergruppen HLM und HLM+AK postoperativ, \* $p < 0,05$  versus T0, Darstellung als Mittelwert und Standardabweichung.

## 3.4 Einfluss der herzchirurgischen Eingriffe mit HLM auf die mikrozykulatorischen Parameter

Zur Beurteilung der Veränderung der Mikrozykulation durch den Einsatz der HLM wurden die bereits in Punkt 2.6.2 beschriebenen Parameter erhoben. Hierbei waren vor allem die Total Vessel Density (TVD), die Vessel Diameter Distribution, der Microcirculatory Flow Index (MFI) und die Perfused Vessel Density (PVD) von Interesse.

### 3.4.1 Betrachtung der HLM-Gruppe komplett

Für die Total Vessel Density (TVD) und Vessel Diameter Distribution ergaben sich keine signifikanten Änderungen über die vier Messzeitpunkte (vgl. Abbildung 17 A und B)

Am Ausgangspunkt (T0) ergaben die Messungen des MFI und der PVD vor Eingriffen an der HLM vergleichbare Ergebnisse mit den Ausgangswerten der Kontrollgruppen (vgl. T0 in Abbildung 18 A und B und Abbildung 19 A und B).

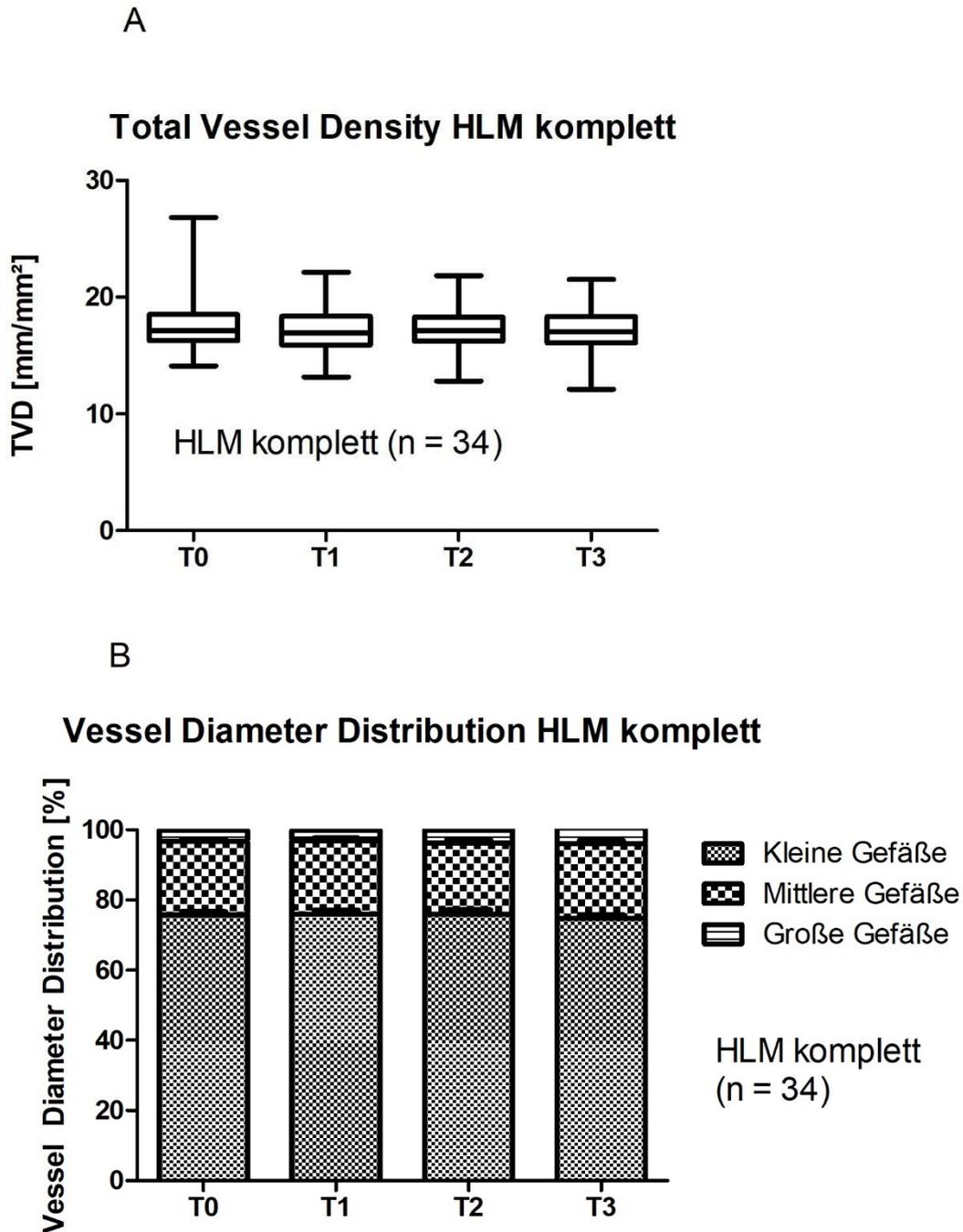


Abbildung 17: Zeitlicher Verlauf der TVD (A) und Vessel Diameter Distribution (B) bei allen Eingriffen mit Einsatz der HLM, hier n = 34, da Messwerte für T2 und T3 von 2 Kindern fehlen, Darstellung als Boxplot mit Minimum und Maximum (A) und als Mittelwerte (B).

Was wir jedoch beobachten konnten, war eine akute Verminderung der mikrovaskulären Perfusion nach Eingriffen mit der HLM. Dies zeigte sich in einem signifikanten Abfall des MFI und der PVD an T1, welche innerhalb von 24 Stunden, zum Zeitpunkt T2, auf ihren Ausgangswert zurückkehrten (vgl. Abbildung 18 A und B).

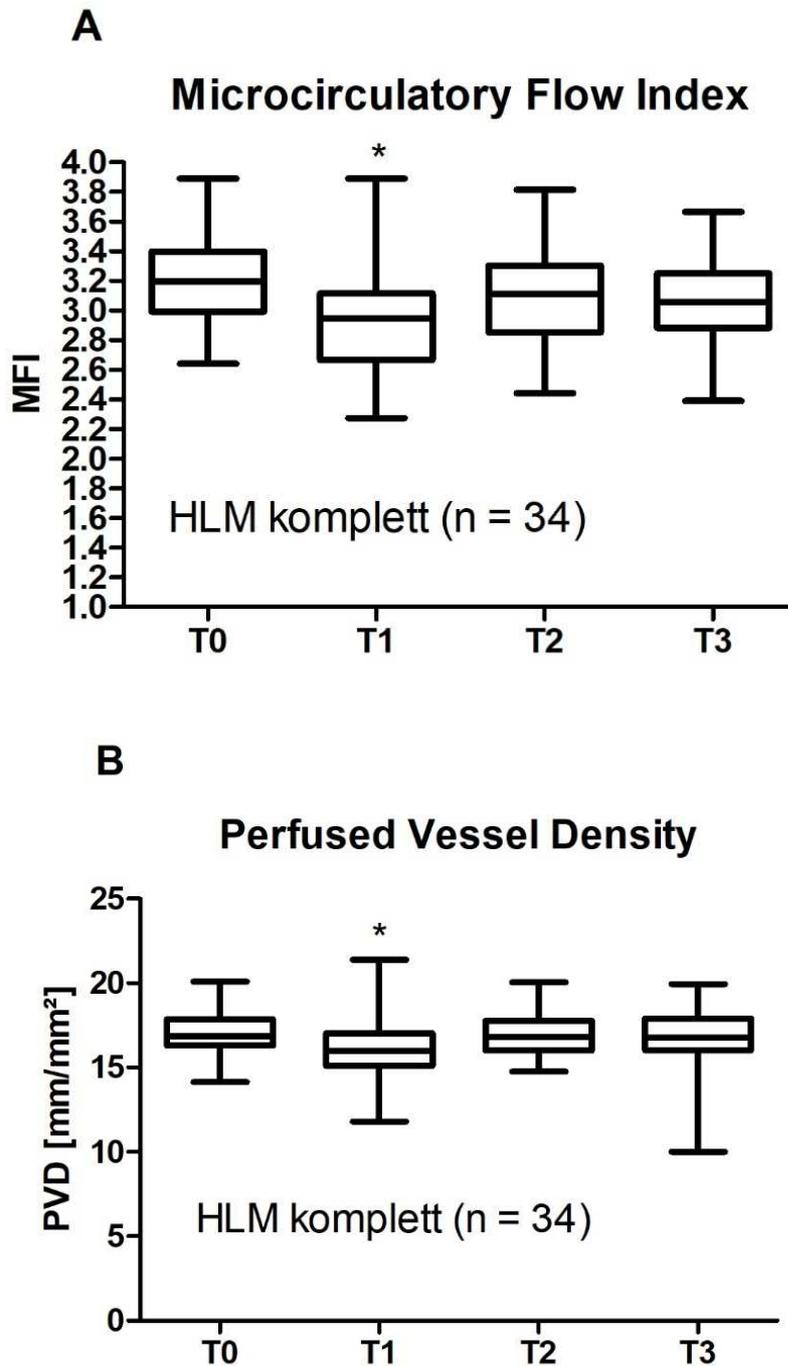


Abbildung 18: Zeitlicher Verlauf des MFI (A)- und der PVD (B) bei allen Eingriffen mit Einsatz der HLM, \* $p < 0,05$ , hier  $n = 34$ , da Messwerte für T2 und T3 von 2 Kindern fehlen, Darstellung als Boxplot mit Minimum und Maximum.

### 3.4.2 Betrachtung der Kontrollgruppen

Bei Kindern mit herzchirurgischen Operationen ohne HLM konnten wir eine ähnliche Abnahme von MFI und PVD zum Zeitpunkt T1 wie bei der HLM-Gruppe gesamt

nachweisen. Allerdings erreichten diese Werte keine Signifikanz aufgrund der kleinen Gruppengröße (vgl. Abbildung 19 A und B).

Bei der Untersuchung der Kinder, welche sich nur einer Herzkatheteruntersuchung unterzogen, zeigte sich, dass MFI und PVD nach der Intervention unverändert zu T0 blieben. Somit blieb der MFI nach Herzkatheteruntersuchungen signifikant höher als nach Operationen ohne HLM, bei welchen es zu einem relativen Abfall des MFI kam.

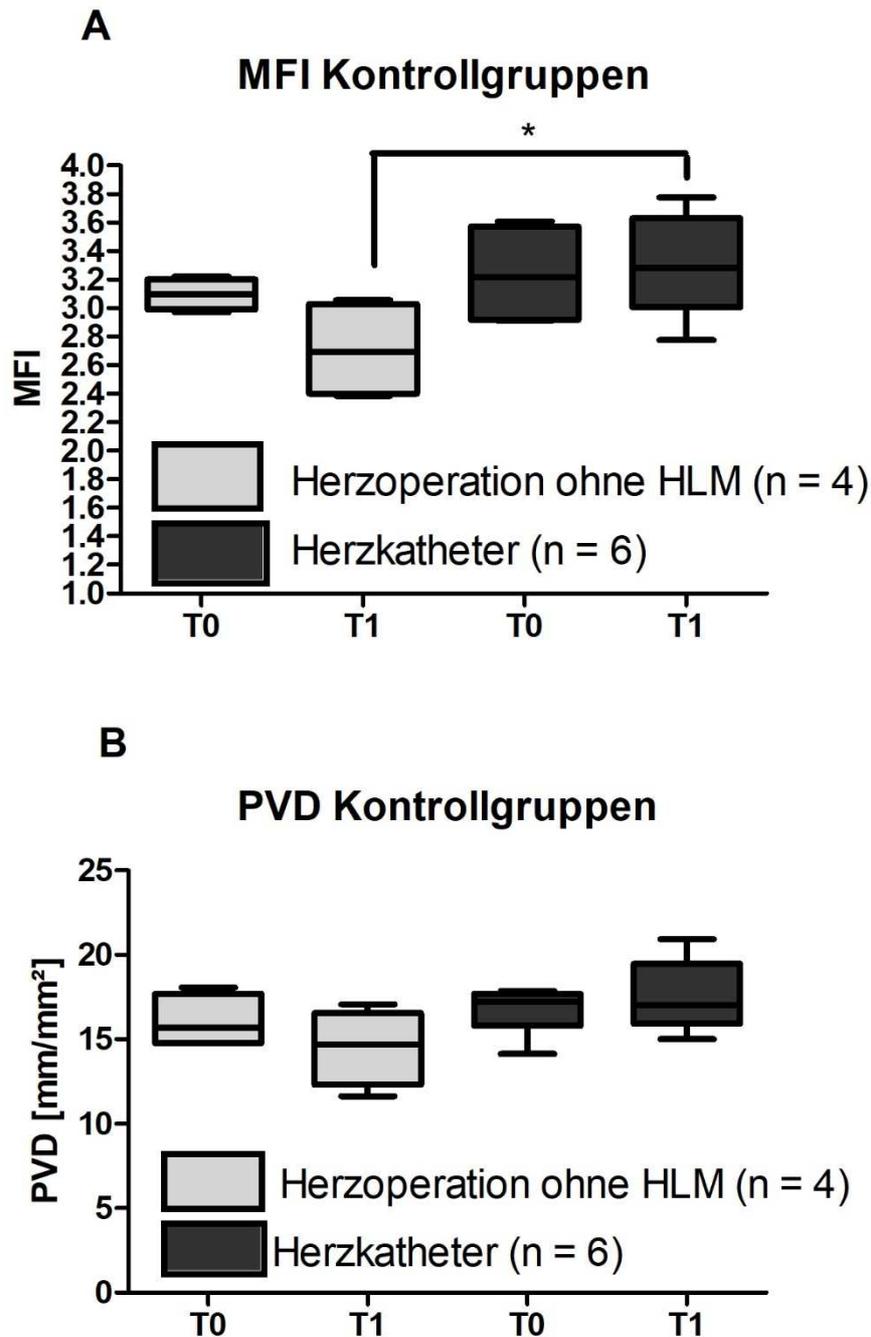


Abbildung 19: Betrachtung des MFI (A) und der PVD (B) der Kontrollgruppen prä- und postoperativ, \*  $p < 0,05$ , Darstellung als Boxplot mit Minimum und Maximum.

### 3.4.3 Betrachtung der HLM-Untergruppen

Außerdem untersuchten wir die Untergruppen der gesamten HLM-Gruppe getrennt voneinander mit besonderem Augenmerk auf den Veränderungen an T1. Hierbei fiel auf, dass die postoperative Abnahme des MFI und der PVD abhängig vom Ausmaß der ischämischen Belastung während der HLM waren.

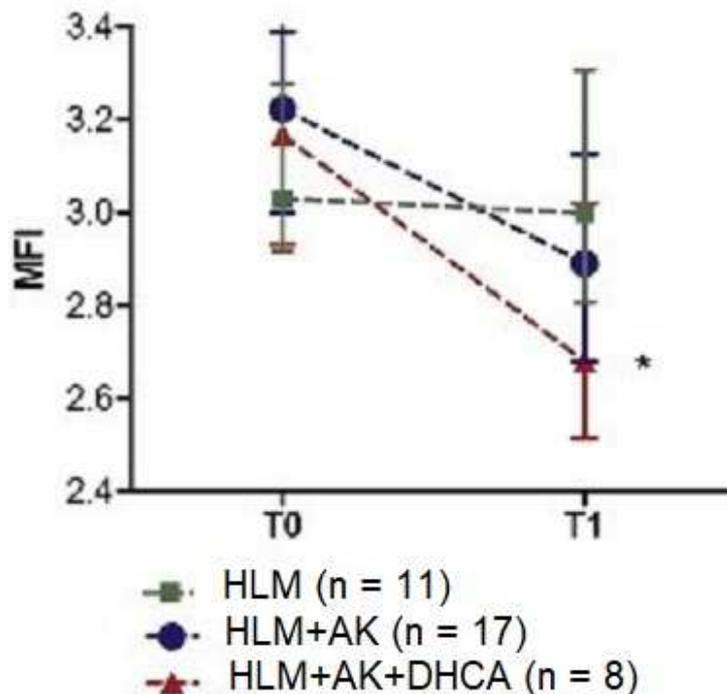
Die größte Reduktion des MFI an T1 im Vergleich zu T0 zeigte sich in der HLM+AK+DHCA-Gruppe, bei welcher eine Phase des totalen Kreislaufstillstands mit Ischämie/Reperfusion des gesamten Körpers auftritt. Der MFI fiel hier im Mittel von 3,17 auf 2,68 und die PVD von 16,83 mm/mm<sup>2</sup> auf 15,21 mm/mm<sup>2</sup> (vgl. Abbildung 20 A und B).

Den geringsten Einfluss auf MFI und PVD hatten dagegen die Eingriffe mit HLM ohne AK und DHCA.

Es konnte zwar keine Korrelation des MFI und der PVD mit der intraoperativen Körpertemperatur, dem postoperativen arteriellen Blutdruck oder dem Hämatokrit nachgewiesen werden, jedoch fanden wir eine schwache, aber signifikante inverse Korrelation zwischen HLM-Dauer und dem MFI ( $r = -0,39$ ,  $p = 0,019$ ) und eine direkte Korrelation zwischen der Körpertemperatur zum Zeitpunkt T1 und der PVD ( $r = 0,43$ ,  $p = 0,01$ ).

**A**

#### Microcirculatory Flow Index



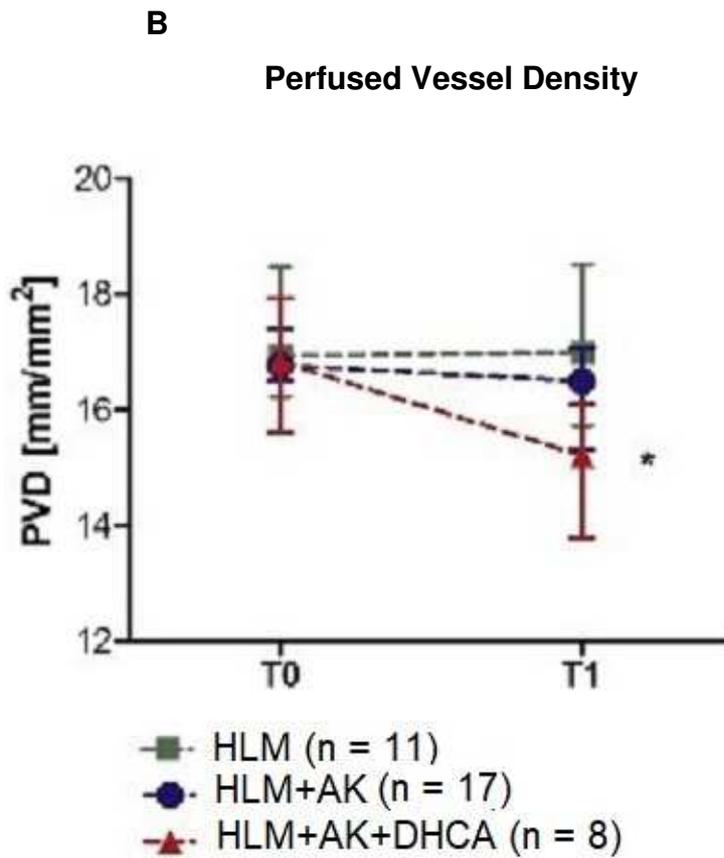


Abbildung 20: Vergleich der mikrozirkulatorischen Parameter MFI (A) und PVD (B) in den HLM-Untergruppen prä- und postoperativ, \* $p < 0,05$  versus T0, Darstellung als Mittelwert und Standardabweichung.

### 3.5 Zusammenhang zwischen Veränderungen mikrozyklatorischer Parameter und dem postoperativen Outcome

Um zu sehen, ob das postoperative Outcome nach Operationen an der HLM in Beziehung zu den Veränderungen in PBR und MFI steht, haben wir den Katecholaminbedarf, die Notwendigkeit der Fortführung einer mechanischen Beatmung und die Entwicklung eines Kapillarlecksyndroms genauer betrachtet.

#### 3.5.1 Zusammenhang mit dem postoperativen Katecholaminbedarf

Zum Zeitpunkt T1 waren 8 Kinder kreislaufstabil ohne Einsatz von Katecholaminen, 16 Kinder erhielten noch ein Katecholamin intravenös und bei 12 Kindern waren noch zwei oder mehr Katecholamine im Einsatz. Hier zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang mit der Dauer der HLM (vgl. Abbildung 21).

Allerdings konnte zu keinem Zeitpunkt eine Assoziation von Katecholaminbedarf mit den postoperativen PBR- und MFI-Werten nachgewiesen werden.

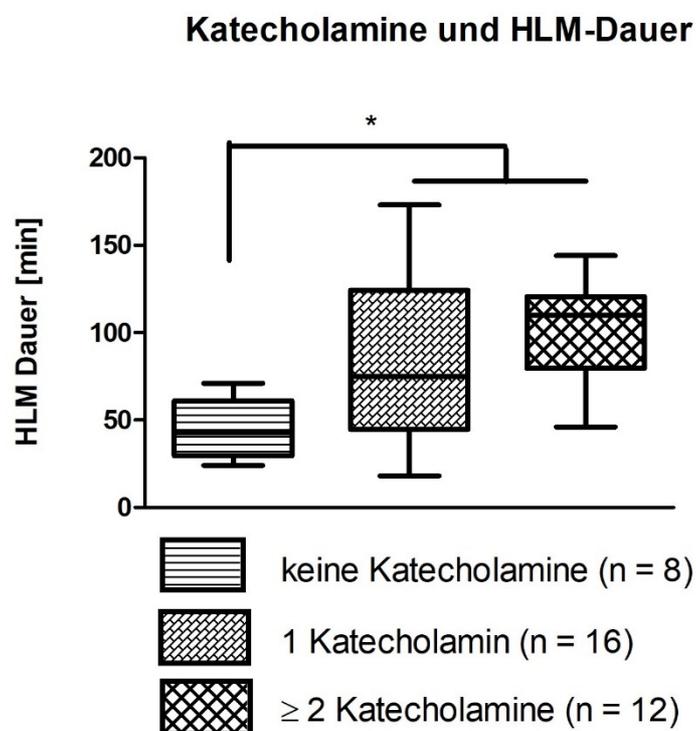


Abbildung 21: Zusammenhang zwischen Dauer der HLM und postoperativem Katecholaminbedarf zum Zeitpunkt T1, \*p < 0,01, Darstellung als Boxplot mit Minimum und Maximum.

### 3.5.2 Zusammenhang mit der Notwendigkeit einer postoperativen mechanischen Beatmung

24h postoperativ, zum Zeitpunkt T2 waren 27 Kinder bereits spontan atmend und 9 Kinder noch mechanisch beatmet. Auch hier konnten wir eine signifikante Korrelation mit der Dauer der HLM nachweisen (vgl. Abbildung 22).

Jedoch konnte, wie beim postoperativen Katecholaminbedarf, kein Zusammenhang mit Veränderungen der PBR und des MFI aufgezeigt werden.

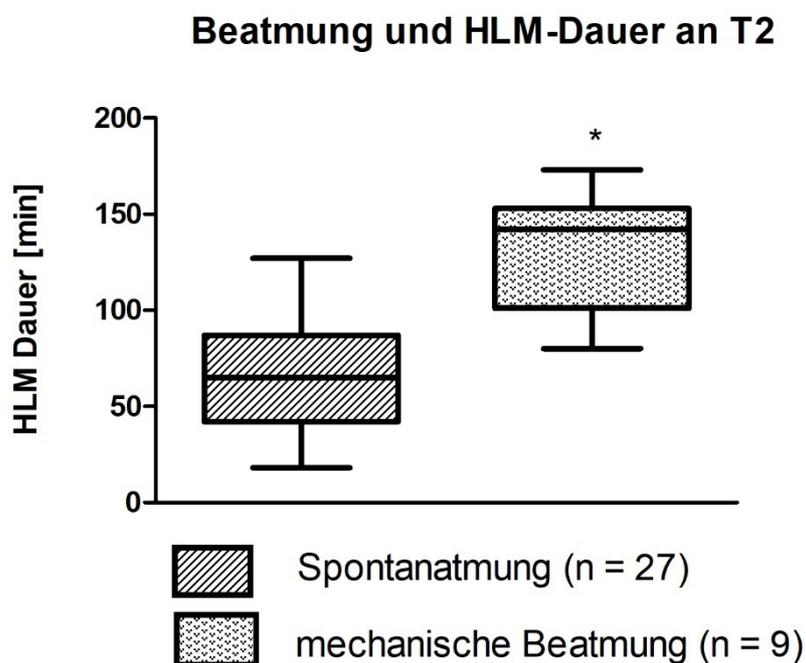


Abbildung 22: Zusammenhang zwischen postoperativer Beatmung und HLM-Dauer zum Zeitpunkt T2, \* $p < 0,001$ , Darstellung als Boxplot mit Minimum und Maximum.

### 3.5.3 Zusammenhang mit der Entwicklung eines Kapillarlecksyndrom (KLS)

Bei Kindern, welche an der HLM operiert wurden, konnten wir zeigen, dass es am ersten postoperativen Tag (T2) im Vergleich zu T0 zu einer signifikanten Zunahme des Weichteil-Thorax-Quotienten (WTQ) kam im Sinne zunehmender Weichteilödeme (vgl. Abbildung 23). Außerdem ließ sich auch eine signifikante Korrelation mit der HLM-Dauer nachweisen ( $r = 0,63$ ,  $p = 0,0013$ ). Jedoch hatten nur 4 Kinder überhaupt einen WTQ über dem Grenzwert, welcher ein KLS definiert ( $WTQ > 12,6\%$ ), weswegen eine sinnvolle Stratifizierung der experimentellen Daten bezüglich der Entwicklung eines KLS nicht möglich war.

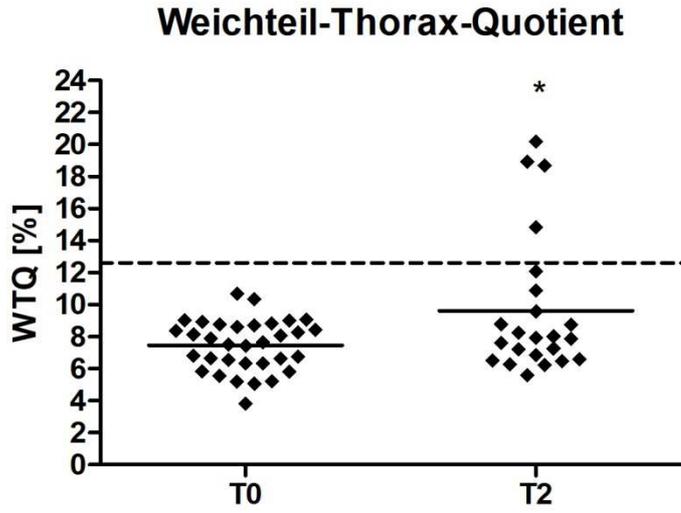


Abbildung 23: Quantifizierung des WTQ anhand von prä- und postoperativen Röntgen-Thorax-Aufnahmen, die unterbrochene Linie stellt den Grenzwert des WTQ von 12,6% für ein KLS dar, \*p < 0,05.

## 4 Diskussion

Ziel der Studie war es, die Auswirkungen einer extrakorporalen Zirkulation während herzchirurgischer Operationen bei Kindern auf die Mikrozirkulation und die Glykokalyx zu untersuchen. Die entsprechenden Parameter wurden vor und nach den Eingriffen erhoben und in Vergleich gesetzt zu Kindern, welche sich Eingriffen ohne Herz-Lungen-Maschine, Herzkatheteruntersuchungen und einem operativen Lippen-Kiefer-Gaumenspaltenverschluss unterziehen mussten. Nach extrakorporaler Zirkulation konnten wir akute Veränderungen der endothelialen Glykokalyx und der mikrovaskulären Durchblutung beobachten.

Diese Ergebnisse sollen im Folgenden erörtert und diskutiert werden.

### 4.1 Diskussion der Methodik

#### 4.1.1 Studiendesign

Als Studiendesign für diese Arbeit wurde eine prospektive, kontrollierte Beobachtungsstudie mit Verblindung bei der Auswertung gewählt. Für alle Gruppen gab es im Vorfeld festgelegte Messzeitpunkte.

Kritisch zu hinterfragen ist hier die Festlegung dieser Messzeitpunkte. Zum einen kann die Tatsache diskutiert werden, dass wir keine intraoperativen Messungen durchführen konnten. Dies war aus logistischen Gründen leider nicht möglich. Die früheste postoperative Evaluation beschränkt sich deshalb auf die postoperativ zum Zeitpunkt T1 durchgeführten Aufnahmen, nach Rückkehr der Kinder auf die kinder-kardiologische Intensivstation und nach Durchführung aller zunächst notwendigen Maßnahmen wie die radiologische Bildgebung.

Das heißt, dass wir über die Vorgänge und Veränderungen, welche direkt nach Beginn der Anästhesie und der HLM vor sich gehen, keine Kenntnis gewinnen konnten.

Rehm et al. haben aber gezeigt, dass gerade während kardiochirurgischer Operationen Erwachsener an der HLM mit Ischämie und Reperfusion das größte Ausmaß an Glykokalyx-„shedding“ nachweisbar ist.<sup>126</sup> Auch Bruegger et al. haben bei kardiochirurgischen Interventionen an Kindern gezeigt, dass der Effekt des „sheddings“ direkt während der Eingriffe am größten ist.<sup>23</sup>

Dies bedeutet, dass wir möglicherweise den maximalen Effekt der Alterationen von Mikrozirkulation und Glykokalyx verpasst haben und nicht abbilden konnten.

Zum anderen mag das Intervall zwischen T2, also dem ersten postoperativen Tag, und T3, der abschließenden Untersuchung eine Woche postoperativ, lang erscheinen. Gegebenenfalls hätte man die Abstände hier kürzer wählen können, um den postoperativen Verlauf genauer beurteilen zu können. Die Messungen gestalteten sich jedoch ab T2 technisch schwieriger, da die Kinder meist wach und nicht mehr sediert waren. Gerade in dieser sensiblen postoperativen Phase war unser Ziel, den Genesungsprozess möglichst wenig zu beeinträchtigen. Auch bietet die Messung zum Zeitpunkt T3 am siebten postoperativen Tag die Möglichkeit zur Evaluation von eventuell langfristigeren Beeinträchtigungen, da bis dahin die unmittelbar durch die Operation induzierten Auswirkungen bereits zurückgegangen sein sollten.<sup>122</sup>

Außerdem diskutabel ist die Heterogenität des Patientenkollektivs. Im Hinblick auf die verschiedenen Herzfehler lässt sich nicht ausschließen, dass diesen zugrunde liegende Charakteristika wie unterschiedliche Hypoxielevel oder hämodynamisch relevante Shunts unsere Ergebnisse beeinflusst haben könnten. Ein persistierender Ductus arteriosus kann zum Beispiel signifikante Veränderungen der funktionellen Gefäßdichte hervorrufen.<sup>74</sup>

Auch wenn in einem großen kinderkardiologischen Zentrum wie der LMU München viele Operationen durchgeführt werden, ist die allgemeine Inzidenz von kongenitalen Herzfehlern dennoch relativ gering, sodass eine Studie mit größerer Teilnehmerzahl und identischen Herzfehlern den zeitlichen Rahmen gesprengt hätte.

Im Hinblick auf die Kontrollen wären Vergleichsgruppen wünschenswert gewesen, welche die gleiche Operation einerseits mit und andererseits ohne Einsatz der HLM darstellen, um direkte Auswirkungen der HLM von operationsbedingten Effekten dividieren zu können. Das war aber aufgrund der Struktur der verschiedenen angeborenen Herzfehler, welche i.d.R. nur unter Einsatz einer HLM operiert werden können, nicht möglich. Deswegen konnten wir nur von vier Kindern mit kleineren kardiochirurgischen Eingriffen ohne HLM die Daten gewinnen. Um dennoch den eventuellen Einfluss von Allgemeinanästhesie und OP-Trauma teilweise berücksichtigen zu können, wurden Kinder eingeschlossen, welche sich einem präoperativen Herzkatheter unter Allgemeinanästhesie oder einer Korrektur der Lippen-Kiefer-Gaumenspalte unterziehen mussten.

#### **4.1.2 Messungen**

Wir verwendeten sowohl für die Mikrozirkulationsmessungen als auch für die Untersuchung der Glykokalyx ein MicroScan Mikroskop, das mit Sidestream Dark Field Imaging-Technik

arbeitet. Dieses Gerät ist eine Weiterentwicklung des Cytoscan-Geräts, das die Orthogonal Polarization Spectral Imaging-Technik benutzt, um Bilder darzustellen. Die OPS-Technik wurde bereits anhand intravitaler Fluoreszenzmikroskopie an Tiermodellen validiert.<sup>70</sup> Limitiert wird diese Technologie durch die begrenzte Eindringtiefe, weswegen wir uns auf die Messung der Mikrozirkulation der Haut als Äquivalent für den allgemeinen Zustand der Mikrozirkulation beschränken mussten. Prinzipiell ist auch die Anwendung bei dunklem Hautkolorit nicht möglich, was bei unserem Patientenkollektiv aber nicht relevant war.

Eine grundsätzliche Einschränkung der SDF Imaging Technologie ist außerdem die Tatsache, dass nur mit Erythrozyten gefüllte Gefäße abgebildet werden können. Gefäße, die nicht perfundiert sind, entgehen somit möglicherweise der Analyse. Da aber nur perfundierte Gefäße am Gasaustausch teilhaben, sind diese ohnehin von größerem Interesse für die Organfunktion als die gesamte Gefäßdichte.

In einem Konsensuspaper haben De Backer und Kollegen fünf „Key Points“ identifiziert, die eine optimale Bildaufnahme erleichtern sollen: Fünf Aufnahmestellen pro Messort, Vermeidung von Druckartefakten, Elimination von Sekreten zwischen Gewebe und Mikroskop, richtige Fokus- und Kontrasteinstellungen und Aufnahmequalität.<sup>49</sup> Wir haben uns stets bemüht diese Kriterien zu erfüllen.

Beim Erwachsenen wurden vielfach die Veränderungen der Mikrozirkulation in der sublingualen Region untersucht. Hierbei hat sich eine sehr gute Reproduzierbarkeit und eine geringe Intraobserver-Variabilität der verwendeten Scores gezeigt.<sup>49</sup>

Bei Neugeborenen und kleinen Kindern eignet sich dieser Messort aufgrund der schlechten Zugänglichkeit und mangelnden Kooperation allerdings weniger.

Als optimaler Messort bei Neugeborenen und Kleinkindern zur Visualisierung der Mikrozirkulation mit SDF Imaging hat sich die transdermale Messung an der Ohrmuschel herausgestellt.<sup>7</sup> Es stellt sich die Frage, inwiefern Messungen am Ohr repräsentativ für die Gefäßbette innerer Organe sind. Es gibt unserem Wissen nach keine Studien, die Messungen am Ohr mit Messungen an inneren Organen vergleichen. Einige Studien haben jedoch gezeigt, dass mikrovaskuläre, sublinguale Veränderungen an einem Messort, der ebenfalls nicht unmittelbar innere Organe repräsentiert, mit Veränderungen in anderen Organsystemen wie Gastrointestinaltrakt oder Niere in Korrelation stehen.<sup>44, 160, 163</sup>

Durch zu starken Druck kann die Qualität der Messungen beeinträchtigt werden, da hierdurch ein verminderter Blutfluss vorgetäuscht wird, was das Ergebnis verfälschen würde.<sup>49</sup> Bei Auftreten von Druckartefakten, welche durch eine Verlangsamung des Blutflusses und gleichzeitige Zunahme der Hintergrundhelligkeit erkennbar sind, kann man durch Korrektur

von Druck und Stellung das Bild unmittelbar optimieren, da man zu jeder Zeit die eigene Aufnahme während der Messung auf dem PC-Bildschirm verfolgen kann. Abhilfe schafft hier oft ein Tropfen steriler Aqua-Lösung als Kontaktflüssigkeit. Größere Schwierigkeiten bereitete bei dieser Arbeit die Vermeidung von Bewegungsartefakten. An unserer Studie nahmen Kinder im Alter zwischen zwei Wochen und knapp über zwei Jahren teil. Je älter die Kinder waren, desto kürzer und seltener waren die Schlafphasen tagsüber und auch die Aktivität nahm zu. Besonders bei postoperativ unruhigen und agitierten Kleinkindern war die Vermeidung von Bewegungsartefakten daher oft schwierig. Gerade bei den Glykokalyxmessungen führte das zu Problemen, da die Software besonders strenge Qualitätskriterien vorgibt und Messungen nur durchgeführt werden können, wenn diese Kriterien eingehalten werden. Aus diesem Grund war es nicht möglich, PBR-Werte für alle Kinder zu ermitteln. Hierdurch könnte es theoretisch zu einer Verzerrung der Ergebnisse gekommen sein. Da die Problematik jedoch auch bei den Kontrollgruppen gegeben war, sollte sich der Effekt beim Vergleich verschiedener Gruppen ausgleichen.

### **4.1.3 Auswertung**

Die Auswertung der Mikrozirkulations- und der Glykokalyxuntersuchungen erfolgte durch zwei unterschiedliche Programme.

#### **4.1.3.1 Mikrozirkulation**

Die Auswertung der mikrozirkulatorischen Aufnahmen erfolgte mit dem halbautomatischen Automated Vascular Analysis-Programm (AVA 3.0). Das Prinzip und die einzelnen Vorgänge sind ausführlich in den Punkten 2.5 und 2.6 beschrieben. Das Programm stabilisiert die ausgewählte Sequenz zur Verringerung von Bewegungsartefakten und erfasst anschließend automatisch die abgebildeten Gefäße anhand der Kontrastunterschiede zum Gewebe. Die korrekte Gefäßerkennung hängt daher maßgeblich von der Qualität der Videosequenzen ab, sodass beispielsweise unscharfe oder zu dunkle Aufnahmen u.U. zu einer fehlerhaften Markierung führen. Um diesem Fehler vorzubeugen, wurden in der vorliegenden Arbeit zu jedem Untersuchungszeitpunkt multiple Aufnahmen generiert, um dann die qualitativ besten Sequenzen für die Auswertung auswählen zu können.

Die Software bietet außerdem die Möglichkeit die automatisch vorgenommenen Gefäßmarkierungen manuell nachzubearbeiten. Wir haben beschlossen, nur augenscheinlich falsche Markierungen wie Haare oder Lufteinschlüsse zu entfernen und keine fehlenden Gefäßmarkierungen von Hand nachzuzeichnen. Dadurch sollte eine Verfälschung und Beeinflussung durch den Anwender vermieden werden. Es ist aber möglich, dass die Gefäßdichte dadurch leicht unterschätzt wird. Allerdings handelt es sich in diesem Falle um einen systematischen Fehler, der sich in allen Versuchsgruppen und zu allen Messzeitpunkten gleichermaßen auswirken sollte, sodass relative Veränderungen über die Zeit oder zwischen den Gruppen weiterhin aussagekräftig sind. Die anschließende Berechnung der mikrozirkulatorischen Parameter wie funktionelle Gefäßdichte, Durchmesser- und Gefäßoberfläche erfolgt wieder automatisch durch das Programm.

Im Konsensuspaper zu Mikrozirkulationsmessungen von De Backer et al. werden die Vor- und Nachteile unserer Messparameter erörtert. Der größte Vorteil der von uns verwendeten Parameter liegt demnach darin, dass verschiedene Variablen für die Organperfusion gemessen werden, die totale Gefäßdichte (TVD, Total Vessel Density), die perfundierte Gefäßdichte (PVD, Perfused Vessel Density) inklusive der funktionellen Kapillardichte. Die totale Gefäßdichte alleine gibt noch keinen Aufschluss über die Perfusion und somit kann erst in Kombination mit der perfundierten Gefäßdichte eine Aussage über die Organperfusion getroffen werden. Außerdem weisen die Messparameter eine gute Reproduzierbarkeit auf. Nachteil ist, dass die Scores sensitiv gegenüber Isotropie sind, was eine Veränderung der Bildgröße während der optischen Vergrößerung bedeutet.<sup>49</sup>

Zuletzt wurde in unserer Arbeit die Qualität des Blutflusses, also der Microvascular Flow Index, durch den Anwender bestimmt.

Laut Konsensuspaper ist der MFI ein schnell zu bestimmender Score, welcher Informationen über die Qualität des Blutflusses in den perfundierten Gefäßen liefert. Allerdings kann keine Aussage über die funktionelle Kapillardichte gemacht werden.<sup>49</sup>

Hier mag die Gefahr der Beeinflussung durch Subjektivität des Untersuchers bestehen. Allerdings haben wir durch Randomisierung und Verblindung der auszuwertenden Sequenzen versucht, diesen Fehler so gering wie möglich zu halten. Die kontinuierliche Auseinandersetzung mit den mikrozirkulatorischen Untersuchungen und Videos schon vor der MFI-Bestimmung erlaubte außerdem die Beurteilung mit einem geschulten und objektiveren Auge.

Auch die „MICRONURSE study“ von 2015 hat gezeigt, dass von Intensivkrankenschwestern direkt am Patientenbett beurteilte MFI-Auswertungen keine signifikanten Unterschiede zu den

zeitlich versetzten Auswertungen durch Ärzte aufwiesen und somit mit etwas Schulung eine gut reproduzierbare Auswertung möglich ist.<sup>149</sup>

#### 4.1.3.2 Glykokalyx

Die Auswertung der Glykokalyx-Parameter erfolgte automatisiert durch eine speziell zu diesem Zweck entwickelte Software. Durch den Anwender war hier keine Mitarbeit erforderlich, das Programm berechnete die Perfused Boundary Region vollautomatisch.<sup>97</sup>

Die hier verwendete Technik wurde bereits in mehreren Studien validiert.<sup>44, 54, 143, 163</sup>

Da mit SDF Imaging die Endothelzellen der Gefäße nicht abgebildet werden und die detektierbare Erythrozytensäule aufgrund der intakten Glykokalyx nicht das gesamte Gefäßlumen ausfüllt, entspricht der als Perfused Diameter errechnete Durchmesser jedoch nicht dem anatomischen. Wenn es zu einem „shedding“ der Glykokalyx kommt, nähert sich zwar der Perfused Diameter dem anatomischen Durchmesser an. Es ist aber davon auszugehen, dass der gemessene Durchmesser immer noch etwas geringer ist als der anatomische, da ein Teil der Kernproteine der Glykokalyx vermutlich auch bei „shedding“ erhalten bleibt. Deswegen kann auch die Dimension der Glykokalyx nicht komplett erfasst werden und die errechnete PBR entspricht nicht dem anatomischen Durchmesser.<sup>94</sup>

Diese indirekte Messmethode bedeutet auch, dass nicht die absolute Dicke der Glykokalyx angegeben wird, sondern Unterschiede zwischen einzelnen Gruppen oder innerhalb einer Gruppe über den zeitlichen Verlauf.<sup>97</sup>

Auch kritisch zu betrachten ist die Tatsache, dass PBR-Messungen nur in Gefäßen bis 25 µm stattfinden und somit größere Gefäße nicht berücksichtigt werden. Damit kann auch nur über einen Teil der Gefäße eine Aussage getroffen werden.<sup>101</sup>

Ebenfalls traten teilweise erhebliche interindividuelle Schwankungen auf, was sich bei den longitudinalen Versuchsreihen jedoch durch intraindividuelle Messungen als weniger problematisch erwies.

## 4.2 Diskussion der Ergebnisse

### 4.2.1 Veränderungen der Glykokalyx im Rahmen herzchirurgischer Operationen bei Kindern an der HLM

In der vorliegenden Studie haben wir die Perfused Boundary Region als Indikator für die Dicke und Integrität der Glykokalyx bei Kindern gemessen, welche sich einer herzchirurgischen Operation mit HLM unterziehen mussten.

Der Ansatz basiert auf der Annahme, dass Erythrozyten und plasmatische Makromoleküle eine intakte Glykokalyx nicht passieren können und diese außerdem als Barriere und Modifikator zwischen dem Blutstrom und der Gefäßwand fungiert.<sup>97, 162</sup>

Wir haben eine signifikante Zunahme der PBR in den Hautkapillaren am Ohr direkt nach Operationen mit Einsatz der Herz-Lungen-Maschine um durchschnittlich 0,2  $\mu\text{m}$  beobachtet, was als akuter Verlust der Glykokalyx intra- und postoperativ zu interpretieren ist.

Studien von Dane et al. und Eskens et al. haben nachgewiesen, dass sich ein Verlust der Barrierefunktion durch eine Störung der Glykokalyx als PBR-Zunahme äußert.<sup>44, 55</sup>

Übereinstimmend mit unserer Studie haben auch andere Forschungsgruppen kongruente Ergebnisse nachweisen können. Rehm et al. haben bereits 2007 die Plasmaspiegel von zirkulierendem Syndecan-1 und Heparan-Sulfat, zwei Bestandteilen der Glykokalyx, vor und nach herzchirurgischen Interventionen gemessen. Hierbei konnten bis zu 65-fach erhöhte Werte nach kardiopulmonalem Bypass und Ischämieexposition nachgewiesen werden.<sup>126</sup>

2011 zeigten Bruegger et al., dass eine Erhöhung des atrialen natriuretischen Peptids (ANP) bei herzchirurgischen Operationen dem „shedding“ der Glykokalyx vorausgeht und hierbei sogar ein leichter Abbau bei Operationen ohne HLM nachgewiesen werden konnte.<sup>26</sup>

Zuletzt konnten ebenfalls Bruegger et al. 2015 bei Kindern erhöhte Plasmalevel von Syndecan-1 und Hyaluronsäure, einem weiteren Glykokalyxbestandteil, während und nach Operationen an der HLM nachweisen. Zudem war hierbei ein klarer Zusammenhang mit dem Ausmaß von Ischämie und Perfusion zu beobachten. Die Plasmalevel während HLM mit AK und DHCA waren deutlich erhöht im Vergleich zu den Operationen, welche allein an der HLM ohne weitere Maßnahmen durchgeführt wurden.<sup>23</sup>

Diese Studien liefern allerdings lediglich indirekte Beweise für den Abbau der Glykokalyx und können keine Aussage zu Veränderungen auf Einzelgefäßebeene machen. Unsere Studie hat unseres Wissens zum ersten Mal Glykokalyx-Veränderungen in der Mikrozirkulation nach kardiochirurgischen Eingriffen mit HLM bei Kindern nachgewiesen.

Im Kontrast zu den Ergebnissen von Bruegger et al.<sup>23</sup> waren bei unseren Untersuchungen die Veränderungen der PBR in der HLM- (keine Ischämie) und der HLM+AK-Gruppe (Ischämie von Herz und Lunge) identisch und somit offenbar unabhängig von der ischämischen Belastung.

Eine Erklärung dafür könnte sein, dass die gemessenen Glykokalyx-Bestandteile im Blut aus dem gesamten Organismus stammen und somit auch unter dem Einfluss von Ischämie-exponierten Organen stehen, während wir unsere Messungen am Ohr durchführten, welches weder in der HLM-Gruppe noch in der HLM+AK-Gruppe einer direkten Ischämie ausgesetzt war.

Glykokalyx-„shedding“ scheint demnach nicht nur auf die Gefäße von ischämischen Organen beschränkt, sondern ein allgemeines Phänomen nach kardiopulmonalem Bypass zu sein. Inwiefern es unter Ischämie zu einer vermehrten Destruktion der Glykokalyx kommt, kann durch unsere Studie nicht abschließend beurteilt werden. Hierfür wäre ein Vergleich mit PBR-Veränderungen in der DHCA-Gruppe interessant, da in dieser Gruppe (Ganzkörperischämie) auch das Ohr zwischenzeitlich einer Ischämie ausgesetzt wird. Aufgrund der geringen Anzahl erfolgreicher PBR-Messungen in der DHCA-Gruppe (n=3) ist eine diesbezügliche valide Aussage jedoch leider nicht möglich.

Es stellt sich nun die Frage, wieso Glykokalyx-Veränderungen auch ohne ischämischen Stress auftreten. Wahrscheinlich ist, dass auch andere Faktoren zum „shedding“ der endothelialen Glykokalyx beitragen wie zum Beispiel der Kontakt des Blutes mit Fremdoberflächen, ein veränderter Blutfluss und die Manipulation an den großen Gefäßen während des Einsatzes der HLM.<sup>108</sup> Außerdem gibt es Hinweise, dass die operative Prozedur an sich ebenfalls Inflammation und Glykokalyx-„shedding“ hervorruft.

Prondzinsky et al. haben in ihrer Studie aus dem Jahr 2005 gezeigt, dass das chirurgische Trauma und der Einsatz der HLM zu der inflammatorischen Antwort nach herzchirurgischen Eingriffen beitragen, und postulieren, dass der Anteil des Traumas überwiegt.<sup>124</sup> Svennevig et al. haben 2008 die Plasmalevel von Syndecan-1 während Koronararterien-Bypass-Operationen untersucht, welche teils mit und teils ohne extrakorporale Zirkulation ausgeführt wurden. Es wurden zwar während des Eingriffs signifikant erhöhte Plasmalevel nachgewiesen, allerdings zeigte sich überraschenderweise insgesamt kein Unterschied zwischen der HLM-Gruppe und jenen Patienten, die ohne HLM operiert wurden.<sup>147</sup> Auch Bruegger et al. haben gezeigt, dass es bei Koronararterien-Operationen sowohl mit HLM als auch ohne zu Glykokalyx-„shedding“ kommt.<sup>24, 26</sup> Dies spricht für den Einfluss des operativen Traumas auf den Glykokalyx-Abbau.

Da kindliche Herzfehler aufgrund ihrer Komplexität meist den Einsatz der HLM erfordern, ist es fast unmöglich, zwei Vergleichsgruppen derselben Operation mit und ohne HLM zu bilden, um die Einflüsse des chirurgischen Eingriffs von denen der HLM zu trennen.

Wir konnten die Daten von vier Kindern gewinnen, welche sich kleineren herzchirurgischen Eingriffen mit offenem Thorax, jedoch ohne Einsatz der HLM unterziehen mussten. Es zeigten sich keine erhöhten PBR-Werte postoperativ im Vergleich zum Ausgangswert. Aufgrund der Unterschiede der durchgeführten Eingriffe im Vergleich zur HLM-Gruppe und der geringen Gruppengröße, lassen sich hieraus jedoch keine verlässlichen Rückschlüsse ziehen.

Kürzlich haben auch Koning et al. Veränderungen von Glykokalyx und Mikrozirkulation durch herzchirurgische Operationen bei Erwachsenen untersucht. Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen zeigte die PBR bei Operationen mit HLM einen Anstieg, welcher auf eine Degradation der Glykokalyx hinweist. Bei Eingriffen ohne HLM konnten auch Koning et al. keine signifikante Vergrößerung der PBR und somit keine Veränderung der Glykokalyx nachweisen. Sie konnten sogar aufzeigen, dass es bei diesen Patienten zu einer intraoperativen Zunahme der Glykokalyx im Vergleich zu den präoperativen Ausgangswerten kam.<sup>93</sup> Eine mögliche Erklärung wurde dem Effekt des Heparins zugeschrieben, welches nach deren ersten Messungen verabreicht wurde. Unfraktioniertes Heparin soll die Heparinase in ihrer Aktivität hindern und somit die Glykokalyx vor Abbau schützen.<sup>166</sup>

In der vorliegenden Arbeit erhielten alle Kinder mit Operationen an der HLM ebenfalls Heparin, so dass sich die Frage stellt, warum dennoch ein Glykokalyxabbau postoperativ zu verzeichnen war. Koning und Kollegen fanden hierfür als mögliche Erklärung, dass der gleichzeitige Einsatz der HLM und damit der beginnende Glykokalyxabbau den positiven Effekt des Heparins auf die Glykokalyx maskiert haben könnte.<sup>93</sup> Demnach ist es denkbar, dass das HLM-induzierte „shedding“ der Glykokalyx ohne den Einfluss von Heparin sogar noch stärker ausgeprägt wäre. Da jeder Einsatz der HLM eine Vollantikoagulation notwendig macht, und die Patienten somit immer unter dem Einfluss von Heparin stehen, kann diese Frage momentan nicht geklärt werden.

Im Gegensatz zu unseren prä- und postoperativen Messungen fanden die Untersuchungen der Kollegen intraoperativ statt. Dies war uns aufgrund logistischer Gründe leider nicht möglich. Auch wurde von Koning et al. ein sublingualer Messort gewählt, da bei Erwachsenen die Verhornung der Haut eine Messung an der Ohrmuschel nicht mehr zulässt. Es wurde jedoch gezeigt, dass sich mikrozirkulatorische Veränderungen während der HLM an verschiedenen Messorten bestätigen lassen. Kiessling et al. haben 2015 Veränderungen der Mikrozirkulation

während kardiochirurgischer Eingriffe mit Einsatz der HLM an der Rektumschleimhaut nachgewiesen.<sup>88</sup>

Eine weitere interessante Erkenntnis von Koning et al. ist die Tatsache, dass die Glykokalyx einer intraoperativen Dynamik zu unterliegen scheint, wie zuvor schon kurz angesprochen wurde. Sie konnten nachweisen, dass die Glykokalyx bei Einsatz von pulsatilem Blutfluss an der HLM innerhalb von vier Stunden nach Beginn der extrakorporalen Zirkulation wiederhergestellt war.<sup>93</sup> Dies führten sie darauf zurück, dass die Glykokalyx in Anwesenheit von stärkerer Schubspannung<sup>66</sup> und zirkulierenden Glykokalyx-Bestandteilen in der Lage ist, diese zum Wiederaufbau zu verwenden und dadurch teilweise ihre Funktion zurückzuerlangen.<sup>79, 94, 166</sup> Umgekehrt ließe sich daraus folgern, dass die fehlende Wiederherstellung der Glykokalyx nach nicht-pulsatilem Blutfluss an der HLM, wie sie in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz kam, durch die gestörte endotheliale Funktion und die verminderte Schubspannung bedingt ist.<sup>93, 109</sup>

Nakano et al. haben nämlich gezeigt, dass unter nicht-pulsatilem Blutfluss die Freisetzung von basalem und flussstimuliertem NO aus dem Endothel signifikant geringer ist als unter pulsatilem Blutfluss und dies somit auch Einfluss auf den peripheren Widerstand hat.<sup>109</sup>

Ebenso können, wie bereits oben erwähnt, Kernproteine der Glykokalyx dazu beitragen, dass Schubspannung im Endothel zu NO-Produktion und Reorganisation glykokalischer Strukturen führt.<sup>162</sup>

Ein weiterer möglicher Faktor, welcher zur Vergrößerung der PBR postoperativ geführt haben könnte, ist der Einsatz von Narkotika und Muskelrelaxantien im Rahmen der Operation.

Bei den Kindern, welche wir vor und nach Herzkatheteruntersuchungen in Vollnarkose und vor und nach Operationen einer Lippen-Kiefer-Gaumenspalte ebenfalls in Vollnarkose untersucht haben, ließ sich jedoch keine signifikante Veränderung der PBR postoperativ im Vergleich zu präoperativ feststellen. Dies spricht für den fehlenden Effekt der Anästhesie auf die endotheliale Glykokalyx und deren potenziellen Abbau. Allerdings waren die Gruppengrößen in beiden Fällen relativ klein, sodass unsere Ergebnisse keine abschließende Aussage erlauben. Annecke et al. und Chappell et al. haben aber gezeigt, dass die Verwendung von Sevofluran als volatiles Anästhetikum die Glykokalyx vor ischämie- und reperusionsbedingtem Abbau sogar schützen kann.<sup>10, 31</sup>

Wenn man die zeitliche Dynamik der Glykokalyxregeneration betrachtet, zeigen unsere Daten, dass die PBR und somit die Dicke der Glykokalyx nach etwa sieben Tagen wieder zu ihrem Ausgangswert zurückgekehrt und damit vollständig regeneriert ist.

Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen von Potter et al., die nachgewiesen haben, dass es nach enzymatischer und durch Zytokine induzierter Degradation der Glykokalyx etwa fünf bis sieben Tage dauert bis sich diese wieder endogen zu ihrer ursprünglichen Dicke aufgebaut hat.<sup>122</sup>

#### **4.2.2 Veränderungen der Mikrozirkulation im Rahmen herzchirurgischer Operationen bei Kindern an der HLM**

Neben der Untersuchung der Glykokalyx lag ein weiteres Augenmerk dieser Arbeit auf messbaren Veränderungen der Mikrozirkulation im Rahmen von herzchirurgischen Eingriffen bei Kindern.

Wir konnten hier eine vorübergehende Störung der mikrozirkulatorischen Perfusion nach Operationen mit HLM nachweisen, welche sich jedoch 24 Stunden nach dem Eingriff wieder normalisiert hatte. Es kam zu einer signifikanten Reduktion des Blutflusses, abgebildet als MFI, und der Anzahl der Gefäße mit kontinuierlichem Blutfluss, hier durch die PVD repräsentiert, mit einer Rückkehr zum Ausgangswert 24 Stunden postoperativ. Keine signifikanten Veränderungen zeigten sich bei der Dichte aller detektierten Gefäße und der Verteilung der Gefäßdurchmesser in allen Gruppen. Dies könnte sich dadurch erklären, dass die chirurgische Intervention zwar auf die Art und Verteilung des Blutflusses Einfluss nimmt, nicht jedoch auf die absolute Gefäßverteilung.

NIRS kommt bereits als effektive Methode zur Überwachung der zerebralen Oxygenierung während herzchirurgischer Eingriffe bei Kindern zum Einsatz. So haben Haydin et al. 2013 die Zusammenhänge zwischen zerebraler  $SO_2$  und zum Beispiel Laktat, Hämatokrit, mittlerem arteriellem Blutdruck und Pumpenflow unter extrakorporaler Zirkulation untersucht. Außerdem zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Laktatspiegel während der HLM. Zwischen zerebraler Sauerstoffsättigung und mittlerem arteriellem Blutdruck, Pumpenflow, Hämatokrit oder  $pCO_2$  konnte kein signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden. Die zerebrale  $SO_2$  zeigte jedoch Veränderungen während der verschiedenen Stadien des Eingriffs. Es kam in der Kühlphase zu einer signifikanten Zunahme der zerebralen  $SO_2$  im Vergleich zum Beginn der HLM trotz der von uns nachgewiesenen Reduktion der mikrozirkulatorischen Perfusion in tiefer Hypothermie, da hier aufgrund der Hypothermie die Sauerstoffextraktion sinkt und damit die gemessene Sauerstoffsättigung steigt.<sup>71</sup>

Wie in genannter Studie zeigten auch unsere Mikrozirkulationsparameter MFI und PVD keine Korrelation zu arteriellem Blutdruck und Hämatokrit. Weitere Studien haben gezeigt, dass

z.B. bei systemischer Inflammation und Infektion regulatorische Mechanismen verloren gehen, welche unter physiologischen Bedingungen die hämodynamische Kohärenz zwischen Makrozirkulation und Mikrozirkulation aufrechterhalten sollen. Zu den daraus folgenden mikrozirkulatorischen Veränderungen zählen unter anderem ein verminderter mikrozirkulatorischer Blutfluss und eine verminderte Kapillardichte.<sup>47, 77</sup>

Dies kann erklären, weshalb unsere mikrozirkulatorischen nicht mit den makrozirkulatorischen Parametern korrelieren.

Während mittels NIRS nur Aussagen über regionale Veränderungen im Gewebe gemacht werden können<sup>40</sup>, ist mittels SDF Imaging eine direkte Visualisierung der Mikrozirkulation und somit eine lokale Beurteilung einzelner Gefäße möglich. De Backer et al. haben 2009 mittels OPS bereits beim Erwachsenen gezeigt, dass bei herzchirurgischen Operationen Veränderungen der Mikrozirkulation auftreten. Es kam zu einer signifikanten Reduktion des Anteils perfundierter Gefäße in den beiden herzchirurgischen Untersuchungsgruppen mit und ohne HLM intra- und postoperativ und auch in der Thyreoidektomie-Kontrollgruppe. Allerdings war in den herzchirurgischen Interventionsgruppen und vor allem in der HLM-Gruppe die Beeinträchtigung längerfristiger und schwerwiegender.<sup>48</sup>

Bemerkenswert ist, dass in der genannten Studie auch bei den Patienten, welche sich einer nicht-herzchirurgischen Operation unterziehen mussten, nach Einleitung der Anästhesie eine signifikante Veränderung der Mikrozirkulation nachgewiesen werden konnte.<sup>48</sup>

Wir konnten bei den Kindern, welche eine Allgemeinanästhesie im Rahmen einer Herzkatheteruntersuchung erhielten, keine Veränderung der Mikrozirkulation dokumentieren. Allerdings handelt es sich hierbei um eine kleine Fallzahl und wir führten keine Untersuchungen der Mikrozirkulation direkt nach der Narkoseeinleitung und während des Eingriffs durch, weshalb wir so mögliche Veränderungen bei den postinterventionellen Messungen eventuell verpasst haben. Grundsätzlich kann jedoch ein Einfluss der Anästhesie auch bei unseren Ergebnissen nicht ausgeschlossen werden. Eine Beeinträchtigung der Mikrozirkulation durch eine Allgemeinanästhesie konnte zum einen bereits an Tiermodellen nachgewiesen werden<sup>22, 137</sup>, zum anderen haben De Blasi et al. 2008 auch in einer klinischen Studie den Einfluss der Allgemeinanästhesie auf die Mikrozirkulation des Muskels dargestellt. Es wurde gezeigt, dass unter Allgemeinanästhesie mit Remifentanyl und Propofol oder Sevofluran der mikrovaskuläre Widerstand abnimmt, das Gewebeblutvolumen und auch der Blutfluss hingegen zunehmen.<sup>51</sup>

Bei unseren Untersuchungen war ein klarer Zusammenhang zwischen den mikrozirkulatorischen Veränderungen und dem ischämischen Stress während der Eingriffe auszumachen.

Die größte postoperative Beeinträchtigung der Mikrozirkulation, repräsentiert durch eine Reduktion von MFI und PVD, konnte demnach in der DHCA-Gruppe beobachtet werden. Bei Kindern, welche zwar an der HLM, aber ohne Kreislaufstillstand und Aortenklammzeit operiert wurden, waren MFI und PVD postoperativ quasi identisch zum präoperativen Ausgangswert. Hier liegt die Vermutung nahe, dass neben der ischämischen Belastung die reduzierte Körpertemperatur, welche bei Eingriffen mit Kreislaufstillstand zur Anwendung kommt um die Ischämietoleranz zu erhöhen, eine Rolle spielen könnte. So bestand eine signifikante Korrelation der PVD mit der postoperativen Körpertemperatur. Dagegen konnten mit der intraoperativen Temperatur, dem arteriellen Blutdruck und dem Hämatokrit keine Korrelationen berechnet werden.

Auch der MFI variierte innerhalb der gesamten HLM-Untergruppen trotz fehlender Korrelation mit der Körpertemperatur signifikant, was die Vermutung nahelegt, dass an der Veränderung der Mikrozirkulation weitere Faktoren eine Rolle spielen. Wahrscheinlich, und erst kürzlich in einigen Arbeiten genauer untersucht <sup>92</sup>, ist die Hypothese, dass auch verschiedene Blutflussformen intraoperativ die mikrovaskuläre Perfusion beeinflussen können.

Grundsätzlich kann mit der HLM ein pulsatiler, der physiologischen Druckkurve nachempfunder Blutfluss generiert werden oder das Blut mit nicht-pulsatilem, das heißt kontinuierlichem, Fluss befördert werden. In der vorliegenden Arbeit kam bei allen herzchirurgischen Eingriffen eine HLM mit nicht-pulsatilem Fluss zum Einsatz. Bei den Eingriffen mit HLM am schlagenden Herzen ohne Abklemmung der Aorta (HLM-Gruppe) bleibt jedoch ein pulsatiler Blutfluss erhalten, während bei Operationen mit Abklemmung der Aorta (HLM+AK- und HLM+AK+DHCA-Gruppen) die HLM die komplette Kreislaufaufrechterhaltung mit nicht-pulsatilem Fluss übernimmt.

Die Auswirkungen der Flusseigenschaft auf die Mikrozirkulation haben unter anderem Koning et al. 2012 untersucht. Sie konnten nachweisen, dass MFI und PVD bei Patienten, welche einen herzchirurgischen Eingriff mit HLM und pulsatilem Fluss erhalten hatten, postoperativ bessere Werte zeigten als bei Patienten mit kontinuierlichem Fluss an der HLM. <sup>92</sup> Ähnliches konnten auch O'Neil et al. 2012 darstellen. <sup>117</sup> Koning et al. haben außerdem demonstriert, dass es in einem Teil der Kapillaren zu sehr hohen Blutflussgeschwindigkeiten während und nach der HLM kommen kann, wenn ein nicht-pulsatiler Fluss verwendet wird.

Dies konnte wiederum mit dem Auftreten von einem vermehrten funktionellen arteriovenösen Shunt von Sauerstoff und damit einer verminderten Sauerstoffausschöpfung in Verbindung gebracht werden. Eine weitere bemerkenswerte Beobachtung war die vermehrte Heterogenität in der mikrovaskulären Durchblutung, welche bei Eingriffen ohne HLM nicht nachgewiesen wurde.<sup>90</sup>

Bei unserer Arbeit haben wir auch bei den Kindern, welche sich einem herzchirurgischen Eingriff ohne HLM unterziehen mussten, eine gewisse Reduktion der mikrovaskulären Perfusion beobachtet. Das Auftreten dieser Veränderungen in Abwesenheit der extrakorporalen Zirkulation spricht dafür, dass hier andere Einflüsse, wie die inflammatorische Antwort durch den chirurgischen Eingriff an sich und auch die Veränderungen des Blutflusses durch die Mobilisierung des Herzens im Rahmen der Operation, eine mögliche Rolle spielen.<sup>12</sup> Allerdings erlaubt auch hier die geringe Fallzahl der Kinder mit kardiochirurgischen Eingriffen ohne Einsatz der HLM keine allgemeine Aussage.

#### **4.2.3 Mögliche Alterationen der Mikrozirkulation und der Glykokalyx abhängig von der Dauer der extrakorporalen Zirkulation während der Operation**

Vergleicht man die drei HLM-Untergruppen in Bezug auf die HLM-Dauer miteinander, zeigen sich hier natürlich aufgrund der zugrundeliegenden Herzfehler und der zunehmenden Komplexität der Eingriffe signifikante Unterschiede. Auch die intraoperative Temperatur in den drei Untersuchungsgruppen unterschied sich signifikant infolge der verschiedenen Operationsmethoden und damit verbundenen Hypothermieniveaus. HLM-Dauer und Temperatur stehen somit in einem direkten Zusammenhang zueinander. Beide Parameter haben Einfluss auf das Ausmaß der HLM-induzierten Glykokalyxschädigung.

In Tiermodellen wurde gezeigt, dass sogar vier Stunden Ischämie bei 4° Celsius weniger Glykokalyx Abbau verursacht haben, als 20 Minuten ischämische Verhältnisse bei einer Körpertemperatur von 37° Celsius.<sup>31, 35</sup>

Bruegger et al. haben in ihrer Studie die höchsten Raten an Glykokalyxabbauprodukten in der Gruppe mit globaler Ischämie (DHCA) gefunden, trotz der ebenfalls in dieser Gruppe gemessenen niedrigsten Körpertemperatur. Dies zeigt den wichtigen Einfluss der Ischämie bzw. der nachfolgenden Reperfusion auf das „shedding“ der Glykokalyx trotz Schutz durch Hypothermie. Bei Normothermie wäre der Schaden an der Glykokalyx durch Ischämie wahrscheinlich noch größer ausgefallen, postulieren die Kollegen.<sup>23</sup>

Unklar bleibt hierbei aber, welche Rolle die HLM-Dauer an sich im Hinblick auf die Schädigung der Glykokalyx ausübt. In der Regel weisen Operationen mit tiefem hypothermen Kreislaufstillstand und somit der größten ischämischen Belastung auch die längste HLM-Dauer auf. Es ist also denkbar, dass die längere Zeit an der extrakorporalen Zirkulation auch deren potentiell negative Auswirkungen wie z.B. die Aktivierung von inflammatorischen und koagulatorischen Kaskaden wie in Punkt 1.3.3 dargestellt, verstärkt und somit zu einer ausgeprägteren Schädigung der endothelialen Glykokalyx in dieser Subgruppe beiträgt.

Bei der Betrachtung der von uns erhobenen Daten hat sich herausgestellt, dass die postoperativ zum Zeitpunkt T1 erhobenen PBR-Werte in der HLM- und in der HLM+AK-Gruppe identisch waren. Wie bereits erwähnt, waren die Daten der HLM+AK+DHCA-Gruppe aufgrund zu geringer Gruppengröße aus dieser Analyse ausgeschlossen. Hieraus lässt sich, wie zuvor diskutiert, kein Rückschluss auf die direkte Abhängigkeit der PBR von Ischämie und Reperfusion ziehen, da unser Messort, die Ohrmuschel, bei den analysierten Gruppen keiner unmittelbaren Ischämie ausgesetzt war.

Eine weitere Beobachtung, welche aus unseren Daten resultiert, ist die fehlende Korrelation der postoperativen PBR-Werten zum Zeitpunkt T1 mit der HLM-Dauer und der intraoperativen Temperatur.

Wieso zeigten sich also bei unseren Ergebnissen keine Zusammenhänge zwischen PBR, HLM-Dauer und Temperatur? Während Bruegger et al. ihre Messungen der Glykokalyxabbauprodukte auch intraoperativ vollziehen konnten, waren wir mit unserer Bildgebung auf prä- und postinterventionelle Zeitpunkte beschränkt. Denkbar wäre es, dass Glykokalyxveränderungen bzw. -degradation, welche laut Bruegger et al. intraoperativ ihr Maximum erreichen, bei postoperativer Messung deswegen von uns nicht mehr in vollem Ausmaß nachgewiesen werden konnten und wir somit mögliche Unterschiede zwischen den Gruppen verpasst haben.

Bei der Auswertung der Daten aus den mikrozirkulatorischen Untersuchungen fiel eine schwache, aber doch signifikante Korrelation von MFI mit der HLM-Dauer auf. Auch ein signifikanter Zusammenhang zwischen PVD und der Körpertemperatur zum Zeitpunkt T1 konnte, wie bereits in Punkt 4.2.2 erwähnt, nachgewiesen werden. Die Bedeutung dieser Beobachtung und der kausale Zusammenhang müssen jedoch hinterfragt werden. Andere Studien haben gezeigt, dass der Einfluss von Hypothermie auf die Mikrozirkulation diskutabel ist und meist mit Wiedererwärmung verschwindet.<sup>86</sup> De Backer et al. konnten keinen Zusammenhang zwischen dem Ausmaß mikrozirkulatorischer Veränderungen und der Körperkerntemperatur nachweisen.<sup>48</sup>

Ebenso konnten Koning et al. 2015 keine Korrelation zwischen Körpertemperatur und Mikroziirkulations- und Glykokalyxparametern finden und deklarierten damit die Rolle der Hypothermie ebenfalls als unklar.<sup>93</sup>

#### **4.2.4 Zusammenhang zwischen dem Verlust der Glykokalyx und den Veränderungen der Mikroziirkulation**

In tierexperimentellen Versuchen ist bereits der Zusammenhang zwischen Veränderungen der Glykokalyx und der Mikroziirkulation untersucht worden. Hier konnte gezeigt werden, dass ein Verlust der Glykokalyx zu Beeinträchtigungen der kapillären Perfusion führt.<sup>29</sup>

Becker et al. haben postuliert, dass es durch Abnahme der Glykokalyxdicke zu einem Verlust der vaskulären Barrierefunktion und konsekutiv zu Proteinextravasation, Gewebsödemen, Verlust von Blutfluss und einer vermehrten Thrombozyten- und Leukozytenadhäsion kommt.

<sup>16</sup> Diese Anheftung der Zellen an das Endothel der mikroziirkulatorischen Gefäße kann wiederum die Durchlässigkeit der Mikrogefäße begünstigen.<sup>29</sup>

Wie einleitend erklärt, besitzt die Glykokalyx außerdem die Fähigkeit zur Transduktion von Schubspannung auf die endotheliale Oberfläche im mikrovasculären Gefäßbett, wodurch NO freigesetzt wird.<sup>82</sup> Wenn es durch eine Abnahme der Glykokalyxdicke auch zu einer Störung in ihrer Funktion kommt, kann hierdurch die Mikroziirkulation weiter beeinträchtigt werden. Beobachtet werden konnte dies zum Beispiel bei dem Einsatz der HLM mit nicht-pulsatilem Blutfluss, was schließlich durch verminderte NO-Freisetzung eine Kompromittierung der Mikroziirkulation erklären könnte.<sup>109</sup>

Wie bereits erläutert, haben die Kollegen Koning et al. auch gezeigt, dass die Glykokalyx bei pulsatilem Fluss und zirkulierenden Glykokalyxbestandteilen in der Lage ist, sich selbst wiederherzustellen. Dies bedeutet, dass bei ungünstigen Bedingungen, wie zum Beispiel nicht-pulsatilem Fluss, nicht nur die initiale Zerstörung der Glykokalyx begünstigt, sondern auch deren Wiederherstellung verhindert oder zumindest verzögert wird, was zu einer längeren Beeinträchtigung der Mikroziirkulation beiträgt.<sup>93</sup>

Es ist aber weiterhin unklar, in welchem kausalen Zusammenhang die Unversehrtheit der Glykokalyx und intravasculäre Blutflussmuster zueinander stehen. Möglich wäre auch, dass eine reduzierte Glykokalyxdicke zu einem verminderten intravasculären Widerstand mit vermehrtem kapillären Blutfluss führt. Dies hat aber nicht unbedingt nur positive Auswirkungen. Wie in Punkt 4.2.2 beschrieben, haben Koning et al. gezeigt, dass nicht-

pulsatiler Fluss an der HLM zu hohen Blutflussgeschwindigkeiten und damit zu heterogenen Flussmustern und Sauerstoffshunting führte.<sup>90</sup>

Umgekehrt wäre es auch möglich, dass die Mikrozirkulation durch den Verlust der Autoregulation während des Einsatzes der HLM verwundbarer wird und es somit durch schnelle Flussraten zu Schäden an der Glykokalyx kommt.<sup>151</sup>

#### **4.2.5 Korrelation zwischen möglichen Veränderungen der Mikrozirkulation und der mikrovaskulären Glykokalyx mit dem postoperativen Verlauf der Kinder**

Als Marker zur Beurteilung des postoperativen Verlaufs der Kinder betrachteten wir den Katecholaminbedarf, die Dauer der Notwendigkeit einer invasiven mechanischen Beatmung und das Auftreten eines sog. Kapillarlecksyndroms (KLS).

Bei Betrachtung des postoperativen Katecholaminbedarfs fiel auf, dass nur ein signifikanter Zusammenhang zur Dauer der HLM bestand, wohingegen die postoperativen PBR- und MFI-Werte zur Qualifizierung von Glykokalyx und Mikrozirkulation keine Assoziation zum Katecholaminbedarf zeigten. Die fehlende Korrelation zu mikrozirkulatorischen Parametern wie dem MFI überrascht nicht, haben doch vorangegangene Studien bereits bewiesen, dass der Blutfluss in der Mikrozirkulation fast unbeeinflusst und ohne Korrelation zu Veränderungen der Plasmakonzentration von Katecholaminen wie Dobutamin und Noradrenalin bleibt.<sup>38</sup>

Fraglich ist, wieso sich keine Korrelation zwischen der PBR und dem postoperativen Katecholaminbedarf der Kinder zeigte. Wenn man davon ausgeht, dass die arterielle Hypotension und damit auch der Katecholaminbedarf aufgrund eines Kapillarlecks entstehen, welches wiederum durch Glykokalyxverlust bedingt ist, dann müssten PBR und Katecholaminbedarf eigentlich eine Abhängigkeit zeigen. Hier ist aber wahrscheinlich, dass die arterielle Hypotension auch durch andere, Glykokalyx-unabhängige Mechanismen bedingt wird, da wir ja insgesamt nur eine sehr geringe Rate an Kapillarlecksyndrom beobachten. Eine eingeschränkte kardiale Pumpfunktion nach der OP und längerer Bedarf an Sedativa könnten zum Beispiel zu einem höheren Katecholaminbedarf führen, ohne dass hier die Glykokalyx beteiligt ist.

Ähnliches zeigte sich bei der Analyse von postoperativer mechanischer Beatmung und der Dauer des HLM-Einsatzes. Hier war ein signifikanter Zusammenhang auszumachen, jedoch gab es keine Korrelation der Beatmungszeit mit PBR oder MFI.

In einer Studie von Agarwal et al. wurde gezeigt, dass insgesamt der Einsatz von HLM und auch eine längere HLM-Dauer mit einer höheren Rate an kardialen Komplikationen assoziiert sind. Diese postoperativen Komplikationen waren signifikant mit beispielsweise längerer postoperativer mechanischer Beatmung, längerem Intensivaufenthalt und höherer Mortalität verbunden.<sup>4</sup> Das bedeutet, dass es letztlich Faktoren und Komplikationen nach Operationen mit Einsatz der HLM gibt, welche Parameter wie die Beatmungsdauer beeinflussen, jedoch unabhängig von Veränderungen der Mikrozirkulation bleiben. Das erklärt, dass nicht unbedingt eine Korrelation zwischen postoperativer mechanischer Beatmung und PBR oder MFI vorliegen muss.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Dauer der HLM und der gesamten Operation stark mit der Komplexität der zugrundeliegenden Herzfehler und dem Aufwand der Operationsmethode zusammenhängt. So ist auch leicht nachzuvollziehen, dass die betroffenen Kinder postoperativ eine längere Rekonvaleszenzphase benötigen und somit auch längere Beatmungszeiten und einen erhöhten Katecholaminbedarf aufweisen.

Auch bei dem von uns untersuchten Weichteil-Thorax-Quotienten<sup>144</sup>, welcher ab einem bestimmten Grenzwert ein Kapillarlecksyndrom definiert, konnte, wie bereits für andere postoperative Komplikationen beschrieben, ein signifikanter Zusammenhang mit der Dauer der HLM beobachtet werden. Auf die Rolle des KLS soll jedoch im folgenden Punkt genauer eingegangen werden.

#### **4.2.6 Klinische Konsequenzen aus den vorliegenden Erkenntnissen**

Der endothelialen Glykokalyx wird schon länger die Rolle eines essenziellen Regulators der vaskulären Permeabilität zugeschrieben.<sup>123</sup> So wurde in Tiermodellen gezeigt, dass ein Verlust der Glykokalyx zu Störungen der vaskulären Barriere und der Entstehung von Gewebsödemen führt.<sup>25, 156</sup> Deswegen ist es vorstellbar, dass der Abbau der Glykokalyx auch an der Entwicklung eines Kapillarlecksyndrom (KLS) beteiligt ist. Dieses ist charakterisiert durch generalisierte Ödembildung und Organdysfunktion und trägt maßgeblich zur Morbidität und Mortalität von Kindern bei, die sich einem kardiochirurgischen Eingriff mit Einsatz der HLM unterziehen mussten.<sup>95, 140, 146</sup>

Bei Kindern, die mit HLM operiert wurden, konnten wir zeigen, dass es am ersten postoperativen Tag im Vergleich zum präoperativen Ausgangswert zu einer signifikanten Zunahme des Weichteil-Thorax-Quotienten (WTQ) kam. Dies ist als Ausdruck einer vermehrten Ödembildung zu werten. Allerdings hatten nur vier Kinder trotz der beobachteten

PBR-Veränderungen überhaupt einen WTQ über dem Grenzwert, welcher ein KLS definiert. Deshalb besitzt die Studie keine ausreichende statistische Teststärke um einen Zusammenhang zwischen Veränderungen der PBR und der Entstehung eines Kapillarlecksyndroms nachzuweisen. Die geringe Rate eines Kapillarlecksyndroms in unserer Kohorte trotz der beobachteten Veränderungen der PBR bedeutet nicht zwangsläufig, dass der Verlust der Glykokalyx nicht kausal an der Entstehung eines KLS beteiligt sein kann.

Zum einen liefert uns die PBR keine Information über die gesamte Dicke der Glykokalyx, da der nicht-permeable Anteil nicht erfasst werden kann. Curry et al. haben gezeigt, dass die Glykokalyx nach Verminderung ihrer Dicke durch „shedding“ auch noch mit den inneren Schichten als Diffusionsbarriere funktionieren kann.<sup>43</sup> Es ist denkbar, dass erst ein gewisser Grenzwert der Glykokalyxdicke unterschritten werden muss, bevor es zur Ausbildung eines relevanten KLS kommt. Außerdem kann man über den reinen Wert „PBR“ noch keine Rückschlüsse über den Aufbau und die Bestandteile der Glykokalyx ziehen. Gao et al. haben in ihrer Studie durch gezielte enzymatische Abspaltung der einzelnen Glykosaminoglykane Heparan-Sulfat, Chondroitin-Sulfat und Hyaluronsäure den Abbau der Glykokalyx induziert und somit deren unterschiedlichen Beitrag zur Permeabilität untersucht.<sup>57</sup>

Es hat sich gezeigt, dass Heparan-Sulfat vor allem auf der luminalen Seite der Glykokalyx vorkommt und eine signifikante Rolle für die strukturelle Integrität spielt. Chondroitin-Sulfat und Hyaluronsäure in der unteren Schicht dagegen tragen signifikant zur Permeabilitätsbarriere bei. Bei inflammationsbedingtem „shedding“ wurde Heparan-Sulfat als Erstes abgespalten. Bei Verlust von Heparan-Sulfat verringerte sich sogar der Diffusionskoeffizient für gelöste Teile. Dies deutet darauf hin, dass die Abspaltung von Heparan-Sulfat einen Kollaps der Glykokalyx verursacht, was deren Dicke zwar verringert aber gleichzeitig in zunehmender Kompaktheit zur Erhaltung einer konstanten Filtrationsbarriere resultiert.<sup>57</sup>

Folglich ist eine Reduktion der Glykokalyxdicke nicht automatisch mit einer Zunahme der Permeabilität gleichzusetzen.

Um die Frage nach einem Zusammenhang von Veränderungen der PBR und der Entstehung eines KLS zu klären, sind zukünftig größer angelegte Multizenterstudien notwendig. Im nächsten Schritt könnten dann auch möglicherweise PBR-Grenzwerte festgelegt werden, die ein höheres Risiko für die Entwicklung eines KLS bedeuten.

Die Untersuchung mikrozirkulatorischer Veränderungen wird aktuell in klinischen Studien in zunehmendem Umfang erprobt. Die Reduktion der FVD beispielsweise ist ein früher Prädiktor für eine Sepsis bei Neugeborenen.<sup>165</sup> Auch bei Erwachsenen mit Sepsis wurde

gezeigt, dass die Heterogenität der Mikrozirkulation mit einer Organdysfunktion korreliert.<sup>154</sup> Ebenso konnten bei Patienten im schweren kardiogenen Schock mikrovaskuläre Blutflussveränderungen festgestellt werden, welche mit der Mortalität der Patienten korrelierten.<sup>45</sup> Dies ist insofern relevant, da mehrfach gezeigt werden konnte, dass mikrozirkulatorische Veränderungen unabhängig von den Parametern der Makrozirkulation auftreten.<sup>48, 91</sup> Dies stützt unsere Ergebnisse, bei denen wir keine signifikante Korrelation zwischen MFI oder PVD und den systemischen Hämodynamikparametern wie Blutdruck oder Herzfrequenz beobachten konnten. Umgekehrt bedeutet es, dass bislang übliche Parameter zum Kreislaufmonitoring wie die Messung des systemischen Blutdrucks und der Herzfrequenz unzureichend sind, um Aufschluss über den Zustand der Mikrozirkulation zu geben.

Aufgrund der fehlenden Korrelation von MFI und PVD mit dem postoperativen Outcome ist die Bedeutung der vorübergehenden Verminderung beider Parameter nach herzchirurgischen Interventionen fraglich. Die Outcome-Parameter Katecholaminbedarf und mechanische Beatmung unterliegen jedoch dem Einfluss unzähliger weiterer Faktoren und sind deswegen möglicherweise nicht optimal, um die Auswirkungen von Mikrozirkulationsstörungen auf den postoperativen Verlauf der Patienten zu untersuchen.

Wie bereits beschrieben, wurde der Zusammenhang zwischen postoperativen Komplikationen und dem klinischen Outcome nach herzchirurgischen Operationen bei Kindern von Agarwal et al. 2014 systematisch untersucht.<sup>4</sup>

Demnach können auch Komplikationen wie Arrhythmien oder Zwerchfellparalysen einen höheren Katecholaminbedarf oder längere Beatmungszeiten postoperativ verursachen, ohne dass dies zwangsläufig Auswirkungen auf die Mikrozirkulation haben müsste. Weiterhin darf man nicht vergessen, dass wir unsere Messungen an der Ohrmuschel durchgeführt haben. Zu bedenken bleibt, dass eventuell Mikrozirkulationsveränderungen in anderen Gefäßbetten und an zentraleren Organen andere Ausmaße haben könnten als an der Haut. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass mit SDF-Technologie auch die Mikrozirkulation innerer Organe untersucht werden kann. Zum Beispiel wurde bei Patienten, die sich einer Leberresektion unterziehen mussten, die Mikrozirkulation der Leber intraoperativ dargestellt.<sup>115</sup> Dies ermöglicht in Zukunft eventuell auch die Messungen an anderen Organen wie Herz oder Lunge, sodass der Effekt der extrakorporalen Zirkulation auf Haut und Herz oder Lunge verglichen werden kann.

### 4.3 Kritik und Limitierungen

Eine der Limitierungen dieser Studie ist die indirekte Messung der endothelialen Glykokalyx. Die hier angewandte Methode misst die PBR und ihre Veränderungen, welche als Indikatoren für die Glykokalyx interpretiert werden. Die direkte Darstellung der Glykokalyx ist bis dato nur invasiv möglich und deswegen tierexperimentellen Studien vorbehalten.<sup>152</sup> Allerdings wurde die in dieser Studie angewandte Technik für den Gebrauch in der klinischen Glykokalyxforschung entwickelt und hat sich bereits in mehreren Studien bewährt.<sup>44, 54, 97</sup> Darüber hinaus werden unsere Ergebnisse, welche auf einen Schaden der Glykokalyx nach Operation an der HLM hinweisen, durch Messung der zirkulierenden Glykokalyxbestandteile gestärkt.<sup>23</sup>

Auch die Heterogenität der untersuchten Herzfehler kann als eine Limitation betrachtet werden, da dadurch eventuell entstehende Einflüsse, wie etwa Hypoxielevel oder hämodynamisch relevante Shunts, auf unsere Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden können. Außerdem konnten wir aufgrund technischer Einschränkungen nur von etwa 60% der Patienten mit Herzfehlern PBR-Daten erheben. Auch wenn dies gleichermaßen für alle HLM-Untergruppen gilt, kann auch hier eine mögliche Beeinflussung der Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden.

Zudem bleibt weiterhin unklar, in welchem Ausmaß Unterschiede in Alter und Gewicht sowie Faktoren, welche mit den unterschiedlichen Operationsmethoden assoziiert sind, zur Beeinflussung unserer Ergebnisse beigetragen haben.

Unsere Untersuchungen können keinen kausalen Zusammenhang zwischen Glykokalyxdegradation und daraus folgenden Mikrozirkulationsstörungen beweisen, jedoch weisen unsere Ergebnisse stark darauf hin, dass die Glykokalyx und ihr Verlust eine entscheidende Rolle bei einer Reduktion der Kapillarperfusion im Rahmen einer inflammatorischen Reaktion spielen könnten.

Dies stimmt mit den Ergebnissen der Studie von Cabrales et al. überein, die nachgewiesen haben, dass ein Glykokalyxverlust eine verminderte mikrovaskuläre Perfusion nach sich zieht, ohne jedoch makrozirkulatorische Parameter zu beeinflussen.<sup>29</sup>

Auch die Tatsache, dass wir unsere Messungen an der Ohrmuschel durchgeführt haben, einem Ort, der weit entfernt von den zentralen und ischämieempfindlichen Organen wie Lunge, Herz und Gehirn ist, lässt weiterhin die Frage offen, inwieweit unsere Ergebnisse auf andere Organe übertragbar sind. Da jedoch andere Studien mit Untersuchungen der sublingualen und rektalen Mikrozirkulation bei Erwachsenen während kardiochirurgischer Eingriffe ähnliche

Ergebnisse gezeigt haben<sup>48, 93</sup>, scheint es naheliegend, dass unsere Erkenntnisse Ausdruck einer generalisierten mikrozirkulatorischen Dysfunktion sind.

#### 4.4 Ausblick

In unserer Arbeit haben wir die Veränderungen von endothelialer Glykokalyx und mikrozirkulatorischer Perfusion nach herzchirurgischen Eingriffen mit Einsatz der Herz-Lungen-Maschine bei Kindern mit angeborenen Herzfehlern untersucht.

Koning et al. haben in ihrer Studie an Erwachsenen nachgewiesen, dass es eine große Rolle für die Restorationsfähigkeit der Glykokalyx spielt, ob der Blutfluss an der HLM in pulsatiler oder nicht-pulsatiler Form eingesetzt wird.<sup>93</sup> Interessant wäre, ob dies auch für die Eingriffe an Kindern gilt und ob sich daraus Konsequenzen für die Prävention der durch Glykokalyxdegradation begünstigten Komplikationen ergeben könnten.

Im Fokus zukünftiger Studien sollte einerseits die Frage stehen, inwieweit Messungen an der Ohrmuschel auf den gesamten Organismus übertragbar sind. Andererseits sollte der Zusammenhang zwischen Veränderungen der Mikrozirkulation und dem postoperativen Outcome von Kindern nach Operationen unter Einsatz der HLM weiter analysiert werden.

Der Einsatz von SDF Imaging als Überwachungsinstrument kann aufgrund seiner leichten und risikofreien Handhabung eine schnelle Beurteilung der Veränderungen von Mikrozirkulation und Glykokalyx gewährleisten.<sup>93, 116</sup> Dies kann für die Evaluation von Therapiestrategien zur Protektion der Glykokalyx und zum Erhalt der Mikrozirkulation von Nutzen sein, was wiederum im besten Fall das klinische Outcome nach kardiochirurgischen Eingriffen verbessern könnte.

Zum Beispiel haben Versuche am Tiermodell gezeigt, dass die Verabreichung von Hydrokortison die Glykokalyx vor dem Ischämie-Reperfusionsschaden schützen kann.<sup>34</sup> Auch die Applikation von Soludexid konnte in einer klinischen Studie Glykokalyxdegradation und erhöhte vaskuläre Permeabilität begrenzen.<sup>21</sup>

Shiose und Kollegen haben in einer tierexperimentellen Studie Surfactant Polymer, ein Molekül mit struktureller Ähnlichkeit zur endothelialen Glykokalyx, zu Operationen mit Einsatz der HLM verabreicht. Dieses Molekül lagerte sich an die Fremdoberflächen der HLM an und beschichtete diese von innen. Dabei konnten unter Vollheparinisierung keine nachteiligen Auswirkungen auf die Hämodynamik und den Gasaustausch beobachtet werden.

Surfactant Polymer könnte also durch Imitation der Glykokalyx-Eigenschaften die negativen Effekte der HLM auf den Organismus reduzieren.<sup>141</sup>

Der Erfolg derartiger Therapieansätze bei kardiochirurgischen Eingriffen könnte auch mit der von uns verwendeten Methode bewertet werden.

Zuletzt bleibt noch hinzuzufügen, dass die von uns verwendete Technik eine hervorragende Möglichkeit zum besseren Verständnis der Glykokalyx und ihrer Aufgaben darstellt, jedoch weiterhin eine indirekte Messmethode bleibt. Deshalb bleibt die Hoffnung, dass die Zukunft uns vielleicht einen Schritt näher an eine direkte und nicht-invasive Darstellung der Glykokalyx in vivo bringen könnte.

## 5 Zusammenfassung

Der endothelialen Glykokalyx wird zunehmend eine große Bedeutung als Mediator der vaskulären Homöostase beigemessen. Bestehend aus mehreren Polysacchariden und assoziierten Plasma-Proteinen bedeckt sie das Lumen des gesamten Gefäßsystems und nimmt damit eine zentrale Rolle zwischen Blutstrom und Endothel ein. Bei Verlust der Glykokalyx etwa durch Inflammation, Hyperglykämie oder Ischämie wurde eine erhöhte Permeabilität, Leukozytenrekretierung, Koagulationsaktivierung und endotheliale Dysfunktion beobachtet. Einige dieser Phänomene wurden bei Kindern, die sich aufgrund eines angeborenen Herzfehlers einem herzchirurgischen Eingriff mit Einsatz von extrakorporaler Zirkulation unterziehen mussten, beschrieben. Hier kam es zu einer systemischen inflammatorischen Reaktion mit Aktivierung von Komplement- und Gerinnungssystem, Thrombozyten, Endothelzellen und Leukozyten. Dabei liegt es nahe, dass derartige Eingriffe und deren Folgen auch Einfluss auf die Mikrozirkulation nehmen können.

In der vorliegenden Studie wurden die Auswirkungen von kardiochirurgischen Operationen mit Einsatz der Herz-Lungen-Maschine (HLM) auf die Mikrozirkulation und die endotheliale Glykokalyx bei Kindern mittels nicht-invasiver Videomikroskopie in einer prospektiven Beobachtungsstudie untersucht. Wir verwendeten Sidestream Dark Field Imaging zur Darstellung der Glykokalyx und der Mikrozirkulation an der Ohrmuschel. Die Auswertung der Videosequenzen erfolgte bezüglich der Versuchsgruppen und Messzeitpunkte verblindet. Für die Analyse mikrozirkulatorischer Parameter verwendeten wir das halbautomatische Programm „Automated Vascular Analysis“ (AVA). Die Beurteilung der Glykokalyx erfolgte mittels Glykocheck Software, welche die sog. Perfused Boundary Region (PBR) berechnet als indirektes Maß für die Glykokalyxdicke. Neben den mikrozirkulatorischen Parametern wurden auch klinische und laborchemische Daten mithilfe eines Erhebungsblattes erfasst.

An der Studie nahmen 40 Kinder mit angeborenen Herzfehlern teil, die sich verschiedenen kardiochirurgischen Eingriffen unterziehen mussten (36 mit HLM, 4 ohne HLM). Die Kinder mit HLM wurden je nach Operationstechnik in drei Gruppen eingeteilt (HLM, HLM+AK, HLM+AK+DHCA). Die Messungen wurden an folgenden vier Zeitpunkten durchgeführt: T0 = präoperativ, T1 = postoperativ innerhalb 1h nach Aufnahme auf die Intensivstation, T2 = 24h postoperativ und T3 = 7d postoperativ. Als Kontrollgruppe untersuchten wir sechs der Kinder vor und nach präoperativen Herzkatheteruntersuchungen und zusätzlich neun Kinder, welche aufgrund einer Lippen-Kiefer-Gaumenspalte operiert wurden.

Zum Messzeitpunkt T0 bestand kein signifikanter Unterschied der PBR-Werte zwischen den experimentellen Gruppen. Zum Zeitpunkt T1 waren die PBR-Werte nach Operationen mit Einsatz der HLM signifikant größer im Vergleich zu den präoperativen Werten, entsprechend einer Verminderung der Glykokalyxdicke um ca. 0,2  $\mu\text{m}$  mit Rückkehr auf Ausgangswerte an T3. Dadurch konnte gezeigt werden, dass der Einsatz der HLM bei Kindern zu einem passageren Verlust der Glykokalyx führt. Dies bewirkt eine Beeinträchtigung ihrer vaskulären Funktionen, wozu die Regulation von Permeabilität, antiinflammatorische und antikoagulatorische Kaskaden und die Reaktion auf „shear stress“ zählen.

Ein Zusammenhang mit dem Ausmaß der Ischämie während des Eingriffes konnte auch aufgrund zu geringer Fallzahlen nicht aufgezeigt werden. Zur intra- und postoperativen Körpertemperatur konnte ebenfalls keine signifikante Verbindung hergestellt werden.

In den Kontrollgruppen konnten wir keine signifikanten Veränderungen der PBR und somit der Glykokalyx beobachten. Dies spricht für den fehlenden Einfluss des Eingriffes und der Anästhesie auf den Glykokalyxverlust.

Die Untersuchung der Mikrozirkulationsparameter zeigte, dass es zu einer akuten Verminderung der Perfusion nach Eingriffen mit HLM kommt. Der Microcirculatory Flow Index (MFI) und die perfundierte Gefäßdichte (PVD) waren zum Zeitpunkt T1 direkt postoperativ signifikant reduziert mit Normalisierung der Werte innerhalb von 24 Stunden.

Auch bei Kindern mit kardiochirurgischen Eingriffen ohne HLM konnten wir ähnliche Veränderungen beobachten, allerdings wurde hier aufgrund der geringen Gruppengröße keine Signifikanz erreicht. In der Herzkatheter-Kontrollgruppe blieben MFI und PVD unverändert. Bei näherer Betrachtung der einzelnen HLM-Untergruppen zeigte sich, dass hier ein Einfluss der Ischämie auf die Mikrozirkulation nachzuweisen ist. In der HLM+AK+DHCA-Gruppe mit Ganzkörperischämie waren MFI und PVD postoperativ zum Zeitpunkt T1 am stärksten verändert.

Zusammenfassend konnten wir in der vorliegenden Arbeit erstmalig auf der Ebene einzelner Gefäße zeigen, dass es nach kardiochirurgischen Operationen mit Einsatz der Herz-Lungen-Maschine zu einer Beeinträchtigung der endothelialen Glykokalyx und mikrovaskulären Perfusion bei Kindern mit angeborenen Herzfehlern kommt.

Die Überwachung der Mikrozirkulation könnte in Zukunft eine hilfreiche Methode zur Einschätzung möglicher Maßnahmen darstellen, um Komplikationen im Zusammenhang mit der HLM zu reduzieren.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Frühzeitige Veränderung der Mikrozirkulation und der endothelialen Glykokalyx bei Kindern mit Diabetes mellitus Typ I - Dissertation Ana Cecilia Cavalcanti Fernandes Hering.
2. Glycocheck User Guide.
3. Adamson RH, Lenz JF, Zhang X et al. Oncotic pressures opposing filtration across non-fenestrated rat microvessels. *J Physiol* 2004; 557(Pt 3): 889-907.
4. Agarwal HS, Wolfram KB, Saville BR et al. Postoperative complications and association with outcomes in pediatric cardiac surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2014; 148(2): 609-16.e1.
5. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ Res* 2007; 100(2): 174-90.
6. Aird WC. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood* 2003; 101(10): 3765-77.
7. Alba-Alejandre I, Hiedl S, Genzel-Boroviczeny O. Microcirculatory changes in term newborns with suspected infection: an observational prospective study. *Int J Pediatr* 2013; 2013: 768784.
8. Alejandre IA. Orthogonal Polarization spectral imaging (OPS) Measurements of Microcirculatory Changes in Term Newborns with Suspected Infection. 2010.
9. Algenstaedt P, Schaefer C, Biermann T et al. Microvascular alterations in diabetic mice correlate with level of hyperglycemia. *Diabetes* 2003; 52(2): 542-9.
10. Annecke T, Chappell D, Chen C et al. Sevoflurane preserves the endothelial glycocalyx against ischaemia-reperfusion injury. *Br J Anaesth* 2010; 104(4): 414-21.
11. Asimakopoulos G, Smith PL, Ratnatunga CP et al. Lung injury and acute respiratory distress syndrome after cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1999; 68(3): 1107-15.
12. Atasever B, Boer C, Speekenbrink R et al. Cardiac displacement during off-pump coronary artery bypass grafting surgery: effect on sublingual microcirculation and cerebral oxygenation. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2011; 13(6): 573-7.
13. Baehner T, Boehm O, Probst C et al. [Cardiopulmonary bypass in cardiac surgery]. *Anaesthesist* 2012; 61(10): 846-56.
14. Bahadori S, Immins T, Wainwright TW. A Novel Approach to Overcome Movement Artifact When Using a Laser Speckle Contrast Imaging System for Alternating Speeds of Blood Microcirculation. *J Vis Exp* 2017(126).
15. Bauer A, Bruegger D, Christ F. [Microcirculatory monitoring of sepsis]. *Anaesthesist* 2005; 54(12): 1163-75.
16. Becker BF, Chappell D, Bruegger D et al. Therapeutic strategies targeting the endothelial glycocalyx: acute deficits, but great potential. *Cardiovasc Res* 2010; 87(2): 300-10.
17. Blackstone EH, Sabik JF, 3rd. Changing the Discussion about On-Pump versus Off-Pump CABG. *N Engl J Med* 2017; 377(7): 692-693.
18. Blume ED, Nelson DP, Gauvreau K et al. Soluble adhesion molecules in infants and children undergoing cardiopulmonary bypass. *Circulation* 1997; 96(9 Suppl): li-352-7.
19. Boeken U, Litmathe J, Feindt P et al. Neurological complications after cardiac surgery: risk factors and correlation to the surgical procedure. *Thorac Cardiovasc Surg* 2005; 53(1): 33-6.
20. Boerma EC, Mathura KR, van der Voort PH et al. Quantifying bedside-derived imaging of microcirculatory abnormalities in septic patients: a prospective validation study. *Crit Care* 2005; 9(6): R601-6.
21. Broekhuizen LN, Lemkes BA, Mooij HL et al. Effect of sulodexide on endothelial glycocalyx and vascular permeability in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia* 2010; 53(12): 2646-55.

22. Brookes ZL, Brown NJ, Reilly CS. Intravenous anaesthesia and the rat microcirculation: the dorsal microcirculatory chamber. *Br J Anaesth* 2000; 85(6): 901-3.
23. Bruegger D, Brettner F, Rossberg I et al. Acute degradation of the endothelial glycocalyx in infants undergoing cardiac surgical procedures. *Ann Thorac Surg* 2015; 99(3): 926-31.
24. Bruegger D, Rehm M, Abicht J et al. Shedding of the endothelial glycocalyx during cardiac surgery: on-pump versus off-pump coronary artery bypass graft surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2009; 138(6): 1445-7.
25. Bruegger D, Rehm M, Jacob M et al. Exogenous nitric oxide requires an endothelial glycocalyx to prevent postischemic coronary vascular leak in guinea pig hearts. *Crit Care* 2008; 12(3): R73.
26. Bruegger D, Schwartz L, Chappell D et al. Release of atrial natriuretic peptide precedes shedding of the endothelial glycocalyx equally in patients undergoing on- and off-pump coronary artery bypass surgery. *Basic Res Cardiol* 2011; 106(6): 1111-21.
27. Buelli S, Perico L, Benigni A. Untangling the Knot in Diabetic Nephropathy: The Unanticipated Role of Glycocalyx in the Antiproteinuric Effect of Endothelin Receptor Antagonists. *Diabetes* 2016; 65(8): 2115-7.
28. Buwalda M, Ince C. Opening the microcirculation: can vasodilators be useful in sepsis? *Intensive Care Med* 2002; 28(9): 1208-17.
29. Cabrales P, Vazquez BY, Tsai AG et al. Microvascular and capillary perfusion following glycocalyx degradation. *J Appl Physiol* (1985) 2007; 102(6): 2251-9.
30. Chappell D, Bruegger D, Potzel J et al. Hypervolemia increases release of atrial natriuretic peptide and shedding of the endothelial glycocalyx. *Crit Care* 2014; 18(5): 538.
31. Chappell D, Heindl B, Jacob M et al. Sevoflurane reduces leukocyte and platelet adhesion after ischemia-reperfusion by protecting the endothelial glycocalyx. *Anesthesiology* 2011; 115(3): 483-91.
32. Chappell D, Hofmann-Kiefer K, Jacob M et al. TNF-alpha induced shedding of the endothelial glycocalyx is prevented by hydrocortisone and antithrombin. *Basic Res Cardiol* 2009; 104(1): 78-89.
33. Chappell D, Jacob M, Becker BF et al. [Expedition glycocalyx. A newly discovered "Great Barrier Reef"]. *Anaesthetist* 2008; 57(10): 959-69.
34. Chappell D, Jacob M, Hofmann-Kiefer K et al. Hydrocortisone preserves the vascular barrier by protecting the endothelial glycocalyx. *Anesthesiology* 2007; 107(5): 776-84.
35. Chappell D, Jacob M, Hofmann-Kiefer K et al. Antithrombin reduces shedding of the endothelial glycocalyx following ischaemia/reperfusion. *Cardiovasc Res* 2009; 83(2): 388-96.
36. Chappell D, Jacob M, Rehm M et al. Heparinase selectively sheds heparan sulphate from the endothelial glycocalyx. *Biol Chem* 2008; 389(1): 79-82.
37. Chappell D, Westphal M, Jacob M. The impact of the glycocalyx on microcirculatory oxygen distribution in critical illness. *Curr Opin Anaesthesiol* 2009; 22(2): 155-62.
38. Chiarandini P, Pompei L, Costa MG et al. Effects of catecholamines on microcirculation during general inhalation anesthesia. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2013; 27(6): 1239-45.
39. Cho YI, Mooney MP, Cho DJ. Hemorheological disorders in diabetes mellitus. *J Diabetes Sci Technol* 2008; 2(6): 1130-8.
40. Christ F, Bauer A, Brugger D. Different optical methods for clinical monitoring of the microcirculation. *Eur Surg Res* 2002; 34(1-2): 145-51.
41. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 2002; 420(6917): 885-91.
42. Collins DM, McCullough WT, Ellsworth ML. Conducted vascular responses: communication across the capillary bed. *Microvasc Res* 1998; 56(1): 43-53.
43. Curry FE, Adamson RH. Endothelial glycocalyx: permeability barrier and mechanosensor. *Ann Biomed Eng* 2012; 40(4): 828-39.

44. Dane MJ, Khairoun M, Lee DH et al. Association of kidney function with changes in the endothelial surface layer. *Clin J Am Soc Nephrol* 2014; 9(4): 698-704.
45. De Backer D, Creteur J, Dubois MJ et al. Microvascular alterations in patients with acute severe heart failure and cardiogenic shock. *Am Heart J* 2004; 147(1): 91-9.
46. De Backer D, Creteur J, Preiser JC et al. Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166(1): 98-104.
47. De Backer D, Donadello K, Sakr Y et al. Microcirculatory alterations in patients with severe sepsis: impact of time of assessment and relationship with outcome. *Crit Care Med* 2013; 41(3): 791-9.
48. De Backer D, Dubois MJ, Schmartz D et al. Microcirculatory alterations in cardiac surgery: effects of cardiopulmonary bypass and anesthesia. *Ann Thorac Surg* 2009; 88(5): 1396-403.
49. De Backer D, Hollenberg S, Boerma C et al. How to evaluate the microcirculation: report of a round table conference. *Crit Care* 2007; 11(5): R101.
50. De Backer D, Ospina-Tascon G, Salgado D et al. Monitoring the microcirculation in the critically ill patient: current methods and future approaches. *Intensive Care Med* 2010; 36(11): 1813-25.
51. De Blasi RA, Palmisani S, Boezi M et al. Effects of remifentanil-based general anaesthesia with propofol or sevoflurane on muscle microcirculation as assessed by near-infrared spectroscopy. *Br J Anaesth* 2008; 101(2): 171-7.
52. de Moraes R, Tibirica E. Early Functional and Structural Microvascular Changes in Hypertension Related to Aging. *Curr Hypertens Rev* 2017; 13(1): 24-32.
53. Desjardins C, Duling BR. Heparinase treatment suggests a role for the endothelial cell glycocalyx in regulation of capillary hematocrit. *Am J Physiol* 1990; 258(3 Pt 2): H647-54.
54. Donati A, Damiani E, Domizi R et al. Alteration of the sublingual microvascular glycocalyx in critically ill patients. *Microvasc Res* 2013; 90: 86-9.
55. Eskens BJ, Mooij HL, Cleutjens JP et al. Rapid insulin-mediated increase in microvascular glycocalyx accessibility in skeletal muscle may contribute to insulin-mediated glucose disposal in rats. *PLoS One* 2013; 8(1): e55399.
56. Fagrell B, Intaglietta M. Microcirculation: its significance in clinical and molecular medicine. *J Intern Med* 1997; 241(5): 349-62.
57. Gao L, Lipowsky HH. Composition of the endothelial glycocalyx and its relation to its thickness and diffusion of small solutes. *Microvasc Res* 2010; 80(3): 394-401.
58. Garsen M, Lenoir O, Rops AL et al. Endothelin-1 Induces Proteinuria by Heparanase-Mediated Disruption of the Glomerular Glycocalyx. *J Am Soc Nephrol* 2016; 27(12): 3545-3551.
59. Genzel-Boroviczeny O, Christ F, Glas V. Blood transfusion increases functional capillary density in the skin of anemic preterm infants. *Pediatr Res* 2004; 56(5): 751-5.
60. Genzel-Boroviczeny O, Strotgen J, Harris AG et al. Orthogonal polarization spectral imaging (OPS): a novel method to measure the microcirculation in term and preterm infants transcutaneously. *Pediatr Res* 2002; 51(3): 386-91.
61. Gessler P, Schmitt B, Pretre R et al. Inflammatory response and neurodevelopmental outcome after open-heart surgery in children. *Pediatr Cardiol* 2009; 30(3): 301-5.
62. Gibbon JH, Jr. Application of a mechanical heart and lung apparatus to cardiac surgery. *Minn Med* 1954; 37(3): 171-85; passim.
63. Goedhart PT, Khalilzada M, Bezemer R et al. Sidestream Dark Field (SDF) imaging: a novel stroboscopic LED ring-based imaging modality for clinical assessment of the microcirculation. *Opt Express* 2007; 15(23): 15101-14.
64. Goldman D, Bateman RM, Ellis CG. Effect of decreased O<sub>2</sub> supply on skeletal muscle oxygenation and O<sub>2</sub> consumption during sepsis: role of heterogeneous capillary spacing and blood flow. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290(6): H2277-85.

65. Gonzalez R, Lopez J, Urbano J et al. Evaluation of sublingual microcirculation in a paediatric intensive care unit: prospective observational study about its feasibility and utility. *BMC Pediatr* 2017; 17(1): 75.
66. Gouverneur M, Spaan JA, Pannekoek H et al. Fluid shear stress stimulates incorporation of hyaluronan into endothelial cell glycocalyx. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290(1): H458-2.
67. Granger DN. Ischemia-reperfusion: mechanisms of microvascular dysfunction and the influence of risk factors for cardiovascular disease. *Microcirculation* 1999; 6(3): 167-78.
68. Groner W, Winkelman JW, Harris AG et al. Orthogonal polarization spectral imaging: a new method for study of the microcirculation. *Nat Med* 1999; 5(10): 1209-12.
69. Hangai-Hoger N, Tsai AG, Cabrales P et al. Microvascular and systemic effects following top load administration of saturated carbon monoxide-saline solution. *Crit Care Med* 2007; 35(4): 1123-32.
70. Harris AG, Sinitsina I, Messmer K. Validation of OPS imaging for microvascular measurements during isovolumic hemodilution and low hematocrits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282(4): H1502-9.
71. Haydin S, Onan B, Onan IS et al. Cerebral perfusion during cardiopulmonary bypass in children: correlations between near-infrared spectroscopy, temperature, lactate, pump flow, and blood pressure. *Artif Organs* 2013; 37(1): 87-91.
72. Haywood-Watson RJ, Holcomb JB, Gonzalez EA et al. Modulation of syndecan-1 shedding after hemorrhagic shock and resuscitation. *PLoS One* 2011; 6(8): e23530.
73. Henry CB, Duling BR. TNF-alpha increases entry of macromolecules into luminal endothelial cell glycocalyx. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279(6): H2815-23.
74. Hiedl S, Schwepcke A, Weber F et al. Microcirculation in preterm infants: profound effects of patent ductus arteriosus. *J Pediatr* 2010; 156(2): 191-6.
75. Hoffmann JN, Vollmar B, Laschke MW et al. Microcirculatory alterations in ischemia-reperfusion injury and sepsis: effects of activated protein C and thrombin inhibition. *Crit Care* 2005; 9 Suppl 4: S33-7.
76. Ignjatovic V, Than J, Summerhayes R et al. The quantitative and qualitative responses of platelets in pediatric patients undergoing cardiopulmonary bypass surgery. *Pediatr Cardiol* 2012; 33(1): 55-9.
77. Ince C. Hemodynamic coherence and the rationale for monitoring the microcirculation. *Crit Care* 2015; 19 Suppl 3: S8.
78. Ince C. The microcirculation is the motor of sepsis. *Crit Care* 2005; 9 Suppl 4: S13-9.
79. Jacob M, Bruegger D, Rehm M et al. The endothelial glycocalyx affords compatibility of Starling's principle and high cardiac interstitial albumin levels. *Cardiovasc Res* 2007; 73(3): 575-86.
80. Jacob M, Bruegger D, Rehm M et al. Contrasting effects of colloid and crystalloid resuscitation fluids on cardiac vascular permeability. *Anesthesiology* 2006; 104(6): 1223-31.
81. Jacob M, Paul O, Mehringer L et al. Albumin augmentation improves condition of guinea pig hearts after 4 hr of cold ischemia. *Transplantation* 2009; 87(7): 956-65.
82. Jacob M, Rehm M, Loetsch M et al. The endothelial glycocalyx prefers albumin for evoking shear stress-induced, nitric oxide-mediated coronary dilatation. *J Vasc Res* 2007; 44(6): 435-43.
83. Jagger JE, Bateman RM, Ellsworth ML et al. Role of erythrocyte in regulating local O<sub>2</sub> delivery mediated by hemoglobin oxygenation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280(6): H2833-9.
84. Joly HR, Weil MH. Temperature of the great toe as an indication of the severity of shock. *Circulation* 1969; 39(1): 131-8.
85. Kabani M, Rotter R, Busche M et al. Impact of diabetes and peripheral arterial occlusive disease on the functional microcirculation at the plantar foot. *Plast Reconstr Surg Glob Open* 2013; 1(7): e48.

86. Kamler M, Goedeke J, Pizanis N et al. In vivo effects of hypothermia on the microcirculation during extracorporeal circulation. *Eur J Cardiothorac Surg* 2005; 28(2): 259-65.
87. Kats S, Schonberger JP, Brands R et al. Endotoxin release in cardiac surgery with cardiopulmonary bypass: pathophysiology and possible therapeutic strategies. An update. *Eur J Cardiothorac Surg* 2011; 39(4): 451-8.
88. Kiessling AH, Reyher C, Philipp M et al. Real-time measurement of rectal mucosal microcirculation during cardiopulmonary bypass. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2015; 29(1): 89-94.
89. Klitzman B, Duling BR. Microvascular hematocrit and red cell flow in resting and contracting striated muscle. *Am J Physiol* 1979; 237(4): H481-90.
90. Koning NJ, Simon LE, Asfar P et al. Systemic microvascular shunting through hyperdynamic capillaries after acute physiological disturbances following cardiopulmonary bypass. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2014; 307(7): H967-75.
91. Koning NJ, Vonk AB, Meesters MI et al. Microcirculatory perfusion is preserved during off-pump but not on-pump cardiac surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2014; 28(2): 336-41.
92. Koning NJ, Vonk AB, van Barneveld LJ et al. Pulsatile flow during cardiopulmonary bypass preserves postoperative microcirculatory perfusion irrespective of systemic hemodynamics. *J Appl Physiol* (1985) 2012; 112(10): 1727-34.
93. Koning NJ, Vonk AB, Vink H et al. Side-by-Side Alterations in Glycocalyx Thickness and Perfused Microvascular Density During Acute Microcirculatory Alterations in Cardiac Surgery. *Microcirculation* 2016; 23(1): 69-74.
94. Kozar RA, Peng Z, Zhang R et al. Plasma restoration of endothelial glycocalyx in a rodent model of hemorrhagic shock. *Anesth Analg* 2011; 112(6): 1289-95.
95. Kubicki R, Grohmann J, Siepe M et al. Early prediction of capillary leak syndrome in infants after cardiopulmonary bypass. *Eur J Cardiothorac Surg* 2013; 44(2): 275-81.
96. Kurose I, Argenbright LW, Wolf R et al. Ischemia/reperfusion-induced microvascular dysfunction: role of oxidants and lipid mediators. *Am J Physiol* 1997; 272(6 Pt 2): H2976-82.
97. Lee DH, Dane MJ, van den Berg BM et al. Deeper penetration of erythrocytes into the endothelial glycocalyx is associated with impaired microvascular perfusion. *PLoS One* 2014; 9(5): e96477.
98. Lehr HA, Bittinger F, Kirkpatrick CJ. Microcirculatory dysfunction in sepsis: a pathogenetic basis for therapy? *J Pathol* 2000; 190(3): 373-86.
99. Levy JH, Tanaka KA. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 2003; 75(2): S715-20.
100. Luft JH. Fine structures of capillary and endocapillary layer as revealed by ruthenium red. *Fed Proc* 1966; 25(6): 1773-83.
101. Martens RJ, Vink H, van Oostenbrugge RJ et al. Sublingual microvascular glycocalyx dimensions in lacunar stroke patients. *Cerebrovasc Dis* 2013; 35(5): 451-4.
102. Mathew JP, Grocott HP, Phillips-Bute B et al. Lower endotoxin immunity predicts increased cognitive dysfunction in elderly patients after cardiac surgery. *Stroke* 2003; 34(2): 508-13.
103. McKinlay KH, Schinderle DB, Swaminathan M et al. Predictors of inotrope use during separation from cardiopulmonary bypass. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2004; 18(4): 404-8.
104. Megens RT, Reitsma S, Schiffers PH et al. Two-photon microscopy of vital murine elastic and muscular arteries. Combined structural and functional imaging with subcellular resolution. *J Vasc Res* 2007; 44(2): 87-98.
105. Meuwese MC, Mooij HL, Nieuwdorp M et al. Partial recovery of the endothelial glycocalyx upon rosuvastatin therapy in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. *J Lipid Res* 2009; 50(1): 148-53.
106. Mulivor AW, Lipowsky HH. Inflammation- and ischemia-induced shedding of venular glycocalyx. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 286(5): H1672-80.

107. Muris DM, Houben AJ, Kroon AA et al. Age, waist circumference, and blood pressure are associated with skin microvascular flow motion: The Maastricht Study. *J Hypertens* 2014.
108. Murphy GJ, Angelini GD. Side effects of cardiopulmonary bypass: what is the reality? *J Card Surg* 2004; 19(6): 481-8.
109. Nakano T, Tominaga R, Nagano I et al. Pulsatile flow enhances endothelium-derived nitric oxide release in the peripheral vasculature. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 278(4): H1098-104.
110. Neuhof C, Walter O, Dapper F et al. Bradykinin and histamine generation with generalized enhancement of microvascular permeability in neonates, infants, and children undergoing cardiopulmonary bypass surgery. *Pediatr Crit Care Med* 2003; 4(3): 299-304.
111. Newman MF, Kirchner JL, Phillips-Bute B et al. Longitudinal assessment of neurocognitive function after coronary-artery bypass surgery. *N Engl J Med* 2001; 344(6): 395-402.
112. Nieuwdorp M, Meuwese MC, Mooij HL et al. Tumor necrosis factor-alpha inhibition protects against endotoxin-induced endothelial glycocalyx perturbation. *Atherosclerosis* 2009; 202(1): 296-303.
113. Nieuwdorp M, Mooij HL, Kroon J et al. Endothelial glycocalyx damage coincides with microalbuminuria in type 1 diabetes. *Diabetes* 2006; 55(4): 1127-32.
114. Nieuwdorp M, van Haeften TW, Gouverneur MC et al. Loss of endothelial glycocalyx during acute hyperglycemia coincides with endothelial dysfunction and coagulation activation in vivo. *Diabetes* 2006; 55(2): 480-6.
115. Nilsson J, Eriksson S, Blind PJ et al. Microcirculation changes during liver resection--a clinical study. *Microvasc Res* 2014; 94: 47-51.
116. Nussbaum C, Cavalcanti Fernandes Heringa A, Mormanova Z et al. Early microvascular changes with loss of the glycocalyx in children with type 1 diabetes. *J Pediatr* 2014; 164(3): 584-9.e1.
117. O'Neil MP, Fleming JC, Badhwar A et al. Pulsatile versus nonpulsatile flow during cardiopulmonary bypass: microcirculatory and systemic effects. *Ann Thorac Surg* 2012; 94(6): 2046-53.
118. Paneni F, Beckman JA, Creager MA et al. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I. *Eur Heart J* 2013; 34(31): 2436-43.
119. Patel KD, Cuvelier SL, Wiehler S. Selectins: critical mediators of leukocyte recruitment. *Semin Immunol* 2002; 14(2): 73-81.
120. Peng Z, Pati S, Potter D et al. Fresh frozen plasma lessens pulmonary endothelial inflammation and hyperpermeability after hemorrhagic shock and is associated with loss of syndecan 1. *Shock* 2013; 40(3): 195-202.
121. Platts SH, Linden J, Duling BR. Rapid modification of the glycocalyx caused by ischemia-reperfusion is inhibited by adenosine A2A receptor activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 284(6): H2360-7.
122. Potter DR, Jiang J, Damiano ER. The recovery time course of the endothelial cell glycocalyx in vivo and its implications in vitro. *Circ Res* 2009; 104(11): 1318-25.
123. Pries AR, Secomb TW, Gaehtgens P. The endothelial surface layer. *Pflugers Arch* 2000; 440(5): 653-66.
124. Prondzinsky R, Knupfer A, Loppnow H et al. Surgical trauma affects the proinflammatory status after cardiac surgery to a higher degree than cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005; 129(4): 760-6.
125. Raja SG, Berg GA. Impact of off-pump coronary artery bypass surgery on systemic inflammation: current best available evidence. *J Card Surg* 2007; 22(5): 445-55.
126. Rehm M, Bruegger D, Christ F et al. Shedding of the endothelial glycocalyx in patients undergoing major vascular surgery with global and regional ischemia. *Circulation* 2007; 116(17): 1896-906.

127. Rehm M, Zahler S, Lotsch M et al. Endothelial glycocalyx as an additional barrier determining extravasation of 6% hydroxyethyl starch or 5% albumin solutions in the coronary vascular bed. *Anesthesiology* 2004; 100(5): 1211-23.
128. Reitsma S, Slaaf DW, Vink H et al. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflugers Arch* 2007; 454(3): 345-59.
129. Rinder CS, Rinder HM, Smith MJ et al. Selective blockade of membrane attack complex formation during simulated extracorporeal circulation inhibits platelet but not leukocyte activation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999; 118(3): 460-6.
130. Rivers E, Nguyen B, Havstad S et al. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 2001; 345(19): 1368-77.
131. Rosner MH, Portilla D, Okusa MD. Cardiac surgery as a cause of acute kidney injury: pathogenesis and potential therapies. *J Intensive Care Med* 2008; 23(1): 3-18.
132. Rubanyi GM, Romero JC, Vanhoutte PM. Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 1986; 250(6 Pt 2): H1145-9.
133. Sallissalmi M, Tenhunen J, Kultti A et al. Plasma hyaluronan and hemorheology in patients with septic shock: a clinical and experimental study. *Clin Hemorheol Microcirc* 2014; 56(2): 133-44.
134. Sarelius IH, Cohen KD, Murrant CL. Role for capillaries in coupling blood flow with metabolism. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2000; 27(10): 826-9.
135. Schiessler C, Schaudig S, Harris AG et al. [Orthogonal polarization spectral imaging--a new clinical method for monitoring of microcirculation]. *Anaesthesist* 2002; 51(7): 576-9.
136. Schirmer U. [Hypothermia in cardiac surgery]. *Anaesthesist* 2007; 56(9): 930-5.
137. Schumacher J, Porksen M, Klotz KF. Effects of isoflurane, enflurane, and halothane on skeletal muscle microcirculation in the endotoxemic rat. *J Crit Care* 2001; 16(1): 1-7.
138. Seal JB, Gewertz BL. Vascular dysfunction in ischemia-reperfusion injury. *Ann Vasc Surg* 2005; 19(4): 572-84.
139. Segal SS. Regulation of blood flow in the microcirculation. *Microcirculation* 2005; 12(1): 33-45.
140. Seghaye MC, Grabitz RG, Duchateau J et al. Inflammatory reaction and capillary leak syndrome related to cardiopulmonary bypass in neonates undergoing cardiac operations. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996; 112(3): 687-97.
141. Shiose A, Takaseya T, Kim HI et al. In vivo evaluation of a new surfactant polymer coating mimicking the glycocalyx of endothelial cells. *Asaio j* 2011; 57(5): 395-8.
142. Singh RS, Thingnam SKS, Mishra AK et al. Renal function after off-pump versus on-pump coronary artery bypass grafting. *Asian Cardiovasc Thorac Ann* 2017: 218492317730256.
143. Snoeijs MG, Vink H, Voesten N et al. Acute ischemic injury to the renal microvasculature in human kidney transplantation. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010; 299(5): F1134-40.
144. Sonntag J, Grunert U, Stover B et al. [The clinical relevance of subcutaneous-thoracic ratio in preterm newborns as a possibility for quantification of capillary leak syndrome]. *Z Geburtshilfe Neonatol* 2003; 207(6): 208-12.
145. Starling EH. On the Absorption of Fluids from the Connective Tissue Spaces. *J Physiol* 1896; 19(4): 312-26.
146. Stiller B, Sonntag J, Dahnert I et al. Capillary leak syndrome in children who undergo cardiopulmonary bypass: clinical outcome in comparison with complement activation and C1 inhibitor. *Intensive Care Med* 2001; 27(1): 193-200.
147. Svennevig K, Hoel T, Thiara A et al. Syndecan-1 plasma levels during coronary artery bypass surgery with and without cardiopulmonary bypass. *Perfusion* 2008; 23(3): 165-71.
148. Tafner P, Chen FK, Rabello RF et al. Recent advances in bedside microcirculation assessment in critically ill patients. *Rev Bras Ter Intensiva* 2017; 29(2): 238-247.

149. Tanaka S, Harrois A, Nicolai C et al. Qualitative real-time analysis by nurses of sublingual microcirculation in intensive care unit: the MICRONURSE study. *Crit Care* 2015; 19: 388.
150. Tarbell JM, Pahakis MY. Mechanotransduction and the glycocalyx. *J Intern Med* 2006; 259(4): 339-50.
151. Taylor AE, Moore TM. Capillary fluid exchange. *Am J Physiol* 1999; 277(6 Pt 2): S203-10.
152. Torres Filho I, Torres LN, Sondeen JL et al. In vivo evaluation of venular glycocalyx during hemorrhagic shock in rats using intravital microscopy. *Microvasc Res* 2013; 85: 128-33.
153. Tripodaki ES, Tasoulis A, Vasileiadis I et al. Microcirculatory alterations after cardiopulmonary bypass as assessed with near infrared spectroscopy: a pilot study. *Can J Anaesth* 2012; 59(6): 620-1.
154. Trzeciak S, Dellinger RP, Parrillo JE et al. Early microcirculatory perfusion derangements in patients with severe sepsis and septic shock: relationship to hemodynamics, oxygen transport, and survival. *Ann Emerg Med* 2007; 49(1): 88-98, 98.e1-2.
155. Vallet B. Endothelial cell dysfunction and abnormal tissue perfusion. *Crit Care Med* 2002; 30(5 Suppl): S229-34.
156. van den Berg BM, Vink H, Spaan JA. The endothelial glycocalyx protects against myocardial edema. *Circ Res* 2003; 92(6): 592-4.
157. van Elteren HA, Ince C, Tibboel D et al. Cutaneous microcirculation in preterm neonates: comparison between sidestream dark field (SDF) and incident dark field (IDF) imaging. *J Clin Monit Comput* 2015; 29(5): 543-8.
158. van Haaren PM, VanBavel E, Vink H et al. Charge modification of the endothelial surface layer modulates the permeability barrier of isolated rat mesenteric small arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289(6): H2503-7.
159. van Haaren PM, VanBavel E, Vink H et al. Localization of the permeability barrier to solutes in isolated arteries by confocal microscopy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285(6): H2848-56.
160. Verdant CL, De Backer D, Bruhn A et al. Evaluation of sublingual and gut mucosal microcirculation in sepsis: a quantitative analysis. *Crit Care Med* 2009; 37(11): 2875-81.
161. Vink H, Constantinescu AA, Spaan JA. Oxidized lipoproteins degrade the endothelial surface layer : implications for platelet-endothelial cell adhesion. *Circulation* 2000; 101(13): 1500-2.
162. Vink H, Duling BR. Identification of distinct luminal domains for macromolecules, erythrocytes, and leukocytes within mammalian capillaries. *Circ Res* 1996; 79(3): 581-9.
163. Vlahu CA, Lemkes BA, Struijk DG et al. Damage of the endothelial glycocalyx in dialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 2012; 23(11): 1900-8.
164. Warren OJ, Smith AJ, Alexiou C et al. The inflammatory response to cardiopulmonary bypass: part 1--mechanisms of pathogenesis. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2009; 23(2): 223-31.
165. Weidlich K, Kroth J, Nussbaum C et al. Changes in microcirculation as early markers for infection in preterm infants--an observational prospective study. *Pediatr Res* 2009; 66(4): 461-5.
166. Yini S, Heng Z, Xin A et al. Effect of unfractionated heparin on endothelial glycocalyx in a septic shock model. *Acta Anaesthesiol Scand* 2015; 59(2): 160-9.

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

ACT	activated clotting time
ADVC-	Analog zu Digital Videoconverter
ALI	acute lung injury
ANOVA	analysis of variance
ANP	Atriales Natriuretisches Peptid
ARDS	acute respiratory distress syndrome
ASD	Atrium(Vorhof)septumdefekt
ATP	Adenosintriphosphat
AVA	automated vascular analysis
AVI	audio video interleave
CK	Creatinkinase
CoA	coarctation of the aorta
CPB	cardiopulmonary bypass
DORV	double outlet right ventricle
EEC	erythrocyte-endothelial cell
EK	Erythrozytenkonzentrat
EKG	Elektrokardiogramm
EKZ	Extrakorporale Zirkulation
ESL	endothelial surface layer
FFP	fresh frozen plasma
FiO <sub>2</sub>	fraction of inspired oxygen (inspiratorischer Sauerstoffanteil)
HLHS	hypoplastisches Linksherzsyndrom
HLM	Herz-Lungen-Maschine
HRHS	hypoplastisches Rechtsherzsyndrom
i.v.	intravenös
IAA	interrupted aortic arch
IE	Internationale Einheit
KG	Körpergewicht
KLS	Kapillarlecksyndrom
KÖF	Körperoberfläche
LDF	Laser-Doppler-Fluxmetrie
LDL	low density lipoprotein
LKG	Lippen-Kiefer-Gaumenspalte

LPS	Lipopolysaccharid
MAC	Membranangriffskomplex
MFI	microvascular flow index
NIRS	Nah-Infrarot Spektroskopie
NO	Stickstoffmonoxid
NSAID	non-steroidal anti-inflammatory drug
OP	Operation
OPS	orthogonal spectral polarization
PaCO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxidpartialdruck im arteriellen Blut
PAL	Phase-Alternating-Line
PaO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck im arteriellen Blut
PBR	perfused boundary region
pCO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxidpartialdruck
PEEP	positive endexpiratory pressure
PIP	positive inspiratory pressure
PPSB	Prothrombinkonzentrat
PVD	perfused vessel density
RBC	red blood cell
SDF	sidestream dark field
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
TA	Trikuspidalatresie
TAPVR	total anomalous pulmonary venous return (Totale Lungenvenenfehlöffnung)
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TGA	Transposition der großen Arterien
TK	Thrombozytenkonzentrat
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
TOF	tetralogy of Fallot (Fallot'sche Tetralogie)
TVD	total vessel density
VD	vessel density
VKP	Venöse Kompressionsplethysmographie
VSD	Ventrikelseptumdefekt
WTQ	Weichteil-Thorax-Quotient
ZVK	Zentraler Venenkatheter

## 7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Anatomie der Mikrozirkulation <sup>148</sup> .....	8
Abbildung 2: OPS Imaging: Polarisiertes Licht trifft auf das Gewebe. Das von den oberflächlichen Schichten reflektierte Licht ist immer noch polarisiert und kann den orthogonalen Filter nicht passieren. Das Licht, welches in tiefere Schichten vorgedrungen ist, wurde mehrfach gestreut und hat hierdurch die Polarisation verloren, sodass es den orthogonalen Filter passieren kann. Dieses Licht wird vom Hämoglobin der Erythrozyten absorbiert, sodass diese auf dem Bildschirm dunkel erscheinen. <sup>50</sup> .....	13
Abbildung 3: Die endotheliale Glykokalyx: Schemazeichnung der Hauptbestandteile (ec-SOD: extrazelluläre Superoxid-Dismutase, AT III: Antithrombin III) <sup>128</sup> .....	15
Abbildung 4 A und B: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der endothelialen Glykokalyx am Meerschweinchenherzen. Ausschnitt eines Koronargefäßes nach Anfärbung auf Lanthanbasis. <sup>33</sup> .....	19
Abbildung 5: Aufbau der Herz-Lungen-Maschine: Schemazeichnung <sup>13</sup> .....	22
Abbildung 6: Videomikroskop mit LED-Beleuchtung der Firma MicroVision Medical <sup>1</sup> .....	36
Abbildung 7: SDF Imaging: Grünes Licht wird von den lateral gelegenen Leuchtdioden des Geräts emittiert. Das von den oberflächlichen Gewebeschichten reflektierte Licht kann das Zentrum des Geräts, wo sich die Optik befindet, nicht erreichen. Das von den tiefen Gewebeschichten reflektierte Licht aber erreicht das Zentrum. Dieses Licht wird vom Hämoglobin der Erythrozyten absorbiert, sodass sich diese auf dem Bildschirm dunkel abbilden, während die Umgebung hell erscheint. <sup>50</sup> .....	37
Abbildung 8: Mikrozirkulationsdarstellung mittels SDF Imaging: Das emittierte Licht wird durch das Hämoglobin der Erythrozyten absorbiert. Deswegen erscheinen perfundierte Gefäße dunkel. <sup>65,78</sup> .....	38
Abbildung 9: Direkte Digitalisierung der Mikrozirkulationsaufnahmen mittels der MicroScan Imaging Unit <sup>1</sup> .....	39
Abbildung 10: PBR: Schemazeichnung über das Konzept der Perfused Boundary Region repräsentiert durch die laterale Erythrozytenbewegung als indirektes Maß für die Glykokalyxdicke, Perfused Diameter entspricht der maximalen Breite der Erythrozytensäule <sup>97</sup> .....	44
Abbildung 11: Benutzeroberfläche der Glycocheck Software während eines Messvorgangs: Rot umkreist sind links der vom Programm festgelegte Bereich für den Fokus des Bildes und rechts der mögliche Messzeitraum von fünf Minuten. <sup>2</sup> .....	46

Abbildung 12: Glykocheck Software: Die Software platziert automatisch die Linien (grün), die die zu beurteilenden Gefäßabschnitte (schwarzer Kontrast) in 10 µm Segmente unterteilen. <sup>97</sup> .....	47
Abbildung 13: PBR in den verschiedenen experimentellen Gruppen zum Zeitpunkt T0, Darstellung als Boxplot mit Minimum und Maximum.....	53
Abbildung 14: Betrachtung der PBR bei allen Eingriffen mit Einsatz der HLM, *p < 0,05 versus T0, Darstellung als Boxplot mit Minimum und Maximum. ....	54
Abbildung 15: PBR prä- und postoperativ in den Kontrollgruppen, Darstellung als Boxplot mit Minimum und Maximum. ....	55
Abbildung 16: PBR-Vergleich der Untergruppen HLM und HLM+AK postoperativ, *p < 0,05 versus T0, Darstellung als Mittelwert und Standardabweichung.....	56
Abbildung 17: Zeitlicher Verlauf der TVD (A) und Vessel Diameter Distribution (B) bei allen Eingriffen mit Einsatz der HLM, hier n = 34, da Messwerte für T2 und T3 von 2 Kindern fehlen, Darstellung als Boxplot mit Minimum und Maximum (A) und als Mittelwerte (B)...	57
Abbildung 18: Zeitlicher Verlauf des MFI (A)- und der PVD (B) bei allen Eingriffen mit Einsatz der HLM, *p < 0,05, hier n = 34, da Messwerte für T2 und T3 von 2 Kindern fehlen, Darstellung als Boxplot mit Minimum und Maximum.....	58
Abbildung 19: Betrachtung des MFI (A) und der PVD (B) der Kontrollgruppen prä- und postoperativ, * p < 0,05, Darstellung als Boxplot mit Minimum und Maximum.....	59
Abbildung 20: Vergleich der mikrozirkulatorischen Parameter MFI (A) und PVD (B) in den HLM-Untergruppen prä- und postoperativ, *p < 0,05 versus T0, Darstellung als Mittelwert und Standardabweichung. ....	61
Abbildung 21: Zusammenhang zwischen Dauer der HLM und postoperativem Katecholaminbedarf zum Zeitpunkt T1, *p < 0,01, Darstellung als Boxplot mit Minimum und Maximum. ....	62
Abbildung 22: Zusammenhang zwischen postoperativer Beatmung und HLM-Dauer zum Zeitpunkt T2, *p < 0,001, Darstellung als Boxplot mit Minimum und Maximum.....	63
Abbildung 23: Quantifizierung des WTQ anhand von prä- und postoperativen Röntgen-Thorax-Aufnahmen, die unterbrochene Linie stellt den Grenzwert des WTQ von 12,6% für ein KLS dar, *p < 0,05. ....	64

### 7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über Diagnosen und Operationsverfahren .....	30
Tabelle 2: Gefäßeinteilung nach Größe und Farbe .....	42
Tabelle 3: Klassifizierung des MFI.....	43
Tabelle 4: Demografische Charakteristika, Werte angegeben als Mittelwert und Spannweite. .....	50
Tabelle 5: Operationstechnische Charakteristika, Werte angegeben als Mittelwert und Spannweite. ....	50
Tabelle 6: Klinische und laborchemische Parameter der HLM-Gruppe komplett zu den Messzeitpunkten, *p < 0,05 versus T0, Werte angegeben als Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes. ....	51
Tabelle 7: Klinische Parameter der Kontrollgruppen zu den Messzeitpunkten, *p < 0,05 versus T0 der eigenen Gruppe, #p < 0,05 versus HLM-Gruppe komplett zum entsprechenden Zeitpunkt, Werte angegeben als Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes.....	52

## 8 Danksagung

Mein Dank gilt zunächst Frau Prof. Dr. Genzel-Boroviczény, meiner Doktormutter, für die engagierte Betreuung, Motivation und Hilfestellung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Betreuerin Frau PD Dr. C. Nußbaum bedanken, die mich zu jeder Zeit hervorragend unterstützt und ermutigt hat und mir bei inhaltlichen und technischen Fragestellungen stets zur Seite gestanden ist. Mit ihrem außerordentlichen Engagement und ihrer Zuverlässigkeit hat sie einen wesentlichen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet. Das habe ich nie als selbstverständlich angesehen.

Maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat auch das gesamte Team der Station G9 in Großhadern, das mir immer freundlich und kooperativ unter die Arme gegriffen hat, vielen Dank dafür!

Auch möchte ich den kleinen Patientinnen und Patienten und ihren Eltern meinen Dank aussprechen für ihr Vertrauen und die Teilnahme an unseren Untersuchungen.

Ebenfalls danke ich meinen Freundinnen und Freunden nah und fern, vor allem Anne, die durch unermüdliches Nachfragen und stetiges Ermutigen zur Fertigstellung beigetragen haben und so manche Absage in der heißen Phase geduldig ertragen haben. Besonders Susi und Bella haben durch ihre gründlichen und flotten Korrekturen dieser Arbeit den letzten Schliff verliehen und mir so manchen sich wiederholenden Rechtschreibfehler hoffentlich verziehen.

Mein ganz besonderer Dank aber gilt meinen Eltern und meiner ganzen Familie für ihre bedingungslose Unterstützung und Geduld in jeglicher Hinsicht.

## **9 Eidesstattliche Versicherung**

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

### **Veränderungen der mikrovaskulären Glykokalyx und Perfusion bei Kindern nach Operationen mit kardiopulmonalem Bypass**

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, den 03.07.2019

Amelie Esther Haberer