

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im
Dr. von Haunerschen Kinderspital
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. Christoph Klein

**Mikrozirkulationsmessungen zur Etablierung von Normwerten der
endothelialen Glykokalyx bei gesunden Neugeborenen**

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

vorgelegt von
Stefanie Artmann
aus München
2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Orsolya Genzel-Boroviczény

Mitberichterstatter: PD Dr. Susanne Jonat

PD Dr. Folke Freudenberg

Mitbetreuung durch die promovierte

Mitarbeiterin: PD Dr. Claudia Nußbaum

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

Tag der mündlichen Prüfung: 15.04.2021

Auf dem richtigen Weg ist,
wer sein Ziel nie aus den Augen verliert ...

(Kurt Hörtenhuber)

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	iii
1. Einleitung.....	1
1.1. Mikrozirkulation	1
1.1.1. Gefäßsystem des Menschen	2
1.1.2. Definition der Mikrozirkulation	3
1.1.3. Funktionsweise der Mikrozirkulation.....	4
1.1.4. Pathophysiologie der Mikrozirkulation.....	5
1.2. Endothel und Glykokalyx	6
1.2.1. Aufbau des Endothels.....	6
1.2.2. Aufbau der Glykokalyx.....	7
1.2.3. Funktion der Glykokalyx	9
1.2.4. Pathophysiologie der Glykokalyx.....	10
1.3. Methoden zur Visualisierung der Mikrozirkulation	12
1.3.1. Orthogonal Polarization Spectral Imaging.....	12
1.3.2. Sidestream Dark-Field Imaging.....	14
1.3.3. Incident Dark-Field Imaging	15
1.4. Mikrozirkulationsmessungen in der Pädiatrie.....	15
1.5. Hypothese und Zielsetzung.....	17
2. Material und Methoden	18
2.1. Studiendesign.....	18
2.2. Patientenkollektiv	18
2.2.1. Patientenrekrutierung.....	18
2.2.2. Ethikantrag, Aufklärung und Einverständnisse	19
2.3. Methode.....	19
2.3.1. Messarbeitsplatz.....	19
2.3.1.1. SDF Videomikroskop.....	20
2.3.1.2. GlycoCheck™ Software	21
2.3.2. Versuchsablauf und Messung	24
2.3.3. Blutgasanalyse.....	26
2.4. Messparameter	27

2.4.1. Messparameter der Mikrozirkulation	27
2.4.2. Klinische Daten	27
2.5. Statistische Auswertung	28
3. Ergebnisse	29
3.1. Patientenkollektiv	29
3.1.1. Klinische Daten	29
3.1.2. Laborchemische Daten.....	30
3.2. Messparameter der Mikrozirkulation.....	32
3.3. Interrater und intrarater Reliabilität.....	32
3.4. Abhängigkeit der Mikrozirkulationsparameter vom Geschlecht	33
3.5. Abhängigkeit der Mikrozirkulationsparameter vom Geburtsmodus	34
3.6. Abhängigkeit der Mikrozirkulationsparameter von Blutgaswerten	35
3.6.1. PBR versus Glucose	35
3.6.2. PBR versus Hämatokrit	35
3.7. Korrelation der einzelnen Mikrozirkulationsparameter.....	36
3.7.1. PBR versus RBC filling	36
3.7.2. PBR versus VVD	37
3.7.3. RBC filling versus VVD	37
3.8. PBR bei Frühgeborenen versus Reifgeborenen.....	39
4. Diskussion	40
4.1. Methodik.....	41
4.2. Ergebnisse	48
4.3. Ausblick	59
5. Zusammenfassung	61
Literaturverzeichnis	63
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	77
Anhang	78
I) Übersichtstabellen	78
II) Elterninformation und Einverständniserklärung	79
Danksagung	84
Eidesstattliche Versicherung	85

Abkürzungsverzeichnis

AGA:	Appropriate for gestational age
AVA:	Automated Vascular Analysis Program
BE:	Base Excess / Basenabweichung / Basendefizit
BGA:	Blutgasanalyse
Bili:	Bilirubin
Ca⁺⁺:	Calcium
Cl⁻:	Chlorid
CRP:	C-reaktives Protein
CTG:	Kardiotokografie
ED:	Einzeldosis
EDHF:	Endothelium-derived hyperpolarizing factor
ESL:	Endothelial Surface Layer
FG:	Frühgeborene
fps:	frames per second
G:	Gauge
GBS:	Streptococcus agalactiae/B-Streptokokken
Gluc:	Glucose
Hb:	Hämoglobin
HCO₃⁻:	Bicarbonat
HKT:	Hämatokrit
HLM:	Herz-Lungen-Maschine
ICAM-1 / ICAM-2:	Intercellular adhesion molecule 1 / Intercellular adhesion molecule 2
IDF:	Incident Dark-Field
K⁺:	Kalium
kap:	kapillär
KFZ:	Kapilläre Füllungszeit
kgKG:	Kilogramm Körpergewicht
Lak:	Laktat
LDL:	Low-density Lipoprotein
LED:	Light-emitting diode / Leuchtdiode
LT:	Lebenstag
n:	Anzahl
NA:	numerische Apertur
Na⁺:	Natrium
NG:	Neugeborene
NO:	Stickstoffmonoxid
NS:	Nabelschnur
OPS:	Orthogonal Polarization Spectral
PBR:	Perfused Boundary Region
pCO₂:	Kohlendioxidpartialdruck
PECAM-1:	Platelet endothelial cell adhesion molecule 1
pO₂:	Sauerstoffpartialdruck

RBC filling:	Red Blood Cell filling
RBCW:	Red Blood Cell Width
SD:	Standard deviation / Standardabweichung
SDF:	Sidestream Dark-Field
SGA:	Small for gestational age
SSW:	Schwangerschaftswoche
TVD:	Total Vessel Density
VCAM-1:	Vascular cell adhesion molecule 1
ven:	venös
VVD:	Valid Vessel Density

1. Einleitung

„Expedition glycocalyx. A newly discovered „Great Barrier Reef““

Dieser Titel eines Papers von Chappell et al. aus 2008 impliziert bereits das Ausmaß wie auch die Vielfältigkeit der sogenannten „Glykokalyx“ (1). Das Great Barrier Reef mit seiner biologischen Diversität ist ein durchaus fragiles Ökosystem, dessen Erhalt maßgeblich durch nachhaltige Nutzung bestimmt wird. Korallenriffe übernehmen wichtige biologische, chemische, physikalische und ökologische Funktionen (2). Jegliche Beeinträchtigung dieser Formationen hat Auswirkungen sowohl auf den Lebensraum selbst wie auch auf die damit zusammenhängende Artenvielfalt und die Küstenabschnitte. In Anlehnung daran kann man die endotheliale Glykokalyx beschreiben: diese Struktur ist dem Endothel als innerste Schicht der Blutgefäße aufgesetzt, kleidet diese luminal aus und stellt somit eine Grenzschicht zwischen den Endothelzellen und den Bestandteilen des Blutes dar. Hierdurch kommt ihr als Filtrationsschicht eine Schlüsselfunktion in der Regulation der Mikrozirkulation, der Physiologie und Pathophysiologie zu (1, 3).

In der Mitte des 20. Jahrhunderts konnten elektronenmikroskopische Fotos die bereits vermutete proteinhaltige Schicht auf dem Endothel erstmals durch neue Fixations- und Färbemethoden bildlich darstellen (4, 5). Die Glykokalyx als Struktur war erkannt. Dennoch ist auch nach mehreren Jahrzehnten intensiver Forschung das Rätsel „Glykokalyx“ bis heute nicht vollständig geklärt.

1.1. Mikrozirkulation

Die Ära der Erforschung der Blutzirkulation reicht hingegen bis in die griechische Antike. Hippokrates und Galen gingen noch von zwei nicht miteinander verbundenen Kreisläufen aus, bis William Harvey 1628 zeigen konnte, dass Arterien und Venen in einem geschlossenen Kreislauf miteinander verbunden sind (6). In den kommenden Jahrhunderten erzielten unter anderem Marcello Malpighi mit der Entdeckung der Kapillaren und Theodor Schwann als Begründer der Zelltheorie großen Fortschritt mit grundlegender Bedeutung für das Verständnis der Mikrozirkulation (6). Der Begriff „Endothel“ wurde erstmals 1865 von Wilhelm His erwähnt. Bis heute beschäftigt sich die Forschung mit der Beschaffenheit, den Aufgaben und Funktionen von Kapillaren und Gefäßwänden (6).

Auf kleinster Gefäßebene laufen die für den Organismus essentiellen Prozesse der Mikrozirkulation ab (s. 1.1.3.). Dieser Teil des Blutkreislaufs steht nur in gewisser

Abhängigkeit zur Makrozirkulation (7-9) und macht insgesamt den weitaus größeren Teil des Gefäßsystems aus (s. 1.1.1).

1.1.1. Gefäßsystem des Menschen

Neben unter anderem Hormontransport und Thermoregulation besteht die Hauptaufgabe des Blutkreislaufs in der bedarfsgerechten Versorgung der unterschiedlichen Gewebe mit Sauerstoff und Nährstoffen und dem Abtransport der Abbauprodukte des Stoffwechsels (10). Das Herz als Motor fördert das Blut aus der linken Herzkammer über die Aorta in die arteriellen Blutgefäße des Systemkreislaufs. Von dort gelangt es bis in die Kapillaren, auf deren Ebene der Stoffaustausch mit dem Gewebe stattfindet (11). Neben dem lymphatischen System wird der größte Teil des Blutvolumens aus der Körperperipherie über die venösen Gefäße dem rechten Herzen zugeführt, von wo es nun in den Lungenkreislauf gepumpt wird (11). Nach Oxygenierung und Eliminierung des Kohlenstoffdioxids gelangt das Blut wieder in die linke Herzhälfte und der Kreislauf beginnt erneut (11).

Gemein ist den arteriellen und venösen Gefäßen die Dreischichtung der Gefäßwand, bestehend aus Tunica externa / Adventitia, Tunica media und Tunica intima (11). Bei Kapillaren und postkapillären Venolen fehlt diese Dreischichtung. Die Gefäßwand besteht vornehmlich aus Endothelzellen (11).

Die verschiedenen Abschnitte des Gefäßsystems nehmen aufgrund ihrer jeweiligen Beschaffenheit und Größe unterschiedliche Funktionen ein: Arterien besitzen von allen Gefäßen die ausgeprägteste Wandstärke um den hohen Drücken (mittlerer arterieller Druck in herznahen Gefäßen 100 mmHg) Stand zu halten (12, 13). Gleichzeitig ist die Strömungsgeschwindigkeit mit bis zu 20 cm/s hier am höchsten (12). Die terminalen Arterienäste und Arteriolen tragen mit rund 50% den größten Anteil am totalen peripheren Strömungswiderstand (12). Mit ihrem kleinen Einzelradius spielen sie somit durch Konstriktion und Relaxation eine wichtige Rolle in der Blutdruckregulation und der bedarfsgerechten Blutverteilung auf die Kapillarbetten der einzelnen Gewebe (13). Im Anschluss folgen mit dem geringsten Gefäßdurchmesser die Kapillaren und postkapillären Venolen. Dünne Kapillarwände und eine gemeinsame Querschnittsfläche von ca. 2500 cm² ermöglichen in den Kapillarnetzen den Stoffaustausch zwischen intravasalem Volumen und Interstitium (13). Daran schließen sich die Kapazitätsgefäße in Form von Venolen und Venen an. Sie sorgen durch ihr großes Lumen und ihre Venenklappen zusammen mit der sogenannten Muskelpumpe für den Rücktransport des verstoffwechsellerten Blutes und dienen als variables Blutreservoir (12). Im venösen Schenkel befinden sich durchschnittlich 64% des

Blutvolumens, der herrschende Druck dagegen beträgt dabei nur ca. 10 mmHg (12). Hieraus erklärt sich auch die funktionelle Aufteilung in ein Hoch- und Niederdrucksystem.

Die Regulation der Blutzirkulation ist ein komplexes Zusammenspiel aus u.a. dem sympathischen Anteil des vegetativen Nervensystems, physikalischen / hormonellen / enzymatischen Vorgängen und Chemosensoren. Die Modulation umfasst kurz-, mittel- und langfristige Veränderungen (10). So kann zum Beispiel innerhalb von Minuten im Falle einer Reduktion des Blutvolumens über Presso- und Dehnungsrezeptoren eine gesteigerte Sympatikusaktivierung erzielt werden. Langfristig beeinflussen einige Hormone (u.a. Antidiuretisches Hormon, Renin-Angiotensin-Aldosteron-System) über die Nierenfunktion die Kreislaufregulation (10).

1.1.2. Definition der Mikrozirkulation

Der Blutfluss in den Endstrombahnen des Gefäßnetzes mit einem vaskulären Durchmesser von weniger als 100 µm bezeichnet die Mikrozirkulation (14). Diese Funktionseinheit setzt sich zusammen aus Arteriolen, Metarteriolen, Kapillaren und Venolen (14). Kapillargefäße gehen am häufigsten von sogenannten Metarteriolen ab, die eine direkte Verbindung zu Venolen herstellen und als Hauptstrombahn bezeichnet werden. Durch am Übergang befindliche diskontinuierliche Muskelfasern, die präkapillären Sphinkteren, wird der Blutfluss in das Kapillarbett, bedarfsgerecht an die aktuellen Bedürfnisse angepasst, gesteuert (12). Aufgrund ihrer zahlreichen Verzweigungen und der daraus resultierenden Gesamtoberfläche entsteht eine nahezu lückenlose Versorgung, da fast keine Körperzelle mehr als 20 – 30 µm von einer Kapillare entfernt ist (13).

Die dünne Kapillarwand setzt sich aus einschichtigen Endothelzellen zusammen, denen außen Perizyten aufliegen. Beide Zelltypen werden von einer Basalmembran umhüllt (11). Die Konnektion der einzelnen Endothelzellen erlaubt eine Aufteilung in drei verschiedene Kapillartypen – abgestimmt auf die jeweiligen Organbedürfnisse: Kapillaren in u.a. Lunge, Muskel, Haut- und Fettgewebe besitzen ein kontinuierliches Endothel, wogegen sich fenestrierte Kapillaren durch Poren im Zytoplasma der Endothelzellen auszeichnen, die eine erhöhte Durchlässigkeit erlauben (12, 15). Diese Zellschichten findet man in den Glomeruli der Nieren wie auch in der Magen- und Darmschleimhaut (12). Diskontinuierliches Endothel besitzt interzelluläre Spalten mit Durchbrechung der Basalmembran, das somit auch für große Moleküle permeabel ist. Leber, Milz und Knochenmark sind Beispiele hierfür (12, 13).

1.1.3. Funktionsweise der Mikrozirkulation

Bei einer Länge von nur 0,3 bis 1 mm und einer Flussgeschwindigkeit von ca. 0,3 mm/sec bleiben auf Kapillarebene zum Stoffaustausch zwischen intravasalem und interstitiellem Raum nur ca. 1 – 3 Sekunden (13). Über Diffusion, einem passiven, gerichteten Transport entlang eines Konzentrationsgefälles, erfolgt der größte Anteil des Stoff- und Flüssigkeitsaustausches (10). Hydrophile (z.B. Wassermoleküle, Natrium- und Chloridionen, Glucose) und lipophile (Sauerstoff, Kohlendioxid) Stoffe diffundieren durch Interzellularräume bzw. direkt durch Endothelzellen (12).

Der hydrostatische Druck im Kapillargebiet führt zu einer Auswärtsfiltration von Flüssigkeit und darin gelösten Stoffen (13). Die Konzentrationsdifferenz der Plasmaproteine ergibt den kolloidosmotischen Druck. Dieser steht dem hydrostatischen Druck entgegen, da er Flüssigkeitsverschiebungen vom Interstitium nach intravasal fördert (13). Gemäß der Starling-Gleichung führt dieses Zusammenspiel aus hydrostatischen und kolloidosmotischen Kräften entlang der Kapillarmembran unter physiologischen Bedingungen dazu, dass im arteriellen Endstromgebiet ca. 0,5% des Plasmavolumens in das Interstitium filtriert werden (12, 16). Aufgrund des niedrigeren hydrostatischen Druckes im venösen Kapillargebiet werden hier 90% des filtrierten Plasmavolumens dem Körperkreislauf über Reabsorption wieder zugeführt. Die restlichen 10% stellen somit eine positive Nettofiltration dar und werden über das lymphatische System abtransportiert (12).

Die genannten Prozesse der Mikrozirkulation werden maßgeblich durch folgende Faktoren reguliert: Gefäßdurchmesser (17), Perfusion (18), Blutviskosität und Endothelbeschaffenheit (19).

Durchblutungsveränderungen im Bereich der Arteriolen beeinflussen den hydrostatischen Druck in den Kapillaren. Auf systemischer Ebene kontrollieren das autonome Nervensystem, das Renin-Angiotensin System und hormonelle Regelkreise die Durchblutung durch Regulierung des Gefäßtonus bis zu den größeren Arteriolen (12). Lokal unterscheidet man zwischen chemischer und metabolischer Durchblutungsregulation. Neben zum Beispiel Prostazyklin und EDHF (endothelium-derived hyperpolarizing factor) ist der wichtigste chemische vasomotorische Steuerungsfaktor hierbei das Stickstoffmonoxid (10). NO wird durch mechanische Reizung, Calcium-Konzentrationsveränderungen sowie durch Bindung von unter anderem Bradykinin oder Histamin an Endothelzellrezeptoren freigesetzt (10). NO aktiviert an den Gefäßmuskelzellen die zytosolische Guanylatcyclase und bewirkt somit die Vasodilatation (20, 21). Endothelzellen reagieren des Weiteren auf lokale metabolische Konzentrationsveränderungen von zum Beispiel Laktat, Kalium, Stickstoffdioxid, Sauerstoff oder eine Abnahme des pH-Wertes sowie auf biomechanische Reize wie Schubspannung

(22). Die Glykokalyx als Teil des sogenannten Endothelial Surface Layer (ESL) spielt hierbei eine wichtige Rolle und nimmt Einfluss auf den Blutfluss und die Interaktion mit den Blutbestandteilen (19, 23). Ebenso beeinflussen die Gefäßdichte, die durch sogenanntes Capillary Recruitment an den lokalen Nähr- und Sauerstoffbedarf angepasst wird, sowie der Blutfluss die Perfusion (18, 24). Der kapilläre Blutfluss hängt unter anderem wiederum von der Viskosität des Blutes ab. Dem Fahraeus-Lindqvist-Effekt nach nimmt die Viskosität mit kleiner werdendem Kapillardurchmesser ab (25). In vivo unterliegen die Fließeigenschaften demnach zahlreichen unterschiedlichen morphologischen, funktionellen und hämodynamischen Faktoren.

1.1.4. Pathophysiologie der Mikrozirkulation

Die Mikrozirkulation ist in ihrer Physiologie äußerst dynamisch und zeigt eine große Heterogenität bei Beeinträchtigungen. Die Aufrechterhaltung einer funktionierenden Mikrozirkulation ist Grundvoraussetzung für die einzelnen Organfunktionen. Krankheitsmanifestation und -fortschritt hängen oft maßgeblich von Veränderungen der Gefäßbiologie ab.

Bei (Vor-) Erkrankungen wie Diabetes mellitus (26), Bluthochdruck und Arteriosklerose (27), Sepsis (28) und generell schwer kranken Patienten (29) wie z.B. bei Zustand nach Herzstillstand (30) kommt es zu Beschädigungen und Veränderungen der Gefäßwände und des Blutflusses und folglich zu Mikrozirkulationsstörungen.

Klinisch dienen in erster Linie Untersuchungsparameter wie Blutdruck, Sauerstoffsättigung, Herz- und Atemfrequenz, Hautkolorit und kapilläre Füllungszeit zur Beurteilung der Hämodynamik (31, 32). Trotz stabiler Vitalparameter können bereits zuvor Beeinträchtigungen der Mikrozirkulation vorliegen. Wie verschiedene Studien aufzeigen konnten, beeinflussen sich Mikrozirkulation und Makrozirkulation nur bedingt gegenseitig und eine stabile klinische Makrozirkulation lässt keinen eindeutigen Rückschluss auf die bestehende mikrozirkulatorische Situation zu (33).

Dank fortschreitender Technologien ist es möglich einzelne Parameter der Mikrozirkulation direkt zu messen und zu quantifizieren (34).

Zahlreiche Studien konnten mikrozirkulatorische Veränderungen bei Patienten mit Sepsis nachweisen. Im Rahmen dieser systemischen Entzündungsreaktion nimmt die Kapillardichte bei gleichzeitiger Steigerung der Perfusionsungleichheit ab (28). Gut sowie schlecht oder nicht durchblutete Kapillaren liegen nahe beieinander. Innerhalb kurzer Zeit können sich die Perfusionsmodalitäten von nicht durchblutet bis zu gut durchblutet und andersherum ändern

(28). Diese Unbeständigkeit der Mikrozirkulation sowie die Vergrößerung des Diffusionsabstandes für Sauerstoff bei Abnahme der Kapillardichte führen zu Bereichen mit Beeinträchtigung der Durchblutung und Oxygenierung bis zur Hypoxie (35). Daraus resultieren anaerobe Stoffwechsellage und Zellschädigung bis hin zum Multiorganversagen (36). Weidlich et al. zeigten, dass bei Frühgeborenen mit nachgewiesener Infektion die Dichte der kleinen Gefäße bereits einen Tag vor dem Auftreten laborchemischer Veränderungen abnahm (37). Der Anteil der durchbluteten kleinen Gefäße dient laut De Backer et al. aus dem Jahr 2013 als wichtigster und verlässlichster Vorhersagewert für das Überleben von Sepsispatienten (38). Des Weiteren spielen in der Pathophysiologie der Sepsis unter anderem auch eine veränderte interzelluläre Übertragung, endotheliale und mitochondriale Funktionsstörungen, die Aktivierung der Koagulation und eine veränderte Glykokalyx eine Rolle (28, 32, 39).

Auch die Pathophysiologie komplett anderer Krankheitsbilder wie zum Beispiel beim Diabetes mellitus Typ I basiert unter anderem auf endothelialen Beeinträchtigungen in Form von beispielsweise gestörter Vasodilatation der Hautdurchblutung. Bei ca. 25% der betroffenen Kinder sind diese bereits nach dem ersten Krankheitsjahr nachweisbar (40).

1.2. Endothel und Glykokalyx

1.2.1. Aufbau des Endothels

Die innerste, Blut- und Lymphgefäße luminal auskleidende Schicht wird als Endothel bezeichnet. Sie stellt mit einer Dicke von weniger als 0,1 μm in Kapillaren und bis zu 1 μm in großen Arterien eine aktive und heterogene Grenzschicht zwischen Intravasal- und Extravasalraum dar (15). Angepasst an die jeweiligen Organbedürfnisse lassen sich aufgrund der Konnektion der in Kapillaren einschichtig aneinandergereihten Endothelzellen drei verschiedene Kapillartypen unterscheiden: kontinuierlich, fenestriert und diskontinuierlich (siehe 1.1.2) (12, 13). Luminal liegt den Endothelzellen in allen Gefäßen eine zucker- und proteinhaltige Schicht an – die endotheliale Glykokalyx (41). Angrenzend an diese Schicht findet sich ein für Erythrozyten unzugänglicher Bereich mit verlangsamtem Blutfluss, wo sowohl flüssige sowie feste Plasmabestandteile gebunden werden können. Diese dynamische Schicht zusammen mit der festen Glykokalyx wird als *Endothelial Surface Layer* (ESL) bezeichnet und variiert je nach Gefäßtyp zwischen einer Dicke von 0,4 μm bis 3 μm (42, 43). Die ESL trägt entscheidend zur Gefäßarchitektur bei, übernimmt wichtige

physiologische Aufgaben und spielt eine aktive Rolle in unter anderem der Hämostase, Perfusion und bei Entzündungsprozessen (44).

1.2.2. Aufbau der Glykokalyx

Bereits in den 1940er Jahren wurde eine proteinhaltige Schicht auf dem Endothel vermutet, die dann 1966 durch Luft et al. elektronenmikroskopisch bildlich dargestellt werden konnte (siehe Abbildung 1) (4, 5). Es dauerte viele Jahrzehnte und wird auch weiter andauern die Zusammensetzung, Funktion und Bedeutung dieser Schicht noch genauer zu erforschen.

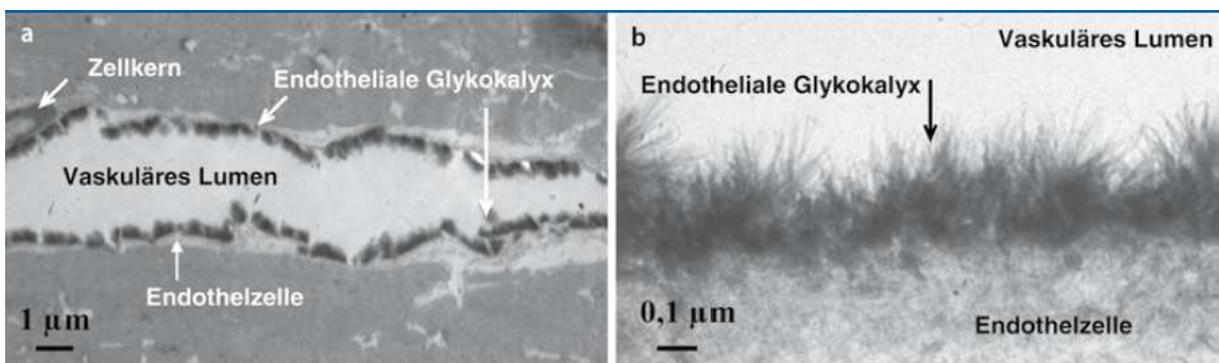


Abbildung 1:
Elektronenmikroskopische Aufnahmen der endothelialen Glykokalyx aus Chappell et al. (1)

Die Dicke der kapillären Glykokalyx beträgt ca. 0,5 µm, in großen arteriellen Gefäßen sogar bis zu mehreren Mikrometern (1, 45), bei einem Volumen von 15 – 20 ml/kgKG (46). Diese gelartige Struktur besteht aus netzartig verknüpften Proteoglykanen, Glykosaminoglykanen, Glykoproteinen und Glykolipiden (siehe Abbildung 2). Diesen eingebunden finden sich zahlreiche Enzyme wie NO-Synthase, Superoxiddismutase, Lipoproteinlipase, Angiotensin Converting Enzyme und Proteine zum Beispiel Albumin, Fibrinogen, Antithrombin III, Wachstumsfaktoren und Chemokine (16).

Das Grundgerüst ist gleichzeitig die endotheliale Verankerung und besteht aus Proteoglykanen und Glykoproteinen (41, 47). Proteoglykane setzen sich aus einem zellulär verankerten Kernprotein wie zum Beispiel Syndecan oder Glypican mit daran angeschlossenen, negativ geladenen Glykosaminoglykanketten zusammen. Die in der Glykokalyx am häufigsten vorkommenden Glykosaminoglykane sind Heparansulfat und Chondroitinsulfat (47). Auch die Hyaluronsäure gehört zu den Glykosaminoglykanen, ist aber nicht an ein (Kern-)Protein gebunden. Weitere Grundbausteine der Glykokalyx sind Glykoproteine mit ihren kurzen, verzweigten Kohlenhydratseitenketten (47). Diese

Zelladhäsionsmoleküle wie Selektine und Integrine sowie Rezeptoren der Immunglobulinsuperfamilie (unter anderem ICAM-1 und -2, VCAM-1 und PECAM-1) haben eine wichtige Rolle im Zusammenspiel von Endothel und Thrombozyten bzw. Leukozyten sowie bei der Hämostase und Fibrinolyse (41). Durch chemische Modifizierungen der Moleküle ergeben sich kontinuierliche Veränderungen, die Auswirkungen auf die Beschaffenheit und Funktionalität der Glykokalyx haben.

In dieses beschriebene Grundgerüst sind lösliche Bestandteile aus dem Blutplasma bzw. dem Endothel variabel eingebunden (47, 48). Der stetige, im Regelfall ausgeglichene Austausch löslicher Stoffe zwischen Glykokalyx und Blutplasma verändert immerzu die Zusammensetzung und Dicke der Glykokalyx. Durch diese flexible Bindung und Integration löslicher Moleküle in die Kernstruktur der Glykokalyx ergibt sich das dynamische Konstrukt der physiologisch tätigen „Endothelial Surface Layer“ (im folgenden Textverlauf nur noch als Glykokalyx bezeichnet) (47).

Die Komplexität und Finesse dieser Grenzschicht lässt erahnen, dass schon kleine pathophysiologische Vorgänge das Gesamtwerk empfindlich beeinflussen können – ganz in Anlehnung an das zu Beginn beschriebene Great Barrier Reef.

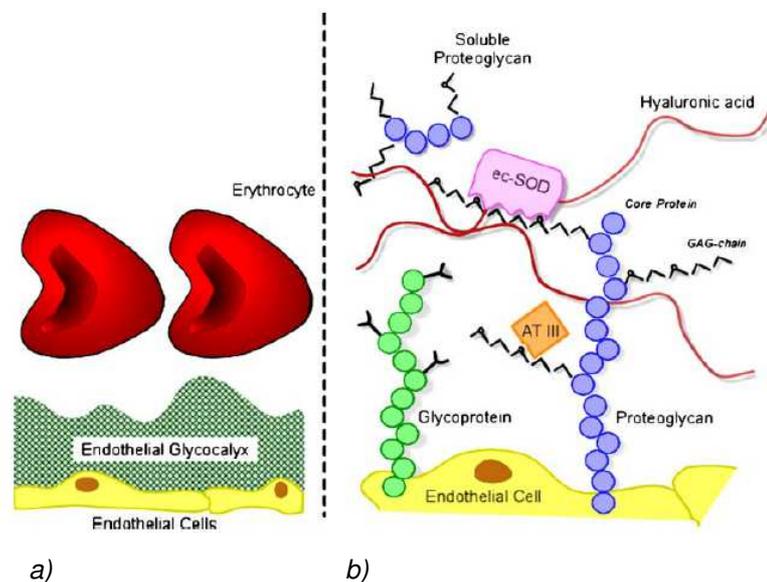


Abbildung 2: Schematische Darstellung der endothelialen Glykokalyx aus Reitsma et al. (47)
a) Die Glykokalyx als Grenze zwischen löslichen Blutbestandteilen und Endothelzellen
b) Die einzelnen Bestandteile der Glykokalyx

1.2.3. Funktion der Glykokalyx

Unter physiologischen Bedingungen im Gleichgewicht zwischen stetigem Auf- und Abbau ist die endotheliale Glykokalyx eine dynamische Struktur mit endothelialen und plasmatischen Bestandteilen. Als Barriere zwischen Blut und Interstitium trägt sie entscheidend zum Schutz der Gefäßwand wie auch zur vaskulären Homöostase bei (41). Eine der wichtigsten Funktionen der Glykokalyx ist ihr Beitrag zur Gefäßpermeabilität (16). Generell basierten die Modelle über Flüssigkeitsverschiebungen zwischen intra- und extravasal vor der Erkenntnis über die Existenz einer proteinhaltigen Grenzschicht neben der reinen Endothelzellschicht, auf dem Prinzip nach Starling (49). Nach Darstellung der Glykokalyx konnte in jüngerer Forschung gezeigt werden, dass Größe und Ladung der Moleküle entscheidend für die Durchlässigkeit sind (47). Aufgrund der Ladung werden negativ geladene Moleküle zurückgestoßen. Zudem können Makromoleküle größer 70 kDa die Glykokalyx nicht passieren (50). Albumin bindet durch einige positive Ladungen an der Proteinkette fester an die Glykokalyx und passiert diese damit wesentlich langsamer (41). Führt man das Wissen über die Glykokalyx mit dem Starling-Prinzip zusammen, ergibt sich, dass der kolloidosmotische Druckgradient nicht zwischen Intravasalraum und Interstitium, sondern über der Glykokalyx mit hohem kolloidosmotischem Druck und dem kleinen Raum zwischen Endothelzelle und Glykokalyx mit niedrigem kolloidosmotischem Druck besteht (1, 51). Wichtig für die Filterfunktion ist zudem das jeweilige in der ESL gebundene plasmatische Kolloid (52). Nach zum Beispiel enzymatischer Schädigung kann die Glykokalyx ihre Barrierefunktion für Flüssigkeit und Kolloide nicht mehr ausreichend erfüllen und es kommt somit zu einer Auswärtsfiltration ins Interstitium mit Ödembildung (53, 54). Die Regulation der Zellinteraktionen mit der Gefäßwand ist eine weitere Aufgabe der Glykokalyx. Sie hält Erythrozyten auf gewissen Abstand zum Endothel, wobei nach Schädigung der Glykokalyx eine deutliche Ausbreitung der Erythrozytensäule beobachtet werden kann (55). Ähnlich verhält es sich mit Thrombozyten. Diese interagieren erst nach teilweiseem Verlust der grundsätzlich antithrombotisch wirkenden Glykokalyx, durch zum Beispiel Zuführung von oxidiertem LDL, mit dem Endothel (56). Unter physiologischen Umständen verhindert die Glykokalyx die Adhäsion von Leukozyten. Gleichzeitig werden aber genau die Selektine und Adhäsionsmoleküle der Immunglobulinsuperfamilie der glykokalen Glykoproteine nach Stimulation zu Liganden für Leukozyten und initiieren somit die Diapedese bei Entzündungsreaktionen (57, 58).

Die Glykokalyx spielt auch im Bereich der Mechanotransduktion eine Rolle. Sie triggert eine vermehrte Stickstoffsynthese bei erhöhter Schubspannung infolge einer Zunahme der Blutflussgeschwindigkeit; so wird z.B. bei physischer Aktivität mit erhöhtem Sauer- und

Nährstoffbedarf durch adäquate Vasodilatation eine bedarfsgerechte Versorgung sichergestellt (48, 59).

Die Bindung verschiedener Enzyme und Proteine an die Glykokalyx beeinflusst diese und dient der zellulären Signalübertragung. Die Anlagerung der extrazellulären Superoxiddismutase schützt das Endothel vor oxidativem Stress (60, 61).

Die Konnektion von Antithrombin III und Heparin-Kofaktor II verstärkt nicht nur deren Wirkung, sondern erklärt auch die gerinnungshemmende Eigenschaft der Glykokalyx (41). Die Fibroblasten-Wachstumsfaktoren werden durch ihre hohe Affinität zu Glykosaminoglykanen in ihrer Wirkung deutlich verstärkt; Aspekte der Signalübertragung sind demnach abhängig von der Glykokalyx (62).

1.2.4. Pathophysiologie der Glykokalyx

Wie aufgezeigt ist die Funktion der endothelialen Glykokalyx sehr vielseitig. Durch unter anderem Hyperglykämie (63), Ischämie/Reperfusion (42), erhöhte Cholesterinwerte (64) und Entzündungsvorgänge (65) kommt es zu einer Schädigung dieser komplexen Struktur. Ein Kapillarleck mit Flüssigkeitsaustritt und Ödembildung, die Aggregation von Leuko- und Thrombozyten, die Gerinnungsaktivierung sowie der Verlust der vaskulären Reagibilität als Beispiele der daraus resultierenden endothelialen Funktionsstörung führen zur Beeinträchtigung der Mikrozirkulation (66). Hauptsächlich tritt durch die genannten Faktoren ein „Shedding“ der Glykokalyx auf – ein meist enzymatisch oder durch Scherkräfte bzw. oxidativen Stress ausgelöster Abbau bestimmter Glykokalyxbestandteile (67, 68).

Die endotheliale Glykokalyx ist somit von zentraler Bedeutung für die Entstehung und das Fortschreiten akuter Störungen (Sepsis (69), Ischämie-/Reperfusionsschäden (70), Trauma (71), Blutung (72)) wie auch chronischer Krankheitsbilder (Diabetes mellitus (73), Atherosklerose (74), Nierenversagen (75), cerebrovaskuläre Krankheitsbilder (76)).

Diabetes mellitus ist eine Volkskrankheit mit vor allem retinalen, kardiovaskulären und nephrologischen Folgeschäden (77). Aufgrund von Insulinresistenz (Typ II) oder fehlender Insulinproduktion (Typ I) kommt es zu Hyperglykämien (77). Diese führen zu einer erhöhten vaskulären Permeabilität, oxidativem Stress, proinflammatorischen Prozessen (78) und durch Scherspannung zu einer verminderten NO-Synthasefunktion (79). Akute (78) wie auch langzeitige (80, 81) hyperglykämie Stoffwechsellagen sind mit einer deutlichen Reduktion des Glykokalyxvolumens assoziiert. Nussbaum et al. zeigten eine um 36% reduzierte Glykokalyxdichte bei Kindern mit Diabetes mellitus Typ I bereits vor dem Auftreten offensichtlicher vaskulärer Komplikationen (82). Generell konnte durch einen Anstieg der

Perfused Boundary Region bei HBA1c Werten $\geq 8\%$ eine Beeinträchtigung der Glykokalyx bei Diabetes mellitus Patienten aufgezeigt werden (83). Des Weiteren besteht eine Verbindung zwischen Hyperglykämien und einer erhöhten Aktivität der Hyaluronidase mit folglich aufgrund von Glykokalyx-Shedding erhöhten Hyaluronkonzentrationen im Blut (78). Dies erklärt die Entstehung einer Mikroalbuminurie im Rahmen einer erhöhten Permeabilität, da Hyaluron eine integrale Komponente der Barriere für den Durchtritt von Makromolekülen darstellt (80, 84).

Zusätzlich konnte bei Typ I Diabetikern ohne weitere metabolische Erkrankungen eine Korrelation zwischen erhöhten Hyaluronwerten im Plasma und Zunahme der Intima-Media-Dicke als Zeichen einer entstehenden Atherosklerose beobachtet werden (85).

Bei der Atherosklerose erzeugen neben hohen Blutzuckerwerten auch turbulenter Blutfluss und hohe LDL-Werte durch Verletzung der Glykokalyx eine Beeinträchtigung der endothelialen Barriere (86, 87). Bis zur Intima eindringende LDL-Proteine oxidieren, fördern Entzündungsprozesse, führen zur Ausbildung von Schaumzellen und bilden somit die Grundlage für atherosklerotische Plaques, die durch Gefäßobstruktion und Rupturierung mit Thrombenbildung zum Schlaganfall oder Herzinfarkt führen (56, 86).

Die Auswirkungen von Ischämie und Reperfusion wie Gewebsödeme und Entzündungsreaktionen durch erhöhte vaskuläre Permeabilität und Leukozytenadhäsion entstehen unter anderem durch Zerstörung der endothelialen Glykokalyx (42). Abbildung 3 verdeutlicht die Schädigung der endothelialen Glykokalyx durch Ischämie und Reperfusion. Auch bei Herzoperationen an Kindern kam es durch lokale und systemische Ischämie/Reperfusion zu erhöhten Syndecan-1 und Hyaluronplasmawerten als Zeichen des Glykokalyx-Sheddings (45). Während eine 20-minütige Ischämiezeit am Meerschweinchenherzen zu einem nahezu vollständigen Abbau der Glykokalyx führt (88), benötigt es laut Mulivor et al. in den Mesenterialgefäßen der Ratte 60 Minuten bis zum Eintritt der Glykokalyx-Schädigung (89).

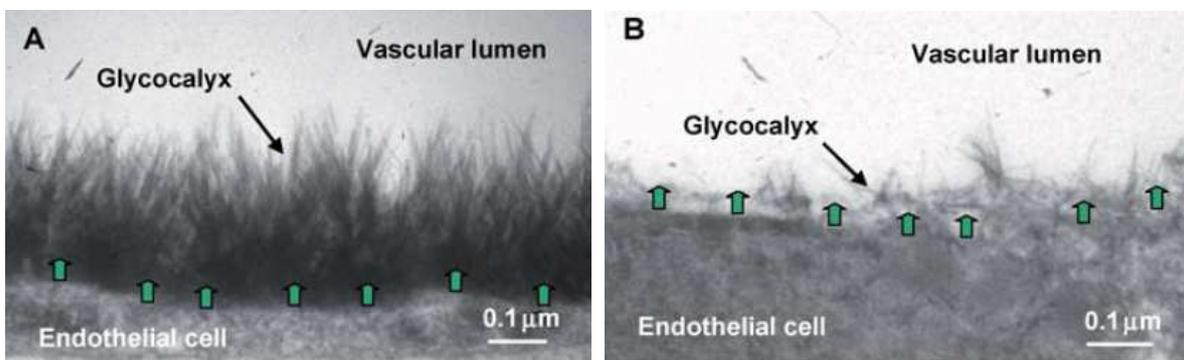


Abbildung 3: aus Becker et al. (66)
Glykokalyx a) bei normaler Perfusion b) nach Schädigung durch Ischämie/Reperfusion

Während einer Sepsis kommt es durch Entzündungsmediatoren wie zum Beispiel TNF- α , Interleukine, in Studien auch durch oxidierte Lipoproteine zu einer Aktivierung und Veränderung der endothelialen Glykokalyx mit starker Ödembildung, Hypovolämie, Leukozytenadhäsion und Aktivierung der Gerinnung bis hin zum Multiorganversagen (39, 90, 91). Donati et al. wie auch Rovas et al. zeigten über die Messung erhöhter PBR-Werte bei Sepsispatienten eine Reduzierung der Glykokalyxdichte auf (92, 93). Ein Anstieg von Syndecan-1 und Heparansulfat im Serum weist auf das stattgefundenen Shedding der Glykokalyx hin (39), korreliert mit der Schwere der Erkrankung (94) und wird in neueren Studien sogar als Vorhersagewert für eine mögliche disseminierte intravasale Gerinnung gehandelt (95).

Aufgrund ihrer vermeintlich ursächlichen Bedeutung an der Entstehung und Ausprägung zahlreicher Krankheitsbilder könnte die endotheliale Glykokalyx auch eine zentrale Bedeutung in der Erforschung möglicher Therapieansätze darstellen.

1.3. Methoden zur Visualisierung der Mikrozirkulation

Die genaue Darstellung mikrozirkulatorischer Vorgänge wurde erst durch verschiedene neuere Technologien möglich. Neben Messmethoden wie der transkutanen pCO₂ Messung, der Near-infrared Spektroskopie oder den Laser Doppler Techniken zählt vor allem die Videomikroskopie zu den bedeutendsten Techniken (96, 97). Diese umfasst Orthogonal Polarization Spectral imaging (OPS) (98), Sidestream Dark-Field imaging (SDF) (98) und Incident Dark-Field imaging (99). Die Mikrozirkulation kann hierdurch direkt abgebildet werden und Parameter wie zum Beispiel Gefäßdichte, Gefäßdurchmesser und Blutflussgeschwindigkeit können gemessen werden (100). Die Visualisierung der Mikrozirkulation findet bislang allerdings nur in Studien Anwendung um Pathologien darzustellen, Krankheitsverläufe zu beobachten und mögliche Therapieversuche zu evaluieren.

Wichtige Faktoren sind hierbei die nichtinvasive, reproduzierbare, unkomplizierte und standardisierte Durchführung der Messungen (101-103).

1.3.1. Orthogonal Polarization Spectral Imaging

Orthogonal Polarization Spectral imaging (OPS) liefert hochaufgelöste Bilder der Mikrozirkulation gemessen beispielsweise auf der Haut, sublingual oder direkt auf Organen im Rahmen chirurgischer Eingriffe (100).

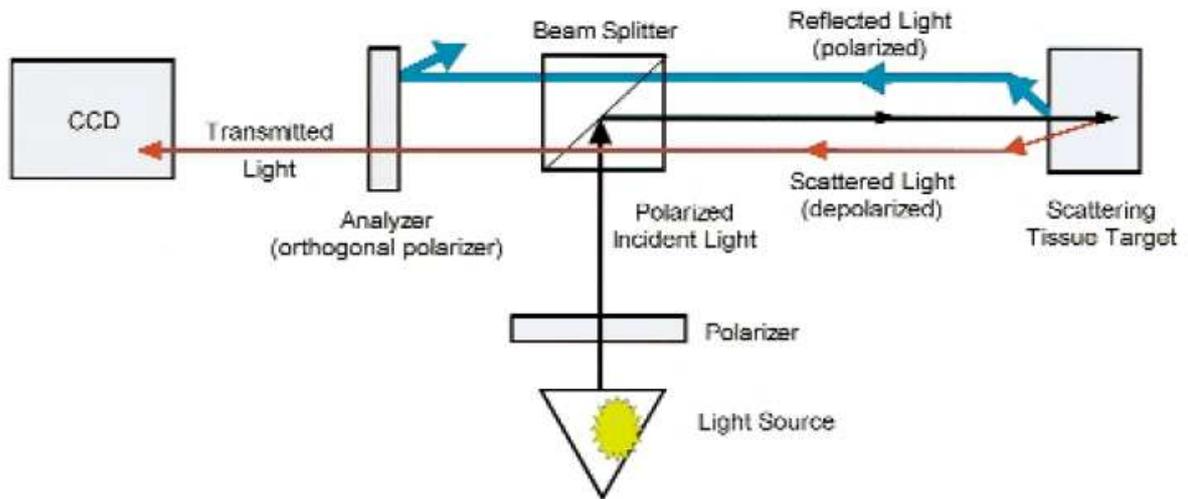


Abbildung 4: Schematische Darstellung der OPS Technik aus Groner et al. (104)

Von einer Lichtquelle abgegebenes Licht wird durch einen Polarisator linear polarisiert und durch einen Beam Splitter auf den darzustellenden Zielbereich geleitet (siehe Abbildung 4) (104-106). Die Fokussierung auf ca. 1 mm² Durchmesser erfolgt über ein Objektiv. Das auf das Gewebe treffende Licht wird entweder reflektiert oder gestreut. Nahe an der Oberfläche reflektiertes Licht ist weiterhin polarisiert und geht über das Objektiv zum direkt vor der Kamera orthogonal zur Lichtquelle angeordneten Polarisationsfilter (Analyzer), welchen es wegen der anhaltenden Polarisierung nicht passieren kann. Nur depolarisiertes Licht kann durch den Analyzer zur Videokamera durchdringen und zur Bildentstehung beitragen. Die hierfür benötigten Streuungen finden relativ tief im Gewebe statt (ca. 300 µm). Dieses depolarisierte Licht erhellt nun das Gewebe von hinten. Aufgrund der Absorptionseigenschaften von Hämoglobin bei der verwendeten Wellenlänge von 548 nm, unabhängig vom Grad der Oxygenierung, führen Erythrozyten zur Lichtabsorption. Dies führt zu einer negativen Kontrastierung der Mikrozirkulation, bei der Gefäße hinsichtlich ihrer Füllung mit Erythrozyten dunkel erscheinen, während das umliegende Gewebe hell ist (Graustufen). Die Wellenlänge von 548 nm stellt eine Lösung zwischen maximaler Hämoglobinabsorption und ausreichender Eindringtiefe dar. Zur Bildentstehung braucht es beim OPS imaging die Lichtabsorption zur Kontrastierung wie auch die Lichtstreuung zur Beleuchtung (104-106).

1.3.2. Sidestream Dark-Field Imaging

Eine Weiterentwicklung der OPS Technik ist die Sidestream Dark-Field imaging Methode (SDF), die im Vergleich zum OPS imaging eine verbesserte Darstellung der teils unscharf abgebildeten Kapillaren ermöglicht (107).

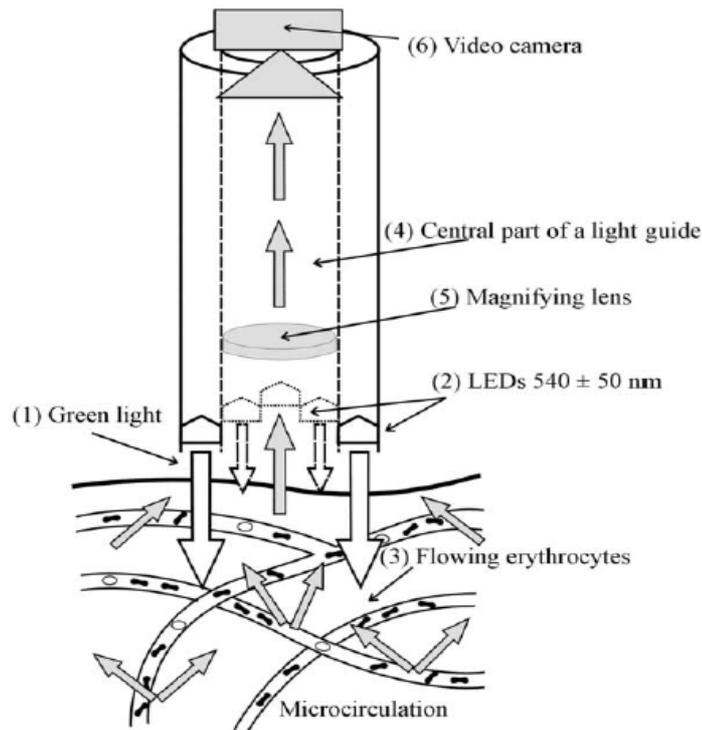


Abbildung 5: Schematische Darstellung der SDF Technik von Cerny (98)

Die Lichtquelle besteht hierbei aus konzentrisch angeordneten Lichtdioden. Diese senden pulsirtes grünes Licht der Wellenlänge 540 nm synchron zur Bildrate der Videokamera aus. Der Stroboskopeffekt verhindert durch kurze Belichtungsintervalle ein Verschwimmen der dynamischen Strukturen. Durch ringförmige Positionierung der Lichtdioden um den zentralen Lichtleiter am Ende des Objektivs kann das direkt am Gewebe reflektierte Licht nicht in den bildverarbeitenden Bereich eindringen und stört somit nicht die Bildentstehung. Nicht direkt reflektiertes Licht dringt in das Gewebe ein und beleuchtet wie bei OPS durch Streuung die mikrozirkulatorischen Gefäße von der Seite (siehe Abbildung 5). Auch hier stellen sich die Erythrozyten aufgrund der Lichtabsorption durch Hämoglobin als dunkle Strukturen dar; das umliegende Gewebe ist gräulich-weiß. Ebenso gilt demnach, dass die Gefäße nicht direkt dargestellt werden können, sondern abhängig vom Vorhandensein der Erythrozyten sind.

Über eine 5-10fache Vergrößerungslinse projiziert sich das Bild auf die Kamera. Bei einer fünffachen Vergrößerung beträgt die Auflösung $\sim 1,4 \times 1,5 \mu\text{m}/\text{Pixel}$ (100, 105, 107-109).

1.3.3. Incident Dark-Field Imaging

Videomikroskope der dritten Generation basieren auf der 1971 von Sherman et al. vorgestellten Incident Dark-Field illumination Technik (110) und umfassen eine höhere Auflösung, bessere Handhabung durch Größen- und Gewichtsreduktion des Messgerätes sowie ein digitales Signal (111). Durch zur Beleuchtungszeit synchronisierte, computergesteuerte Bilderstellung ergeben sich ein besserer Kontrast und eine genauere Abgrenzung der einzelnen Blutzellen. Zudem bietet die IDF Methode ein ca. 3-fach größeres Beobachtungsfeld. IDF liefert durch eine bessere Auflösung ($0,66 \mu\text{m}/\text{Pixel}$) eine höhere Bildqualität, wodurch mehr Kapillaren detektiert werden können (112). Die IDF Technologie stellt im Gegensatz zum SDF imaging ca. 20-30% mehr Kapillaren dar (99, 113).

1.4. Mikrozirkulationsmessungen in der Pädiatrie

Die dargestellten Methoden/Techniken zur Visualisierung der Mikrozirkulation vor allem im Bedside setting erfolgten bei Erwachsenen aufgrund der komplikationslosen Durchführbarkeit und fehlenden Epithelialisierung meist im Gefäßbett unter der Zunge (98).

Bisher gibt es bei pädiatrischen und neonatologischen Patienten nur eine geringe Anzahl an Studien. Wegen der mangelnden Kooperation sowie der Größenverhältnisse ist eine sublinguale/buccale Messung im pädiatrischen Bereich nur selten durchführbar (82, 114). Bei Neonaten eignet sich hinsichtlich der dünneren Haut auch die transkutane Messung zum Beispiel an der Innenseite des Oberarms sowie der Innenseite der Ohrmuschel (113, 115).

Die Parameter der Mikrozirkulation lassen sich aufgrund der unterschiedlichen Physiologie nicht direkt vom Erwachsenen auf Neugeborene und Kinder projizieren. Durch die Geburt kommt es zur Umstellung der fetalen Kreislaufverhältnisse (10). Der intrauterin parallel geschaltete Blutfluss wird zu einem seriellen. Durch Druckumkehr und erhöhten Sauerstoffgehalt schließen sich Foramen ovale und Ductus arteriosus Botalli (10). Meist besteht eine periphere Zyanose mit verminderter peripherer Durchblutung in den ersten Lebensminuten (116). In der ersten Lebenswoche kommt es zu einem erhöhten Sauerstoffverbrauch durch Atemarbeit und Verdauungsprozesse (117). Zudem verändert sich das Gefäßbett nicht nur während der Embryologie sondern unterliegt auch einem Reifeprozess nach Geburt (118). Direkt postnatal findet sich ein ungeordnetes Gefüge aus

horizontal, vertikal und diagonal angeordneten und verbundenen Kapillaren. Ab Ende der ersten Lebenswoche beginnt die Bildung der Kapillarloops. Zuvor sind diese nur an Handflächen, Fußsohlen und Nagelfalz zu finden. Ein adultes dermales Gefäßmuster mitsamt Kapillarloops und der Entstehung des subpapillaren Plexus wird etwa im dritten Lebensmonat erreicht. Externe Kälteexposition, Hämatokrit, Sauerstoffpartialdruck und Blutdruck sind wichtige Faktoren dieser Veränderungen (119).

Postnatale Veränderungen konnten auch anhand mikrozirkulatorischer Parameter nachgewiesen werden. So nimmt die Dichte kleiner Gefäße in den ersten Lebensmonaten deutlich ab (120, 121). Die wenigen weiteren pädiatrischen/neonatologischen Studien beschäftigen sich unter anderem mit der Mikrozirkulation bei Frühgeburtlichkeit (122-124), Infektionen (37, 114), respiratorischem Versagen (125), Diabetes mellitus (82) und angeborenen Herzfehlern (126).

1.5. Hypothese und Zielsetzung

Neben der Untersuchung der Mikrozirkulation rückte in jüngerer Zeit die Evaluation der endothelialen Glykokalyx durch Videomikroskopie ins Interesse der Forschung. Bisher existieren dazu vornehmlich Studien an Erwachsenen.

Das Ziel dieser Arbeit ist die Evaluation der endothelialen Glykokalyx durch Bestimmung der Perfused Boundary Region (PBR) – einem indirekten Parameter zur Beurteilung der Glykokalyxdicke – sowie mikrozirkulatorischer Parameter bei gesunden, reifen Neugeborenen am 3. bzw. 4. Lebenstag. Die Durchführung erfolgte mithilfe videomikroskopischer Messungen mit der Sidestream Dark-Field imaging Methode.

Um Pathologien und Veränderungen zum Beispiel im Rahmen einer Sepsis oder bei Frühgeburtlichkeit zu erkennen bedarf es primär einer Definition von Normalwerten anhand einer gesunden, reifgeborenen Kontrollkohorte, die weiteren Studien als Referenzwert zu Grunde liegen können.

Folgende Fragestellungen sollten im Detail untersucht werden:

- Ist eine endotheliale Glykokalyx bei Reifgeborenen in der Mikrozirkulation an der Ohrmuschel visualisier- und messbar?
- Was sind durchschnittliche Glykokalyxwerte bei männlichen und weiblichen Neugeborenen?
- Beeinflusst der Geburtsmodus die Glykokalyxdicke?
- Gibt es einen statistischen Zusammenhang zwischen Glykokalyxdicke und Glucosewerten im Serum?
- Korrelieren Glykokalyxdicke und Gefäßdicke bzw. Durchblutung?
- Ist diese Messmethode bedside-fähig und geeignet für den Einsatz im klinischen Alltag?
- Wie gut stimmt die Messung zwischen zwei unterschiedlichen Untersuchern überein?

2. Material und Methoden

2.1. Studiendesign

Es erfolgte eine prospektive, monozentrische Beobachtungsstudie am Perinatalzentrum Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München. Für den Zeitraum von Dezember 2013 bis Januar 2016 wurden etappenweise Mikrozirkulationsmessungen an Neugeborenen der Wöchnerinnenstation nach Einverständnis der Eltern durchgeführt um die zuvor aufgeführten Fragestellungen genauer zu untersuchen. Jede Messung erfolgte nach einem genauen Ablaufplan zu einem definierten Zeitpunkt im „Allgemeinen Kinderzimmer“ des Perinatalzentrums. Diese nicht-invasive Videomikroskopie hatte keinerlei Auswirkungen auf die medizinische Versorgung der Studienpatienten oder den Ablauf des Krankenhausaufenthalts.

2.2. Patientenkollektiv

2.2.1. Patientenrekrutierung

Neugeborene am Perinatalzentrum Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München wurden entsprechend folgender Kriterien in die Studie eingeschlossen.

Einschlusskriterien:

- Gesunde Neugeborene mit einem Gestationsalter $\geq 37+0$ SSW
- Unterzeichnete Einverständniserklärung der Eltern

Ausschlusskriterien (teils aufgrund technischer Limitationen):

- Frühgeborene $< 37+0$ SSW
- Hämodynamisch relevante Herzerkrankungen
- Vermutete oder bestätigte Chromosomenanomalien/syndromale Erkrankungen
- Lebensbedrohliche Erkrankungen
- Phototherapiepflichtige Hyperbilirubinämie
- Neugeborene mit pigmentierter Haut
- Fehlende Einverständniserklärung der Eltern

2.2.2. Ethikantrag, Aufklärung und Einverständnisse

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München genehmigt.

Bei allen Studienpatienten erfolgte mindestens einen Tag vor der Messung eine mündliche Aufklärung der Eltern über den genauen Versuchsablauf. Zusätzlich erhielten die Eltern eine schriftliche Elterninformation (siehe Anhang). Die Teilnahme war freiwillig und vollkommen unabhängig von der generellen medizinischen Versorgung. Erst nach Erhalt der unterzeichneten Einverständniserklärung erfolgten die Mikrozirkulationsmessungen. Das Einverständnis konnte zu jeder Zeit problemlos zurückgezogen werden. Den Eltern wurde freigestellt bei den Messungen anwesend zu sein. Jeder Studienpatient erhielt eine Patienten ID, so dass Messwerte und Patienteninformationen pseudonymisiert dokumentiert werden konnten.

2.3. Methode

2.3.1. Messarbeitsplatz

Die bettseitige Darstellung der kutanen Mikrozirkulation an der Ohrmuschel erfolgte über ein Sidestream Dark-Field Videomikroskop (MicroScan®, MicroVision Medical, Amsterdam, Niederlande), das mit einer Software für Glykokalyxmessungen (GlycoCheck™ B.V., Maastricht, Niederlande) verbunden war. Die einzelnen Messgeräte waren zur besseren Handhabung und zum Transport auf einem Rolltisch aufgebaut (siehe Abbildung 6).

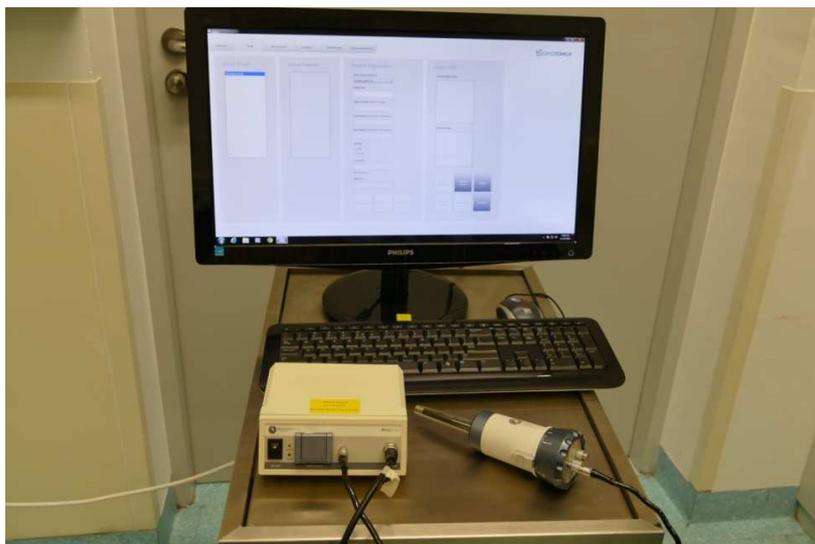


Abbildung 6: Aufbau der Messgeräte

2.3.1.1. SDF Videomikroskop

Das von MicroVision Medical gebaute Videomikroskop MicroScan® ist ein häufig für Mikrozirkulationsmessungen verwendetes Gerät. Hierbei wurde die SDF imaging Technologie in ein handliches, tragbares Videomikroskop eingebaut, das problemlos am Patientenbett angewandt werden kann (siehe Abbildung 7) (113).



Abbildung 7: MicroScan Videomikroskop

Wie in Kapitel 1.3.2. bereits beschrieben senden sechs an der Kameraspitze angebrachte Leuchtdioden (siehe Abbildung 8b) gepulstes grünes Licht synchron zur Bildfrequenz aus. Das Hämoglobin der Erythrozyten absorbiert Licht dieser Wellenlänge unabhängig des Oxygenierungsstatus. Das gestreute Licht, das zur Bildentstehung beiträgt, gelangt in den bildverarbeitenden Teil der Kamera zurück und wird über eine 5-fache Vergrößerungslinse (mit 0.2 NA) der Videokamera zugeführt. Die roten Blutkörperchen stellen sich dunkel dar, das umliegende Gewebe in Grautönen, die Gefäßwand selbst ist nicht abgrenzbar. Die Auflösung der MicroScan® Kamera beträgt $\sim 1,3 \mu\text{m}/\text{Pixel}$. Die Mikrozirkulationsvideos wurden mit einer Bildfrequenz von 25 fps aufgenommen und haben 720×576 Pixel. Das Beobachtungsfeld in vivo beträgt somit ungefähr $0,94 \times 0,75$ mm. Die Kamera ist über eine zwischengeschaltete Stromquelle mit dem Computer (Cooler Master Technology Inc., New Taipei City, Taiwan) verbunden. Hierauf wurden die Bildsequenzen gespeichert und mithilfe der GlycoCheck™ Software automatisch analysiert. Am Monitor war zeitgleich die Darstellung der Mikrozirkulation möglich. Beleuchtungsintensität und Fokus mussten vom Untersucher manuell am Videomikroskop eingestellt und justiert werden (siehe Abbildung 8a) (99, 101, 107, 127). Zur Stromversorgung war die Kamera mit einer Battery Unit verbunden, die eine Laufzeit von über 12 Stunden hatte und nachts aufgeladen wurde (siehe Abbildung 8b).

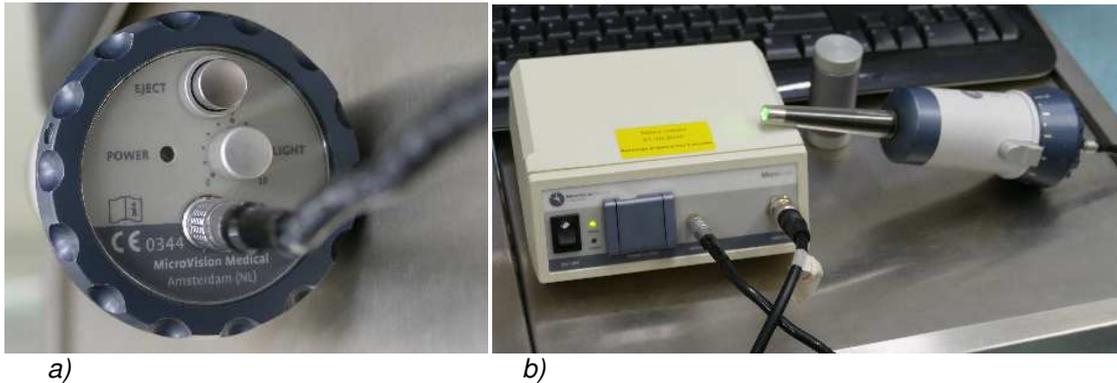


Abbildung 8:
 a) MicroScan Videomikroskop mit den Justiermöglichkeiten für Beleuchtung und Fokus
 b) MicroScan Videomikroskop mit Battery Unit und Kalibriereinheit

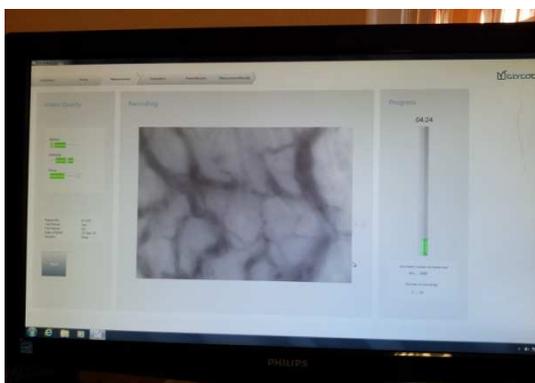
2.3.1.2. GlycoCheck™ Software

Die GlycoCheck™ Software (GlycoCheck™ B.V., Maastricht, Niederlande) bietet die Möglichkeit einer automatischen on-line Analyse der mikrozirkulatorischen Videosequenzen. Im Vordergrund steht die Bestimmung der endothelialen Glykokalyx. Während der Aufzeichnung kontrolliert das Programm stetig die Qualität der Aufnahmen anhand von Bewegung, Lichtintensität und Fokus. Fokus und Belichtung müssen hierbei durch den Untersucher manuell an der Videokamera eingestellt werden (siehe Abbildung 8a). Balken mit grünem Signal zeigen dem Untersucher den Zielbereich an. Ist dieser erreicht, beginnt das Programm selbständig mit der Videoaufzeichnung (siehe Abbildung 9a). Hierbei ermittelt das System alle dargestellten kleinen Gefäße mit einem Durchmesser von 5 – 25 μm . Die bestimmten Gefäße werden in 10 μm lange Gefäßsegmente (vascular segments) geteilt (siehe Abbildung 9b). Daraufhin wird eine Sequenz von 40 Bildern mit durchschnittlich 300 Gefäßabschnitten aufgezeichnet. Durch Kamerabewegungen wird der Messort leicht verändert. Somit werden ca. 10 Videosequenzen an verschiedenen Positionen mit je 40 Bildern aufgenommen. Nach ca. 1-2 Minuten, wenn mit über 3000 die erforderliche Anzahl an Gefäßsegmenten aufgezeichnet wurde, ist die Messung beendet. Direkt im Anschluss erfolgt die Bildanalyse mit einer Dauer von ca. 3 Minuten. Zunächst testet das Programm auf gerade Gefäßabschnitte und eine ausreichende Erythrozytenmenge und sortiert unbrauchbare Segmente aus: in jedem ersten Bild wird jedes Gefäßsegment alle 0,5 μm durch insgesamt 21 sogenannte line markers (Markierungslinien) unterteilt. Nur diejenigen Gefäßsegmente, die in mehr als 60% der line markers mit Erythrozyten gefüllt sind und damit aufgrund der Durchblutung ausreichend kontrastiert werden, werden als „valid vascular segments“ bezeichnet (siehe Abbildung 9c). Die Valid Vessel Density errechnet sich dann

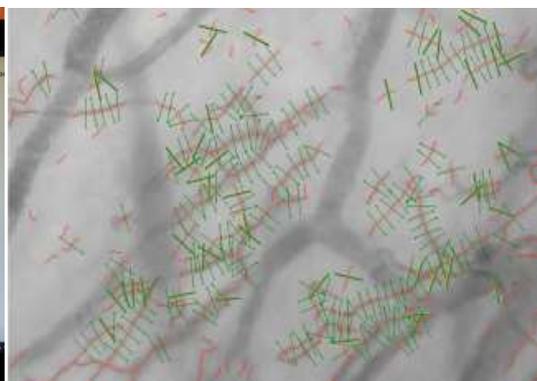
aus der Multiplikation der „valid vascular segments“ pro Bildfläche mit 10 µm, der Länge jedes Gefäßsegments. In einem zweiten Schritt berechnet die Software den prozentualen Anteil der Gefäßsegmente (nur aus der Menge der valid vessel segments), die während allen 40 Bildern mit Erythrozyten gefüllt waren. Hieraus ergibt sich die RBC filling percentage.

Im Weiteren werden für alle gültigen Gefäßabschnitte 840 radiale Intensitätsprofile erstellt (= 21 line markers x 40 Bilder). Hierüber lassen sich dann die durchschnittliche Breite der Erythrozytensäule (RBCW = P50) und weiter über eine lineare Regressionsanalyse die maximale luminale Ausbreitung der roten Blutzellen zur Gefäßwand hin (Dperf) bestimmen. Die Glykokalyx begrenzt die lateralen in Richtung der Gefäßwand orientierten Bewegungen der Erythrozyten. Die maximale Ausbreitung der Erythrozyten und somit der maximale Durchmesser der Erythrozytensäule (Dperf) werden durch die Glykokalyx limitiert. Diese besteht aus einem undurchlässigen Bereich, der direkt dem Endothel aufliegt und dem luminal gelegenen für Zellen zugänglichen Bereich. Bei Beeinträchtigungen der Glykokalyx wie Abbau oder Schädigung können sich die Erythrozyten weiter Richtung Gefäßwand ausbreiten. Dperf vergrößert sich somit und auch der permeable Anteil der endothelialen Glykokalyx (PBR) wird größer, da die roten Blutzellen tiefer in die Glykokalyx eindringen können. Eine größere PBR (Perfused Boundary Region) steht demnach für eine beeinträchtigte Glykokalyx und ein angreifbareres Endothel. Die Perfused Boundary Region ist definiert als der Abstand zwischen mittlerer Breite der Erythrozytensäule (RBCW) und dem äußersten Rand der von Erythrozyten perfundierten Gefäßbreite (Dperf): $PBR = (Dperf - RBCW) / 2$ (siehe Abbildung 9d und 9e). Die Software berechnet letztendlich einen einzigen PBR-Wert pro Patient als Durchschnittswert der PBR-Werte in Gefäßen von 5 – 25 µm. Alle ermittelten Parameter wurden im Microcirculatory Report zusammengefasst und gespeichert (128-130).

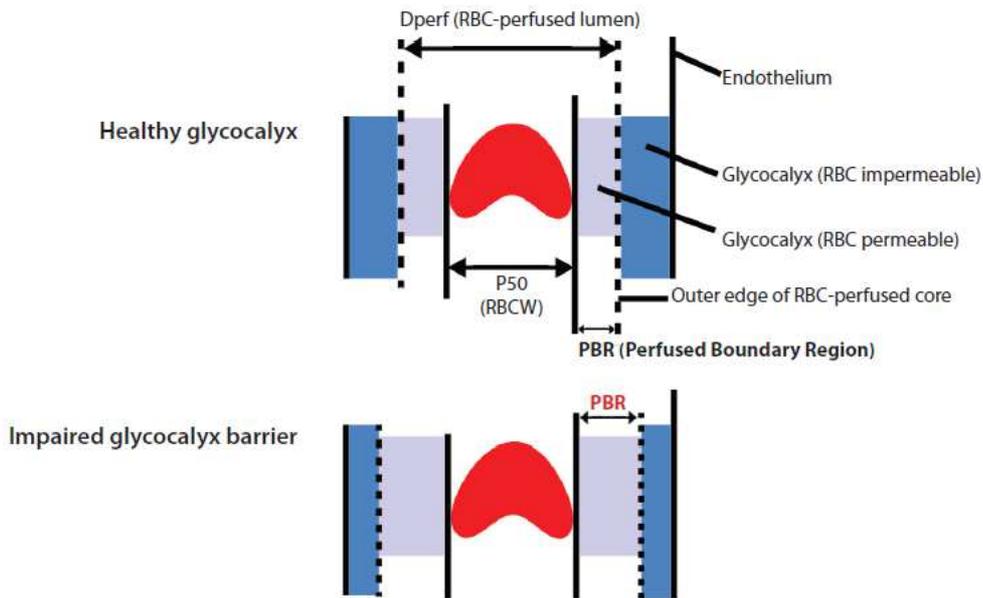
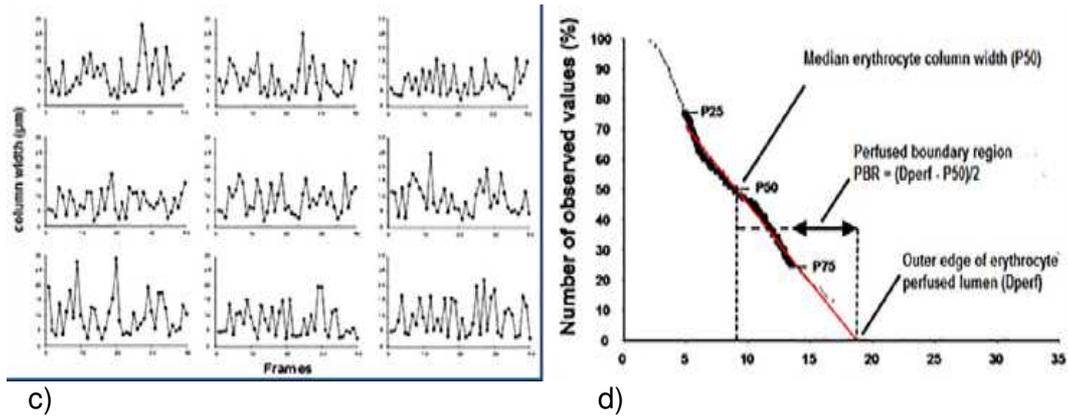
Zusätzlich fand immer eine Sicherungskopie auf einer externen Festplatte statt.



a)



b)



e)

Abbildung 9: GlycoCheck™ Software

a) Mikrozirkulationsmessung bei einem männlichen Säugling am 3. LT, SSW 39+5, GG 3920g
 b) aus Lee et al. (129), grüne Linien begrenzen die von der Software automatisch alle 10 µm eingeteilten vascular segments

c) aus Jaarsma et al. (131), Darstellung von 9 der 21 line markers entlang eines Gefäßabschnitts zur Bestimmung der Breite der Erythrozytensäule für insgesamt 40 Bilder

d) aus Jaarsma et al. (131), über die in den bis zu 840 radialen Intensitätsprofilen ermittelte mittlere Breite der Erythrozytensäule wird die Perfused Boundary Region berechnet

e) aus GlycoCheck Whitepaper (128), schematische Darstellung der Perfused Boundary Region und der einzelnen für ihre Berechnung notwendigen Variablen

2.3.2. Versuchsablauf und Messung

Die Mikrozirkulationsmessungen fanden jeweils am dritten oder vierten Lebenstag (innerhalb der 36. - 72. Lebensstunde) im „Allgemeinen Kinderzimmer“ des Perinatalzentrums Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München vor oder nach der morgendlichen pflegerischen Routine in Zusammenhang mit der Abnahme des Neugeborenen-Screenings auf angeborene Stoffwechselerkrankungen statt. Nach Erhalt der elterlich unterzeichneten Einverständniserklärung wurde der Messzeitpunkt so koordiniert, dass er möglichst kurz nach der letzten Mahlzeit stattfand und die Patienten somit meist zufrieden und ruhig geschlafen haben. Im Vorhinein wurde der Messarbeitsplatz vorbereitet: der Computer wurde hochgefahren, die GlycoCheck Software geöffnet und die Kamera in den batteriebetriebenen Modus geschaltet. Hierauf folgte die Kalibrierung. Mithilfe einer dem MicroScan® Videomikroskop zugehörigen Kalibriereinheit wurde die horizontale und vertikale Pixelanzahl bestimmt sowie Fokussierung, Bildschärfe und Sensitivität der Kamera eingestellt. Vor jedem neuen Patienten erfolgte eine gründliche Desinfektion der Messgeräte, vor allem der Videokamera. Zudem wurde eine sterile Einmalschutzkappe (MicroScan Lens von MicroVision Medical, Amsterdam, Niederlande) auf die Kameraspitze gesteckt. Dies dient einerseits dem Schutz der Kamera, andererseits schützt es die empfindliche Haut der Neugeborenen vor möglicher Überwärmung und verhindert potentielle Keimübertragung. Die kleinen Patienten blieben in ihren fahrbaren Bettchen liegen und wurden primär in Rückenlage teils auch in Seitenlage gelagert. Zur besseren Verbindung zwischen Haut und Kamera wurde ein kleiner Tropfen Kochsalzlösung 0,9% (B.Braun, Melsungen, Deutschland) auf die Haut gegeben. Die Mikrozirkulationsmessungen erfolgten an der Ohrmuschel zwischen Helix und Crus anthelicis superius und inferius im Bereich der Scapha bis zur Fossa triangularis. Um Bewegungsartefakte zu minimieren stützte sich der Untersucher mit den Unterarmen am Rand des Babybettchens ab (siehe Abbildung 10).





Abbildung 10: Mikrozirkulationsmessung bei einem männlichen Neugeborenen (40+0 SSW, GG 3875g) am 4. Lebenstag

Nach manueller Einstellung von Fokus und Belichtung ist es essentiell das Gerät für ca. 10 – 20 Sekunden so stabil und ruhig wie möglich zu halten um eine möglichst gute Bildqualität während der Aufnahme zu erhalten. Ein weiteres Problem stellen Luftblasen, Haare sowie zu großer Druck dar. Zur Beseitigung der Luftblasen bzw. Haare bedarf es eines leichten Positionswechsels zur Seite. Durch zu hohen Anpressdruck kommt es primär zu exogen bedingten Veränderungen der Mikrozirkulation in den Kapillaren. Um dies zu vermeiden übt man initial so starken Druck auf die Untersuchungsfläche aus, dass man am Monitor eine deutliche Verlangsamung bis hin zum Abbruch der Durchblutung sehen kann. Dann reduziert man den Druck bis der Kontakt mit der Hautoberfläche verloren geht um danach sehr vorsichtig so viel Druck auszuüben bis gerade der Kontakt zwischen Kamera und Hautoberfläche wieder hergestellt ist (132).

Eine Messung dauerte vom ersten Hautkontakt bis zur vollständigen Aufnahme zwischen 1 und 3 (maximal 5) Minuten. Pro Patient wurden insgesamt 3 (maximal 5) aufeinanderfolgende Messungen durchgeführt. Bei jeder Messung waren zwei Untersucher anwesend, einer hielt die Kamera und führte die Messung aus, der andere bediente den Computer und kümmerte sich um den Patienten (klinischer Zustand, Lagerung, Schnuller, vorsichtiges Festhalten z.B. eines Armes oder des Kopfes). Nach Beendigung der Messung wurde der Kochsalztropfen mit einem Tupfer abgewischt.

Alle Messungen wurden gut toleriert, es kam dabei zu keinerlei Komplikationen.

Im Anschluss wurden direkt die mikrozirkulatorischen Parameter generiert.

Grundsätzlich wurde ein Patient vom gleichen Untersucher gemessen. Die Untersucher wechselten sich zwischen den aufeinanderfolgenden Patienten ab. Bei insgesamt 9 Patienten führten beide Untersucher je 3 Messungen hintereinander durch um eine mögliche Untersucherabhängigkeit zu prüfen.

2.3.3. Blutgasanalyse

Zeitnah zu jeder Mikrozirkulationsmessung erfolgte eine Blutgasanalyse. Um den kleinen Patienten eine medizinisch nicht-indizierte Blutabnahme zu ersparen, wurde im Rahmen der Blutabnahme für den Stoffwechselltest mit Einverständnis der Eltern zusätzlich in einer 175 µl heparinisierten Kunststoffkapillare (Sarstedt AG und Co. KG, Nümbrecht, Deutschland) Blut für eine Blutgasanalyse gewonnen. Wenn aus Zeitgründen die Blutabnahme durch die Schwestern erfolgte, wurde kapillär (Safety-Lanzette Normal 21G, Sarstedt AG und Co. KG, Nümbrecht, Deutschland) an der Ferse gestochen. Durch die Untersucher erfolgte die Blutentnahme venös an Handrücken, Füßchen oder Kopf mithilfe einer Einmalkanüle (BD Microlance3 20G, Becton Dickinson & Co., Drogheda, Irland). Die Blutgasanalyse erfolgte durch das Gerät Radiometer ABL 800 Flex (Radiometer GmbH, Krefeld, Deutschland). Bestimmt wurden: pH-Wert, Gasverteilung (Partialdruck von Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid), Bicarbonat, Base Excess (BE), Hämoglobin und Hämoglobinderivate, Bilirubin gesamt, Elektrolyte (Natrium, Kalium, Calcium, Chlorid), Laktat und Glucose.

2.4. Messparameter

2.4.1. Messparameter der Mikrozirkulation

Folgende Parameter wurden mithilfe der GlycoCheck Software ermittelt (129, 133).

Perfused Boundary Region (PBR)

Der PBR-Wert ist ein inverser Parameter der Glykokalyxdicke, welcher über die maximale seitliche Ausbreitung der Erythrozyten bestimmt wird. Die genaue Berechnung ist unter 2.3.1.2. erläutert. Die Einheit beträgt μm .

Red Blood Cell filling (RBC filling)

Das RBC filling wird in Prozent angegeben und stellt (gemeinsam mit der VVD, siehe unten) einen Schätzwert für die aktuelle Perfusion dar. Sie gibt den prozentualen Anteil der Gefäßabschnitte an (gemessen anhand der 21 sogenannten line markers pro Segment), in denen in allen 40 Bildern Erythrozyten vorhanden sind. Es wird somit prozentual die Zeit angegeben, in der ein bestimmter Gefäßabschnitt durchblutet ist.

Total Vessel Density (TVD)

Die TVD definiert die Länge aller automatisch identifizierten Gefäßsegmente (mit guter und schlechter Durchblutung) pro mm^2 der beobachteten Gewebefläche. Die Einheit beträgt $\mu\text{m}/\text{mm}^2$.

Valid Vessel Density (VVD)

Die VVD ist die Teilmenge der TVD, die nur Gefäßsegmente mit einem RBC filling $\geq 50\%$ (bzw. $\geq 60\%$, unterschiedliche Angaben in der Literatur zu finden, siehe 4.2.) im ersten Bild der Videoaufzeichnung beinhaltet. Auch sie wird in $\mu\text{m}/\text{mm}^2$ angegeben.

p50 / Red Blood Cell Width (RBCW)

Durchschnittliche Breite der Erythrozytensäule. Dieser Wert wird in μm angegeben.

2.4.2. Klinische Daten

Für jeden Studienpatienten wurden folgende klinische Daten vom Tag der Messung aus der Patientenkurve entnommen: Lebensstag, aktuelles Körpergewicht, Körpertemperatur (rektale Messung) und gegebenenfalls antibiotische Therapie. Allgemeine Informationen wie

Geburtsdatum und –uhrzeit, Geschlecht, Gestationsalter bei Geburt, errechneter Termin, Entbindungsmodus, Geburtsdauer, Dauer Blasensprung bis Geburt, mögliche Komplikationen sowie Daten zum Neugeborenen (Geburtsgewicht, Körperlänge, Kopfumfang, Apgar-Wert nach 1, 5 und 10 Minuten, Nabelarterien pH) konnten anhand des Kreissaal-Berichts dokumentiert werden. Zusätzlich wurden von den Müttern der Studienkinder Vorerkrankungen und Entbindungsrisiken erfasst.

2.5. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, San Diego, Kalifornien, Vereinigte Staaten) für Windows und Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, Vereinigte Staaten). Pro Patient erfolgten 3 (maximal 5 Messungen), wovon die Mittelwerte der Mikrozirkulationsdaten für die statistische Analyse verwendet wurden.

Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ angenommen. Alle kontinuierlichen, normalverteilten Variablen wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) angegeben und in Excel berechnet.

Folgende statistische Tests wurden verwendet:

- D'Agostino & Pearson omnibus normality test: zur Beurteilung der Normalverteilung einer Studienpopulation (1. Wahl)
- Shapiro-Wilk normality test: zur Beurteilung der Normalverteilung einer Studienpopulation (2. Wahl)
- Unpaired t-Test / Welch-Test: zum Vergleich zweier normalverteilter, ungepaarter Populationen
- Wilcoxon rank sum test / Mann Whitney-U-test: zum Vergleich zweier Populationen bei fehlender Gauß-Verteilung
- Bland-Altman-Plot: zur Darstellung der interrater und intrarater Reliabilität
- Korrelationsanalyse nach Pearson: zur Untersuchung des linearen Zusammenhangs zweier normalverteilter Parameter
- Korrelationsanalyse nach Spearman: zur Untersuchung des linearen Zusammenhangs zwischen zwei nichtparametrischen Parametern
- One-way ANOVA mit post hoc Dunn's Multiple Comparison Test: zum Vergleich mehrerer Gruppen

3. Ergebnisse

3.1. Patientenkollektiv

In diese Studie konnte eine Gesamtheit von 85 reifen Neugeborenen eingeschlossen werden. Hiervon waren 43 weibliche und 42 männliche Neugeborene, darunter befand sich ein dichoriales-diamniales Zwillingspärchen.

3.1.1. Klinische Daten

68 Neugeborene wurden vaginal entbunden, darunter 8 vaginal operativ durch Vakuumentextraktion. Aufgrund von Geburtsrisiken wie pathologischem CTG, Geburtsstillstand oder hohem Geradstand (10 x), Lageanomalie bei Beckenendlage (1x), Zustand nach vorausgegangener Sectio / Sectiones (5 x) sowie einmal auf Wunsch erfolgte die Geburt bei 17 Studienpatienten per primärer oder sekundärer Sectio caesarea.

Da für diese Studie nur reife Neugeborene rekrutiert wurden, betrug das geringste Gestationsalter 37 + 0 Schwangerschaftswochen. Das Höchste lag bei 42 + 0 Schwangerschaftswochen (bestimmt anhand der letzten Periode der Mutter). Im Mittel lag das Gestationsalter bei Geburt bei 40,1 ± 1,1 Schwangerschaftswochen.

Tabelle 1 zeigt die wichtigsten klinischen Daten bei Geburt.

Für ein Kind bestehen keine Informationen zu Apgar-Wert und Nabelschnur pH, da es sich um eine Hausgeburt handelte.

Insgesamt 5 Kinder waren SGA (small for gestational age), da sie ein Geburtsgewicht kleiner der 10. Perzentile hatten. Da die Rate an SGA Kindern bei nur 5,88% lag, erschien eine Stratifizierung SGA versus AGA (appropriate for gestational age, Geburtsgewicht 10. - 90. Perzentile) nicht sinnvoll.

	Min	Max	Mittelwert ± SD
Geburtsgewicht (g)	2090	4325	3512 ± 448
Körperlänge (cm)	44	57,5	51,6 ± 2,6
Kopfumfang (cm)	32	38	35,1 ± 1,3
Apgar Min. 1	3	10	9,0 ± 1,2
Min. 5	8	10	9,8 ± 0,5
Min. 10	8	10	10 ± 0,2
Nabelschnur pH	7,03	7,46	7,29 ± 0,09

Tabelle 1: Patientenkollektivdaten zur Geburt n=85 bzw. Apgar und NS pH n=84

Klinische Daten der Neugeborenen, die zum Zeitpunkt der Mikrozirkulationsmessung erhoben wurden, sind in Tabelle 2 dargestellt.

Bei 67 Kindern fand die Messung am dritten Lebenstag statt, bei 18 am vierten Lebenstag. Es zeigte sich ausgehend vom Geburtsgewicht ein physiologischer Gewichtsverlust in den ersten Lebenstagen.

6 Kinder erhielten zum Zeitpunkt der Messung angesichts einer Neugeboreneninfektion eine antibiotische Therapie mit Ampicillin (150 mg/kgKG/d in 3 ED) und Cefotaxim (150 mg/kgKG/d in 3 ED) intravenös sowie zur Pilzprophylaxe Nystatin (3 x 0,5 ml/d) per os. Alle Neugeborene zeigten sich in gutem Allgemeinzustand und waren kardiorespiratorisch stabil, so dass sie keine weitere Überwachung benötigten.

	Min	Max	Mittelwert ± SD
aktuelles Gewicht (g)	1950	4110	3333 ± 438
Kerntemperatur (°C)	36,6	38,0	37,1 ± 0,3

Tabelle 2: Patientenkollektivdaten zum Messzeitpunkt n=85

3.1.2. Laborchemische Daten

In den zeitnah zu den Mikrozirkulationsmessungen durchgeführten Blutgasanalysen ergaben sich keine großen Auffälligkeiten. Bei 4 von 85 Patienten konnte aufgrund technischer Probleme wie zum Beispiel Gerinnselbildung oder Luftblasen keine Blutgasanalyse durchgeführt werden. Zwei weitere Astrupanalysen waren unvollständig, in zwei Fällen konnte Kalium nicht bestimmt werden und weitere dreimal wurde kein Bilirubinwert berechnet.

Insgesamt erfolgte die Blutabnahme bei 43 Studienpatienten venös und 36 mal kapillär. Bei zwei Blutentnahmen wurde der Modus nicht dokumentiert (siehe Abbildung 11).

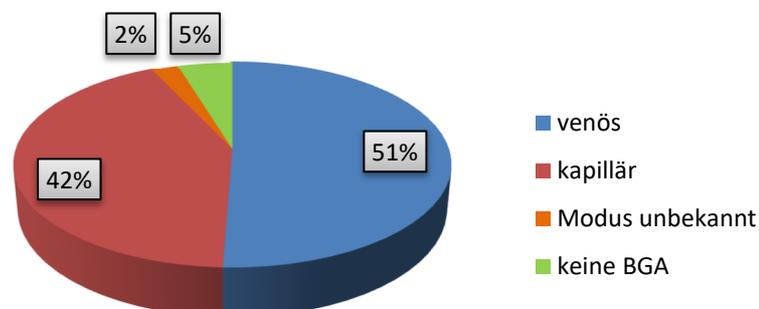


Abbildung 11: Modus der Blutgasanalyse n=85

In Tabelle 3 ist eine Übersicht der Blutgasparameter mit jeweiligem Mittelwert und Standardabweichung dargestellt. Die Mittelwerte entsprechen den Normwerten für reifgeborene Kinder (134). Eine ausführliche Auflistung mit Minimal- und Maximalwerten findet sich im Anhang (Seite 80). Zusätzlich findet sich dort auch eine Darstellung der Blutgaswerte aufgeteilt entsprechend des Blutabnahmemodus. So unterscheiden sich unter anderem Hämatokritwerte, Kohlenstoff- und Sauerstoffpartialdrücke bei venöser und kapillärer Abnahme. Der kapillär abgenommene Hämatokrit ist beispielsweise signifikant höher als der venös gewonnene ($p < 0,0001$) (siehe Abbildung 12).

a)

	Na ⁺ mmol/L	K ⁺ mmol/L	Ca ⁺⁺ mmol/L	Cl ⁻ mmol/L
mean ± SD	139 ± 4	4,9 ± 0,8	1,22 ± 0,06	111 ± 4

b)

	pH	pCO ₂ mmHg	pO ₂ mmHg	BE mmol/L	HCO ₃ ⁻ mmol/L
mean ± SD	7,40 ± 0,04	36,0 ± 5,5	43,7 ± 11,4	-2,0 ± 1,8	22,6 ± 1,5

c)

	Lak mmol/L	Gluc mg/dL	Bili mg/dL	Hb g/dL	Hkt %
mean ± SD	2,3 ± 0,8	69 ± 11	9,3 ± 3,5	19,3 ± 2,8	59 ± 8

Tabelle 3: Mittelwerte der Blutgasanalysewerte mit Standardabweichung:

a) Elektrolyte b) Gasverteilung c) weitere Parameter

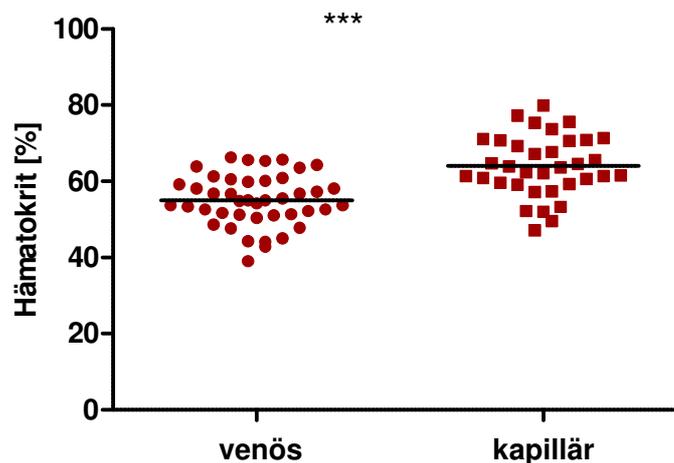


Abbildung 12: Hämatokrit [%] venös vs. kapillär, $p < 0,0001$

3.2. Messparameter der Mikrozirkulation

Bei den 85 Studienpatienten erfolgten jeweils zwischen 3 und 5 Einzelmessungen. Für die weitere statistische Auswertung wurde für jedes Neugeborene pro Messparameter ein Mittelwert ermittelt. Messungen mit weniger als 2000 Sites oder extreme Ausreißer mit einer Abweichung von mehr als zweimal der Standardabweichung vom Mittelwert wurden gestrichen. Insgesamt wurden somit 305 einzelne Messungen in die Berechnungen einbezogen (bei 8 Kindern je 5 Messungen, bei 34 Kindern je 4 Messungen, bei 43 Kindern je 3 Messungen). Hierbei gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen Kindern, die am dritten und Kindern, die am vierten Lebenstag gemessen wurden.

Die Mittelwerte mit Standardabweichung der einzelnen Mikrozirkulationsparameter sind in Tabelle 4 aufgelistet.

	Min	Max	Mittelwert ± SD
PBR (µm)	1,53	2,68	2,14 ± 0,25
RBC filling (%)	49,9	85,5	70,1 ± 7,4
VVD (µm/mm²)	293	1149	687 ± 146
TVD (µm/mm²)	771	1953	1286 ± 227
p50 (µm)	9,04	15,46	11,72 ± 1,26

Tabelle 4: Mikrozirkulationsparameter, PBR und RBC filling n=85, VVD/TVD und p50 n=84 (aufgrund eines technischen Problems wurden bei einem Patienten keine VVD/TVD und p50-Werte angegeben)

3.3. Interrater und intrarater Reliabilität

Zur Berechnung der Übereinstimmung der Messungen wurden bei neun Studienpatienten je 3 Messungen von beiden Untersuchern durchgeführt. Den PBR-Wert betreffend gab es keinen relevanten Unterschied zwischen den Mittelwerten: bei Untersucher A betrug die PBR $2,26 \pm 0,23 \mu\text{m}$ und bei Untersucher B $2,20 \pm 0,29 \mu\text{m}$ ($p = 0,29$, $r = 0,84$). Die Interraterreliabilität wurde mittels des Bland-Altman-Diagramms dargestellt und zeigte eine gute Übereinstimmung der Messungen beider Untersucher. Die durchschnittliche Differenz (bias) der beiden PBR-Werte lag bei $0,059 \mu\text{m}$. Die 95% limits of agreement lagen zwischen $-0,25$ und $0,36$. Auch die Berechnung mit dem Pearson Korrelationskoeffizienten ergab eine signifikante Korrelation (Pearson $r = 0,84$, $p = 0,004$).

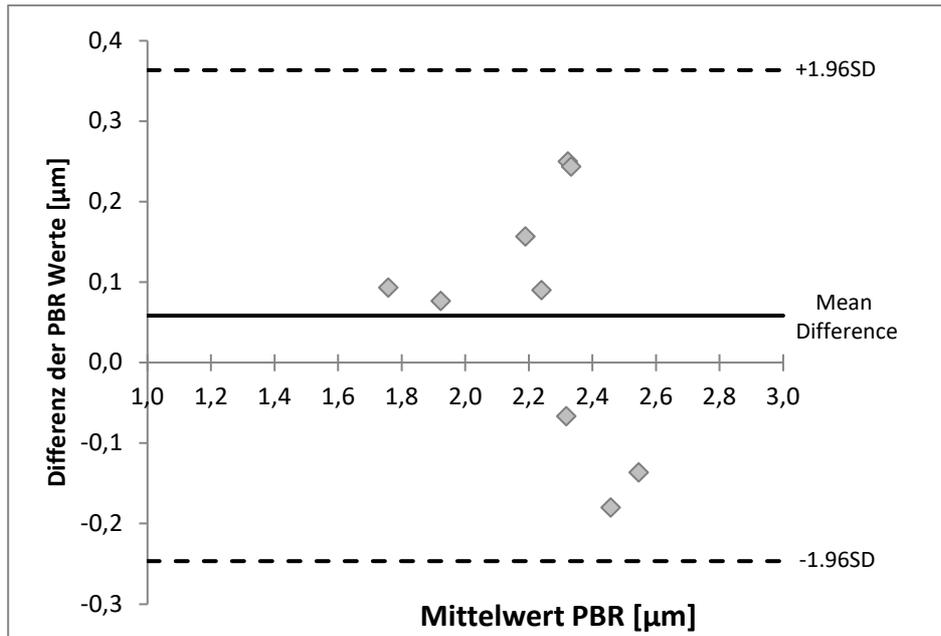


Abbildung 13: Bland-Altman Plot of Interrater Reliability: Differenz vs. Mittelwert

Um die Intrarater Reliabilität zu untersuchen wurden bei 9 Patienten 3 aufeinanderfolgende Messungen durch Untersucher B durchgeführt und der Variationskoeffizient berechnet. Der durchschnittliche Variationskoeffizient der PBR lag bei 7,3% (variiert zwischen minimal 1,5% und maximal 11,0%) und zeigte eine gute Übereinstimmung der Messungen.

3.4. Abhängigkeit der Mikrozirkulationsparameter vom Geschlecht

Aufgrund unterschiedlicher hormoneller und metabolischer Prozesse bei weiblichen und männlichen Individuen (135) sollte untersucht werden, ob das Geschlecht einen Einfluss auf die endotheliale Glykokalyxdicke hat. Hierfür wurden mithilfe des unpaired t-Tests die PBR-Werte von männlichen und weiblichen Neonaten verglichen. Eine Normalverteilung wurde zuvor durch den D'Agostino wie auch den Shapiro-Wilk normality test bestätigt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Geschlechtern ($p = 0,81$). Auch hinsichtlich der anderen Mikrozirkulationsparameter (RBC filling, VVD und TVD) erwiesen sich keine Unterschiede.

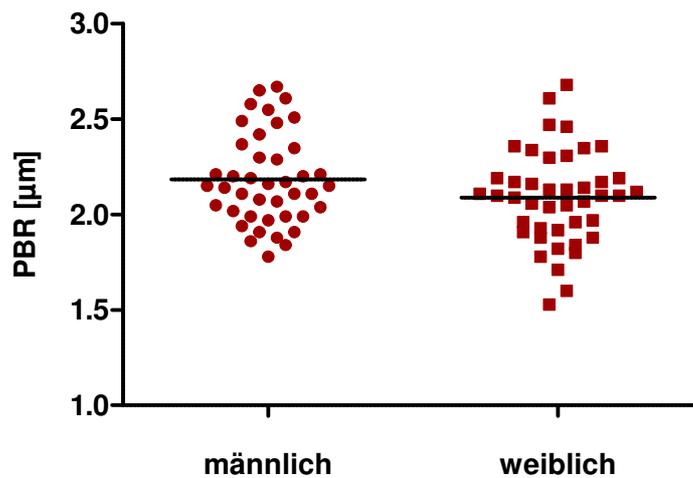


Abbildung 14: unpaired t-Test: Perfused Boundary Region [μm] männlich vs. weiblich, $p = 0,81$

3.5. Abhängigkeit der Mikrozirkulationsparameter vom Geburtsmodus

Die Geburt an sich stellt ein integrales Ereignis in der Neonatalperiode dar. Einige Studien zeigten signifikant erhöhte Werte an Sauerstoffradikalen und somit vermehrt oxidativem Stress bei Neonaten, die spontan geboren wurden im Gegensatz zu Kaiserschnittgeburten (136, 137). Um Glykokalyx- sowie Mikrozirkulationswerte zwischen spontan und per Sectio caesarea geborenen Kindern zu untersuchen, erfolgten bei Normalverteilung (bei PBR und VVD) die Testung auf statistische Differenz per unpaired t-Test und bei fehlender Normalverteilung (bei Kaiserschnittgeburten hinsichtlich RBC filling und TVD) per Wilcoxon rank sum test. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Geburtsmodi festgestellt werden.

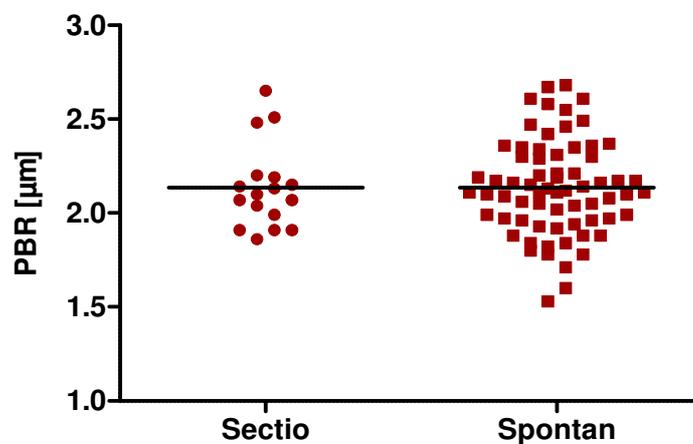


Abbildung 15: unpaired t-Test: Perfused Boundary Region [μm] Sectio vs. Spontangeburt, $p = 1,0$

3.6. Abhängigkeit der Mikrozirkulationsparameter von Blutgaswerten

3.6.1. PBR versus Glucose

Akute wie auch chronische Hyperglykämien führen zu einer Schädigung der endothelialen Glykokalyx (138). Studien konnten zeigen, dass eine akute Erhöhung der Blutzuckerlevel über eine Beeinträchtigung der Glykosaminoglykane zur Erhöhung der Gefäßpermeabilität führt (138).

Um nun bei unseren Patienten einen möglichen Zusammenhang zwischen Glykokalyxbeschaffenheit und aktuellem Blutzuckerlevel zu untersuchen, wurde eine Korrelationsberechnung durchgeführt. Hierbei zeigte sich keine Korrelation zwischen Glykokalyxbeschaffenheit und Glucosewert (Pearson $r = -0,10$ und Spearman $r = -0,09$).

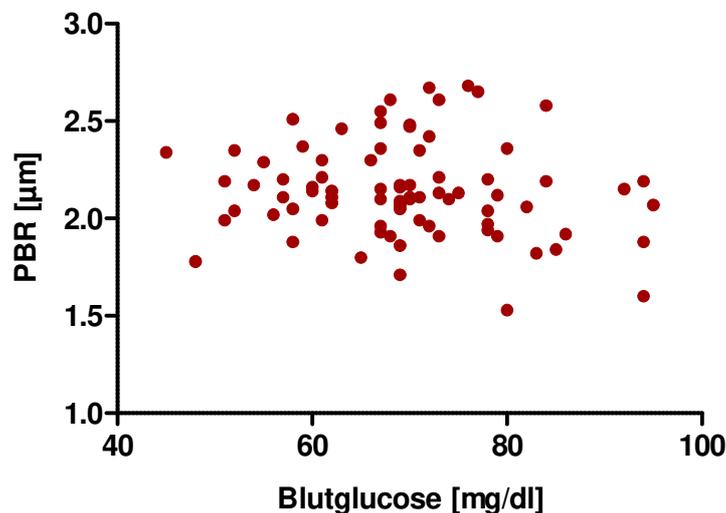


Abbildung 16: Blutglucosewert [mg/dl] vs. Perfused Boundary Region [µm], $p = 0,37$

3.6.2. PBR versus Hämatokrit

Da bei der SDF imaging Methode die Messung auf der Absorption von Licht durch das Hämoglobin der Erythrozyten beruht (139), sollte bei diesem Patientenkollektiv ein möglicher Zusammenhang zwischen der Mikrozirkulation und dem aktuellen Hämatokrit-Wert untersucht werden. Ähnlich dem Blutzuckerwert ließ sich auch hier kein direkter Zusammenhang zwischen Hämatokritwert des jeweiligen Patienten und der Perfused Boundary Region (kapillär: Pearson $r = 0,02$ und Spearman $r = -0,01$, venös: Pearson $r = 0,02$ und Spearman $r = 0,01$) oder anderen mikrozirkulatorischen Werten nachweisen.

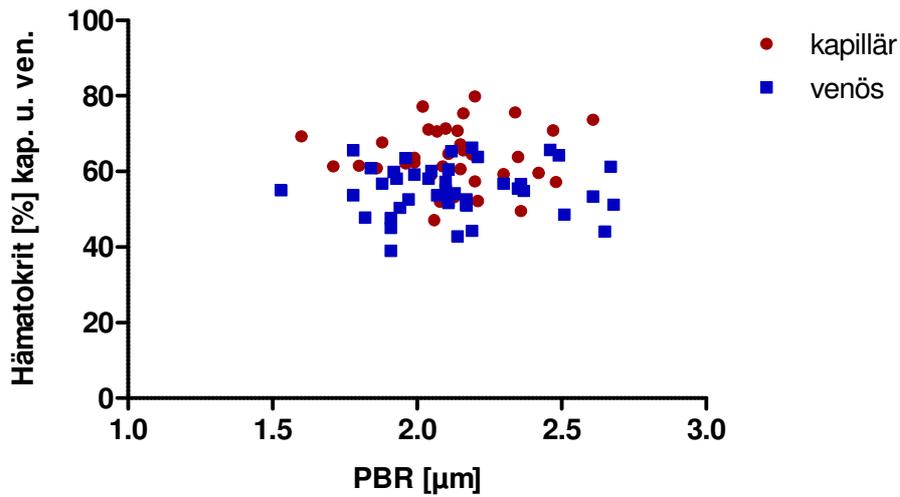


Abbildung 17: Perfused Boundary Region [μm] vs. Hämatokrit [%] kapillär u. venös,
 kap. $p = 0,92$ / ven. $p = 0,91$

3.7. Korrelation der einzelnen Mikrozirkulationsparameter

Tabelle 7 im Anhang zeigt eine Übersicht über die Zusammenhänge der einzelnen Mikrozirkulationsparameter. Diese werden im Folgenden noch genauer beleuchtet. Vor den einzelnen Korrelationsanalysen wurde stets auf Normalverteilung getestet.

3.7.1. PBR versus RBC filling

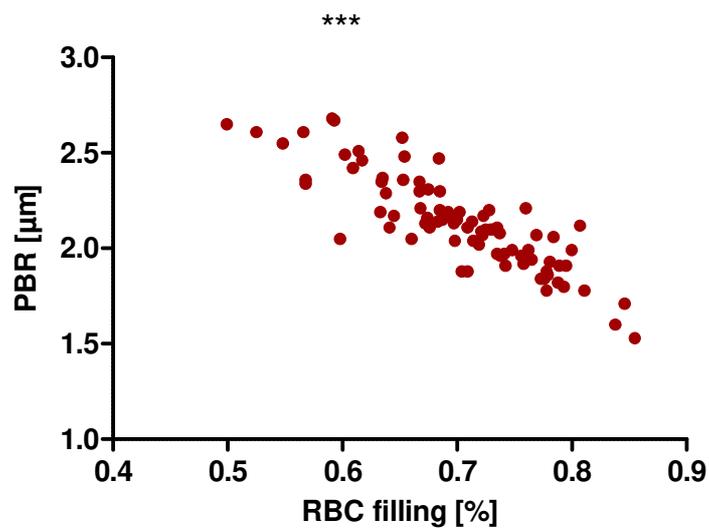


Abbildung 18: Red Blood Cell filling [%] vs. Perfused Boundary Region [μm], $r = -0,87$, $p < 0,0001$

Der dargestellte Graph zeigt eine statistisch signifikante negative Korrelation zwischen dem RBC filling und der PBR mit einem Korrelationskoeffizienten nach Pearson von -0,87 ($p < 0,0001$).

3.7.2. PBR versus VVD

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen Glykokalyxdicke und der zu einem bestimmten Prozentsatz durchbluteten Gefäßdicke zu untersuchen erfolgte auch hier eine Korrelationsanalyse nach Pearson. Zwischen der PBR und der VVD konnte ein negativer Zusammenhang nachgewiesen werden (Pearson $r = -0,41$, $p = 0,0001$).

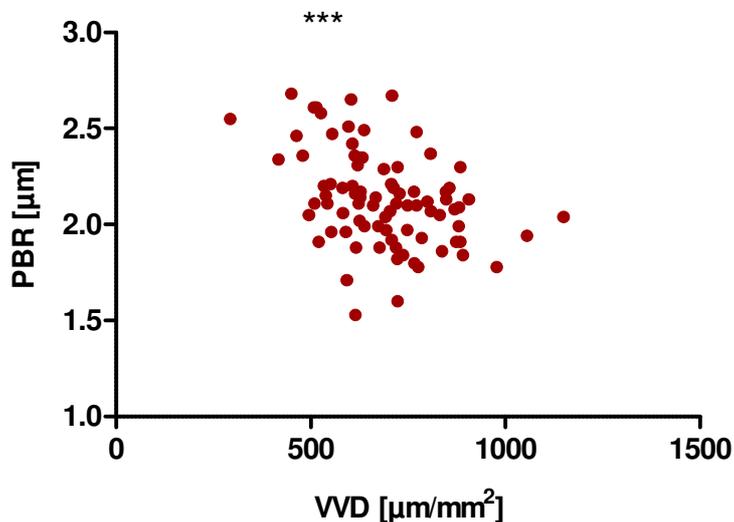


Abbildung 19: Valid Vessel Density [$\mu\text{m}/\text{mm}^2$] vs. Perfused Boundary Region [μm],
 $r = -0,41$, $p = 0,0001$

3.7.3. RBC filling versus VVD

Auch der Vergleich von RBC filling mit der Valid Vessel Density ergab einen signifikanten Zusammenhang bei der Korrelationsanalyse nach Pearson. So korrelierten RBC filling und VVD, die beide einen Schätzwert für die aktuelle Perfusion darstellen, positiv miteinander (Pearson $r = 0,46$, $p < 0,0001$).

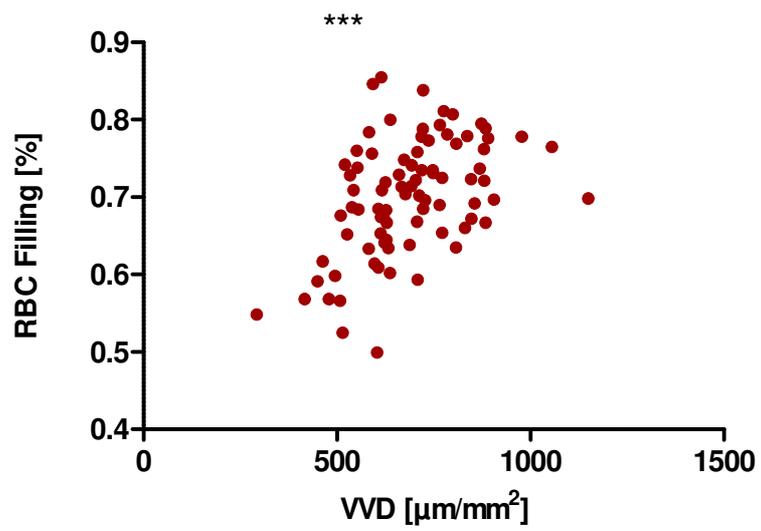


Abbildung 20: Valid Vessel Density [$\mu\text{m}/\text{mm}^2$] vs. Red Blood Cell filling [%],
 $r = 0,46, p < 0,0001$

3.8. PBR bei Frühgeborenen versus Reifgeborenen

Parallel zu der vorliegenden Arbeit wurden in einem weiteren Promotionsprojekt (von Frau Lea Rajwich) Messungen der Mikrozirkulation und der endothelialen Glykokalyx bei Frühgeborenen analog zu den hier dargestellten Messungen durchgeführt. Für den Vergleich der Daten Reifgeborener mit Frühgeborenen wurde für die Gruppe der Frühgeborenen auf die Daten von Frau Rajwich mit deren Genehmigung zurückgegriffen.

Eine one-way ANOVA gefolgt von einem post hoc Dunn's Multiple Comparison Test wurde benutzt um die PBR von extremen Frühgeborenen (< 30 + 0 SSW) mit der PBR moderater Frühgeborener (30 + 0 SSW bis 36 + 6 SSW) und mit der PBR reifer Neugeborener ($\geq 37 + 0$ SSW), die jeweils zum Zeitpunkt der Abnahme des Neugeborenen Screenings gemessen wurden, zu vergleichen. Es zeigte sich in Abhängigkeit vom Gestationsalter ein signifikanter Unterschied der Median Werte ($p = 0,004$), wobei extreme Frühgeborene die niedrigsten PBR-Werte aufwiesen und reife Neugeborene die höchsten. Nach dem post hoc Test zeigte nur der Vergleich von extremen Frühchen zu reifen Neugeborenen eine statistische Signifikanz.

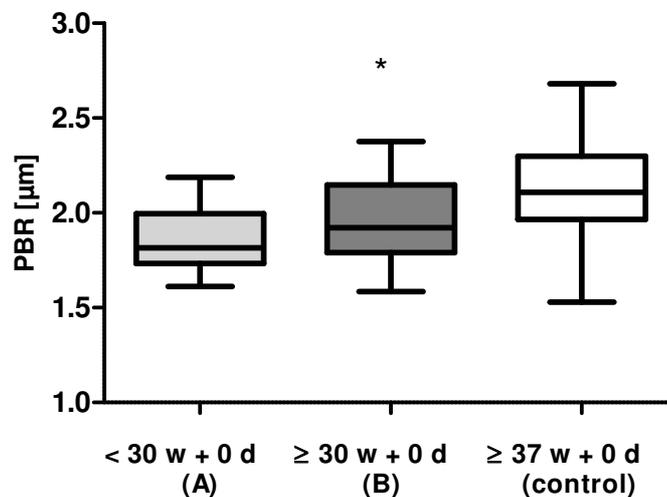


Abbildung 21: PBR [μm] extreme FG (Gestationsalter bei Geburt < 30+0 SSW, Gruppe A, $n = 10$) vs. moderate FG (Gestationsalter bei Geburt 30+0 SSW – 36+6 SSW, Gruppe B, $n = 14$) vs. RG (Gestationsalter bei Geburt $\geq 37+0$ SSW, Kontrollgruppe, $n = 85$) zum Zeitpunkt des Neugeborenen Screenings (36 – 72 h nach Geburt)

(Die Daten und Graphik der FG-Gruppe stammen aus der Promotionsarbeit von Frau Lea Rajwich)

4. Diskussion

Ziel dieser Studie war es zu untersuchen, ob mit den derzeit zur Verfügung stehenden Methoden eine Beurteilung der endothelialen Glykokalyx bei reifen Neugeborenen in vivo möglich ist und diese genauer zu evaluieren.

Die Mikrozirkulation der Ohrmuschel bei reifen Neugeborenen konnte mit der Sidestream Dark-Field imaging Methode in vivo dargestellt werden. Die Berechnung und Quantifizierung der Perfused Boundary Region als indirektes Maß für die endotheliale Glykokalyx erlaubte es Rückschlüsse auf den Zustand der Glykokalyx selbst zu ziehen.

Die Grundlage hierfür bieten Studien, die zeigen konnten, dass die Perfused Boundary Region zur Beurteilung der Glykokalyx dient und ein Maß für die funktionelle Glykokalyxdicke darstellt (140, 141). Die PBR berechnet sich aus der mittleren Breite der Erythrozytensäule und dem äußeren Durchmesser des maximalen von roten Blutzellen durchbluteten Lumens. Somit beschreibt die PBR den für Erythrozyten durch seitliche Ausbreitung zugänglichen Bereich der proteoglykan- und glykoproteinreichen Grenzschicht zwischen vasalem Lumen und Endothelzellen. Eine erhöhte PBR – sprich eine Verbreiterung des permeablen Glykokalyxbereichs – spricht somit für eine Schädigung oder Ausdünnung des äußeren Glykokalyxbereichs, so dass die Erythrozyten tiefer in die endotheliale Glykokalyx eindringen können. In früheren Studien wurde eine dicke, also intakte Glykokalyx (kleine PBR) mit einer ausreichenden Durchblutung und Gewebeversorgung assoziiert, wogegen eine vergrößerte PBR (entspricht einer dünneren luminalen Glykokalyxschicht) auf eine Mikrozirkulationsstörung durch geschädigte Glykokalyx hinweist (131, 140).

Unserer Recherche nach wurden seit 2012 47 Paper (Quelle: PubMed, Stand Februar 2020, Suchbegriffe: perfused boundary region, glycocalyx sowie PBR, glycocalyx) veröffentlicht, die mithilfe von Videomikroskopie und automatischer Bildanalyse die endotheliale Glykokalyx über die Bestimmung der Perfused Boundary Region untersuchten. Diese klinisch anwendbaren Mikrozirkulationsuntersuchungen zeigten bereits erhöhte PBR-Werte unter anderem bei Patienten mit Nierenversagen (75), eingeschränkter myokardialer Perfusion (131), arteriellem Hypertonus (141), lakunären Infarkten (76) und kritisch kranken Patienten zum Beispiel im Rahmen eines septischen Schocks (92).

Jede einzelne dieser Studien unterstreicht die Bedeutung der endothelialen Glykokalyx bezüglich ihrer Beschaffenheit und Funktion für die Regulation der Mikrozirkulation.

Von all diesen Veröffentlichungen untersuchten bislang lediglich zwei Studien die Perfused Boundary Region bei pädiatrischen Patienten (126, 142).

Unserem Wissen nach ist diese Studie die erste, die anhand eines homogenen Patientenkollektivs nennenswerte Basiswerte für die Perfused Boundary Region bei gesunden Neugeborenen am dritten bzw. vierten Lebenstag liefert.

Im Folgenden sollen nun die Methodik per se sowie die in unseren Untersuchungen gewonnenen Erkenntnisse und Ergebnisse genauer betrachtet und kritisch diskutiert werden.

4.1. Methodik

Das Patientenkollektiv umfasste männliche und weibliche Neugeborene, die spontan oder per Sectio caesarea geboren und prospektiv in die Studie eingeschlossen wurden. Bezüglich Adaptation nach Geburt, Geburtsmaßen sowie Daten zum Zeitpunkt der Mikrozirkulationsmessung repräsentierten diese Studienpatienten ein Normalkollektiv der Neugeborenenstation unserer Klinik.

Wir terminierten den Messzeitpunkt auf den 3. bzw. 4. Lebenstag (bzw. Lebensstunde 36 – 72) zeitgleich zur routinemäßigen Blutentnahme für den Neugeborenenstoffwechselltest um zusätzlich eine Blutgasanalyse durchzuführen ohne die Kinder ausschließlich für die Studie einer Blutentnahme unterziehen zu müssen. Vorausgehende Untersuchungen der Mikrozirkulation zeigten keine wesentlichen Unterschiede in den ersten Lebenstagen von reifen Neugeborenen ((118) und Dissertation von Christina Zauner, 2012). Daher sahen wir den dritten bzw. vierten Lebenstag als aussagekräftige Messzeitpunkte an. Interessant wäre es in einer weiteren Studie auch die endotheliale Glykokalyx im longitudinalen Zeitverlauf nach Geburt zu beobachten.

Ein kritisch anzusehender Faktor war die relativ liberale Patientenrekrutierung. So befanden sich in unserem Patientenkollektiv auch sechs Kinder, die aufgrund einer Neugeboreneninfektion zum Zeitpunkt der Messung eine zweifach antibiotische Therapie erhielten. Wie Studien bereits zeigen konnten, können die Mikrozirkulationsparameter und die endotheliale Glykokalyx bei Entzündungsprozessen verändert sein (92, 115, 143). Ein Vergleich der kleinen Gruppe mit Neugeboreneninfektion und antibiotischer Therapie mit den übrigen Neugeborenen ohne Infektion erbrachte hinsichtlich der PBR in unserem Patientenkollektiv keinen statistisch signifikanten Unterschied ($p = 0,49$), allerdings ist die Aussagekraft aufgrund der geringen Fallzahl in der Subgruppe deutlich limitiert. Für zukünftige Projekte wäre es ein interessanter Ansatzpunkt Messungen der PBR bei Neugeborenen mit Neugeboreneninfektion durchzuführen.

Einschränkend ist zudem zu erwähnen, dass Neugeborene mit Hauttypen IV, V und VI (Klassifikation nach Fitzpatrick) nicht in die Studie eingeschlossen werden konnten, da Melanin Licht derselben Wellenlänge wie Hämoglobin absorbiert (144), so dass die Mikrozirkulationsmessung technisch nicht möglich war. Somit entstand ein gewisser Selektionsbias. Andererseits führte es zu einer größeren Homogenität der Kohorte, da mögliche Unterschiede aufgrund unterschiedlicher Ethnizität der Probanden (145) minimiert wurden.

Da die Untersuchungen von zwei Untersuchern durchgeführt wurden, erfolgte eine genauere Analyse der interrater und intrarater Reliabilität. Hierbei zeigte sich eine sehr gute Reproduzierbarkeit und Korrelation der Messergebnisse zwischen den beiden Untersuchern. Daraus erschließt sich auch, dass die im weiteren Verlauf diskutierten möglichen Druckartefakte bei unseren Messungen relativ gering gewesen sein mussten bzw. zwischen den einzelnen Untersuchern nicht stark variierten. Die Bland-Altman Analyse mit einem Bias von 0,059 ist nahe Null. Dies bedeutet, dass manchmal Untersucher B (Verfasser dieser Arbeit) und manchmal Untersucher A höhere Werte gemessen hat, wobei die Werte im Mittel eng beieinander lagen. Ein systemischer Bias, bei welchem ein Untersucher immer höher als der andere misst, kann somit weitestgehend ausgeschlossen werden (146).

Die intrarater Variabilität bei Untersucher B lag bei durchschnittlich 7,3%. Mit < 10% ist diese als akzeptabel anzusehen und liegt im Vergleich zu anderen Studien damit im Durchschnitt (vgl. Gu et al. 5,6% und 11,9%) (145).

Die Methode bestehend aus SDF imaging und GlycoCheck Software zeigte auch in anderen Studien eine gute Reproduzierbarkeit. Durch automatische Bildkontrolle bzgl. Fokus, Licht, Tiefe und Bewegung wird eine mögliche Untersucherabhängigkeit durch die GlycoCheck Software von Beginn der Messung an reduziert (130).

Seit der Erkenntnis, dass die endotheliale Glykokalyx eine Art Schutzschicht für das Endothel darstellt, geht man davon aus, dass Beeinträchtigungen dieser Struktur bedeutenden Einfluss auf die gesamte mikrozirkulatorische Perfusion haben (147-149). Eine große Herausforderung in der Erforschung der endothelialen Glykokalyx ist die direkte Darstellung dieser delikaten Struktur. Die Untersuchung der Beschaffenheit und Funktion war meist invasiv und kompliziert (16). Die Entwicklung der Videomikroskopie ermöglicht nun die direkte, nicht-invasive Darstellung der Mikrozirkulation in verschiedenen Körperregionen

(150-153). Aufgrund dieser harmlosen und gefahrlosen Technik ist auch eine Anwendung im neonatologischen Bereich bedenkenlos möglich (118).

Allem voran galt es in dieser Studie aufzuzeigen, dass die Bestimmung der endothelialen Glykokalyx durch Mikrozirkulationsuntersuchungen an der Ohrmuschel mithilfe der Sidestream Dark-Field Methode bei reifen Neugeborenen in den ersten Lebenstagen mit relativ geringem Aufwand realisiert werden kann. Das Sidestream Dark-Field imaging ist eine bewährte Methode zur Visualisierung der Mikrozirkulation in Echtzeit. Vorhergehende Studien konnten bereits belegen, dass videomikroskopische Untersuchungen mit der OPS bzw. SDF imaging Technik bei Kindern und Neonaten komplikationslos durchführbar sind (82, 121). Auch wir konnten in unserer Studie zeigen, dass eine Anwendung der Videomikroskopkamera an der Ohrmuschel von Reifgeborenen problemlos machbar ist und einen guten Zugang zur nicht-invasiven Erforschung der Mikrozirkulation bei Neugeborenen bietet (vgl. (115)). Bei keinem der 85 Studienpatienten kam es zu Komplikationen oder unüberwindbaren Hindernissen.

Dies müsste nach unserem Wissensstand die bis dato größte Studie sein, die die endotheliale Glykokalyx bei reifen Neonaten indirekt quantifiziert und bestimmt. Frühere Untersuchungen wurden bislang nur an einer relativ kleinen Patientenpopulation von Neugeborenen und Kindern mit angeborenen Herzvitien durchgeführt (126). Diese Methode könnte somit auch in weiteren Studien und Untersuchungen bei Neonaten und Säuglingen angewandt werden, bei denen eine sublinguale Messung (siehe unten) nicht oder aufgrund der kleineren Proportionen nur schwer durchführbar ist.

Mithilfe der Videomikroskopie wurde die kutane Mikrozirkulation dargestellt, alle weiteren Berechnungen der mikrozirkulatorischen Parameter sowie der endothelialen Glykokalyx erfolgten automatisch durch die GlycoCheck Software (s. 2.3.1.2.).

SDF imaging sowie die GlycoCheck Software wurden bereits in zahlreichen Studien verwendet und validiert (75, 76, 107, 154). Die MicroVision Kamera, gepaart mit der GlycoCheck Software, stellt einen nicht-invasiven Versuchsaufbau dar – eine der obersten Prämissen bei der Durchführung klinisch-experimenteller Studien vor allem an Kindern.

Trotz der guten Handhabbarkeit und Durchführung dieser Mikrozirkulationsmessungen sind einige Aspekte doch kritisch zu diskutieren.

Zunächst kommt hierbei die Frage auf, ob die in unserer Studie an der Ohrmuschel gemessenen Mikrozirkulationswerte und PBR als Basiswerte im Bereich der Hautdurchblutung gesehen werden oder repräsentativ sogar für die gesamte systemische

Glykokalyx stehen könnten. Bisherige Studien an Erwachsenen untersuchten vor allem die sublinguale Mikrozirkulation (155, 156); in jüngerer Zeit gelang Haeren et al. auch die Messung am offenen Gehirn im Rahmen neurochirurgischer Eingriffe (139). Van den Berg et al. berichteten von bukkalen und transkutanen Messungen bei reifen Neugeborenen (157). In ihrer Studie konnte kein Zusammenhang zwischen der Gefäßdichte bei bukkalen und transkutanen Messungen an der Innenseite des Oberarms bei reifen Neugeborenen am ersten Lebenstag gefunden werden. Zudem berichteten sie generell von einer schlechteren Bildqualität bei transkutanen Messungen sowie einer schlechten interobserver Reliabilität (157). Alba-Alejandre et al. untersuchten 2013 die Mikrozirkulation durch OPS imaging an der Ohrmuschel und am Oberarm von reifen Neugeborenen (115). Hierbei konnten wesentlich weniger Gefäße bei der Messung am Oberarm erkannt werden. Sie kamen zu dem Schluss, dass die Ohrmuschel mit ihrem dichten subepidermalen Plexus und den fehlenden Kapillarloops ein geeigneterer Messort für Mikrozirkulationsmessungen bei Reifgeborenen ist (115). Im Gegensatz dazu konnten bei Frühgeborenen bereits in mehreren Studien qualitativ hochwertige Mikrozirkulationsmessungen am Oberarm durchgeführt werden (123, 158, 159). Hier muss man sich fragen, ob das Problem die relativ dickere Haut bei reifen Neugeborenen im Unterschied zur unreifen Haut der Frühchen sein kann. Aufgrund der nicht ganz unkomplizierten bukkalen Messung bei reifen Neugeborenen durch unter anderem den Saugreflex wie auch möglicherweise eher unruhigen Patienten wurden in dieser Studie die Messungen ebenfalls an der Ohrmuschel durchgeführt. Vorteile hierbei waren, dass die Ohrmuschel beim Neugeborenen gut zugänglich ist und es nicht nötig ist das Kind auszuziehen, wodurch keine Gefahr der Auskühlung besteht und die meisten Studienpatienten einfach ungestört weiter geschlafen haben. Ein weiterer positiver Aspekt war, dass die Ohrmuschel relativ statisch ist; Bewegungsartefakte wurden minimiert (keine Atemexkursion, kein plötzliches Umlagern des Armes u.a.). Des Weiteren erlaubte der kleine Bereich an der Ohrmuschel von Scapha bis Fossa triangularis keine allzu großen Ortswechsel, so dass die Messungen in ähnlichen Gefäßbetten stattfanden.

Die Blutversorgung des Ohres erfolgt über die Rami auriculares anteriores aus der Arteria temporalis superficialis und der Arteria auricularis posterior aus der Arteria carotis externa. Die Arteria temporalis superficialis ist ein Endast der Arteria carotis externa. Somit entstammt die Blutversorgung der Ohrmuschel dem gleichen Kreis wie die sublinguale Mikrozirkulation (11). In unserer Studie wurde nur die Glykokalyx und Mikrozirkulation am Ohr gemessen. Nun stellt sich die Frage, ob die sublinguale bzw. an der Ohrmuschel durchgeführte Messung auch auf andere Organe übertragbar ist. Am Tiermodell zeigten sublinguale und den Darmbereich betreffende Mikrozirkulationsveränderungen signifikante

Übereinstimmungen bezüglich Schwere und zeitlichem Verlauf bei Sepsis (160). Boerma et al. hatten diesen Zusammenhang bei Patienten mit Sepsis nicht darstellen können (152). Die Arbeit von de Bruin et al. ließ vermuten, dass sublinguale Messungen mit intraoperativen Messungen an der Darmserosa vergleichbar sind (161). Haeren et al. fanden keine direkte Korrelation zwischen sublingual und intraoperativ cortical sowie hippocampal gemessenen PBR-Werten (139). Einschränkungen dieser Studie waren allerdings die kleine Patientenzahl und Probleme mit der sterilen Abdeckung des Messgeräts während der operativen Messung (139). Generell legen zahlreiche Studien nahe, dass die sublingual und, durch oben angebrachte Argumente, im übertragenen Sinn auch die an der Ohrmuschel gemessene Glykokalyx mit der Endothelfunktion verschiedener Organe korreliert (75, 141, 156, 162). Insgesamt bedarf es auf diesem Gebiet jedoch noch weiterer Forschung um diese doch integrale Fragestellung letztendlich beantworten zu können.

Ein weiteres häufig in der Literatur diskutiertes Problem stellen Druckartefakte durch zu großen Applikationsdruck sowie Seitwärtsbewegungen dar (102, 163):

Der exakte Auflagedruck an dem zu untersuchenden Gewebe lässt sich nicht genau steuern bzw. objektiv kontrollieren. Hierdurch entstehen Druckartefakte. Erhöht sich der Druck werden die kleinen Gefäße komprimiert und es kommt zur Verlangsamung des Blutflusses bis zur Stagnation. Somit können Fehlmessungen entstehen. Wir versuchten mit der Methode von Trzeciak et al. (132) Druckartefakte so gut wie möglich zu verhindern, dennoch ist nicht ganz genau zu evaluieren inwieweit das auch gelungen ist. Die gute interrater Reliabilität deutet geringe Druckunterschiede zwischen den Untersuchern an, dennoch kann sie nicht ausschließen, dass nicht beide Untersucher ähnlich starken, zu hohen Druck ausgeübt haben. Dies hätte insbesondere zu einer Beeinträchtigung der RBC filling und der VVD geführt, da diese perfusionsabhängige Parameter darstellen.

Auch Aufnahmestörungen und folglich Beeinträchtigungen der Bildqualität durch Seitwärtsbewegungen sind nie ganz auszuschließen - alleine schon durch die unvermeidbaren Bewegungen des Untersuchers. Diese werden zwar durch die Software ausgeglichen, resultieren aber in einer Bildverkleinerung. Für weitere Studien wäre eine statische Halterung der Messapertur für stabile Bildfolgen zu überlegen (vgl. Dissertation von Alexandra Schwepcke, 2010). Allerdings kontrolliert die GlycoCheck Software auch selbstständig Bewegungsartefakte („Motion“) und Intensität. Zu viel Druck führt zu einer Zunahme der Intensität, was wiederum zu einer Pausierung der Messung führt, bis die Intensität wieder im Zielbereich liegt. Wenn somit nicht gleichzeitig am Intensitätsregler gedreht wird, ist eine Zunahme der Intensität ein Zeichen für zu viel Druck.

Zu semiautomatischen, zeitintensiven und zum Teil untersucherabhängigen Mikrozirkulationsanalyseprogrammen wie AVA (164) stellt die in dieser Studie verwendete, vollautomatische Bildaufnahme und –analysesoftware GlycoCheck eine interessante Alternative dar (129). Dieses Programm ermittelt die totale Gefäßdicke und Perfusionsparameter wie VVD und RBC filling. Zudem liefert die Perfused Boundary Region eine indirekte Messung für die Glykokalyxdicke und somit Hinweise auf deren protektive Funktion. Dennoch sollte man auch bezüglich der automatischen Softwareanalyse einige Aspekte kritisch hinterfragen, auf die im Folgenden näher eingegangen wird. Fokus dieser Arbeit war die Evaluation der endothelialen Glykokalyx.

Diese gelartige, die Gefäße luminal auskleidende Schicht, reguliert Permeabilität, Koagulation, Zellinteraktionen und Gefäßdurchmesser durch Mechanotransduktion. Aufgrund dieser essentiellen Funktionen geht man davon aus, dass eine Schädigung dieser komplexen Struktur zu Störungen auf mikrozirkulatorischer Ebene mit unter anderem Ödementwicklung, Gerinnungsstörungen, verändertem Fließverhalten etc. führt (138).

Die GlycoCheck Software misst die Glykokalyx aber nicht direkt. Die Bestimmung der Perfused Boundary Region stellt eine Methode dar die endotheliale Glykokalyx in vivo zu evaluieren. Mithilfe der bereits diskutierten Sidestream Dark-Field imaging Technik können Erythrozyten, die eine Größe von 5-8 μm haben, wegen ihres gebundenen Hämoglobins bildlich dargestellt werden. Dadurch werden nur mit Erythrozyten perfundierte Gefäße erkannt und in die Analyse einbezogen. Folglich wird die Glykokalyx in nicht perfundierten Gefäßen nicht beachtet (129). Vink et al. zeigten, dass die roten Blutzellen mit einem Abstand zur Gefäßwand durch die kleinen Gefäße fließen. Sie interpretierten, dass die endotheliale Glykokalyx diese Distanzierung generiert (55). Unter physiologischen Bedingungen hält die Glykokalyx die Erythrozyten somit auf gewissen Abstand zu den Endothelzellen. Diese Erkenntnis macht sich die Berechnung der Perfused Boundary Region zu Nutze. Die PBR beschreibt nun die seitliche Ausbreitung der Erythrozyten in den permeablen, luminal gelegenen Teil der Glykokalyx in μm . Durch eine Schädigung verliert sie ihre Grenzfunktion und die roten Blutzellen können tiefer eindringen, was sich als eine Erhöhung der Perfused Boundary Region ausdrückt (140). Dane et al. beschrieben die PBR als Maß für die Qualität der Endothelial Surface Layer (75).

Die PBR bietet somit keinen Wert für die gesamte Glykokalyxdicke. Eine erhöhte PBR geht mit einer Reduzierung der glykokalen Gesamtbreite einher, lässt aber keinen Rückschluss auf die verbleibenden Absolutwerte von permeablem und impermeablem Anteil zu. Auch andere Methoden wie die Abschätzung der Glykokalyxdicke mithilfe der Veränderung der Breite der Erythrozytensäule bei dem Durchfließen von Leukozyten (46) erlauben keine

endgültigen Werte für die Glykokalyxdicke. Machin et al. zeigten eine negative Korrelation zwischen PBR und Glykokalyxdicke. Die Glykokalyxdicke wurde hierbei anhand der Veränderung der roten Blutzellsäule vor und nach Passage eines Leukozyten bestimmt (133). Dies implizierte, dass beide Werte Indikatoren für den Zustand der Glykokalyx darstellen. Die Autoren folgerten, dass die GlycoCheck Software eine brauchbare Methode zur Evaluation der Glykokalyx darstellt (133).

Des Weiteren erlaubt die PBR keine Aussage über die Zusammensetzung und Struktur der Glykokalyx. Studien konnten zeigen, dass der enzymatische oder durch Schubspannung induzierte Abbau verschiedener Glykokalyxbestandteile – sogenanntes Shedding – bei unterschiedlichen Pathologien zur plasmatisch messbaren Erhöhung von glykokalen Bestandteilen wie Syndecan-1 oder Hyaluronsäure führt und Prognosen für das Outcome erlaubt (45, 164, 165). In den letzten Jahren untersuchten einige Forschungsgruppen einen Zusammenhang zwischen PBR und Glykokalyx Shedding. PBR und Syndecan-1 waren beide vor Nierentransplantation sowie bei Dialysepatienten erhöht (75, 140). Keine Korrelation dagegen konnten Donati et al. bei Sepsispatienten nachweisen (166). Ein Syndecan-1 Anstieg ohne Veränderungen der PBR fiel bei Dialysepatienten nach Gabe von niedermolekularem Heparin auf. Cornelis et al. vermuteten deshalb, dass beide Werte verschiedene Aspekte der Glykokalyxschädigung messen (167). Da eine Interpretation von Absolutwerten eher schwierig ist, wurden in dieser Studie solche Marker nicht gemessen. Ein Vergleich zwischen PBR und Markerwerten zur Beschreibung des Glykokalyxzustands stellt dennoch eine interessante Fragestellung auch bei Neonaten dar und könnte in weiteren Studien zum Beispiel im Verlauf vor und nach Transfusion oder antibiotischer Therapie untersucht werden.

Zuletzt soll noch kurz eine grundsätzliche Problematik der automatischen Analyse angesprochen werden. Bei unseren Messungen fiel teilweise auf, dass trotz eingeschränkter Bildqualität auf dem Monitor eine zügige automatische Bildaufnahme und darauffolgend eine Mikrozirkulationsanalyse durchgeführt wurden. Eine manuelle Korrektur zum Beispiel zum Ausschluss von Artefakten wie Haare oder einzelner Gefäße mit geringem Kontrast oder schlechtem Fluss ist nicht möglich, so dass diese möglicherweise zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen. Auf der anderen Seite wird durch die vorab geforderten Qualitätskriterien eine Standardisierung vorgegeben und durch die automatisierte Methode ein Untersucherbias ausgeschlossen. Somit bietet die transkutane Aufnahme und automatische Analyse der Perfused Boundary Region mithilfe des SDF imaging und der GlycoCheck Software eine einfache, nicht-invasive und schnelle Untersuchungsmethode, die eine gute

Reproduzierbarkeit zeigt und bereits in zahlreichen Studien verwendet und validiert wurde (130, 141, 168, 169).

Zusammenfassend eignet sich die Ohrmuschel beim reifen Neugeborenen als unkomplizierter Messort für die nicht-invasive Videomikroskopie. Die automatische Bildaufnahme und -analyse liefern reproduzierbare Informationen zur Glykokalyx und Mikrozirkulation.

4.2. Ergebnisse

In dieser Studie haben wir die Perfused Boundary Region sowie weitere Mikrozirkulationsparameter bei reifen Neugeborenen im Alter von 36 – 72 Stunden gemessen. Der Mittelwert mit SD der PBR-Werte aller 85 Neugeborener betrug $2,14 \pm 0,25$ μm . Die Werte schwankten im Gesamten zwischen $1,53$ μm und $2,68$ μm .

Wie unter 4.1. angesprochen, stellte unsere Studienpopulation ein Normalkollektiv reifer Neugeborener am 3./4. Lebenstag dar.

Es gibt bisher nur zwei uns bekannte Studien, die die Perfused Boundary Region bei pädiatrischen Patienten gemessen haben. Nussbaum et al. untersuchten 2015 bereits die endotheliale Glykokalyx an der Ohrmuschel bei Kindern im Rahmen von Operationen an der Herz-Lungen-Maschine (HLM) (126). Die Ergebnisse dieser Studie stimmen mit vorausgehenden Studien an Erwachsenen und Kindern nach kardiochirurgischen Eingriffen überein, die zeigen konnten, dass Operationen an der HLM zu einer akuten Beeinträchtigung der Mikrozirkulation sowie einer Schädigung der endothelialen Glykokalyx mit Zunahme der zirkulierenden Glykokalyxabbauprodukten im Serum führen (45, 170). Die PBR-Werte bei Nussbaum et al. lagen direkt nach der Operation mit HLM um ca. $0,2$ μm höher als davor. Im Vergleich veränderte sich die PBR bei Operationen ohne HLM nicht signifikant. Eine Kontrollgruppe stellten Kinder mit operativer Versorgung einer Gaumenspalte dar (Altersdurchschnitt 5,2 Monate) (126). Vor Operation zeigten alle Versuchsgruppen ähnliche PBR-Werte, der Graphik nach lagen diese im Mittel bei ca. $2,5$ – $2,7$ μm und somit etwas höher als die in dieser Studie gemessenen PBR-Werte bei Neugeborenen. Eine weitere Studie untersuchte die Perfused Boundary Region bei pädiatrischen Patienten (6 Monate bis 10 Jahre) mit Malaria (142). Es kam bei dieser Infektion mit systemischer Entzündungsreaktion und Endothelzellaktivierung zu einer Schädigung der endothelialen Glykokalyx gemessen anhand einer Zunahme der PBR und der durch Shedding erhöhten Glykokalyxbestandteile im Plasma (142). Die Technik der PBR Messung unterscheidet sich

allerdings zu der Methodik der vorliegenden Studie. Die PBR-Werte einer gesunden Kontrollgruppe (mittleres Alter 2,6 Jahre) lagen einer graphischen Darstellung nach bei ungefähr $\pm 2 \mu\text{m}$, die der Kinder mit Malariainfektion deutlich höher bei im Mittel ca. $4 \mu\text{m}$ (142).

Bei zahlreichen Studien an Erwachsenen erfolgten zusätzlich häufig PBR Messungen einer gesunden Kontrollgruppe. Wirkliche Einheitswerte sind bisher aber nicht definiert worden. Meist beschränkten sich die Studien auf den Vergleich der PBR-Werte in ausgewählten Pathologien mit einer meist sehr groß definierten Kontrollgruppe (große Altersspannweite, keine Geschlechtertrennung). Hierbei zeigten sich in 7 Studien Mittelwerte von $1,77 - 1,9 \mu\text{m}$, das mittlere Alter mit Standardabweichung, soweit angegeben, lag zwischen Mitte 30 und Mitte 70 (75, 83, 131, 133, 141, 156, 164). Wesentlich höhere PBR-Werte von durchschnittlich $2,4 - 3,3 \mu\text{m}$ zeigten sich in drei weiteren Studien mit durchschnittlich etwas jüngerem Patientenkollektiv (Alter 30 – ca. 50 Jahre) (92, 140, 171). Martens et al. fanden in einer Kontrollgruppe (53% Männer, Alter $65,4 \pm 7,6$ Jahre) eine PBR von $2,08 \pm 0,24 \mu\text{m}$ in Gefäßen von $5 - 25 \mu\text{m}$ (76). In einer weiteren Kontrollgruppe mit ähnlicher Altersverteilung ($66,4 \pm 6,9$ Jahre, 65% Frauen) fanden sich vergleichbare PBR-Werte von $2,06 \pm 0,26 \mu\text{m}$ (172). Zwei weitere Studien zeigten PBR-Werte von im Mittel $2,04 \mu\text{m}$ in einer Kontrollgruppe mit 27 – 34jährigen Probanden (93) bzw. in einer Kontrollgruppe mit einem Alter von $50,9 \pm 12,5$ Jahren (173). Die Definition der PBR als permeabler Anteil der ESL erklärt den Unterschied zur anatomisch gemessenen Glykokalyx von ca. $0,5 \mu\text{m}$ (50). Inwieweit diese auffällige Spannweite an PBR-Werten mit Messgeräten (SDF Kamera und Analysesoftware) verschiedener Hersteller zusammenhängt, muss in Zukunft noch weiter abgeklärt werden. Eine andere mögliche Erklärung für unterschiedliche Werte wäre eine altersabhängige Verteilung.

Uns sind bisher nur zwei Studien bekannt, die junge und ältere Menschen bezüglich PBR-Werten und Glykokalyxdicke direkt verglichen haben. Marchin et al. gelang es zu beweisen, dass mit höherem Alter – in diesem Fall eine Studienpopulation mit dem Alter entsprechendem kardiovaskulären Risikoprofil, aber ohne definitive nachgewiesene Pathologien - die endotheliale Glykokalyx verringert und die Mikrozirkulation beeinträchtigt sind (174). In dieser Studie zeigte sich eine Reduktion der Glykokalyxdicke um 33%, eine Vergrößerung der Perfused Boundary Region um 10 – 22% und eine geringere Perfused Microvascular Density sowie geringere RBC fraction bei älteren Menschen (60 ± 2 Jahre) im Gegensatz zu jüngeren Menschen (29 ± 1 Jahr) (174). In einer weiteren Studie war die PBR bei 70-Jährigen im Gegensatz zu Mitte 20-Jährigen nicht signifikant verändert (162). Die genannten Studien könnten implizieren, dass die endotheliale Glykokalyx möglicherweise

einem altersbedingten Wandel unterliegt. Eine kürzlich von Astapenko et al. veröffentlichte Studie untersuchte die endotheliale Glykokalyx anhand der Perfused Boundary Region bei gesunden, jungen erwachsenen Probanden mit der Intention mögliche Vergleichswerte für kommende Studien zu etablieren (175). Das recht kleine Kollektiv von 21 Probanden ergab einen durchschnittlichen PBR-Wert von 1,82 μm und lag somit eher im unteren Bereich der bisher an gesunden Kontrollkohorten veröffentlichten Daten (siehe oben).

Aufgrund der teils widersprüchlichen Studienergebnisse ist es umso wichtiger weitere Basiswerte für jede Altersgruppe zu etablieren.

Zunächst wurden in dieser Studie nun die PBR-Werte männlicher und weiblicher Studienpatienten verglichen um einen möglichen Unterschied zwischen den Geschlechtern herauszuarbeiten. Vor allem im Rahmen von Frühgeburtlichkeit haben männliche Neonaten eine schlechtere Prognose bezüglich Komplikationen im Rahmen der Frühgeburtlichkeit wie Hirnblutungen und Sepsis. Auch die Mortalität sowie ein schlechteres neurologisches Langzeitoutcome waren bei extremen Frühgeborenen mit männlichem Geschlecht erhöht (176). Im Bereich der Mikrozirkulation konnten ebenfalls geschlechtsspezifische Unterschiede nachgewiesen werden. So war der mit Doppler Flowmetrie gemessene Blutfluss bei männlichen Frühgeborenen am ersten Lebenstag deutlich erhöht, was laut Stark et al. die vaskuläre Vulnerabilität vergrößern könnte (177). Bei Reifgeborenen hingegen konnten keine Unterschiede in der Durchblutung zwischen den Geschlechtern gezeigt werden (115).

Wir untersuchten 42 männliche und 43 weibliche Reifgeborene. Die Perfused Boundary Region wie auch die anderen Mikrozirkulationsparameter zeigten hierbei keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Geschlechtern. Die PBR lag bei männlichen Neonaten mit 2,18 μm im Durchschnitt minimal höher als bei weiblichen mit 2,09 μm .

In der Literatur fand sich außer bei Lee et al., wo die PBR der weiblichen Studienpatienten leicht vergrößert war (129), keine Abweichung des Glykokalyxausmaßes bei Männern und Frauen (130).

Vor grundsätzlicher Aussage, dass die Perfused Boundary Region bei reifen Neugeborenen geschlechtsunabhängig ist, sollte dies nochmals in einer weiteren Studie mit gegebenenfalls größerem Patientenkollektiv validiert werden.

Die Geburt per se ist ein entscheidendes Ereignis in der Neonatalperiode, weshalb auch die endotheliale Glykokalyx im Hinblick auf den Geburtsmodus untersucht werden sollte. Gibt es Unterschiede zwischen Spontangeburt und Kaiserschnitten? Diese Fragestellung ist

wichtig für die Etablierung von Normwerten und ob es in zukünftigen Untersuchungen nötig ist sektionierte und nicht sektionierte Kinder getrennt zu betrachten. Kaiserschnitte sind mit pulmonalen Komplikationen, verzögertem Kontakt zwischen Mutter und Kind sowie bei geplanten Sectiones ohne medizinische Indikation mit einer erhöhten Mortalität in der Neonatalperiode vergesellschaftet (178). Uteruskontraktionen während der Geburt führen intermittierend zu einer verminderten plazentaren Durchblutung, was sich beim Fötus als kurzzeitige Ischämie- und Reperfusionsphasen auswirken kann (179). Aus vorausgehenden Studien ist bereits bekannt, dass der Geburtsmodus die Physiologie grundsätzlich beeinflussen kann; so konnte gezeigt werden, dass der durch eine vaginale Geburt ausgelöste Geburtsstress zu einer vermehrten Leukozytenaktivierung führt (180).

Bei unserem Patientenkollektiv sind 17 Kinder per Sectio caesarea geboren worden. Es fand sich kein wesentlicher Unterschied der PBR-Werte zwischen diesen Neugeborenen und den spontan entbundenen Kindern. Bei der Interpretation muss berücksichtigt werden, dass nur 1/5 unserer Studienpatienten per Kaiserschnitt geboren wurde und diese somit eine wesentlich kleinere Fallzahl darstellen. Weiterhin haben wir keine genauere Unterscheidung zwischen primärer und sekundärer Sectio durchgeführt.

Dies könnte interessant für weitere Studien sein, um zu untersuchen, ob es womöglich Einflüsse durch einen wehenlosen Uterus und somit fehlenden Geburtsstress bei primären Sectiones auf die kindliche Mikrozirkulation geben könnte.

Unsere Ergebnisse bezüglich Geschlecht und Geburtsmodus deuten demnach an, dass in zukünftigen Untersuchungen keine Unterscheidung zwischen männlichen und weiblichen Reifgeborenen bzw. natürlicher Geburt und Kaiserschnitt unternommen werden muss und die Patientenkollektive somit in Folgestudien mischbar sind.

Integraler Bestandteil der endothelialen Glykokalyx sind Glykoproteine (41). Um die Auswirkung des Glucoselevels auf die Integrität der Glykokalyx zu ermitteln nutzten wir die Bestimmung der Perfused Boundary Region. Diese Fragestellung basiert auf zahlreichen Voruntersuchungen von Veränderungen und Schädigung der Glykokalyx und Mikrozirkulation im Rahmen hyperglykämischer Stoffwechsellagen bei Diabetes mellitus Typ I und II (63, 81, 181). Eine Studie von Wadowski et al. zeigte bei Diabetikern mit HBA1c Werten $\geq 8\%$ signifikant erhöhte PBR-Werte (83). Die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen ist multifaktoriell. Untersuchungen ergaben, dass ein wichtiger Faktor bei Diabetes die Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion ist (182). Man geht davon aus, dass Hyperglykämien durch eine vermehrte Produktion an Sauerstoffradikalen/oxidativem Stress sowie gesteigerter Aktivität von Hyaluronidase und Heparanase zu einem Shedding

von integralen Glykokalyxbestandteilen und somit zu einer Beeinträchtigung der endothelialen Glykokalyx im Gesamten führen (182). Der Abbau der Hyaluronsäure aus der ESL kann anhand erhöhter zirkulierender Serumwerte aufgezeigt werden (80). Diese Schädigung der Glykokalyx hat eine gestörte Gefäßpermeabilität und –reaktivität sowie eine Gerinnungsaktivierung zur Folge (182). In aktuellen Studien stellte man bei (prä-) diabetischen Patienten sowie bei mit Diabetes mellitus familiär vorbelasteten Studienpatienten mit gesteigerter Insulinresistenz anhand erhöhter PBR-Werte eine verminderte Glykokalyxdicke fest (171). Diese war bei akuten Hyperglykämien stärker reduziert und korrelierte mit Myokardbeeinträchtigungen. Die endotheliale Glykokalyx könnte daher ein entscheidendes Therapieziel bei der Reduktion kardiovaskulärer Risikofaktoren darstellen (162, 183, 184).

Die Arbeitsgruppe um Eskens et al. untersuchte den zeitlichen Zusammenhang zwischen Insulinresistenz und Glykokalyxschädigung am Tiermodell. Ein manifester Glykokalyxschaden konnte schon früh nach Beginn einer stark fettreichen Diät beobachtet werden, was andeuten könnte, dass der Glykokalyxschaden wesentlich zur Abnahme der Insulinsensitivität beiträgt (185, 186).

Bei unserem Patientenkollektiv ergab sich kein Zusammenhang zwischen Glykokalyxdicke und Glucosewerten. Da die Blutzuckerwerte im altersentsprechenden Normbereich lagen und insbesondere keine Hyperglykämien zum Zeitpunkt der Messungen verzeichnet wurden, erscheint es nicht verwunderlich, dass die PBR-Werte keine signifikante Abhängigkeit mit den Blutzuckerwerten zeigten. Somit implizieren unsere Ergebnisse, dass man bei gesunden Neugeborenen mit normaler Stoffwechsellage von einer unbeeinträchtigten Glykokalyx ausgehen kann. Ein kleiner Kritikpunkt ist, dass bei Neugeborenen aufgrund des Trinkverhaltens keine wirklich gut vergleichbaren Nüchternmessungen stattfinden konnten.

Anämie und Polyglobulie sind hämatologische Komplikationen in der Neonatologie. Bei reifgeborenen gesunden Kindern ist eine Eindickung des Blutes wahrscheinlicher, wogegen die Anämie ein zentrales Problem bei Frühgeborenen darstellt (187).

Da die Messung der Perfused Boundary Region methodisch auf der Ausbreitung der Erythrozyten im Gefäß beruht, interessierte uns, ob es einen Zusammenhang zwischen systemisch gemessenem Hämatokrit und Eindringtiefe der roten Blutzellen in die Glykokalyx gibt. Da die Analysesoftware in der Berechnung nur Gefäßsegmente mit einer Erythrozytenfüllung von mehr als 50% bzw. 60% (siehe unten) verwendet, wird durchgehend eine ausreichende Breite der Erythrozytensäule sichergestellt (139). Wir konnten trotz Unterscheidung zwischen venös und kapillär gemessenem HKT keinen Zusammenhang mit

den PBR-Werten nachweisen. Wie erwartet waren die kapillären Messwerte des HKT höher. Kein Kind zeigte Anzeichen einer Anämie. Bei kapillären Abnahmen zeigten sich bei ein paar Kindern (grenzwertig) erhöhte Werte, weshalb wir eine Schleuderhämatokritmessung durchführten. Nach diesen Messungen war kein Kind polyglobul (HKT 65-70% + klinische Symptomatik wie Dyspnoe, Akrozyanose, Hypoglykämie bzw. HKT > 70% ± klinische Symptomatik), so dass wir bei allen Studienpatienten von altersentsprechenden Normwerten ausgehen konnten.

Auch Nussbaum et al. konnten keinen Zusammenhang zwischen Mikrozirkulationsparametern und Hämatokrit nachweisen (126). In einer großen Bevölkerungsstudie konnte eine signifikante Abnahme der Perfused Boundary Region mit steigendem Hämatokrit beobachtet werden (145). Inwiefern dies auch bei Neonaten oder Kindern der Fall ist, konnte durch unsere Untersuchung nicht geklärt werden und müsste an einem Kollektiv polyglobuler Kinder weiter untersucht werden.

Entsprechend den oben genannten Untersuchungen bzgl. Blutzucker/Hämatokrit und Glykokalyx unterstützt der fehlende Zusammenhang zwischen Elektrolyten und PBR unsere Hypothese, dass bei gesunden Kindern mit altersentsprechend normwertigen Laborwerten von einer intakten Glykokalyx auszugehen ist und keine Veränderungen der Perfused Boundary Region zu erwarten sind.

Neben der Perfused Boundary Region ist es möglich mit der GlycoCheck Measurement Software auch das Red Blood Cell filling, die Valid Vessel Density und die Total Vessel Density als Parameter für die Mikrozirkulation zu bestimmen. Von Interesse war es den Zusammenhang der einzelnen Mikrozirkulationswerte und der Perfused Boundary Region genauer zu betrachten. Die deutlichste Korrelation zeigte sich zwischen der PBR und dem RBC filling. Diese korrelierten negativ miteinander. Gleichermäßen bestand auch eine schwächere Assoziation zwischen PBR und der VVD, wobei eine Zunahme der PBR entsprechend einer Schädigung der Glykokalyx mit einer Abnahme der VVD einherging. Im Hinblick auf das RBC filling bestand ein direkter Zusammenhang mit der VVD d.h. mit zunehmendem RBC filling stieg die VVD.

Eine enge Verbindung zwischen Glykokalyxintegrität und mikrozirkulatorischer Perfusion, gemessen anhand des RBC fillings und der Valid Vessel Density, konnten auch vorangehende Veröffentlichungen darlegen (83, 129, 130, 133, 156, 172). Diese negative Korrelation impliziert, dass eine geschädigte Glykokalyx (große PBR) mit einer veränderten endothelialen Grenzfunktion einhergeht und eine Störung der Mikrozirkulation hervorruft. Im

Gegensatz dazu ist eine intakte, dicke Glykokalyx (kleine PBR), die ein tieferes Eindringen der Erythrozyten verhindert, mit einer besseren Gewebepерfusion assoziiert. Eine durch verschiedene Faktoren ausgelöste Schädigung der endothelialen Glykokalyx führt zu einer endothelialen Dysfunktion mit veränderter Permeabilität, Mikroinflammation sowie Gerinnungs- und Durchblutungsstörungen. All diese Komplikationen resultieren in einer Beeinträchtigung der Mikrozirkulation und schlechteren Gewebeversorgung bis hin zu Störungen und Versagen der einzelnen Organe (41, 188).

Initial konnten Tierversuche belegen, dass eine Beschädigung der endothelialen Glykokalyx Störungen der Mikrozirkulation bedingt und zu einer Abnahme der Gefäßdichte führt (91, 189, 190). Untersuchungen in vivo ergaben eine Reduktion der Gefäßdichte beispielsweise bei Herzoperationen (126, 164) und Herzversagen (156), systemischer Sklerose (133), Leber- und Nierenversagen (191, 192) und Sepsis (193). Eine Zunahme der Gefäßdichte diente als Indikator für den Erfolg von Therapien. So zeigte sich anhand eines Anstiegs der Perfused Vessel Density und Proportion of Perfused Vessels eine verbesserte Mikrozirkulation bei Sepsispatienten, die mit aktiviertem Protein C behandelt wurden (155) wie auch bei Verabreichung von leukozytenarmen Erythrozytenkonzentraten (166).

Einschränkend muss man hinterfragen, ob die Valid Vessel Density direkt mit der Perfused Vessel Density verglichen werden kann. Haeren et al. definierten die Perfused Vessel Density als die Länge der durchbluteten Gefäße aller Durchmesser in mm^2 (139). Um diese Fragestellung zu diskutieren muss man sich noch einmal mit der Software auseinandersetzen. Zunächst nimmt die Software nur die von der Kamera aufgenommenen roten Blutzellen anhand des Kontrastes zur Umgebung durch Absorption des entsendeten Lichts wahr und ermittelt daraus die Position der Gefäße. Daraus kalkuliert das Programm die Total Vessel Density pro Beobachtungseinheit. Für die weitere Berechnung der Perfused Boundary Region werden nur Gefäße mit über 60% RBC filling verwendet. Dieses ist der prozentuale Anteil der Gefäßabschnitte – gemessen an den 21 Markierungslinien pro Segment – in denen in allen 40 Bildern Erythrozyten vorhanden sind. Das heißt 100% RBC filling würde bedeuten, dass alle vaskulären Segmente über alle 40 frames mit Erythrozyten gefüllt waren. Bei unseren Messungen bedeutet das, dass im Mittel 687 μm an durchbluteten Kapillaren (= mittlere VVD) pro mm^2 Gewebereinheit zu 70,1% in allen 40 frames mit Erythrozyten gefüllt waren. In der Literatur fanden sich nun widersprüchliche Angaben, ob Valid Vessel Segments für die PBR Berechnung ein RBC filling von mehr als 50% (133, 139, 145, 174) oder mehr als 60% (129, 194) voraussetzen. Nur über diese vom Programm als valide eingestuft Gefäßabschnitte wird die Valid Vessel Length und, in Bezug auf die nach

Kamerabewegungen korrigierte Feldgröße von 0,94 x 0,75 mm, die Valid Vessel Density berechnet (75, 129).

Daraus kann man annehmen, dass die Valid Vessel Density ein Schätzwert für die Perfused Vessel Density sein könnte. Da die Kamera nicht alle Kapillaren erkennt und in der Berechnung Gefäßsegmente mit einer Perfusion unter 50% bzw. 60% ausschließt, beschreiben die beiden Werte nicht genau das Gleiche. Die Valid Vessel Density ist also die Dichte an sehr gut durchbluteten von der Software erkannten Gefäßen.

Neben der Perfused bzw. Valid Vessel Density fand sich in Studien oft ein Parameter zur Quantifizierung der (gesamten) Kapillardichte (133, 156, 162, 195). Diese wurde auch in der gegenwärtigen Studie in Form der Total Vessel Density zusätzlich zur Valid Vessel Density von der GlycoCheck Software bestimmt. Die in dieser Studie direkt mit der GlycoCheck Software gemessene Total Vessel Density ist aber aufgrund unterschiedlicher Definitionen bezüglich u. a. Einheit/Größenordnung und untersuchten Gefäßgrößen keinesfalls direkt mit der Total Vessel Density anderer Analyseprogramme gleichzusetzen (vgl. z.B. (93)).

Die Valid Vessel Density berechnet sich nur aus Gefäßen mit einem bestimmten RBC filling. Die Parameter VVD, RBC filling percentage sowie der PBR-Wert beziehen sich daher nur auf die sogenannten valid vascular segments. Zur TVD hingegen zählen alle automatisch identifizierten Gefäßsegmente mit sowohl guter als auch schlechter Durchblutung. Voraussetzung hierfür ist aber überhaupt das Vorhandensein von Erythrozyten, auf deren Existenz die Methodik des SDF imaging bzw. der Software von GlycoCheck beruht. Nicht durchblutete Gefäße können demnach nicht erkannt werden, sind anatomisch gesehen aber selbstredend Teil der gesamten Gefäßdichte. Da man bei unseren gesunden Studienpatienten von einem Kollektiv mit guter Kapillarreserve ausgehen kann, muss beachtet werden, dass einerseits zahlreiche nicht durchblutete Kapillaren möglicherweise gar nicht erkannt wurden. Andererseits werden für die Berechnung der Perfused Boundary Region nur Gefäßsegmente gezählt, die zu mehr als 50% bzw. 60% mit Erythrozyten gefüllt sind. Eine Korrelation der TVD mit anderen Mikrozirkulationsparametern vor allem auch der PBR erscheint daher nicht sinnvoll, da die TVD auch Gefäße mit einer geringeren prozentualen Erythrozytenfüllung umfasst.

Die TVD ist im Grunde zum aktuellen Zeitpunkt kein gut validierter Parameter und unterscheidet sich hinsichtlich der Definition zu in anderen Studien gemessenen Gefäßdichten. Die Einordnung dieses Werts in den bisher publizierten Kontext ist schwierig. Erstrebenswert wäre eine vergleichende Studie zwischen verschiedenen validierten Analyseprogrammen (z.B. AVA (126, 155, 164) und GlycoCheck) um die Wertigkeit der

einzelnen Parameter in Bezug auf die Beurteilung der Mikrozirkulation herauszuarbeiten und einheitliche Messgrößen zu definieren.

Neueste Studien verglichen die Dimension der endothelialen Glykokalyx weiter differenziert in Kapillaren mit unterschiedlichen Größendurchmessern (172, 196). Es wurde zwischen kleinen (5-9 μm), mittleren (10-19 μm) und großen (20-25 μm) Kapillaren unterschieden. So zeigten sich in einer Studie von 2017 zum Beispiel die größten Auffälligkeiten in den Gefäßdichten der kleinsten Gefäße (133). Dies könnte laut Machin et al. ausschlaggebend für die Schwere der Erkrankung sein, da der Sauerstoffaustausch in den Kapillaren als kleinste Gefäßeinheit stattfindet (133). Da die verwendete Methode nur die Erythrozyten erkennt, nicht aber die eigentliche anatomische Gefäßbreite, basieren die Berechnungen rein auf der Breite der Erythrozytensäule. Zu diskutieren ist daher die Problematik, dass mit dieser Methodik die Gefäßwand nicht erkannt bzw. dargestellt werden und der reelle Gefäßdurchmesser somit nicht bestimmt werden kann. Die GlycoCheck Software erkennt Gefäße mit einem Durchmesser von 5 - 25 μm , wobei in dieser Studie aber nicht weiter in kleinere und größere Kapillaren unterschieden wurde. So könnte bei intakter, dicker Glykokalyx der Anschein entstehen, dass der Anteil an kleinen Kapillaren größer ist, da bei einer unbeschädigten, dicken Glykokalyx der Blutfluss mehr auf das Gefäßzentrum konzentriert ist. Die Erythrozyten können sich weniger weit in Richtung Gefäßwand ausbreiten, die gesamte Breite der Erythrozytensäule ist geringer. Vergleicht man ein solches Gefäß mit einer anatomisch identisch breiten Kapillare mit schlechterer, ausgedünnter Glykokalyx und daraus resultierend breiterer Erythrozytensäule, wird dieses Blutgefäß von der Software als dicker erkannt. Folglich könnte bei vielen Gefäßen mit guter Glykokalyx artifiziell der Eindruck entstehen, dass eine höhere Dichte an kleinen Kapillaren vorliegt. Weiterführend könnte dadurch fälschlich interpretiert werden, dass die Perfused Capillary Density größer wird, da Gefäße mit dicker Glykokalyx vermeintlich eher als Kapillaren eingestuft werden. Gegenteilig verhält es sich mit anatomisch gleich großen Gefäßen, die eine dünnere Glykokalyx besitzen. Der mögliche methodische Bias lässt sich aktuell in der vorliegenden Studie nicht klären. Scheinbare Veränderungen der Gefäßdurchmesser, gemessen anhand der p50-Werte, könnten daher nur Veränderungen der Glykokalyxdicke bei anatomisch gleichen Gefäßdurchmessern sein.

Die Frage nach einem möglichen sogenannten capillary recruitment bzw. capillary rarefaction durch tatsächliche Erhöhung bzw. Reduzierung der perfundierten Kapillardichte oder ob es sich lediglich um eine artifizielle, durch die Methodik bedingte scheinbare Veränderung der Kapillardichte handelt kann nicht ausreichend beurteilt werden. Beim

capillary recruitment ist in Ruhe nur ein gewisser Gefäßanteil perfundiert, welcher als Functional Capillary Density bezeichnet wird. Bei erhöhtem Versorgungsbedarf des Gewebes werden durch vorgeschaltete terminale Arteriolen zuvor nicht durchblutete Kapillaren "rekrutiert". Dadurch erhöht sich der Anteil der Functional Capillary Density an der gesamten Gefäßdichte (197). Eine mögliche Herangehensweise um diese Fragestellung genauer zu untersuchen wäre die Durchführung von z.B. Muskelbiopsien zur Bestimmung der wirklichen Kapillardichte (vgl. (83)).

Ähnlich unseren Ergebnissen korrelierte bei Patienten mit Peritonealdialyse und bei Patienten mit systemischer Sklerose die Perfused Boundary Region negativ mit der Vessel Density (133, 195). Die Autoren folgerten, dass parallel zum Ausmaß der Glykokalyxschädigung die Gefäßdichte geringer wird. Wie oben beschrieben erkennt die GlycoCheck Software Gefäße mit einem Durchmesser von 5 - 25 μm , die in dieser Studie allerdings nicht weiter in kleinere und größere Kapillaren differenziert wurden (vgl. (162)). So macht es proportional und rheologisch gesehen einen großen Unterschied ob eine zum Beispiel 0,5 μm dicke Glykokalyx in einem Gefäß mit 7 μm Durchmesser oder einer größeren Kapillare mit 20 μm Durchmesser vorliegt. Machin et al. vermuteten, dass es vor allem in sehr kleinen Kapillargefäßen mit intakter Glykokalyx aufgrund des engen Lumens zu einer Verlängerung der roten Blutzellen kommen könnte (133). Hierdurch wurde es laut der Autoren wahrscheinlicher, dass die Erythrozyten in den durch die Software gemessenen Gefäßsegmenten vorhanden sind, was eine mögliche Erklärung für die negative Korrelation zwischen PBR und Perfusionsparametern sein könnte.

Zusammenfassend lässt sich ableiten, dass mit dieser Arbeit und der darin verwendeten Methodik keine grundlegende Aussage über den tatsächlichen Zusammenhang von Glykokalyxintegrität und der Gefäßdichte getroffen werden kann.

Zusätzlich fällt in der Literatur auch die Verwendung verschiedener Einheiten der Mikrozirkulationsparameter auf. Lee et al. gaben die VVD und TVD in $\mu\text{m}/\text{mm}^2$ an (129). In einer großen Hypertonusstudie von Gu et al. wurden die Gefäßdichten in segments (n)/ mm^2 angegeben (145). Und Koning et al. benutzten die Einheit mm/mm^2 (154). Laut einer direkten Nachfrage bei der GlycoCheck Firma werden die Ergebnisse grundsätzlich als sogenannte valid vascular segments/ mm^2 angegeben (persönliche Korrespondenz). Multipliziert man diese mit 10 μm , also der Länge eines einzelnen Gefäßsegments, erhält man die Einheit der Länge in $\mu\text{m}/\text{mm}^2$. Unsere Daten wurden in dieser Einheit angegeben.

Auch ist es fraglich inwieweit sich die verschiedenen Kamerahersteller und Softwareprogramme untereinander unterscheiden.

Grundsätzlich würde man sich für kommende Untersuchungen einheitliche Studienprotokolle bezüglich Bildgenerierung und Analyse wünschen um eine bessere Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit zu gewährleisten.

An dieser Stelle sollte kurz erwähnt werden, dass parallel zu den Messungen an reifen Neugeborenen auch Mikrozirkulationsmessungen bei Frühgeborenen zur Evaluation der longitudinalen Entwicklung der endothelialen Glykokalyx im Rahmen von Frühgeburtlichkeit durchgeführt wurden. Diese interessante Fragestellung ist Thema der Promotionsarbeit von Frau Lea Rajwich, auf die hier hingewiesen werden soll. Der unter 3.8. dargestellte Graph zeigt die PBR-Werte von extremen Frühgeborenen bis Ende der 30. Schwangerschaftswoche, moderaten Frühgeborenen ab einem Gestationsalter von 30 + 0 SSW sowie reifen Neugeborenen aus der vorliegenden Arbeit jeweils zum Zeitpunkt des Neugeborenen-screenings (36. – 72. Lebensstunde). Hierbei zeigte sich eine signifikante Zunahme der Perfused Boundary Region mit dem Gestationsalter. Dies steht für eine im Verlauf der Gestation fortschreitende Verschmälerung der endothelialen Glykokalyx durch Ausdünnung des permeablen Anteils der Glykokalyx – wie bereits vorausgehend im Text diskutiert. Da im experimentellen Setting herausgefunden wurde, dass sich die Glykokalyx sehr früh in der Embryologie entwickelt (198), ist es von großem Interesse die weitere Entwicklung ex utero bei Frühgeborenen zu betrachten.

Der Vergleich zwischen Reifgeborenen als gesunde Kohorte und Frühgeborenen als „krankes“ Patientenkollektiv, diente zum ersten Mal dazu die generierten Normwerte der Reifgeborenen als Vergleichskollektiv heranzuziehen und sich zu fragen wie es zu Abweichungen von diesen Normwerten kommt und was diese bedeuten könnten.

Unsere Werte sind keinesfalls als „in Stein gemeißelt“ zu betrachten, stellen aber unseres Wissens nach die erste Erhebung von Normwerten der PBR bei reifen Neugeborenen für die indirekte Beschreibung der endothelialen Glykokalyx dar.

Da die PBR nur eine indirekte Abschätzung der Glykokalyxbreite darstellt, ist es umso wichtiger Normwerte einer gesunden Kontrollkohorte vorliegen zu haben. Bei pathologischen Werten kann man diese nun genauer anhand der Abweichungen von den Normwerten klassifizieren.

4.3. Ausblick

Die Etablierung von Basisdaten stellt eine essentielle Grundlage für die Identifikation pathologischer Werte im Rahmen von Erkrankungen dar. Viele Studien konnten bereits zeigen, dass durch die Untersuchung und Evaluation der endothelialen Glykokalyx Krankheiten (frühzeitig) erkannt (171, 199), ihr Verlauf beurteilt (156) und mögliche Therapieziele beobachtet werden können (155, 184).

Bei Kindern, die zwar in der Regel ein geringes kardiovaskuläres Risikoprofil haben, könnte dennoch auch iatrogen durch z.B. Narkosen (200, 201) oder übermäßige Flüssigkeitstherapie (202) die Gefahr der Endothelschädigung bestehen. Generell ist wichtig zu unterstreichen, dass Neugeborene, Säuglinge und Kinder nicht als „kleine Erwachsene“ angesehen und beurteilt werden dürfen. Ganz im Gegenteil ist es essentiell jede Altersstufe individuell zu betrachten. Ergebnisse von Studien an adulten Probanden können daher nicht einfach auf ein pädiatrisches Kollektiv übertragen werden. Es verlangt demnach nach eigenen Normwerten für die einzelnen Mikrozirkulationswerte inklusive Perfused Boundary Region für Kinder aller Alters- bzw. Entwicklungsstufen.

Da Pathologien auf dem Boden endothelialer Dysfunktion mit akuter und chronischer Beeinträchtigung der Mikrozirkulation und der endothelialen Glykokalyx ein großes Patientenkollektiv betreffen und somit ein Bestandteil der alltäglichen klinischen Arbeit sind, sind weitere Studien zur Evaluation der endothelialen Glykokalyx und Mikrozirkulation unabdingbar.

Ein erster Ansatz für eine Studie könnte das bereits vorbeschriebene Wissen über mikrozirkulatorische Veränderungen und Glykokalyxschäden im Rahmen einer Infektion/Sepsis bzw. erhöhter Entzündungswerte sein (37, 92, 93, 115, 140, 194).

Anhand der generierten Basisdaten für gesunde Neugeborene wäre es interessant eine Kohorte von Neugeborenen mit Hinweisen auf ein Amnioninfektionssyndrom bzw. Risikofaktoren für eine Neugeboreneninfektion/Early onset sepsis (vorzeitiger Blasensprung, grünes Fruchtwasser, GBS positive Mutter, Fieber/ansteigende Entzündungswerte der Mutter sub partu u.a.) im zeitlichen Verlauf nach Geburt zu beurteilen. Gibt es Veränderungen der endothelialen Glykokalyx vor und während einer Neugeboreneninfektion und zeigen diese einen Zusammenhang mit Entzündungswerten?

Denkt man noch einen Schritt weiter, wäre eine klinisch etablierte Glykokalyxmessung eventuell eine mögliche Alternative zu häufigen, invasiven Blutentnahmen zur Diagnosestellung und Beobachtung des Therapieverlaufs.

Initial wäre es auch interessant Normwerte für zirkulierende, glykokale Plasmabestandteile wie Syndecan-1 und Hyaluronsäure bei gesunden reifgeborenen Kindern aufzustellen. So könnte im Rahmen von Pathologien die Dimension der Glykokalyschädigung genauer bestimmt werden (vgl. (142)).

Schaut man sich die Funktionen und Beschaffenheit der endothelialen Glykokalys genauer an, ist der Erhalt dieser feinen Struktur äußerst wichtig. Hierdurch stellt der Schutz wie auch die Reparatur der Glykokalys bei akuten wie auch chronischen Erkrankungen ein vielversprechendes Therapieziel dar (184). Einige experimentelle und klinische Studien fanden positive Auswirkungen auf die endotheliale Glykokalys bei Versuchen mit u.a. Hydrocortison, Albumin, Protein C und Sulodexid (203). Eine Studie von 2019 konnte zeigen, dass das bei Sepsis vermehrt produzierte Angiopoetin-2 das sogenannte Tie2 am Endothel inhibiert (204). Dies führte zu einer vermehrten Sekretion des Enzyms Heparanase, welches zur durch Shedding bedingten Schädigung der Glykokalys führte. Im Umkehrschluss konnte die Untersuchung vermuten, dass eine Aktivierung von Tie2 die Wiederherstellung der Glykokalys begünstigt und somit ein mögliches Therapieziel darstellt (204). Auch im Bereich der Folgen von Flüssigkeitstherapie und dem Einsatz verschiedener Volumenersatzmittel auf die Glykokalys wird geforscht (205). Astapenko et al. fanden keine negativen Auswirkungen einer SMOFlipid 20%-Infusion – eine auch bei Kindern und Neonaten im Rahmen der parenteralen Ernährung häufig verabreichte Fettlösung – auf die endotheliale Glykokalys (206). Somit stellt die Untersuchung der endothelialen Glykokalys auch eine Möglichkeit zur Evaluation medizinischer Maßnahmen dar.

Die Intravitalmikroskopie stellt einen relativ einfachen, nicht-invasiven Zugang zur Mikrozirkulation dar. Auf mikrozirkulatorischer Ebene treten Veränderungen teils deutlich vor systemischen, makrozirkulatorisch messbaren Auffälligkeiten auf. Die Glykokalys als zentraler Bestandteil der Mikrozirkulation und Marker für Endothelschäden könnte im bedside setting eine entscheidende Rolle bei Prävention, Diagnostik und Therapie spielen. Krankheiten könnten anhand frühzeitig auftretender Endothel- bzw. Mikrozirkulationsveränderungen bereits vor dem Auftreten genereller, systemischer Symptome erkannt werden.

Ein Blick in die Zukunft lässt erhoffen, dass eines Tages Glykokalys- und Mikrozirkulationsmessungen als integraler Bestandteil des hämodynamischen Monitorings im klinischen Alltag zu finden sind.

5. Zusammenfassung

Zu den Hauptaufgaben des Blutkreislaufs gehören neben Hormontransport und Thermoregulation die bedarfsgerechte Versorgung der unterschiedlichen Gewebe und Organe mit Sauerstoff und Nährstoffen sowie der Abtransport von Stoffwechselabbauprodukten. Auf kleinster Gefäßebene in den Kapillaren laufen die für den Organismus essentiellen Prozesse der Mikrozirkulation ab. Funktionsstörungen im Bereich der Mikrozirkulation sind bei zahlreichen Pathologien u.a. Sepsis, Arteriosklerose, Hypertonus, Diabetes mellitus maßgeblich an der Krankheitsentstehung und dem Fortschreiten der Erkrankung beteiligt. Generell konnte gezeigt werden, dass die Gefäßfunktion eng mit der Intaktheit der endothelialen Glykokalyx zusammenhängt. Die Glykokalyx als integraler Bestandteil mikrozirkulatorischer Vorgänge übernimmt viele verschiedene Aufgaben. Diese gelartige Struktur aus Proteoglykanen, Glykoproteinen und Glykolipiden kleidet dem Endothel aufliegend alle Gefäße luminal aus und hat vaskuloprotektive Eigenschaften. Allen voran stellt sie anatomisch und physiologisch eine Grenzschicht zwischen intra- und extravasalem Raum dar. Hierbei trägt sie einen großen Teil zur Regulation der Gefäßpermeabilität, zum Erhalt der vaskulären Homöostase und zu Zellinteraktionen mit der Gefäßwand bei. Man geht davon aus, dass Störungen und Beschädigungen dieser hoch komplexen Struktur ursächlich und mit die ersten Schritte in der Entstehung des großen Formenkreises der vaskulären Funktionsstörungen und Erkrankungen sein können. Die Entwicklung der Videomikroskopie und automatischer Bildanalyseprogramme ermöglichte die direkte Darstellung der Mikrozirkulation, die valide Berechnung der Mikrozirkulationsparameter und die Beurteilung der endothelialen Glykokalyx. Studien, die Versuche mit dieser Technik durchführten, untersuchten meist die sublinguale Mikrozirkulation bei Erwachsenen im Rahmen ausgewählter Pathologien. So konnte nachgewiesen werden, dass die Perfused Boundary Region - ein inverses Maß für die Integrität der endothelialen Glykokalyx – bei zahlreichen kardialen, nephrologischen, neurologischen und systemischen Erkrankungen wie Sepsis und Diabetes mellitus erhöht ist. Eine Erhöhung der Perfused Boundary Region bedeutet, dass die Erythrozyten weiter in die Glykokalyx eindringen können und steht somit für eine dünnere, beschädigte oder strukturell defekte Glykokalyx.

Da unserem Wissen nach bisher nur zwei Studien die PBR an Kindern untersuchten, war es Ziel dieser Studie die endotheliale Glykokalyx von Neugeborenen anhand der PBR zu evaluieren. Bei unserem Patientenkollektiv von gesunden, reifen Neugeborenen stand im

Fokus Normwerte für die PBR in den ersten Lebenstagen zu etablieren und mögliche Einflussfaktoren auf diese zu identifizieren. Diese generierten Basiswerte von reifen Neugeborenen könnten in Folgestudien als Vergleichskollektiv herangezogen werden. Mithilfe der Sidestream Dark-Field imaging Technik und der GlycoCheck Software erfolgten die Mikrozirkulationsmessungen an insgesamt 85 reifen Neugeborenen, wobei der Fokus stets auf der Evaluierung der endothelialen Glykokalyx lag. Daneben wurden auch Parameter der Mikrozirkulation in Form der Valid Vessel Density und des Red Blood Cell fillings generiert.

Bei den in dieser Studie durchgeführten Messungen war die PBR unabhängig von Geschlecht, Geburtsmodus und Blutgaswerten. Eng korrelierte die Glykokalyxdicke mit der mikrozirkulatorischen Durchblutung. Sowohl die Untersuchung der Interrater- wie auch der Intraraterreliabilität zeigte eine gute Übereinstimmung der Messungen.

Die Untersuchungen zeigten, dass bei reifen Neugeborenen in vivo Mikrozirkulationsmessungen an der Ohrmuschel mithilfe einer SDF Videokamera problemlos im bedside setting durchführbar sind. Die nicht-invasive, unkomplizierte Untersuchung der endothelialen Glykokalyx durch automatische Softwareanalyse liefert die Basis für weitere Evaluationen dieser komplexen Struktur in ausgewählten Pathologien und Fragestellungen.

Als facettenreicher Schauplatz biologischer und physikalischer Wunder stellt die endotheliale Glykokalyx – in Anlehnung an das bunte, artenreiche Great Barrier Reef – ein ebenso durch exogene und endogene Faktoren gefährdetes Konstrukt dar, das weiter intensiv erforscht werden will.

Literaturverzeichnis

1. Chappell D, Jacob M, Becker BF, Hofmann-Kiefer K, Conzen P, Rehm M. Expedition glycocalyx. A newly discovered "Great Barrier Reef". *Der Anaesthetist*. 2008;57(10):959-69.
2. Australian Government. Great Barrier Reef Marine Park Authority: The Great Barrier Reef Outlook Report 2014. www.gbrmpa.gov.au 26.12.2018.
3. Weinbaum S, Tarbell JM, Damiano ER. The structure and function of the endothelial glycocalyx layer. *Annual review of biomedical engineering*. 2007;9:121-67.
4. Luft JH. Fine structures of capillary and endocapillary layer as revealed by ruthenium red. *Federation proceedings*. 1966;25(6):1773-83.
5. Danielli JF. Capillary permeability and oedema in the perfused frog. *The Journal of physiology*. 1940;98(1):109-29.
6. Hwa C, Aird WC. The history of the capillary wall: doctors, discoveries, and debates. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2007;293(5):H2667-79.
7. Koning NJ, Vonk AB, Meesters MI, Oomens T, Verkaik M, Jansen EK, et al. Microcirculatory perfusion is preserved during off-pump but not on-pump cardiac surgery. *Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia*. 2014;28(2):336-41.
8. Gao F, Fu X, Qian M, Zhang Y, Li G, Hu J. Changes of small intestinal villi microcirculation in sidestream dark-field imaging with different target blood pressure in rabbits during endotoxin shock. *Zhonghua wei zhong bing ji jiu yi xue*. 2017;29(4):311-5.
9. Hernandez G, Teboul JL. Is the macrocirculation really dissociated from the microcirculation in septic shock? *Intensive care medicine*. 2016;42(10):1621-4.
10. Klinker R, Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S. *Physiologie*. Stuttgart, New York: Georg Thieme; 2009.
11. Aumüller G. *Duale Reihe - Anatomie*. Stuttgart: Thieme; 2010.
12. Hick C, Hick A. *Intensivkurs Physiologie*. München: Urban & Fischer; 1995.
13. Guyton AC, Hall JE. *Textbook of Medical Physiology*. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2006.
14. Tafner P, Chen FK, Rabello RF, Correa TD, Chaves RCF, Serpa AN. Recent advances in bedside microcirculation assessment in critically ill patients. *Revista Brasileira de terapia intensiva*. 2017;29(2):238-47.
15. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circulation research*. 2007;100(2):158-73.
16. van den Berg BM, Nieuwdorp M, Stroes ES, Vink H. Glycocalyx and endothelial (dys) function: from mice to men. *Pharmacological reports : PR*. 2006;58 Suppl:75-80.
17. Ortiz D, Briceno JC, Cabrales P. Microhemodynamic parameters quantification from intravital microscopy videos. *Physiological measurement*. 2014;35(3):351-67.
18. De Backer D, Donadello K, Taccone FS, Ospina-Tascon G, Salgado D, Vincent JL. Microcirculatory alterations: potential mechanisms and implications for therapy. *Annals of intensive care*. 2011;1(1):27.

19. Pries AR, Secomb TW. Rheology of the microcirculation. *Clinical hemorheology and microcirculation*. 2003;29(3-4):143-8.
20. Quinn AC, Petros AJ, Vallance P. Nitric oxide: an endogenous gas. *British journal of anaesthesia*. 1995;74(4):443-51.
21. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation*. 2007/03/14 ed2007. p. 1285-95.
22. Behrends J. *Duale Reihe - Physiologie*. Stuttgart: Thieme; 2010.
23. Gouverneur M, Berg B, Nieuwdorp M, Stroes E, Vink H. Vasculoprotective properties of the endothelial glycocalyx: effects of fluid shear stress. *Journal of internal medicine*. 2006;259(4):393-400.
24. Piagnerelli M, Ince C, Dubin A. Microcirculation. *Critical care research and practice*. 2012;2012:867176.
25. Fåhræus R, Lindqvist T. The viscosity of the blood in narrow capillary tubes. *American Journal of Physiology*. 1931;96(3):562-8
26. Suchkova OV, Gurfinkel YI, Sasonko ML. Microcirculatory parameters in compensated and decompensated type 2 diabetes mellitus. *Terapevticheskii arkhiv*. 2017;89(10):28-35.
27. Cersosimo E, DeFronzo RA. Insulin resistance and endothelial dysfunction: the road map to cardiovascular diseases. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 2006;22(6):423-36.
28. De Backer D, Orbegozo Cortes D, Donadello K, Vincent JL. Pathophysiology of microcirculatory dysfunction and the pathogenesis of septic shock. *Virulence*. 2014;5(1):73-9.
29. Koning NJ, Atasever B, Vonk AB, Boer C. Changes in microcirculatory perfusion and oxygenation during cardiac surgery with or without cardiopulmonary bypass. *Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia*. 2014;28(5):1331-40.
30. Omar YG, Massey M, Andersen LW, Giberson TA, Berg K, Cocchi MN, et al. Sublingual microcirculation is impaired in post-cardiac arrest patients. *Resuscitation*. 2013;84(12):1717-22.
31. Janssens U, Jung C, Hennersdorf M, Ferrari M, Fuhrmann J, Buerke M, et al. Empfehlungen zum hämodynamischen Monitoring in der internistischen Intensivmedizin. *Der Kardiologe*. 2016;10(3):149-69.
32. Charlton M, Sims M, Coats T, Thompson JP. The microcirculation and its measurement in sepsis. *Journal of the Intensive Care Society*. 2017;18(3):221-7.
33. Hernekamp JF, Neubrech F, Cordts T, Schmidt VJ, Kneser U, Kremer T. Influences of Macrohemodynamic Conditions on Systemic Microhemodynamic Changes in Burns. *Annals of plastic surgery*. 2016;77(5):523-8.
34. Ince C, Boerma EC, Cecconi M, De Backer D, Shapiro NI, Duranteau J, et al. Second consensus on the assessment of sublingual microcirculation in critically ill patients: results from a task force of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive care medicine*. 2018;44(3):281-99.

35. Bateman RM, Tokunaga C, Kareco T, Dorscheid DR, Walley KR. Myocardial hypoxia-inducible HIF-1alpha, VEGF, and GLUT1 gene expression is associated with microvascular and ICAM-1 heterogeneity during endotoxemia. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2007;293(1):H448-56.
36. Assuncao MS, Correa TD, Bravim Bde A, Silva E. How to choose the therapeutic goals to improve tissue perfusion in septic shock. *Einstein (Sao Paulo, Brazil)*. 2015;13(3):441-7.
37. Weidlich K, Kroth J, Nussbaum C, Hiedl S, Bauer A, Christ F, et al. Changes in microcirculation as early markers for infection in preterm infants--an observational prospective study. *Pediatric research*. 2009;66(4):461-5.
38. De Backer D, Donadello K, Sakr Y, Ospina-Tascon G, Salgado D, Scolletta S, et al. Microcirculatory alterations in patients with severe sepsis: impact of time of assessment and relationship with outcome. *Critical care medicine*. 2013;41(3):791-9.
39. Steppan J, Hofer S, Funke B, Brenner T, Henrich M, Martin E, et al. Sepsis and major abdominal surgery lead to flaking of the endothelial glycocalyx. *The Journal of surgical research*. 2011;165(1):136-41.
40. Heimhalt-El Hamriti M, Schreiber C, Noerenberg A, Scheffler J, Jacoby U, Haffner D, et al. Impaired skin microcirculation in paediatric patients with type 1 diabetes mellitus. *Cardiovascular diabetology*. 2013;12:115.
41. Alphonsus CS, Rodseth RN. The endothelial glycocalyx: a review of the vascular barrier. *Anaesthesia*. 2014;69(7):777-84.
42. Rehm M, Bruegger D, Christ F, Conzen P, Thiel M, Jacob M, et al. Shedding of the endothelial glycocalyx in patients undergoing major vascular surgery with global and regional ischemia. *Circulation*. 2007;116(17):1896-906.
43. Pries AR, Secomb TW, Gaehtgens P. The endothelial surface layer. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 2000;440(5):653-66.
44. Pries AR, Kuebler WM. Normal endothelium. *Handbook of experimental pharmacology*. 2006(176 Pt 1):1-40.
45. Bruegger D, Brettner F, Rossberg I, Nussbaum C, Kowalski C, Januszewska K, et al. Acute degradation of the endothelial glycocalyx in infants undergoing cardiac surgical procedures. *The Annals of thoracic surgery*. 2015;99(3):926-31.
46. Nieuwdorp M, Meuwese MC, Mooij HL, Ince C, Broekhuizen LN, Kastelein JJ, et al. Measuring endothelial glycocalyx dimensions in humans: a potential novel tool to monitor vascular vulnerability. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)*. 2008;104(3):845-52.
47. Reitsma S, Slaaf DW, Vink H, van Zandvoort MA, oude Egbrink MG. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 2007;454(3):345-59.
48. Tarbell JM, Pahakis MY. Mechanotransduction and the glycocalyx. *Journal of internal medicine*. 2006;259(4):339-50.
49. Starling EH. On the Absorption of Fluids from the Connective Tissue Spaces. *The Journal of physiology*. 1896;19(4):312-26.

50. Vink H, Duling BR. Capillary endothelial surface layer selectively reduces plasma solute distribution volume. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2000;278(1):H285-9.
51. Adamson RH, Lenz JF, Zhang X, Adamson GN, Weinbaum S, Curry FE. Oncotic pressures opposing filtration across non-fenestrated rat microvessels. *The Journal of physiology*. 2004;557(Pt 3):889-907.
52. Jacob M, Bruegger D, Rehm M, Welsch U, Conzen P, Becker BF. Contrasting effects of colloid and crystalloid resuscitation fluids on cardiac vascular permeability. *Anesthesiology*. 2006;104(6):1223-31.
53. Rehm M, Zahler S, Lotsch M, Welsch U, Conzen P, Jacob 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.
54. van den Berg BM, Vink H, Spaan JA. The endothelial glycocalyx protects against myocardial edema. *Circulation research*. 2003;92(6):592-4.
55. Vink H, Duling BR. Identification of distinct luminal domains for macromolecules, erythrocytes, and leukocytes within mammalian capillaries. *Circulation research*. 1996;79(3):581-9.
56. 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.
57. Ait-Oufella H, Maury E, Lehoux S, Guidet B, Offenstadt G. The endothelium: physiological functions and role in microcirculatory failure during severe sepsis. *Intensive care medicine*. 2010;36(8):1286-98.
58. Mulivor AW, Lipowsky HH. Role of glycocalyx in leukocyte-endothelial cell adhesion. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2002;283(4):H1282-91.
59. Mochizuki S, Vink H, Hiramatsu O, Kajita T, Shigeto F, Spaan JA, et al. Role of hyaluronic acid glycosaminoglycans in shear-induced endothelium-derived nitric oxide release. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2003;285(2):H722-6.
60. Li Q, Bolli R, Qiu Y, Tang XL, Murphree SS, French BA. Gene therapy with extracellular superoxide dismutase attenuates myocardial stunning in conscious rabbits. *Circulation*. 1998;98(14):1438-48.
61. Beresewicz A, Czarnowska E, Maczewski M. Ischemic preconditioning and superoxide dismutase protect against endothelial dysfunction and endothelium glycocalyx disruption in the postischemic guinea-pig hearts. *Molecular and cellular biochemistry*. 1998;186(1-2):87-97.
62. Yang Y, Haeger SM, Suflita MA, Zhang F, Dailey KL, Colbert JF, et al. Fibroblast Growth Factor Signaling Mediates Pulmonary Endothelial Glycocalyx Reconstitution. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2017;56(6):727-37.
63. Zuurbier CJ, Demirci C, Koeman A, Vink H, Ince C. Short-term hyperglycemia increases endothelial glycocalyx permeability and acutely decreases lineal density of capillaries with flowing red blood cells. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)*. 2005;99(4):1471-6.

64. Constantinescu AA, Vink H, Spaan JA. Elevated capillary tube hematocrit reflects degradation of endothelial cell glycocalyx by oxidized LDL. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2001;280(3):H1051-7.
65. Hofmann-Kiefer KF, Kemming GI, Chappell D, Flondor M, Kisch-Wedel H, Hauser A, et al. Serum heparan sulfate levels are elevated in endotoxemia. *European journal of medical research*. 2009;14:526-31.
66. Becker BF, Chappell D, Bruegger D, Annecke T, Jacob M. Therapeutic strategies targeting the endothelial glycocalyx: acute deficits, but great potential. *Cardiovascular research*. 2010;87(2):300-10.
67. Song JW, Goligorsky MS. Perioperative implication of the endothelial glycocalyx. *Korean journal of anesthesiology*. 2018;71(2):92-102.
68. Manon-Jensen T, Itoh Y, Couchman JR. Proteoglycans in health and disease: the multiple roles of syndecan shedding. *The FEBS journal*. 2010;277(19):3876-89.
69. Burke-Gaffney A, Evans TW. Lest we forget the endothelial glycocalyx in sepsis. *Critical care (London, England)*. 2012;16(2):121.
70. Rancan L, Simon C, Sanchez Pedrosa G, Aymonnier K, Shahani PM, Casanova J, et al. Glycocalyx Degradation after Pulmonary Transplantation Surgery. *European surgical research*. 2018;59(3-4):115-25.
71. Chignalia AZ, Yetimakman F, Christiaans SC, Unal S, Bayrakci B, Wagener BM, et al. THE GLYCOCALYX AND TRAUMA: A REVIEW. *Shock (Augusta, Ga)*. 2016;45(4):338-48.
72. Torres Filho I, Torres LN, Sondeen JL, Polykratis IA, Dubick MA. In vivo evaluation of venular glycocalyx during hemorrhagic shock in rats using intravital microscopy. *Microvascular research*. 2013;85:128-33.
73. Lemkes BA, Nieuwdorp M, Hoekstra JB, Holleman F. The glycocalyx and cardiovascular disease in diabetes: should we judge the endothelium by its cover? *Diabetes technology & therapeutics*. 2012;14 Suppl 1(1):S3-10.
74. Cancel LM, Ebong EE, Mensah S, Hirschberg C, Tarbell JM. Endothelial glycocalyx, apoptosis and inflammation in an atherosclerotic mouse model. *Atherosclerosis*. 2016;252:136-46.
75. Dane MJ, Khairoun M, Lee DH, van den Berg BM, Eskens BJ, Boels MG, et al. Association of kidney function with changes in the endothelial surface layer. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2014;9(4):698-704.
76. Martens RJ, Vink H, van Oostenbrugge RJ, Staals J. Sublingual microvascular glycocalyx dimensions in lacunar stroke patients. *Cerebrovascular diseases (Basel, Switzerland)*. 2013;35(5):451-4.
77. Herold G. *Innere Medizin*. Köln: Herausgeber Dr. Gerd Herold; 2013.
78. Nieuwdorp M, van Haeften TW, Gouverneur MC, Mooij HL, van Lieshout MH, Levi M, et al. Loss of endothelial glycocalyx during acute hyperglycemia coincides with endothelial dysfunction and coagulation activation in vivo. *Diabetes*. 2006;55(2):480-6.
79. Lopez-Quintero SV, Cancel LM, Pierides A, Antonetti D, Spray DC, Tarbell JM. High glucose attenuates shear-induced changes in endothelial hydraulic conductivity by degrading the glycocalyx. *PloS one*. 2013;8(11):e78954.

80. Nieuwdorp M, Mooij HL, Kroon J, Atasever B, Spaan JA, Ince C, et al. Endothelial glycocalyx damage coincides with microalbuminuria in type 1 diabetes. *Diabetes*. 2006;55(4):1127-32.
81. Broekhuizen LN, Lemkes BA, Mooij HL, Meuwese MC, Verberne H, Holleman F, et al. Effect of sulodexide on endothelial glycocalyx and vascular permeability in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2010;53(12):2646-55.
82. Nussbaum C, Cavalcanti Fernandes Heringa A, Mormanova Z, Puchwein-Schwepecke AF, Bechtold-Dalla Pozza S, Genzel-Boroviczeny O. Early microvascular changes with loss of the glycocalyx in children with type 1 diabetes. *The Journal of pediatrics*. 2014;164(3):584-9.e1.
83. Wadowski PP, Kautzky-Willer A, Gremmel T, Koppensteiner R, Wolf P, Ertl S, et al. Sublingual microvasculature in diabetic patients. *Microvascular research*. 2019;129:103971.
84. Henry CB, Duling BR. Permeation of the luminal capillary glycocalyx is determined by hyaluronan. *The American journal of physiology*. 1999;277(2 Pt 2):H508-14.
85. Nieuwdorp M, Holleman F, de Groot E, Vink H, Gort J, Kontush A, et al. Perturbation of hyaluronan metabolism predisposes patients with type 1 diabetes mellitus to atherosclerosis. *Diabetologia*. 2007;50(6):1288-93.
86. Mitra R, O'Neil GL, Harding IC, Cheng MJ, Mensah SA, Ebong EE. Glycocalyx in Atherosclerosis-Relevant Endothelium Function and as a Therapeutic Target. *Current atherosclerosis reports*. 2017;19(12):63.
87. van den Berg BM, Spaan JA, Vink H. Impaired glycocalyx barrier properties contribute to enhanced intimal low-density lipoprotein accumulation at the carotid artery bifurcation in mice. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 2009;457(6):1199-206.
88. Chappell D, Jacob M, Hofmann-Kiefer K, Bruegger D, Rehm M, Conzen P, et al. Hydrocortisone preserves the vascular barrier by protecting the endothelial glycocalyx. *Anesthesiology*. 2007;107(5):776-84.
89. Mulivor AW, Lipowsky HH. Inflammation- and ischemia-induced shedding of venular glycocalyx. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2004;286(5):H1672-80.
90. Chelazzi C, Villa G, Mancinelli P, De Gaudio AR, Adembri C. Glycocalyx and sepsis-induced alterations in vascular permeability. *Critical care (London, England)*. 2015;19:26.
91. Marechal X, Favory R, Joulin O, Montaigne D, Hassoun S, Decoster B, et al. Endothelial glycocalyx damage during endotoxemia coincides with microcirculatory dysfunction and vascular oxidative stress. *Shock (Augusta, Ga)*. 2008;29(5):572-6.
92. Donati A, Damiani E, Domizi R, Romano R, Adrario E, Pelaia P, et al. Alteration of the sublingual microvascular glycocalyx in critically ill patients. *Microvascular research*. 2013;90:86-9.
93. Rovas A, Seidel LM, Vink H, Pohlkötter T, Pavenstadt H, Ertmer C, et al. Association of sublingual microcirculation parameters and endothelial glycocalyx dimensions in resuscitated sepsis. *Critical care (London, England)*. 2019;23(1):260.
94. Nelson A, Berkestedt I, Schmidtchen A, Ljunggren L, Bodelsson M. Increased levels of glycosaminoglycans during septic shock: relation to mortality and the antibacterial actions of plasma. *Shock (Augusta, Ga)*. 2008;30(6):623-7.

95. Ikeda M, Matsumoto H, Ogura H, Hirose T, Shimizu K, Yamamoto K, et al. Circulating syndecan-1 predicts the development of disseminated intravascular coagulation in patients with sepsis. *Journal of critical care*. 2018;43:48-53.
96. De Backer D, Donadello K, Cortes DO. Monitoring the microcirculation. *Journal of clinical monitoring and computing*. 2012;26(5):361-6.
97. Lima A, Bakker J. Noninvasive monitoring of peripheral perfusion. *Intensive care medicine*. 2005;31(10):1316-26.
98. Cerny V. Sublingual Microcirculation. *Applied Cardiopulmonary Pathophysiology*. 2012(16):229-48.
99. Aykut G, Veenstra G, Scorcella C, Ince C, Boerma C. Cytocam-IDF (incident dark field illumination) imaging for bedside monitoring of the microcirculation. *Intensive care medicine experimental*. 2015;3(1):40.
100. Eriksson S, Nilsson J, Stureson C. Non-invasive imaging of microcirculation: a technology review. *Medical devices (Auckland, NZ)*. 2014;7:445-52.
101. Dobbe JG, Streekstra GJ, Atasever B, van Zijderveld R, Ince C. Measurement of functional microcirculatory geometry and velocity distributions using automated image analysis. *Medical & biological engineering & computing*. 2008;46(7):659-70.
102. De Backer D, Hollenberg S, Boerma C, Goedhart P, Buchele G, Ospina-Tascon G, et al. How to evaluate the microcirculation: report of a round table conference. *Critical care (London, England)*. 2007;11(5):R101.
103. van Elteren H, Reiss IK, de Jonge RC. Transcutaneous Microcirculatory Imaging in Preterm Neonates. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2015(106):e53562.
104. Groner W, Winkelmann JW, Harris AG, Ince C, Bouma GJ, Messmer K, et al. Orthogonal polarization spectral imaging: a new method for study of the microcirculation. *Nature medicine*. 1999;5(10):1209-12.
105. Cerny V, Turek Z, Parizkova R. Orthogonal polarization spectral imaging. *Physiological research*. 2007;56(2):141-7.
106. Schiessler C, Schaudig S, Harris AG, Christ F. [Orthogonal polarization spectral imaging--a new clinical method for monitoring of microcirculation]. *Der Anaesthetist*. 2002;51(7):576-9.
107. Goedhart PT, Khalilzada M, Bezemer R, Merza J, Ince C. Sidestream Dark Field (SDF) imaging: a novel stroboscopic LED ring-based imaging modality for clinical assessment of the microcirculation. *Optics express*. 2007;15(23):15101-14.
108. Bezemer R, Dobbe JG, Bartels SA, Boerma EC, Elbers PW, Heger M, et al. Rapid automatic assessment of microvascular density in sidestream dark field images. *Medical & biological engineering & computing*. 2011;49(11):1269-78.
109. Ince C. Sidestream dark field imaging: an improved technique to observe sublingual microcirculation. *Critical Care*. 2005;9(Suppl 1):P72-P.
110. Sherman H, Klausner S, Cook WA. Incident dark-field illumination: a new method for microcirculatory study. *Angiology*. 1971;22(5):295-303.

111. Gilbert-Kawai E, Coppel J, Bountziouka V, Ince C, Martin D. A comparison of the quality of image acquisition between the incident dark field and sidestream dark field video-microscopes. *BMC medical imaging*. 2016;16:10.
112. Massey MJ, Shapiro NI. A guide to human in vivo microcirculatory flow image analysis. *Critical care (London, England)*. 2016;20:35.
113. van Elteren HA, Ince C, Tibboel D, Reiss IK, de Jonge RC. Cutaneous microcirculation in preterm neonates: comparison between sidestream dark field (SDF) and incident dark field (IDF) imaging. *Journal of clinical monitoring and computing*. 2015;29(5):543-8.
114. Top AP, Ince C, de Meij N, van Dijk M, Tibboel D. Persistent low microcirculatory vessel density in nonsurvivors of sepsis in pediatric intensive care. *Critical care medicine*. 2011;39(1):8-13.
115. Alba-Alejandre I, Hiedl S, Genzel-Boroviczeny O. Microcirculatory changes in term newborns with suspected infection: an observational prospective study. *International journal of pediatrics*. 2013;2013:768784.
116. Muntau AC. *Intensivkurs Pädiatrie*. München: Urban & Fischer Verlag; 2011.
117. Top AP, Tasker RC, Ince C. The microcirculation of the critically ill pediatric patient. *Critical care (London, England)*. 2011;15(2):213.
118. Genzel-Boroviczeny O, Strotgen J, Harris AG, Messmer K, Christ F. Orthogonal polarization spectral imaging (OPS): a novel method to measure the microcirculation in term and preterm infants transcutaneously. *Pediatric research*. 2002;51(3):386-91.
119. Perera P, Kurban AK, Ryan TJ. The Development of the Cutaneous Microvascular System in the Newborn. *British Journal of Dermatology*. 1970;82(5):86-91.
120. Top AP, van Dijk M, van Velzen JE, Ince C, Tibboel D. Functional capillary density decreases after the first week of life in term neonates. *Neonatology*. 2011;99(1):73-7.
121. Kroth J, Weidlich K, Hiedl S, Nussbaum C, Christ F, Genzel-boroviczeny O. Functional vessel density in the first month of life in preterm neonates. *Pediatric research*. 2008;64(5):567-71.
122. Genzel-Boroviczeny O, Christ F, Glas V. Blood transfusion increases functional capillary density in the skin of anemic preterm infants. *Pediatric research*. 2004;56(5):751-5.
123. Schwepcke A, Weber FD, Mormanova Z, Cepissak B, Genzel-Boroviczeny O. Microcirculatory mechanisms in postnatal hypotension affecting premature infants. *Pediatric research*. 2013;74(2):186-90.
124. Hiedl S, Schwepcke A, Weber F, Genzel-Boroviczeny O. Microcirculation in preterm infants: profound effects of patent ductus arteriosus. *The Journal of pediatrics*. 2010;156(2):191-6.
125. Top AP, Ince C, Schouwenberg PH, Tibboel D. Inhaled nitric oxide improves systemic microcirculation in infants with hypoxemic respiratory failure. *Pediatric critical care medicine : a journal of the Society of Critical Care Medicine and the World Federation of Pediatric Intensive and Critical Care Societies*. 2011;12(6):e271-4.
126. Nussbaum C, Haberer A, Tiefenthaller A, Januszewska K, Chappell D, Brettner F, et al. Perturbation of the microvascular glycocalyx and perfusion in infants after cardiopulmonary bypass. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2015;150(6):1474-81.e1.

127. MicroVision. <http://www.microvisionmedical.com/> 26.12.2018
128. GlycoCheck. <https://microvascular.com/wp-content/uploads/2015/01/MicroVascular-Health-Solutions-Glycocalyx-White-Paper.pdf> 26.12.2018.
129. Lee DH, Dane MJ, van den Berg BM, Boels MG, van Teeffelen JW, de Mutsert R, et al. Deeper penetration of erythrocytes into the endothelial glycocalyx is associated with impaired microvascular perfusion. *PLoS one*. 2014;9(5):e96477.
130. Rovas A, Lukasz AH, Vink H, Urban M, Sackarnd J, Pavenstadt H, et al. Bedside analysis of the sublingual microvascular glycocalyx in the emergency room and intensive care unit - the GlycoNurse study. *Scandinavian journal of trauma, resuscitation and emergency medicine*. 2018;26(1):16.
131. Jaarsma C, Vink H, van Haare J, Bekkers S, van Rooijen BD, Backes WH, et al. Non-invasive assessment of microvascular dysfunction in patients with microvascular angina. *International journal of cardiology*. 2017;248:433-9.
132. Trzeciak S, Dellinger RP, Parrillo JE, Guglielmi M, Bajaj J, Abate NL, et al. Early microcirculatory perfusion derangements in patients with severe sepsis and septic shock: relationship to hemodynamics, oxygen transport, and survival. *Annals of emergency medicine*. 2007;49(1):88-98, .e1-2.
133. Machin DR, Gates PE, Vink H, Frech TM, Donato AJ. Automated Measurement of Microvascular Function Reveals Dysfunction in Systemic Sclerosis: A Cross-sectional Study. *The Journal of rheumatology*. 2017;44(11):1603-11.
134. Roos R, Genzel-Boroviczeny O, Proquitte H. *Checkliste Neonatologie*. Stuttgart, Germany: Georg Thieme Verlag; 2010.
135. Huxley VH, Kemp SS. Sex-Specific Characteristics of the Microcirculation. *Advances in experimental medicine and biology*. 2018;1065:307-28.
136. Greco A, Minghetti L, Puopolo M, Pietrobon B, Franzoi M, Chiandetti L, et al. Plasma levels of 15-F(2t)-isoprostane in newborn infants are affected by mode of delivery. *Clinical biochemistry*. 2007;40(18):1420-2.
137. Mocatta TJ, Winterbourn CC, Inder TE, Darlow BA. The effect of gestational age and labour on markers of lipid and protein oxidation in cord plasma. *Free radical research*. 2004;38(2):185-91.
138. Pillinger NL, Kam P. Endothelial glycocalyx: basic science and clinical implications. *Anaesthesia and intensive care*. 2017;45(3):295-307.
139. Haeren RHL, Rijkers K, Schijns O, Dings J, Hoogland G, van Zandvoort M, et al. In vivo assessment of the human cerebral microcirculation and its glycocalyx: A technical report. *Journal of neuroscience methods*. 2018;303:114-25.
140. Vlahu CA, Lemkes BA, Struijk DG, Koopman MG, Krediet RT, Vink H. Damage of the endothelial glycocalyx in dialysis patients. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2012;23(11):1900-8.
141. Ikonomidis I, Voumvourakis A, Makavos G, Triantafyllidi H, Pavlidis G, Katogiannis K, et al. Association of impaired endothelial glycocalyx with arterial stiffness, coronary microcirculatory dysfunction, and abnormal myocardial deformation in untreated hypertensives. *Journal of clinical hypertension (Greenwich, Conn)*. 2018;20(4):672-9.

142. Lyimo E, Haslund LE, Ramsing T, Wang CW, Efunshile AM, Manjurano A, et al. In vivo imaging of the buccal mucosa shows loss of the endothelial glycocalyx and perivascular hemorrhages in pediatric *Plasmodium falciparum* malaria. *Infection and immunity*. 2020;88(3):e00679-19
143. Mitsides N, Cornelis T, Broers NJH, Diederens NMP, Brenchley P, Heitink-Ter Braak N, et al. Inflammatory and Angiogenic Factors Linked to Longitudinal Microvascular Changes in Hemodialysis Patients Irrespective of Treatment Dose Intensity. *Kidney & blood pressure research*. 2017;42(5):905-18.
144. Treu CM, Lupi O, Bottino DA, Bouskela E. Sidestream dark field imaging: the evolution of real-time visualization of cutaneous microcirculation and its potential application in dermatology. *Archives of dermatological research*. 2011;303(2):69-78.
145. Gu YM, Wang S, Zhang L, Liu YP, Thijs L, Petit T, et al. Characteristics and determinants of the sublingual microcirculation in populations of different ethnicity. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)*. 2015;65(5):993-1001.
146. Giavarina D. Understanding Bland Altman analysis. *Biochemia medica*. 2015;25(2):141-51.
147. Salmon AH, Satchell SC. Endothelial glycocalyx dysfunction in disease: albuminuria and increased microvascular permeability. *The Journal of pathology*. 2012;226(4):562-74.
148. Jacob M, Chappell D, Becker BF. Regulation of blood flow and volume exchange across the microcirculation. *Critical care (London, England)*. 2016;20(1):319.
149. Cao RN, Tang L, Xia ZY, Xia R. Endothelial glycocalyx as a potential therapeutic target in organ injuries. *Chinese medical journal*. 2019;132(8):963-75.
150. Klijn E, Den Uil CA, Bakker J, Ince C. The heterogeneity of the microcirculation in critical illness. *Clinics in chest medicine*. 2008;29(4):643-54, viii.
151. Wright IM, Latter JL, Dyson RM, Levi CR, Clifton VL. Videomicroscopy as a tool for investigation of the microcirculation in the newborn. *Physiological reports*. 2016;4(19):e12941.
152. Boerma EC, van der Voort PH, Spronk PE, Ince C. Relationship between sublingual and intestinal microcirculatory perfusion in patients with abdominal sepsis. *Critical care medicine*. 2007;35(4):1055-60.
153. Langer S, Hatz R, Harris AG, Hernandez-Richter T, Maiwald G, Messmer K. Assessing the microcirculation in a burn wound by use of OPS imaging. *European journal of medical research*. 2001;6(6):231-4.
154. Koning NJ, Vonk AB, Vink H, Boer C. Side-by-Side Alterations in Glycocalyx Thickness and Perfused Microvascular Density During Acute Microcirculatory Alterations in Cardiac Surgery. *Microcirculation (New York, NY : 1994)*. 2016;23(1):69-74.
155. Donati A, Damiani E, Botticelli L, Adrario E, Lombrano MR, Domizi R, et al. The aPC treatment improves microcirculation in severe sepsis/septic shock syndrome. *BMC anesthesiology*. 2013;13(1):25.
156. Wadowski PP, Hulsmann M, Schorghofer C, Lang IM, Wurm R, Gremmel T, et al. Sublingual functional capillary rarefaction in chronic heart failure. *European journal of clinical investigation*. 2018;48(2).

157. van den Berg VJ, van Elteren HA, Buijs EA, Ince C, Tibboel D, Reiss IK, et al. Reproducibility of microvascular vessel density analysis in Sidestream dark-field-derived images of healthy term newborns. *Microcirculation (New York, NY : 1994)*. 2015;22(1):37-43.
158. Puchwein-Schwepcke A, Grzybowski AK, Genzel-Boroviczeny O, Nussbaum C. Effects of on the Cutaneous Microcirculatory Network in the First Weeks of Life. *Frontiers in pediatrics*. 2019;7:198.
159. Puchwein-Schwepcke AF, Schottmayer K, Mormanova Z, Dreyhaupt J, Genzel-Boroviczeny O, Thome UH. Permissive Hypercapnia Results in Decreased Functional Vessel Density in the Skin of Extremely Low Birth Weight Infants. *Frontiers in pediatrics*. 2018;6:52.
160. Verdant CL, De Backer D, Bruhn A, Clausi CM, Su F, Wang Z, et al. Evaluation of sublingual and gut mucosal microcirculation in sepsis: a quantitative analysis. *Critical care medicine*. 2009;37(11):2875-81.
161. de Bruin AF, Kornmann VN, van der Sloot K, van Vugt JL, Gosselink MP, Smits A, et al. Sidestream dark field imaging of the serosal microcirculation during gastrointestinal surgery. *Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland*. 2016;18(3):O103-10.
162. Groen BB, Hamer HM, Snijders T, van Kranenburg J, Frijns D, Vink H, et al. Skeletal muscle capillary density and microvascular function are compromised with aging and type 2 diabetes. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)*. 2014;116(8):998-1005.
163. Lindert J, Werner J, Redlin M, Kuppe H, Habazettl H, Pries AR. OPS imaging of human microcirculation: a short technical report. *Journal of vascular research*. 2002;39(4):368-72.
164. Pranskunas A, Tamosutis T, Balciuniene N, Damanskyte D, Sneider E, Vitkauskiene A, et al. Alterations of conjunctival glycocalyx and microcirculation in non-septic critically ill patients. *Microvascular research*. 2018;118:44-8.
165. Anand D, Ray S, Srivastava LM, Bhargava S. Evolution of serum hyaluronan and syndecan levels in prognosis of sepsis patients. *Clinical biochemistry*. 2016;49(10-11):768-76.
166. Donati A, Damiani E, Luchetti M, Domizi R, Scorcella C, Carsetti A, et al. Microcirculatory effects of the transfusion of leukodepleted or non-leukodepleted red blood cells in patients with sepsis: a pilot study. *Critical care (London, England)*. 2014;18(1):R33.
167. Cornelis T, Broers NJ, Titulaer DC, Henskens YM, van Oerle R, van der Sande FM, et al. Effects of ultrapure hemodialysis and low molecular weight heparin on the endothelial surface layer. *Blood purification*. 2014;38(3-4):203-10.
168. Mitsides N, Cornelis T, Broers NJH, Diederer NMP, Brenchley P, van der Sande FM, et al. Extracellular overhydration linked with endothelial dysfunction in the context of inflammation in haemodialysis dependent chronic kidney disease. *PLoS one*. 2017;12(8):e0183281.
169. Lekakis J, Abraham P, Balbarini A, Blann A, Boulanger CM, Cockcroft J, et al. Methods for evaluating endothelial function: a position statement from the European Society of Cardiology Working Group on Peripheral Circulation. *European journal of cardiovascular prevention and rehabilitation : official journal of the European Society of Cardiology, Working Groups on Epidemiology & Prevention and Cardiac Rehabilitation and Exercise Physiology*. 2011;18(6):775-89.

170. Bruegger D, Schwartz L, Chappell D, Jacob M, Rehm M, Vogeser M, 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 research in cardiology*. 2011;106(6):1111-21.
171. Ikonomidis I, Pavlidis G, Lambadiari V, Kousathana F, Varoudi M, Spanoudi F, et al. Early detection of left ventricular dysfunction in first-degree relatives of diabetic patients by myocardial deformation imaging: The role of endothelial glycocalyx damage. *International journal of cardiology*. 2017;233:105-12.
172. Brands J, Hubel CA, Althouse A, Reis SE, Pacella JJ. Noninvasive sublingual microvascular imaging reveals sex-specific reduction in glycocalyx barrier properties in patients with coronary artery disease. *Physiological reports*. 2020;8(2):e14351.
173. Ikonomidis I, Frogoudaki A, Vrettou AR, Andreou I, Palaiodimou L, Katogiannis K, et al. Impaired Arterial Elastic Properties and Endothelial Glycocalyx in Patients with Embolic Stroke of Undetermined Source. *Thrombosis and haemostasis*. 2019;119(11):1860-8.
174. Machin DR, Bloom SI, Campbell RA, Phuong TTT, Gates PE, Lesniewski LA, et al. Advanced age results in a diminished endothelial glycocalyx. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2018;315(3):H531-h9.
175. Astapenko D, Ticha A, Tomasova A, Hyspler R, Zadak Z, Lehmann C, et al. Evaluation of endothelial glycocalyx in healthy volunteers - An observational study. *Clinical hemorheology and microcirculation*. 2019; published online ahead of print.
176. Kent AL, Wright IM, Abdel-Latif ME. Mortality and adverse neurologic outcomes are greater in preterm male infants. *Pediatrics*. 2012;129(1):124-31.
177. Stark MJ, Clifton VL, Wright IM. Sex-specific differences in peripheral microvascular blood flow in preterm infants. *Pediatric research*. 2008;63(4):415-9.
178. MacDorman MF, Declercq E, Menacker F, Malloy MH. Infant and neonatal mortality for primary cesarean and vaginal births to women with "no indicated risk," United States, 1998-2001 birth cohorts. *Birth (Berkeley, Calif)*. 2006;33(3):175-82.
179. Saphier O, Schneid-Kofman N, Silberstein E, Silberstein T. Does mode of delivery affect neonate oxidative stress in parturition? Review of literature. *Archives of gynecology and obstetrics*. 2013;287(3):403-6.
180. Yektaei-Karin E, Moshfegh A, Lundahl J, Berggren V, Hansson LO, Marchini G. The stress of birth enhances in vitro spontaneous and IL-8-induced neutrophil chemotaxis in the human newborn. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*. 2007;18(8):643-51.
181. Brower JB, Targovnik JH, Caplan MR, Massia SP. High glucose-mediated loss of cell surface heparan sulfate proteoglycan impairs the endothelial shear stress response. *Cytoskeleton (Hoboken, NJ)*. 2010;67(3):135-41.
182. Dogne S, Flamion B, Caron N. Endothelial Glycocalyx as a Shield Against Diabetic Vascular Complications: Involvement of Hyaluronan and Hyaluronidases. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2018;38(7):1427-39.

183. Villela NR, Kramer-Aguiar LG, Bottino DA, Wiernsperger N, Bouskela E. Metabolic disturbances linked to obesity: the role of impaired tissue perfusion. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*. 2009;53(2):238-45.
184. Lambadiari V, Pavlidis G, Kousathana F, Maratou E, Georgiou D, Andreadou I, et al. Effects of Different Antidiabetic Medications on Endothelial Glycocalyx, Myocardial Function, and Vascular Function in Type 2 Diabetic Patients: One Year Follow-Up Study. *Journal of clinical medicine*. 2019;8(7).
185. Eskens BJ, Mooij HL, Cleutjens JP, Roos JM, Cobelens JE, Vink H, 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.
186. Eskens BJ, Leurgans TM, Vink H, Vanteeffelen JW. Early impairment of skeletal muscle endothelial glycocalyx barrier properties in diet-induced obesity in mice. *Physiological reports*. 2014;2(1):e00194.
187. Crowley M, Kirpalani H. A rational approach to red blood cell transfusion in the neonatal ICU. *Current opinion in pediatrics*. 2010;22(2):151-7.
188. Sakr Y, Dubois MJ, De Backer D, Creteur J, Vincent JL. Persistent microcirculatory alterations are associated with organ failure and death in patients with septic shock. *Critical care medicine*. 2004;32(9):1825-31.
189. Cabrales P, Vazquez BY, Tsai AG, Intaglietta M. Microvascular and capillary perfusion following glycocalyx degradation. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)*. 2007;102(6):2251-9.
190. Landsverk SA, Tsai AG, Cabrales P, Intaglietta M. Impact of enzymatic degradation of the endothelial glycocalyx on vascular permeability in an awake hamster model. *Critical care research and practice*. 2012;2012:842545.
191. Pulitano C, Joseph D, Sandroussi C, Verran D, Ho P, Debiasio A, et al. Postreperfusion microcirculatory derangements after liver transplantation: Relationship to hemodynamics, serum mediators, and outcome. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2017;23(4):527-36.
192. Yeh YC, Chao A, Lee CY, Lee CT, Yeh CC, Liu CM, et al. An observational study of microcirculation in dialysis patients and kidney transplant recipients. *European journal of clinical investigation*. 2017;47(9):630-7.
193. Miranda M, Balarini M, Caixeta D, Bouskela E. Microcirculatory dysfunction in sepsis: pathophysiology, clinical monitoring, and potential therapies. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2016;311(1):H24-35.
194. Pouska J, Tegl V, Astapenko D, Cerny V, Lehmann C, Benes J. Impact of Intravenous Fluid Challenge Infusion Time on Macrocirculation and Endothelial Glycocalyx in Surgical and Critically Ill Patients. *BioMed research international*. 2018;2018:8925345.
195. Vlahu CA, Lopes Barreto D, Struijk DG, Vink H, Krediet RT. Is the systemic microvascular endothelial glycocalyx in peritoneal dialysis patients related to peritoneal transport? *Nephron Clinical practice*. 2014;128(1-2):159-65.

196. Weissgerber TL, Garcia-Valencia O, Milic NM, Codsí E, Cubro H, Nath MC, et al. Early Onset Preeclampsia Is Associated With Glycocalyx Degradation and Reduced Microvascular Perfusion. *Journal of the American Heart Association*. 2019;8(4):e010647.
197. Moore JP, Dyson A, Singer M, Fraser J. Microcirculatory dysfunction and resuscitation: why, when, and how. *British journal of anaesthesia*. 2015;115(3):366-75.
198. Henderson-Toth CE, Jahnsen ED, Jamarani R, Al-Roubaie S, Jones EA. The glycocalyx is present as soon as blood flow is initiated and is required for normal vascular development. *Developmental biology*. 2012;369(2):330-9.
199. Gorshkov AY, Klimushina MV, Boytsov SA, Kots AY, Gumanova NG. Increase in perfused boundary region of endothelial glycocalyx is associated with higher prevalence of ischemic heart disease and lesions of microcirculation and vascular wall. *Microcirculation (New York, NY : 1994)*. 2018;25(4):e12454.
200. Astapenko D, Pouska J, Benes J, Skulec R, Lehmann C, Vink H, et al. Neuraxial anesthesia is less harmful to the endothelial glycocalyx during elective joint surgery compared to general anesthesia. *Clinical hemorheology and microcirculation*. 2019;72(1):11-21.
201. Brettner F, Heitzer M, Thiele F, Hulde N, Nussbaum C, Achatz S, et al. Non-invasive evaluation of macro- and microhemodynamic changes during induction of general anesthesia - A prospective observational single-blinded trial. *Clinical hemorheology and microcirculation*. 2020; published online ahead of print.
202. Dostalova V, Astapenko D, Dostalova V, Jr., Kraus J, Cerny V, Ticha A, et al. The Effect of Fluid Loading and Hypertonic Saline Solution on Cortical Cerebral Microcirculation and Glycocalyx Integrity. *Journal of neurosurgical anesthesiology*. 2019;31(4):434-443.
203. Schott U, Solomon C, Fries D, Bentzer P. The endothelial glycocalyx and its disruption, protection and regeneration: a narrative review. *Scandinavian journal of trauma, resuscitation and emergency medicine*. 2016;24:48.
204. Drost CC, Rovas A, Kusche-Vihrog K, Van Slyke P, Kim H, Hoang VC, et al. Tie2 Activation Promotes Protection and Reconstitution of the Endothelial Glycocalyx in Human Sepsis. *Thrombosis and haemostasis*. 2019;119(11):1827-38.
205. Martin L, Koczera P, Zechendorf E, Schuerholz T. The Endothelial Glycocalyx: New Diagnostic and Therapeutic Approaches in Sepsis. *BioMed research international*. 2016;2016:3758278.
206. Astapenko D, Turek Z, Dostal P, Hyspler R, Ticha A, Kaska M, et al. Effect of short-term administration of lipid emulsion on endothelial glycocalyx integrity in ICU patients - A microvascular and biochemical pilot study. *Clinical hemorheology and microcirculation*. 2019;73(2):329-39.

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der endothelialen Glykokalyx aus Chappell et al.

Abbildung 2: Schematische Darstellung der endothelialen Glykokalyx aus Reitsma et al.

Abbildung 3: Endotheliale Glykokalyx vor und nach Schädigung durch Ischämie/Reperfusion aus Becker et al.

Abbildung 4: Schematische Darstellung der OPS Technik aus Groner et al.

Abbildung 5: Schematische Darstellung der SDF Technik von Cerny

Abbildung 6: Aufbau der Messgeräte

Abbildung 7: MicroScan Videomikroskop

Abbildung 8: MicroScan Videomikroskop mit Battery Unit und Kalibriereinheit

Abbildung 9: GlycoCheck™ Software

Abbildung 10: Mikrozirkulationsmessung bei einem männlichen Neugeborenen

Abbildung 11: Modus der Blutgasanalyse n=85

Abbildung 12: Hämatokrit [%] venös vs. kapillär

Abbildung 13: Bland-Altman Plot of Interrater Reliability: Differenz vs. Mittelwert

Abbildung 14: unpaired t-Test: Perfused Boundary Region [μm] männlich vs. weiblich

Abbildung 15: unpaired t-Test: Perfused Boundary Region [μm] Sectio vs. Spontangeburt

Abbildung 16: Blutglucosewert [mg/dl] vs. Perfused Boundary Region [μm]

Abbildung 17: Perfused Boundary Region [μm] vs. Hämatokrit [%] kapillär u. venös

Abbildung 18: Red Blood Cell filling [%] vs. Perfused Boundary Region [μm]

Abbildung 19: Valid Vessel Density [$\mu\text{m}/\text{mm}^2$] vs. Perfused Boundary Region [μm]

Abbildung 20: Valid Vessel Density [$\mu\text{m}/\text{mm}^2$] vs. Red Blood Cell filling [%]

Abbildung 21: PBR [μm] extreme FG vs. moderate FG vs. RG

Tabelle 1: Patientenkollektivdaten zur Geburt n=85 bzw. Apgar und NS pH n=84

Tabelle 2: Patientenkollektivdaten zum Messzeitpunkt n=85

Tabelle 3: Mittelwerte der Blutgasanalysewerte mit Standardabweichung

Tabelle 4: Mikrozirkulationsparameter, PBR und RBC filling n=85, VVD/TVD und p50 n=84

Tabelle 5: Übersicht BGA Werte aller Reifgeborener am 3. bzw. 4. Lebenstag

Tabelle 6: Übersicht BGA Mittelwerte und SD aufgeteilt nach kapillärem und venösem Abnahmemodus

Tabelle 7: Übersicht über die Korrelationen der Mikrozirkulationsparameter

Anhang

I) Übersichtstabellen

Tabelle 5: Übersicht BGA Werte aller Reifgeborener am 3. bzw. 4. Lebenstag

	Min	Max	Mittelwert + SD	n
Natrium mmol/L	127	146	139 ± 4	81
Kalium mmol/L	3,7	7,4*	4,9 ± 0,8	79
Calcium mmol/L	1,05	1,35	1,22 ± 0,06	81
Chlorid mmol/L	100	129	111 ± 4	80
pH	7,30	7,51	7,40 ± 0,04	81
pCO2 mmHg	17,4	48,1	36,0 ± 5,5	80
pO2 mmHg	25,1	83,3	43,7 ± 11,4	80
Base Excess mmol/L	-6,6	1,7	-2,0 ± 1,8	80
Hydrogencarbonat mmol/L	18,6	25,6	22,6 ± 1,5	80
Laktat mmol/L	1,1	4,6*	2,3 ± 0,8	81
Glucose mg/dL	45	95	69 ± 11	80
Bilirubin mg/dL	1,5	17,4	9,3 ± 3,5	79
Hämoglobin g/dL	12,7	26,3	19,3 ± 2,8	80
Hämatokrit %	39,0	79,9*	59,1 ± 8,4	80

* diese Maximalwerte stammen alle aus kapillären Proben, wobei die Gefahr der Stauung und folglich falsch hohen Werten größer ist. Bei hohen Hämatokrit Werten wurde bei Verdacht auf Polyglobulie ein Schleuder-Hämatokrit bestimmt. Keiner der Studienpatienten zeigte in den Kontrollen eine interventionspflichtige Polyglobulie (HKT 65-70% + klinische Symptomatik wie Dyspnoe, Akrozyanose, Hypoglykämie bzw. HKT > 70% ± klinische Symptomatik)

Tabelle 6: Übersicht BGA Mittelwerte und SD aufgeteilt nach kapillärem und venösem Abnahmemodus

Kapilläre Abnahme:

a)					
	Na ⁺ mmol/L	K ⁺ mmol/L	Ca ⁺⁺ mmol/L	Cl ⁻ mmol/L	
mean ± SD	138 ± 3	5,4 ± 0,9	1,22 ± 0,06	113 ± 3	
b)					
	pH	pCO2 mmHg	pO2 mmHg	BE mmol/L	HCO ₃ ⁻ mmol/L
mean ± SD	7,42 ± 0,03	33,4 ± 4,3	49,9 ± 8,9	-2,2 ± 2,1	23,0 ± 1,4
c)					
	Lak mmol/L	Gluc mg/dL	Bili mg/dL	Hb g/dL	Hkt %
mean ± SD	2,3 ± 0,9	69 ± 12	8,8 ± 3,5	21,0 ± 2,6	64 ± 8

Venöse Abnahme:

a)

	Na ⁺ mmol/L	K ⁺ mmol/L	Ca ⁺⁺ mmol/L	Cl ⁻ mmol/L
mean ± SD	141 ± 4	4,5 ± 0,6	1,22 ± 0,07	109 ± 5

b)

	pH	pCO ₂ mmHg	pO ₂ mmHg	BE mmol/L	HCO ₃ ⁻ mmol/L
mean ± SD	7,39 ± 0,03	38,1 ± 5,1	38,8 ± 11	-1,8 ± 1,6	22,3 ± 1,5

c)

	Lak mmol/L	Gluc mg/dL	Bili mg/dL	Hb g/dL	Hkt %
mean ± SD	2,2 ± 0,7	69 ± 11	9,4 ± 3,5	18,0 ± 2,2	55 ± 7

Tabelle 7: Übersicht über die Korrelationen der Mikrozirkulationsparameter

x\y	RBC filling	VVD
PBR	p < 0,0001 Pearson r = -0,87	p = 0,0001 Pearson r = -0,41
RBC filling		p < 0,0001 Pearson r = 0,46

II) Elterninformation und Einverständniserklärung

Klinikum der Universität

Neonatologie im Perinatalzentrum Innenstadt
Leitung:

Prof. Dr. med. Orsolya Genzel-Boroviczény

München

Kinderklinik und Kinderpoliklinik
im Dr. von Haunerschen Kinderspital

Leitung: Prof. Dr. med. Dr. sci. nat. Christoph Klein

Dr. med. Claudia Nußbaum

Dr. von Haunersches Kinderspital

Lindwurmstr. 4, 80337 München

Tel: 089 5160-2811

Information und Einverständniserklärung für die Studie:

„In-vivo Untersuchung der mikrovaskulären Glykokalyx bei Neonaten und Kindern unter physiologischen Bedingungen und im Rahmen ausgewählter Pathologien.“

Patienteninformation

Liebe Eltern, liebe Erziehungsberechtigte,

Wie Sie bereits im Gespräch mit uns erfahren haben, führen wir eine Studie mit dem Titel „In-vivo Untersuchung der mikrovaskulären Glykokalyx bei Neonaten und Kindern unter physiologischen Bedingungen und im Rahmen ausgewählter Pathologien“ durch.

In dieser Studie geht es darum, neue Erkenntnisse über den Aufbau und die Funktion der kleinsten Blutgefäßen zu erlangen. Ziel ist es die Entstehung von Erkrankungen, welche mit einer Fehlregulation der Gefäße und Durchblutungsstörungen einhergehen, genauer zu verstehen, um diese besser behandeln zu können. Zu solchen Erkrankungen zählen beispielsweise schwere Infektionen und akute Veränderungen der Blutzusammensetzung aber auch chronische Erkrankungen wie Diabetes mellitus oder angeborene Herzfehler.

Von besonderem Interesse ist hierbei eine Struktur der Gefäßwand, die sich Glykokalyx nennt. Es handelt sich um eine Schicht aus Zucker- und Eiweißbestandteilen, welche jedes

gesunde Gefäß von innen ausgekleidet. Untersuchungen an Erwachsenen haben gezeigt, dass die Glykokalyx eine zentrale Rolle bei der Regulation der Gefäßfunktionen einnimmt. Ein Abbau oder Veränderung der Zusammensetzung der Glykokalyx können daher zu Fehlfunktion der Blutgefäße führen. Die Folgen sind vielfältig und reichen bis zum Organversagen. Bei Kindern ist bislang unklar wie weit die Glykokalyx bereits ausgebildet ist und ob eine Schädigung zur Entstehung von Komplikationen im Rahmen der o.g. Erkrankungen führt.

Wir möchten daher mittels eines kleinen Videomikroskopes (MicroScan, MicroVision Medical, Amsterdam, Niederlande) die Gefäße Ihres Kindes direkt untersuchen. Hierzu setzen wir je nach Alter des Kindes einen kleinen Messfühler an die Ohrmuschel, den Oberarm oder unter die Zunge. Dieser verfügt über eine LED Lichtquelle, welche grünes Licht ins Gewebe entsendet. Das Licht wird von den roten Blutkörperchen in den Gefäßen absorbiert, während es von dem umliegende Gewebe reflektiert wird. Das zurückgestrahlte Licht wird wiederum von dem Messfühler detektiert und in ein bewegtes Bild der Gefäße umgesetzt, welches über eine Verbindung mit einem Computer digital aufgezeichnet wird. Die Lichtquelle ist so konzipiert, dass es zu keiner Erwärmung oder anderen Auswirkungen auf die Haut kommt. Die Messung dauert ca. 15 Minuten und ist für Ihr Kind vollkommen schmerzlos, strahlungsfrei und ohne Risiko. Sie können selbstverständlich gerne bei der Untersuchung anwesend sein.

Um zu klären, welche Faktoren möglicherweise zu einem Abbau der Glykokalyx führen, möchten wir zudem bestimmte Blutwerte (z.B. Blutzucker, Hämoglobinwert) bestimmen. Hierfür versuchen wir die Messungen zu einem Zeitpunkt durchzuführen, an welchem eine klinisch notwendige Blutentnahme vorgesehen ist, damit ihr Kind keiner zusätzlichen Blutentnahme ausgesetzt wird. Wir werden dann im Rahmen dieser Blutentnahme etwa 5-10 ml Blut (bei Säuglingen 2 ml) gewinnen. Falls dies nicht möglich ist, verzichten wir auf eine Blutentnahme aus einer Vene und würden dafür ggf. nur einen kleinen Fingerpiks machen. Weiterhin kann es notwendig sei, dass wir eine Urinprobe von ihrem Kind nehmen oder sogar eine Urinsammlung über 24-Stunden veranlassen, um die Abbauprodukte der Glykokalyx im Urin zu messen. Die Proben werden unmittelbar verschlüsselt und dann zur weiteren Verarbeitung in das Laboratorium der Kinderklinik transferiert. Die Daten und Proben werden in der Abteilung für Neonatologie der Kinderklinik im Perinatalzentrum Innenstadt zehn Jahre lang aufbewahrt.

Sie können vollkommen frei entscheiden, ob Sie einer Teilnahm ihres Kindes an der Studie zustimmen. Sollten Sie ablehnen, wird dadurch keinerlei Nachteil für die weitere medizinische Versorgung Ihres Kindes entstehen. Sie können Ihr Einverständnis jederzeit ohne Angabe von Gründen zurückziehen. Im Falle eines Rücktritts von der Studie wird bereits gewonnenes Material vernichtet, es sei denn, Sie erklären sich trotz des Rücktritts von der Studie mit der Auswertung des Materials bzw. der Daten bereit. In diesem Fall wird das Material nur in irreversibel anonymisierter Form weiter verwendet.



Datenschutz:

Nur direkt mit der Studie betraute Personen haben im Rahmen der entsprechenden gesetzlichen Vorschriften Zugang zu den vertraulichen Daten, in denen die Probanden namentlich genannt werden. Dritte erhalten keinen Einblick in Originalkrankenunterlagen. Die Daten und Proben werden verschlüsselt (pseudonymisiert) erhoben. Hierzu erhält jedes Kind eine fortlaufende Studiennummer (z.B. 001, 002, 003 usw.), welche weder Initialen noch Geburtsdatum oder sonstige personenbezogene Merkmale enthält. Alle Messungen und Proben eines Probanden werden unter dieser Studiennummer geführt. Eine Entschlüsselung ist nicht planmäßig vorgesehen. Unter Umständen ist es für die Interpretation der Untersuchungsergebnisse jedoch notwendig, dass nachträglich eine Zuordnung der Messungen oder Proben zu den Probanden erfolgt, um beispielsweise eine Korrelation mit klinischen und laborchemischen Daten vornehmen zu können, welche zum Messzeitpunkt noch nicht vorlagen. In diesem Falle findet eine Entschlüsselung der Daten/Proben nur durch unmittelbar mit der Studie betrauten Personen statt. Diese Personen unterliegen der Schweigepflicht und sind zur Beachtung des Datenschutzes verpflichtet.

Die Weitergabe der Daten erfolgt ausschließlich zu statistischen und wissenschaftlichen Zwecken in verschlüsselter Form. Auch in etwaigen Veröffentlichungen der Daten dieser Studie findet keine namentliche Nennung statt.

Gerne können Sie sich bei weiteren Fragen an einen der verantwortlichen Ärzte wenden.

Wir würden uns sehr freuen, wenn Sie der Teilnahme Ihres Kindes zustimmen würden. Sie helfen damit den jungen Patienten.

Mit freundlichen Grüßen

Dr. med. Claudia Nußbaum
Assistenzärztin für Kinderheilkunde

Dr. med. Alexandra Puchwein-Schwepcke
Assistenzärztin für Kinderheilkunde

Einverständniserklärung

Hiermit erkläre ich mich mit der Teilnahme meines Kindes
an der Studie „In-vivo Untersuchung der mikrovaskulären Glykokalyx bei Neonaten und
Kindern unter physiologischen Bedingungen und im Rahmen ausgewählter Pathologien“
einverstanden.

Ich wurde darüber aufgeklärt, dass die im Rahmen der Studie gewonnenen Proben und
Daten in verschlüsselter Form gespeichert und ausgewertet werden. Für die
Verschlüsselung werden die Proben mit fortlaufenden Nummern versehen, ohne jeglichen
Hinweis auf die Person wie Geburtsdatum oder Initialen. Ich bin mit der Weitergabe der
Daten in verschlüsselter Form ausschließlich zu statistischen und wissenschaftlichen
Zwecken im Rahmen der Studie einverstanden.

Ich wurde darauf hingewiesen, dass die Teilnahme an dieser Studie freiwillig ist und aus
einer Nichtteilnahme meinem Kind keinerlei Nachteile entstehen. Ich bin darüber informiert,
dass ich jederzeit und ohne Angabe von Gründen meine Einwilligung zur Teilnahme an der
Studie widerrufen kann. In diesem Falle werden bereits erhobene Daten/Proben vernichtet.

Die Studie wurde mir von in einem persönlichen Gespräch
ausführlich und verständlich erklärt und ich habe keine weiteren Fragen bezüglich der
Durchführung dieser Untersuchungen. Ich hatte ausreichend Zeit mich zu entscheiden.

Ort, Datum Name und Unterschrift der Eltern/Erziehungsberechtigten

Ort, Datum Name und Unterschrift des Arztes

**Ich bin einverstanden, dass im Rahmen der o.g. Studie Daten und Proben in
verschlüsselter Form gewonnen und nach Maßgabe der Patienteninformation für
Studienzwecke verwendet werden.**

Ort, Datum Name und Unterschrift der Eltern/Erziehungsberechtigten

Ort, Datum Name und Unterschrift des Arztes

Danksagung

Zunächst gilt mein Dank meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. med. O. Genzel-Boroviczény, die mir die Durchführung dieser Doktorarbeit überhaupt erst ermöglicht hat. Hierdurch durfte ich in das spannende Feld der Neonatologie eintauchen und diese näher kennen lernen. Auch erleichterte sie mir den Übergang von Studium bis zum Einstieg in die Assistenzarztzeit, wofür ich sehr dankbar bin. Für die Zeit außerhalb der Neonatologie die besten Wünsche.

Weiterhin möchte ich mich von ganzem Herzen bei meiner Betreuerin Frau PD Dr. med. C. Nußbaum für ihre Hilfe und Geduld bedanken. Vom ersten Tag an stand sie stets für alle Fragen technischer, wissenschaftlicher oder klinischer Natur bereit und unterstützte mich wo es nur ging.

Für die schöne und interessante Zeit sowie die gegenseitige Hilfe möchte ich mich bei meiner Mitdoktorandin Lea Rajwich bedanken.

Ein großes Danke geht an die Schwestern und Ärzte der neonatologischen Intensivstation und dem Allgemeinen Kinderzimmer in der Frauenklinik Maistrasse. Die Pflege, die ein wichtiger Ansprechpartner beim Handling der kleinen Patienten war und die Stationsärzte, die ein beengtes Arztzimmer und herumliegende Kabel tolerierten aber auch bei schwierigen Blutentnahmen und Fragen immer gerne geholfen haben.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei den Eltern und kleinen Patienten bedanken. Ohne ihr Vertrauen und Interesse an unseren Messungen wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Aus ganzem Herzen möchte ich schließlich meinen Eltern und meinem Freund danken. Nicht nur bei der Durchführung dieses Projekts sondern während meines ganzen Studiums und weit darüber hinaus standen sie mir mit Rat und Tat zur Seite und unterstützten mich wo es nur geht. Ihr habt immer ein offenes Ohr, eine Schulter zum Ausweinen, ertragt mich in allen Stimmungslagen und seit immer für mich da, danke für alles!

Eidesstattliche Versicherung

Artmann, Stefanie

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

„Mikrozirkulationsmessungen zur Etablierung von Normwerten der endothelialen Glykokalyx bei gesunden Neugeborenen“

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

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

Neuried, 21.04.2021

Stefanie Artmann

Ort, Datum

Unterschrift der Doktorandin