

Aus der
Abteilung der Kinderkardiologie und Pädiatrischen Intensivmedizin
Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Nikolaus Alexander Haas

Kardiovaskuläre Langzeitfolgen nach Kawasaki Syndrom

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

vorgelegt von

Miriam Erika König

aus

Nürnberg

Jahr

2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Nikolaus Alexander Haas

Mitberichterstatter: PD Dr. Simon Deseive

Prof. Dr. Bruno C. Huber

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. André Jakob

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 14.12.2023

Affidavit



Eidesstattliche Versicherung

König, Miriam

Name, Vorname

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

Kardiovaskuläre Langzeitfolgen nach Kawasaki Syndrom

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

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

Nürnberg, den 02.03.2024

Miriam König

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

Inhaltsverzeichnis

Affidavit	3
Inhaltsverzeichnis	4
Tabellenverzeichnis	5
Abbildungsverzeichnis	6
Abkürzungsverzeichnis	7
Publikationsliste	8
1. Beitrag zu den Veröffentlichungen	9
1.1 Beitrag zu Veröffentlichung I	9
1.2 Beitrag zu Veröffentlichung II	10
2. Einleitung	11
2.1 Kawasaki Syndrom	11
2.2 Begründung der Studien	12
2.3 Carotid Intima-Media Roughness	13
2.4 Endotheliale Glykokalix	15
3. Zusammenfassung	17
3.1 Ergebnisse der cIMR Untersuchung	17
3.1.1 Baseline-Charakteristika	17
3.1.2 Carotis Intima-Media Roughness	18
3.1.3 CIMR im Vergleich zu Kontrollpersonen	19
3.1.4 Korrelation der cIMR mit kardiovaskulären Risikofaktoren	19
3.1.5 Einfluss von Parameter aus der Akutphase auf die cIMR	20
3.2 Endotheliale Glykokalix	20
3.2.1 Baseline-Charakteristika	21
3.2.2 Glykokalix Biomarker im Vergleich zu Kontrollpersonen	21
3.2.3 Einfluss von Parameter aus der Akutphase auf die Glykokalix	21
3.2.4 Interaktionen zwischen kardiovaskulären Risikofaktoren, Glykokalix Biomarkern und der Diagnose Kawasaki Syndrom	22
3.3 Schlussfolgerung	23
4. Abstract (English):	25
5. Veröffentlichung I	27
6. Veröffentlichung II	38
7. Literaturverzeichnis	45
Danksagung	49

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: <i>Baseline-Charakteristika der Patienten und Kontrollen</i>	18
Tabelle 2: <i>Akutphaseparameter der KS Patienten</i>	20
Tabelle 3: <i>Assoziation zwischen Akutphaseparametern und Glycocalix Biomarkern</i>	22

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: *cIMR* Messungen dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung (**A**)
Enddiastolische *cIMR* in Patienten mit KS ($0,040 \pm 0,010$ mm, $N = 44$) vs.
Kontrollen ($0,042 \pm 0,011$ mm, $N = 36$), p -Wert = 0.590; (**B**) Endsystolische *cIMR*:
Patienten mit KS (0.039 ± 0.009 mm, $N = 44$) vs. Kontrollen (0.039 ± 0.009 mm, N
= 36), p -Wert = 0,0886 19
- Abbildung 2: Pearson Korrelationsanalyse zwischen Hyaluron und (a) systolischem
Blutdruck, (b) mittlerem arteriellen Druck, (c) Cholesterin und (d) LDLc/HDLc-Ratio
bei KS Patienten (rot) und Kontrollen (blau). 22

Abkürzungsverzeichnis

AHA	American Heart Association
ESPED	Erhebungseinheit für Seltene Pädiatrische Erkrankungen Deutschland
KS, KD	Kawasaki Syndrom, Kawasaki Disease
cIMR	carotid Intima-Media Roughness
cIMT	carotid Intima-Media Thickness
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
HDLc	High-Density-Lipoprotein-Cholesterin
LDLc	Low-Density-Lipoprotein-Cholesterin
VLDLc	Very-Low-Density-Lipoprotein-Cholesterin

Publikationsliste

Publikationen:

1. **König, M.**; Ullmann T.; Pastor-Villaescusa, B.; Dalla-Pozza, R.; Bohlig, S.; Schmidt-Trucksäss, A.; Pattathu, J.; Haas, N.A.; Jakob, A.: KD Diagnosis Does Not Increase Cardiovascular Risk in Children According to Dynamic Intima–Media Roughness Measurements. *J. Clin. Med.* 2022, *11*, 1177.
2. Jakob, A.; Bohlig, S.; **König, M.**; Nussbaum, C.; Dalla-Pozza, R.; Hermann, M.; Haas, N.A.; Pastor-Villaescusa, B.: Kawasaki disease and increased cardiovascular risk: Is there a link to circulating glycocalyx biomarkers? *Microvasc. Res.* 2022, *140*, 104269.

Kongress Präsentation:

1. **König, M.**; Walter, S.; Ullmann T.; Jakob, A.; Dalla-Pozza, R.; Haas, N.A.; Fischer, M.: Longterm vascular investigation indicates alteration of medium- but not large-sized arteries in Kawasaki patients with persistent coronary artery aneurysms; EURO-KiDS, Paris, 2021

Kongress Abstracts:

1. Jakob, A.; Walser, M.; Walter, S.; **König, M.**; Dalla-Pozza, R.; Haas, N.A.; Fischer, M.: Anakinra and etanercept combination treatment in refractory Kawasaki disease - a monocentric experience; Euro-KiDS, Paris, 2021
2. Mandilaras, G.; Klau, S.; Walter, S.; **König, M.**; Haas, N.A.; Fischer, M.;Dalla-Pozza, R.; Lehner, A.;Ulrich, S.; Jakob, A.: Evaluation of Coronary Artery Z-Score Models in a German Population-Based Study Cohort of 310 Patients, *Thorac Cardiovasc Surg* 2019; 67(S 02): S101-S128 51st Annual Meeting German Society for Pediatric Cardiology 2019
3. Jakob, A.; Dubinski, I.; Haas, N.A.; Walter, S.; **König, M.**; Fischer, M.: Biologicals in Severe Kawasaki's Disease—A Monocentric Experience *Thorac Cardiovasc Surg* 2019; 67(S 02): S101-S128
4. Mandilaras, G.; Klau, S.; Walter, S.; **König, M.**; Haas, N.A.; Fischer, M.; Dalla-Pozza, R.; Lehner, A.; Ulrich, S.; Jakob, A.: Evaluation of different coronary artery Z-Score models in a German population based study cohort of 310 patients, 53. Annual meeting of the Association of European societies of pediatric cardiology (AEPC)

1. Beitrag zu den Veröffentlichungen

1.1 Beitrag zu Veröffentlichung I

Beide Veröffentlichungen waren Teil einer groß angelegten Studie zur Evaluation der kardiovaskulären Langzeitfolgen nach Kawasaki Syndrom unabhängig von der Beteiligung der Herzkranzgefäße. Nach umfangreicher Literaturrecherche wurden in mehrfachen Gesprächen mit Doktorvater und Betreuer der Doktorarbeit unterschiedliche Aspekte zur Beurteilung des Gefäßstatus ausgewählt. Durchführung und Zielsetzung wurden im Team diskutiert. Altersbedingt konnten entsprechende Untersuchungen jeweils nur in Subpopulationen aller Studienteilnehmer durchgeführt werden.

Der nächste Schritt bestand darin, passende Patienten und Kontrollen für die Studien zu rekrutieren. Hierfür veröffentlichten eine weitere Doktorandin und ich das Studienvorhaben in einer Facebook Gruppe, scannten das ESPED Melderegister nach Münchner Postleitzahl und durchsuchten die krankenhausinterne Datenbank nach Patienten, die zwischen 2003 und 2017 mit der Diagnose Kawasaki-Syndrom an der LMU vorstellig waren. Wir arbeiteten zu gleichen Teilen alle Patientendaten nach einem von uns entworfenen Fragebogen auf, welcher u.a. die Diagnosekriterien des Kawasaki-Syndroms nach internationalen Leitlinien, echokardiografische Untersuchungsergebnisse, Therapie und Outcome, abfragt. Auf diese Weise konnten wir Patienten ausschließen, welche die Diagnosekriterien des Kawasaki-Syndroms nicht erfüllten. Wir erhoben diese Daten zum einen mithilfe der elektronischen Patientenakte, zum anderen mithilfe archivierter Arztbriefe und mitgebrachten Arztbriefen der Patienten. Die Familien aller in Frage kommenden Patienten wurden per Post kontaktiert.

Unser Kontrollkollektiv akquirierten wir im Klinikalltag mit Kindern ohne studienrelevanten Vorerkrankungen. Zudem baten wir Studienteilnehmer, sich von jeweils einem/r Freund/in zur geplanten Untersuchung begleiten zu lassen. So entstand eine nach Alter und Geschlecht angepasste Kontrollgruppe.

Für jeden Studienteilnehmer vergaben wir individuelle Termine in der kinder-kardiologischen Ambulanz des Hauner'schen Kinderspitals. Am geplanten Untersuchungstag führten wir im Team von drei Doktoranden bei allen Patienten und Kontrollen Anamnese, körperliche Untersuchung, Blutentnahme und EKG durch. Zudem führte ich mit ärztlicher Unterstützung die Echokardiographie durch. Die Sonografie der Karotiden führte ich nach entsprechender Anleitung selbstständig durch. Anschließend analysierte ich die gespeicherten Schleifen mit entsprechender Software.

Im Team aus drei Doktoranden waren wir für Datenpflege verantwortlich. Sowohl Daten aus der Akutphase, als auch aktuelle anthropometrische Daten und Ergebnisse der Untersuchungen wurden systematisch eingepflegt. Die spezifischen Daten der sonografischen Untersuchungen wurden von mir selbst aufgearbeitet und verwaltet.

Einfache statistische Auswertungen führte ich selbstständig durch, komplexe statistische Auswertungen und Visualisierungen der Ergebnisse gelangen in Zusammenarbeit mit Mitarbeitern des Biometrischen Instituts der LMU und einer frei arbeitenden Statistikerin.

Nach umfassender Literaturrecherche war ich insbesondere für das Verfassen des Artikels verantwortlich und beteiligt an der Editierung. Die Einreichung des Papers erfolgte ebenfalls durch mich.

1.2 Beitrag zu Veröffentlichung II

Die Konzeptualisierung des Projektes erfolgte im gleichen Rahmen wie beim oben genannten Studienvorhaben. Die Rekrutierung der Studienteilnehmer entspricht ebenfalls der Beschreibung im Kapitel 1.1. Zusätzlich zu bereits erwähnten standardmäßig durchgeführten Untersuchungen verarbeiteten wir die Blutproben, welche zur Bestimmung der Glykokalix Biomarker entnommen wurden, direkt im Anschluss an die Entnahme: die Proben wurden bei 3000 xg für 10 Minuten zentrifugiert und bei - 80°C für die weitere Analyse tiefgefroren.

Das komplette Datenmanagement der notwendigen Daten für diese Publikation erfolgte gleichzeitig durch zwei Doktoranden, insbesondere wurden die Ergebnisse der Glykokalix-Biomarker Syndecan und Hyaluron in Assoziation zu dem von uns erhobenen klinischen Datensatz und den Ergebnisse unserer Analysen gesetzt.

Die statistische Auswertung erfolgte in diesem Paper durch andere Mitarbeitende, jedoch leistete ich einen bedeutsamen Beitrag zum Verfassen und Editieren des Artikels.

2. Einleitung

2.1 Kawasaki Syndrom

Das Kawasaki Syndrom (KS) wird zu den Vaskulitiden gezählt und ist ein in Deutschland und Europa seltenes Krankheitsbild der Pädiatrie mit noch ungeklärter Ätiologie. Kleinkinder < 5 Jahren und Jungen sind am häufigsten betroffen und zeigen zudem häufiger einen schweren Verlauf mit Ausbildung von Koronaraneurysmen (1). Hinzu kommt eine geographische und ethnische Abhängigkeit der Inzidenz: Die höchste Inzidenz ist in Japan mit 359/100 000 Kindern im Alter von < 5 Jahren im Jahr 2018 (2) zu verzeichnen, wohingegen Deutschland mit einer Inzidenz 7,2/100 000 Kindern im Alter von < 5 Jahren (3) europaweit im Mittelfeld der Untersuchungen zu Kindern mit kaukasischer Herkunft liegt (Tschechischen Republik 1,6/100 000 (4), Irland 15,2/100 000 (5), Finnland 11,4/100 000 (6)). Während der akuten Krankheitsphase ist ein hohes Inflammationsniveau charakteristisch, messbar beispielsweise an erhöhten Spiegeln von Interleukinen und Tumor-Nekrose-Faktor- α im Blut (7, 8). Klinisch präsentiert sich das komplette KS mit persistierendem Fieber über mindestens 5 Tage mit zumeist schlechter Wirkung antipyretischer Maßnahmen und mindestens 4 der folgenden 5 Hauptsymptome: einer beidseitigen nichtexsudativen Konjunktivitis, zervikaler Lymphadenopathie, Enanthem, einem polymorphen stammbetonten Exanthem und Extremitätenbeteiligung in Form von Rötung und Schwellung der Handflächen und Fußsohlen mit nachfolgender Hautschuppung der Zehen und Finger (9). Entsprechend einer Empfehlung der American Heart Association (AHA) kann ein inkomplettes KS bei unzureichenden Vorliegen von Hauptsymptomen mithilfe von Laborparameter und der Echokardiografie gestellt werden, damit auch bei diesen Kindern die nötige Therapie rechtzeitig eingeleitet werden kann (10). Im Sinne der systemischen Entzündungsreaktion können zusätzlich weitere Organsysteme und arterielle Gefäßabschnitte betroffen sein. Dementsprechend finden sich diverse klinische Erscheinungsbilder, beispielsweise eine interstitielle Pneumonie, aseptische Meningitis, Arthralgien im Rahmen von Arthritiden oder in Form von Erbrechen, Diarrhö, Gallenblasenhydrops oder Hepatitis den Gastrointestinaltrakt betreffend (11). Koronaraneurysmen stellen die gefährdetste Komplikation mit hohem Einfluss auf die Morbidität und Mortalität dar. In der Akutphase besteht die Gefahr von Koronarthrombosen, im Verlauf sind prä- und postaneurysmatische Stenosen mit folgender Ischämie möglich. Koronaraneurysmen treten bei ca. 5% aller mit intravenösen Immunglobulinen behandelten Kindern und sogar bei bis zu 25% aller unbehandelten Kinder auf. Therapieziel ist die Reduktion eben genannter lebensbedrohlicher Komplikationen. Hierfür werden entsprechend der deutschen Leitlinie in der Akutphase primär Immunglobuline intravenös, Aspirin und je nach Risikoprofil Kortikosteroide eingesetzt. Patienten, die nach spätestens 48 Stunden nach der ersten Immunglobulin-Gabe nicht fieberfrei sind, werden als therapierefraktär bezeichnet. Dies betrifft ca. 10-15% aller Patienten und geht mit einem erhöhten Risiko für Koronaraneurysmen einher. Neben einer erneuten Gabe von Immunglobulinen werden bei diesen Patienten auch Immunsuppressiva, beispielsweise Infliximab oder Cyclosporin A, eingesetzt. Nach der Akutphase sollten alle Patienten kardiologische Verlaufskontrollen erhalten.

Zudem erfolgt eine niedrigdosierte prophylaktische Aspirin-Gabe je nach Schwere der Erkrankung für mindestens 6 Wochen. Bei schwerem Befall der Koronararterien kann eine zusätzliche Antikoagulation nötig sein (1).

2.2 Begründung der Studien

Weitgehend ungeklärt sind die Langzeitauswirkungen des KS auf das gesamte Gefäßsystem, da wie beschrieben neben Koronararterien auch andere Gefäßabschnitte, Organe und Gewebe beteiligt sein können (12). Der häufigste Manifestationsort sind die Koronarien, deren Befall persistierenden Veränderungen der Gefäßwände verursachen kann und daher mit dem höchsten kardiovaskulärem Langzeitrisiko einhergeht. Im Gegensatz dazu sind die vaskulären Effekte des KS bei Patienten ohne Koronarbeteiligung noch immer fraglich (1). Pathophysiologisch führt die unkontrollierte Aktivierung des Immunsystems zunächst zu einer subakuten Arteriitis, geprägt durch Lymphozyten, Plasmazellen und Eosinophilen. Bei einem geringen Anteil der Patienten kommt es im weiteren Verlauf zu einer selbstlimitierenden nekrotisierenden Vaskulitis mit Invasion von Neutrophilen und Zerstörung der Gefäßwand bis zur Adventitia. Vor allem in dieser Patientengruppe besteht die Gefahr der Ausbildung von großen Gefäßaneurysmen. Zudem entwickelt sich in den ersten beiden Wochen nach Fieberbeginn eine luminale myofibroblastische Proliferation mit der Gefahr von arteriellen Stenosen. Letzterer pathophysiologische Prozess kann Monate bis Jahre nach der Akutphase andauern (13). Entsprechend dieser Pathologien lassen sich als Langzeiteffekte des KS ein pathologisches Serum-Lipid-Profil (14), eine prolongierte endotheliale Dysfunktion (15, 16) und persistierende Endothelschäden beobachten. Letztere sind durch erhöhte Spiegel von zirkulierenden Endothelzellen und endothelialen Mikropartikeln messbar (17).

Die vaskuläre Entzündungsreaktion kann zudem die inneren Gefäßschichten der A. carotis beeinflussen: bei Patienten mit durchgemachtem KS konnte eine signifikant erhöhte Gefäßwanddicke - carotid Intima-Media Thickness, cIMT – im Vergleich zu den altersentsprechenden Normalwerten gezeigt werden. Die cIMT wird gemessen als die Strecke zwischen Lumen-Intima Schnittstelle und Media-Adventitia Grenze. Auch hervorzuheben ist, dass in genannter Studie ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten ohne und mit persistierenden Koronaraneurysmen festgestellt werden konnte, mit entsprechend höheren cIMT Werten bei weiterhin bestehenden Koronaraneurysmen (18).

Die Ergebnisse verschiedener Studien zur cIMT sind jedoch kontrovers: eine weitere Studie mit 92 Patienten nach KS konnten weder Unterschiede in Abhängigkeit vom Koronarstatus noch Unterschiede im Vergleich zum Kontrollkollektiv festhalten (17). 2015 erschien eine Metaanalyse, welche 30 Studien, darunter 15 zur cIMT-Messung, einschloss. Hier wurde die hohe Variabilität an Daten bezüglich der cIMT bei Patienten nach KS unterstrichen, es konnten keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit vom Koronarstatus oder im Vergleich zu Kontrollgruppen festgestellt werden (16). Aus diesem Grund untersuchten wir die carotid Intima-Media Roughness (cIMR), welche die Oberflächenbeschaffenheit der innersten Gefäßschichten analysiert. Möglich-

erweise können persistierende Unregelmäßigkeiten auf diese Weise präziser nachgewiesen werden. Betrachtet man die Folgen der Vaskulitis auf die innerste Gefäßschicht auf molekularer Ebene, konnten in oben genannter Metaanalyse, insbesondere bei Patienten mit Koronaraneurysmen, eine endotheliale Dysfunktion sowohl in der Akutphase als auch Jahre nach der Erkrankung gezeigt werden (16). Zudem sind Schädigungen der Glykokalix im akuten Erkrankungsstadium nachweisbar (19). Ob diese Schädigung der Glykokalix auch nach der Akutphase fortbesteht und ob sich daraus ein verändertes kardiovaskuläres Risiko ergibt, ist bisher unbekannt.

Generell ist aufgrund der kontroversen Datenlage unklar, ob das KS unabhängig von der Koronarbeteiligung zu einem erhöhten kardiovaskulären Langzeitrisiko führt. Bis zum jetzigen Zeitpunkt gibt es keine standardisiert messbaren Parameter, die kardiovaskuläre Veränderungen bei Patienten mit durchgestandenem KS unabhängig vom Koronarstatus zuverlässig detektieren können. Dies wäre vor allem für Patienten ohne Koronaraneurysmen von Bedeutung, da über deren kardiovaskuläres Langzeitrisiko bisher sehr wenig bekannt ist. Unter anderem konnten oben genannte Studien zum Teil einen veränderten Gefäßstatus und demzufolge vermutlich auch ein erhöhtes kardiovaskuläres Langzeitrisiko, sowohl für Patienten mit als auch ohne Koronaraneurysmen, nachweisen. An diese Ergebnisse sollte in unserer groß angelegten klinischen Studie angeknüpft werden, um mehr über die Langzeitauswirkungen des KS auf das Gefäßsystem zu erfahren und somit zur Entwicklung von standardisierten Follow-Up Untersuchungen bei Kawasaki Patienten beizutragen. Ansatzpunkte waren die cIMR und endotheliale Biomarker als Surrogatmarker für eine Schädigung der Glykokalix. Zudem sollte der Zusammenhang zwischen Glykokalix Biomarkern und einem erhöhten kardiovaskulären Risikos untersucht werden, indem die Korrelation von Glykokalix Biomarkern mit etablierten kardiovaskulären Risikofaktoren sowohl bei Patienten als auch Kontrollen untersucht wurde.

2.3 Carotid Intima-Media Roughness

Atherosklerotische Veränderungen der Gefäßwände gehen bekannterweise mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko einher. Eindeutige Risikofaktoren stellen Plaqueablagerungen dar, beispielsweise an den Herzkranzgefäßen mit dem Risiko eines Myokardinfarktes, an peripheren Arterien mit Gefahr eines Arterienverschlusses und folgender Minderperfusion von Extremitäten oder an den Karotiden mit Erhöhung des Schlaganfallrisikos. Diese Veränderungen können radiologisch mittels Kontrastmitteluntersuchungen oder auch sonografisch dargestellt werden (20). Bei der Reduktion von kardiovaskulären Ereignissen ist die frühzeitige Detektion von Gefäßveränderungen essenziell, um bereits im Anfangsstadium vor der Ausbildung von Plaques eine prophylaktische Therapie zu beginnen und ein Fortschreiten der Erkrankung zu verlangsamen. In den offiziellen Empfehlungen zum Assessment des kardiovaskulären Risikos bei Erwachsenen wurde hierfür inzwischen die cIMT eingeführt. Diese wird sonografisch gemessen als die durchschnittliche Dicke der Intima und Media in einem möglichst distal gelegenen Abschnitt der A. carotis communis kurz vor dem Sinus caroticus (21).

Um die Intima und Media als Gefäßschichten noch genauer beurteilen zu können, untersuchten wir anstatt der alleinigen Dicke die Rauigkeit der Intima und Media - die sogenannte carotid Intima Media Roughness. Diese beschreibt die Oberflächenbeschaffenheit der A. carotis communis und entspricht der Abweichung der tatsächlichen Intima-Media Dicke von der durchschnittlichen Intima-Media Dicke innerhalb eines 10mm Segmentes an multiplen Messpunkten. Die Berechnung erfolgt als das arithmetische Mittel der Abweichung von der Regressionsgeraden aller cIMT-Werte in diesem Gefäßabschnitt, entsprechend der ISO Definition (International Organization for Standardisation, Geneva, Switzerland) (22). Dies berücksichtigt, dass sich die lokale Verdickung der Intima und Media nicht nur als Vorwölbung Richtung Lumen, sondern auch als Verdickung in Richtung Gefäßaußenwand darstellen kann, welche durch die Messung der cIMT nicht erfasst werden würde. Auf diese Weise sollen Unregelmäßigkeiten der Intima und Media quantifiziert werden, welche durch beginnende Plaquebildung oder Granulationen als Zeichen einer Gefäßwandschädigung entstehen. Der prädiktive Wert könnte hierdurch gegenüber dem der cIMT verbessert werden und weitere Informationen für die Abschätzung des kardiovaskulären Risikos gewonnen werden (23).

Als weiteren Vorteil scheint die cIMR im Gegensatz zur cIMT nicht durch physiologische, altersbedingte Veränderungen beeinflusst zu werden und zeigt zudem eine engere Korrelation mit pathologischen und atherosklerotischen Veränderungen als die cIMT (22, 24). Normwerte der cIMR bei Kindern wurden erstmals 2016 in einer Studie an 602 gesunden Kindern zwischen 8 und 18 Jahren erhoben. In gleicher Studie konnte auch ein signifikant positiver Zusammenhang zwischen etablierten kardiovaskulären Risikofaktoren wie dem BMI und der cIMR nachgewiesen werden, wodurch die Rolle der cIMR als kardiovaskulärer Risikofaktor auch im Kindesalter gestützt wird (23). Bisher gibt es zur cIMR bei Kindern zudem eine Fallstudie, in der die mögliche Abhängigkeit der cIMR von der Einstellung eines Typ 1 Diabetes aufgezeigt werden konnte: ein 12-jähriger mit schlecht eingestelltem Diabetes Typ 1 wies bei intialem HbA1c von 15,0% eine cIMR von 0,048mm auf, nach intensivierter Insulintherapie sank der HbA1c auf 8,2% und die cIMR auf 0,036mm (25).

Im Erwachsenenalter wurde der Zusammenhang zwischen cIMR und kardiovaskulären Risiko bereits in verschiedenen Studien bestärkt, beispielsweise als enge Korrelation mit koronarer Herzkrankheit (22) und etablierten kardiovaskulären Risikofaktoren wie arterielle Hypertonie, Hyperlipidämie und Nikotinabusus (26, 27). Da bereits Messungen der cIMT beim KS vorliegen, diese jedoch zu widersprüchlichen Ergebnissen kommen und nicht eindeutig dem Ausmaß des kardiovaskulären Risikos dieser Patienten zuzuordnen sind (16–18), erhoffen wir uns die cIMR als zuverlässigeren Prädiktor des kardiovaskulären Risikos für das Langzeit Follow-up der Kawasaki Patienten. Daher analysierten wir die cIMR in einer Fall-Kontroll-Studie und untersuchten, ob das KS im Allgemeinen und klinische Aspekte des KS während der Akutphase mit Veränderungen der cIMR einhergehen, um dadurch eine mögliche generelle arterielle Vaskulopathie als Langzeitfolge des KS nachzuweisen.

2.4 Endotheliale Glykokalix

Die endotheliale Glykokalix kleidet die luminaire Oberfläche eines jeden gesunden Blutgefäßes aus. Die negativ geladene Schicht besteht aus einem Netz aus Proteoglykanen, Glykosaminoglykanen und Glykoproteinen. Dementsprechend bildet die endotheliale Glykokalix eine Barriere zwischen Lumen und Gefäßwandendothel und trägt damit einen großen Beitrag zur endothelialen Zellfunktion und vaskulären Integrität bei (28). Die endotheliale Glykokalix reguliert die Gefäßpermeabilität und damit den mikrovaskulären Flüssigkeitstransport. Zudem funktioniert sie als Mechanotransduktor und wandelt mechanische Kräfte in biochemische Signale um (29). Ein Beispiel hierfür ist die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) durch Endothelzellen als Antwort auf Scherkräfte, die bei erhöhtem Blutfluss auf die Glykokalix wirken (30). Außerdem besteht durch die antithrombotische und antiinflammatorische Funktion der endothelialen Glykokalix eine gefäßprotektive Wirkung (29). Beispielsweise werden Zytokine und zytotoxische Antikörper, welche beim KS im Rahmen der Vaskulitis freigesetzt werden, durch eine intakte Glykokalix vom Gefäßendothel ferngehalten (31).

Fehlfunktionen der endothelialen Glykokalix sind sowohl bei akuten vaskulären Entzündungsreaktionen, wie beispielsweise bei der Sepsis, als auch bei Langzeiterkrankungen des Gefäßsystems von Relevanz (29). So scheint in der Pathophysiologie der Atherosklerose eine endotheliale Dysfunktion am Beginn der Pathogenese zu stehen (32). Alle bekannten kardiovaskulären Risikofaktoren wie Hyperlipidämie oder Hypertonie führen zu einer Erhöhung von reaktiven Sauerstoffspezies, welche wiederum eine große Rolle beim Abbau der endothelialen Glykokalix mit daraus resultierender endothelialer Dysfunktion spielen (33–36). In Studien konnte zudem ein Zusammenhang zwischen der Höhe von Glykokalixkomponenten im Serum und dem akuten Koronarsyndrom (37) oder dem Auftreten eines Postreanimationssyndroms (38) nachgewiesen werden. Außerdem konnte bei Kindern eine Assoziation zwischen endothelialer Dysfunktion und kardiovaskulären Risikofaktoren gezeigt werden (39).

Surrogatmarker für eine geschädigte Glykokalix sind Hyaluron und Syndecan-1, da beide Hauptkomponenten der endothelialen Glykokalix darstellen (40). Erhöhte Werte von Syndecan-1 und Hyaluron im Serum konnten bereits mehrfach im Zusammenhang mit akuten und chronischen Erkrankungen des kardiovaskulären Systems nachgewiesen werden, beispielsweise bei der Sepsis oder beim Diabetes Mellitus (40–42, 28). Auch in der Akutphase des KS konnten sowohl erhöhte Syndecan-1-Level als auch erhöhte Hyaluron-Spiegel im Vergleich zu gesunden und febrilen Kontrollen beobachtet werden. Ebenso wurde für beide Parameter eine Assoziation mit dem Vorhandensein von Koronaraneurysmen gezeigt (43, 19). Es gibt Hinweise auf eine anhaltende Endothelschädigung auch Jahre nach der Akutphase: so konnten erhöhte Werte von endothelialen Mikropartikeln, zirkulierenden Endothelzellen und löslichen Zelladhäsionsmolekülen nachgewiesen werden, vor allem bei Patienten mit persistierenden Koronaraneurysmen (17).

Hyaluron und Syndecan-1 wurden unseres Wissens nach bisher nicht zum Follow-Up nach KS untersucht. Ziel der Studie war es einerseits, eine Korrelation zwischen einer geschädigten Gly-

kokalix und etablierten kardiovaskulären Risikofaktoren darzustellen, um so die Rolle der Glykokalix bei kardiovaskulären Erkrankungen zu bestärken. Andererseits sollten Langzeitschäden durch das KS an der endothelialen Glykokalix evaluiert werden. Hierfür wurde untersucht, ob bei Patienten mit durchgemachtem KS im Vergleich zu gesunden Kontrollkindern höhere Glykokalix Biomarkern nachweisbar sind. Zudem wurde der Einfluss verschiedener Parameter aus der Akutphase, wie beispielsweise das Vorhandensein von Koronaraneurysmen oder Entzündungswerte im Blut, auf die gemessenen Surrogatmarker Hyaluron und Syndecan-1 untersucht.

3. Zusammenfassung

Über die Langzeitfolgen des KS auf das kardiovaskuläre System ist bisher nicht viel bekannt. Patienten mit persistierenden Koronaraneurysmen haben auch nach Abklingen der Akutphase ein erhöhtes Risiko für prä- und postaneurysmatische Stenosen und benötigen daher eine kinder-kardiologische Nachbetreuung zur regelmäßigen Kontrolle und prophylaktischen plättchen-hemmenden und gegebenenfalls antikoagulatorischen Therapie, um eine Minderperfusion des Herzens zu vermeiden (1). Unklarer ist die Situation bei Patienten ohne Koronaraneurysmen. Die generalisierte Vaskulitis könnte sowohl bei Patienten mit Koronaraneurysmen als auch bei Patienten ohne Koronaraneurysmen zu einem veränderten Gefäßstatus, einem erhöhtem Risiko für Atherosklerose und auch zu einem veränderten kardiovaskulären Risikoprofil führen. Eine Studie aus 2017 zeigte, dass Patienten nach KS eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von etablierten kardiovaskulären Risikofaktoren wie erhöhte Blutfettwerte und arterielle Hypertonie haben könnten (11). Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden Kawasaki Patienten zu einer Follow-Up Untersuchung eingeladen und mit gesunden, nach Alter und Geschlecht angepassten Kontrollpersonen bezüglich verschiedener kardiovaskulärer Parameter verglichen. Bei allen Studienteilnehmern führten wir eine standardisierte Anamneseerhebung, eine körperliche Untersuchung, das Schreiben eines 12-Kanal-EKGs, eine Echokardiographie und eine Blutentnahme durch. Eingeschlossen wurde Kontrollkinder ohne kardiale, onkologische, rheumatische, neurologische, endokrine oder infektiöse Erkrankung, um den Einfluss auf das kardiovaskuläre System zu minimieren. Zudem wurden Kontrollkinder mit erhöhtem Blutdruck, Adipositas und pathologischem EKG oder Echokardiografie ausgeschlossen. Patienten wurden ab 6 Monaten nach Kawasaki-Syndrom in die Studie aufgenommen. Die Diagnose des KS wurde mittels standardisiertem Fragebogen, welcher unter anderem die Diagnosekriterien der AHA abfragt, gesichert. Zudem wurde der Z-Score jeder darstellbaren Koronararterie nach Dallaire et al. bestimmt und ein Koronaraneurysma entsprechend einem Z-Score $> 2,5$ definiert (44).

3.1 Ergebnisse der cIMR Untersuchung

Für die Beurteilung von Langzeitfolgen auf große Arterien erfolgte die sonografische Darstellung der A. carotis communis beidseits mit nachfolgender Analyse der Gefäßwand mittels entsprechender Software zur Berechnung der cIMR. Es konnten 44 Patienten und 36 Kontrollen in die Fall-Kontroll-Studie eingeschlossen werden.

3.1.1 Baseline-Charakteristika

In einem ersten Schritt wurden die Baseline-Charakteristika der Patienten- und Kontrollgruppe verglichen (siehe Tabelle 1). Es ergab sich kein signifikanter Unterschied in Alter, Geschlecht, Body Mass Index, Blutfettwerten oder Blutdruckwerten der Studienteilnehmer. Durch fehlende signifikante Unterschiede in den Baseline-Charakteristika ist eine Verzerrung der cIMR Messwerte minimiert.

Tabelle 1: *Baseline-Charakteristika der Patienten und Kontrollen*

	<i>n</i>	KD Patients (<i>n</i> = 44)	<i>n</i>	Controls (<i>n</i> = 36)	<i>p</i> -Value *
Female, <i>n</i> (%)	44	15 (34.1)	36	14 (38.9)	0.657
Age (years)	44	13.4 (7.5)	36	12.1 (5.3)	0.372
Height (cm)	44	149.3 (24.2)	36	148.4 (22.5)	0.864
Weight (kg)	44	43.5 (21.3)	36	42.2 (18.6)	0.763
BMI (kg/m ²)	44	18.2 (3.7)	36	18.1 (3.1)	0.834
Blood pressure					
SBP (mmHg)	44	117.3 (13.6)	36	113.4 (8.2)	0.117
DBP (mmHg)	44	70.9 (10.0)	36	68.2 (8.9)	0.207
MAP (mmHg)	44	92.1 (10.5)	36	89 (7.7)	0.128
HR (1/min)	44	88.5 (12.4)	36	82.9 (12.6)	0.053
Laboratory data					
Total cholesterol (mg/dL)	38	163.6 (31.5)	24	171.2 (30.7)	0.356
Triglycerides (mg/dL)	38	112.5 (65.3)	24	88.5 (35.4)	0.067
LDL (mg/dL)	26	104.7 (25.5)	24	104 (26.2)	0.925
VLDL (mg/dL)	20	16.6 (6.4)	24	13.9 (6.5)	0.176
HDL (mg/dL)	26	50.1 (13.0)	24	53.9 (8.7)	0.224
CAA Status					
Group A		27 (69.2)			
Group B		6 (15.4)			
Group C		6 (15.4)			

BMI, body mass index; CAA, coronary artery aneurysm; DBP, diastolic blood pressure; HDL, high-density lipoprotein; HR, heart rate; KD, Kawasaki disease; LDL, low-density lipoprotein; MAP, mean arterial pressure; VLDL, very low-density lipoprotein. Data are expressed as the mean (standard deviation) unless otherwise specified. * Differences between groups were analyzed with the χ^2 test for sex distribution and with Welch's unequal variances *t*-test for all other variables. Group A: never had CAA, Group B: regressed CAA, Group C: persisting CAA; missing data of 5 patients.

Quelle: König, 2022, S. 5 (45)

3.1.2 Carotis Intima-Media Roughness

Für die Analyse der cIMR wurden zwei Schleifen pro Seite aufgezeichnet. Aus diesen vier Aufnahmen erfolgte EKG-getriggert die Berechnung der enddiastolischen und endsystolischen cIMR und die Berechnung der mittleren cIMR als Mittelwert aller acht cIMR-Werte. Bei insgesamt zwei Teilnehmern konnten nicht alle vier Schleifen gespeichert werden, sodass bei diesen Patienten die Mittelwerte aus den verfügbaren Messwerten berechnet wurden. Um allgemeine Erkenntnisse über die cIMR zu gewinnen, wurden zunächst alle cIMR-Werte von Patienten und Kontrollen gemeinsam betrachtet und hinlänglich Unterschieden zwischen rechts vs. links gemessener cIMR und enddiastolischer vs. endsystolischer cIMR analysiert. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen rechter und linker cIMR, jedoch ein signifikant erhöhter enddiastolischer Wert im Vergleich zur endsystolischen cIMR (N= 80, mittlere enddiastolische cIMR = 0,041mm vs. mittlere endsystolische cIMR = 0,039mm, CI 0 (0,0005; 0,0036), *p*-Wert = 0,044). Dies folgt Erkenntnissen über die cIMT: zugrundeliegend ist höchstwahrscheinlich die Dehnung der Gefäßschichten mit Komprimierung der Tunica intima und Tunica media während der Systole aufgrund eines erhöhten Gefäßdurchmessers. Bei Kindern könnte dieser Effekt laut einer Studie noch ausgeprägter sein als im Erwachsenenalter (cIMT Erhöhung während der Diastole bei Kindern um 8,8% vs. bei Erwachsenen um 3,8%) (46).

3.1.3 CIMR im Vergleich zu Kontrollpersonen

Im nächsten Schritt untersuchten wir Unterschiede der cIMR zwischen Patienten und Kontrollen. Weder endsystolisch noch enddiastolisch ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen (siehe Abbildung 1).

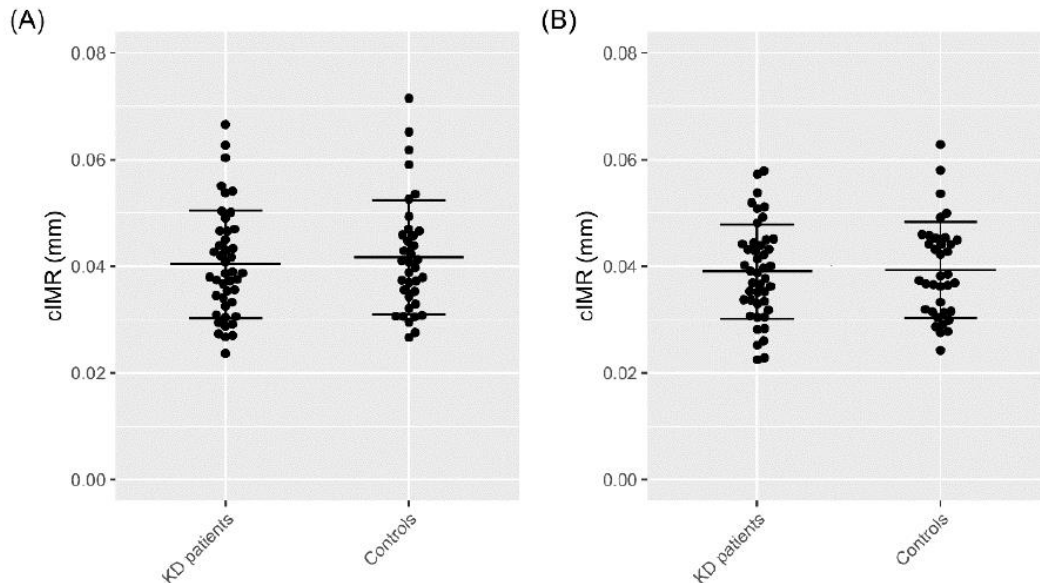


Abbildung 1: cIMR Messungen dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung (A) Enddiastolische cIMR in Patienten mit KS ($0,040 \pm 0,010$ mm, $N = 44$) vs. Kontrollen ($0,042 \pm 0,011$ mm, $N = 36$), p -Wert = 0,590; (B) Endsystolische cIMR: Patienten mit KS ($0,039 \pm 0,009$ mm, $N = 44$) vs. Kontrollen ($0,039 \pm 0,009$ mm, $N = 36$), p -Wert = 0,0886. Quelle: König, 2022, S. 6 (45)

Zur genaueren Evaluation der cIMR führten wir anschließend eine multiple lineare Regressionsanalyse durch, adjustiert an Alter, Geschlecht, Größe und Gewicht. Hierfür wurden Patienten nach Koronarstatus in drei Gruppen gegliedert und anschließend jede Gruppe mit der Kontrollgruppe verglichen: Patienten ohne Koronaraneurysmen (A, $N=27$), Patienten mit Koronaraneurysmen während der Akutphase (B, $N=6$), Patienten mit persistierenden Koronaraneurysmen (C, $N=6$). Fünf Patienten mussten aufgrund fehlender Daten zum Koronarstatus aus der Analyse ausgeschlossen werden. Auch hier zeigten sich in keiner Untergruppe signifikante Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen.

3.1.4 Korrelation der cIMR mit kardiovaskulären Risikofaktoren

Eine Korrelationsanalyse zwischen Blutdruck, Blutfettwerten, Body Mass Index und cIMR Messwerten ergab bis auf eine Korrelation von VLDL mit der enddiastolischen cIMR der gesunden Kontrollen, nicht jedoch mit der enddiastolischen cIMR der Kawasaki Patienten, keine signifikanten Ergebnisse. Aufgrund der multiplen Testung wurde dieses Ergebnis jedoch von uns als nicht wegweisend interpretiert.

3.1.5 Einfluss von Parameter aus der Akutphase auf die cIMR

Um den Einfluss der Akutphase und damit auch der Schwere der Erkrankung auf die cIMR zu untersuchen, analysierten wir im zweiten Teil der Regressionsanalyse den Einfluss von Daten aus der Akutphase auf die cIMR. Für relevante Daten aus der Akutphase siehe Tabelle 2.

Tabelle 2: Akutphaseparameter der KS Patienten

	<i>n</i>	
Aneurysms (cases, %)	39	12 (30.8%)
Therapy refractory (>1 times IVIG) (cases, %)	37	14 (37.8%)
Duration of fever (days)	33	9.70 (5.3)
Age at disease (months)	41	4.4 (3.2)
BMI (kg/m ²)	30	15.3 (1.4)
CRP (mg/L)	35	115.4 (92.0)
Thrombocytes (g/L)	32	534.9 (175.6)
Hb (g/dL)	34	10.2 (1.9)
Leukocytes (g/L)	35	19.1 (10.9)

BMI, body mass index; CRP, C-reactive protein; Hb, hemoglobin; IVIG, intravenous immunoglobulins; KD, Kawasaki Disease. Data are expressed as the mean (standard deviation) unless otherwise specified.

Quelle: König, 2022, S. 7 (45)

Weder die Dauer des Fiebers, das fehlendes Ansprechen auf intravenöse Gabe von Immunglobulinen, noch Laborwerte wie Thrombozyten, Hämoglobin, Leukozyten und C-reaktives-Protein hatten einen Einfluss auf die enddiastolische oder endsystolische cIMR. Da in dieser Analyse nur Patienten eingeschlossen werden konnten, welche für alle Parameter vollständige Daten nachweisen konnten, war die Regressionsanalyse bezüglich oben genannter Parameter nur bei 29 Patienten möglich. Patienten mit Koronareteiligung in der Akutphase zeigten leicht erhöhte endsystolische cIMR Werte im Vergleich zu Patienten ohne Koronareteiligung (mittlere enddiastolische cIMR: Gruppe A 0,038mm, Gruppe B 0,043mm, Gruppe C 0,041mm). In der Regressionsanalyse konnte jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen nachgewiesen werden. Festzuhalten ist außerdem, dass zwei Patienten der Gruppe A und eine Kontrollperson die Normwerte für Kinder zwischen 8 und 18 Jahren über die 97. Perzentile überschritten (23).

Festzuhalten ist, dass kein signifikanter Unterschied der cIMR zwischen Patienten und Kontrollen feststellbar war. Für eine persistierende Schädigung der A. Carotis, ein Repräsentant von mittelgroßen Arterien, gibt es nach KS demnach keine Hinweise. Allerdings sollten die Ergebnisse bei der geringen Anzahl von Studienteilnehmern mit Vorsicht interpretiert werden.

3.2 Endotheliale Glykokalix

Die zweite Studie im Rahmen der Nachuntersuchung von Kawasaki Patienten beschäftigt sich mit Schädigung der endothelialen Glykokalix, welche in der Akutphase nachweisbar ist und auch Jahre nach der Erkrankung zu endothelialer Dysfunktion und Atherosklerose führen könnte. Ziel der Studie war auf der einen Seite die Frage nach einer potentiellen Beteiligung der endothelialen Glykokalix an den Langzeitfolgen des KS auf das arterielle Gefäßsystem. Auf der anderen Seite sollte Korrelationen und Interaktionen zwischen erhöhtem kardiovaskulären Risiko und einer

Schädigung der Glykokalix untersucht werden. Hierfür wurden Syndecan-1 und Hyaluron, beides Hauptkomponenten der endothelialen Glykokalix und Marker für eine Schädigung derselben, via ELISA aus dem Serum bestimmt (41, 37). Die Blutproben wurden sofort nach der Entnahme zentrifugiert und bei -80 °C bis zur Analyse gelagert. 31 Patienten und 20 Kontrollen konnten in die prospektive Kohortenstudie eingeschlossen werden, jedoch wurde eine Probe von Syndecan-1 von der Analyse ausgeschlossen, da sie den Wert den höchsten Punkt der Standardkurve überschritt und von einem Messfehler ausgegangen werden musste.

3.2.1 Baseline-Charakteristika

Erneut wurde im ersten Schritt die Baseline-Charakteristika (in Alter, Geschlecht, Body Mass Index, Blutdruck-, Blutfettwerten) zwischen Patienten und Kontrollen verglichen. Hierbei fand sich ein signifikant höherer diastolischer Blutdruck bei den Kawasaki-Patienten ($73,6 \pm 9,2$ vs. $68,1 \pm 9$, $p=0,048$) und eine Tendenz zu höheren Triglyzerid-Werten, einer erhöhten LDLc/HDLc-Ratio und geringeren HDLc-Spiegeln, jedoch ohne statistische Signifikanz. Koronaraneurysmen traten bei sieben der Patienten während der Akutphase auf, bei drei Patienten waren zum Untersuchungszeitpunkt Koronaraneurysmen nachweisbar.

3.2.2 Glykokalix Biomarker im Vergleich zu Kontrollpersonen

Im Vergleich zwischen Patienten und Kontrollen konnte weder für Syndecan-1 noch für Hyaluron ein signifikanter Unterschied festgestellt werden, wenngleich für letzteren Biomarker tendenziell höhere Werte bei den Patienten gemessen wurden ($96,5 \pm 28,6$ ng/dl vs. $84 \pm 24,1$ ng/dl, $p=0,113$). Analog zu Evaluation der cIMR führten wir eine an Alter, Geschlecht, Größe und Gewicht angepasste multiple lineare Regressionsanalyse durch. Auch hier wurde keine signifikante Assoziation zwischen den Glykokalix Biomarkern und dem KS festgestellt.

3.2.3 Einfluss von Parameter aus der Akutphase auf die Glykokalix

Bei dieser Analyse wurde der Fragestellung nachgegangen, ob Aspekte aus der Akutphase der Erkrankung wie Thrombo-, Leukozytenzahl, Hämoglobinspiegel, C-reaktives-Protein (CRP) und der Koronarstatus einen möglichen Einfluss auf Glykokalixabbauprodukte im Langzeitverlauf haben. Wie in Tabelle 3 zusammengefasst, waren sowohl eine hohe Thrombozytenzahl als auch ein niedriger Hämoglobinspiegel signifikant mit höheren Syndecan-1-Werten assoziiert. Ebenso zeigte sich eine positive Korrelation zwischen hohen Leukozytenzahlen und Syndecan-1. Für Hyaluron konnten keinerlei signifikante Assoziationen zu Parametern aus der Akutphase festgestellt werden. Weder CRP-Spiegel noch das Auftreten von Koronaraneurysmen in der Akutphase oder persistierende Koronaraneurysmen konnten mit einem der beiden Glykokalix Biomarkern assoziiert werden.

Tabelle 3: Assoziation zwischen Akutphaseparametern und Glycocalix Biomarkern

	Syndecan-1 (ng/ml) (log 10)		R ²	Hyaluronan (ng/ml)		R ²
	β	p-Value		β	p-Value	
CAA (yes vs. no)	0.087 ^a	0.543	0.40	-0.003 ^a	0.425	0.15
Leukocytes (G/l)	0.407	0.061	0.51	-0.215	0.363	0.19
Thrombocytes ($\times 1000/\mu\text{l}$)	0.473	0.041	0.53	-0.290	0.290	0.21
Haemoglobin (g/dl)	-0.519	0.044	0.56	-0.133	0.650	0.15
CRP (mg/l)	0.219	0.387	0.43	-0.070	0.797	0.14

Abbreviations: CAA, coronary artery aneurysm.

β values are unstandardised in terms of CAA, and standardised in terms of the remaining variables.

Bold text indicates p-values < 0.05.

These analyses were adjusted for the following covariates: sex, body mass index and age (years) in the acute phase.

Quelle: Jakob, 2022, S. 3 (47)

3.2.4 Interaktionen zwischen kardiovaskulären Risikofaktoren, Glykocalix Biomarkern und der Diagnose Kawasaki Syndrom

Das Ziel der letzten Analyse war zunächst bei allen Studienteilnehmer einen Zusammenhang zwischen etablierten kardiovaskulären Risikofaktoren (Blutdruckwerte und Blutfettwerte) und den Glykocalixbiomarkern zu detektieren: in der Gruppe der Kawasaki Patienten korrelierte Hyaluron signifikant positiv mit systolischem Blutdruck, dem mittleren arteriellen Druck und der LDLc/HDLc-Ratio (siehe Abbildung 2). Syndecan-1 zeigte lediglich eine Tendenz zur Korrelation mit LDLc. Für die Kontrollgruppe konnten keine signifikanten Korrelationen festgestellt werden.

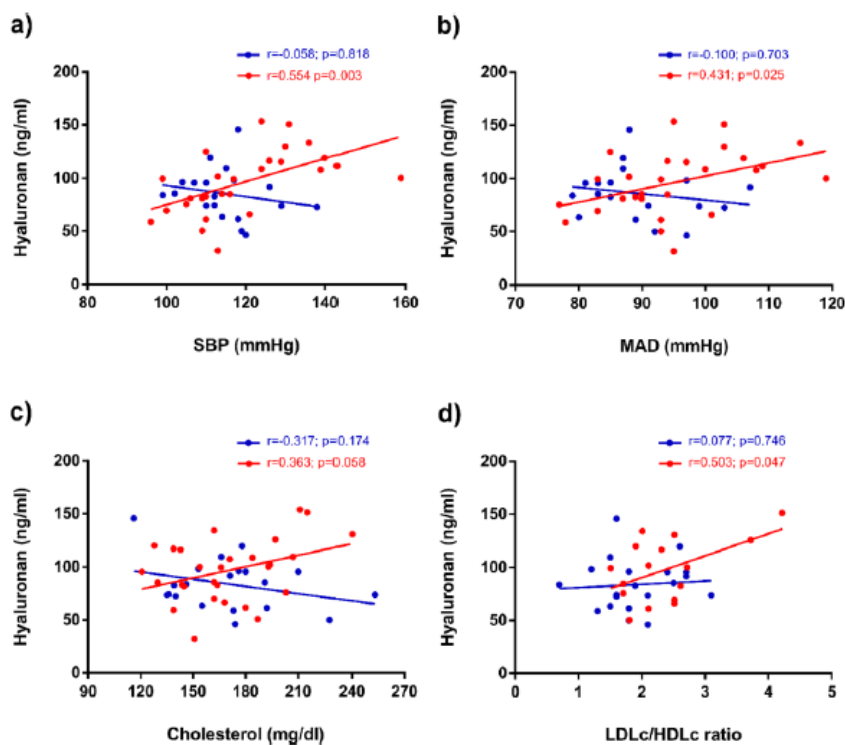


Abbildung 2: Pearson Korrelationsanalyse zwischen Hyaluron und (a) systolischem Blutdruck, (b) mittlerem arteriellen Druck, (c) Cholesterin und (d) LDLc/HDLc-Ratio bei KS Patienten (rot) und Kontrollen (blau).

Quelle: Jakob, 2022, S. 4 (47)

Um die Korrelationen in der Patientengruppe zu spezifizieren, führten wir eine Sensitivitätsanalyse mit allen untersuchten kardiovaskulären Risikofaktoren durch. Dabei zeigten sich Hinweise, dass die Kombination von durchgemachtem KS und einzelnen Risikofaktoren einen Einfluss auf die Glykokalix Biomarker haben könnte, welcher den synergistischen Effekt dieser beiden Parameter überschreitet. Bezüglich Hyaluron zeigten sich signifikante Interaktionen zwischen KS und Cholesterinspiegeln, dem systolischen Blutdruck und dem mittleren arteriellen Druck. Dies bedeutet, dass der Zustand nach KS die Beziehung zwischen Blutdruck und Hyaluron bzw. Cholesterinspiegel und Hyaluron beeinflusst. Patienten nach KS, die zusätzlich einen erhöhten systolischen Blutdruck, erhöhten mittleren arteriellen Druck oder erhöhte Cholesterinwerte haben, weisen höhere Hyaluronwerte auf als die Kontrollgruppe. Das relevanteste Modell war die Kombination von durchgemachtem KS und systolischem Blutdruck: hierauf konnten 29% der Hyaluronkonzentration zurückgeführt werden. Syndecan-1 zeigte signifikante Interaktionen mit Cholesterin, LDLc und VLDLc. Hohe Werte dieser Blutlipide führten zu höheren Syndecan-1 Werten bei Kawasaki Patienten als in der Kontrollgruppe.

Weder Hyaluron noch Syndecan waren in der Patientengruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Für Syndecan-1 konnten signifikante Assoziationen zu Blutwerten aus der Akutphase (Thrombozyten und Hämoglobin) nachgewiesen werden. Für Hyaluron zeigte sich ausschließlich eine Tendenz zu höheren Serumwerten in der Patientengruppe im Vergleich zu den Kontrollen, diese war jedoch nicht statistisch signifikant. Die Ergebnisse der Sensitivitätsanalyse deuten darauf hin, dass wichtige kardiovaskuläre Risikofaktoren bei Kawasaki Patienten –nicht aber bei gesunden Kontrollen - für erhöhte Glykokalix Biomarker verantwortlich sein könnten.

3.3 Schlussfolgerung

In beiden Studien untersuchten wir potentielle Surrogatparameter, die nach durchgemachtem KS auf eine Schädigung der arteriellen Blutgefäße hinweisen könnten, mit dem Ziel, mehr über das kardiovaskuläre Langzeitrisiko von betroffenen Patienten in Erfahrung zu bringen. Die Mechanismen, welche den Langzeiteffekten des KS auf das Gefäßsystem zugrunde liegen, sind noch weitgehend unklar. Möglicherweise führen synergistische Effekte ausgelöst durch die überschießende Aktivierung des Immunsystems in der Akutphase (11), die vermutlich anhaltende endotheliale Dysfunktion (17) und etablierte kardiovaskuläre Risikofaktoren zu persistierenden Gefäßschäden. Die Studienlage über Langzeitschäden am Gefäßsystem ist inkonsistent, vor allem bei Patienten ohne Ausbildung von Koronaraneurysmen in der Akutphase. Wir konnten keine Unterschiede bezüglich der Oberflächenbeschaffenheit der Gefäße, gemessen als cIMR, feststellen. Bezüglich der Schädigung auf molekularer Ebene konnten in der Akutphase bereits erhöhte Werte von Syndecan-1 und Hyaluron bei Kawasaki Patienten im Vergleich zu gesunden Kindern und auch febrilen Kontrollen nachgewiesen werden. Auch zeigte sich in diesen Studien jeweils eine signifikante Assoziation zwischen den Glykokalix Biomarkern und dem Auftreten von Koronaraneurysmen. Unsere Untersuchungen wurden explizit nach der Akutphase durchgeführt, um Langzeitfolgen am arteriellen Gefäßsystem zu detektieren. Signifikante Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen konnten auch hier nicht nachgewiesen werden, jedoch liefert die Studie

Daten zu potentiellen Interaktionen zwischen kardiovaskulären Risikofaktoren und zirkulierenden Glykokalix Biomarker in der postakuten Phase des KS. Angesichts der geringen Anzahl an Studienteilnehmern, der hohen Variabilität der Zeit nach der Akutphase KS bis zur Untersuchung und der hohen Anzahl an durchgeführten Tests bieten unsere Ergebnisse nur Anhaltspunkte für weitere Studien, um die Langzeitfolgen des KS auf das gesamte Gefäßsystem zu erfassen. Obwohl zum Teil Veränderungen des kardiovaskulären Systems nach KS nachweisbar sind, bleibt die klinische Bedeutung dieser Veränderungen, vor allem für Patienten ohne Koronararterienbeteiligung, noch unklar.

4. Abstract (English):

Background: Kawasaki Disease (KD) is a generalized vasculitis, most commonly affecting children under 5 years of age, with possible long-term effects on the cardiovascular system besides the presence of coronary artery lesions. So far, there are no reliable parameters of vascular anomalies after KD. Therefore, we investigated different markers of vascular damage after the acute phase of KD, which to our knowledge have not been extensively evaluated in these patients yet. The carotid intima-media roughness (cIMR) describes the common carotid artery's luminal surface texture and is regarded as an encouraging surrogate marker for predicting cardiovascular risk, beyond measuring the thickness of the carotid intimal and media layer, known as carotid intima-media thickness. To assess vascular health on a molecular level, in the second study we conducted, we took a closer look at the potential involvement of the endothelial glycocalyx in long-term vascular disease in patients with a history of KD. An endothelial glycocalyx damage has already been observed during the acute phase (43, 19), however there is no data on long-term glycocalyx damage. Both cIMR and glycocalyx damage are predisposing risk factors for atherosclerosis and thus for an elevated cardiovascular risk. Furthermore, we investigated the association between increased cardiovascular risk, characterized as known cardiovascular risk factors, and endothelial glycocalyx damage to evaluate the role of glycocalyx biomarkers in the assessment of cardiovascular risk.

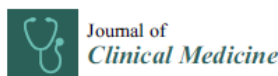
Methods: We conducted a cohort study in patients with a history of Kawasaki Disease and healthy subjects matched for age and sex. As we could not collect all necessary data from all participants the number of participants differs between the two studies. We assessed cIMR in a case-control study including 44 patients and 36 controls. To evaluate endothelial glycocalyx damage we measured syndecan-1 and hyaluron via ELISA in 31 patients and 20 controls. Apart from differences between the patient group and the control group, we analyzed different clinical outcomes such as the coronary artery status and acute phase inflammation data in association with cIMR values and glycocalyx biomarkers. For the latter we additionally investigated the association to current cardiovascular risk factors such as blood pressure and blood lipid markers.

Results: Regarding cIMR, there was neither a difference between patients and controls nor an association to the clinical parameters indicating the disease severity, such as coronary artery status and acute phase inflammation data. End-diastolic cIMR was marginally significant higher than end-systolic cIMR taking all study participants together. Also, neither hyaluron nor syndecan-1 were associated with KD. The multivariate analysis revealed significant association between syndecan-1 and acute-phase blood counts. Lastly both biomarkers showed significant interactions with present cardiovascular risk factors like blood pressure and blood lipids only in KD patients.

Conclusions: In our study cIMR showed no significant interaction with KD and is therefore no indicator for a general arteriopathy after vasculitis caused by KD. However analysis of the glycocalyx biomarkers exhibits a possible predisposition to a long-term endothelial glycocalyx alteration influenced by other cardiovascular risk factors. Regarding the low number of study participants,

of course our results should be interpreted with care. On the basis of the inconsistent data on long-term effects of KD on the vascular system more studies investigating cardiovascular health after KD will hopefully be conducted.

5. Veröffentlichung I



Article

KD Diagnosis Does Not Increase Cardiovascular Risk in Children According to Dynamic Intima–Media Roughness Measurements

Miriam König ¹, Theresa Ullmann ², Belén Pastor-Villaescusa ¹, Robert Dalla-Pozza ¹, Sarah Bohlig ¹, Arno Schmidt-Trucksäss ³, Joseph Pattathu ¹, Nikolaus A. Haas ¹ and André Jakob ^{1,*}

- ¹ Department of Paediatric Cardiology, Ludwig-Maximilians-University of Munich, 81377 Munich, Germany; miriam.kab@t-online.de (M.K.); belen.pastor@imibic.org (B.P.-V.); robert.dallapozza@med.uni-muenchen.de (R.D.-P.); sarah.wala93@gmail.com (S.B.); joseph.pattathu@med.uni-muenchen.de (J.P.); nikolaus.haas@med.uni-muenchen.de (N.A.H.)
² Institute for Medical Information Processing, Biometry and Epidemiology, Ludwig-Maximilians-University of Munich, 81377 Munich, Germany; tullmann@ibe.med.uni-muenchen.de
³ Department of Sport, Exercise and Health, Division Sport and Exercise Medicine, University of Basel, 4052 Basel, Switzerland; arno.schmidt-trucksass@unibas.ch
 * Correspondence: andre.jakob@med.uni-muenchen.de; Tel: +49-(0)-89-4400-73941/2



Citation: König, M.; Ullmann, T.; Pastor-Villaescusa, B.; Dalla-Pozza, R.; Bohlig, S.; Schmidt-Trucksäss, A.; Pattathu, J.; Haas, N.A.; Jakob, A. KD Diagnosis Does Not Increase Cardiovascular Risk in Children According to Dynamic Intima–Media Roughness Measurements. *J. Clin. Med.* **2022**, *11*, 1177. <https://doi.org/10.3390/jcm11051177>

Academic Editors: Renate Oberhoffer-Fritz, Annette Wacker-Gussmann and Chrong-Reen Wang

Received: 29 November 2021
 Accepted: 18 February 2022
 Published: 22 February 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Background: Kawasaki Disease (KD) is a generalized vasculitis in childhood with possible long-term impact on cardiovascular health besides the presence of coronary artery lesions. Standard vascular parameters such as carotid intima–media thickness (cIMT) have not been established as reliable markers of vascular anomalies after KD. The carotid intima–media roughness (cIMR) representing carotid intimal surface structure is considered a promising surrogate marker for predicting cardiovascular risk even beyond cIMT. We therefore measured cIMR in patients with a history of KD in comparison to healthy controls to investigate whether KD itself and/or KD key clinical aspects are associated with cIMR alterations in the long-term. Methods: We assessed cIMR in this case-control study (44 KD, mean age in years (SD); 13.4 (7.5); 36 controls, mean age 12.1 (5.3)) approximately matched by sex and age. Different clinical outcomes such as the coronary artery status and acute phase inflammation data were analyzed in association with cIMR values. Results: When comparing all patients with KD to healthy controls, we detected no significant difference in cIMR. None of the clinical parameters indicating the disease severity, such as the persistence of coronary artery aneurysm, were significantly associated with our cIMR values. However, according to our marginally significant findings ($p = 0.044$), we postulate that the end-diastolic cIMR may be rougher than the end-systolic values in KD patients. Conclusions: We detected no significant differences in cIMR between KD patients and controls that could confirm any evidence that KD predisposes patients to a subsequent general arteriopathy. Our results, however, need to be interpreted in the light of the low number of study participants.

Keywords: Kawasaki disease; intima–media roughness; vascular disease

1. Introduction

Kawasaki Disease (KD) is a generalized vasculitis in children, still of unknown etiology [1]. Other than boys < 5 years being most often affected ¹, its incidence also reveals a geographic and ethnic susceptibility, as children of Asian origin are affected more often than those of Caucasian origin: the highest incidence in children aged 0–4 years is in Japan, with 359/100,000 in 2018 [2], whereas the annual incidence in Germany is 7.2/100,000 [3]. Clinically, KD presents with persistent fever, cervical lymphadenopathy, non-exudative conjunctivitis, enanthema, polymorphous exanthema and reddened palms and soles, with subsequent scaling on the toes and fingers. Coronary artery aneurysms (CAA) are KD's

most feared complication, with a strong impact on long-term morbidity; they still occur in approximately 5% of all children who undergo intravenous immunoglobulin (IVIG) treatment [1,4], and in even 25% of untreated children [4]. Its acute clinical presentation already shows that the inflammatory process is not only limited to the coronary arteries, but is probably attributable to vascular changes in various tissues and organs, e.g., the gastrointestinal tract (pain, vomiting, diarrhea), meninges (aseptic meningitis) or lung (interstitial pneumonitis) [5]. In line with these manifestations, a pathological serum lipid profile [6], prolonged endothelial dysfunction [7,8] and persistent endothelial injury, identifiable as increased levels of circulatory endothelial cells and endothelial microparticles [9], are observed as KD's long-term effects.

Vascular inflammation attributable to KD can also influence the carotid's intimal and media layers. In patients with CAA, carotid intima-media thickness (cIMT)—measured as the distance between the lumen-intima interface and media-adventitia boundary of the common carotid artery—was found to be thicker than in KD patients without coronary artery lesions [10]; however, the data on cIMT in patients with a KD history are inconsistent [8,9]. Carotid intima-media roughness (cIMR) describes the common carotid artery's surface texture. It evaluates the surfaces of the carotid artery's intima and media layer, even beyond the intima-media thickness, and allows us to detect signs of arteriopathy, such as plaque formation, as irregularities in the intima-media layers [11]. Persisting irregularities affecting the vessels' inner wall after an inflammatory process such as KD may be diagnosed more accurately than by altered cIMT. Furthermore, cIMR has two advantages over cIMT: cIMR does not seem to be prone to age-related physiological vascular changes and shows a closer correlation with pathological changes and the atherosclerotic process than cIMT [11,12]. We therefore analyzed cIMR in a case-control study-design to investigate whether KD itself and/or clinical key aspects of KD are associated with cIMR alterations and therefore indicate a possible general arterial vasculopathy in the long term.

2. Materials and Methods

2.1. Study Population

Patients with KD were recruited and examined at the paediatric cardiology department at Ludwig Maximilian University of Munich. All patients' KD diagnoses had been verified following the American Heart Association (AHA) guidelines. The Z-score of each coronary artery was calculated according to Dallaire et al. [13], with a Z-score > 2.5 defining a CAA.

Healthy controls were recruited among the patients' personal contacts. The patients or parents were asked to present in a fasting state and bring along a sex- and age-identical friend or sibling to the appointment. We took a detailed medical history and carried out physical examinations, ECGs, and echocardiography in all patients and controls. The following applies to the healthy control children: absence of any cardiac, infectious, oncologic, rheumatic, neurologic or endocrine disease (e.g., diabetes mellitus) to eliminate any impact on the cardiovascular system. Further inclusion criteria were: normal resting ECG (12 leads), body mass index (BMI) < 30 kg/m², blood pressure < 97 th percentile and normal echocardiography.

After at least 10 min in resting state, blood tests and blood pressure were taken and the cIMR ultrasound examination was performed by a pediatric cardiologist, experienced in cIMT measurement.

2.2. Ultrasound Examination

cIMR was determined via an ECG-triggered sonographic examination. An ultrasound device from Philips (IE33) equipped with a linear transducer (L11-3) was used for the measurement. All examinations were carried out according to a standardized protocol for right and left common carotid artery. In a supine position, patients turned their head 30 degrees to the opposite side to create optimal visual conditions. The common carotid artery (CCA) was visualized in the longitudinal plane, and the intima-media layer was visible as typical double lines. Two cine-loops in B-mode were recorded on each side,

proximal to the carotid bulb. The first possible 10 mm section proximal to the carotid bulb of sufficient image quality was selected for analysis. To measure the CCA's far wall, we relied on the end-diastolic and end-systolic phase of the heart cycle, defined via the top of the QRS-complex and the end of the T-wave, in order to minimize intrabeat variability. Dynamic Artery Analysis (DYARA) software was used to automatically identify the IM layers. This software has been described and validated in adult and pediatric cohorts [11,14–16]. To determine the media–adventitia border and lumen–intima border of the far wall and the media–adventitia interface of the near wall, DYARA software analyses a 10-mm segment (266 pixels) (see Figure 1).

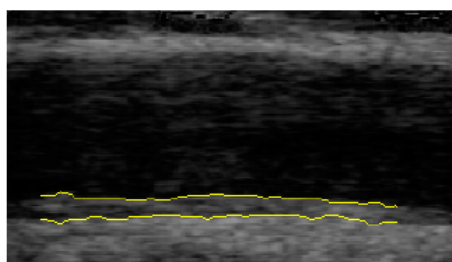


Figure 1. Automated identification of intima–media and media–adventitia border of the carotid artery using the software DYARA.

The regression line of all cIMT values within the 10-mm segment was calculated, and the respective regression line's deviation was determined. CIMR was calculated as the arithmetic mean of the deviation from the regression line, according to the ISO definition (International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland). The higher this deviation, the greater the roughness [11] (Figure 2).

2.3. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed with the program R (Version R-4.0.2). Data are indicated as the mean and standard deviation (SD) unless otherwise specified. To check the homogeneity of sex distribution between patients with KD and controls, the χ^2 test was applied. For the participants' clinical characteristics (age, body mass index (BMI), blood pressure and blood lipids determined on the day of presentation) and cIMR measurements (end-diastolic and end-systolic), we assessed differences at baseline per groups via Welch's *t*-test (an adaptation of the standard Student's *t*-test for unequal variances). Furthermore, to evaluate differences between end-diastolic and end-systolic cIMR measurements, the paired-samples *t*-test was applied. For correlations between clinical parameters (BMI, blood pressure and lipid profile) and cIMR, Pearson's coefficient was assessed. The correlation analyses were conducted for all study participants together as well as stratified by KD and control patients.

Multiple linear regression analysis adjusted for age, sex, weight and height was performed to study the association between KD (absence of disease (control group) = reference) and cIMR measurements. In relation to the coronary artery lesion, patients were subdivided into the following three groups: A: never had CAA, B: CAA only during acute phase of KD and C: persistent CAA. In one regression model, each group (A, B and C) was compared to the healthy control group (i.e., group membership was encoded as a four-level categorical predictor with the healthy control group as baseline). In another regression model, we compared group A to group B + C (without including the healthy control group).

In the second step, we evaluated the associations between clinical KD acute phase parameters and the end-diastolic and end-systolic cIMR. The following acute phase variables were used as predictors in a regression model (with either end-diastolic or end-systolic cIMR as the dependent variable): aneurysm status (groups B + C vs. group A), IVIG

non-responder, duration of fever (days), C-reactive protein (CRP) levels, thrombocytes, leucocytes and hemoglobin. As before, we adjusted for age, sex, weight and height (measured at the time of our study).

In all analyses, a p -value of < 0.05 was considered significant.

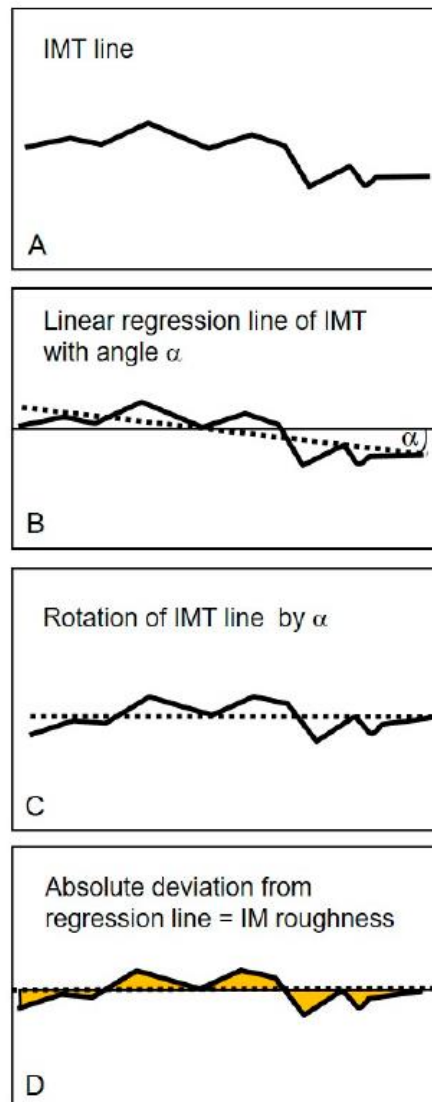


Figure 2. Schematic illustration of the calculation of the carotid intima media roughness (cIMR) adapted from Schmidt-Trucksäss et al. *Atherosclerosis* (2003) [11]. (A): carotid intima media thickness (cIMT) line calculated as the difference between all intima–lumen and media–adventitia measurement points. (B): shows the linear regression line of all cIMT measurement points, with α representing the angle between the regression line and the horizontal. (C): Rotation of regression line to horizontal (D): The yellow colored areas indicate the profile deviation of the cIMT from the regression line. The arithmetic mean of this deviation is equivalent to the cIMR.

3. Results

3.1. Comparison of Baseline Characteristics between Patients and Controls

A total of 44 patients with KD (15 female and 29 male, mean age (SD) in years: 13.4 (7.5)) and 36 healthy controls (14 female and 22 male, mean age in years: 12.1 (5.3)) were included in this investigation. One patient (out of the original 45 patients) had to be excluded from the study due to poor image quality, as intima-media boundaries were not precise enough for analysis.

The examination was carried out, on average, 8.1 years after the acute phase of KD (range: 7 months to 26.9 years). Patients with KD and controls did not differ significantly in age, sex or BMI (mean BMI (SD) in kg/m²: KD 18.2 (3.7) vs. controls 18.1 (3.1). Furthermore, our assessments of blood pressure hemodynamics (e.g., mean blood pressure (SD) in mmHg KD 117/71 (13.6/10.0) vs. controls 113/68 (8.2/9.2)) and blood-lipid values (e.g., mean LDL-cholesterol (SD) in mg/dL: KD 104.7 (25.5) vs. controls 104(26.2)) revealed no significant differences between the two groups. A detailed comparison of baseline characteristics in patients with KD and controls is provided in Table 1.

Table 1. Baseline characteristics of controls and patients with KD.

	<i>n</i>	KD Patients (<i>n</i> = 44)	<i>n</i>	Controls (<i>n</i> = 36)	<i>p</i> -Value *
Female, <i>n</i> (%)	44	15 (34.1)	36	14 (38.9)	0.657
Age (years)	44	13.4 (7.5)	36	12.1 (5.3)	0.372
Height (cm)	44	149.3 (24.2)	36	148.4 (22.5)	0.864
Weight (kg)	44	43.5 (21.3)	36	42.2 (18.6)	0.763
BMI (kg/m ²)	44	18.2 (3.7)	36	18.1 (3.1)	0.834
Blood pressure					
SBP (mmHg)	44	117.3 (13.6)	36	113.4 (8.2)	0.117
DBP (mmHg)	44	70.9 (10.0)	36	68.2 (8.9)	0.207
MAP (mmHg)	44	92.1 (10.5)	36	89 (7.7)	0.128
HR (1/min)	44	88.5 (12.4)	36	82.9 (12.6)	0.053
Laboratory data					
Total cholesterol (mg/dL)	38	163.6 (31.5)	24	171.2 (30.7)	0.356
Triglycerides (mg/dL)	38	112.5 (65.3)	24	88.5 (35.4)	0.067
LDL (mg/dL)	26	104.7 (25.5)	24	104 (26.2)	0.925
VLDL (mg/dL)	20	16.6 (6.4)	24	13.9 (6.5)	0.176
HDL (mg/dL)	26	50.1 (13.0)	24	53.9 (8.7)	0.224
CAA Status					
Group A		27 (69.2)			
Group B		6 (15.4)			
Group C		6 (15.4)			

BMI, body mass index; CAA, coronary artery aneurysm; DBP, diastolic blood pressure; HDL, high-density lipoprotein; HR, heart rate; KD, Kawasaki disease; LDL, low-density lipoprotein; MAP, mean arterial pressure; VLDL, very low-density lipoprotein. Data are expressed as the mean (standard deviation) unless otherwise specified. * Differences between groups were analyzed with the χ^2 test for sex distribution and with Welch's unequal variances *t*-test for all other variables. Group A: never had CAA, Group B: regressed CAA, Group C: persisting CAA; missing data of 5 patients.

3.2. Carotid Intima-Media Roughness

Two loops per carotid artery side were analyzed and used to calculate mean cIMR values. Mean cIMR was calculated as the mean of all four recorded loops of both carotid arteries. For one patient, only one loop per side (left/right) could be recorded instead of two; the mean cIMR values were calculated from the available measurements. For one control person, one of the two end-diastolic cIMR values recorded on the right carotid artery had to be removed due to a measurement error. For this control person, the mean end-diastolic cIMR was thus calculated from two loops on the left and one on the right side. We also calculated end-systolic and end-diastolic cIMR values in each study participant.

No statistically significant difference appeared after comparing right-sided and left-sided cIMR values from all study participants together (these data are not presented here, but are available upon request). However, we did observe that the mean end-diastolic cIMRs were significantly higher than the end-systolic values when taking all study participants together ($N = 80$, mean end-diastolic cIMR = 0.041 mm vs. mean end-systolic cIMR = 0.039 mm, 95% CI = (0.00005; 0.0036) (CI of the difference between end-diastolic and end-systolic cIMR), p -value = 0.044).

BMI, blood pressure and blood lipid values mostly did not correlate significantly with our cIMR measurements, except for VLDL (mg/dL), which correlated significantly with end-diastolic cIMR in the healthy control group ($r = -0.502$, p -value = 0.012) and when taking all study participants together ($r = -0.334$, p -value = 0.026). However, due to the high number of tests performed overall, this result should be regarded with caution (we did not correct for multiple testing). In the patient group, VLDL (mg/dL) did not correlate significantly with end-diastolic cIMR. The full correlation results are available upon request.

Differences in heart cycle-specific cIMR between patients and controls were analyzed first via the Welch's unequal variances t -test. Neither the end-diastolic cIMR (patients 0.040 mm vs. controls 0.042 mm (95% CI = (-0.0059; 0.0034) (CI of the difference between cIMR in patients and controls); p -value = 0.590) nor end-systolic cIMR (0.039 mm vs. 0.039 mm (95% CI = (-0.0043; 0.0037)) (CI of the difference between cIMR in patients and controls); p -value = 0.886) differed significantly between groups (see also Figure 3).

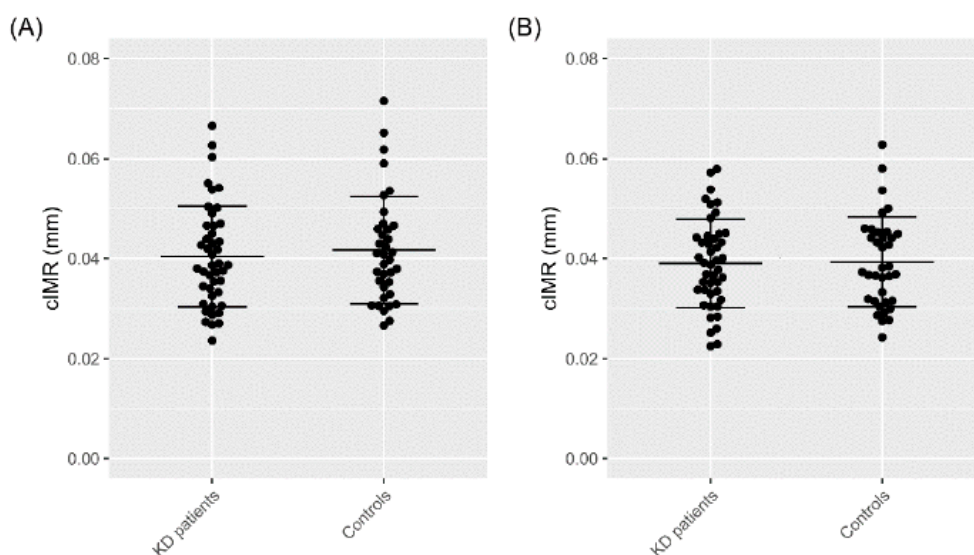


Figure 3. cIMR measurements expressed as mean \pm standard deviation. (A) End-diastolic cIMR in patients with Kawasaki disease (KD) (0.040 ± 0.010 mm, $N = 44$) vs. healthy controls (0.042 ± 0.011 mm, $N = 36$), p -value = 0.590; (B) end-systolic cIMR KD patients (0.039 ± 0.009 mm, $N = 44$) vs. healthy controls (0.039 ± 0.009 mm, $N = 36$), p -value = 0.886. Differences between groups were analyzed via Welch's unequal variances t -test.

To further evaluate KD's influence on cIMR, we performed linear regression analysis adjusted for age, sex, weight and height, but again, cIMR values revealed no significant association with KD (see Table 2).

Table 2. Association between KD and cIMR.

	cIMR End-Diastolic (mm)	p-Value	cIMR End-Systolic (mm)	p-Value
Kawasaki disease (Yes vs. No)	−0.128	0.584	−0.044	0.851

cIMR, carotid intima-media roughness. Standardized β coefficients and *p*-values for two linear regression models (each with sample size $N = 80$) with Kawasaki disease (yes vs. no) encoded as a dummy predictor variable and cIMR end-diastolic (mm) resp. cIMR end-systolic (mm) as the dependent variable. Adjustment for the following covariates was performed: sex, age, height and weight. All continuous variables, i.e., cIMR, age, height and weight were standardized into z-scores, resulting in the reported standardized β coefficients.

Comparing end-diastolic cIMR measurements to age and sex-specific normative data on children aged 8 to 18 years [17], we identified two patients with KD (belonging to Group A) and one control exceeding the 97th percentile.

3.3. Influence of Coronary Artery Status and Acute Phase Parameters on cIMR

The age of KD patients at the acute phase of the disease ranges from 2 months to 11.7 years. Twelve patients developed CAA during the acute phase of KD, six of whom had recovered to normal dimensions in the follow-up echocardiographic analysis. Regarding laboratory results, for each patient, the most pathological value measured during the acute phase of KD was considered for our analysis. For further acute-phase parameters, see Table 3.

Table 3. Acute phase parameters in KD patients.

	<i>n</i>	
Aneurysms (cases, %)	39	12 (30.8%)
Therapy refractory (>1 times IVIG) (cases, %)	37	14 (37.8%)
Duration of fever (days)	33	9.70 (5.3)
Age at disease (months)	41	4.4 (3.2)
BMI (kg/m ²)	30	15.3 (1.4)
CRP (mg/L)	35	115.4 (92.0)
Thrombocytes (g/L)	32	534.9 (175.6)
Hb (g/dL)	34	10.2 (1.9)
Leukocytes (g/L)	35	19.1 (10.9)

BMI, body mass index; CRP, C-reactive protein; Hb, hemoglobin; IVIG, intravenous immunoglobulins; KD, Kawasaki Disease. Data are expressed as the mean (standard deviation) unless otherwise specified.

We also applied multivariate regression analysis to investigate any associations between the coronary artery status, acute phase parameters and cIMR. In relation to the CAA, patients with KD were divided into three subgroups (A: never had CAA $N = 27$, B: regressed CAA $N = 6$, C: persisting CAA $N = 6$, missing values: $N = 5$). Due to the five persons with unknown CAA status, the number of KD patients in the analyses was reduced to 39 persons. Patients with KD with evidence of coronary artery involvement (Group B and C) had slightly higher mean end-systolic cIMR values than patients in Group A (mean end-systolic cIMR: Group A 0.038 mm, Group B 0.043 mm, Group C 0.041 mm). For end-diastolic cIMR values, there was no clear tendency (mean end-diastolic cIMR: Group A 0.040 mm, Group B 0.038 mm, Group C 0.042 mm). However, according to the multiple linear regression analyses, the group differences were not statistically significant for either end-systolic or end-diastolic values (see Table 4).

Multiple linear regressions showed that acute phase parameters such as being a non-responder to intravenous immunoglobulins (IVIG), duration of fever (days), CRP levels, thrombocytes, leucocytes and hemoglobin were significantly associated with neither the end-systolic nor the end-diastolic cIMR (these data are not presented here but are available upon request). These regression analyses were limited to 29 patients with complete values for all the variables.

Table 4. Association between coronary artery status and cIMR in KD patients.

	cIMR End-Diastolic (mm)	p-Value	cIMR End-Systolic (mm)	p-Value
Group A (vs. healthy)	−0.140	0.599	−0.143	0.583
Group B (vs. healthy)	−0.403	0.391	0.293	0.524
Group C (vs. healthy)	0.006	0.990	0.280	0.554
Group B + C (vs. A)	−0.056	0.888	0.543	0.150

cIMR, carotid intima-media roughness. Group A: No CAA; Group B: CAA at acute phase; Group C: persistent CAA. Standardized β coefficients and *p*-values from four different linear regression models, resulting from two different dependent variables (cIMR end-diastolic and cIMR end-systolic) and two types of predictors. For the first predictor type (sample size $N = 75$), groups A, B and C were each compared to the healthy control group, by encoding groups A, B, C vs. healthy as dummy predictor variables with the healthy group as baseline. The comparisons of A, B and C to the healthy control group were performed simultaneously in a single model. For the second predictor type (sample size $N = 39$), the group composed of both B and C was compared to group A, by encoding group B + C vs. group A as a dummy predictor variable with group A as the baseline. Healthy controls were not included in the latter type of model. Adjustment for the following covariates was performed: sex, age, height and weight. All continuous variables, i.e., cIMR, age, height and weight were standardized into *z*-scores, resulting in the reported standardized β coefficients.

4. Discussion

4.1. Dynamic Carotid Intima–Media Roughness, a Potential Vascular Parameter

In this study, we investigated cIMR as a potential surrogate marker for long-term vascular anomalies in children with a history of KD. To the best of our knowledge, the cIMR in children with KD has not been investigated until now. cIMR might reveal an intima–media anomaly more thoroughly than the thickness alone. However, we found that our KD patients' cIMR—including both the systolic and diastolic values—failed to differ significantly from our healthy controls' cIMR. Furthermore, 95.6% of all cIMR values of the KD patients concurred with published cIMR normative data for children [17]; they were only exceeded in both groups by a total of three children. Moreover, those patients with KD and a more severe clinical presentation (represented, for example, by CRP levels (mean CRP levels 115.4 mg/L), being refractory to IVIG, or developing CAA), did not demonstrate a “rougher” intima–media surface.

Following the characteristics of cIMT, we found that cIMR measured during the heart cycle's diastole was significantly higher than end-systolic cIMR. As assumed for cIMT, the most probable reason for this is the lumen diameter's physiological expansion during systole, causing the artery's intima–media complex to become thinner. A study from 2017 even implicates that this effect is clearly stronger in childhood than in adulthood, as they reported a cIMT increase by 8.8% (38 μm) in four-year-olds compared to only 3.8% (18 μm) in adults [18].

AHA guidelines recommend the acquisition of end-diastolic cIMT values for cardiovascular risk assessment [19]. The inconsistency of published normative cIMT values regarding heart cycle specific measurement can lead to misinterpretation, e.g., the ARIC study [20] where cIMT was acquired in peak systole vs. the cardiovascular health study [21] where the phase of cardiac cycle was not controlled. This pitfall should be taken into account in future studies investigating cIMR to ensure consistent investigation procedures, especially concerning pediatric populations of very different ages.

cIMT studies in adults showed that atherosclerotic anomalies such as plaque formation or a granulated intima–media layer are linked to cardiovascular risk factors and transient ischemic lesions or stroke, and may be a major criterion for cardiovascular events [22–25]. cIMR describes the amount of variation in a set of cIMTs and is supposed to quantify irregularities in the IM layers caused by such plaque formations or granulations as a sign of arterial injury. In adults, cIMR is known to correlate closely with arterial hypertension and coronary artery disease [11,26]. Wu et al. found cIMR was significantly associated with the Framingham heart score, and that it increased in conjunction with the number of cardiovascular risk factors. Smoking status, systolic blood pressure and hyperlipidemia, especially, proved to be independently associated with cIMR [27]. These results reveal that cIMR is a new parameter facilitating the assessment of arteriopathy and cardiovascular

risk. However, in our pediatric study participants, we failed to detect any significant association between cIMR values and blood lipids and/or blood pressure, except for a negative correlation of cIMR to VLDL, acknowledging that all values had been within the normal range. Yet, up to now, only few studies assessed the cIMR in children. Nevertheless, significant positive correlation between cIMR and cardiovascular risk factors such as body mass index and a strong negative correlation to physical fitness, measured as maximum oxygen uptake, have been found¹⁷. In one case report, the cIMR in a 12-year-old boy with type 1 diabetes diminished during consequent blood glucose control from 0.048 mm to 0.036 mm (initial HbA1c level: 15%; after 41 months: 8.2%) [28]. Patients with diabetes are known to carry an increased cardiovascular risk, but that risk decreases as HbA1c-levels return to normal [29]. cIMR might therefore be a parameter to reveal cardiovascular risk not only in adults, but also in children.

Apart from its effect on the coronary arteries, the evidence of KD's long-term effect on the vascular system is inconsistent. Dalla Pozza et al. [10] detected significantly higher cIMT values in children after a KD diagnosis than in healthy controls and normative data on Western children. Furthermore, children with persistent CAA even demonstrated an additional significant increase in cIMT. Another investigation, including 92 patients with KD, found no difference in cIMT and arterial stiffness, measured as pulse wave velocity (PWV). However, the same study reported that different markers of endothelial injury—such as circulating endothelial cells (CECs), endothelial microparticles (EMPs) and soluble adhesion molecules—were significantly higher in patients with KD than in healthy controls; they were highest in patients with persistent CAA [9]. A systematic review evaluated 30 studies investigating endothelial dysfunction, arterial stiffness and cIMT in patients with a KD history and found that, while arterial stiffness and endothelial dysfunction seem to be abnormal, especially in CAA-positive patients with KD, studies measuring cIMT were inconsistent [8]. cIMR might give us information on intima-media anomalies even beyond the thickness itself. However, the results we obtained from our patient cohort did not indicate that patients with KD carry a higher risk for peripheral arteriopathy. This naturally does not relate to KD's coronary artery-related vasculopathy. Invasive high-resolution investigation of the coronary arteries in KD patients, such as optical coherence tomography (OCT), indicates an altered vascular-wall texture similar to intimal hyperplasia, partial disappearance of media and fibrosis, seen at both aneurysmal sites and angiographically normal segments [30]. Yet, little is known about coronary vascular wall texture in KD children, never having had evidence of coronary artery involvement, since invasive cardiac catheterization is usually not part of routine follow-up investigation.

4.2. Strengths and Limitations

In this study, we investigated the cIMR in patients with a history of KD in comparison to healthy controls. By recruiting groups whose anthropometric and laboratory data are similar—that is, our two groups did not differ significantly in sex, age, weight, height and laboratory data—we restricted influencing factors to a minimum. However, our data should be interpreted in the light of the low number of study participants. We had only a few patients with coronary artery aneurysms, thus weakening our statistical subgroup analysis. Furthermore, the broad range of the time since the KD diagnosis must also be accounted for. We were unable to compare our results within a clinical context as there are no cIMR normative values applying to children < 8 years, or even to adults, available.

We assessed the systolic and diastolic cIMR, which differed significantly, indicating that, in future cIMR studies, clear reference to heart cycle-specific values may be useful. However, the differences are small and should be confirmed by studies including a larger sample size.

5. Conclusions

In this study, cIMR did not differ in either patients with a KD history or in those with KD and a severe cardiovascular phenotype, such as persistent CAA. Therefore, our results

do not support the hypothesis of a generally higher long-term cardiovascular risk in patients with KD. Nevertheless, more investigations are needed with larger study populations that investigate other known vascular parameters in association with cIMR. Nevertheless, CIMR seems to be a promising parameter in the long-term assessment of atherogenesis.

Author Contributions: Conceptualization, A.J., M.K., R.D.-P., S.B., A.S.-T., J.P. and N.A.H.; methodology, M.K., S.B., A.J. and A.S.-T.; formal analysis, M.K., T.U., B.P.-V. and A.J.; investigation, M.K., S.B. and A.J.; resources, A.J., R.D.-P. and N.A.H.; data curation, M.K., T.U. and A.J.; writing—original draft preparation, M.K.; writing—review and editing, A.J., N.A.H., R.D.-P. and T.U.; visualization, M.K., T.U. and B.P.-V.; supervision, A.J., R.D.-P. and N.A.H.; project administration, A.J., R.D.-P. and N.A.H.; funding acquisition, A.J. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Friedrich Baur Institute, grant number 57/18, to André Jakob.

Institutional Review Board Statement Written informed consent for publication was obtained from every study participant and/or the legal guardian. The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of Ludwig Maximilian University in Munich (NO.: 17-692 and date of approval: 30 November 2017).

Informed Consent Statement Informed consent was obtained from all subjects involved in the study. Written informed consent has been obtained from the patient(s) to publish this paper.

Data Availability Statement: Data available on request due to restrictions eg privacy or ethical.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

- Jakob, A. Kawasaki-Syndrom. *Mon. Kinderheilkd* **2016**, *164*, 241–256. [[CrossRef](#)]
- Ae, R.; Makino, N.; Kosami, K.; Kuwabara, M.; Matsubara, Y.; Nakamura, Y. Epidemiology, Treatments, and Cardiac Complications in Patients with Kawasaki Disease: The Nationwide Survey in Japan, 2017–2018. *J. Pediatr.* **2020**, *225*, 23–29.e22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Jakob, A.; Whelan, J.; Kordecki, M.; Berner, R.; Stiller, B.; Arnold, R.; von Kries, R.; Neumann, E.; Roubinis, N.; Robert, M. Kawasaki Disease in Germany. *Pediatric Infect. Dis. J.* **2016**, *35*, 129–134. [[CrossRef](#)]
- McCrinkle, B.W.; Rowley, A.H.; Newburger, J.W.; Burns, J.C.; Bolger, A.F.; Gewitz, M.; Baker, A.L.; Jackson, M.A.; Takahashi, M.; Shah, P.B.; et al. Diagnosis, Treatment, and Long-Term Management of Kawasaki Disease: A Scientific Statement for Health Professionals From the American Heart Association. *Circulation* **2017**, *135*, e927–e999. [[CrossRef](#)]
- Amano, S.; Hazama, F.; Kubagawa, H.; Tasaka, K.; Haebara, H.; Hamashima, Y. General pathology of Kawasaki disease: On the morphological alterations corresponding to the clinical manifestations. *Pathol. Int.* **1980**, *30*, 681–694. [[CrossRef](#)]
- Silva, A.A.; Maeno, Y.; Hashmi, A.; Smallhorn, J.E.; Silverman, E.D.; McCrinkle, B.W. Cardiovascular risk factors after Kawasaki disease: A case-control study. *J. Pediatr.* **2001**, *138*, 400–405. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Pinto, F.F.; Laranjo, S.; Parames, F.; Freitas, I.; Mota-Carmo, M. Long-term evaluation of endothelial function in Kawasaki disease patients. *Cardiol. Young* **2013**, *23*, 517–522. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Dietz, S.M.; Tacke, C.E.; Hutten, B.A.; Kuijpers, T.W. Peripheral Endothelial (Dys)Function, Arterial Stiffness and Carotid Intima-Media Thickness in Patients after Kawasaki Disease: A Systematic Review and Meta-Analyses. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0130913. [[CrossRef](#)]
- Shah, V.; Christov, G.; Mukasa, T.; Brogan, K.S.; Wade, A.; Eleftheriou, D.; Levin, M.; Tulloh, R.M.; Almeida, B.; Dillon, M.J.; et al. Cardiovascular status after Kawasaki disease in the UK. *Heart* **2015**, *101*, 1646–1655. [[CrossRef](#)]
- Dalla Pozza, R.; Bechtold, S.; Urschel, S.; Kozlik-Feldmann, R.; Netz, H. Subclinical atherosclerosis, but normal autonomic function after Kawasaki disease. *J. Pediatr.* **2007**, *151*, 239–243. [[CrossRef](#)]
- Schmidt-Trucksass, A.; Sandrock, M.; Cheng, D.C.; Muller, H.M.; Baumstark, M.W.; Rauramaa, R.; Berg, A.; Huonker, M. Quantitative measurement of carotid intima-media roughness—effect of age and manifest coronary artery disease. *Atherosclerosis* **2003**, *166*, 57–65. [[CrossRef](#)]
- Homma, S.; Hirose, N.; Ishida, H.; Ishii, T.; Araki, G. Carotid plaque and intima-media thickness assessed by b-mode ultrasonography in subjects ranging from young adults to centenarians. *Stroke* **2001**, *32*, 830–835. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Dallaire, F.; Dahdah, N. New equations and a critical appraisal of coronary artery Z scores in healthy children. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* **2011**, *24*, 60–74. [[CrossRef](#)]
- Teynor, A.; Caviezel, S.; Dratva, J.; Kunzli, N.; Schmidt-Trucksass, A. An automated, interactive analysis system for ultrasound sequences of the common carotid artery. *Ultrasound Med. Biol.* **2012**, *38*, 1440–1450. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

15. Schmidt-Trucksäss, A.; Cheng, D.C.; Sandrock, M.; Schulte-Mönting, J.; Rauramaa, R.; Huonker, M.; Burkhardt, H. Computerized analysing system using the active contour in ultrasound measurement of carotid artery intima-media thickness. *Clin. Physiol.* **2001**, *21*, 561–569. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Cheng, D.C.; Schmidt-Trucksäss, A.; Cheng, K.S.; Burkhardt, H. Using snakes to detect the intimal and adventitial layers of the common carotid artery wall in sonographic images. *Comput. Methods Programs Biomed.* **2002**, *67*, 27–37. [[CrossRef](#)]
17. Dalla Pozza, R.; Pirzer, R.; Beyerlein, A.; Weberruss, H.; Oberhoffer, R.; Schmidt-Trucksäss, A.; Netz, H.; Haas, N. Beyond intima-media-thickness: Analysis of the carotid intima-media-roughness in a paediatric population. *Atherosclerosis* **2016**, *251*, 164–169. [[CrossRef](#)]
18. Rueb, K.; Mynard, J.; Liu, R.; Wake, M.; Vuillermin, P.; Ponsonby, A.L.; Zannino, D.; Burgner, D.P. Changes in carotid artery intima-media thickness during the cardiac cycle—A comparative study in early childhood, mid-childhood, and adulthood. *Vasa* **2017**, *46*, 275–281. [[CrossRef](#)]
19. Greenland, P.; Alpert, J.S.; Beller, G.A.; Benjamin, E.J.; Budoff, M.J.; Fayad, Z.A.; Foster, E.; Hlatky, M.A.; Hodgson, J.M.; Kushner, F.G.; et al. 2010 ACCF/AHA guideline for assessment of cardiovascular risk in asymptomatic adults: Executive summary. A report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation* **2010**, *122*, 2748–2764.
20. Chambless, L.E.; Heiss, G.; Folsom, A.R.; Rosamond, W.; Szklo, M.; Sharrett, A.R.; Clegg, L.X. Association of coronary heart disease incidence with carotid arterial wall thickness and major risk factors: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study, 1987–1993. *Am. J. Epidemiol.* **1997**, *146*, 483–494. [[CrossRef](#)]
21. Gardin, J.M.; Bartz, T.M.; Polak, J.F.; O’Leary, D.H.; Wong, N.D. What do carotid intima-media thickness and plaque add to the prediction of stroke and cardiovascular disease risk in older adults? The cardiovascular health study. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* **2014**, *27*, 998–1005.e1002. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Belcaro, G.; Nicolaidis, A.N.; Laurora, G.; Cesarone, M.R.; De Sanctis, M.; Incandela, L.; Barsotti, A. Progression of subclinical atherosclerosis in 6 years. Ultrasound evaluation of the average, combined femoral and carotid bifurcation intima-media thickness. *Vasa* **1995**, *24*, 227–232. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Belcaro, G.; Nicolaidis, A.N.; Laurora, G.; Cesarone, M.R.; De Sanctis, M.; Incandela, L.; Barsotti, A. Ultrasound morphology classification of the arterial wall and cardiovascular events in a 6-year follow-up study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **1996**, *16*, 851–856. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Polak, J.F.; O’Leary, D.H.; Kronmal, R.A.; Wolfson, S.K.; Bond, M.G.; Tracy, R.P.; Gardin, J.M.; Kittner, S.J.; Price, T.R.; Savage, P.J.; et al. Sonographic evaluation of carotid artery atherosclerosis in the elderly: Relationship of disease severity to stroke and transient ischemic attack. *Radiology* **1993**, *188*, 363–370. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Espeland, M.A.; Hoen, H.; Byington, R.; Howard, G.; Riley, W.A.; Furberg, C.D. Spatial distribution of carotid intimal-medial thickness as measured by B-mode ultrasonography. *Stroke* **1994**, *25*, 1812–1819. [[CrossRef](#)]
26. Wu, Y.; Xi, M.; Zhang, L.; Lu, X.; Cheng, X.; Lv, Q. Carotid Intima-Media Roughness and Elasticity in Hypertensive Patients With Normal Carotid Intima-Media Thickness. *J. Ultrasound Med.* **2019**, *38*, 1545–1552. [[CrossRef](#)]
27. Wu, Y.; Lu, X.; Zhang, L.; Cheng, X.; Yuan, L.; Xie, M.; Lv, Q. Correlation between carotid intima-media roughness and cardiovascular risk factors. *Exp. Ther. Med.* **2019**, *18*, 49–56. [[CrossRef](#)]
28. Krebs, A.; Schmidt-Trucksäss, A.; Wagner, J.; Krebs, K.; Doerfer, J.; Schwab, K.O. Adult-like but regressive increase of intima-media thickness and roughness in a child with type 1 diabetes. *Pediatr. Diabetes* **2005**, *6*, 161–164. [[CrossRef](#)]
29. Cavero-Redondo, I.; Peleteiro, B.; Álvarez-Bueno, C.; Rodríguez-Artalejo, E.; Martínez-Vizcaino, V. Glycated haemoglobin A1c as a risk factor of cardiovascular outcomes and all-cause mortality in diabetic and non-diabetic populations: A systematic review and meta-analysis. *BMJ Open* **2017**, *7*, e015949. [[CrossRef](#)]
30. Dionne, A.; Ibrahim, R.; Gebhard, C.; Bakloul, M.; Selly, J.B.; Leye, M.; Déry, J.; Lapierre, C.; Girard, P.; Fournier, A.; et al. Coronary Wall Structural Changes in Patients With Kawasaki Disease: New Insights From Optical Coherence Tomography (OCT). *J. Am. Heart Assoc.* **2015**, *4*, e001939. [[CrossRef](#)]

6. Veröffentlichung II

Microvascular Research 140 (2022) 104269



Contents lists available at ScienceDirect

Microvascular Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ymvre



Kawasaki disease and increased cardiovascular risk: Is there a link to circulating glycoalyx biomarkers?

André Jakob^{a,*}, Sarah Bohlig^a, Miriam König^a, Claudia Nussbaum^b, Robert Dalla-Pozza^b, Mathias Hermann^a, Nikolaus A. Haas^a, Belén Pastor-Villaescusa^a

^a Ludwig-Maximilians-University of Munich, Department of Pediatric Cardiology, Marchioninistr. 15, 81377 Munich, Germany
^b Div. of Neonatology, Dr. von Hauner Children's Hospital, LMU Munich, 80337 Munich, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:

Kawasaki disease
 Endothelial function
 Glycoalyx
 Blood pressure
 Circulating lipids

ABSTRACT

Aims: Kawasaki disease (KD) is an acute systemic vasculitis with possible long-term impact of general cardiovascular health. An endothelial glycoalyx disorder during the disease's acute phase might predispose to long-term vascular anomalies leading to endothelial dysfunction and atherosclerosis. To investigate any association between increased cardiovascular risk and endothelial glycoalyx, we assessed circulating glycoalyx components in patients with a KD history, and analyzed their association with acute-phase clinical features and more importantly, with patients' current cardiovascular risk factors.

Methods: This prospective observational cohort study included 51 subjects: 31 patients with a history of KD, and 20 healthy subjects matched for age and sex. We analyzed serum syndecan-1 and hyaluronan via ELISA. We assessed features reported during the acute phase of KD such as blood counts, C-reactive protein (CRP) levels and coronary artery aneurysms (CAA), and their current blood pressure and lipid markers in relation to measured glycoalyx components.

Results: Our multivariate analysis revealed that hyaluronan and syndecan-1 levels were not associated with KD. However, the latter exhibited a significant association with acute-phase blood count alterations in patients with KD. Furthermore, significant interactions of hyaluronan and syndecan-1 with certain cardiovascular risk factors like blood lipids and blood pressure were only present in KD patients.

Conclusion: Vasculitis during KD's acute phase might predispose to a long-term endothelial glycoalyx alteration, influenced by other factors having a vascular impact such as blood pressure and circulating lipids.

Clinical trial registration: German Clinical Trials Register on 25th February 2016, DRKS00010071 https://www.drks.de/drks_web/.

1. Introduction

Kawasaki disease (KD) is a rare acute systemic vasculitis of uncertain aetiology occurring predominantly in infants and young children (McCrindle et al., 2017a; Newburger et al., 2016). Its incidence in Germany is estimated to be 7,2/100,000 in children under 5 years of age (Jakob et al., 2016). KD is now the leading cause of acquired heart disease among children in North America, Europe and Japan (Singh et al., 2015). Coronary artery aneurysms (CAAs) occur in 15–25% of KD patients during its acute stage, and may lead to myocardial infarction, sudden death, or chronic coronary insufficiency and heart failure (Iemura et al., 2000).

Vasculitis linked to KD in part is characterised by endothelial cell damage following over-activation of the immune system during the acute phase, abnormal cytokine production and cytotoxic antibodies targeting endothelial cells (Galeotti et al., 2010). The endothelial glycoalyx is a negatively charged complex layer composed of proteoglycans and glycoproteins on top of endothelial cells, acting as a barrier on the luminal surface against the untoward effect of such cytokines or cytotoxic antibodies via direct contact with the endothelium (Kim et al., 2017). In silico experiments using computational simulation of glycoalyx molecular dynamics have greatly advanced our understanding of its conformation and function under physiological and pathological conditions (Cruz-Chu et al., 2014; Jiang et al., 2019). Apart

* Corresponding author at: Department of Pediatric Cardiology and Intensive Care, Ludwig Maximilian-University of Munich, Marchioninistr. 15, D-81377 Munich, Germany.

E-mail address: andre.jakob@med.uni-muenchen.de (A. Jakob).

<https://doi.org/10.1016/j.mvr.2021.104269>

Received 15 June 2021; Received in revised form 14 October 2021; Accepted 18 October 2021

Available online 23 October 2021

0026-2862/© 2021 Published by Elsevier Inc.

from acting as a protective shield, the glycocalyx serves important functions as mechanosensor and regulator of microvascular fluid transport. A derangement in endothelial glycocalyx seems to both play a key role in acute vascular inflammation and is associated with long-term vascular diseases like atherosclerosis (Reitsma et al., 2007). There is solid evidence of the relationship between serum glycocalyx component levels and the occurrence of postcardiac arrest syndrome (Grundmann et al., 2012) or acute coronary syndrome (Miranda et al., 2016). Syndecan-1 and hyaluronan are major components of endothelial glycocalyx (Gonzalez Rodriguez et al., 2017). Syndecan-1 is a proteoglycan firmly connected to the endothelial cell membrane. Hyaluronan, a non-sulfated glycosaminoglycan, plays a crucial role in glycocalyx structure and maintenance in this entangled network by providing stability through its water-retaining properties (Broekhuizen et al., 2009). Elevated serum levels of both are known to be biomarkers indicating damaged endothelial glycocalyx (Grundmann et al., 2012; Miranda et al., 2016). In KD patients, circulating glycocalyx components have been observed as elevated during the disease's acute phase and associated with coronary artery lesions (Luo et al., 2019; Ohnishi et al., 2019). However, there is no data related to how these clinical features manifested in KD's acute phase might lead to long-term glycocalyx damage, thus predisposing these patients to an increased risk of atherosclerosis.

Furthermore, KD patients might present a different pattern or susceptibility to cardiovascular risk factors such as elevated blood lipids or arterial pressure than the general population (McCrintle et al., 2017a). In this study we aimed to detect associations between cardiovascular risk factors, such as high blood pressure and excessive blood lipids, and circulating glycocalyx biomarkers that may contribute to a deeper understanding of KD patients' general vascular involvement and long-term vascular health. We assessed serum syndecan-1 and hyaluronan concentrations in patients with a history of KD in comparison with healthy controls. We further analysed the association between these circulating glycocalyx biomarkers and KD-specific acute-phase clinical features and more importantly, established cardiovascular risk factors such as blood pressure and blood lipids.

2. Material and methods

2.1. Study population and blood samples

This study was designed as a prospective observational cohort study. KD patients were recruited from the Department of Paediatric Cardiology and Intensive care at Ludwig Maximilian-University of Munich, presenting during follow-up evaluations. A signed written informed consent from either the participant and/or their parents/legal guardians was required prior to study participation. Approval for this study had been provided by the Ethics Committee of Ludwig Maximilians University of Munich, in accordance with the ethical standards of the Declaration of Helsinki.

Clinical information on the acute phase, including laboratory and echocardiographic findings were obtained from medical records using a standardised questionnaire. All participating patients were diagnosed according to American Heart Association (AHA) guidelines (Newburger et al., 2004). The Z-score of each traceable coronary artery was calculated according to Dallaire et al. with a Z-score > 2.5 defining a CAA (Dallaire and Dahdah, 2011). The minimum time required to have passed for our follow-up study was 6 months.

Age- and sex-matched controls were recruited, either among personal contacts or healthy patients from the department, i.e. those undergoing cardiac evaluation for a heart murmur or during a fitness evaluation for competitive sports. We applied these criteria to the healthy controls: they had to be free of any cardiac, infectious, oncologic, rheumatic, neurologic or endocrine disease (i.e. diabetes mellitus). All participants were asked to present in a fasting state. Physical examination, anthropometric measurements, blood pressure and blood lipid values via venous puncture in standard serum tubes were obtained

Table 1

Clinical characteristics of controls and KD patients.

	N	Controls (n = 20)	N	KD patients (n = 31)	p-Value ^a
Females (%)	7	35	12	38.7	0.514
Age (years)	20	11.7 ± 4.1	31	13.1 ± 7.7	0.405
BMI (kg/m ²)	20	18 ± 3.3	29	18.4 ± 3.7	0.758
Persistent CAA (yes)			31	3 (9.7)	–
SBP (mm Hg)	19	115 ± 9.4	28	119 ± 15.4	0.268
DBP (mm Hg)	19	68.1 ± 9	28	73.6 ± 9.2	0.048
MAD (mm Hg)	18	89.6 ± 8.1	28	94.4 ± 11.1	0.124
Cholesterol (mg/dl)	20	170.6 ± 33.5	29	169.7 ± 29.6	0.920
Triglycerides (mg/dl)	20	89.6 ± 35.8	29	119.7 ± 69.8	0.084
LDLc (mg/dl)	20	102.5 ± 28.4	22	108.4 ± 24.3	0.475
HDLc (mg/dl)	20	54.5 ± 9.3	29	50.7 ± 13.3	0.298
LDLc/HDLc ratio	20	1.9 ± 0.6	17	2.4 ± 0.7	0.053
VLDLc (mg/dl)	20	13.7 ± 6.9	19	16.2 ± 6.2	0.253
LPA (mg/dl)	11	32.2 ± 37.8	14	30.2 ± 29.1	0.884
pro-BNP (pg/ml)	11	47 ± 33	22	43.5 ± 29.1	0.757
Leucocytes (G/l)	19	7.2 ± 1.4	30	6.9 ± 2.1	0.662
Haemoglobin (g/dl)	19	13.3 ± 1.2	29	13.6 ± 1.4	0.450
Acute phase					
CAA (yes)			31	7 (22.6)	
Time since acute phase (months)			29	97.1 ± 69.2	
Days with fever			25	8.7 ± 4.5	
Refractive to IVIG			31	10 (32.3)	
Leucocytes (G/l)			28	18.7 ± 11.7	
Thrombocytes (×1000/μl)			26	526.5 ± 179	
Haemoglobin (g/dl)			27	10.3 ± 1.9	
CRP (mg/l)			27	120.1 ± 97.8	

Abbreviations: BMI, body mass index; BNP, brain natriuretic peptide; CAA, coronary artery aneurysm; CRP, C-reactive protein; DBP, diastolic blood pressure; HDLc, high-density lipoprotein cholesterol; IVIG, intravenous immunoglobulin; LDLc, low-density lipoprotein cholesterol; LPA, lipoprotein; MAD, mean arterial pressure; SBP, systolic blood pressure; VLDLc, very low-density lipoprotein cholesterol.

Data are expressed as the mean ± standard deviation for continuous variables and counts (%) for categorical variables.

Bold text indicates p-values < 0.05.

^a Chi-squared test for the distribution of frequencies and t-test for unpaired samples.

(Table 1). All study participants underwent resting electrocardiogram (ECG) (12 leads) and echocardiography and found to be normal in the control group.

For the glycocalyx study, 51 participants (31 KD and 20 controls) had blood samples available for the syndecan-1 and hyaluronan measurements. Blood samples collected from KD patients and controls were immediately centrifuged at 3000 ×g for 10 min, and the serum was stored at –80 °C for further analysis.

2.2. Measuring syndecan-1 and hyaluronan in serum

We determined serum syndecan-1 and hyaluronan in duplicate via enzyme-linked immunosorbent assay (Human sCD138 (Syndecan-1) ELISA Kit (Dialclone SAS, Besancon Cedex, France) and Hyaluronan Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kit (Echelon Biosciences Inc., Salt Lake City, UT)), respectively, using a microplate reader SPECTROstar Omega (BMG LABTECH, Ortenberg, Germany) according to manufacturers' instructions. When assessing the assay reproducibility, we noted that the range of intra-assay coefficient of variation (CV) for syndecan-1 and hyaluronan amounted to 0.41–9.8% and 6.6–17.7%, and the mean of inter-assay CV was 4.22% and 12.4%, respectively. For syndecan-1, one sample was excluded from data analysis as it exceeded the highest point on the standard curve (>256 ng/ml).

2.3. Statistical analysis

Values in descriptive tables represent the mean and standard

deviation. All continuous variables were tested for normality using Q-Q plots and histograms. Variables not normally distributed were log-transformed for analysis (syndecan-1). For participants' clinical characteristics, group differences were assessed via the Student *t*-test. Heteroscedasticity between experimental groups was explored via the Levene test. To check the homogeneity of sex distribution between groups, the χ^2 test was applied. Linear regression analyses were performed to examine the association between KD (absence of disease (control group) = reference), and the presence of CAA in the acute phase (in KD patients), with the serum glycoalyx biomarkers (syndecan-1 and hyaluronan) adjusting by age (years), sex, and body mass index (BMI, kg/m²). All regression models were evaluated by model control (investigating linearity of effects on outcome(s), consistent with normal distribution and variance homogeneity). Pearson's coefficient was assessed to seek any correlations between the serum glycoalyx biomarkers, blood pressure and lipid profile. Analyses of correlation were done in KD and control patient, separately. To detect possible interactions between KD and cardiovascular risk factors that might exacerbate the effect on the glycoalyx markers, we conducted a sensitivity analysis based on general linear models introducing interaction terms with the blood pressure and lipid markers. Tests were done using a two-sided 5% significance level, and all statistical analyses were carried out using SPSS software version 24 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3. Results

3.1. Clinical characteristics of the study population

Clinical and biochemical characteristics are summarised in Table 1. Sex was homogeneously distributed between controls (35% females) and KD patients (38.7% females). Mean age was 11.7 years in controls and 13.1 years in KD patients, with no significant differences. Both groups reported a BMI of 18 kg/m². In terms of haemodynamics, the KD patients' diastolic blood pressure (DBP) was significantly higher than that in controls (73.6 ± 9.2 vs. 68.1 ± 9 mm Hg, *p* = 0.048). Systolic blood pressure (SBP) and mean arterial pressure (MAD) were similar in both groups. We observed no significant differences in laboratory values. KD patients tended to reveal higher concentrations of triglycerides and low-density lipoprotein cholesterol/high-density lipoprotein cholesterol (LDLc/HDLc) ratio (119.7 ± 69.8 vs. 89.6 ± 35.8 mg/dl, *p* = 0.084; 2.4 ± 0.7 vs. 1.9 ± 0.6, *p* = 0.053, respectively) and lower HDLc levels.

To describe briefly the KD group's acute clinical phase: they had a fever for a mean of nine days. All 31 KD patients were given aspirin (ASA) and intravenous immunoglobulins (IVIG), and 32.3% of them continued to have a fever within at least 36 h after IVIG application and were thus given a second course of IVIG. We defined those patients as being IVIG-refractory. Nine patients had been given additional corticosteroids; two of whom together with the first IVIG dose. No other KD-specific treatments were needed by any of the patients. Seven presented with a CAA (22.6%) during the acute phase of the disease; three of them had a persistent CAA at visit time (9.7%).

3.2. Hyaluronan and syndecan-1 concentrations according to KD

We compared serum hyaluronan and syndecan-1 concentrations between KD patients and controls. Although hyaluronan concentrations tended to be higher in KD patients (96.5 ± 28.6 ng/ml vs. 84 ± 24.1 ng/ml for controls), that difference was not statistically significant (*p* = 0.113). The syndecan-1 concentrations were similar between KD and control patients (54.3 ± 45.5 ng/ml vs. 53 ± 43.8 ng/ml, respectively, *p* = 0.986). Furthermore, our linear regression analysis revealed no significant association between KD and any of the serum glycoalyx biomarkers (Table 2).

Table 2
Association between KD and serum glycoalyx biomarkers.

	Syndecan-1 (ng/ml) (log 10)			Hyaluronan (ng/ml)		
	β	<i>p</i> -Value	R ²	β	<i>p</i> -Value	R ²
Kawasaki disease (yes vs. no)	-0.011	0.900	0.01	13.5	0.108	0.1

Yes: KD patients; no: controls.

β values are unstandardized.

These analyses were adjusted for the following covariates: sex, body mass index and age (years) at visit time.

Syndecan-1 was not normally distributed and therefore log-transformed for analysis.

3.3. Association between glycoalyx biomarkers and KD acute phase parameters

We analysed any associations between acute phase blood counts, CRP levels, and the CAA incidence with the concentrations of glycoalyx biomarkers (Table 3). Regarding the acute phase blood counts: we detected a significant positive association between syndecan-1 and thrombocytes (β = 0.473; *p* = 0.041), and a negative association with haemoglobin (β = -0.519; *p* = 0.044). Leucocytes tended to be positively associated with syndecan-1 (β = 0.407; *p* = 0.061). However, none of the blood count values were associated with hyaluronan concentrations. Neither CRP levels and the CAA incidence during the disease's acute phase nor persistent CAA (syndecan-1: β = -0.016; *p* = 0.945; hyaluronan: β = -0.136; *p* = 0.564) indicated to be associated with any glycoalyx parameter (Table 3).

3.4. Relationships and interactions between serum glycoalyx biomarkers, blood pressure and lipid profile

All correlations between serum glycoalyx biomarkers and blood pressure and lipid profile parameters stratified by KD and control patients are illustrated in Supplement Table S1. In the KD group, hyaluronan correlated positively with SBP (*r* = 0.554; *p* = 0.003, Fig. 1a), MAD (*r* = 0.431; *p* = 0.025, Fig. 1b) and LDLc/HDLc ratio (*r* = 0.503; *p* = 0.047, Fig. 1d), and exhibited a tendency to correlate positively with cholesterol (*r* = 0.363; *p* = 0.050) (Fig. 1c). Syndecan-1 tended to correlate positively with LDLc (*r* = 0.437; *p* = 0.054) (Fig. 2). We observed no significant correlations in the control group.

To further explore the aforementioned correlations, we conducted a sensitivity analysis including known cardiovascular risk factors in the model (Table 4). These analyses revealed significant interactions

Table 3
Association between CAA incidence and markers measured in the acute phase with serum glycoalyx biomarkers.

	Syndecan-1 (ng/ml) (log 10)			Hyaluronan (ng/ml)		
	β	<i>p</i> -Value	R ²	β	<i>p</i> -Value	R ²
CAA (yes vs. no)	0.087 ^a	0.543	0.40	-0.003 ^a	0.425	0.15
Leucocytes (G/l)	0.407	0.061	0.51	-0.215	0.363	0.19
Thrombocytes (× 1000/ μ l)	0.473	0.041	0.53	-0.290	0.290	0.21
Haemoglobin (g/dl)	-0.519	0.044	0.56	-0.133	0.650	0.15
CRP (mg/l)	0.219	0.387	0.43	-0.070	0.797	0.14

Abbreviations: CAA, coronary artery aneurysm.

β values are unstandardised in terms of CAA, and standardised in terms of the remaining variables.

Bold text indicates *p*-values < 0.05.

These analyses were adjusted for the following covariates: sex, body mass index and age (years) in the acute phase.

A. Jakob et al.

Microvascular Research 140 (2022) 104269

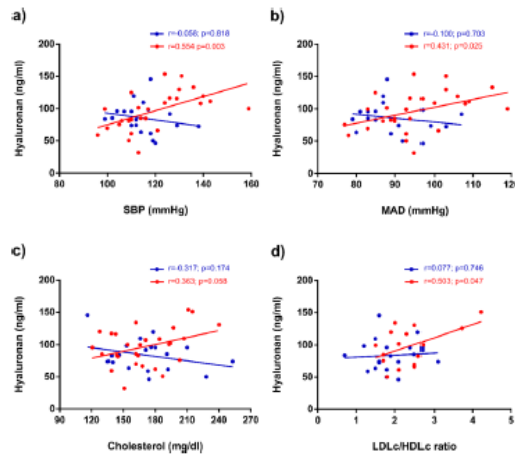


Fig. 1. Pearson correlation analyses between serum hyaluronan and SBP (a), MAD (b), cholesterol (c) and LDLc/HDLc ratio in KD (red) and control (blue) patients. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

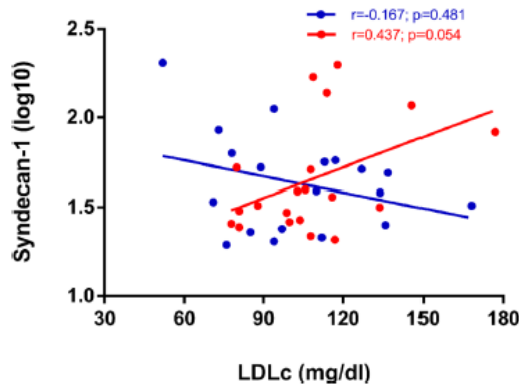


Fig. 2. Pearson correlation analyses between serum syndecan-1 and LDLc in KD (red) and control (blue) patients. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

indicating that combining KD with some of these risk factors could exert a synergic effect on hyaluronan and syndecan-1 levels. In terms of hyaluronan, the interactions $KD * SBP$ and $KD * MAD$ were significant ($F = 5.957$, $p = 0.019$; $F = 4.306$, $p = 0.043$, respectively), meaning that KD modulates the relationship between blood pressure and hyaluronan. Similarly, cholesterol concentrations also proved to be, along with KD, a modulator of hyaluronan concentrations ($F = 5.631$, $p = 0.023$). In other words, patients with KD and high SBP, MAD or cholesterol levels presented higher concentrations of hyaluronan than control patients. Regarding syndecan-1, we observed significant interactions between cholesterol, LDLc and very low-density lipoprotein cholesterol (VLDLc), and KD ($F = 6.478$, $p = 0.015$; $F = 7.235$, $p = 0.011$; $F = 6.012$, $p = 0.021$, respectively). High levels of these lipid markers triggered higher concentrations of syndecan-1 in KD patients than in the control group. Blood pressure revealed no significant interactions with KD affecting syndecan-1 levels. According to the R^2 , the model based on SBP combined with KD was the most predictive, explaining 29% of the

Table 4

Analysis of interactions between KD and cardiovascular risk factors.

	Hyaluronan (ng/ml)			Syndecan-1 (ng/ml)		
	F	p-Value	R ²	F	p-Value	R ²
Interaction term $KD * SBP$	5.957	0.019	0.29	0.035	0.853	0.032
Interaction term $KD * DBP$	0.859	0.36	0.1	0.01	0.921	0.027
Interaction term $KD * MAD$	4.306	0.043	0.21	0.009	0.925	0.036
Interaction term $KD * Cholesterol$	5.631	0.023	0.24	6.478	0.015	0.16
Interaction term $KD * Triglycerides$	0.059	0.81	0.13	0.569	0.456	0.41
Interaction term $KD * LDLc$	2.312	0.138	0.24	7.235	0.011	0.23
Interaction term $KD * VLDLc$	0.095	0.76	0.22	6.012	0.021	0.22
Interaction term $KD * HDLc$	1.399	0.245	0.22	0.197	0.66	0.046
Interaction term $KD * LDLc/HDLc$	1.153	0.292	0.26	0.955	0.337	0.15
Interaction term $KD * LPA$	0.246	0.626	0.32	0.392	0.54	0.13

Abbreviations: BMI, body mass index; DBP, diastolic blood pressure; HDLc, high-density lipoprotein cholesterol; KD, Kawasaki disease; LDLc, low-density lipoprotein cholesterol; LPA, Lipoprotein; MAD, mean arterial pressure; SBP, systolic blood pressure; VLDLc, very low-density lipoprotein cholesterol.

Data are expressed as F and p value for the interaction term, and R² of the full model.

Bold text indicates p-values < 0.05.

Each model included additionally the following covariates: sex, body mass index and age (years) at visit time.

hyaluronan concentrations.

4. Discussion

Long-term cardiovascular health in patients with a history of KD, apart from the coronary artery lesions, remains controversial. There is evidence of ongoing endothelial injury as revealed by increased levels of circulating endothelial cells, endothelial microparticles, and soluble adhesion molecules in KD patients even years after an acute disease phase compared to healthy controls, especially in patients with persistent CAA (Shah et al., 2015). As a first line of defence, the cell surface-attached extracellular glycocalyx is a major contributor to endothelial cell function and vascular integrity. Endothelial dysfunction is believed to be an early event in atherosclerosis and has been shown in children to be significantly associated with cardiovascular risk factors (Hadi et al., 2005; Medina-Leyte et al., 2021).

In this study we investigated the potential involvement of the endothelial glycocalyx in long-term vascular disease in patients with a history of KD vasculitis. Syndecan-1 and hyaluronan are two main components and surrogate markers for degraded endothelial glycocalyx. We not only compared these two markers between KD patients and healthy controls - we also investigated associations with KD-specific, acute-phase parameters and established cardiovascular risk factors. To the best of our knowledge, these glycocalyx markers have not been investigated in follow-up studies of KD so far.

Syndecan-1, a member of the syndecan proteoglycan family, consists of a substitutable extracellular and a highly conserved transmembrane and cytoplasmic domain (Bemfield et al., 1999). The extracellular domain can be cleft from the cell surface upon glycocalyx injury (Rehm et al., 2007). Previous studies reported elevated syndecan-1 serum levels in relation to general acute and chronic diseases affecting the cardiovascular system such as sepsis, cardiac arrest, and cardiovascular disease (Broekhuizen et al., 2009; Grundmann et al., 2012; Henrich et al., 2010; Kim et al., 2017). Serum syndecan-1 seems to mirror vascular

endothelial damage also during KD's acute phase. Syndecan-1 levels have been significantly higher in KD patients than in healthy and febrile controls, and significantly associated with the presence of CAAs (Luo et al., 2019). We measured syndecan-1 in KD patients specifically after the acute inflammatory state to detect any long-term vascular involvement. Although we observed no syndecan-1 levels in KD differing from controls, syndecan-1 within the KD group was significantly associated with acute-phase blood count levels (revealing a significant positive correlation with the platelet count and negative correlation with haemoglobin levels). The leucocyte count also tended to be positively associated with KD. Blood count anomalies during the acute phase are linked to a more severe disease course, as in our (previously reported) Caucasian KD cohort (Jakob et al., 2018). Thrombocytosis is usually diagnosed in the 2nd to 3rd week of the illness in KD patients (McCord et al., 2017b). Thrombocytes are typically activated through endothelial-cell damage, including the endothelial glycocalyx, exposing sub-endothelial extracellular matrix components (Watson, 2009). One of those is von Willebrand factor (vWF), which we detected correlating positively with thrombocyte counts during KD's acute phase (Jakob et al., 2020).

Hyaluronan, a linear polysaccharide with disaccharide repeats, exhibits a tendency towards higher serum levels in patients with a KD history, although the difference compared to controls was not statistically significant. During the acute phase, hyaluronan levels were found to be significantly elevated in KD patients (as were syndecan-1 levels) in comparison to healthy and febrile controls, with hyaluronan superior in predicting coronary artery lesions (Ohnishi et al., 2019). Unlike syndecan-1, we did not find hyaluronan levels to be associated with the acute-phase parameters we analysed. Importantly, syndecan-1 and hyaluronan are connected differently to the endothelium, have different positions within the glycocalyx (Becker et al., 2015; Gao and Lipowsky, 2010) and are shed by different enzymes and mechanisms (Bogner-Platz et al., 2019; Kornacki et al., 2019). Furthermore, circulating levels of glycocalyx markers also depend on clearance from the circulation (Hahn et al., 2019).

Interestingly, the results from our sensitivity analysis imply that important factors known to impact vascular health, in particular blood pressure and cholesterol, seem to be accountable for higher levels of circulating glycocalyx components in KD patients, but not in the controls.

The mechanisms underlying KD's long-term effects on vascular health still need to be unravelled. Possibly synergistic effects of inflammation, glycocalyx shedding, and cardiovascular risk factors lead to permanent vascular changes. Furthermore, a genetic predisposition seems very likely in view of KD's epidemiology and evidence from genome-wide association studies (Kuo et al., 2016). Indeed, a recent publication linked polymorphisms in the gene encoding for manganese superoxide dismutase to an increased risk for developing KD (Wu et al., 2020). The family of superoxide dismutases is critical for the defence against oxidative stress induced by reactive oxygen species (ROS) (Fukai and Ushio-Fukai, 2011). ROS are increased by all known cardiovascular risk factors including hypercholesterolemia and hypertension, and are considered to play a major role in shedding the endothelial glycocalyx, endothelial dysfunction, and the pathogenesis of arteriosclerosis (Ali et al., 2019; Förstermann et al., 2017; Rubio-Gayosso et al., 2006; Singh et al., 2013). Thus, genetic polymorphisms might not just exacerbate the susceptibility to KD itself, but also to the impact of cardiovascular risk factors in affected patients.

The world is currently experiencing a pandemic caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection (Sars CoV 2). Primarily a respiratory infectious disease, the severity of COVID-19 is attributable to a systemic inflammatory disease that damages both the lungs and multiple organs, including the heart. This systemic form of COVID-19 may be caused by vascular endothelial cell injury (Okada et al., 2020). Severely affected adult COVID-19 patients have presented glycocalyx damage (i.e., thinner glycocalyx) and increased blood levels

of shed glycocalyx biomarkers such as syndecan-1 (Rovas et al., 2021). Fortunately, this infection in children is rarely associated with severe disease (Götzinger et al., 2020). However, in some cases it may lead to a serious inflammatory condition, clinically overlapping with KD, termed pediatric inflammatory multisystem syndrome (PIMS) or multisystem inflammatory syndrome in children (MIS-C). Therefore, damaged endothelial glycocalyx could serve as the missing link in the complex pathogenesis not only of KD, but also of this new COVID-19-associated disease, and certainly warrants further investigation.

5. Strengths and limitations

We assessed circulating syndecan-1 and hyaluronan in this exploratory study - both endothelial-glycocalyx constituents - in patients with KD in comparison to controls of equal age and sex. Patients were evaluated in a standardised manner. Moreover, we collected a considerable amount of data, including specific information on coronary arteries and biochemical parameters. Nevertheless, our results should be interpreted in light of several limitations: Our patient cohort only comprised 31 patients with KD; the age of the study participants and the time that had passed since KD varied considerably; and a relevant number of overall tests were performed but not correcting for multiple testing. Our findings might have been strengthened had we investigated a homogeneous group of KD patients after a specific time interval had passed since KD. A relevant statistical analysis with only three KD patients presenting with persistent CAA was not found to be expedient.

6. Conclusion

This study provides initial data on potential associations between cardiovascular risk factors and circulating glycocalyx biomarkers in the post-acute phase of KD possibly contributing to cardiovascular sequelae in these patients. We hope that our results will encourage future investigations with larger samples to increase our understanding of both the long-term complications associated with KD and its pathogenesis.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2021.104269>.

Abbreviations

AHA	American Heart Association
ASA	Aspirin
BMI	Body mass index
CAA	Coronary artery aneurysms
cIMT	Carotid intima-media roughness
CRP	C-reactive protein
CV	Coefficient of variation
DBP	Diastolic blood pressure
ECG	Electrocardiogram
HDLc	High-density lipoprotein cholesterol
IVIG	Immunoglobulins
KD	Kawasaki disease
LDLc	Low-density lipoprotein cholesterol
MAD	Mean arterial pressure
MIS-C	Multisystem inflammatory syndrome in children
PIMS	Pediatric inflammatory multisystem syndrome
ROS	Reactive oxygen species
SBP	Systolic blood pressure
VLDLc	Very low-density lipoprotein cholesterol
vWF	von Willebrand factor

Funding

AJ received funding by a grant from the Friedrich-Baur-Institut - LMU Klinikum (Munich, Germany) to support this work.

A. Jakob et al.

Microvascular Research 140 (2022) 104269

CRediT authorship contribution statement

André Jakob: Conceptualization, methodology, validation, investigation, resources, writing—original draft preparation, writing—review and editing, supervision.
 Sarah Walter: Conceptualization, methodology, investigation.
 Miriam König: Conceptualization, methodology, investigation.
 Claudia Nussbaum: Conceptualization, methodology, investigation, writing—review and editing.
 Robert Dalla-Pozza: Conceptualization investigation, resources.
 Mathias Herrmann: Conceptualization, investigation, resources.
 Nikolaus A. Haas: Conceptualization, investigation, resources, writing—review and editing.
 Belén Pastor-Villaescusa: Conceptualization, methodology, validation, formal analysis, data curation, investigation, writing—original draft preparation.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

The authors acknowledge the Friedrich-Baur-Stiftung, LMU Klinikum, Munich, Germany for supporting this study. The authors are grateful towards all the children and their parents/guardians for their participation in the study.

References

- Ali, M.M., Mahmoud, A.M., Master, E.Le, Levitan, I., Phillips, S.A., 2019. Role of matrix metalloproteinases and histone deacetylase in oxidative stress-induced degradation of the endothelial glycocalyx. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 316, H647–H663. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00090.2018>.
- Becker, B.F., Jacob, M., Leipert, S., Salmon, A.H.J., Chappell, D., 2015. Degradation of the endothelial glycocalyx in clinical settings: searching for the sheddases. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 80, 389–402. <https://doi.org/10.1111/bcp.12629>.
- Bernfield, M., Götte, M., Park, P.W., Reizes, O., Fitzgerald, M.L., Lincecum, J., Zako, M., 1999. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu. Rev. Biochem.* <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.68.1.729>.
- Bogner-Flatz, V., Braunstein, M., Ocker, L.E., Kusmenkov, T., Tsoheop, J., Ney, L., Böcker, W., Anneck, T., 2019. On-the-scene hyaluronan and syndecan-1 serum concentrations and outcome after cardiac arrest and resuscitation. *Mediat. Inflamm.* 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/6071619>.
- Broekhuizen, L.N., Mooij, H.L., Kastelein, J.J.P., Stroes, E.S.G., Vink, H., Nieuwdoorn, M., 2009. Endothelial glycocalyx as potential diagnostic and therapeutic target in cardiovascular disease. *Curr. Opin. Lipidol.* <https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e3283231b587>.
- Cruz-Chu, E.R., Malafeev, A., Pajarskas, T., Pivkin, I.V., Koumoutsakos, P., 2014. Structure and response to flow of the glycocalyx layer. *Biophys. J.* 106, 232–243. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.09.060>.
- Dallaire, F., Dahdah, N., 2011. New equations and a critical appraisal of coronary artery Z scores in healthy children. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* 24, 60–74. <https://doi.org/10.1016/j.echo.2010.10.004>.
- Forstermann, U., Xia, N., Li, H., 2017. Roles of vascular oxidative stress and nitric oxide in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ. Res.* <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309326>.
- Fukai, T., Ushio-Fukai, M., 2011. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid. Redox Signal.* <https://doi.org/10.1089/ars.2011.3999>.
- Galeotti, C., Bayry, J., Kone-Paut, I., Kaveri, S.V., 2010. Kawasaki disease: aetiopathogenesis and therapeutic utility of intravenous immunoglobulin. *Autoimmun. Rev.* <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2009.12.004>.
- Gao, L., Lipowsky, H.H., 2010. Composition of the endothelial glycocalyx and its relation to its thickness and diffusion of small solutes. *Microvasc. Res.* 80, 394–401. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2010.06.005>.
- Gonzalez Rodriguez, E., Ostrowski, S.R., Cardenas, J.C., Baer, L.A., Tomasek, J.S., Henriksen, H.H., Stensballe, J., Cotton, B.A., Holcomb, J.B., Johanson, P.I., Wade, C.E., 2017. Syndecan-1: a quantitative marker for the endotheliopathy of trauma. *J. Am. Coll. Surg.* 225, 419–427. <https://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2017.05.012>.
- Götzinger, F., Santiago-García, B., Noguera-Julian, A., Lanasa, M., Lancelli, L., Calò Carlucci, F.I., Gabrovská, N., Velizarova, S., Prunk, P., Oeterman, V., Krivec, U., Lo Vecchio, A., Shingalia, D., Soriano-Arandes, A., Melendo, S., Lanari, M., Pierantoni, L., Wagner, N., L'Huillier, A.G., Heining, U., Ritz, N., Bandi, S., Krajcar, N., Roglic, S., Santos, M., Christaens, C., Creuven, M., Buonsenso, D., Weich, S.B., Bogyi, M., Brinkmann, F., Tebruegge, M., Pfefferle, J., Zacharasiewicz, A., Berger, A., Berger, R., Strenger, V., Kohlfürst, D.S., Zschocke, A., Bemar, B., Simma, B., Haberlandt, E., Thir, C., Biehl, A., Vanden Driessche, K., Boiy, T., Van Brusselen, D., Bael, A., Debulpaep, S., Schelstraete, P., Pavic, I., Nygaard, U., Glenthøj, J.P., Heilmann Jensen, L., Lind, I., Tistzenko, M., Uustalu, Ü., Buchtala, L., Thee, S., Kobbe, R., Rau, C., Schwert, N., Barker, M., Tsoia, M., Eleftheriou, I., Gavin, P., Kozłoba, O., Zeigmond, B., Valentini, P., Ivaškevičienė, I., Ivaškevičius, R., Vilc, V., Scholvinck, E., Rojahn, A., Smyrniotis, A., Klingenberg, C., Carvalho, I., Ribeiro, A., Starshinova, A., Solovic, I., Falcón, L., Neth, O., Minguell, L., Bustillo, M., Gutiérrez-Sánchez, A.M., Guarch Ibáñez, B., Ripoll, F., Soto, B., Kötz, K., Zimmermann, P., Schmid, H., Zucol, F., Niederer, A., Buettcher, M., Cetin, B.S., Bilogortseva, O., Chechenyeva, V., Demirjian, A., Shackley, F., McFetridge, L., Speirs, L., Doherty, C., Jones, L., McMaster, P., Murray, C., Child, F., Beuvink, Y., Malwana, N., Whitaker, E., Williams, A., Fidler, K., Bematoniene, J., Song, R., Oliver, Z., Riordan, A., 2020. COVID-19 in children and adolescents in Europe: a multinational, multicentre cohort study. *Lancet Child Adolesc. Health* 4, 653–661. [https://doi.org/10.1016/S2352-4642\(20\)30177-2](https://doi.org/10.1016/S2352-4642(20)30177-2).
- Grundmann, S., Fink, K., Rabadzhieva, L., Bourgeois, N., Schwab, T., Moser, M., Bode, C., Busch, H.J., 2012. Perturbation of the endothelial glycocalyx in post cardiac arrest syndrome. *Resuscitation* 83, 715–720. <https://doi.org/10.1016/j.resuscitation.2012.01.028>.
- Hadji, H.A.R., Carr, C.S., Al Suwaidi, J., 2005. Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome. *Vasc. Health Risk Manag.* 1, 183–190.
- Hahn, R.G., Hasselgren, E., Björne, H., Zdošek, M., Zdošek, J., 2019. Biomarkers of endothelial injury in plasma are dependent on kidney function. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 72, 161–168. <https://doi.org/10.3233/CH-180444>.
- Henrich, M., Gruss, M., Weigand, M.A., 2010. Sepsis-induced degradation of endothelial glycocalyx. *ScientificWorldJournal* 10, 917–923. <https://doi.org/10.1100/tsw.2010.88>.
- Iemura, M., Ishii, M., Sugimura, T., Akagi, T., Kato, H., 2000. Long term consequences of regressed coronary aneurysms after Kawasaki disease: vascular wall morphology and function. *Heart* 83, 307–311. <https://doi.org/10.1136/heart.83.3.307>.
- Jakob, A., Schachinger, E., Klau, S., Lehner, A., Ulrich, S., Stiller, B., Zieger, B., 2020. Von Willebrand factor parameters as potential biomarkers for disease activity and coronary artery lesion in patients with Kawasaki disease. *Eur. J. Pediatr.* 179, 377–384. <https://doi.org/10.1007/s00431-019-03513-6>.
- Jakob, A., von Kries, R., Horstmann, J., Hufnagel, M., Stiller, B., Bemar, R., Schachinger, E., Meyer, K., Obermeier, V., 2018. Failure to predict high-risk Kawasaki disease patients in a population-based study cohort in Germany. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 37, 850–855. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000001923>.
- Jakob, A., Whelan, J., Kordecki, M., Bemar, R., Stiller, B., Arnold, R., von Kries, R., Neumann, E., Roubinis, N., Robert, M., Grohmann, J., Höhn, R., Hufnagel, M., 2016. Kawasaki disease in Germany: a prospective, population-based study adjusted for underreporting. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 35, 129–134. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000000953>.
- Jiang, X.Z., Ventikos, Y., Luo, K.H., 2019. Microvascular ion transport through endothelial glycocalyx layer: new mechanism and improved starting principle. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 317, H104–H113. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00794.2018>.
- Kim, Y.H., Nijst, P., Kiefer, K., Tang, W.H.W., 2017. Endothelial glycocalyx as biomarker for cardiovascular diseases: mechanistic and clinical implications. *Curr. Heart Fail. Rep.* <https://doi.org/10.1007/s11897-017-0320-5>.
- Komacki, J., Würstlein, P., Wender-Ozegowska, E., 2019. Levels of syndecan-1 and hyaluronan in early- and late-onset preeclampsia. *Pregnancy Hypertens.* 18, 108–111. <https://doi.org/10.1016/j.preghy.2019.08.165>.
- Kuo, H., Chang, L.I., S.C., Guo, M.M.H., Huang, Y.H., Yu, H.R., Huang, F.C., Jiao, F., Kuo, Hsing Chun, Andrade, J., Chan, W.C., 2016. Genome-wide association study identifies novel susceptibility genes associated with coronary artery aneurysm formation in Kawasaki disease. *PLoS One* 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154943>.
- Luo, L., Feng, S., Wu, Y., Su, Y., Jing, F., Yi, Q., 2019. Serum levels of syndecan-1 in patients with Kawasaki disease. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 38, 99–94. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000002047>.
- McCordle, B.W., Rowley, A.H., Newburger, J.W., Burns, J.C., Bolger, A.F., Gewitz, M., Baker, A.L., Jackson, M.A., Takahashi, M., Shah, P.B., Kobayashi, T., Wu, M.H., Saji, T.T., Pahl, E., 2017a. Diagnosis, treatment, and long-term management of Kawasaki disease: a scientific statement for health professionals from the American Heart Association. *Circulation* 135, e927–e999. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000484>.
- McCordle, B.W., Rowley, A.H., Newburger, J.W., Burns, J.C., Bolger, A.F., Gewitz, M., Baker, A.L., Jackson, M.A., Takahashi, M., Shah, P.B., Kobayashi, T., Wu, M.H., Saji, T.T., Pahl, E., 2017b. Diagnosis, treatment, and long-term management of Kawasaki disease: a scientific statement for health professionals from the American Heart Association. *Circulation* 135, e927–e999. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000484>.
- Medina-Leyte, D.J., Zepeda-García, O., Dominguez-Pérez, M., González-Garrido, A., Villarreal-Molina, T., Jacobo-Albavera, L., 2021. Endothelial dysfunction, inflammation and coronary artery disease: potential biomarkers and promising therapeutic approaches. *Int. J. Mol. Sci.* <https://doi.org/10.3390/ijms22083850>.
- Miranda, C.H., de Carvalho Borges, M., Schmidt, A., Marin-Neto, J.A., Pazin-Filho, A., 2016. Evaluation of the endothelial glycocalyx damage in patients with acute coronary syndrome. *Atherosclerosis* 247, 184–188. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.02.023>.

A. Jakob et al.

Microvascular Research 140 (2022) 104269

- Newburger, J.W., Takahashi, M., Burns, J.C., 2016. Kawasaki disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2015.12.073>.
- Newburger, J.W., Takahashi, M., Gerber, M.A., Gewitz, M.H., Tani, L.Y., Burns, J.C., Shulman, S.T., Bolger, A.F., Ferrieri, P., Baltimore, R.S., Wilson, W.R., Baddour, L.M., Levison, M.E., Pallasch, T.J., Falace, D.A., Taubert, K.A., 2004. Diagnosis, treatment, and long-term management of Kawasaki disease: a statement for health professionals from the committee on rheumatic fever, endocarditis, and Kawasaki disease, council on cardiovascular disease in the young, American Heart Association. *Pediatrics*. <https://doi.org/10.1542/peds.2004-2182>.
- Ohnishi, Y., Yasudo, H., Suzuki, Y., Furuta, T., Matsuguma, C., Azuma, Y., Miyake, A., Okada, S., Ichihara, K., Ohga, S., Hasegawa, S., 2019. Circulating endothelial glycocalyx components as a predictive marker of coronary artery lesions in Kawasaki disease. *Int. J. Cardiol.* 292, 236–240. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2019.05.045>.
- Okada, H., Yoshida, S., Hara, A., Ogura, S., Tomita, H., 2020. Vascular endothelial injury exacerbates coronavirus disease 2019: the role of endothelial glycocalyx protection. *Microcirculation*. <https://doi.org/10.1111/micc.12654>.
- Rehm, M., Bruegger, D., Christ, F., Conzen, P., Thiel, M., Jacob, M., Chappell, D., Stoekelhuber, M., Weloch, U., Reichart, B., Peter, K., Becker, B.F., 2007. Shedding of the endothelial glycocalyx in patients undergoing major vascular surgery with global and regional ischemia. *Circulation* 116, 1896–1906. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.684852>.
- Reitsma, S., Slaaf, D.W., Vink, H., Van Zandvoort, M.A.M.J., Oude Egbrink, M.G.A., 2007. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflugers arch. Eur. J. Physiol.* <https://doi.org/10.1007/s00424-007-0212-8>.
- Rovas, A., Oziaev, I., Buscher, K., Sacklarn, J., Tepasse, P.R., Fobler, M., Kühn, J., Braune, S., Göbel, U., Thöling, G., Gröschel, A., Pavenstädt, H., Vink, H., Kämpers, P., 2021. Microvascular dysfunction in COVID-19: the MYSTIC study. *Angiogenesis* 24, 145–157. <https://doi.org/10.1007/s10456-020-09753-7>.
- Rubio-Gayosso, I., Platts, S.H., Duling, B.R., 2006. Reactive oxygen species mediate modification of glycocalyx during ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 290 <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00796.2005>.
- Shah, V., Christov, G., Mukasa, T., Brogan, K.S., Wade, A., Eleftheriou, D., Levin, M., Tulloh, R.M., Almeida, B., Dillon, M.J., Marek, J., Klein, N., Brogan, P.A., 2015. Cardiovascular status after Kawasaki disease in the UK. *Heart* 101, 1646–1655. <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2015-307734>.
- Singh, A., Ramnath, R.D., Foster, R.R., Wylie, E.C., Fridén, V., Dasgupta, I., Haraldsson, B., Welsh, G.I., Mathieson, P.W., Satchell, S.C., 2013. Reactive oxygen species modulate the barrier function of the human glomerular endothelial glycocalyx. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055852>.
- Singh, S., Vignesh, P., Burgner, D., 2015. The epidemiology of Kawasaki disease: a global update. *Arch. Dis. Child.* <https://doi.org/10.1136/archdischild-2014-307536>.
- Watson, S., 2009. Platelet activation by extracellular matrix proteins in haemostasis and thrombosis. *Curr. Pharm. Des.* 15, 1358–1372. <https://doi.org/10.2174/138161209787846702>.
- Wu, J., Yu, M., Huang, L., Qian, Y., Kong, M., Kang, Z., Yang, Z., 2020. Association of MnSOD gene polymorphism with susceptibility to Kawasaki disease in Chinese children. *Cardiol. Young* 31, 1–7. <https://doi.org/10.1017/S104795112000356X>.

7. Literaturverzeichnis

1. Jakob A. Kawasaki-Syndrom. *Monatsschr Kinderheilkd* 2016; 164(3):241–56.
2. Ae R, Makino N, Kosami K, Kuwabara M, Matsubara Y, Nakamura Y. Epidemiology, Treatments, and Cardiac Complications in Patients with Kawasaki Disease: The Nationwide Survey in Japan, 2017-2018. *J Pediatr* 2020; 225:23-29.e2.
3. Jakob A, Whelan J, Kordecki M, Berner R, Stiller B, Arnold R et al. Kawasaki Disease in Germany: A Prospective, Population-based Study Adjusted for Underreporting. *Pediatr Infect Dis J* 2016; 35(2):129–34.
4. Dolezalová P, Telekesová P, Nemcová D, Hoza J. Incidence of vasculitis in children in the Czech Republic: 2-year prospective epidemiology survey. *J Rheumatol* 2004; 31(11):2295–9.
5. Lynch M, Holman RC, Mulligan A, Belay ED, Schonberger LB. Kawasaki syndrome hospitalizations in Ireland, 1996 through 2000. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22(11):959–63.
6. Salo E, Griffiths EP, Farstad T, Schiller B, Nakamura Y, Yashiro M et al. Incidence of Kawasaki disease in northern European countries. *Pediatr Int* 2012; 54(6):770–2.
7. Furukawa S, Matsubara T, Jujoh K, Yone K, Sugawara T, Sasai K et al. Peripheral blood monocyte/macrophages and serum tumor necrosis factor in Kawasaki disease. *Clinical Immunology and Immunopathology* 1988; 48(2):247–51.
8. Hirao J, Hibi S, Andoh T, Ichimura T. High levels of circulating interleukin-4 and interleukin-10 in Kawasaki disease. *Int Arch Allergy Immunol* 1997; 112(2):152–6.
9. Kawasaki T. Acute febrile mucocutaneous syndrome with lymphoid involvement with specific desquamation of the fingers and toes in children. *Arerugi* 1967; 16(3):178–222.
10. Newburger JW, Takahashi M, Gerber MA, Gewitz MH, Tani LY, Burns JC et al. Diagnosis, treatment, and long-term management of Kawasaki disease: a statement for health professionals from the Committee on Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease, Council on Cardiovascular Disease in the Young, American Heart Association. *Pediatrics* 2004; 114(6):1708–33.
11. McCrindle BW, Rowley AH, Newburger JW, Burns JC, Bolger AF, Gewitz M et al. Diagnosis, Treatment, and Long-Term Management of Kawasaki Disease: A Scientific Statement for Health Professionals From the American Heart Association. *Circulation* 2017; 135(17):e927-e999.
12. Amano S, Hazama F, Kubagawa H, Tasaka K, Haebara H, Hamashima Y. General pathology of Kawasaki disease. On the morphological alterations corresponding to the clinical manifestations. *Acta Pathol Jpn* 1980; 30(5):681–94.
13. Orenstein JM, Shulman ST, Fox LM, Baker SC, Takahashi M, Bhatti TR et al. Three linked vasculopathic processes characterize Kawasaki disease: a light and transmission electron microscopic study. *PLoS One* 2012; 7(6):e38998.
14. Silva AA, Maeno Y, Hashmi A, Smallhorn JF, Silverman ED, McCrindle BW. Cardiovascular risk factors after Kawasaki disease: a case-control study. *J Pediatr* 2001; 138(3):400–5.
15. Pinto FF, Laranjo S, Paramés F, Freitas I, Mota-Carmo M. Long-term evaluation of endothelial function in Kawasaki disease patients. *Cardiol Young* 2013; 23(4):517–22.

16. Dietz SM, Tacke CEA, Hutten BA, Kuijpers TW. Peripheral Endothelial (Dys)Function, Arterial Stiffness and Carotid Intima-Media Thickness in Patients after Kawasaki Disease: A Systematic Review and Meta-Analyses. *PLoS One* 2015; 10(7):e0130913.
17. Shah V, Christov G, Mukasa T, Brogan KS, Wade A, Eleftheriou D et al. Cardiovascular status after Kawasaki disease in the UK. *Heart* 2015; 101(20):1646–55.
18. Dalla Pozza R, Bechtold S, Urschel S, Kozlik-Feldmann R, Netz H. Subclinical atherosclerosis, but normal autonomic function after Kawasaki disease. *J Pediatr* 2007; 151(3):239–43.
19. Ohnishi Y, Yasudo H, Suzuki Y, Furuta T, Matsuguma C, Azuma Y et al. Circulating endothelial glycocalyx components as a predictive marker of coronary artery lesions in Kawasaki disease. *Int J Cardiol* 2019; 292:236–40.
20. NHLBI NI. What Is Atherosclerosis?; 2022 [cited 2022 Oct 23]. Available from: URL: <https://www.nhlbi.nih.gov/health/atherosclerosis>.
21. Greenland P, Alpert JS, Beller GA, Benjamin EJ, Budoff MJ, Fayad ZA et al. 2010 ACCF/AHA guideline for assessment of cardiovascular risk in asymptomatic adults: executive summary: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation* 2010; 122(25):2748–64.
22. Schmidt-Trucksäss A, Sandrock M, Cheng D, Müller H-M, Baumstark MW, Rauramaa R et al. Quantitative measurement of carotid intima-media roughness--effect of age and manifest coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2003; 166(1):57–65.
23. Dalla Pozza R, Pirzer R, Beyerlein A, Weberruß H, Oberhoffer R, Schmidt-Trucksäss A et al. Beyond intima-media-thickness: Analysis of the carotid intima-media-roughness in a paediatric population. *Atherosclerosis* 2016; 251:164–9.
24. Homma S, Hirose N, Ishida H, Ishii T, Araki G. Carotid plaque and intima-media thickness assessed by b-mode ultrasonography in subjects ranging from young adults to centenarians. *Stroke* 2001; 32(4):830–5.
25. Krebs A, Schmidt-Trucksäss A, Wagner J, Krebs K, Doerfer J, Schwab KO. Adult-like but regressive increase of intima-media thickness and roughness in a child with type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes* 2005; 6(3):161–4.
26. Wu Y, Lu X, Zhang L, Cheng X, Yuan L, Xie M et al. Correlation between carotid intima-media roughness and cardiovascular risk factors. *Exp Ther Med* 2019; 18(1):49–56.
27. Wu Y, Xie M, Zhang L, Lu X, Cheng X, Lv Q. Carotid Intima-Media Roughness and Elasticity in Hypertensive Patients With Normal Carotid Intima-Media Thickness. *J Ultrasound Med* 2019; 38(6):1545–52.
28. Kim Y-H, Nijst P, Kiefer K, Tang WHW. Endothelial Glycocalyx as Biomarker for Cardiovascular Diseases: Mechanistic and Clinical Implications. *Curr Heart Fail Rep* 2017; 14(2):117–26.
29. Reitsma S, Slaaf DW, Vink H, van Zandvoort, Marc A M J, oude Egbrink, Mirjam G A. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflugers Arch* 2007; 454(3):345–59.
30. Rubanyi GM, Romero JC, Vanhoutte PM. Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *The American journal of physiology* 1986; 250(6 Pt 2):H1145-9. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3487253/>.

31. Galeotti C, Bayry J, Kone-Paut I, Kaveri SV. Kawasaki disease: aetiopathogenesis and therapeutic utility of intravenous immunoglobulin. *Autoimmun Rev* 2010; 9(6):441–8.
32. Hadi HAR, Carr CS, Al Suwaidi J. Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome. *Vasc Health Risk Manag* 2005; 1(3):183–98.
33. Ali MM, Mahmoud AM, Le Master E, Levitan I, Phillips SA. Role of matrix metalloproteinases and histone deacetylase in oxidative stress-induced degradation of the endothelial glycocalyx. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2019; 316(3):H647-H663.
34. Förstermann U, Xia N, Li H. Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Circ Res* 2017; 120(4):713–35.
35. Rubio-Gayosso I, Platts SH, Duling BR. Reactive oxygen species mediate modification of glycocalyx during ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290(6):H2247-56.
36. Singh A, Ramnath RD, Foster RR, Wylie EC, Fridén V, Dasgupta I et al. Reactive oxygen species modulate the barrier function of the human glomerular endothelial glycocalyx. *PLoS One* 2013; 8(2):e55852.
37. Miranda CH, Carvalho Borges M de, Schmidt A, Marin-Neto JA, Pazin-Filho A. Evaluation of the endothelial glycocalyx damage in patients with acute coronary syndrome. *Atherosclerosis* 2016; 247:184–8.
38. Gonzalez Rodriguez E, Ostrowski SR, Cardenas JC, Baer LA, Tomasek JS, Henriksen HH et al. Syndecan-1: A Quantitative Marker for the Endotheliopathy of Trauma. *J Am Coll Surg* 2017; 225(3):419–27.
39. Medina-Leyte DJ, Zepeda-García O, Domínguez-Pérez M, González-Garrido A, Villarreal-Molina T, Jacobo-Albavera L. Endothelial Dysfunction, Inflammation and Coronary Artery Disease: Potential Biomarkers and Promising Therapeutical Approaches. *Int J Mol Sci* 2021; 22(8).
40. Broekhuizen LN, Mooij HL, Kastelein JJP, Stroes ESG, Vink H, Nieuwdorp M. Endothelial glycocalyx as potential diagnostic and therapeutic target in cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 2009; 20(1):57–62.
41. Grundmann S, Fink K, Rabadzhieva L, Bourgeois N, Schwab T, Moser M et al. Perturbation of the endothelial glycocalyx in post cardiac arrest syndrome. *Resuscitation* 2012; 83(6):715–20.
42. Henrich M, Gruss M, Weigand MA. Sepsis-induced degradation of endothelial glycocalix. *ScientificWorldJournal* 2010; 10:917–23.
43. Luo L, Feng S, Wu Y, Su Y, Jing F, Yi Q. Serum Levels of Syndecan-1 in Patients With Kawasaki Disease. *Pediatr Infect Dis J* 2019; 38(1):89–94.
44. Dallaire F, Dahdah N. New equations and a critical appraisal of coronary artery Z scores in healthy children. *J Am Soc Echocardiogr* 2011; 24(1):60–74.
45. König M, Ullmann T, Pastor-Villaescusa B, Dalla-Pozza R, Bohlig S, Schmidt-Trucksäss A et al. KD Diagnosis Does Not Increase Cardiovascular Risk in Children According to Dynamic Intima-Media Roughness Measurements. *J Clin Med* 2022; 11(5).

-
46. Rueb K, Mynard J, Liu R, Wake M, Vuillermin P, Ponsonby A-L et al. Changes in carotid artery intima-media thickness during the cardiac cycle - a comparative study in early childhood, mid-childhood, and adulthood. *Vasa* 2017; 46(4):275–81.
47. Jakob A, Bohlig S, König M, Nussbaum C, Dalla-Pozza R, Hermann M et al. Kawasaki disease and increased cardiovascular risk: Is there a link to circulating glyocalyx biomarkers? *Microvasc Res* 2022; 140:104269.

Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei Herrn Prof. Dr. Nikolaus Alexander Haas, Leiter des Instituts für Kinderkardiologie und Pädiatrische Intensivmedizin der Ludwig-Maximilian- Universität München bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen.

Herrn PD Dr. med. André Jakob danke ich besonders für die Themastellung, die hervorragende Betreuung und seine ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft. Auch für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens möchte ich mich herzlich bedanken.

Besonderen Dank auch an die gesamte Arbeitsgruppe, bestehend aus Mitdoktoranden und dem Team der Kinderkardiologischen Ambulanz im Dr. von Haunerschen Kinderspital, für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, viele wertvolle Anregungen und stete Hilfsbereitschaft, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei meinen Eltern und Geschwistern möchte ich mich ganz besonders herzlich bedanken für die uneingeschränkte, liebevolle und vielseitige Unterstützung während meines Studiums, ohne die diese Arbeit so nicht möglich gewesen wäre.