

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

**Untersuchung der Mikrozirkulation und endothelialen Glykokalix bei an Kawasaki-Syndrom erkrankten Kindern, eine Fall-Kontroll-Studie**

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

vorgelegt von  
Sarah Doris Bohlig, geb. Walter

aus Laichingen

2024

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

|   |                                 |
|---|---------------------------------|
| Berichterstatter:                                   | Prof. Dr. Robert Dalla-Pozza    |
| Mitberichterstatter:                                | Prof. Dr. Christoph Reichel     |
| Mitbetreuung durch den<br>promovierten Mitarbeiter: | PD Dr. André Jakob              |
| Dekan:  | Prof. Dr. med. Thomas Gudermann |
| Tag der mündlichen Prüfung:                         | 07.03.2024                      |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Inhaltsverzeichnis</b>   |           |
| <b>Abkürzungsverzeichnis</b>  | <b>5</b>  |
| <b>Abbildungsverzeichnis</b>  | <b>6</b>  |
| <b>Tabellenverzeichnis</b>  | <b>7</b>  |
| <b>Zusammenfassung</b>  | <b>8</b>  |
| <b>Abstract</b>   | <b>9</b>  |
| <b>1. Einleitung</b>  | <b>11</b> |
| 1.1. Das Kawasaki-Syndrom   | 11        |
| 1.2. Mikrozirkulation   | 13        |
| 1.3. Die Glykokalix   | 15        |
| 1.4. Messung der Mikrozirkulation und Glykokalix  | 15        |
| 1.5. Abbauprodukte der Glykokalix   | 16        |
| 1.6. Zielsetzung  | 17        |
| <b>2. Material und Methodik</b>   | <b>19</b> |
| 2.1. Studiendesign und Patientenauswahl   | 19        |
| 2.2. Methodik   | 25        |
| SDF-Technik   | 25        |
| Messung der Glykokalix  | 26        |
| Messung der Mikrozirkulation  | 28        |
| Versuchsaufbau  | 28        |
| Blutentnahme  | 30        |
| Enzyme-linked Immunsorbent Assay (ELISA)  | 30        |
| <b>3. Auswertung</b>  | <b>32</b> |
| 3.1. Glykokalix   | 32        |
| 3.2. Mikrozirkulation   | 32        |
| 3.3. ELISA  | 34        |
| <b>4. Statistik</b>   | <b>35</b> |
| <b>5. Ergebnisse</b>  | <b>36</b> |
| 5.1. Vergleich klinischer Daten von Patienten und Kontrollen  | 36        |
| 5.2. Analysen zur Detektion von Unterschieden zwischen Patienten und Kontrollen im Bereich der Mikrozirkulation | 38        |
| 5.3. Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen im Bereich der Glykokalix                                   | 39        |
| 5.4. Einfluss einer koronaren Beteiligung auf den Gefäßstatus bei KS-Patienten                                  | 40        |
| 5.5. Korrelation zwischen Messwerten der Mikrozirkulation / Glykokalix und klinischen Daten aus der Akutphase   | 42        |
| 5.6. Untersuchung von Glykokalixabbauprodukten im Serum zur Bewertung einer Glykokalixbeteiligung beim KS       | 43        |
| 5.7. Untersuchung von Akutfällen während der Studienlaufzeit  | 48        |
| <b>6. Diskussion</b>  | <b>50</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>6.1. Diskussion der Ergebnisse .....</b>  | <b>50</b> |
| <b>Klinische Daten.....</b>  | <b>50</b> |
| <b>Beeinträchtigung der Mikrozirkulation durch das KS - Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen .....</b>                 | <b>51</b> |
| <b>Endotheliale Mikrozirkulation in Zusammenhang mit dem KS - Beurteilung anhand von Veränderungen der Glykokalixdicke .....</b> | <b>52</b> |
| <b>Einfluss einer koronaren Beteiligung auf die vaskuläre Situation bei KS-Patienten .</b>                                       | <b>53</b> |
| <b>Zusammenhang der klinischen Daten aus der Akutphase mit Messungen im Langzeitverlauf .....</b>                                | <b>54</b> |
| <b>Glykokalixbestandteile als Marker einer Beeinträchtigung der vaskulären Situation - .....</b>                                 | <b>55</b> |
| <b>Syndecan-1 und Hyaluronsäure .....</b>  | <b>55</b> |
| <b>Untersuchungen in Bezug auf ein kardiovaskuläres Risiko durch das KS .....</b>  | <b>56</b> |
| <b>Beteiligung der Glykokalix und Mikrozirkulation in der Akutphase des KS .....</b>   | <b>59</b> |
| <b>6.2. Diskussion der Methodik.....</b>   | <b>60</b> |
| <b>Geräte und Technik .....</b>  | <b>60</b> |
| <b>Messung der Mikrozirkulation mittels AVA.....</b>   | <b>60</b> |
| <b>Messung der Glykokalix mittels GlycoCheck .....</b>   | <b>62</b> |
| <b>Messung von Glykokalixabbauprodukten mittels ELISA.....</b>   | <b>63</b> |
| <b>Studiendesign und Patientenkollektiv.....</b>   | <b>63</b> |
| <b>7. Ausblick _____</b>   | <b>64</b> |
| <b>8. Anhang _____</b>   | <b>65</b> |
| <b>8.1. Patienten-/Elterninformation Patientengruppe .....</b>   | <b>65</b> |
| <b>8.2. Patienten-/Elterninformation Kontrollgruppe.....</b>   | <b>68</b> |
| <b>8.3. Fragebogen.....</b>  | <b>71</b> |
| <b>8.4. Ethikantrag .....</b>  | <b>73</b> |
| <b>9. Literaturverzeichnis _____</b>   | <b>81</b> |
| <b>10. Danksagung _____</b>  | <b>86</b> |
| <b>11. Publikationen _____</b>   | <b>87</b> |
| <b>12. Eidesstattliche Versicherung _____</b>  | <b>88</b> |

## Abkürzungsverzeichnis

|             |  |
|-------------|--|
| AK          | Antikörper   |
| AVA         | Automated Vascular Analysis  |
| BMI         | Body Mass Index  |
| CCD         | Charge-coupled Device  |
| CRP         | C-reaktives Protein  |
| ELISA       | Enzyme-linked Immunsorbent Assay   |
| ESPED       | Erhebungseinheit für seltene pädiatrische Erkrankungen                           |
| GOT         | Glutamat-Oxalacetat-Transaminase   |
| HA          | Hyaluronsäure  |
| Hb          | Hämoglobin   |
| HDL         | High Density Lipoprotein   |
| ICD-        | International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems |
| IVIG        | Intravenöse Immunglobuline   |
| KS          | Kawasaki Syndrom   |
| LDL         | Low Density Lipoprotein  |
| LMP         | luminale myofibroblastische Proliferation  |
| LMU         | Ludwig-Maximilians-Universität   |
| LPA         | Lipoprotein a  |
| MAD         | Mittlerer Arterieller Druck  |
| MFI         | Microvascular flow index   |
| MW          | Mittelwert   |
| NO          | Stickstoffmonoxid  |
| OPS         | Orthogonal Polarization Imaging  |
| P50         | mediane Breite der Erythrohytensäule   |
| PBR         | Perfused Boundary Region   |
| pro BNP     | B-type natriuretic Peptide   |
| RAD         | aktueller Rotorradius [mm]   |
| RBC-Filling | Red Blood Cell filling in %  |
| RCF         | Relative Zentrifugalkraft  |
| SD          | Standardabweichung   |
| SDC-1       | Syndecan-1   |
| SDF         | Sidestream Darkfield Imaging   |
| TNF         | Tumor Nekrose Faktor   |
| TVD         | Total Vessel Density   |
| VLDL        | Very Low Density Lipoprotein   |
| VS          | Vessel Surface   |

## Abbildungsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Abbildung 1: Evaluation bei vermutetem inkomplettem KS .....  | 22 |
| Abbildung 2: Zusammensetzung der Studienpopulation .....  | 23 |
| Abbildung 3: MicroScan Imaging Element mit Schutzkappe .....  | 25 |
| Abbildung 4: Schematische Darstellung der SDF-Messung .....   | 26 |
| Abbildung 5: Schematische Veranschaulichung der Perfused Boundary Region (PBR) .....  | 27 |
| Abbildung 6: Versuchsaufbau der Mikrozirkulationsmessung mit Messsonde (1),<br>Batterieeinheit (2), Analog-zu-Digital Umwandler (Canopus ADVC110) (3) und Laptop (4) ..   | 29 |
| Abbildung 7: Versuchsaufbau der Glykocheckmessung mit Messsonde (1), Batterieeinheit<br>(2) und Bildschirm / PC (3) .....   | 29 |
| Abbildung 8: Pearson Korrelationsanalyse zwischen systolischem Blutdruck und<br>Hyaluronkonzentration in gemeinsamer Kohorte aus Patienten und Kontrollen, $p = 0.009$ , $r =$<br>$0.381$ . .....                       | 47 |
| Abbildung 9: Pearson Korrelationsanalyse zwischen LDL/HDL-Quotient und<br>Hyaluronkonzentration in gemeinsamer Kohorte aus Patienten und Kontrollen, $p = 0.029$ , $r =$<br>$0.365$ . .....                             | 47 |
| Abbildung 10: Pearson Korrelationsanalyse zwischen dem Mikrovaskulären Flow Index (MFI)<br>und der SDC-1-Konzentration in einer gemeinsamen Kohorte aus Patienten und Kontrollen,<br>$p = 0.024$ , $r = -0.339$ . ..... | 48 |

## Tabellenverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Tabelle 1: Klinische Daten von Patienten und Kontrollen zum Studienzeitpunkt.....                           | 36 |
| Tabelle 2: Klinische Daten der Patienten aus der Akutphase.....   | 37 |
| Tabelle 3: Blutfettwerte der Patienten und Kontrollen .....   | 38 |
| Tabelle 4: Ergebnisse Mikrozirkulation, univariate Analyse .....  | 39 |
| Tabelle 5: Ergebnisse Mikrozirkulation, multivariate Analyse.....   | 39 |
| Tabelle 6: Ergebnisse Glykokalix, univariate Analyse .....  | 40 |
| Tabelle 7: Ergebnisse Glykokalix, multivariate Analyse .....  | 40 |
| Tabelle 8: Gruppenvergleich koronare Beteiligung und Gefäßstatus beim KS.....                               | 41 |
| Tabelle 9: Vergleich von Patienten mit koronarer Beteiligung .....  | 42 |
| Tabelle 10: Assoziation von Messwerten der Mikrozirkulation und Glykokalix mit<br>Akutphaseparametern ..... | 43 |
| Tabelle 11: Vergleich der Konzentrationen von SDC-1 und HA.....   | 44 |
| Tabelle 12: Korrelation zwischen Laborparametern der Akutphase und<br>Glykokalixabbauprodukten .....        | 45 |
| Tabelle 13: Korrelationsanalyse zwischen Glykokalixabbauprodukten und metabolischen<br>Parametern .....     | 46 |
| Tabelle 14: Korrelation Glykokalixabbauprodukte und Messdaten.....  | 48 |
| Tabelle 15: Klinische Daten Akutfälle .....   | 49 |
| Tabelle 16: Messergebnisse Akutfälle .....  | 49 |

## Zusammenfassung

Bei dem zu den systemischen Vaskulitiden im Kindesalter zählenden Kawasaki-Syndrom handelt es sich um ein inflammatorisches Geschehen mit bislang noch unbekannter Ursache. Neben den im Rahmen der Erkrankung auftretenden koronaren Aneurysmen sind die vaskulären Folgen durch inflammatorische Prozesse im Krankheitsverlauf vor allem im Langzeit-Follow-up bislang nur wenig erforscht.

In unserer Studie untersuchten wir Patienten im Langzeitverlauf nach stattgehabtem Kawasaki-Syndrom auf Veränderungen des peripheren vaskulären Status, im Speziellen auf Veränderungen der Mikrozirkulation und der endothelialen Glykokalix. Als Vergleichsgruppe diente eine alters- und geschlechtskonforme Kontrollgruppe. Die Messungen der Mikrozirkulation erfolgten mit der Methodik der SDF-Messung über ein videomikroskopisches Verfahren. Die endotheliale Glykokalixdicke wurde mit dem System von GlycoCheck ermittelt. Außerdem untersuchten wir die Seren von Patienten und Kontrollen auf Auffälligkeiten in den Konzentrationen von Glykokalixabbauprodukten. Zusätzlich zogen wir Laborwerte beider Gruppen und klinische Daten der Akutphase der Patienten für die Auswertung hinzu.

Die Ergebnisse der Analysen für die Mikrozirkulation und endotheliale Glykokalix im Vergleich von Patienten- und Kontrollgruppe ergaben keine signifikanten Unterschiede. Jedoch konnten wir in einer multivariaten Regressionsanalyse einen Zusammenhang zwischen klinischen Werten aus der Akutphase und Daten der Mikrozirkulationsmessung finden. Dabei stellten wir einen Einfluss der Fieberdauer auf die Gefäßdurchmesser der Mikrozirkulation fest. Diese Veränderung entsteht vermutlich durch das inflammatorische Geschehen auf vaskulärer Ebene im Rahmen der Erkrankung an dem KS. Wir untersuchten die Patientengruppe auf Unterschiede des vaskulären Status abhängig von dem Vorhandensein koronarer Veränderungen im Krankheitsverlauf, konnten aber keine Hinweise auf Unterschiede finden. Auch bei den Glykokalixabbauprodukten Syndecan-1 und Hyaluron zeigten sich keine signifikanten Differenzen zwischen den Konzentrationen in der Patienten- und Kontrollgruppe. Hingegen konnten wir in weiteren Analysen signifikante Korrelationen von Glykokalixabbauprodukten und kardiovaskulären Risikoparametern feststellen, unabhängig von einer Erkrankung an KS. Dabei zeigte sich ein Zusammenhang zwischen Hyaluron und systolischen Blutdruckwerten als auch mit dem LDL/HDL-Quotienten der Lipidwerte. Für SDC-1 konnten wir einen signifikanten Zusammenhang mit der mikrovaskulären Flussgeschwindigkeit (MFI) feststellen. Bei der Betrachtung der Daten der während des Studienzeitraums gemessenen Patienten in der Akutphase zeigten sich Veränderungen der Mikrozirkulation bei den Patienten im akuten Verlauf im Vergleich mit Patienten im Langzeit-Follow-up. Zur besseren Einschätzung eines kardiovaskulären Risikos

der KS-Patienten analysierten wir die beiden Gruppen auf Unterschiede bei den Lipidwerten. Es zeigten sich sowohl erhöhte Triglyceridwerte als auch ein erhöhter LDL/HDL-Quotient bei den Patienten.

Insgesamt konnten wir keinen direkten Unterschied zwischen der Patienten- und Kontrollgruppe hinsichtlich der Mikrozirkulation und endothelialen Glykokalix finden. Allerdings zeigten einzelne Analysen Hinweise auf ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko bei Patienten nach einer KS-Erkrankung, vor allem bei Patienten mit einem schweren Krankheitsverlauf.

## **Abstract**

The Kawasaki disease (KD), which belongs to the family of general vasculitides in childhood, is an inflammatory event with a so far unknown cause. In addition to the coronary aneurysms that occur as part of the disease, the vascular anomalies caused by inflammatory processes during the disease, especially in the long-term follow-up, have been researched very little up to now.

In our study, we investigated changes in the peripheral vascular status in the long-term course after Kawasaki disease, including in particular changes in the microcirculation and the endothelial glycocalyx. A control group matching in age and gender served for comparison. The measurements of the microcirculation were carried out using the methodology of the SDF measurement by a video-microscopic method. The thickness of the endothelial glycocalyx was assessed utilizing the GlycoCheck system. Moreover, we examined the sera of patients and controls for abnormalities in the concentrations of glycocalyx biomarkers. Additionally, we used blood samples from both groups as well as clinical characteristics from the acute phase of the patients for the evaluation.

Comparing patients and controls with respect to the microcirculation and endothelial glycocalyx, did not result in any significant differences. However, in a multivariate regression analysis, we were able to find a correlation of clinical characteristics from the acute phase and data from the measurement of the microcirculation. We found out that the duration of the fever influences the lumen diameter of the microcirculation. This change presumably arises from the inflammatory events at the vascular level during the KD. We assessed differences of the vascular status of patients depending on the existence of coronary artery lesions during the disease, but could not find any. The concentrations of the glycocalyx biomarkers syndecan-1 and hyaluronan were not significantly different among patients and controls. However, we were able to identify significant correlations of glycocalyx biomarkers and parameters associated with a cardiovascular risk, regardless of a KD. There was a

connection between hyaluronan and systolic blood pressure as well as with the LDL/HDL quotient of the lipid values. For SDC-1, there was a significant correlation with the microvascular flow index (MFI). When looking at the data of the patients which were in the acute phase during the study period, changes in the microcirculation were present for patients in the acute phase in contrast to patients in the long-term follow-up. To better assess cardiovascular risk of KD patients, we analyzed the two groups for differences in lipid values. Patients had both increased triglyceride values and an increased LDL/HDL quotient.

In general, we could not find any clear difference between the patient and control groups with respect to microcirculation and the endothelial glycocalyx. However, individual analyzes indicated an increased cardiovascular risk of patients after KD, especially in case of a severe course of the disease.

## **1. Einleitung**

### **1.1. Das Kawasaki-Syndrom**

Das Kawasaki-Syndrom (KS), auch bezeichnet als mukokutanes Lymphknotensyndrom, ist eine seltene, im Kindesalter auftretende Krankheit unbekannter Ätiologie [1]. Erstmals beschrieben wurde das zu den Vaskulitiden zählende KS im Jahr 1967 von dem japanischen Arzt Dr. T. Kawasaki [2]. Neben Purpura Schönlein-Henoch ist das KS die häufigste systemische Vaskulitis im Kindesalter und betrifft hauptsächlich Kinder unter fünf Jahren [3]. Als Hauptsymptom gilt hohes Fieber, welches über mindestens fünf Tage anhält. Weitere diagnostisch wichtige Symptome sind Lymphadenopathie, Exanthem, Enanthem mit Beteiligung der Schleimhäute, Konjunktivitis und Schwellung beziehungsweise Rötung der Extremitäten [2, 4]. Treten nicht alle der aufgelisteten Symptome auf, wird das Krankheitsbild als inkomplettes KS bezeichnet. Patienten mit der Diagnose eines inkompletten Kawasaki-Syndroms sind meist jünger als Patienten mit komplettem KS [3]. In Industrienationen ist das KS der häufigste Grund einer Herzerkrankung im Kindesalter. Es wird aber weltweit von Kawasaki-Fällen berichtet [5]. Da sich die Inflammation auf vaskulärer Ebene in vielen Fällen an den Koronararterien manifestiert, kann es ohne Behandlung in 15-25 % der Fälle als gefürchtete Komplikation zu Koronaraneurysmen und anderen Gefäßveränderungen kommen [1, 6]. Dadurch steigt die Morbidität- und Mortalitätsrate des KS. Allerdings kann das Risiko der Entwicklung eines Koronaraneurysmas durch eine Therapie in Form von intravenöser Gabe von Immunglobulinen (IVIG) in der Akutphase auf weniger als 5 % reduziert werden [6]. Dabei hängt die kardiale Langzeitprognose von dem Ausmaß der Beteiligung der Koronararterien im Verlauf der Erkrankung ab. Besonders gefährdet bezüglich der Ausbildung von Veränderungen an den Koronararterien sind Kinder, die in ihrem ersten Lebensjahr am KS erkranken [7]. Als weitere Behandlungsmöglichkeit zur IVIG wird Acetylsalicylsäure aufgrund der antithrombozytären und antiinflammatorischen Wirkung empfohlen [5]. Zusätzlich wird über die Gabe von Kortikosteroiden diskutiert. Studien zeigen eine deutliche Verringerung kardialer Komplikationen durch eine frühe Steroidtherapie, vor allem bei Patienten, die nicht auf die IVIG-Gabe ansprechen [4, 8].

### **Vaskuläre Langzeitfolgen**

In verschiedenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass es sowohl zu kardialen als auch zu nicht kardialen pathologischen Vorgängen im Akutstadium und im Langzeitverlauf nach einem akuten Kawasaki-Syndrom kommen kann. Festgestellt wurden zum Beispiel neben einem gestörten Lipidstoffwechsel auch eine endotheliale Dysfunktion [9, 10]. Eine Beeinflussung peripherer Gefäße und der Mikrozirkulation ist bisher vor allem in der

Akutphase des Kawasaki-Syndroms nachgewiesen worden. Die genaue Pathogenese ist jedoch bislang noch nicht ausreichend geklärt. Vorstellbar ist ein ähnlicher pathologischer Prozess wie bei den Veränderungen der Koronargefäße. Inwieweit eine systemische Entzündungsreaktion beim KS auch im Langzeitverlauf zu pathologischen Veränderungen der peripheren Gefäße und der Mikrozirkulation führt, ist jedoch bisher noch unklar. Eine Studie zur Untersuchung der Mikrozirkulation der Retina bei Patienten, die mindestens zwei Jahre zuvor an KS erkrankt waren, zeigte erste Hinweise auf periphere Veränderungen der Mikrozirkulation durch die systemische Vaskulitis [11]. Zudem konnte in einer weiteren Studie zum KS durch eine Untersuchung mit dynamischer Kapillaroskopie eine morphologische Veränderung der Mikrozirkulation sowohl in der afebrilen Phase als auch in der Zeit der Rekonvaleszenz festgestellt werden [12]. Genauere Untersuchung zur Mikrovaskularisation in Bezug auf das KS wurden allerdings bisher kaum durchgeführt. Speziell zu Veränderungen der endothelialen Glykokalix liegen bislang nur wenige Forschungsergebnisse vor. Darum befasst sich die vorliegende Studie mit der Fragestellung, ob es im Verlauf des KS in Folge der systemischen Vaskulitis zu messbaren Veränderungen der Mikrozirkulation und der endothelialen Glykokalix kommt. Mittels eines Videomikroskops wurde die Schleimhaut sublingual dargestellt und zusätzlich Abbauprodukte der Glykokalix im Serum der Patienten bestimmt. Dadurch konnte die Mikrozirkulation auf eventuelle Veränderungen untersucht und die Glykokalixdicke evaluiert werden.

Ziel des Forschungsvorhabens war es, mehr über die Auswirkungen des KS auf den Langzeitverlauf, damit verbundene Risiken und die dahinterstehenden pathophysiologischen Mechanismen, auch auf periphere Gefäße, zu erfahren. Weitergehend sollte durch die Studie überprüft werden, ob eventuelle mikrozirkulatorische Veränderungen als Parameter für das Follow-Up dienen können und die angewandte Methodik neue Therapiemöglichkeiten eröffnet.

## 1.2. Mikrozirkulation

### Aufbau und Aufgaben

Das Blutgefäßsystem des Menschen umfasst eine Gesamtlänge von 20000-40000 km. Damit besitzt es ungefähr die Länge des Erdumfangs. Die innere Oberfläche beträgt ca. 1000 m<sup>2</sup>. Unterteilt wird das Gefäßsystem in die Makrozirkulation (Arterien und Venen) und in die Mikrozirkulation (Arteriolen, Kapillaren, Venolen). Zur Mikrozirkulation gehören somit alle Blutgefäße mit einem Durchmesser von maximal 150 µm [13]. Als Teil der Endstrombahn fällt der Mikrozirkulation als Hauptaufgabe der Austausch zwischen Blut und Interstitium zu [14]. Dazu gehört sowohl der Gasaustausch als auch die Verteilung von Nährstoffen, der Abtransport von Stoffwechselprodukten und der Wärmetransport. Zudem erfolgt über die Mikrozirkulation die Regulation der Leukozytenadhäsion und -migration. Außerdem spielt sie eine Rolle bei der Kontrolle der Gerinnungshomöostase. Alle diese Aufgaben werden größtenteils von dem Gefäßendothel, welches als Zellmonolayer die gesamte innere Oberfläche der Gefäße auskleidet, gesteuert [15]. Dabei erfolgt, ausgehend von den Endothelzellen, eine Regulierung der Steuerung des regionalen Gefäßtonus, der Blutgerinnung, in Entzündungsprozessen und beim Gefäßwachstum [16].

### Regulation und Störungen

Als Grenzfläche zwischen Blut und Gewebe nimmt das vaskuläre Endothel eine zentrale Rolle in der Homöostase ein. Die physiologische Aufgabe der Endothelzellen ist die Adhäsion von Leukozyten und Thrombozyten an den Gefäßwänden. Kommt es im Verlauf einer Entzündungsreaktion, vermittelt durch proinflammatorische Zytokine, zur Bildung und Expression von Endothelzelladhäsionsmoleküle, führt dies zu einer Adhäsion von Leukozyten und infolgedessen zu deren Migration in das Gewebe [13, 17]. Eine weitere essenzielle Aufgabe der Mikrozirkulation ist die Kontrolle der Gefäßpermeabilität. Verschiedene Mediatoren wie beispielsweise Histamin, Serotonin und Leukotrien sowie die Komplementfaktoren C3 und C5 können zu einer Hyperpermeabilität durch Erweiterung der interzellulären Spalten führen. Durch den Einfluss von Zytokinen wie zum Beispiel Interleukin-1 (IL-1), Tumor-Nekrose-Faktor-(TNF-)  $\alpha$  und Interferon- (IFN-)  $\gamma$ , kommt es zu einer Reorganisation des Zytoskeletts infolge von Endothelzellkontraktionen. Daraus resultiert ebenfalls eine Hyperpermeabilität der Gefäße [13]. Bei der Beurteilung der Mikrovaskularisation spielt die endotheliale Glykokalix eine große Rolle, da als Folge der Zerstörung und Schädigung der Glykokalix eine endotheliale Dysfunktion entstehen kann [18].

## **Bedeutung der Krankheitsentstehung**

Um Gewebe ausreichend mit Nährstoffen und Sauerstoff zu versorgen, ist eine intakte Mikrozirkulation unabdingbar. Zu einer Störung der Mikrozirkulation kann es sowohl im Rahmen von verschiedenen akuten als auch chronischen Krankheiten kommen. Im Falle von systemischen Entzündungsreaktionen wie der Sepsis, nach durchgemachter Operation an der Herz-Lungen-Maschine, aber auch im Rahmen einer schweren Atherosklerose ist die Funktion der Mikrozirkulation beeinträchtigt. Die zugrunde liegenden Ursachen für die Veränderungen der Mikrozirkulation sind noch nicht vollständig geklärt. Ein Zusammenhang mit einer endothelialen Dysfunktion und einer Veränderung der Dicke der Glykokalix wird jedoch angenommen [19].

In Folge der systemischen Inflammation im Rahmen einer Erkrankung an dem Kawasaki-Syndrom kann es zu Veränderungen der peripheren Mikrozirkulation kommen. Diese Annahme basiert auf der Beobachtung, dass es im Rahmen einer systemischen Inflammation auch zu pathologischen Vorgängen in vielen anderen Organen und Geweben kommen kann. Klinisch ersichtlich wird dies durch Befunde im Rahmen einer Erkrankung an dem KS wie Hepatitis, interstitielle Pneumonie, Diarrhoe, Gallenblasenhydrops, Myokarditis und Lymphadenopathie [5]. Bei der Entwicklung von Koronaraneurysmen scheinen drei pathologischen Prozessen im Mittelpunkt zu stehen. Dazu gehört die nekrotisierende Arteriitis, eine subakute und chronische Vaskulitis sowie eine luminale myofibroblastische Proliferation (LMP) [20]. Da vor allem die chronische Vaskulitis und die LMP über Monate und Jahre persistieren können, spielt die Beobachtung und das Follow-Up der Patienten im Langzeitverlauf des KS eine große Rolle. Pathologische Auffälligkeiten der peripheren Gefäße konnten Jahre nach durchgemachtem KS, auch bei Patienten ohne Koronarbeteiligung im Akutstadium, bisher in mehreren Studien nachgewiesen werden [21]. Inwieweit diese auch im Langzeitverlauf noch vorhanden und messbar sind, sollte in der vorliegenden Studie untersucht werden.

### **1.3. Die Glykokalix**

Die endotheliale Glykokalix besteht aus einem Netzwerk von Proteoglykanen, Glykoproteinen, Glykosaminoglykanen und assoziierten Plasmaproteinen. Sie kleidet das gesamte Gefäßsystem aus [22]. Die Glykokalix stellt die Grenzschicht zwischen dem Blutstrom und dem Endothel dar und reguliert dadurch die Permeabilität der Gefäßwand. Zudem beeinflusst sie die rheologischen Eigenschaften der Mikrozirkulation, dient als Sensor für Schubspannung und übt antiadhäsive und vaskuloprotektive Effekte aus [23]. Bei jedem gesunden Gefäß bildet das Netzwerk der Glykokalix eine endotheliale Schicht an der Oberfläche, welche einen direkten Kontakt von Zellen des Blutes mit der Gefäßoberfläche verhindert [24, 25]. Dies gelingt, indem aufgrund der negativen Ladung der Zuckerreste andere negativ geladene Teilchen aus dem Blut abgestoßen und auf Distanz gehalten werden [26]. Dadurch ist die endotheliale Glykokalix ständig den durch den Blutfluss entstehenden mechanischen Kräften ausgesetzt. Die Reaktion der Endothelzellen auf diese hämodynamischen Kräfte haben großen Einfluss auf die Homöostase des zirkulatorischen Systems [27]. Die Dicke der endothelialen Glykokalix beträgt in physiologischem Zustand ca. 0,2-2 µm, abhängig von dem jeweiligen Gefäßtyp [22, 25]. Durch enzymatische Wirkungen und Einlagerung von Proteinen befindet sich die Glykokalix in einem ständigen Auf- und Abbau. Die Glykokalix spielt eine zentrale Rolle in der Organisation der Aufgaben der Mikrozirkulation. Ihre Funktion besteht vor allem darin, eine Barriere für die Adhäsion von Plättchen und inflammatorischen Zellen an der Zellwand zu schaffen und die Erreichbarkeit von Lipiden und Proteinen zu begrenzen. Außerdem ist die Glykokalix bei der Transduktion von hämodynamischen Stimuli an das Endothel beteiligt und dadurch auch an der Regulation der Produktion von Stickstoffmonoxid. Somit führt eine Schädigung der Glykokalix zu einer gestörten endothelialen Funktion. Diese zeigt sich in einer Aktivierung von Inflammation und Koagulation, dem Austritt von Flüssigkeiten und Proteinen aus den Gefäßen als auch in einer verminderten Bioverfügbarkeit von NO [28]. Zudem konnte in verschiedenen Studien nachgewiesen werden, dass die Integrität der Glykokalix mit pathophysiologischen Vorgängen bei Atherosklerose in Zusammenhang steht [29, 30]. Dabei wurde festgestellt, dass ein Verlust der Intaktheit der endothelialen Glykokalix mit atherogenetischen Risikofaktoren wie Hyperglykämie, Hyperlipidämie und Nikotin korreliert [31-34].

### **1.4. Messung der Mikrozirkulation und Glykokalix**

Eine intakte Mikrozirkulation ist essenziell um das Gewebe ausreichend mit Nährstoffen und Sauerstoff zu versorgen und um den Austausch zwischen Blut und Gewebe sicherzustellen. Treten Störungen der Mikrozirkulation auf, liegt die Ursache meist in der Folge einer

schweren Systemerkrankung wie beispielsweise der Sepsis oder Ischämie [35]. Damit therapeutisch eingegriffen werden kann, ist es wichtig, Veränderungen der Mikrozirkulation zu erkennen. Bei der Beurteilung der Mikrozirkulation ist die Betrachtung der endothelialen Glykokalix von großer Bedeutung. Ihr genauer Aufbau ist in Absatz 1.3 beschrieben. Eine endotheliale Dysfunktion entsteht als Resultat der Zerstörung beziehungsweise dem Abbau, dem sogenannten Shedding, der Glykokalix und der infolgedessen entstandenen höheren Permeabilität der Gefäßwand [18].

Durch die Möglichkeit der frühzeitigen Detektion von Störungen der Gefäßperfusion ist die Untersuchung der Mikrozirkulation in den Fokus der medizinischen Diagnostik gerückt. Die Visualisierung der Mikrozirkulation ermöglicht eine nicht invasive Darstellung von sowohl physiologischen als auch pathologischen Vorgängen im Gefäßsystem und damit verbundenen Krankheitsverläufen. Als nicht invasive und einfach einsetzbare Methoden bieten das Orthogonal Polarization Imaging (OPS) und das verbesserte Nachfolgesystem Sidestream Darkfield Imaging (SDF) eine Möglichkeit zur Darstellung der Mikrozirkulation, die gerade auch bei Kindern sehr gut eingesetzt werden kann. Neben der Darstellung der Mikrozirkulation ist mit Hilfe der SDF-Messung auch eine indirekte Quantifizierung der mikrovaskulären Glykokalixdicke möglich [36, 37]. In Bezug auf verschiedene Erkrankungen, bei denen ebenfalls eine vaskuläre Beteiligung vermutet wurde, konnte diese Methode erfolgreich angewandt werden. Durch die Untersuchung mittels der SDF-Technik konnten beispielsweise bei Kindern mit Typ-1-Diabetes wichtige Hinweise auf Veränderungen der Mikrozirkulation und der endothelialen Glykokalix gefunden werden, bevor es zu klinisch ersichtlichen vaskulären Komplikationen kam [38]. Ebenso ist es möglich, bei verschiedenen anderen Systemerkrankungen wie der Sepsis [35] und der familiären Hypercholesterinämie [39] sowie bei Herztransplantationen von Kindern [40] Veränderungen der endothelialen Glykokalix festzustellen. Dabei scheint in der Pathogenese vor allem eine chronische Inflammation eine entscheidende Rolle zu spielen [41].

### **1.5. Abbauprodukte der Glykokalix**

Bisher bekannt ist, dass es durch eine Schädigung, dem sogenannten Shedding, der Glykokalix zu einem erhöhten Spiegel an zirkulierenden Glykokalixbestandteilen im Blut kommt. Hierzu gehören unter anderem Syndecan-1, Heparansulfat und Hyaluron [25, 42-44]. Der zu Grunde liegende Mechanismus ist dabei eine Aktivierung spezifischer abbauender Enzyme wie beispielsweise Hyaluronidase und Heparinase. Diese Aktivierung erfolgt durch pro-inflammatorische Mediatoren wie dem Tumor Nekrose Faktor (TNF) alpha [45]. Eine Schädigung endothelialer Zellen steht im Zusammenhang mit der Aktivierung des Immunsystems in der Akutphase des KS durch die zirkulierenden Zytokine und

Entzündungsmediatoren, hauptsächlich in kleinen und mittelgroßen Arterien [46, 47]. Hinweise dazu, dass es in der Akutphase des Kawasaki- Syndroms zu nachweisbaren Veränderungen der Glykokalixbestandteile im Blut kommt, liefern bereits einzelne Studien [46, 48]. Beispielsweise wurden in einer Studie spezielle Abbauprodukte der Glykokalix im Blut in der Akutphase, der subakuten Phase und der Konvaleszenzphase analysiert. Es zeigten sich signifikante Veränderungen, insbesondere im Vergleich von Patienten mit Koronaraneurysmen und denjenigen Patienten, die keine Veränderungen der Herzkranzgefäße aufwiesen [48]. Am bedeutendsten scheinen die beiden Glykokalixbestandteile Syndecan-1 und Hyaluron zu sein. Bei Syndecan-1 handelt es sich um ein auf der Glykokalix von endothelialen Zellen exprimiertes Strukturprotein [46]. Syndecan-1 wurde in der Vergangenheit bereits in vielen Bereichen wie beispielsweise bei der Sepsis [49], dem akutem Koronarsyndrom [50] und dem Lupus Erythematoses [51] zur Evaluierung endothelialer Aktivität und Schädigung angewandt.

Hyaluron gehört wie auch Syndecan-1 zur Gruppe der Glykosaminoglykane und spielt eine wichtige Rolle bei der Regulierung von Entzündungsreaktionen und Reparationsmechanismen der endothelialen Glykokalix. Es besteht ein enger Zusammenhang zwischen einer Schädigung der endothelialen Glykokalix, einer Veränderung der Hyaluronsäurenkonzentration und einer endothelialen Dysfunktion. Dieser Zusammenhang konnte bei verschiedenen Pathogenesen wie Dyslipidämie, Hypertension und Diabetes festgestellt werden [52]. Auch bei einer Infektion mit COVID-19 scheint die HA eine bedeutende Rolle zu spielen. Aufgrund einer Entzündungsreaktion kann es zu einer Ansammlung von HA in den Lungenalveolen kommen, wodurch das Risiko einer Hypoxämie und eines respiratorischen Versagens steigt [53, 54].

Veränderungen der Glykokalixbestandteile im Blut scheinen auch im Langzeitverlauf nach akutem KS nachweisbar zu sein [46]. So war es möglich, in einer Studie deutlich erhöhte Werte zirkulierender endothelialer Zellen und Mikropartikel auch noch Jahre nach akutem KS nachzuweisen [55]. Neben der Glykokalix selbst sollten in unserer Studie durch eine unabhängige Analyse auch Abbauprodukte der Glykokalix im Blut analysiert werden.

## **1.6. Zielsetzung**

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit erfolgten im Rahmen einer groß angelegten Studie. Insgesamt wurden mehrere Aspekte einer vaskulären Beteiligung beim KS untersucht. Dabei wurden zum Einen Messungen der IMR der Carotis Interna und dadurch die großen und mittelgroßen Gefäße auf Auffälligkeiten untersucht [56]. In unserer Studie lag der Fokus auf der Mikrozirkulation. Dabei wurden sowohl Messungen des mikrozirkulatorischen Flusses mittels SDF-Technik sublingual durchgeführt als auch die

Dicke der endothelialen Glykokalix mit der Methodik von GlycoCheck im Follow-Up bei Kindern mit stattgehabtem KS gemessen. Da im Zusammenhang mit Veränderungen der Glykokalix auch Abbauprodukte der Glykokalix eine große Rolle spielen, wurde in der Patienten- und Kontrollgruppe Blut abgenommen und die Seren tiefgefroren. Die Analysen der Blutseren mittels ELISA erfolgten in Zusammenarbeit mit der in diesem Bereich geschulten Mitarbeiterin Belen Pastor. Die Ergebnisse der Daten hierzu sind bereits durch eine Zweitautorenschaft publiziert [57]. Um die Daten der vorliegenden Studie zu komplementieren und den wichtigen Aspekt der Glykokalixabbauprodukte nicht außer Acht zu lassen, wurden die Ergebnisse der Untersuchungen mittels ELISA mit in diese Arbeit aufgenommen.

In der vorliegenden Fall-Kontroll-Studie gingen wir folgenden Fragestellungen nach:

- Haben Patienten mit durchgemachtem Kawasaki-Syndrom im Vergleich zu gesunden Kontrollkindern eine nachweisbare Veränderung der Mikrozirkulation und/oder der endothelialen Glykokalix?
- Korrelieren die Daten der Mikrozirkulation und der Glykokalix
  - A) mit den erhobenen klinischen Daten aus der Akutphase des Kawasaki-Syndroms
  - B) mit kardiovaskulären Risikofaktoren
- Können bei Patienten nach durchgemachtem KS Auffälligkeiten im Bereich der Glykokalixabbauprodukte gemessen werden? Gibt es dabei einen Zusammenhang mit den Ergebnissen der Mikrozirkulations- und Glykokalixmessungen?
- Weisen Patienten in der Akutphase Veränderungen der Mikrozirkulation / endothelialen Glykokalix und/oder erhöhte Glykokalixabbauprodukte im Serum auf?

## **2. Material und Methodik**

### **2.1. Studiendesign und Patientenauswahl**

Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um eine Fall-Kontroll-Studie. Dabei wurden verschiedene Fragestellungen beleuchtet (siehe 1.6).

Versuchsgruppen:

- Kinder / Adoleszente / Erwachsene nach durchgemachtem KS
- Alters- und geschlechtskonforme Kontrollgruppe

Ausschlusskriterien Patienten:

- Fehlende Einwilligung zur Studienteilnahme
- Widerruf der Einwilligung
- Patienten mit ICD-10 kodiertem KS, die aber aktuell geltende internationale Diagnosekriterien nicht erfüllten

Ausschlusskriterien Kontrollprobanden:

- Kardiale, vaskuläre, onkologische, infektiologische, rheumatologische, neurologische oder endokrine (z.B. Diabetes Mellitus) Vorerkrankungen
- Akute Erkrankungen

### **Biometrie**

Bezüglich Mikrozirkulation bzw. mikrovaskulärer Glykokalixdicke haben Voruntersuchungen an Erwachsenen gezeigt, dass bei vergleichenden Fragestellungen eine Gruppengröße von ca. 17 Probanden notwendig war, um einen Unterschied in der mikrovaskulären Glykokalixdicke von 0.2  $\mu\text{m}$  (entspricht ~25-30 % der Gesamtdicke) zwischen zwei Untersuchungsgruppen nachweisen zu können [43].

In dem vorliegenden Forschungsvorhaben wurden vergleichende Untersuchungen zwischen der Patientengruppe und der Kontrollgruppe durchgeführt. In der Patientengruppe waren 45 Kinder in die Studie integriert, in der Kontrollgruppe 36. Die statistische Analyse der Daten erfolgte nach Abschluss der Rekrutierung und Auswertung der Daten.

## **Studienort**

Die Untersuchungen wurden in der Abteilung für Kinderkardiologie und Pädiatrische Intensivmedizin an der Kinderklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital, Kinderklinik und Kinderpoliklinik der LMU München, Lindwurmstraße 4, 80337 München, durchgeführt.

## **Patientenkollektiv**

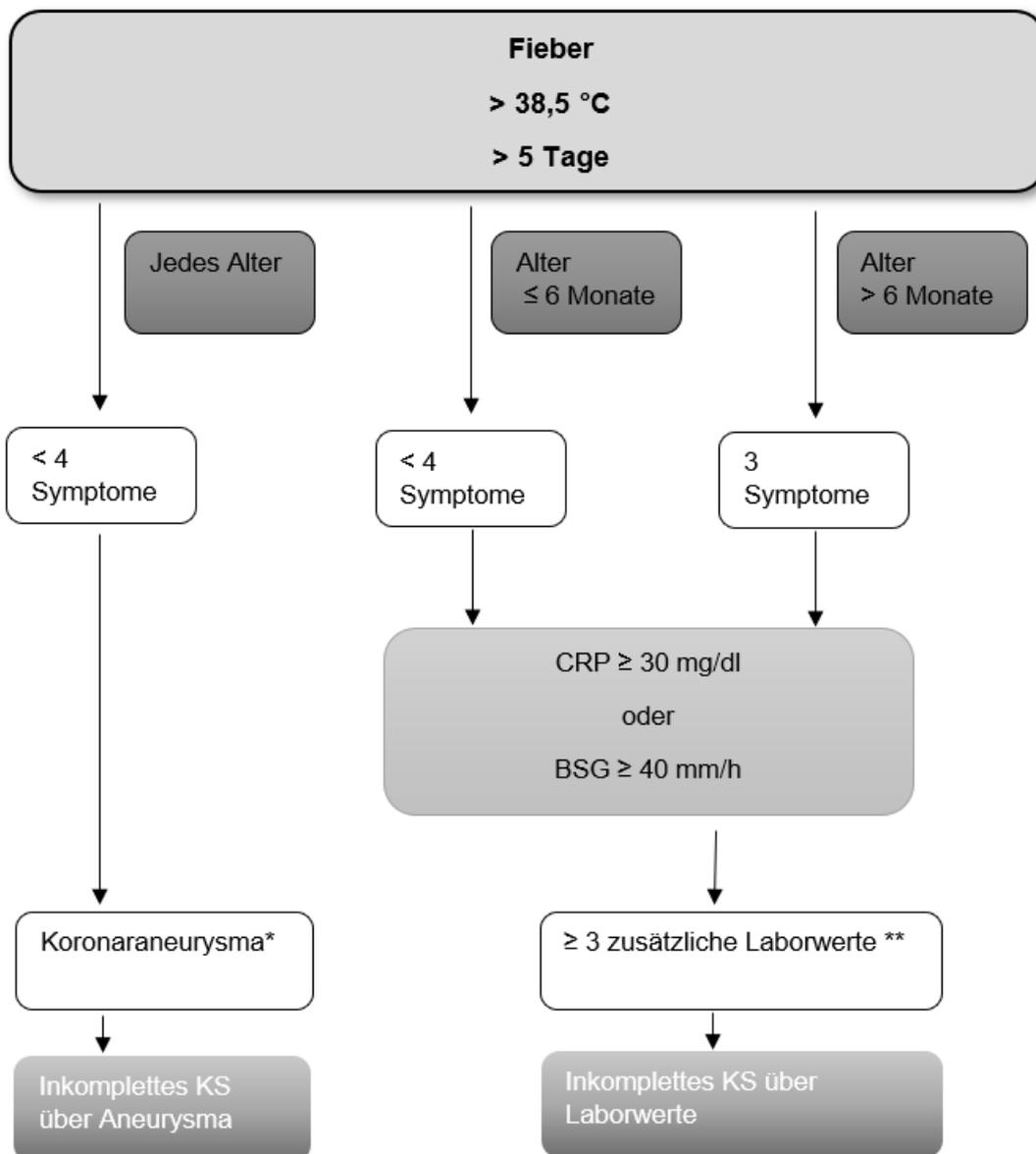
Das in der vorliegenden Studie untersuchte Patientenkollektiv wurde über unterschiedliche Wege rekrutiert. Der Großteil der Patienten wurde aus dem Patientenpool der Ambulanz für Kinderkardiologie im Dr. von Haunerschen Kinderspital rekrutiert. Ein kleinerer Teil der Patienten stammt aus dem Pool der Erhebungseinheit für seltene pädiatrische Erkrankungen (ESPED). Als weitere Rekrutierungsmöglichkeit nutzten wir eine Facebook-Gruppe, in der sich Eltern von Patienten und Erwachsene, die selbst als Kind an Kawasaki-Syndrom erkrankt waren, über die Krankheit austauschten.

Die Rekrutierung über den Pool der LMU umfasste  $n = 125$  Patienten, die im Zeitraum von 2004 bis 2017 an der LMU vorstellig waren und über die ICD-10 Codierung als Kawasaki-Patienten diagnostiziert wurden. Alle  $n = 125$  Patienten wurden nach einem standardisierten Fragebogen (siehe Anhang 8.3) mit Angaben aus der Akutphase der Erkrankung aufgearbeitet. Die Abfragekriterien des Fragebogens basierten auf den Diagnosekriterien der internationalen Leitlinien, echographischen Untersuchungen, Therapie und Outcome des KS und waren angelehnt an den Fragebogen der ESPED Studie [5]. Dadurch konnte die Diagnose des KS verifiziert werden. Außerdem wurde durch die Fragebögen eine Untersuchung auf eine Assoziation von krankheitsspezifischen Faktoren aus der Akutphase und unseren Messergebnissen ermöglicht. Anschließend an die Auswertung des Fragebogens wurden Patienten ausgeschlossen, die nach international geltenden Kriterien nicht an KS erkrankt waren. Dadurch reduzierte sich die Anzahl möglicher Studienteilnehmer über den LMU Pool auf  $n = 76$  Patienten. Die dabei angewandten Kriterien zur Diagnose eines kompletten beziehungsweise inkompletten KS sind in Abbildung 1 dargestellt [6]. Die in Frage kommenden Studienteilnehmer erhielten postalisch ein Anschreiben über unser Forschungsvorhaben mit der Bitte, sich telefonisch in unserer Ambulanz zu melden, um einen Termin zu vereinbaren. Über diesen Weg konnten wir  $n = 31$  Patienten untersuchen und die Daten in die Auswertung einschließen. Die Erhebungseinheit für seltene Erkrankungen in Deutschland (ESPED) ermöglichte das Einladen weiterer Patienten. Im Rahmen dieser Bundesweiten Studie wurden in den Jahren 2011-2014 alle Kliniken in Deutschland angehalten, diagnostizierte KS-Fälle zu melden. In der Nähe von München wohnende Patienten identifizierten wir mittels Postleitzahlen und konnten darüber  $n = 23$

Patienten zu unserer Studie einladen. Davon erklärten sich  $n = 6$  Patienten bereit zur Studienteilnahme. Durch Rekrutierung über die Facebook-Gruppe war es möglich nach der Evaluation anhand der gleichen Kriterien wie für den LMU-Pool beschrieben,  $n = 8$  weitere Patienten in die Studie einzuschließen. Insgesamt konnten  $n = 31 + 6 + 8 = 45$  Patienten rekrutiert und untersucht werden. Die genaue Aufstellung der Studienpopulation ist in Abbildung 2 veranschaulicht.

Zusätzlich zu den bisher beschriebenen Patienten untersuchten wir diejenigen Kawasaki-Fälle, die während der Messphase der Studie im Dr. von Haunerschen Kinderspital in der akuten Krankheitsphase vorstellig wurden. Dabei erfüllten  $n = 6$  Patienten die diagnostischen Kriterien und konnten erfolgreich im akuten Krankheitsverlauf untersucht werden. Ein Patient verstarb bevor die Messungen durchgeführt werden konnten.

## Diagnostische Kriterien



**Abbildung 1: Evaluation bei vermutetem inkomplettem KS**

Quelle: In Anlehnung an Newburger, J.W., et al., 2004. 110(17): p. 2747-71

\*Koronaraneurysma:  
Aneurysma oder mind. 3 der folgenden Auffälligkeiten:  
Perikoronare Echogenitätserhöhung  
Mitralklappeninsuffizienz  
Perikarderguss  
Verschlechterung der myokardialen Funktion

\*\* Laborkriterien, mind. 3 Kriterien müssen vorliegen:  
Altersspezifische Anämie  
Leukozytose > 15.000/ $\mu$ l  
Thrombozytose > 450.000/ $\mu$ l  
Hypalbuminämie < 3g/dl  
Anstieg der GOT  
Leukozyturie > 10/ $\mu$ l  
[6]

## Zusammensetzung Studienpopulation

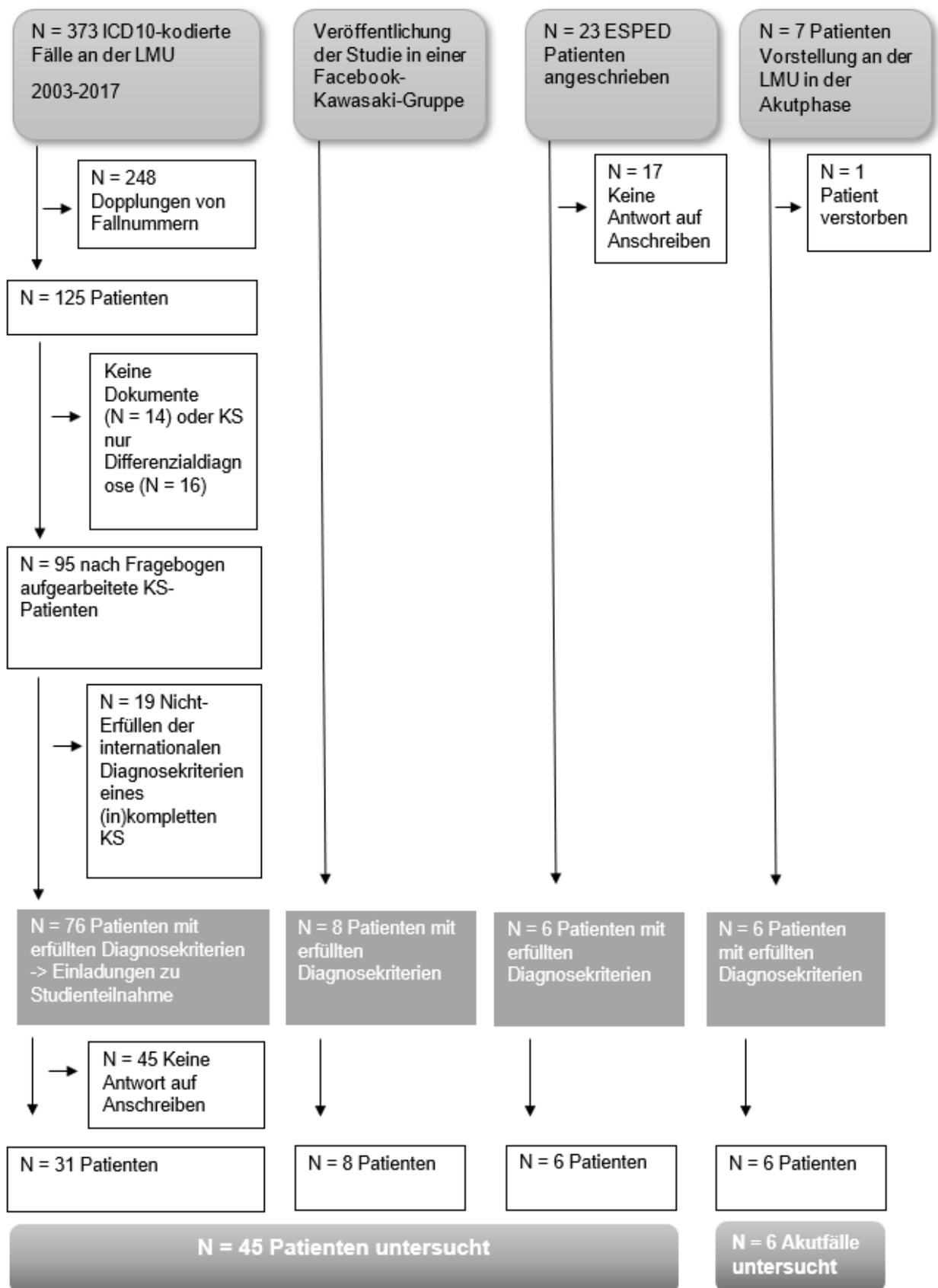


Abbildung 2: Zusammensetzung der Studienpopulation

## **Kontrollgruppe**

Um ein alters- und geschlechtskonformes gesundes Kontrollkollektiv zu erhalten, wurden die Patienten gebeten, zur Untersuchung eine/n gleichaltrige/n und gleichgeschlechtliche/n Freundin/Freund mitzubringen. Über diesen Weg konnten bei n = 21 Kontrollprobanden die Untersuchungen erfolgen. Zudem wurden Kontrollen aus Freundes- und Bekanntenkreisen ohne Vorerkrankung in die Studie eingeschlossen. Als Ausschlusskriterien galten bei den Kontrollprobanden kardiologische, onkologische, infektiologische, rheumatologische, neurologische oder endokrine (z.B. Diabetes Mellitus) Vorerkrankungen. Insgesamt konnten wir eine Kontrollgruppe mit n = 36 Kindern untersuchen. Es wurden in der Kontrollgruppe die gleichen Untersuchungen wie auch in der Patientengruppe durchgeführt.

## **Einverständniserklärung**

Die Ethikkommission der Ludwigs-Maximilians-Universität München hat die Datenerhebung und die Durchführung der Untersuchungen in dem Antrag Nr. 17-692 vom 30.11.2017 genehmigt. Eine Einverständniserklärung (siehe 8.1) zur Teilnahme an der Studie und Veröffentlichung der Daten in anonymisierter Form wurden von mindestens einem Elternteil und, wenn im einwilligungsfähigen Alter, auch vom Patienten oder Kontrollprobanden unterzeichnet.

## **Messzeitpunkte**

Da es sich bei der vorliegenden Studie um eine Untersuchung des Langzeitverlaufs handelte, wurden die Messungen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Akutphase der Erkrankung des Kawasaki-Syndroms durchgeführt. Zusätzlich wurden bei Patienten, die während der Laufzeit der Studie akut an Kawasaki-Syndrom erkrankten, die Messungen durchgeführt und als gesonderte Gruppe ausgewertet.

## **Klinische Daten**

Anhand des Fragebogens (siehe Anhang 9.6), der für jeden Patienten ausgefüllt wurde, hatten wir alle relevanten klinischen Daten der Akutphase vorliegen. Beispielsweise bestand so die Möglichkeit, eine Beteiligung der Koronararterien und Laborwerte in die Auswertung mit einzubeziehen. Zudem wurde zum Zeitpunkt der Untersuchung das aktuelle Gewicht, die Körpergröße und das Alter abgefragt.

## 2.2. Methodik

### SDF-Technik

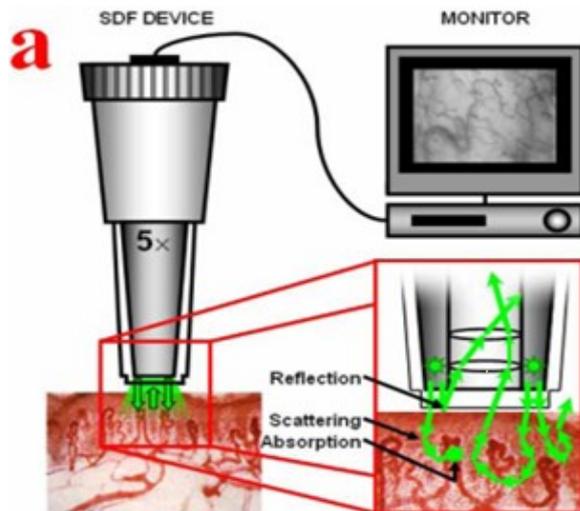
Die Visualisierung der Mikrozirkulation und die Evaluation der endothelialen Glykokalix erfolgte mittels Sidestream Darkfield Imaging (SDF). Dabei handelt es sich um ein portables Videomikroskop (MicroScan; Microvision Medical, Amsterdam, Niederlande) mit 5-fachem Linsensystem und damit einer 380-fachen Vergrößerung (siehe Abbildung 3). Über das Mikroskop wurde polarisiertes grünes Licht der Wellenlänge 530 nm (Absorptionsmaximum von Hämoglobin) emittiert. Das Licht wurde von tiefliegenden Gewebeschichten in dem zu untersuchenden Gewebe reflektiert, wogegen es vom Hämoglobin in den Erythrozyten absorbiert wurde. Dadurch konnte ein bewegtes Bild der Blutgefäße aufgezeichnet werden. In dem Bild wurden die Gefäße durch die Absorption von Hämoglobin dunkel und durch Lichtreflektion die umliegenden Gewebestrukturen hell dargestellt (siehe Abbildung 4). Durch Verstellen des „Charge-coupled Device“ (CCD)-Chips gegen das feste Linsensystem konnte die Tiefenschärfe angepasst werden.



**Abbildung 3: MicroScan Imaging Element mit Schutzkappe**

Quelle: Eigene Aufnahme

Das Mikroskop wurde über eine MicroScan Battery Unit mit Strom versorgt und war mit dieser über ein Verbindungskabel verbunden. Die Battery Unit wurde vor jeder Messung über ein Stromkabel aufgeladen.



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der SDF-Messung**

Quelle: Goedhart et al., Opt. Express 2007

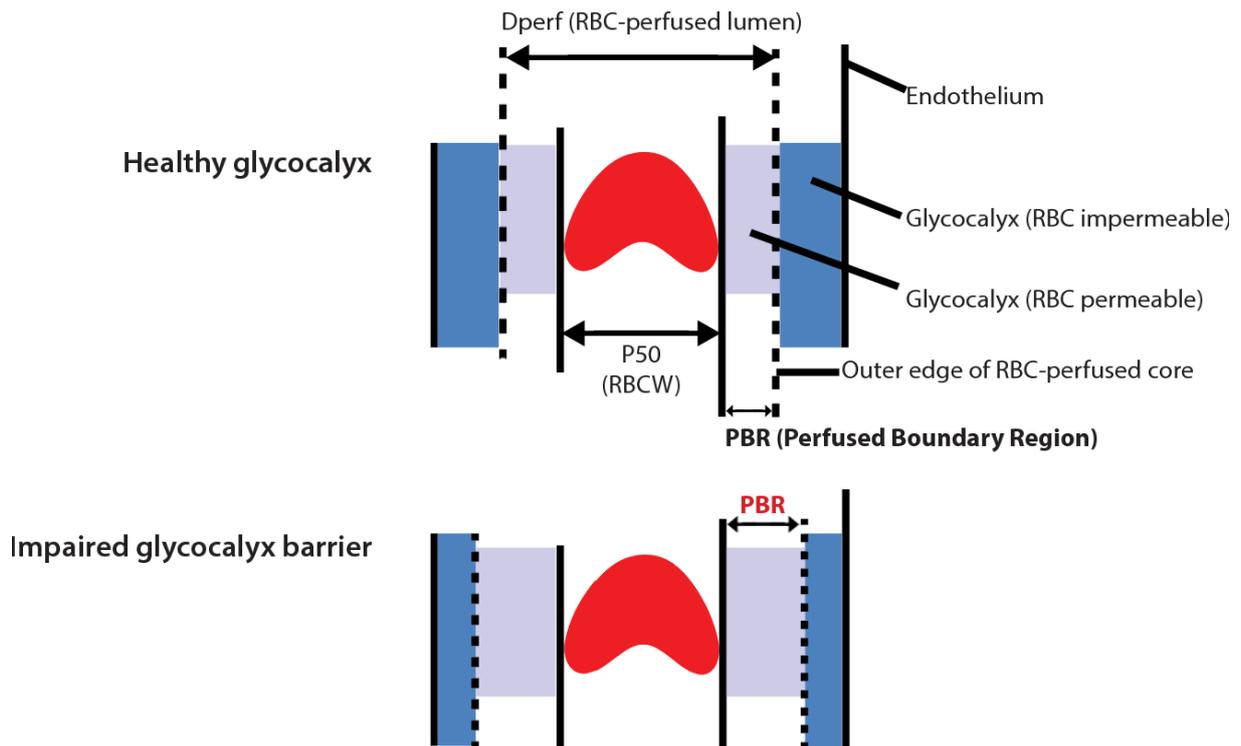
Die Bilderfassung mittels SDF war zum Zeitpunkt der Studie die neueste Methode zur Darstellung der Mikrozirkulation. Sie zeichnete sich durch eine einfache und nicht invasive Technik, verbunden mit niedrigen Kosten und hoher Sensitivität, aus [58].

Die Messung wurde am liegenden oder sitzenden Patienten sublingual und ohne Strahlenbelastung durchgeführt. Da es sich bei den Akutfällen vorwiegend um Säuglinge handelte, erfolgte in diesen Fällen die Messung an der Ohrmuschel. Bei älteren Kindern ist dies aufgrund der zunehmenden Hautdicke nicht mehr möglich. Die Dauer der Untersuchung betrug pro Patient 10-15 Minuten. Um eine Übertragung von pathogenen Keimen zu verhindern, wurden die vom Hersteller angebotenen sterilen Schutzkappen, sogenannte MicroScan Disposable Lenses, verwendet. Die Technologie zur Messung der Mikrozirkulation mittels SDF wurde schon in verschiedenen Studien angewandt und dabei relevante Ergebnisse aufgezeichnet. Aufgrund der nicht invasiven und einfachen Anwendung eignete sich diese Methodik besonders gut, um bei Kindern die Mikrozirkulation und die mikrovaskuläre Glykokalixdicke zu beurteilen [37, 38, 59, 60].

### **Messung der Glykokalix**

Grundlage der Glykokalixmessung ist die Beobachtung, dass es in der Blutsäule der Gefäße zu permanenten Durchmesser-schwankungen aufgrund von intermittierendem Eindringen von Erythrozyten in die oberste Schicht der Glykokalix kommt. Der Raum, in dem sich die Erythrozyten bewegen, wird als Perfused Boundary Region (PBR) bezeichnet. Bei intakter Glykokalix ist es den Erythrozyten nicht möglich in tiefe Schichten vorzudringen. Kommt es zu einer Schädigung und folglich zu einem Abbau der Glykokalix, können die Erythrozyten

tiefer vordringen, wodurch sich die PBR erweitert. Damit kann über die PBR indirekt die Glykokalixdicke bestimmt werden. Hierfür wird die Differenz des maximalen und mittleren Durchmessers der Erythrozytensäule berechnet. Da der maximale Durchmesser der Erythrozytensäule bei einer Schädigung der Glykokalix größer wird, nimmt folglich auch die PBR zu (siehe Abbildung 5). Die Dicke der mikrovaskulären Glykokalix steht sowohl in enger Beziehung mit dem systemischen Volumen der Glykokalix als auch mit kardiovaskulären Risikofaktoren [33].



**Abbildung 5: Schematische Veranschaulichung der Perfused Boundary Region (PBR)**

P50: stellt den mittleren Durchmesser der Erythrozytensäule dar, Dperf: maximaler Durchmesser der Erythrozytensäule. PBR beschreibt die Differenz von Dperf und P50. Die Differenz nimmt bei Schädigung der Glykokalix zu, dargestellt in der unteren Abbildung.

Quelle: Van Teeffelen and Vink – Glycocheck™ - Whitepaper, 2012

Die Messung der Glykokalixdicke war einfach und schnell durchzuführen. Außerdem wurde sie nicht durch die Kompetenz und Erfahrung des Anwenders beeinflusst. Eine standardisierte Methodik ermöglichte die Messung von über 30000 Gefäßsegmenten der sublingualen Mikrozirkulation und eine Einschätzung der Intaktheit der Glykokalix von Mikrogefäßen mit Durchmessern zwischen 5 und 25  $\mu\text{m}$ . Dadurch stellte diese Methode eine sehr gute Reproduzierbarkeit dar [22, 24, 33]. Aufgrund dessen wurde sie von der Europäischen Gesellschaft der kardiologischen Arbeitsgruppen an peripherer Zirkulation zur Beurteilung der endothelialen Funktion empfohlen [34].

## **Messung der Mikrozirkulation**

Zur Beurteilung der Mikrozirkulation wurden bei jedem Patienten mehrere Videosequenzen mit der Dauer von 10 Sekunden über die Software Automated Vascular Analysis (AVA; Version 3.2, University of Amsterdam, Niederlande) aufgenommen. Dabei wurden die Grundeinstellungen individuell vorgenommen. Um die Anzahl der Pixel pro  $\mu\text{m}$  festzulegen, erfolgte eine Kalibrierung mit Mikrometerpapier. Für die vorliegende Arbeit fand eine Eichung in horizontaler Richtung auf 1,465 Pixel/ $\mu\text{m}$  und vertikal auf 1,338 Pixel/ $\mu\text{m}$  statt. Außerdem wurden die Gefäße anhand ihres Durchmessers klassifiziert. Die Einteilung erfolgte in kleine ( $<10 \mu\text{m}$ ), mittlere ( $10\text{-}25 \mu\text{m}$ ) und große ( $>25 \mu\text{m}$ ) Gefäße. Anschließend wurden verschiedene Parameter berechnet. Dazu gehörte unter anderem die Total Vessel Density (TVD), welche definiert ist als die gesamte Länge der Gefäße (mm) geteilt durch die Beobachtungsfläche ( $\text{mm}^2$ ). Als weiterer Parameter wurde die Verteilung der Gefäßdurchmesser berechnet. Dabei wurde der prozentuale Anteil an kleinen, mittleren und großen Gefäßen an der Gesamtgefäßlänge beschrieben. Zusätzlich wurde die Fläche berechnet, als der Bereich, der mit Gefäßen bedeckt. Diese wurde in das Verhältnis zum gesamten analysierten Bildabschnitt gesetzt. Zur Berechnung der Parameter wurden die Aufnahmen der sublingualen Mikrozirkulation in vier Quadranten eingeteilt. Anschließend wurde für jeden Quadranten die jeweilige dominante Flusscharakteristik berechnet. Die Einteilung erfolgte in keinen Fluss (0), unterbrochener Fluss (1), sehr langsamer Fluss (2), konstanter Fluss (3). Daraus wurde der Mean Flow Index (MFI) als Durchschnitt der vier Quadranten berechnet.

## **Versuchsaufbau**

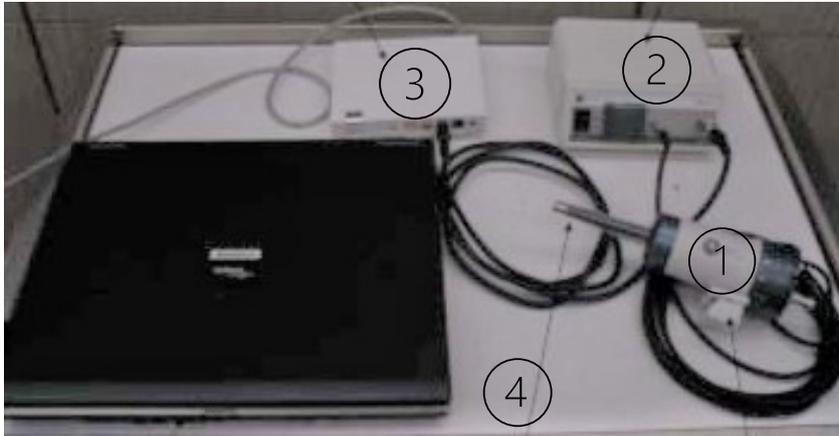
Zur Darstellung der Mikrozirkulation und Glykokalix wurde das MicroScan Video Microscope System® der Firma MicroVisionMedical (Amsterdam, Niederlande) angewandt.

Bei dem MicroScan® Mikroskop handelt es sich um ein handgeführtes Videomikroskop mit LED-Beleuchtung. Zur Visualisierung in vivo wurde die Technik des Sidestream Dark Field (SDF) Imaging verwendet. Die zur Messung notwendigen Geräte waren das Mikroskop (MicroScan Imaging Unit®) und die dazugehörige Batterieeinheit.

### Mikrozirkulation

Über einen Analog-zu-Digital-Umwandler (Canopus ADVC110, Thomson Inc dba Grass Valley, Kobe, Japan) wurden die aufgenommenen Bildsequenzen in das „Auto Video Interleaved®“ Format übertragen. Zur Darstellung und anschließenden offline Analyse wurden die Videosequenzen auf dem Bildschirm des Computers (Fujitsu Lifebook, Modell E-

8310, Fujitsu Siemens GmbH) über einen Videoausgang aufgezeichnet und auf einer externen Festplatte gespeichert. Dabei hatten die Bilder eine Auflösung von ca. 1 Pixel (näherungsweise 1  $\mu\text{m}$ ) und die Größe der dargestellten Bildfläche betrug etwa 0,94 mm x 0,75 mm. Der Aufbau der Messung ist in Abbildung 6 dargestellt.

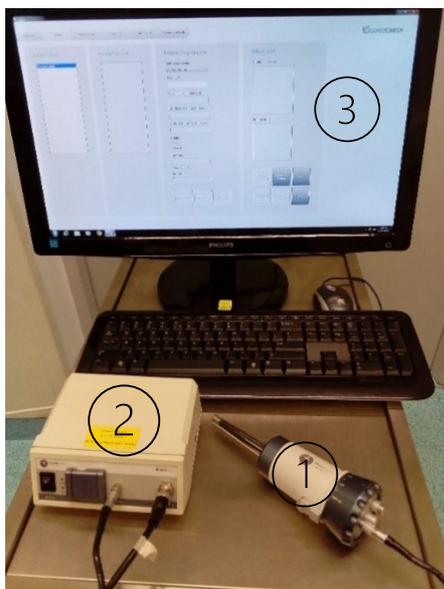


**Abbildung 6: Versuchsaufbau der Mikrozirkulationsmessung mit Messsonde (1), Batterieeinheit (2), Analog-zu-Digital Umwandler (Canopus ADVC110) (3) und Laptop (4)**

Glykokalix

Die Messung der Dicke der Glykokalix erfolgte über das Programm GlycoCheck®.

Die dafür notwendigen Geräte waren das oben genannte Mikroskop inklusive der Batterieeinheit und ein Verbindungskabel von Batterieeinheit zu einem Computer (siehe Abbildung 7). Über die Software wurden verschiedene Parameter zur Beurteilung der Glykokalixdicke automatisch berechnet und die Werte in Form einer PDF und Excel Datei gespeichert.



**Abbildung 7: Versuchsaufbau der GlycoCheck-Messung mit Messsonde (1), Batterieeinheit (2) und Bildschirm / PC (3)**

## **Blutentnahme**

Sowohl bei den Patienten als auch bei den Kontrollprobanden erfolgte im Rahmen der Untersuchungen einmalig eine Blutentnahme. Damit wurden die Entzündungsparametern, das Blutbild und Lipidwerte bestimmt. Außerdem wurde jeweils ein Serumröhrchen zusätzlich abgenommen und direkt im Labor weiterverarbeitet und asserviert, um später Enzyme-linked Immunsorbent Assays (ELISA) durchführen zu können. Hierfür erfolgte eine Zentrifugation nach 30-60 min bei 10 °C, RCF 1000 g und RAD 86 für 10 min. Anschließend wurden Aliquots à 400 µg abpipettiert und bei -80 °C tiefgefroren.

## **Enzyme-linked Immunsorbent Assay (ELISA)**

Die Messung der Serumkonzentrationen von den Glykokalixbestandteilen Syndecan-1 (SDC-1) und Hyaluronsäure (HA) erfolgte über Enzyme-linked Immunsorbent Assays (ELISA). Dem Prinzip der Messung von Stoffkonzentrationen über Enzyme-linked Immunsorbent Assay (ELISA) liegt das generelle Konzept der Immunologie zugrunde, das besagt, dass sich ein Antigen an einen spezifischen Antikörper bindet. Dadurch können schon sehr kleine Mengen von Antigenen wie beispielsweise Proteine, Peptide und Hormone gemessen werden. Die verwendeten Antigene und Antikörper sind über gebundene Enzyme markiert [61]. Somit beinhaltet dieses methodische Vorgehen die quantitative Messung eines speziellen Antigens, wie z.B. eines Proteins, in einem Medium durch enzymgekoppelte Antikörper (AK). Dafür wird ein Stoffgemisch mit einem Antikörper inkubiert. Dieser erkennt spezifisch das gesuchte Protein und bindet an dieses. In einem zweiten Schritt wird dieser primäre Antikörper von einem sekundären enzymgekoppelten Antikörper erkannt und gebunden. Als nächstes wird eine Farbreagenz zugegeben, welche sich durch das indirekt an die gesuchte Substanz gekoppelte Enzym verändert. Die Intensität der Farbreaktion gibt Aufschluss über die Konzentration der Substanz im Stoffgemisch. Somit ist die Menge des enzymgekoppelten Antikörpers proportional zur Menge des speziell gesuchten Proteins [62]. Da die Seren der Probanden teilweise ungenügend waren, konnten nicht in allen Fällen beide Glykokalixbestandteile bestimmt werden.

### Durchführung des ELISA

Die Seren wurden aufgetaut und die Menge von SDC-1 und HA über ELISA bestimmt.

Material:      Human sCD138 (Syndecan-1)  
                  ELISA Kit (Diacclone SAS, Besancon Cedex, France)  
                  Hyaluronan ELISA Kit (Echelon Biosciences Inc., Salt Lake City, UT9)  
                  Microplate reader SPECTROstar Omega (BMG LABTECH, Ortenberg)

Die Verwendung der aufgeführten Materialien erfolgte anhand der Empfehlung der Hersteller.

Bei der Beurteilung der Reproduzierbarkeit des Assays wurde der Bereich des Intra-Assay-Variationskoeffizienten (CV) für Syndecan-1 und Hyaluron auf 0.41-9.8 % und 6.6-17.7 % geschätzt. Der Mittelwert des Inter-Assay CV betrug 4.22 % und 12.4 %.

Im Falle von Syndecan-1 wurden 2 Proben aus den Analysen ausgeschlossen, um das Maximum der Standardkurve (> 256 ng/ml) nicht zu übertreffen.

### 3. Auswertung

#### 3.1. Glykokalix

Die Auswertung der endothelialen Glykokalixdicke erfolgte über eine Software (Glykokalix-Measurement Software TM, Firma GlycoCheck, Holland), welche speziell dafür entwickelt wurde und eine indirekte Berechnung der Glykokalixdicke ermöglicht. Die Software kontrollierte automatisch die Qualität der Videoaufnahmen indem auf Intensität, Bewegung und Fokus geachtet wurde [28]. Über die Bestimmung der Glykokalixdicke konnte die Glykokalix beurteilt werden. Die hierfür benötigten Parameter waren das RBC-Filling und die Perfused Boundary Region (PBR).

**RBC-Filling:** Durch den prozentualen RBC-Wert erfolgt die Beschreibung der Durchblutung der Gefäße anhand der Menge der Erythrozyten, die sich in den Gefäßen aufhalten.

**PBR:** Die Perfused Boundary Region umfasst den Abstand zwischen der medianen und maximalen Breite der Erythrozytensäule. Folglich geht mit einer Zunahme der PBR eine Abnahme der endothelialen Glykokalixdicke einher. In der folgenden Auswertung wurden für die PBR-Werte Gefäße mit einer Größe von 5-25  $\mu\text{m}$  betrachtet.

#### 3.2. Mikrozirkulation

Die Auswertung der Messungen zur Mikrozirkulation erfolgte mithilfe der Software eines Videobildanalyse-Systems Automated Vascular Analysis (AVA) Version 3.0 (University of Amsterdam, Amsterdam, Niederlande).

Hierfür wurden alle Daten der Messungen auf einer Festplatte gespeichert und offline ausgewertet. Mithilfe der Software erfolgte eine qualitative und quantitative Analyse mikrozirkulatorischer Parameter anhand von Informationen über die Gefäße wie Gefäßlänge, -durchmesser, -dichte und Flussgeschwindigkeiten der Erythrozyten.

Ablauf der Auswertung:

1. Bildoptimierung: Helligkeit und Kontrast wurden individuell angepasst, um Abweichungen im Hintergrund zu korrigieren und um die Bildqualität zu verbessern.

2. Bildstabilisierung: Bewegungsartefakte in der gewählten Videosequenz wurden durch die Software stabilisiert.
3. Berechnung eines Durchschnittsbildes: Durch die beschriebenen Anwendungen und Korrekturen der durch Leukozyten oder Plasmalücken entstandenen Unterbrechungen in den Kapillaren wurde ein Bild berechnet, welches die Grundlage einer bestmöglichen Bildauswertung darstellte.
4. Gefäßmarkierung: Durch das Programm wurden nun alle erfassbaren Gefäße markiert und anhand der Größe in farblich gekennzeichnete Segmente eingeteilt. Dabei wurden kleine Gefäße mit einem Gefäßdurchmesser von bis zu 10  $\mu\text{m}$  gelb dargestellt, mittelgroße Gefäße (10-25  $\mu\text{m}$ ) wurden weiß markiert und große Gefäße (25-100  $\mu\text{m}$ ) grün.
5. Manuelle Bearbeitung: Im Bild vorhandene Luftblasen oder Haare konnten manuell demarkiert werden und andererseits konnten nicht markierte Abschnitte nachgezeichnet werden.

#### Analyse:

Abschließend wurden alle notwendigen Informationen und Daten in einem Analysebericht aufgeführt und gespeichert [63].

#### Parameter:

##### Total Vessel Density (TVD)

Die Gefäßdichte beschreibt die Gesamtlänge des Gefäßnetzes in mm pro Fläche des Bildausschnitts in  $\text{mm}^2$ . Da die Methodik der Messung der Mikrozirkulation mit dem SDF Imaging darauf beruht, dass das emittierte Licht vom Hämoglobin der Erythrozyten absorbiert wird, wurden nur perfundierte Gefäße visualisiert. Nicht perfundierte Gefäße wurden deshalb in die Analyse nicht mit einbezogen. Zur Berechnung der Gesamtlänge wurde ein Bildausschnitt gewählt und über das Programm AVA die Länge aller Gefäße automatisch berechnet.

### Gefäßoberfläche (Vessel Surface - VS)

Die Gefäßoberfläche umfasst den durch Blutgefäße bedeckten prozentualen Anteil der Fläche des Bildausschnitts. Damit handelte es sich bei der ebenfalls durch AVA automatisierten Berechnung der Gefäßoberfläche um eine Kombination der Werte der Gefäßdichte (TVD) und der Durchmessererteilung pro Bildausschnitt.

### Quality of Flow (microvascular flow index – MFI)

Zur Beschreibung der Qualität und der Geschwindigkeit des Blutflusses in einem Gefäß wurde der semiquantitative Score MFI bestimmt. Hierfür erfolgte eine Einteilung der Videosequenzen in vier Quadranten. Anschließend wurde der Blutfluss jedes Quadranten analysiert. Dabei wurde folgende Klassifikation herangezogen: 0 – no flow, 1 – intermittent, 2 – sluggish, 3 – continuous, 4 – hyperdynamic.

### **3.3. ELISA**

Zur Auswertung der ELISAs wurden in einem ersten Schritt die durchschnittlichen Absorptionswerte der Standard-, der Kontrollreagenzien und der Proben der Patienten bestimmt. Mit diesen Werten wurde eine lineare Standardkurve erstellt. Die vertikale Achse beinhaltete die durchschnittliche Absorption des Standards, die horizontale Achse beschrieb die korrespondierenden Syndecan-1 Standardkonzentrationen. Die Menge des in den Seren der Patienten enthaltenen Syndecan-1 konnte anschließend über die Extrapolation der gemessenen Werte der optischen Dichte gegen die Syndecan-1 Standardkonzentrationen über die Standardkurve bestimmt werden.

#### 4. Statistik

Zur Berechnung der Messungen der Mikrozirkulation und Glykokalix wurde das Programm R (Version R-4.0.2) angewandt. Zur Sicherstellung einer gleichmäßigen Geschlechterverteilung in beiden Gruppen (Patienten und Kontrollen) wurde ein Chi Quadrat Test ( $\chi^2$  Test) durchgeführt. Die Auswertung der im Rahmen der Studie erhobenen Messwerte zu Mikrozirkulation und Glykokalix erfolgte anhand einer univariaten und multivariaten linearen Regression. Zunächst wurden die einzelnen klinischen Variablen betrachtet. Anschließend wurden sowohl für Patienten als auch für die Kontrollgruppe als Referenzgruppe der jeweilige Mittelwert und der Standardfehler mit p-Wert berechnet. Die KS-Patienten wurden mit der Kontrollgruppe verglichen und anhand einer multivariaten Regression analysiert. Dabei dienten als Kontrollvariablen das Alter zum Zeitpunkt der Untersuchung, das Geschlecht, die Körpergröße und das Gewicht. In einem zweiten Teil erfolgte die Auswertung anhand der Einteilung der Patienten in Gruppen aufgrund von Aneurysmaentwicklungen in der Akut- und Langzeitphase des KS. Als Referenzgruppe diente erneut die Kontrollgruppe. Im Folgenden wurden mittels einer Regressionsanalyse die Patienten mit koronarer Beteiligung untereinander verglichen. Weitergehend fand die Untersuchung auf einen Zusammenhang zwischen Daten aus der Akutphase der Patienten und Messdaten zu Mikrozirkulation und Glykokalix mittels einer Regressionsanalyse statt. Zudem befasste sich die Studie mit der Fragestellung von messbaren Glykokalixbestandteilen im Blut und deren Zusammenhang mit einer Schädigung der Glykokalix im Zuge einer Erkrankung an KS. Hierfür erfolgte als erstes ein Vergleich der Konzentrationen der beiden Glykokalixbestandteile SDC-1 und HA. Anschließend wurde ein Zusammenhang mit den Abbauprodukten der Glykokalix und einer Erkrankung an KS untersucht. An statistischen Tests wurde hierfür nach Testung auf Normalverteilung über den Levene-Test der unabhängige T-Test angewandt. Um Korrelationen von SDC-1 und HA mit Daten aus der Akutphase und zum Studienzeitpunkt herauszufinden wurde der Pearson Korrelationskoeffizient berechnet. Zur Auswertung der Ergebnisse aus den ELISAs wurde das Programm SPSS Version 24 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) angewandt. Der letzte Teil umfasst eine deskriptive Beschreibung der Messergebnisse derjenigen Patienten, die während der Studienlaufzeit in der Kinderklinik der LMU mit akutem Kawasaki-Syndrom vorstellig wurden.

## 5. Ergebnisse

### 5.1. Vergleich klinischer Daten von Patienten und Kontrollen

Um einen Überblick über die Zusammensetzung der Patienten- und Kontrollgruppe zu bekommen, erfolgte als erstes eine Analyse der klinischen Daten beider Gruppen zum Studienzeitpunkt. Für die Untersuchungen konnten 45 Patienten mit im Mittel 12 3/5 Jahren (min./max. 4 / 38 J.; 64 % männlich) und 36 Kontrollen mit im Mittel 11 4/7 Jahren (min./max. 5 / 29 J.; 61 % männlich) eingeschlossen werden (siehe Tabelle 1). Um die Gleichverteilung der Geschlechter in beiden Gruppen sicherzustellen, wurde ein Chi-Quadrat-Test ( $\chi^2$ -Test) durchgeführt. Mit einer Signifikanz von  $p = 0.758$  ( $\alpha = 0.05$ ) konnte ein ausgeglichenes Geschlechterverhältnis verifiziert werden.

**Tabelle 1: Klinische Daten von Patienten und Kontrollen zum Studienzeitpunkt**

|  | Patienten             | Kontrollen            |
|--|-----------------------|-----------------------|
|  | n = 45                | n = 36                |
| Alter in Jahren (Untersuchungszeitpunkt) | 12 3/5                | 11 4/7                |
| als Mittelwert (min./max.)               | (4 / 38)              | (5 / 29)              |
| Geschlecht männlich/weiblich (%)         | 29 (64 %) / 16 (36 %) | 22 (61 %) / 14 (39 %) |

Angaben als Mittelwert / prozentualer Anteil, n bezeichnet die Anzahl der Patienten mit vollständig vorliegenden Daten.

### Klinische Daten der Patienten in der Akutphase

Die aus der Akutphase der Erkrankung erhobenen Daten sind in Tabelle 2 dargestellt. Es erfüllten 30 Patienten alle Kriterien für ein komplettes Kawasaki-Syndrom. Bei 8 Patienten zeigte sich das Bild eines inkompletten Kawasaki-Syndroms, bei dem die Hauptkriterien für ein KS zusätzlich zu hohem Fieber nicht erfüllt sind, aber eine Koronareteiligung und/oder erhöhte Entzündungsparameter vorlagen. Bei den restlichen 7 Patienten konnte aufgrund von lückenhafter Dokumentation in der Akutphase nicht klar zwischen komplettem oder inkomplettem Kawasaki-Syndrom unterschieden werden. 13 Patienten (33 %) entwickelten ein Aneurysma. Von 5 Patienten konnten keine Daten bezüglich der Entwicklung von einem Aneurysma im Rahmen der Erkrankung ermittelt werden. Das mittlere Alter zum Zeitpunkt der Erkrankung betrug 4.7 Jahre ( $\pm 3.3$ ). Die erhobenen Laborwerte aus der Akutphase sind Tabelle 2 zu entnehmen. Bei den besonders relevanten Laborparametern, CRP, Leukozyten und Thrombozyten zeigten sich im Mittel erhöhte Werte.

**Tabelle 2: Klinische Daten der Patienten aus der Akutphase**

|  | n  | Anzahl (%) bzw. Mittelwert<br>(Standardabweichung) |
|--|----|--|
| komplettes KS/ inkomplettes KS                       | 38 | 30 (79 %) /8 (21 %)                                |
| Aneurysma (Anzahl, Prozent)                          | 40 | 13 (33 %)  |
| therapierefraktär > 1 IVIG Gabe<br>(Anzahl, Prozent) | 38 | 15 (39 %)  |
| Fieberdauer (Tage)                                   | 34 | 9.8 (5.1)  |
| Alter bei Erkrankung (Jahre)                         | 36 | 4.7 (3.3)  |
| BMI (kg/m <sup>2</sup> )                             | 32 | 15.3 (1.3)   |
| CRP (mg/l)   | 36 | 115.9 (90.7)                                       |
| Thrombozyten (g/l)                                   | 33 | 536.7 (173.2)                                      |
| Leukozyten (g/l)                                     | 37 | 19.2 (10.8)  |
| Hb (g/dl)  | 35 | 10.1 (2.0)   |

Angaben als Mittelwert (Standardabweichung) bzw. Anzahl (Prozent), n bezeichnet diejenigen Patienten, bei denen die entsprechenden Werte vollständig vorlagen.

### Vergleich der Blutfettwerte zwischen Patienten und Kontrollgruppe

Aufgrund eines mit erhöhten Blutfettwerten assoziierten atherosklerotischen und kardiovaskulären Risiko untersuchten wir die im Rahmen der Studie erhobenen Lipidwerte auf Unterschiede zwischen der Patienten- und Kontrollgruppe. Im Mittelwertvergleich weisen die Patienten gegenüber den Kontrollen auffällige Blutfettwerte auf. Beispielsweise sind die Triglyceride bei den Patienten mit 112.5 mg/dl (SD 64.6) im Vergleich zu den Kontrollen mit 88.5 mg/dl (SD 34.6) erhöht. Die Berechnung des p-Wertes belegt signifikant höhere Triglyceridwerte bei den Kontrollen mit  $p = 0.042$ . Außerdem zeigt sich bei dem LDL/HDL-Quotient im Mittelwertvergleich ein deutlicher Unterschied mit 2.4 (SD 0.66) versus 1.97 (SD 0.44). Auch wenn der Unterschied mit einem p-Wert von 0.056 nicht ganz das Signifikanzniveau erreicht, lässt sich aus den Ergebnissen eine Tendenz zu einem höheren LDL/HDL-Quotienten in der Patientengruppe feststellen. Die detaillierten Werte hierzu sind Tabelle 3 zu entnehmen.

**Tabelle 3: Blutfettwerte der Patienten und Kontrollen**

|                      | Patienten |                     | Kontrollen |                     | p-Wert |
|----------------------|-----------|---------------------|------------|---------------------|--------|
|                      | n         | MW (SD)             | n          | MW (SD)             |        |
| Cholesterin (mg/dl)  | 38        | 163.632<br>(31.11)  | 24         | 171.167<br>(30.079) | 0.543  |
| Triglyceride (mg/dl) | 38        | 112.474<br>(64.4)   | 24         | 88.542<br>(34.630)  | 0.042* |
| LDL (mg/dl)          | 26        | 104.692<br>(24.997) | 24         | 104<br>(25.652)     | 0.259  |
| VLDL (mg/dl)         | 20        | 16.6<br>(6.216)     | 24         | 13.917<br>(6.37)    | 0.078  |
| HDL (mg/dl)          | 26        | 50.077<br>(12.764)  | 24         | 53.917<br>(8.52)    | 0.200  |
| LDL/HDL-Quotient     | 18        | 2.361<br>(0.661)    | 24         | 1.967<br>(0.544)    | 0.056  |

Angaben als Mittelwerte (MW) mit Standardabweichung (SD) und p-Wert, \* = signifikant für  $p < 0.05$ , n bezeichnet die Anzahl der jeweils vollständig vorliegenden Proben.

## 5.2. Analysen zur Detektion von Unterschieden zwischen Patienten und Kontrollen im Bereich der Mikrozirkulation

Die sublinguale Messung der Mikrozirkulation konnte bei 42 (93 %) Patienten und 35 (97 %) Kontrollen erfolgreich durchgeführt werden. Gründe für nicht durchführbare Messungen waren bei 2 Patienten eine fehlende Patientencompliance aufgrund ihres jungen Alters. Des Weiteren kam es bei 1 Patient und 1 Kontrollproband zu technischen Problemen.

Die Ergebnisse einer ersten einfachen univariaten Analyse der Daten der Mikrozirkulationsmessung ergaben im Mittel bei den Patienten im Vergleich zu den Kontrollen eine höhere Gefäßdicke TVD (MW 19.34 SD 1.81 vs. MW 18.79 SD 2.06 mm/mm<sup>2</sup>) und eine prozentual größere Gefäßoberfläche VS (MW 23.63 SD 2.08 vs. MW 22.72 SD 2.76 %). Auch der Anteil der Gefäße mit mittlerem Durchmesser ergab im Mittelwertvergleich bei den Patienten größer Werte (Dia m MW 46.9 SD 6.44 vs. MW 45.62 SD 6.7 %), während bei den Kontrollen ein größerer Anteil an Gefäßen mit kleinerem Durchmesser (Dia s MW 48.49 SD 8.04 vs. MW 47.13 SD 7.71 %) gemessen wurde. Jedoch zeigten sich diese Unterschiede in der univariaten Analyse als nicht signifikant. Tabelle 4 zeigt die Werte der Mikrozirkulationsmessung mit Mittelwert (Standardabweichung) und p-Werte der univariaten Analyse.

**Tabelle 4: Ergebnisse Mikrozirkulation, univariate Analyse**

|                           | <b>Patienten</b><br><b>n = 42</b><br><b>MW (SD)</b> | <b>Kontrollen</b><br><b>n = 35</b><br><b>MW (SD)</b> | <b>Univariate</b><br><b>Analyse</b><br><b>p-Wert</b> |
|---------------------------|---|--|--|
| TVD (mm/mm <sup>2</sup> ) | 19.34 (1.81)  | 18.79 (2.06)   | 0.221  |
| VS (%)                    | 23.63 (2.08)  | 22.72 (2.76)   | 0.110  |
| Diameter Small (%)        | 47.13 (7.71)  | 48.49 (8.04)   | 0.456  |
| Diameter Medium (%)       | 46.90 (6.44)  | 45.62 (6.7)  | 0.402  |
| MFI                       | 2.832 (0.2)   | 2.844 (0.14)   | 0.221  |

Mittelwertvergleich und univariate Analyse, Angaben als Mittelwert MW, (Standardabweichung SD) und p-Wert, \* = signifikant für  $p < 0.05$ , n bezeichnet die Anzahl der jeweils vollständig vorliegenden Proben.

Um den Einfluss unabhängiger Variablen mit einzubeziehen, führten wir eine multivariate Regressionsanalyse durch. Auch hier zeigten die Ergebnisse keine Signifikanz für Unterschiede zwischen der Patienten- und Kontrollgruppe. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 dargestellt.

**Tabelle 5: Ergebnisse Mikrozirkulation, multivariate Analyse**

| <b>Mikrozirkulation</b>   | <b>p-Wert</b> | <b>Standardfehler</b> | <b>T-Wert</b> |
|---------------------------|---------------|-----------------------|---------------|
| TVD (mm/mm <sup>2</sup> ) | 0.181         | 0.422                 | 1.352         |
| VS (%)                    | 0.185         | 0.56                  | 1.339         |
| Diameter Small (%)        | 0.673         | 1.75                  | -0.452        |
| Diameter Medium (%)       | 0.573         | 1.49                  | 0.566         |
| MFI                       | 0.94          | 0.04                  | -0.075        |

Multivariate Analyse, Kontrollvariablen Alter in Tagen, Geschlecht, Körpergröße in cm, Gewicht in Kg, Angabe als p-Wert mit Standardfehler und T-Wert, \* = signifikant für  $p < 0.05$ .

### **5.3. Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen im Bereich der Glykokalix**

Die Messung der Glykokalix konnte bei 37 (82 %) der Patienten und 25 (69 %) der Kontrollen erfolgreich durchgeführt werden. Bei 8 Patienten und 11 Kontrollprobanden konnte die Glykokalixmessung nicht durchgeführt werden. Die fehlende Durchführbarkeit beruhte auf der unter Abschnitt 3.1 beschriebenen automatischen Auswertung und damit einhergehend mit den hohen Qualitätsanforderungen der Glykokalix Software. In der analog zur Mikrozirkulationsmessung durchgeführten univariaten Analyse der Glykokalixmessung konnten keine Unterschiede im Vergleich von Patienten versus Kontrollen festgestellt werden. Beispielsweise zeigen sich bei dem RBC-Wert, der zur Einschätzung der

Durchblutung der Gefäße hergenommen werden kann, keine relevanten Differenzen zwischen Patienten und Kontrollen (MW 0.69 SD 0.53 vs. 0.7 SD 0.06). Auch im Falle des gemessenen PBR5-25-Wertes, der zur direkten Einschätzung der Glykokalixdicke dient, konnten keine Unterschiede zwischen der Patienten- und Kontrollgruppe gefunden werden (MW PBR5-25 2.3 SD 0.28 vs. 2.21 SD 0.18,  $p = 0.18$ ). Tabelle 6 zeigt die Ergebnisse der univariaten Analyse zur Glykokalixmessung im Vergleich von Patienten und Kontrollen.

**Tabelle 6: Ergebnisse Glykokalix, univariate Analyse**

|                           | <b>Patienten</b><br>n = 37 | <b>Kontrollen</b><br>n = 26 | <b>Univariate Analyse</b> |
|---------------------------|----------------------------|-----------------------------|---------------------------|
|                           | <b>Mittelwert (SD)</b>     | <b>Mittelwert (SD)</b>      | <b>p-Wert</b>             |
| RBC-Filling (%)           | 0.69 (0.53)                | 0.7 (0.06)                  | 0.808                     |
| PBR5-25 ( $\mu\text{m}$ ) | 2.30 (0.28)                | 2.21 (0.18)                 | 0.181                     |

Mittelwertvergleich und univariate Analyse, Angaben als Mittelwert (Standardabweichung SD) und p-Wert der univariaten Analyse, \* = signifikant für  $p < 0.05$ , n bezeichnet die Anzahl der jeweils vollständig vorliegenden Messwerte.

Ebenso wie bei den Ergebnissen der Mikrozirkulation wurden die Ergebnisse der Glykokalixmessung auf Unterschiede der Patienten- und Kontrollgruppe im Rahmen einer multivariaten Regressionsanalyse getestet. Wie in Tabelle 7 ersichtlich ist, zeigte sich auch hier kein signifikanter Effekt in der Patientengruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe.

**Tabelle 7: Ergebnisse Glykokalix, multivariate Analyse**

|                           | <b>p-Wert</b> | <b>Standardfehler</b> | <b>T-Wert</b> |
|---------------------------|---------------|-----------------------|---------------|
| RBC-Filling (%)           | 0.727         | 0.0143                | -0.350        |
| PBR5-25 ( $\mu\text{m}$ ) | 0.218         | 0.0671                | 1.246         |

Multivariate Analyse, p-Wert Vergleich, Angaben mit p-Wert, Standardfehler und T-Wert, Kontrollvariablen Alter in Tagen, Geschlecht, Körpergröße in cm, Gewicht in Kg, \* = signifikant für  $p < 0.05$

#### **5.4. Einfluss einer koronaren Beteiligung auf den Gefäßstatus bei KS-Patienten**

Ein nicht unerheblicher Anteil von 33 % (13/40) der Patienten unserer Studie entwickelte im Rahmen der Erkrankung an KS eine koronare Beteiligung in Form von Aneurysmen. Um Auswirkungen einer koronaren Beteiligung beim KS auf die Mikrozirkulation und Glykokalix darstellen zu können, unterteilten wir die Patienten in 3 Gruppen, abhängig von dem Ausmaß und dem Vorhandensein von aneurysmatischen Veränderungen während und im Verlauf einer Erkrankung an KS. Gruppe 1 beinhaltet 27 Patienten, die im gesamten Verlauf keine Erweiterung der Koronararterien beziehungsweise Aneurysmen hatten. In Gruppe 2

sind diejenigen Patienten zusammengefasst, die zwar in der Akutphase aneurysmatische Veränderungen hatten, im Langzeitverlauf allerdings keine Aneurysmen mehr aufgezeichnet werden konnten (n = 6). Die letzte Gruppe umfasst 7 Patienten, die auch bei der letzten Kontrolluntersuchung noch Veränderungen der Koronararterien aufgewiesen haben. In folgender Tabelle (Tabelle 8) sind die Ergebnisse anhand eines p-Wert Vergleichs der einzelnen Gruppen im Vergleich mit der Kontrollgruppe dargestellt. Als Kontrollvariablen dienten, wie in der vorhergehenden Analyse, das Alter, das Geschlecht, die Körpergröße und das Gewicht. Im Bereich der Glykokalix konnte für den relevanten Parameter RBC-Filling, der zur Einschätzung der Durchblutung dient, keine signifikante Assoziation zwischen den Gruppen bei Aneurysmaentwicklungen gefunden werden (p-Wert 0.67 vs. 0.99 vs. 0.98). Ebenso zeigen die Werte der Mikrozirkulation zum Beispiel bei der Gefäßdicke TVD (p-Wert 0.11 vs. 0.29 vs. 0.22) keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen 1-3.

**Tabelle 8: Gruppenvergleich koronare Beteiligung und Gefäßstatus beim KS**

| <b>Gruppe</b>               | <b>Gruppe 1</b>         | <b>Gruppe 2</b>         | <b>Gruppe 3</b>           |
|-----------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|
| <b>Koronare Beteiligung</b> | <b>keine</b>            | <b>nur in Akutphase</b> | <b>in Langzeitverlauf</b> |
| <b>Anzahl (n)</b>           | <b>n = 27</b>           | <b>n = 6</b>            | <b>n = 7</b>              |
| <b>Glykokalix</b>           | <b>p-Wert</b>           | <b>p-Wert</b>           | <b>p-Wert</b>             |
|                             | <b>(Standardfehler)</b> | <b>(Standardfehler)</b> | <b>(Standardfehler)</b>   |
| RBC-Filling (%)             | 0.674<br>(0.0156)       | 0.990<br>(0.0285)       | 0.982<br>(0.0282)         |
| PBR5-25 (µm)                | 0.230<br>(0.0728)       | 0.391<br>(0.134)        | 0.819<br>(0.132)          |
| <b>Mikrozirkulation</b>     |                         |                         |                           |
| TVD (mm/mm <sup>2</sup> )   | 0.111<br>(0.446)        | 0.292<br>(0.888)        | 0.217<br>(0.831)          |
| VS (%)                      | 0.156<br>(0.60)         | 0.953<br>(1.12)         | 0.490<br>(1.12)           |
| Diameter Small (%)          | 0.797<br>(1.9)          | 0.755<br>(3.77)         | 0.610<br>(3.52)           |
| Diameter Medium (%)         | 0.702<br>(1.61)         | 0.974<br>(3.21)         | 0.356<br>(3.01)           |
| MFI                         | 0.855<br>(0.044)        | 0.901<br>(0.0883)       | 0.867<br>(0.0827)         |

Multivariate Analyse, p-Wert Gruppenvergleich mit Kontrollgruppe, Angabe als p-Wert mit Standardfehler, \* = signifikant für p < 0.05, n bezeichnet jeweils die Anzahl der zur Gruppe gehörenden Patienten.

In einem weiteren Teil analysierten wir die einzelnen Messparameter nach Aufteilung der Patienten in zwei Gruppen. Die zu untersuchende Gruppe beinhaltete Patienten, die zum Studienzeitpunkt noch Aneurysmen aufwiesen (n = 7). Die Referenzgruppe umfasste diejenigen Patienten, die entweder kein Aneurysma oder nur in der Akutphase der Erkrankung ein Aneurysma hatten (n = 33). Im p-Wert Vergleich konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Die Ergebnisse der Analyse sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

**Tabelle 9: Vergleich von Patienten mit koronarer Beteiligung**

| Glykokalix      | Mikrozirkulation           |   |
|-----------------|----------------------------|---|
|                 | p-Wert<br>(Standardfehler) | p-Wert<br>(Standardfehler)                    |
| RBC-Filling (%) | 0.829<br>(0.027)           | TVD (mm/mm <sup>2</sup> )<br>0.338<br>(0.784) |
| PBR5-25 (µm)    | 0.541<br>(0.151)           | VS (%)<br>0.628<br>(1.00)                     |
|                 |                            | Diameter Small (%)<br>0.651<br>(3.5)          |
|                 |                            | Diameter Medium (%)<br>0.425<br>(3.01)        |
|                 |                            | MFI<br>0.821<br>(0.059)                       |

Vergleich von Patienten mit noch bestehenden Aneurysmen n = 7 vs. Patienten ohne Aneurysmen n = 33, Angaben als p-Wert mit Standardfehler, \* = signifikant für p < 0.05.

### 5.5. Korrelation zwischen Messwerten der Mikrozirkulation / Glykokalix und klinischen Daten aus der Akutphase

Inwiefern ein Zusammenhang zwischen klinischen Parametern aus der Akutphase und Messdaten der im Rahmen der Studie durchgeführten Untersuchungen zu Glykokalix und Mikrozirkulation besteht, wurde in einer multiplen linearen Regression analysiert. Es wurden klinisch relevante Variablen auf einen eventuell bestehenden Zusammenhang mit den Messdaten der Untersuchungen zu Glykokalix und Mikrozirkulation untersucht. Die Daten aus der Akutphase beinhalteten den koronaren Status, das Ansprechen auf eine IVIG Therapie, die Fieberdauer und die Laborwerte CRP, Thrombozyten, Hb und Leukozyten. Die durch die lineare Regressionsanalyse ermittelten statistischen Werte sind in Tabelle 10

zusammengefasst. Mit einem Overall-p-Wert von  $p = 0.047$  zeigte sich ein statistisch signifikanter Effekt zwischen den klinischen Parametern aus der Akutphase mit dem prozentualen Anteil der kleinen Gefäße Dia s. Dergleichen ist dies bei dem prozentualen Anteil des Durchmessers der mittelgroßen Gefäße Dia m der Fall ( $p = 0.021$ ). Mit einem p-Wert für den Effekt von Fieberdauer auf Dia s von  $p = 0.059$  und  $p = 0.017$  bei Dia m scheint der Einfluss von Akutphaseparametern auf die Mikrozirkulation größtenteils von der Fieberdauer auszugehen.

**Tabelle 10: Assoziation von Messwerten der Mikrozirkulation und Glykokalix mit Akutphaseparametern**

|                           | p-Wert | F Statistik     |
|---------------------------|--------|-----------------|
| <b>Glykokalix</b>         |        | <b>df 11,14</b> |
| RBC-Filling (%)           | 0.124  | 1.93            |
| PBR5-25 (µm)              | 0.452  | 1.06            |
|                           | p-Wert | F Statistik     |
| <b>Mikrozirkulation</b>   |        | <b>df 11,17</b> |
| TVD (mm/mm <sup>2</sup> ) | 0.170  | 1.65            |
| VS (%)                    | 0.653  | 0.78            |
| Dia s (%)                 | 0.047* | 2.45            |
| Dia m (%)                 | 0.021* | 3.00            |
| MFI                       | 0.204  | 1.54            |

P-Wert Vergleich anhand multipler linearer Regressionsanalyse, Kontrollvariablen Alter in Tagen, Geschlecht, Körpergröße in cm, Gewicht in Kg. F-Statistik mit Angabe der Anzahl Freiheitsgrade df, \* = signifikant für  $p < 0.05$ .

### 5.6. Untersuchung von Glykokalixabbauprodukten im Serum zur Bewertung einer Glykokalixbeteiligung beim KS

Im Rahmen dieser Studie wurden die Seren der Patienten und Kontrollen mittels ELISA auf die Konzentration von Glykokalixbestandteilen untersucht. Über einen Vergleich der Werte von Patienten und Kontrollprobanden konnten wir dadurch Rückschlüsse über die Beteiligung der Glykokalix im Langzeitverlauf nach KS ziehen. Zudem war es möglich, über die Anwendung verschiedener Messmethoden unsere Ergebnisse zu verifizieren. Aus den Blutproben wurden bei  $n = 30$  Patienten Analysen für HA und bei  $n = 28$  Patienten für SDC-1 durchgeführt. In der Kontrollkohorte konnten die Messungen für HA bei  $n = 20$  und für SDC-1 für  $n = 19$  Kontrollprobanden erfolgen. Nicht bei allen Patienten und Kontrollen konnte eine ausreichende Menge an Blut abgenommen werden um die Untersuchungen zu den Glykokalixabbauprodukten durchzuführen.

## Untersuchung der Konzentrationen der Glykokalixabbauprodukte auf Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen

In einer einfachen statistischen Analyse wurde mittels Mittelwertvergleich untersucht, ob Unterschiede der SDC-1- und HA-Konzentrationen zwischen den beiden Kohorten Patienten und Kontrollen vorhanden sind. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 dargestellt. Dabei ergaben sich im Mittel zwar Unterschiede zwischen der Patienten und Kontrollgruppe, doch zeigten sich diese im T-Test mit einem p-Wert von 0.986 für Syndecan und  $p = 0.113$  für Hyaluron als nicht signifikant.

**Tabelle 11: Vergleich der Konzentrationen von SDC-1 und HA**

|               | Patienten |                 | Kontrollen |                 | p-Wert | Standardfehler | T-Wert |
|---------------|-----------|-----------------|------------|-----------------|--------|----------------|--------|
|               | n         | Mittelwert (SD) | n          | Mittelwert (SD) |        |                |        |
| SDC-1 (ng/ml) | 28        | 54.33 (45.46)   | 19         | 52,98 (43.78)   | 0.986  | 0.08227        | 0.017  |
| HA (ng/ml)    | 30        | 96,49 (28.63)   | 20         | 83,96 (24.06)   | 0.113  | 7.76992        | 1.613  |

Mittelwertvergleich SDC-1 und HA, Patienten versus Kontrollen, Angabe mit Mittelwert (Standardabweichung SD), p-Wert, Standardfehler und T-Wert über unabhängiger T-Test, n bezeichnet diejenigen Patienten, bei denen die entsprechenden Werte vollständig vorlagen.

## Einfluss des KS auf die Glykokalixbestandteile SDC-1 und HA

Zur Untersuchung eines Zusammenhangs von SDC-1 und HA in Bezug auf das KS wurde eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt. Als unabhängige Variablen wurden das Geschlecht, das Alter in Jahren und der BMI zum Studienzeitpunkt hergenommen. Die abhängige Variable beschrieb eine Erkrankung an KS. In der Analyse ergab sich ein p-Wert von 0.9 ( $\beta$  0.02,  $t$  0.127) für Syndecan und ein p-Wert von 0.108 ( $\beta$  0.241,  $t$  1.643) für Hyaluron. Somit konnte kein signifikanter Effekt auf den Einfluss einer Erkrankung an KS auf die Glykokalixbestandteile SDC-1 und HA nachgewiesen werden.

## Aneurysmaentwicklungen beim KS und deren Zusammenhang mit Glykokalixabbauprodukten

Aufgrund der hohen Inzidenz der Entwicklung von Koronaraneurysmen im Verlauf des KS, wurden Untersuchungen zu einem eventuellen Zusammenhang der im Rahmen der Erkrankung an KS entstandenen Aneurysmen sowie zu den Glykokalixabbauprodukten SDC-1 und HA durchgeführt. Es erfolgte eine Analyse der Werte mittels linearer Regression, adjustiert an Alter, Geschlecht und BMI. Hierzu wurden die Patienten in unterschiedliche Gruppen analog zu den Untersuchungen in Absatz 5.4 anhand ihrer Entwicklung von aneurysmatischen Veränderungen im Laufe des KS eingeteilt. Insgesamt konnten in die Gruppe 1 mit aneurysmatischen Veränderungen im Laufe des KS n = 13 Patienten eingeschlossen werden. Die zweite Gruppe bestand aus n = 7 Patienten mit zum Studienzeitpunkt noch vorhandenen Aneurysmen. Mit einem p-Wert von 0.95 für SDC-1 und p = 0.2 für HA zeigte sich in Gruppe 1 kein statistisch signifikantes Ergebnis, welches auf einen Zusammenhang von Glykokalixabbauprodukten und der Entwicklung von Aneurysmen schließen lassen würde. Auch in der Gruppe mit Patienten, die zum Studienzeitpunkt noch Aneurysmen aufwiesen, brachte die beschriebene Analyse keine signifikanten Ergebnisse (SDC-1 p = 0.72 , HA p = 0.22).

### Korrelation zwischen Glykokalixabbauprodukten und Laborwerten aus der Akutphase

Ob eine Korrelation zwischen Glykokalixabbauprodukten und spezifischen, in der Akutphase der Patienten bestimmten Laborwerten wie beispielsweise CRP und Leukozyten besteht, untersuchten wir in weiteren Korrelationsanalysen. Sowohl über den ermittelten Pearson-Korrelationswert r als auch über den p-Wert konnte keine Korrelation festgestellt werden (siehe Tabelle 12).

**Tabelle 12: Korrelation zwischen Laborparametern der Akutphase und Glykokalixabbauprodukten**

|                     | SDC-1 |                       |                   | HA |                       |                   |
|---------------------|-------|-----------------------|-------------------|----|-----------------------|-------------------|
|                     | n     | Pearson Korrelation r | p-Wert (2-seitig) | n  | Pearson Korrelation r | p-Wert (2-seitig) |
| CRP (mg/l)          | 24    | 0.043                 | 0.841             | 26 | 0.194                 | 0.343             |
| Leukozyten (g/l)    | 25    | 0.331                 | 0.106             | 27 | 0.175                 | 0.382             |
| Thrombozyten (g/μl) | 23    | 0.264                 | 0.224             | 26 | -0.18                 | 0.379             |
| Hb (g/dl)           | 24    | -0.27                 | 0.203             | 26 | -0.027                | 0.897             |

Dargestellt mit Pearson Korrelationswert r und p-Wert, \* = signifikant für p < 0.05, n bezeichnet diejenigen Patienten, bei denen die entsprechenden Werte vollständig vorlagen.

Aufgrund des durch die bisher beschriebenen Analysen fehlenden Nachweises eines Einflusses der Glykokalixabbauprodukte in Bezug auf das KS, gingen wir der Fragestellung nach, ob eine generelle Korrelation zwischen Glykokalixabbauprodukten und klinischen Parametern zu beobachten ist. Hierzu verglichen wir metabolische Parameter zum Studienzeitpunkt mit Ergebnissen unserer Messungen zur Mikrozirkulation und Glykokalix in einer Gesamtkohorte, die Patienten und Kontrollprobanden beinhaltete. Tabelle 13 zeigt die Ergebnisse der Analyse.

Es konnte eine signifikante positive Korrelation von HA und dem systolischen Blutdruckwert ( $p = 0.009$   $r = 0.381$   $n = 46$ , Abbildung 8) gefunden werden. Dabei korrelieren hohe HA-Werte mit hohen systolischen Blutdruckwerten. Für den Zusammenhang von HA mit dem LDL/HDL-Quotienten konnte ebenfalls eine positive Korrelation festgestellt werden ( $p = 0.029$   $r = 0.365$   $n = 34$ , ). Für SDC-1 ergaben die Analysen keine signifikanten Ergebnisse beziehungsweise Zusammenhänge.

**Tabelle 13: Korrelationsanalyse zwischen Glykokalixabbauprodukten und metabolischen Parametern**

|                          | SDC-1 |                       |                   | HA |                       |                   |
|--------------------------|-------|-----------------------|-------------------|----|-----------------------|-------------------|
|                          | n     | Pearson Korrelation r | p-Wert (2-seitig) | n  | Pearson Korrelation r | p-Wert (2-seitig) |
| BMI (kg/m <sup>2</sup> ) | 45    | 0.029                 | 0.852             | 48 | 0.2                   | 0.174             |
| Blutdruck syst. (mmHg)   | 43    | -0.142                | 0.363             | 46 | 0.381                 | 0.009*            |
| Blutdruck diast. (mmHg)  | 43    | -0.123                | 0.43              | 46 | 0.12                  | 0.427             |
| MAD (mmHg)               | 42    | -0.155                | 0.328             | 45 | 0.286                 | 0.057             |
| Cholesterin (mg/dl)      | 45    | 0.029                 | 0,849             | 48 | 0.087                 | 0.557             |
| Leukozyten (g/l)         | 45    | 0.23                  | 0.128             | 48 | 0.004                 | 0.976             |
| LDL (mg/dl)              | 39    | 0.062                 | 0.707             | 41 | 0.136                 | 0.396             |
| VLDL (mg/dl)             | 36    | -0.058                | 0.738             | 38 | 0.061                 | 0.717             |
| HDL (mg/dl)              | 39    | 0.063                 | 0.703             | 41 | -0.186                | 0.243             |
| LDL/HDL                  | 34    | -0.022                | 0.9               | 36 | 0.365                 | 0.029*            |
| LPA (mg/dl)              | 23    | -0.147                | 0.504             | 24 | -0.201                | 0.347             |
| pro BNP (pg/ml)          | 29    | -0.122                | 0.529             | 32 | -0.232                | 0.202             |

Dargestellt mit Pearson Korrelationskoeffizient r und p-Wert, \* = signifikant für  $p < 0,05$ , n bezeichnet diejenigen Patienten/Kontrollen, bei denen die entsprechenden Werte vollständig vorlagen.

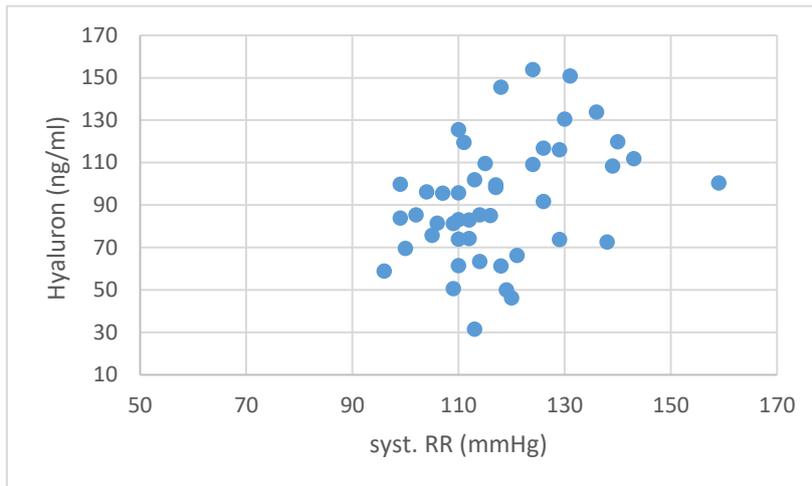


Abbildung 8: Pearson Korrelationsanalyse zwischen systolischem Blutdruck und Hyaluronkonzentration in gemeinsamer Kohorte aus Patienten und Kontrollen,  $p = 0.009$ ,  $r = 0.381$ .

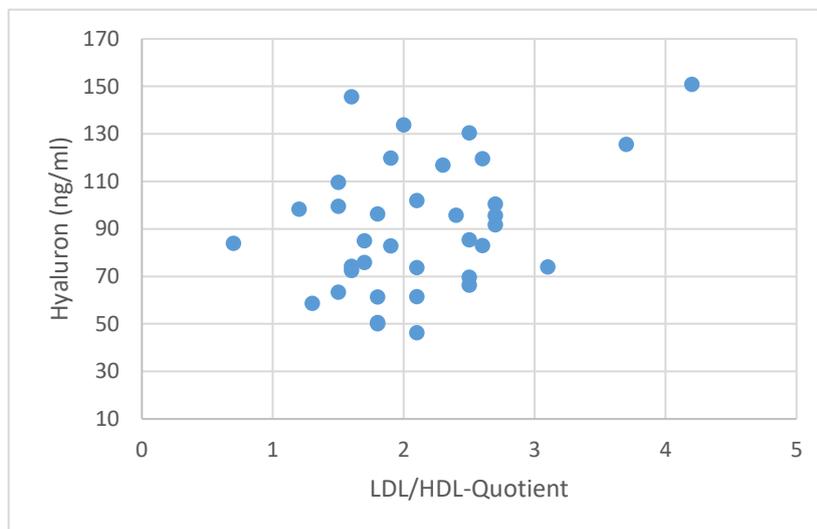


Abbildung 9: Pearson Korrelationsanalyse zwischen LDL/HDL-Quotient und Hyaluronkonzentration in gemeinsamer Kohorte aus Patienten und Kontrollen,  $p = 0.029$ ,  $r = 0.365$ .

Da Syndecan und Hyaluron direkte Abbauprodukte der endothelialen Glykokalix darstellen, stellte sich die Frage, ob sich ein Zusammenhang der Glykokalixdicke und der Mikrozirkulation mit den Glykokalixabbauprodukten SDC-1 und HA zeigt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 dargestellt. Der Vergleich von SDC-1 und HA und den erhobenen Messdaten zur Glykokalixdicke und der endothelialen Mikrozirkulation ergab eine signifikante Korrelation des mikrozirkulatorischen Parameters MFI und dem Abbauprodukt der Glykokalix SDC-1 ( $p = 0.024$ ,  $r = -0.339$ ). Ein hoher MFI korreliert dabei mit niedrigen Werten von SDC-1 im Serum. In Abbildung 10 ist der Zusammenhang der beiden Parameter in einem Diagramm veranschaulicht.

Für die Gefäßoberfläche VS zeigte sich weder für SDC-1 noch für HA eine signifikante Korrelation (SDC-1  $p = 0.279$ , HA  $p = 0.221$ ). Ebenso scheinen auch die Durchmesser der Gefäße (Dia s, m, l) nicht mit den Glykokalixabbauprodukten zu korrelieren. Die Messungen der Glykokalixdicke RBC-Filling und PBR5-25 weisen kein signifikantes Zusammenspiel mit den Glykokalixabbauprodukten auf. Die Werte hierzu sind in Tabelle 14 dargestellt.

**Tabelle 14: Korrelation Glykokalixabbauprodukte und Messdaten**

|                           | SDC-1 |                          |                      | HA |                          |                      |
|---------------------------|-------|--------------------------|----------------------|----|--------------------------|----------------------|
|                           | n     | Pearson<br>Korrelation r | p-Wert<br>(2-seitig) | n  | Pearson<br>Korrelation r | p-Wert<br>(2-seitig) |
| TVD (mm/mm <sup>2</sup> ) | 44    | 0.065                    | 0.675                | 47 | 0.239                    | 0.106                |
| MFI                       | 44    | -0.339                   | 0.024*               | 47 | 0.202                    | 0.173                |
| Dia s (%)                 | 44    | -0.159                   | 0.304                | 47 | 0.126                    | 0.399                |
| Dia m (%)                 | 44    | 0.175                    | 0.257                | 47 | -0.178                   | 0.209                |
| VS (%)                    | 44    | 0.167                    | 0.279                | 47 | 0.182                    | 0.221                |
| RBC-Filling (%)           | 38    | 0.023                    | 0.893                | 41 | -0.072                   | 0.654                |
| PBR5-25 (µm)              | 38    | -0.079                   | 0.332                | 41 | 0.155                    | 0.332                |

Korrelationsanalyse, dargestellt mit Pearson Korrelationskoeffizient r und p-Wert, \* = signifikant für  $p < 0,05$ , n bezeichnet die Anzahl der jeweils vorhandenen Proben.

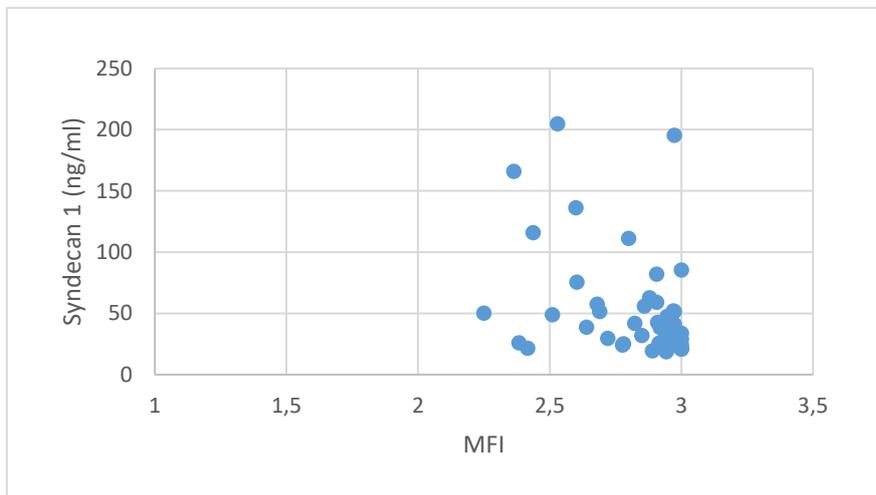


Abbildung 10: Pearson Korrelationsanalyse zwischen dem Mikrovaskulären Flow Index (MFI) und der SDC-1-Konzentration in einer gemeinsamen Kohorte aus Patienten und Kontrollen,  $p = 0.024$ ,  $r = -0.339$ .

### 5.7. Untersuchung von Akutfällen während der Studienlaufzeit

In der Studienlaufzeit stellten sich mehrere Patienten mit akutem Kawasaki Syndrom in unserer Klinik vor, bei denen es uns gelang, die Messung der Mikrozirkulation und der endothelialen Glykokalix durchzuführen und Laborparameter zu bestimmen. Tabelle 15 zeigt die klinischen Werte der Patienten. Das Alter der gemessenen 6 Akutfälle war zum Zeitpunkt der Erkrankung im Mittel  $4 \frac{4}{5}$  Jahre (3 Monate –  $10 \frac{1}{3}$  Jahre). Die Geschlechterverteilung war mit 100 % männlichen Patienten unausgeglichen. Es zeigt sich hier jedoch die für das KS bekannte häufigere Erkrankung männlicher Patienten. Unter den Akutfällen zeigte sich eine mittlere Fieberdauer von 8.7 Tagen. Die Hälfte der Fälle entwickelte ein Aneurysma. Die Ergebnisse der Untersuchung werden aufgrund der geringen Fallzahl der Akutpatienten nur deskriptiv beschrieben.

**Tabelle 15: Klinische Daten Akutfälle**

| <b>n = 6</b>  |                         |
|---|-------------------------|
| Alter bei Erkrankung in Jahren Mittelwert (min./max.) | 4.8 (3 Monate / 10 1/3) |
| Geschlecht m/w Anzahl (%)                             | 6 (100 %) / 0 (0 %)     |
| Fieberdauer in Tagen, Mittelwert (Standardabweichung) | 8.7 (3.4)               |
| Aneurysma Anzahl Fälle (%)                            | 3 (50 %)                |

Deskriptive Statistik der Akutfälle, n = 6 beinhaltet diejenigen Patienten, die während des Studienverlaufs in der Kinderklinik der LMU mit akutem KS vorstellig wurden.

Die Ergebnisse der Messungen zu Glykokalix und Mikrozirkulation sind in Tabelle 16 dargestellt. Der Vergleich der Untersuchungswerte zwischen den Patienten, die im Langzeit-Follow-Up gemessen wurden, und den Akutfällen zeigt Unterschiede bei einigen Messparametern. In der Mikrozirkulation weisen die Patienten im akuten Verlauf eine niedrigere Gefäßdichte (TVD 17.88 SD 1.9 vs. 19.34 SD 1.81) und damit einhergehend auch einen niedrigeren Wert der Gefäßoberfläche (VS 22.32 SD 2.54 vs. 23.63 SD 2.08) auf. Dahingegen liegt der Prozentsatz der mittelgroßen Gefäße höher als bei den Messungen lange nach der akuten Erkrankung (Dia m 54.26 SD 7.82 vs. 46.90 SD 6.44). Der höhere MFI (MFI 3.2 SD 0.34 vs. 2.8 SD 0.2) beschreibt eine erhöhte Flussgeschwindigkeit in den Gefäßen zum Zeitpunkt der akuten Erkrankung. Im Bereich der Messwerte der Glykokalix konnte kein Unterschied zwischen Werten bei den Akutfällen und Messungen im Langzeitverlauf gefunden werden.

**Tabelle 16: Messergebnisse Akutfälle**

| <b>Mikrozirkulation Akutfälle</b> | <b>Mittelwert (SD)</b> | <b>Mikrozirkulation Langzeit-Follow-up</b> | <b>Mittelwert (SD)</b> |
|-----------------------------------|------------------------|--|------------------------|
| TVD (mm/mm <sup>2</sup> )         | 17.88 (1.9)            | TVD (mm/mm <sup>2</sup> )                  | 19.34 (1.81)           |
| VS (%)                            | 22.32 (2.54)           | VS (%)                                     | 23.63 (2.08)           |
| Dia S (%)                         | 40.99 (7.68)           | Dia S (%)                                  | 47.13 (7.71)           |
| Dia M (%)                         | 54.26 (7.82)           | Dia M (%)                                  | 46.90 (6.44)           |
| MFI                               | 3.20 (0.34)            | MFI  | 2.832 (0.2)            |
| <b>Glykokalix Akutfälle</b>       | <b>Mittelwert (SD)</b> | <b>Glykokalix Langzeit-Follow-up</b>       | <b>Mittelwert (SD)</b> |
| RBC-Filling (%)                   | 0.68 (0.06)            | RBC-Filling (%)                            | 0.69 (0.53)            |
| PBR5-25 (µm)                      | 2.21 (0.32)            | PBR5-25 (µm)                               | 2.30 (0.28)            |

Vergleich Akutfälle vs. Patienten im Langzeitverlauf, dargestellt als Mittelwert (Standardabweichung SD).

## **6. Diskussion**

In der vorliegenden Fall-Kontroll-Studie wurden die Auswirkungen des Kawasaki Syndroms auf die Mikrozirkulation und die Glykokalix im Langzeitverlauf untersucht. Nach unserem Wissensstand ist zum Zeitpunkt der Studie noch unklar, welche Langzeitauswirkungen das Kawasaki-Syndrom auf das periphere Gefäßsystem hat [64]. Bislang ist bekannt, dass es sich beim KS um eine systemische Entzündungsreaktion handelt, die in der akuten Phase und im chronischen Verlauf sowohl pulmonale, kardiale als auch periphere Gefäße betreffen kann [64, 65]. Im Fokus der Diskussionen über Langzeitauswirkungen des KS stehen beispielsweise Veränderungen der endothelialen Funktion, pathologische Auswirkungen auf das Lipidprofil und ein anhaltendes inflammatorisches Geschehen.

Im Rahmen unserer Studie sollte vor allem die mikrovaskuläre Situation bei Patienten nach vorausgegangenem Kawasaki Syndrom näher betrachtet werden. Dazu führten wir Messungen zur Mikrozirkulation und Glykokalix an Patienten nach vorausgegangenem Kawasaki Syndrom im Vergleich zu einer alters- und geschlechtskonformen Kontrollkohorte durch. Dabei ergaben sich Hinweise auf Veränderungen der Mikrozirkulation auch im Langzeitverlauf nach einer Erkrankung an KS. Die in der vorliegenden Studie angewandte Methodik ist zum Studienzeitpunkt noch kaum in diesem Bereich zur Verwendung gekommen. Im Rahmen der Anwendung der Methodik in der von uns durchgeführten Studie zeigte sich großes Potential, um bei Erkrankungen mit vaskulärer Beteiligung wie dem KS diagnostisch und prognostisch zum Einsatz kommen zu können. Im Folgenden werden die Ergebnisse unserer Untersuchungen und die angewandten Methoden kritisch diskutiert.

### **6.1. Diskussion der Ergebnisse**

#### **Klinische Daten**

Die Erhebung der klinischen Daten zum Studienzeitpunkt ergab keine wesentlichen Unterschiede in den beiden Kohorten Patienten und Kontrollen. Ein alters- und geschlechtskonformer Vergleich konnte dadurch sichergestellt werden. Die Untersuchungen der klinischen Daten der Patienten aus der Akutphase der Erkrankung zeigten für das Kawasaki Syndrom bekannte Auffälligkeiten. Bezüglich der Geschlechterverteilung ergab unsere Auswertung eine deutlich häufigere Erkrankung bei Jungen (64 % zu 16 %). Dies entspricht einem Verhältnis von 1.8 : 1. Diese ungleiche Geschlechterverteilung beim KS ist in der Literatur bereits beschrieben [4, 66]. Die Ursache hierfür konnte allerdings bisher noch nicht gefunden werden. Am naheliegendsten wären genetische Gründe, doch bislang konnten keine beweisenden Hinweise eruiert werden [66]. Etwa ein Drittel der Patienten

entwickelten im Rahmen der Erkrankung an KS ein Aneurysma. Dadurch liegt der prozentuale Anteil an Patienten mit Aneurysmen über dem in der Literatur veröffentlichten Wert von durchschnittlich 25 % [67]. Diese Varianz kann mit der Zusammensetzung unserer Kohorte erklärt werden. Dabei liegt die hohe Rate an Aneurysmen in unserer Studienpopulation vermutlich daran, dass Patienten mit aneurysmatischen Veränderungen im Verlauf der Krankheit häufiger zur Nachsorge kommen und dadurch auch eher an Studien teilnehmen.

Unter den klinischen Daten zeigten sich die erhobenen Blutwerte aus der Akutphase auffällig. Sowohl die erhöhten Thrombozyten, Leukozyten und das CRP als auch der erniedrigte Hb sind aus der Literatur im Rahmen einer Erkrankung an KS bekannt und spiegeln ein akutes Entzündungsgeschehen wider [68].

### **Beeinträchtigung der Mikrozirkulation durch das KS - Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen**

Bislang konzentrierten sich die Bemühungen der Forschung hinsichtlich der Langzeitfolgen nach KS auf Patienten mit koronarer Beteiligung und den damit zusammenhängenden Untersuchungen. Obwohl bekannt ist, dass es sich beim KS um eine systemische vaskuläre Entzündungsreaktion handelt, die auch die peripheren Gefäße betrifft, findet man hierzu noch kaum Daten. Vor allem zu Patienten ohne koronare Beteiligung sind kaum Informationen vorhanden, da in diesen Fällen keine routinemäßigen Kontrolluntersuchungen durchgeführt werden. In unserer Studie gingen wir deshalb der Fragestellung nach, ob es im Rahmen einer Erkrankung an KS im Langzeitverlauf zu messbaren Veränderungen der Mikrozirkulation peripherer Gefäße kommt.

In der Auswertung unserer Mikrozirkulationsmessungen konnten wir weder in einer ersten univariaten Analyse noch in der multivariaten Analyse signifikante Veränderungen zwischen Patienten und Kontrollen feststellen. Die Literatur beschreibt bisher das KS aus histopathologischer Sicht mit einer Entzündungsreaktion der Gefäße mit Ödembildung, Nekrose und Leukozyteninfiltration sowohl an Koronararterien als auch an Arterien der mittleren Größe [69, 70]. Über die Auswirkung des Entzündungsgeschehens auf die Mikrozirkulation finden sich in der Literatur bisher nur sehr wenige Informationen. In den aktuell veröffentlichten Studien konnte festgestellt werden, dass es im Rahmen schwerer Entzündungsreaktionen im Körper zu Veränderungen der Mikrozirkulation kommt. Ursache hierfür scheint unter anderem eine schlechte Oxygenierung des Gewebes, infolgedessen es zu einem Verlust der Kapillardichte kommt [71]. Im Falle einer Sepsis oder eines septischen Schocks kommt es zur Störung der Mikrozirkulation mit der Folge einer verminderten

Gefäßdichte und gleichzeitig zu einem größeren Anteil vermindert durchbluteter Kapillaren [72]. Die zurzeit veröffentlichten Studien zu einer systemischen Beteiligung des peripheren Gefäßstatus Jahre nach stattgehabtem KS zeigen konträre Ergebnisse. In einem Teil der vorausgehenden Studien zum KS wurde festgestellt, dass es nicht nur in der Akutphase des Entzündungsgeschehen, sondern auch im Langzeitverlauf zu Veränderungen der endothelialen Funktion peripherer Arterien kommt, jedoch abhängig von einer vorhandenen oder nicht vorhandenen koronaren Beteiligung [73, 74]. Neuere Studien zeigen allerdings, dass auch Patienten, die keine Beteiligung der Koronararterien aufweisen, eine endotheliale Dysfunktion aufweisen können [74, 75]. Ebenso beschreiben Dhillon et al. in ihrer Studie endotheliale Auffälligkeiten in der Brachialarterie, unabhängig einer koronaren Beteiligung in der Akutphase der Erkrankung [76]. Außerdem zeigen Untersuchungen zu systemischen arteriellen Veränderungen eine geringe aber signifikant höhere arterielle Gefäßsteifigkeit [64]. Eine Studie beschäftigte sich mit der Messung der Tonometrie der peripheren Arterien (ENDO-PAT) und stellte eine signifikante endotheliale Dysfunktion bei Patienten im Langzeitverlauf nach KS fest [75]. Dagegen konnte in einer in Kanada durchgeführten Studie keine Evidenz zu Störungen der endothelialen Funktion lange nach durchgemachtem Kawasaki, unabhängig vom koronaren Status, gefunden werden [77]. Auch die Ergebnisse der Untersuchung zur Mikrozirkulation bei KS-Patienten unserer Studie zeigen zumindest im Langzeitverlauf nach einem KS keine signifikanten Veränderungen der Mikrozirkulation. Woher diese Divergenz der Ergebnisse kommt, ist bislang noch unklar. Mögliche Gründe könnten in den verschiedenen Populationen mit genetischer Variabilität liegen oder auch an den unterschiedlichen Methoden [78]. Ebenso spielt vermutlich auch die Variabilität des Zeitraums zwischen der Erkrankung und den Messungen eine Rolle. Zudem könnte auch das Erkrankungsalter ein Einflussfaktor darstellen.

### **Endotheliale Mikrozirkulation in Zusammenhang mit dem KS - Beurteilung anhand von Veränderungen der Glykokalixdicke**

Durch inflammatorische Prozesse und den damit zusammenhängenden oxidativen Stress kommt es zu einer Schädigung der Glykokalixstruktur und infolgedessen zu einer endothelialen Dysfunktion. Die Messung und Beurteilung der Glykokalixdicke zur Einschätzung einer endothelialen Dysfunktion gewinnt deshalb immer mehr an Bedeutung. In einer Studie zur Untersuchung der Glykokalix und Mikrozirkulation im Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen konnten Hinweise auf eine Korrelation der Dicke der Glykokalix mit der mikrozirkulären Durchblutung gefunden werden. Dabei zeigte sich in einer großen Kohorte eine mit großer Glykokalixdicke (kleine perfused boundary region, PBR) einhergehende gute Durchblutung. Wohingegen eine dünne Glykokalix, entsprechend einer

großen PBR, mit einer pathologischen Veränderung der Mikrozirkulation einhergeht [79]. Somit können über die Glykokalixdicke Rückschlüsse auf den Status der Durchblutung getroffen werden. Auch in weiteren Studien konnten über die von uns angewandte Messmethode der Glykokalixdicke mittels GlycoCheck pathologische Veränderungen der Glykokalix bei unterschiedlichen Pathologien, wie beispielsweise bei Patienten mit Hypertension und bei Patienten, die an chronischen Herzerkrankungen erkrankt waren, festgestellt werden [80, 81]. Daraus entsteht die Vermutung, dass es auch beim KS durch die Vaskulitis möglicherweise zu einer anhaltenden Schädigung der endothelialen Glykokalix kommt. Die Ergebnisse unserer Messungen und Analysen konnten eine solche pathologische Veränderung der Glykokalix bei Patienten mit stattgehabtem KS zumindest im Langzeitverlauf nicht bestätigen. Ob die Glykokalixdicke tatsächlich durch das KS unbeeinträchtigt bleibt, kann durch unsere Studie aufgrund der kleinen Kohorte und der in diesem pathologischen Feld noch nicht etablierten Messmethode nicht abschließend geklärt werden.

### **Einfluss einer koronaren Beteiligung auf die vaskuläre Situation bei KS-Patienten**

In bisher veröffentlichten Studien konnte gezeigt werden, dass die Entstehung von aneurysmatischen Veränderungen während einer KS-Erkrankung in Zusammenhang mit einer endothelialen Funktionsstörung stehen. Dazu wurde in einer in Japan durchgeführten Studie eine Veränderung der peripheren Mikrozirkulation bei Patienten festgestellt, die im Zuge des Kawasaki Syndroms aneurysmatische Veränderungen aufwiesen [82]. In einer Studie von Yamakawa et al. konnte bei Patienten mit koronarer Beteiligung beim KS eine Beeinträchtigung der endothelialen Funktion der Koronararterien festgestellt werden, auch dann, wenn sich die Aneurysmen zurückgebildet hatten [83].

In unserer differenzierten Analyse, in der die Entwicklung einer koronaren Beteiligung miteinbezogen wurde, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit oder ohne aneurysmatischen Veränderungen, unabhängig davon, ob diese zum Zeitpunkt der Messung noch vorhanden waren oder nicht. Allerdings müssen diese Ergebnisse vor dem Hintergrund betrachtet werden, dass die Patientenkohorten nach Einteilung in Gruppen je nach Ausmaß der koronaren Beteiligung mit  $n = 6$  und  $n = 7$  klein waren. Zudem stellt vermutlich die vergangene Zeit zwischen der akuten Erkrankung und der Messung eine bedeutende Rolle bei der Frage nach Veränderungen der Mikrozirkulation dar. Weitere mögliche Gründe für die Unterschiede der Ergebnisse unserer Studie zu den in der Literatur vorhandenen Daten könnten zudem in der Wahl der Messmethode liegen. Wie bereits beschrieben, gibt es zu diesem Forschungsbereich bisher nur sehr wenige Studien. Während der Wissenstand zu einer koronaren Beteiligung inzwischen gewachsen ist, sind

die systemischen Auswirkungen auf vaskulärer Ebene auch im Hinblick auf Patienten mit koronarer Beteiligung noch weitestgehend unerforscht und es sind weitere Studien nötig, um etwaige pathologischen Prozesse auf vaskulärer Ebene darstellen zu können.

### **Zusammenhang der klinischen Daten aus der Akutphase mit Messungen im Langzeitverlauf**

Anhand eines Fragebogens, welcher die international anerkannten Kriterien zum KS abfragte (siehe Anhang 8.3), ermittelten wir die klinischen Daten jedes Patienten aus der Akutphase des KS. Darunter erfragten wir beispielsweise die Fieberdauer, das Ansprechen auf eine Therapie mit Immunglobulinen und die Entwicklung von Aneurysmen.

Bei den Analysen zu einem Zusammenhang zwischen den Daten aus der Akutphase und den Ergebnissen unserer Messmethoden zu Mikrozirkulation und Glykokalix konnten signifikante Auffälligkeiten gefunden werden. Der prozentuale Anteil der Gefäße mit kleinem und mittlerem Durchmesser (Dia s und Dia m) aus der Mikrozirkulationsmessung zeigen in der Regressionsanalyse eine signifikante Korrelation mit den klinischen Werten aus der Akutphase (Dia s  $p = 0.0469$  Dia m  $p = 0.021$ ). Diese Ergebnisse spiegeln einen Zusammenhang des Ausmaßes der Erkrankung in der Akutphase des KS mit dem Status der Mikrozirkulation der Patienten im Langzeitverlauf wider. Insbesondere die Fieberdauer scheint dabei Einfluss auf die mikrozirkuläre Situation der Patienten zu nehmen. Speziell zum KS konnten wir hierzu keine Informationen aus anderen Studien finden. Jedoch ist bekannt, dass es beispielsweise bei einer Sepsis durch inflammatorische Prozesse ebenfalls zu Veränderungen der mikrozirkulatorischen Gefäße und zu einer mikrozirkulatorischen Dysfunktion kommen kann. Diese Veränderungen konnten bereits mit der Vorgängerversion unserer Methodik, dem OPS, dargestellt werden [84]. Bei der Entstehung einer mikrozirkulatorischen Dysfunktion kommt es zu einer Störung des Blutflusses in den Gefäßen. Dabei kann die Flussgeschwindigkeit (MFI) beeinflusst werden. Aber auch die Anzahl und Größe der durchbluteten Gefäße verändert sich durch das inflammatorische Geschehen. Es kommt zu einer Vasokonstriktion großer Gefäße und zu einer Vasodilatation kleinerer Gefäße [85]. Hierbei verschiebt sich das Verhältnis des Durchmessers der durchbluteten Gefäße. Dieser Prozess konnte in einer weiteren Studie beobachtet werden, in der bei Patienten mit einer koronaren Beteiligung im Zuge des KS im Langzeitverlauf die endotheliale Funktion mittels Injektionen mit Acetylcholin in den Koronararterien gemessen wurde. Auch hier zeigte sich bei den KS-Patienten eine auffällige Vasokonstriktion beziehungsweise Vasodilatation [83].

## **Glykokalixbestandteile als Marker einer Beeinträchtigung der vaskulären Situation - Syndecan-1 und Hyaluronsäure**

Bislang sind uns kaum Studien bekannt, die sich mit dem Nachweis von Glykokalixbestandteilen beim KS beschäftigen. Eine der wenigen veröffentlichten Studien hierzu beschreibt einen signifikanten Anstieg von Syndecan-1 und Hyaluronsäure im Serum bei Patienten mit KS in der Akutphase. Dies ist sowohl bei Patienten mit Koronareteiligung als auch bei Patienten ohne Veränderungen der Herzkranzgefäße zu beobachten [46]. In einer weiterführenden Studie wurde auch die Konvaleszenzphase auf Veränderungen von Glykokalixbestandteilen im Blut untersucht. Es zeigten sich auch noch in dieser Zeit nach KS signifikant erhöhte Werte von Syndecan-1 und Hyaluronsäure [48]. Zudem konnten in Untersuchungen bei Patienten mit Sepsis deutlich erhöhte SDC-1-Werte gemessen werden [86]. Sowohl bei einer Sepsis als auch bei einer Erkrankung an KS handelt es sich um einen inflammatorischen Prozess. Hierzu wurde in einer Studie die Korrelation zwischen SDC-1 und dem inflammatorischen Geschehen untersucht. Es zeigte sich eine Assoziation von SDC-1-Werten und inflammatorischen Parametern [87]. Beide in unseren Untersuchungen gemessenen Glykokalixbestandteile, SDC-1 und HA, weisen in verschiedenen anderen Bereichen bereits große Relevanz auf. So konnte beispielsweise in einer Studie zu Patienten mit Sepsis gezeigt werden, dass sowohl SDC-1 als auch HA als prognostische Marker von Bedeutung sind [88]. Stepan et al. unterstützen diese These durch ihre Studie bei Patienten mit Sepsis und nach chirurgischen Eingriffen im Abdomen [89]. Wie sich die Serumparameter im Langzeitverlauf bei KS entwickeln, war nach unserem Wissen bislang unbekannt. In unserer Studie widmeten wir uns deshalb dieser Fragestellung. In der univariaten Analyse zeigten sich zwischen den Patienten und Kontrollen keine signifikanten Unterschiede in der Konzentration der Glykokalixabbauprodukte (SDC-1  $p = 0.986$ , HA  $p = 0.113$ ).

Um den Einfluss einer koronaren Beteiligung beim KS auf die Glykokalix und damit auch die Glykokalixabbauprodukte zu messen, führten wir die Analysen ebenfalls bei den Patientengruppen nach Einteilung nach koronarem Status durch. Dabei konnten auch bei Patienten mit noch bestehenden Aneurysmen keine signifikant erhöhten Glykokalixbestandteile nachgewiesen werden.

Im Vergleich zu den in der Literatur beschriebenen Informationen zu Glykokalixabbauprodukten bei Patienten mit Sepsis und aus der Akutphase des KS scheint der Zeitpunkt der Untersuchung und das Vorhandensein von aneurysmatischen Veränderungen relevant zu sein, wie stark und ob noch erhöhte Glykokalixbestandteile nachgewiesen werden können. So waren die in der vorliegenden Studie untersuchten Patienten zum Zeitpunkt der Messungen im Mittel 8 Jahre zuvor an KS erkrankt. Die von Luo et al. [46] und Ohnishi et al. [48] veröffentlichten Daten mit signifikant erhöhten HA-Werten

und SDC-1-Werten bei KS-Patienten beziehen sich dagegen auf Messungen bis spätestens zur Konvaleszenzphase. Daraus lässt sich schließen, dass es zwar in der Akutphase und in der Konvaleszenzphase nach der akuten Erkrankung zu pathologisch erhöhten Serumbestandteilen der Glykokalix beim KS kommen kann, jedoch im Langzeitverlauf sich die endotheliale Glykokalix wieder erholt und dadurch lange nach der akuten Erkrankung keine signifikant erhöhten HA- und SDC-1-Werte mehr messbar sind.

### **Untersuchungen in Bezug auf ein kardiovaskuläres Risiko durch das KS**

Ob und in welchem Ausmaß das KS mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko und der Entwicklung einer Atherosklerose in Zusammenhang steht, wird bisher noch diskutiert. Eine wichtige Rolle spielen hierbei die Lipidwerte als kardiovaskuläre Risikofaktoren. Newburger et al. führten eine Studie zu Cholesterinwerten bei Kawasaki Syndrom in der Akutphase und lange nach Erkrankung durch. Es zeigten sich vor allem in der Akutphase pathologisch veränderte Cholesterinwerte. Aber auch in den Langzeitbeobachtungen ließen sich Veränderungen des Lipidprofils durch das KS feststellen. Das HDL zeigte auch 3 und 10 Jahre nach der akuten Erkrankung noch niedrigere Werte als in der Kontrollpopulation. Auch die Triglyceridwerte waren auffällig. Als Grund für die verminderten HDL-Werte vermuteten Newburger et al. eine verminderte Aktivität der Lipoproteinlipase als Folge einer endothelialen Dysfunktion [9]. Eine weitere Studie, die sich mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko nach KS beschäftigte, stellte erhöhte Triglyceridwerte bei Patienten mit KS fest [90]. Vor allem bei Patienten mit KS und koronarer Beteiligung fielen in einer Studie erniedrigte HDL-Werte auf [91].

In unseren Analysen zeigten die Blutfettwerte ebenfalls auffällige Ergebnisse in der Patientengruppe. Hierunter war sowohl ein erhöhter Triglyceridwert bei den Patienten (112.5 SD 64.4 vs. 88.5 SD 34.6,  $p = 0.042$ ) als auch ein höherer LDL/HDL-Quotient (2.361 SD 0.661 vs. 1.967 SD 0.544,  $p = 0.056$ ). Die beschriebenen auffälligen Werte weisen in Zusammenhang mit den bisherigen Vermutungen aus anderen Studien auf eine Veränderung des Lipidprofils durch das KS hin, womit ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko nicht ausgeschlossen werden kann. In den Analysen zu einer Korrelation zwischen den Glykokalixabbauprodukten SDC-1 und HA sowie LDL/HDL beziehungsweise zwischen den Glykokalixabbauprodukten und den Untersuchungen zu Mikrozirkulation und Glykokalix konnten keine signifikanten Hinweise auf ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko speziell in der Patientengruppe gefunden werden. Um generell die Zusammenhänge von Glykokalixabbauprodukten mit Lipidwerten beziehungsweise der Mikrozirkulation und Glykokalix zu untersuchen, führten wir Korrelationsanalysen in einer gemeinsamen Kohorte aus Patienten und Kontrollprobanden durch. Die Ergebnisse der Auswertung ergaben eine

signifikante Korrelation der Konzentration von HA mit dem LDL/HDL-Quotienten und mit systolischen Blutdruckwerten. Dies bestärkt unsere Annahme, dass grundsätzlich ein Zusammenspiel zwischen HA als Marker einer Glykokalixschädigung und kardiovaskulären Risikofaktoren wie den Blutfettwerten und dem Blutdruck vorliegt. Da HA ein wichtiger Bestandteil der endothelialen Glykokalix darstellt, besteht somit auch ein Zusammenhang zwischen der Glykokalix und dem kardiovaskulären System.

Folglich scheint eine Beeinträchtigung der Glykokalix in Zusammenhang mit kardiovaskulären Risikofaktoren wie erhöhten Lipidwerten oder Blutdruckwerten zu stehen. Für SDC-1 zeigte sich eine Korrelation mit dem Mikrozirkulationsparameter der Flussgeschwindigkeit MFI. Hohe SDC-1-Werte gehen dabei mit höheren Flussgeschwindigkeiten (MFI) einher. Die Gründe für einen hyperdynamischen Fluss (hoher MFI) sind bisher noch unbekannt [92]. Ein möglicher Einflussfaktor könnte ein erhöhter Nährstoffbedarf im Gewebe sein. Durch den steigenden Metabolismus kommt es zu einer reaktiven Erhöhung des Blutflusses [93]. So wurde beispielsweise bei Patienten mit Sepsis ein beschleunigter Blutfluss gemessen [94]. Ein verminderter Blutfluss konnte von De Backer et al. ebenfalls bei Patienten mit Sepsis nachgewiesen werden. Jedoch scheint dies nur kleine Gefäße zu betreffen [84]. Dieser heterogenen Perfusion können mehrere Ursachen zu Grunde liegen. Eine mögliche Erklärung ist, dass in Gebieten mit hyperdynamischem Fluss eine geringere Kapillardichte vorliegt als in hypodynamischen Regionen [95]. Da diese Beobachtung bisher noch nicht speziell bei KS-Patienten stattfand, kann daraus für diese Kohorte keine Aussage bezüglich des damit verbundenen vaskulären Risikos getroffen werden. Was die Ergebnisse generell bedeuten und inwiefern man von dem Wissen diagnostisch oder therapeutisch profitiert, konnte im Rahmen unserer Studie nicht geklärt werden.

Die Literatur liefert bereits Hinweise für Zusammenhänge der Glykosaminoglykane (SDC-1 und HA) im Blut mit Laborparametern und der endothelialen Funktion. Bielecka et al. konnten in ihrer Studie einen mit erhöhten Blutdruckwerten einhergehenden erhöhten Wert von SDC-1 im Serum der Patienten beobachten [96]. In einer Studie von Ravinder et al. wurde eine durch erhöhte LDL-Werte stimulierte vermehrte Produktion von HA herausgefunden [97]. Einen vergleichbaren Effekt lieferte eine Studie von Viola et al. Hier zeigte sich ebenfalls ein durch LDL stimulierter Anstieg des HA-Metabolismus [98]. Auch eine Korrelation von HA-Werten im Serum mit dem Blutdruck lässt sich in vorausgegangenen Studien wiederfinden. So konnte beispielsweise bei Frauen, die im Rahmen einer Präeklamsie erhöhte Blutdruckwerte aufwiesen, erhöhte HA-Werte nachgewiesen werden [99]. Auch in einer weiteren Studie an unserer Institution, in der der Zusammenhang zwischen einem erhöhten kardiovaskulären Risiko und der endothelialen Glykokalix bei KS-Patienten näher betrachtet

und untersucht wurde, konnten signifikante Ergebnisse gefunden werden. Dabei wurde ebenfalls ein Zusammenspiel von kardiovaskulären Risikoparametern wie Lipidwerten und Blutdruck mit den endothelialen Abbauprodukten SDC-1 und HA beobachtet [57]. Die beschriebenen Ergebnisse der vorliegenden Studie scheinen sich mit den in der Literatur beschriebenen Zusammenhängen zu decken. Eine Beeinträchtigung der Glykokalix durch einen erhöhten systolischen Blutdruck wurde von Ikonomidis et al. in einer Studie zum Zusammenhang der Glykokalix bei Patienten mit unbehandeltem Hypertonus beobachtet [24]. Diese Beobachtungen weisen auf ein erhöhtes atherosklerotisches und damit einhergehend auch kardiovaskuläres Risiko durch die Erkrankung an KS hin. Unter Betrachtung mehrerer Faktoren wie der Dicke der Intima Media, der endothelialen Funktion und der Gefäßsteifigkeit wurde in einer Metaanalyse ebenfalls ein erhöhtes Risiko vor allem bei Patienten mit koronarer Beteiligung beschrieben [21]. Parallel zur vorliegenden Studie wurden an der gleichen Institution Untersuchungen zur Einschätzung des kardiovaskulären Risikos bei KS-Patienten anhand von Messungen der Intima Media durchgeführt. Dabei zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied der Intima Media bei Patienten und Kontrollen, wodurch auch ein erhöhtes atherosklerotisches Risiko in diesen Analysen nicht nachgewiesen werden konnte [56].

Bislang gibt es wenig Informationen dazu, inwiefern die beschriebenen Zusammenhänge einer beeinträchtigten Glykokalix mit Laborparametern und klinischen Daten auch als prognostische Hinweise für noch nicht entdeckte Pathologien dienen können. Bekannt ist jedoch, dass beispielsweise bei Patienten, die durch einen Typ-1-Diabetes ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko und Risiko für Atherosklerose haben, die Hyaluronsäure-Werte deutlich erhöht zu sein scheinen [100].

Nach unserem aktuellen Wissensstand beeinflussen mehrere Faktoren den vaskulären Status und damit das kardiovaskuläre und atherosklerotische Risiko der KS-Patienten. Dabei spielt das Inflammationsgeschehen und das damit einhergehende Shedding der Glykokalix sicherlich eine große Rolle. Aber auch das beschriebene veränderte Lipidprofil und erhöhte Blutdruckwerte scheinen mit beteiligt zu sein. Den genauen pathophysiologischen Mechanismus, der das Risiko für kardiovaskuläre Veränderungen durch das KS hervorruft, ist dennoch bisher nicht geklärt. Vermutet wird aber, dass eine chronische Inflammation zu einem erhöhten Risiko für Atherosklerose lange nach einem KS führen könnte. Diese Annahme beruht auf gemessenen erhöhten inflammatorischen Parametern wie beispielsweise ein erhöhter CRP-Wert bei Patienten mit koronarer Beteiligung im Langzeitverlauf nach einem KS [101, 102].

## **Beteiligung der Glykokalix und Mikrozirkulation in der Akutphase des KS**

Die bisher beschriebenen und diskutierten Ergebnisse beziehen sich auf Daten lange nach einer Erkrankung an KS. Zusätzlich zur rekrutierten Patienten- und Kontrollgruppe untersuchten wir im Rahmen der vorliegenden Studie auch Patienten, die sich während der Studienlaufzeit in der Klinik in der Akutphase des KS vorstellten. Der bei diesen Patienten mit akutem KS gemessene schnellere Blutfluss (höherer MFI) und die niedrigere Gefäßdichte (TVD) im Vergleich zu den Kontrollen bestärken die Annahme, dass es durch das KS zu einer Verringerung der Kapillardichte und als Ausgleich zu einem reaktiven Anstieg des MFI zur ausreichenden Versorgung des Gewebes kommt. Eine ähnliche Beobachtung wurde bei Patienten mit Sepsis gemacht. Im Vergleich zu gesunden Kontrollen zeigte sich bei Patienten mit Sepsis ebenfalls eine geringere Gefäßdichte [84]. Somit scheint es einen Zusammenhang eines inflammatorischen Prozesses und einer Veränderung der Mikrozirkulation zu geben. Für Patienten mit KS stellt sich die Frage, inwiefern sich dies nur auf die Akutphase bezieht oder auch Folgen für den Langzeitverlauf hat.

## **6.2. Diskussion der Methodik**

### **Geräte und Technik**

Für die Messungen der Glykokalixdicke und Mikrozirkulation wurde das MicroScan Mikroskop mit der Sidestream Dark Field Imaging Technik verwendet. Mit dieser Methodik konnten bei Erwachsenen Veränderungen der Mikrozirkulation bei sublingualen Messungen festgestellt werden [92]. Einschränkungen dieser Messmethode beruhen hauptsächlich auf der geringen Eindringtiefe, sodass nur durch die Messung der Mikrozirkulation sublingual Rückschlüsse auf die allgemeine Beeinträchtigung der Mikrozirkulation geschlossen werden konnte.

Die Glykokalixabbauprodukte HA und SDC-1 wurden mittels ELISA bestimmt. Bei dieser Basismethodik handelt es sich um eine etablierte Routinetechnik, die im Labor häufig durchgeführt wird und so keine speziellen Voraussetzungen nötig waren.

### **Messung der Mikrozirkulation mittels AVA**

Im Rahmen der Analysen zu Mikrozirkulation und Glykokalix verglichen wir Patienten im Langzeitverlauf nach stattgehabtem Kawasaki Syndrom mit gesunden Kontrollen.

Die Mikrozirkulationsmessung mittels AVA ist ein schon lange erprobtes Messverfahren.

Aufgrund der fehlenden Strahlenbelastung ist es eine etablierte Methodik zur Anwendung bei Kindern. Vor allem zur Messung der Mikrozirkulation bei generalisierten Infektionen und Sepsis wurde das SDF-Imaging bisher erfolgreich eingesetzt [35, 84, 103, 104].

Zum Zeitpunkt der Studie erfolgen Therapieentscheidungen bei Erkrankungen mit Gefäßbeteiligung größtenteils durch Bestimmung makrozirkulatorischer Parameter wie beispielsweise Blutdruckmessungen. Grund dafür ist die fehlende Möglichkeit einer praktikablen Messung zur Beurteilung der Mikrozirkulation im klinischen Alltag. Die in dieser Studie verwendete Methodik des Sidestream Darkfield Imaging und die GlycoCheck-Messung bieten großes Potential diese Lücke zu füllen.

### **Limitationen**

Zum Erreichen einer optimalen Bildqualität ist eine stabile Positionierung der Messsonde am Zungengrund erforderlich. Vor allem bei sehr jungen Kindern kann es durch Bewegungen und dadurch zur Entstehung von Artefakten kommen. Des Weiteren kann es durch zu starken Druck auf das Gewebe zur Stase des Blutflusses kommen. Da der Untersucher aber das aufzunehmende Bild direkt sieht, kann er die Kompression erkennen und dem Artefakt

so entgegenwirken. Zudem wurden pro Proband mindestens drei Sequenzen aufgenommen, sodass die Wahrscheinlichkeit technischer und systematischer Fehler reduziert werden konnten. Um die automatisierte Analyse zu ermöglichen, muss der Untersucher aus den jeweiligen Videoabschnitten Bildsequenzen mit stabilen Bildern und ohne Artefaktüberlagerung heraussuchen. Zur Vermeidung einer interindividuellen Variabilität wurden die Untersuchungen und Auswertungen nur durch eine Person durchgeführt.

Ein Problem der Mikrozirkulationsmessung ist das Fehlen von Normwerten. Gründe hierfür sind geringe Anzahl der Patienten in den bereits bestehenden Studien und Unterschiede in den Messbedingungen. So konnte ein Vergleich nur mit der Kontrollgruppe, nicht aber mit Normwerten aus einem großen Kollektiv erfolgen.

### **Parameter**

Die Berechnung der Parameter erfolgte automatisiert über das Softwareprogramm AVA. Um einen subjektiven Einfluss zu verhindern, wurde keine manuelle Nachbearbeitung durchgeführt. Somit konnte eine Interrater-Reliabilität sichergestellt werden.

#### **TVD**

Die Gefäßdicke kann als quantitativer Parameter zur Messung der Hautdurchblutung hergenommen werden. Durch die SDF-Technik werden nur perfundierte Gefäße erfasst, sodass die TVD als indirekter Indikator für die Sauerstoffversorgung des Gewebes angesehen werden kann.

#### **VS**

Die Gefäßoberfläche wird von der Software AVA automatisch berechnet und dadurch vom Untersucher unabhängig. Es wird der Anteil der von Gefäßen bedeckten Fläche an der Gesamtfläche des Bildausschnittes berechnet. Aufgrund der vollautomatischen Berechnung der VS könnte dieser Parameter ein wichtiger Marker sein, um künftig schnell zuverlässige Aussagen über die Mikrozirkulation zu erlangen.

#### **MFI**

Über den MFI kann die Flussqualität in verschiedenen Gefäßgrößen bestimmt und ausgewertet werden. Dadurch lässt sich einschätzen, wie gut die unterschiedlich großen Gefäße perfundiert sind. Als normal gilt ein kontinuierlicher Fluss. Beeinträchtigt werden kann der MFI vor allem durch zu starken Druck mit der Messsonde auf die Gefäße.

## **Messung der Glykokalix mittels GlycoCheck**

Bei der Messung der Glykokalix mittels GlycoCheck untersuchten wir im Speziellen, ob es im Rahmen der Erkrankung am Kawasaki Syndrom zu einer Schädigung der Glykokalix kommt und diese zu Langzeitveränderungen führt. Die Messung der Glykokalixdicke ist eine neue Methodik, die aber aufgrund der nicht-Invasivität und der Objektivität zunehmend an Bedeutung gewinnt. In verschiedenen Studien konnten Veränderungen der Glykokalixdicke bei diversen Krankheiten wie der Sepsis, der arteriellen Hypertonie und rheumatischen sowie kardiovaskulären Erkrankungen aufgezeigt werden [32, 80, 105].

Ein wesentlicher Vorteil der Messungen mit GlycoCheck ist die einfache Handhabung, die vollautomatische und standardisierte Auswertung sowie die Reproduzierbarkeit [106, 107]. Die europäische Gesellschaft der Arbeitsgemeinschaft Kardiologie empfiehlt deshalb auch diese Methode zur Bewertung der endothelialen Integrität [34]. Basierend auf diesem Wissen wurde in der vorliegenden Arbeit die Glykokalix auf Schädigungen durch die vorherrschende Vaskulitis beim Kawasaki Syndrom untersucht. Zur Messung der Glykokalixdicke bei Kindern gibt es bislang kaum Studien. Dabei eignet sich diese Messmethode besonders gut, da sie umgehend ohne weitere Auswertungen ein objektives Ergebnis liefert. Dadurch besteht für die Zukunft besonderes Potential bei akuten Erkrankungen, bei denen eine schnelle Einschätzung des Krankheitsstatus essenziell für die weitere Therapie ist.

### **Parameter**

Die gemessenen Parameter mittels GlycoCheck wurden von der Software automatisch bestimmt. Somit musste keine nachträgliche Bearbeitung stattfinden. Die Daten konnten direkt gespeichert und ausgewertet werden.

### **Limitationen**

Das integrierte Programm zur Auswertung der aufgenommenen Sequenzen stellt hohe Anforderungen an Bildqualität und -stabilität. Aufgrund dessen ist die sublinguale Messung erst bei Kindern ab einem Alter von ca. fünf Jahren möglich. Unseren Erfahrungen nach schafft es kaum ein jüngeres Kind ohne Sedierung die Zunge so lange ruhig zu halten, um die geforderte Bildstabilität zu ermöglichen. Aufgrund der noch nicht lange bestehenden Messmöglichkeit der Glykokalix über GlycoCheck stehen wie auch bei der SDF-Messung auch hier noch keine Daten zu Normwerten zur Verfügung. Dadurch konnte nur ein Vergleich zu den Werten der Kontrollgruppe erfolgen. Für eine verlässliche Angabe zu Normwerten wäre hier eine größere Kontrollkohorte nötig.

## **Messung von Glykokalixabbauprodukten mittels ELISA**

Die beiden Glykokalixabbauprodukte Syndecan-1 und Hyaluron wurden in der vorliegenden Studie mittels ELISA nachgewiesen. Die zu Grunde liegende Patienten- und Kontrollkohorte war alters- und geschlechtskonform. Trotzdem müssen die Ergebnisse unter Beachtung der kleinen Patientenkohorte und den unterschiedlichen Zeitpunkten der Erkrankung betrachtet werden. Die Messung von Proteinen über ELISA ist eine weit verbreitete diagnostische Methodik sowohl in der Medizin als auch in der Industrie. Ihre Stärken liegen in dem Nachweis von sehr kleinen Konzentrationen der gesuchten Antigene oder Antikörper [61].

### **Limitationen**

Wie in den meisten labortechnischen Auswertungen gibt es auch bei den ELISAs das Risiko von Störeinflüssen wie Verunreinigungen oder Einflüsse durch verschiedene Medikamente. Um das gesuchte Protein nachweisen zu können, wird ein passender Antikörper oder ein passendes Antigen benötigt. Außerdem dürfen die Werte der Probenkonzentrationen nicht über den Werten des Maximums der Standardkurve liegen, da die Reaktionen in den darüber liegenden Bereichen nicht linear verlaufen [61].

## **Studiendesign und Patientenkollektiv**

Wir führten die Messungen im Rahmen einer Fall-Kontroll-Studie durch. Aufgrund der Rekrutierung von Kontrollen über den Freundeskreis der Patienten erreichten wir eine alters- und geschlechtskonforme Kontrollgruppe. Die Daten aller Patienten wurden anhand eines standardisierten Fragebogens evaluiert. So stellten wir sicher, dass alle Patienten die international anerkannten Kriterien für ein KS erfüllten. Außerdem erhielten wir über den Fragebogen detaillierte Informationen über den Erkrankungsverlauf der Patienten. Mit Hilfe der Rekrutierung von Patienten über unterschiedliche Wege wie ESPED, Fälle der LMU und Facebook erhielten wir ein Spektrum von Patienten aus ganz Deutschland. Damit stellen unsere Daten ein repräsentatives Bild von KS-Fällen aus ganz Deutschland dar.

### **Limitationen**

Unsere Ergebnisse müssen in dem Bewusstsein einer kleinen untersuchten Kohorte betrachtet werden. Zudem sollte die starke Variation der vergangenen Zeit zwischen Erkrankung und Studienuntersuchung nicht außer Acht gelassen werden.

## 7. Ausblick

In der vorliegenden Studie wurden mittels Messungen der Mikrozirkulation und der endothelialen Glykokalix Patienten nach stattgehabtem Kawasaki-Syndrom auf vaskuläre Veränderungen im Langzeitverlauf untersucht.

Mithilfe der in unserer Studie angewandten nichtinvasiven Methode zur Messung der Mikrozirkulation und der endothelialen Glykokalix besteht für die Zukunft großes Potential zur Diagnose, vor allem bei Erkrankungen mit inflammatorischen Prozessen. Insbesondere für Messungen bei Kindern eignen sich diese Methoden aufgrund der einfachen Anwendung und fehlenden Nebenwirkungen besonders gut. Um verlässliche Ergebnisse zu erzielen, benötigt man allerdings noch Normwerte aus größeren Kollektiven als Vergleichswerte. Zur alleinigen Diagnostik und Therapieentscheidung reichen die Methoden und das Wissen dazu zwar noch nicht aus, doch bereits jetzt können hilfreiche Erkenntnisse zur Störung der Mikrozirkulation und so zur Versorgung des Gewebes mit Nährstoffen und Sauerstoff erlangt werden. Zur Verbesserung der Methodik und dadurch zur besseren klinischen Handhabung sollte das automatisierte Auswertungsprogramm verbessert werden, um Artefakte auszuschließen und eine sofortige Ausgabe der relevanten Ergebnisse zu ermöglichen.

Die Option, die Mikrozirkulation direkt am Bett durchführen zu können und sofort Ergebnisse vorliegen zu haben, eröffnet unter anderem die Möglichkeit einer umgehenden Therapie im akuten Erkrankungsfall. Zudem bleibt die Frage nach eventuellen Veränderungen der Konzentration der Glykokalixabbauprodukte im Serum und deren Auswirkungen für die KS-Patienten offen. Die bisher vorliegenden Studien hierzu zeigen zumindest in der Akut- und Konvaleszenzphase des KS Veränderungen. Welche Konsequenzen sich durch diese Ergebnisse für den vaskulären Status und dadurch auch für das kardiovaskuläre Risiko der Patienten ergibt, bleibt ein großes Thema der zukünftigen Forschung. Bezüglich des kardiovaskulären Risikos sind die in unserer Studie signifikant erhöhten Lipidwerte bei KS-Patienten sicherlich ein spannender Bereich für weitere Studien.

## 8. Anhang

### 8.1. Patienten-/Elterninformation Patientengruppe

#### Elterninformation/Patienteninformation (Patientengruppe)

Liebe/r Patient/in  
Bzw. liebe Erziehungsberechtigte von

\_\_\_\_\_  
Name des Kindes/Patientenkleber

Wir führen aktuell eine Studie zur Abschätzung des kardiovaskulären Langzeit-Risikos bei Kindern/Patienten mit durchgemachten Kawasaki-Syndrom durch.

Das Kawasaki-Syndrom ist eine Entzündung, die auch die Gefäßwände betreffen kann. Ob diese Entzündung eine langfristige Auswirkung auf die Gefäße hat, ist jedoch nach wie vor nicht eindeutig bekannt. Mit dieser Studie möchten wir valide Parameter identifizieren, mithilfe derer wir das langfristige Risiko für Herz-Kreislaufkrankungen abschätzen und zu einer möglichst effektiven Prävention beitragen können.

Dazu möchten wir einmalig unterschiedliche Untersuchungen bei Ihrem Kind durchführen, mit denen wir Veränderungen in verschiedenen Gefäßabschnitten feststellen können. Die Messergebnisse werden zudem im Zusammenhang mit etablierten Blutwerten, die wir bereits routinemäßig zur Beurteilung des kardiovaskulären Risikos hernehmen, z.B. Cholesterin, untersucht.

1. **Pulswellengeschwindigkeit (PWV):** Die PWV stellt den Verlauf der Geschwindigkeit des Blutes im Gefäßsystem während des Herzschlags graphisch dar und wird mithilfe eines speziellen Blutdruckmessgerätes gemessen. Dieses wird bereits routinemäßig zur Erfassung von Herz-Kreislauf-Risiken eingesetzt. Für die Untersuchung wird eine passende Blutdruckmanschette am Oberarm angelegt, welche sich automatisch aufpumpt. Die Messung erfolgt ähnlich einer normale Blutdruckmessung, dauert jedoch wenige Minuten, in denen die Kinder möglichst ruhig sitzen sollten. Risiken bestehen hierbei nicht.
2. **Carotid Intima Media Thickness und Roughness (cIMT, cIMR):** Die innerste Schicht einer Arterie ist die sog. Intima-Media. Die Dicke (=thickness) und die Rauigkeit bzw. Oberflächenbeschaffenheit (=roughness) dieser Intima-Media können sich verändern z.B. bei Patienten mit Diabetes. Mithilfe eines herkömmlichen Ultraschallgerätes messen wir die IMT und IMR der Halsschlagader (=Carotis). Die Untersuchung erfolgt im Liegen, wobei sowohl die rechte als auch die linke Halsschlagader untersucht werden. Die Ultraschalluntersuchung ist risiko- und strahlungsfrei.

### **3. Veränderungen der Mikrozirkulation incl. der mikrovaskulären Glykokalyx:**

Über die Darstellung der Mikrozirkulation und Glykokalyxdicke wollen wir neue und genauere Informationen über den Aufbau und die Funktion der kleinsten Blutgefäße erlangen. Die Mikrozirkulation ist dabei der Blutfluss in den kleinsten Gefäßen. Die Glykokalyx ist eine aus Zucker- und Eiweißbestandteilen bestehende Zellmembran, die gesunde Gefäße von innen auskleidet. Sie nimmt einen zentralen Platz in der Regulation der Gefäßfunktionen ein. Kommt es zu einem Abbau oder einer Veränderung der Glykokalyx, kann dadurch eine Fehlfunktion der Blutgefäße mit schwerwiegenden Folgen entstehen.

Die Untersuchung der Gefäße erfolgt mittels eines Videomikroskopes, welches grünes Licht in das Gewebe entsendet. Dieses Licht wird von den roten Blutkörperchen in den Gefäßen absorbiert, dagegen wird es vom umliegenden Gewebe reflektiert. Mit einem Messfühler, den wir unter die Zunge oder an die Ohrmuschel des Patienten halten, wird das reflektierte Licht detektiert und in ein bewegtes Bild der Gefäße umgesetzt. Über eine Verbindung mit einem Computer werden die Bilder digital aufgezeichnet und im Anschluss analysiert und ausgewertet.

Die Untersuchung dauert ca. 15 Minuten, ist schmerzlos, strahlungsfrei und ohne Risiko. Durch besondere Konzeption der Lichtquelle kommt es zu keiner Erwärmung oder anderen Auswirkungen auf die Haut.

### **4. Periphere arterielle Tonometrie (PAT-Messung):**

Diese Messung ermöglicht uns eine direkte Aussage über die Gefäßfunktion. Durch eine Blutdruckmanschette am Oberarm wird die Durchblutung des Armes beeinflusst und durch einen speziellen Sensor an der Fingerkuppe die Gefäßreaktion darauf ermittelt. Dabei wird eine Blutdruckmanschette an einen der Arme angelegt und die Blutdruckmanschette soweit aufgepumpt, dass die Blutzufuhr für kurze Zeit unterbunden wird, dabei fühlt sich der Arm etwas schläfrig an. Nach Ablassen des Manschettendruckes messen wir über den Fingersensor wie gut sich die Gefäße Erweitern bzw. Engstellen können. Dies birgt keinerlei Gefahren noch sind irgendwelche Nebenwirkungen bekannt.

Ziel ist es, durch unsere Untersuchungen diese Parameter für Kinder mit Kawasaki-Syndrom anwendbar zu machen und die Zuverlässigkeit der Parameter abzuschätzen.

Sie können vollkommen frei entscheiden, ob Sie einer Teilnahme Ihres Kindes an der Studie zustimmen. Sollten Sie ablehnen, wird dadurch keinerlei Nachteil für die weitere medizinische Versorgung Ihres Kindes entstehen.

#### Datenschutz:

Die Vorschriften über die ärztliche Schweigepflicht und den Datenschutz werden bei dieser Studie eingehalten. Die persönlichen Daten und Befunde von Ihnen/Ihres Kindes, werden gespeichert und nur verschlüsselt (pseudonymisiert), d.h. weder Ihr Name, Initialen oder Geburtsdaten/der Name, Initialen oder Geburtsdatum Ihres Kindes erscheinen im Verschlüsselungscode, weitergegeben.

Eine Entschlüsselung erfolgt lediglich in Fällen, in denen es Ihre eigene Sicherheit erfordert („medizinische Gründe“) oder falls es zu Änderungen in der wissenschaftlichen Fragestellung kommt („wissenschaftliche Gründe“). Im Falle von Veröffentlichungen der Studienergebnisse bleibt die Vertraulichkeit der persönlichen Daten gewährleistet.“

Im Falle eines Widerrufs ihrer Einwilligung werden die pseudonymisiert gespeicherten Daten vernichtet.

Der Zugang zu den Originaldaten und zum Verschlüsselungscode ist auf den Studienleiter Dr. med. André Jakob und von ihm berechnigte Personen beschränkt.

Die Unterlagen werden in der Abteilung für Kinderkardiologie am Dr. von Haunerschen Kinderspital, Kinderklinik und Kinderpoliklinik der LMU München, Lindwurmstraße 4, 80337 München gespeichert und für 20 Jahre aufbewahrt.

Gerne können Sie sich bei weiteren Fragen an die Studienleitung bzw. Studienkoordinatoren wenden. Wir würden uns sehr freuen, wenn Sie der Teilnahme Ihres Kindes zustimmen würden.

Mit freundlichen Grüßen

### **Einverständniserklärung**

Ich bin mit der Teilnahme an der o.g. Studie einverstanden. Ich habe verstanden, welche Untersuchungen bei meinem Kind gemacht werden sollen und es wurden alle Fragen beantwortet.

Ich weiß, dass die Untersuchungen freiwillig sind und die Untersuchungen auf Wunsch jederzeit abgebrochen werden können.

Ich erlaube den Ärzten Daten meines Kindes in verschlüsselter Form zu sammeln, zu speichern und an von ihnen berechnigte Personen weiterzugeben. Eine Teilnahme an der Studie kann jederzeit widerrufen werden.

---

Dr. André Jakob  
Studienleitung

---

Miriam König/Sarah Walter/Julian Bäuerle  
Studienkoordination/Doktorandinnen

---

Ort, Datum

---

Name und Unterschrift

## 8.2. Patienten-/Elterninformation Kontrollgruppe

### Elterninformation/Patienteninformation (Kontrollgruppe)

Liebe/r Patient/in  
Bzw. liebe Erziehungsberechtigte von

\_\_\_\_\_  
Name des Kindes/Patientenkleber

Wir führen aktuell eine Studie zur Abschätzung des kardiovaskulären Langzeit-Risikos bei Kindern/Patienten mit durchgemachten Kawasaki-Syndrom durch.

Das Kawasaki-Syndrom ist eine Entzündung, die auch die Gefäßwände betreffen kann. Ob diese Entzündung eine langfristige Auswirkung auf die Gefäße hat, ist jedoch nach wie vor nicht eindeutig bekannt. Mit dieser Studie möchten wir valide Parameter identifizieren, mithilfe derer wir das langfristige Risiko für Herz-Kreislaufkrankungen abschätzen und zu einer möglichst effektiven Prävention beitragen können.

Dazu möchten wir einmalig unterschiedliche Untersuchungen bei Ihrem Kind durchführen, mit denen wir Veränderungen in verschiedenen Gefäßabschnitten feststellen können. Die Messergebnisse werden zudem im Zusammenhang mit etablierten Blutwerten, die wir bereits routinemäßig zur Beurteilung des kardiovaskulären Risikos hernehmen, z.B. Cholesterin, untersucht.

1. **Pulswellengeschwindigkeit (PWV):** Die PWV stellt den Verlauf der Geschwindigkeit des Blutes im Gefäßsystem während des Herzschlags graphisch dar und wird mithilfe eines speziellen Blutdruckmessgerätes gemessen. Dieses wird bereits routinemäßig zur Erfassung von Herz-Kreislauf-Risiken eingesetzt. Für die Untersuchung wird eine passende Blutdruckmanschette am Oberarm angelegt, welche sich automatisch aufpumpt. Die Messung erfolgt ähnlich einer normale Blutdruckmessung, dauert jedoch wenige Minuten, in denen die Kinder möglichst ruhig sitzen sollten. Risiken bestehen hierbei nicht.

2. **Carotid Intima Media Thickness und Roughness (cIMT,cIMR):** Die innerste Schicht einer Arterie ist die sog. Intima-Media. Die Dicke (=thickness) und die Rauigkeit bzw. Oberflächenbeschaffenheit (=roughness) dieser Intima-Media können sich verändern z.B. bei Patienten mit Diabetes. Mithilfe eines herkömmlichen Ultraschallgerätes messen wir die IMT und IMR der Halsschlagader (=Carotis). Die Untersuchung erfolgt im Liegen, wobei sowohl die rechte als auch die linke Halsschlagader untersucht werden. Die Ultraschalluntersuchung ist risiko- und strahlungsfrei.

3. **Veränderungen der Mikrozirkulation incl. der mikrovaskulären Glykokalyx:**

Über die Darstellung der Mikrozirkulation und Glykokalyxdicke wollen wir neue und genauere Informationen über den Aufbau und die Funktion der kleinsten Blutgefäße erlangen. Die Mikrozirkulation ist dabei der Blutfluss in den kleinsten Gefäßen. Die Glykokalyx ist eine aus Zucker- und Eiweißbestandteilen bestehende Zellmembran, die gesunde Gefäße von innen auskleidet. Sie nimmt einen zentralen Platz in der Regulation der Gefäßfunktionen ein. Kommt es zu einem Abbau oder einer Veränderung der Glykokalyx, kann dadurch eine Fehlfunktion der Blutgefäße mit schwerwiegenden Folgen entstehen.

Die Untersuchung der Gefäße erfolgt mittels eines Videomikroskopes, welches grünes Licht in das Gewebe entsendet. Dieses Licht wird von den roten Blutkörperchen in den Gefäßen absorbiert, dagegen wird es vom umliegenden Gewebe reflektiert. Mit einem Messfühler, den wir unter die Zunge oder an die Ohrmuschel des Patienten halten, wird das reflektierte Licht detektiert und in ein bewegtes Bild der Gefäße umgesetzt. Über eine Verbindung mit einem Computer werden die Bilder digital aufgezeichnet und im Anschluss analysiert und ausgewertet.

Die Untersuchung dauert ca. 15 Minuten, ist schmerzlos, strahlungsfrei und ohne Risiko. Durch besondere Konzeption der Lichtquelle kommt es zu keiner Erwärmung oder anderen Auswirkungen auf die Haut.

4. **Periphere arterielle Tonometrie (PAT-Messung):**

Diese Messung ermöglicht uns eine direkte Aussage über die Gefäßfunktion. Durch eine Blutdruckmanschette am Oberarm wird die Durchblutung des Armes beeinflusst und durch einen speziellen Sensor an der Fingerkuppe die Gefäßreaktion darauf ermittelt. Dabei wird eine Blutdruckmanschette an einen der Arme angelegt und die Blutdruckmanschette soweit aufgepumpt, dass die Blutzufuhr für kurze Zeit unterbunden wird, dabei fühlt sich der Arm etwas schläfrig an. Nach Ablassen des Manschettendruckes messen wir über den Fingersensor wie gut sich die Gefäße Erweitern bzw. Engstellen können. Dies birgt keinerlei Gefahren noch sind irgendwelche Nebenwirkungen bekannt.

Ziel ist es, durch unsere Untersuchungen diese Parameter für Kinder mit Kawasaki-Syndrom anwendbar zu machen und die Zuverlässigkeit der Parameter abzuschätzen.

Sie können vollkommen frei entscheiden, ob Sie einer Teilnahme Ihres Kindes an der Studie zustimmen. Sollten Sie ablehnen, wird dadurch keinerlei Nachteil für die weitere medizinische Versorgung Ihres Kindes entstehen.

Datenschutz:

Die Vorschriften über die ärztliche Schweigepflicht und den Datenschutz werden bei dieser Studie eingehalten. Die persönlichen Daten und Befunde von Ihnen/Ihres Kindes, werden gespeichert und nur verschlüsselt (pseudonymisiert), d.h. weder Ihr Name, Initialen oder Geburtsdaten/der Name, Initialen oder Geburtsdatum Ihres Kindes erscheinen im Verschlüsselungscode, weitergegeben.

Eine Entschlüsselung erfolgt lediglich in Fällen, in denen es Ihre eigene Sicherheit erfordert („medizinische Gründe“) oder falls es zu Änderungen in der wissenschaftlichen Fragestellung kommt („wissenschaftliche Gründe“). Im Falle von Veröffentlichungen der Studienergebnisse bleibt die Vertraulichkeit der persönlichen Daten gewährleistet.“

Im Falle eines Widerrufs ihrer Einwilligung werden die pseudonymisiert gespeicherten Daten vernichtet.

Der Zugang zu den Originaldaten und zum Verschlüsselungscode ist auf den Studienleiter Dr. med. André Jakob und von ihm berechnigte Personen beschränkt.

Die Unterlagen werden in der Abteilung für Kinderkardiologie am Dr. von Haunerschen Kinderspital, Kinderklinik und Kinderpoliklinik der LMU München, Lindwurmstraße 4, 80337 München gespeichert und für 20 Jahre aufbewahrt.

Gerne können Sie sich bei weiteren Fragen an die Studienleitung bzw. Studienkoordinatoren wenden. Wir würden uns sehr freuen, wenn Sie der Teilnahme Ihres Kindes zustimmen würden.

Mit freundlichen Grüßen

### **Einverständniserklärung**

Ich bin mit der Teilnahme an der o.g. Studie einverstanden. Ich habe verstanden, welche Untersuchungen bei meinem Kind gemacht werden sollen und es wurden alle Fragen beantwortet.

Ich weiß, dass die Untersuchungen freiwillig sind und die Untersuchungen auf Wunsch jederzeit abgebrochen werden können.

Ich erlaube den Ärzten Daten meines Kindes in verschlüsselter Form zu sammeln, zu speichern und an von ihnen berechnigte Personen weiterzugeben. Eine Teilnahme an der Studie kann jederzeit widerrufen werden.

---

Dr. André Jakob  
Studienleitung

---

Miriam König/Sarah Walter/Julian Bäuerle  
Studienkoordination/Doktorandinnen

---

Ort, Datum

---

Name und Unterschrift

### 8.3. Fragebogen

|  |   |  |   |
|--|---|--|---|
|   | <b>KLINIKUM</b><br><small>DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN</small> | <small>CAMPUS GROßHADERN</small><br>ABTEILUNG FÜR KINDERKARDIOLOGIE<br>UND PÄDIATRISCHE INTENSIVMEDIZIN<br><small>Univ. Prof. Dr. med. Nikolaus Haas</small> |  |
| <b>RETROSPEKTIVE ERHEBUNG ZU KINDERN MIT KAWASAKI SYNDROM AM KLINIKUM DER LMU MÜNCHEN</b><br><b>STUDIENLEITUNG: DR. A. JAKOB</b> |   |  |   |

#### PATIENTENDATEN - Kind:

Geschlecht:  männlich  weiblich      Geburtsdatum: |\_|\_|/|\_|\_|/|\_|\_|

Postleitzahl Wohnort: |\_|\_|\_|\_|\_|\_|      Nationalität:  deutsch  andere: \_\_\_\_\_

Gewicht: \_\_\_\_\_ kg      Größe: \_\_\_\_\_ cm      (falls unterschiedlich zur Nationalität): \_\_\_\_\_

#### KLINIK

O Ersterkrankung      O Rezidiv, Anzahl: \_\_\_\_\_

**Diagnose:**      O komplettes Kawasaki Syndrom      O inkomplettes Kawasaki Syndrom

ja      nein

Fieber >38,5°C:        1. Tag des Auftretens |\_|\_|/|\_|\_|/|\_|\_| (tt / mm / jjjj)      Dauer: \_\_\_\_\_ Tage

Konjunktivitis:        1. Tag des Auftretens |\_|\_|/|\_|\_|/|\_|\_|      O einseitig      O beidseitig      exsudativ: ja / nein

Lymphadenopathie:        1. Tag des Auftretens |\_|\_|/|\_|\_|/|\_|\_|      O einseitig      O beidseitig

Exanthem:        1. Tag des Auftretens |\_|\_|/|\_|\_|/|\_|\_|      O monomorph      O polymorph

Hautschuppung:        1. Tag des Auftretens |\_|\_|/|\_|\_|/|\_|\_|

Schleimhautbeteiligung (Enanthem / rote Lippen / Erdbeerzunge):       ja       nein      1. Tag des Auftretens |\_|\_|/|\_|\_|/|\_|\_|

Extremitätenbeteiligung (Schwellung / Rötung der Hände / Füße):       ja       nein      1. Tag des Auftretens |\_|\_|/|\_|\_|/|\_|\_|

Weitere Symptome (10d vor Fieberbeginn bis vor ersten IVIG-Gabe):

Respiratorisch:       Husten       Rhinitis       Heiserkeit       Otitis media       Tonsillopharyngitis

Abdominal:       Durchfall       Erbrechen       Bauchschmerzen

Splenomegalie       Hepatomegalie       Gallenblasenhydrops

Neurologisch:       Irritabilität       Meningismus       zentrale Hörminderung       Myalgie       Uveitis

Gelenke:       Gelenkschmerzen, welche Gelenke: \_\_\_\_\_

Arthritis, welche Gelenke: \_\_\_\_\_

Zusätzliche Symptome: \_\_\_\_\_

Traten o.g. Symptome nach der ersten IVIG-Gabe auf?       nein       ja, welche: \_\_\_\_\_

**ANAMNESE:**       Bisher gesundes Kind       Grunderkrankung: \_\_\_\_\_

**IMPFANAMNESE:** Impfungen in den letzten 4 Wochen vor Erkrankungsbeginn?       ja       nein       unbekannt

Wenn ja, welche: \_\_\_\_\_ Datum |\_|\_|/|\_|\_|/|\_|\_|

                         \_\_\_\_\_ Datum |\_|\_|/|\_|\_|/|\_|\_|

Weiteren Medikamente zur Therapie des KS ? \_\_\_\_\_

#### OUTCOME

Heilung       Rezidive, Anzahl: \_\_\_\_\_       verstorben an: \_\_\_\_\_

**DIAGNOSTIK**

| LABOR:                  | Nicht bestimmt        | Pathologischste Werte vor 1. IVIG-Gabe | Datum (tt.mm.jjjj) | Pathologischste Werte absolut (nach) 1. IVIG-Gabe | Datum (tt.mm.jjjj) |
|-------------------------|-----------------------|--|--------------------|---|--------------------|
| Albumin (min.)          | <input type="radio"/> | g/dl                                   |                    | g/dl  |                    |
| Gesamt-Eiweiß (min.)    | <input type="radio"/> | g/dl                                   |                    | g/dl  |                    |
| GPT (max.)              | <input type="radio"/> | U/l                                    |                    | U/l   |                    |
| GOT (max.)              | <input type="radio"/> | U/l                                    |                    | U/l   |                    |
| γ-GT (max.)             | <input type="radio"/> | U/l                                    |                    | U/l   |                    |
| Gesamt-Bilirubin (max.) | <input type="radio"/> | mg/l                                   |                    | mg/l  |                    |
| CRP (max.)              | <input type="radio"/> | mg/l                                   |                    | mg/l  |                    |
| Na (min.)               | <input type="radio"/> | mmol/l                                 |                    | mmol/l  |                    |
| K (min.)                | <input type="radio"/> | mmol/l                                 |                    | mmol/l  |                    |
| Thrombozyten            | <input type="radio"/> | T/μl                                   |                    | T/μl  |                    |
| Hb (min.)               | <input type="radio"/> | g/dl                                   |                    | g/dl  |                    |
| Leukozyten              | <input type="radio"/> | T/μl                                   |                    | T/μl  |                    |
| <b>Diff. Blutbild</b>   |                       |  |                    |   |                    |
|                         | Eosinophile:          |  | %                  |   | %                  |
|                         | Monozyten:            |  | %                  |   | %                  |
|                         | Granulozyten:         |  | %                  |   | %                  |

Leukozyturie  nicht bestimmt  nein  ja BSG: \_\_\_\_/\_\_\_\_ (mm), wann: |\_\_|\_|\_|\_|  
 Leukozyten im Liquor:  nicht bestimmt  nein  ja, Zellzahl/μl: \_\_\_\_\_  
 ANA:  nicht bestimmt  negativ  positiv, Titer: \_\_\_\_\_

**ECHOKARDIOGRAFIE:**  nein  ja, erstmalig durchgeführt am |\_\_|\_|\_|\_|\_| Koronaraneurysma: ja / nein  
 Durchmesser: \_\_\_\_\_ mm LCA: \_\_\_\_\_ LAD: \_\_\_\_\_ LCX: \_\_\_\_\_ RCA: \_\_\_\_\_  
 Eingeschränkte LV-Funktion:  unbekannt  nein  ja EF: |\_\_|\_| SF: |\_\_|\_|  
 Perikarderguss:  unbekannt  nein  ja  
 Mitralinsuffizienz:  unbekannt  nein  ja, Grad: \_\_\_\_\_

**ABDOMENSONOGRAPHIE:**  nein  ja, durchgeführt am |\_\_|\_|\_|\_|\_|  
 Gallenblasenhydrops  Hepatomegalie  Splenomegalie  abd. LK-Vergrößerung  Verdickte Darmwände  
 Sonstige pathologische Befunde, welche: \_\_\_\_\_

**EKG:**  Normalbefund  pathologischer Befund, welcher: \_\_\_\_\_

**THERAPIE**

**ASS (Initial: high-dose):** Dosis: \_\_\_\_\_ mg/kgKG/d erstmalig: |\_\_|\_|\_|\_|\_|  
 (Dauer: low-dose): Dosis: \_\_\_\_\_ mg/kgKG/d erstmalig: |\_\_|\_|\_|\_|\_| Dauer: \_\_\_\_ Wochen

**Immunglobuline (IVIG):** Wieviele Therapien insg. \_\_\_\_  keine IVIG Begründung: \_\_\_\_\_

1. Therapie: Dosis: \_\_\_\_\_ g/kgKG/d, Datum |\_\_|\_|\_|\_|\_|

2. Therapie: Dosis: \_\_\_\_\_ g/kgKG/d, Datum |\_\_|\_|\_|\_|\_|

Weitere Therapien: Dosis: \_\_\_\_\_ g/kgKG/d, Datum |\_\_|\_|\_|\_|\_| Dosis: \_\_\_\_\_ g/kgKG/d, Datum |\_\_|\_|\_|\_|\_|

**Steroide:** Als KS-Therapie  ja  nein (2 x möglich) bei nein Grund für Steroide: \_\_\_\_\_

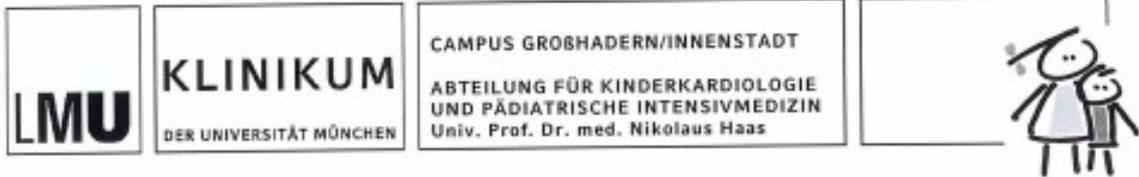
welche: \_\_\_\_\_ Dosis: \_\_\_\_\_ erstmalig: |\_\_|\_|\_|\_|\_| wie lange \_\_\_\_\_ Tage

**Weiteren Medikamente** zur Therapie des KS ? \_\_\_\_\_

**OUTCOME**

Heilung  Rezidive, Anzahl: \_\_\_\_\_  verstorben an: \_\_\_\_\_

## 8.4. Ethikantrag



Klinikum der Universität München, Kinderkardiologie und Pädiatrische Intensivmedizin  
Marchioninistr. 15, 81377 München

Herrn  
Prof. Dr. med. Wolfgang Eisenmenger  
Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der  
LMU  
Pettenkoferstr. 8a  
80336 München

Univ. Prof. Dr. med. Nikolaus Haas

Telefon +49 (0)89 4400 - 73941 / -73942  
Telefax +49 (0)89 4400 - 73943

Nikolaus.Haas@med.uni-muenchen.de  
www.klinikum.uni-muenchen.de  
www.kinderkardiologie-muenchen.de

Postanschrift:  
Marchioninistr. 15  
D-81377 München

Ihr Zeichen:

Unser Zeichen:

München, 01.09.2017

|  |   |
|--|---|
| <p><b>1. Antragssteller: Name, Anschrift, Tel. /Fax- Nr.:</b><br/>                 Dr. med. André Jakob<br/>                 Kinderkardiologie und pädiatrische Intensivmedizin<br/>                 Dr. v. Hauner'schen Kinderspital<br/>                 Lindwurmstr. 4, 80337 München<br/>                 Tel.: 089/4400-52837; Fax.: 089/4400-52858</p> <p>Miriam König<br/>                 Kinderkardiologie und pädiatrische Intensivmedizin<br/>                 Dr. v. Hauner'schen Kinderspital<br/>                 Lindwurmstr. 4, 80337 München<br/>                 Tel.: 089/4400-52837; Fax.: 089/4400-52858</p> <p>Sarah Walter<br/>                 Kinderkardiologie und pädiatrische Intensivmedizin<br/>                 Dr. v. Hauner'schen Kinderspital<br/>                 Lindwurmstr. 4, 80337 München<br/>                 Tel.: 089/4400-52837; Fax.: 089/4400-52858</p> <p>Prof. Dr. med. Dalla Pozza<br/>                 Kinderkardiologie und pädiatrische Intensivmedizin<br/>                 Marchioninistr. 15, 81377 München<br/>                 Tel.: 089 4400 73941 Fax.: 089 4400 73943</p> |   |
| <p><b>2. Titel des Forschungsvorhabens:</b><br/> <i>Untersuchung des kardiovaskulären Langzeitriskos bei an Kawasaki Syndrom erkrankten Kindern mithilfe der Messungen der Pulse Wave Velocity, Carotis Intima Media Thickness und Roughness, Mikrozirkulation und endothelialen Glykokalyx</i></p>  |   |
| <p><b>3. Ausbildungsdaten und Prüferfahrung:</b> Siehe beigefügten Lebensläufe</p>   |   |
| <p><b>4. Monozentrische oder multizentrische Studie:</b></p>   | <p>monozentrische Studie <input checked="" type="checkbox"/> (x)<br/>                 multizentrische Studie <input type="checkbox"/> (o)</p> |
| <p><b>5. Erklärung, dass die Grundsätze der Deklaration von Helsinki in Ihrer derzeit gültigen Fassung berücksichtigt werden.</b></p>  | <p>Ich /wir erklären, dass die Grundsätze der Deklaration von Helsinki in der derzeit gültigen Fassung werden</p>                             |



|   |   |
|---|---|
| <p><b>6. Studienbedingte Belastungen:</b></p> <p>a) Strahlenbelastung</p> <p><u>Falls ja:</u></p><br><br><p>b) Diagnostische Untersuchungen</p><br><br><p>c) Blut - / Gewebeentnahme</p>  | <p>Ja <input type="radio"/></p> <p>Nein <input checked="" type="radio"/></p> <p>Ich /wir erklären, dass vor Beginn der Studie die Genehmigung des BFS eingeholt wird.</p> <p>Ort, Datum, Unterschrift</p> <p>Ja <input checked="" type="radio"/></p> <p>Nein <input type="radio"/></p> <p>Ja <input checked="" type="radio"/></p> <p>Nein <input type="radio"/></p> |
| <p>Alle Messungen werden zum Teil bei anderen Krankheitsbildern bzw. Indikationen im klinischen Alltag angewendet. Komplikationen oder Risiken sind bei dieser Untersuchung nicht bekannt oder zu erwarten. Die Blutentnahmen werden routinemäßig bei der ambulanten Vorstellung dieser Patienten durchgeführt. Zusätzliche Blutentnahmen sind nicht geplant. Bei den Kontrollprobanden wird keine Blutentnahme durchgeführt.</p>   |   |
| <p><b>7. Wissenschaftliche Angaben zum Forschungsvorhaben:</b></p>  |   |
| <p>7.1 Fragestellung/Studienziel</p>  |   |
| <p><b>Hintergrund und Begründung der Studie</b></p> <p>Das Kawasaki-Syndrom (KS), eine Erkrankung die zu ungeklärtem Fieber bei Kindern führt, wird zu den Vaskulitiden gezählt. Eine Erweiterung der Koronararterien, sog. Koronaraneurysmen die bei etwa 5-10% aller Kinder auftreten, haben einen hohen Einfluss auf die Langzeit-Morbidität. Jedoch auch andere Gefäßabschnitte können im Rahmen des Kawasaki-Syndroms betroffen sein.[1, 2] Noch Unklarheit besteht bezüglich der Langzeitauswirkungen des Kawasaki-Syndroms auf das Gefäßsystem, insb. bei denjenigen Patienten, die keine echokardiografisch messbare Erweiterung der Coronargefäße hatten. Unter anderem werden histopathologisch perivaskuläre Veränderungen (z.B. Fibrose, Entzündungen) [3], eine prolongierte endotheliale Dysfunktion [4, 5], ein pathologisch verändertes Serum-Lipid-Profil [6], anhaltende Endotheldefekte [7] sowie eine erhöhte arterielle Gefäßsteifigkeit [5] diskutiert. Bisher gibt es jedoch keine standardisiert messbaren Parameter, die - unabhängig von der Entstehung von Koronaraneurysmen – das kardiovaskuläre Risiko bei Patienten mit durchgestandenem KS zuverlässig abschätzen. Dies wäre vor allem für Patienten ohne Koronaraneurysmen von Bedeutung, da über deren kardiovaskuläres Langzeitrisiko bisher sehr wenig bekannt ist. Bisherige Studien konnten einen veränderten Gefäßstatus - und demzufolge vermutlich auch ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko - sowohl für Patienten mit als auch ohne Koronaraneurysmen nachweisen [5, 7].</p> |   |



**7.1 Studienziel**

In einer prospektiven Fall-Kontroll-Studie sollen die Langzeitauswirkungen des KS auf unterschiedliche Gefäßabschnitte untersucht werden. Einerseits erhoffen wir uns darüber Erkenntnisse über die Ätiologie der Koronaraneurysmen zu gewinnen, andererseits sollen valide prädiktive Parameter zum kardiovaskulärem Risiko betroffener Patienten identifiziert werden und zur Entwicklung einer standardisierten Follow-Up Untersuchung bei Kawasaki-Patienten beitragen.

1. Pulse Wave Velocity (PWV):

Die Messung der Pulse wave velocity (Messeinheit m/s) ermöglicht eine Quantifizierung der arteriellen Gefäßsteifigkeit. Außerdem dient die PWV zum einen der Beurteilung eines Endorganschadens und zum anderen als eigenständiger, unabhängiger Prädiktor für kardiovaskuläre Ereignisse [8, 9].

2. Carotid intima-media thickness (cIMT) und roughness (cIMR):

Die cIMT wird mithilfe einer sonografischen Untersuchung der Karotiden gemessen und ist ein Erscheinungsbild der subklinischen Artherosklerose [10]. Mehrere Studien zeigen, dass die cIMT als validierter Parameter zur Abschätzung des kardiovaskulären Risikos eingesetzt werden kann [10-12] und auch bei Kindern scheint der Wert der cIMT mit dem Kardiovaskulären Risiko zu steigen [13]. Mithilfe neuerer Untersuchungsmethoden kann die Intima auch strukturell analysiert, sog. roughness cIMR. Auf diese Weise können Veränderungen der Intima bereits vor der irreversiblen Schädigung durch Plaques erkannt werden und der prädiktive Wert gegenüber dem der cIMT verbessert werden [13].

3. Mikrozirkulation incl. Mikrovaskuläre Glykokalyx:

Eine ungestörte Mikrozirkulation ist essenziell, um das Gewebe ausreichend mit Nährstoffen und Sauerstoff zu versorgen. Zur Beurteilung der Mikrovaskularisation spielt die endotheliale Glykokalyx eine große Rolle, da als Folge der Zerstörung der Glykokalyx eine endotheliale Dysfunktion entsteht. [14]

Als nicht-invasive und einfach einsetzbare Methode, um die Mikrovaskularisation zu untersuchen, eignet sich das Sidestream Darkfield Imaging (SDF) sehr gut. Neben der Darstellung der Mikrozirkulation ist mit Hilfe der SDF-Messung auch eine indirekte Quantifizierung der mikrovaskulären Glykokalyxdicke möglich. [15, 16] Die Messung wird sublingual und ohne Strahlenbelastung durchgeführt. Aus hygienischen Gründen werden sterile 1xSchutzkappen verwendet.

Da es sich in der Akutphase des Kawasaki-Syndroms um eine systemische Entzündungsreaktion der mittelgroßen Arterien als auch verschiedener Organe und Gewebe handelt, wollen wir durch die Untersuchung der Glykokalyx und der Mikrozirkulation feststellen, in wie weit sich die Mitbeteiligung der peripheren Gefäße auf den Gefäßstatus der Patienten, vor allem auch in Bezug auf den Langzeitverlauf des KS, auswirkt. Aus bereits durchgeführten Studien wissen wir, dass es beispielsweise an der Retina durch das KS zu Veränderungen der Mikrozirkulation kommen kann. [17] Durch die weitere Untersuchung mittels SDF an der Mundschleimhaut wollen wir genauere Informationen über pathologische und histologische Veränderungen an peripheren Gefäßen im Langzeitverlauf des KS bekommen. Ziel ist es, in eventuelle pathologische Vorgänge eingreifen zu können und somit ein besseres Follow-Up für die beteiligten Patienten zu erlangen.

7.2 Studiendesign

Mit Kontrollgruppe

Ja  (x)

Nein  (o)

Mit Gesunden

Ja  (x)

Nein  (o)



|  |   |
|--|---|
| <p>7.3 Statistische Beratung - Fallzahlschätzung und Auswertungskonzept</p>  | <p>Ja <input type="radio"/> O Durch wen?:</p> <p>Nein <input checked="" type="checkbox"/> Bitte begründen:</p>  |
| <p>Bezüglich der cIMT haben Voruntersuchungen gezeigt, dass bei vergleichenden Fragestellungen eine Gruppengröße von 20 – 30 Probanden notwendig ist um einen Unterschied festzustellen [18]. Bezüglich der cIMR gibt es aus unserer Abteilung eine Untersuchung zur Erstellung von Normwerten an Kindern [13]. Bezüglich Mikrozirkulation bzw. mikrovaskulärer Glykokalyxdicke haben Voruntersuchungen an Erwachsenen gezeigt, dass bei vergleichenden Fragestellungen eine Gruppengröße von ca. 17 Probanden notwendig ist, um einen Unterschied in der mikrovaskulären Glykokalyxdicke von 0,2 µm (entspricht ~ 25-30% der Gesamtdicke) zwischen zwei Untersuchungsgruppen nachzuweisen. [19]</p> <p>In dem vorliegenden Forschungsvorhaben sind vergleichende Untersuchungen geplant, als Vergleich der Kawasaki-Gruppe mit einem Vergleichskollektiv. Bezüglich cIMT und cIMR liegen bereits altersentsprechende Normwerte vor. Diese werden zur Beurteilung der entsprechenden Messwerte ebenfalls herangezogen. In Anlehnung an o.g. Studie ist daher geplant, pro Gruppe ca. 25 - 40 Kinder in die Studie einzuschließen.</p> <p>Die Auswertung der Daten wird verblindet durchgeführt, ohne Kenntnis der Zugehörigkeit des jeweiligen Kindes zu einer der Untersuchungsgruppen. Die statistische Analyse der Daten erfolgt nach Abschluss der Rekrutierung und Auswertung der Daten. Eine statistische Zwischenanalyse ist nicht geplant.</p> |   |
| <p>7.4 Studiendauer</p>  | <p>Voraussichtlicher Beginn:<br/>Sobald die Zustimmung der Ethikkommission zur Durchführung der geplanten Untersuchungen vorliegt. Die Studie ist zunächst auf 18 Monate ausgelegt.</p> <p>Voraussichtliches Ende:<br/>31.12.2018</p> |
| <p><b>8 Diskussion der ethisch-rechtlich relevanten Probleme</b></p>   |   |
| <p>8.1. Diskussion der Nachteile, Risiken, Belastungen und des möglichen Nutzens der Studie</p>  |   |
| <p>Die Messung der PWV, cIMT/cIMR und die Mikrozirkulation/mikrovaskuläre Glykokalyx können schmerzfrei und nicht-invasiv durchgeführt werden. Jede Untersuchung dauert ca. 5-15 Minuten. Es besteht dabei weder eine Strahlenbelastung, noch sind sonstige Nebenwirkungen bekannt oder zu erwarten. Eine Blutentnahme bei Patienten mit Z. n. Kawasaki-Syndrom wird bereits routinemäßig im Langzeitverlauf durchgeführt. Dabei werden etablierte Marker zur Einschätzung des kardiovaskulären Risikos abgenommen (insb. Cholesterin, Triglyceride, LDL-Cholesterin, HDL-Cholesterin und Lipoprotein A). Eine frühzeitige Therapie, z.B. mit Statinen bei entsprechender Veränderung dieser Werte wird empfohlen. Durch den zusätzlichen Informationsgewinn der o.g. Messungen können in Zukunft möglicherweise diejenigen Patienten, die von einer frühzeitigen Therapie profitieren, zuverlässiger detektiert werden.</p>   |   |



|   |  |
|---|--|
| <p>8.2. Einschluss Nicht- Einwilligungsfähiger</p> <p><u>Falls vorgesehen</u></p>   | <p>Vorgesehen <input checked="" type="checkbox"/> (x)</p> <p>Nicht vorgesehen <input type="checkbox"/></p> <p>Angabe von Gründen</p>   |
| <p>8.3. Forschung an Minderjährigen</p> <p><u>Falls vorgesehen</u></p>  | <p>Vorgesehen <input checked="" type="checkbox"/> (x)</p> <p>Nicht vorgesehen <input type="checkbox"/> 0</p>   |
| <p>Angabe von Gründen: In vorliegender Studie sollen unterschiedliche Parameter untersucht werden, die das frühzeitige, also bereits im Kindesalter vorliegende, kardiovaskuläre Risiko bei Kindern mit durchgemachtem Kawasaki Syndrom abschätzen sollen. Präventive Maßnahmen, die sich dadurch bereits im Kindesalter ableiten lassen, könnten darüber hinaus ein Benefit für die untersuchten Kinder haben. Eine Untersuchung an Minderjährigen ist somit unabdingbar.</p>  |  |
| <p><b>9 Datenschutz:</b></p> <p><u>Falls pseudonymisierte Verwendung</u></p>  | <p>Irreversibel anonymisierte Verwendung der Proben /Daten (ohne Personenbezug) <input type="checkbox"/> 0</p> <p>Pseudonymisierte Verwendung der Proben /Daten <input checked="" type="checkbox"/> (x)<br/>(Verschlüsselung)</p> <p>Angaben, wie der Verschlüsselungscode gebildet wird, wer Zugang zum Verschlüsselungscode hat, Gründe für die Entschlüsselung und wo wie lange die Daten /Proben aufbewahrt werden</p> |
| <p>Nur direkt mit der Studie betraute Personen haben im Rahmen der entsprechenden gesetzlichen Vorschriften Zugang zu den vertraulichen Daten, in denen die Probanden namentlich genannt werden. Diese Personen unterliegen der Schweigepflicht und sind zur Beachtung des Datenschutzes verpflichtet. Dritte erhalten keinen Einblick in Originalkrankenunterlagen. Für die Interpretation der Untersuchungsergebnisse ist es u.U. notwendig, dass nachträglich eine Zuordnung der Messungen oder Proben zu den Probanden erfolgt, um beispielsweise eine Korrelation mit klinischen und laborchemischen Daten vornehmen zu können, welche zum Messzeitpunkt noch nicht vorlagen. Um dies zu gewährleisten, werden die Daten pseudonymisiert. Hierzu erhält jedes Kind eine fortlaufende Studiennummer (001, 002, 003 usw.), welche weder Initialen noch Geburtsdatum oder sonstige personenbezogene Merkmale enthält. Alle Messungen und Proben eines Probanden werden unter dieser Studiennummer und ggf. einem numerischen oder alphabetischen Zusatz z.B. 001-1a, 001-2a zur weiteren Unterscheidung geführt. Die Weitergabe der Daten erfolgt ausschließlich zu statistischen und wissenschaftlichen Zwecken ohne namentliche Nennung. Auch in etwaigen Veröffentlichungen der Daten dieser Studie findet keine namentliche Nennung statt. Im Falle eines Widerrufs der Einwilligung werden die verschlüsselt gespeicherten Daten vernichtet. Zusätzlich zur allgemeinen Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Studie willigen die Eltern/Erziehungsberechtigten in eine gesonderte datenschutzrechtliche Einwilligungserklärung ein. Die Daten werden in der Abteilung für Kinderkardiologie am Dr. von Hauerschen Kinderspital aufbewahrt.</p> |  |



## Literaturverzeichnis

1. Jakob, A., *CME Zertifizierte Fortbildung Kawasaki Syndrom*. Monatsschr Kinderheilkunde, 2016: p. 241-256.
2. Newburger, J.W., 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*. Circulation, 2004. **110**(17): p. 2747-71.
3. Fujiwara, H. and Y. Hamashima, *Pathology of the heart in Kawasaki disease*. Pediatrics, 1978. **61**(1): p. 100-7.
4. Pinto, F.F., et al., *Long-term evaluation of endothelial function in Kawasaki disease patients*. Cardiol Young, 2013. **23**(4): p. 517-22.
5. Dietz, S.M., et al., *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): p. e0130913.
6. Silva, A.A., et al., *Cardiovascular risk factors after Kawasaki disease: a case-control study*. J Pediatr, 2001. **138**(3): p. 400-5.
7. Shah, V., et al., *Cardiovascular status after Kawasaki disease in the UK*. Heart, 2015. **101**(20): p. 1646-55.
8. Ben-Shlomo, Y., et al., *Aortic pulse wave velocity improves cardiovascular event prediction: an individual participant meta-analysis of prospective observational data from 17,635 subjects*. J Am Coll Cardiol, 2014. **63**(7): p. 636-46.
9. Mitchell, G.F., et al., *Arterial stiffness and cardiovascular events: the Framingham Heart Study*. Circulation, 2010. **121**(4): p. 505-11.
10. Lorenz, M.W., et al., *Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima-media thickness: a systematic review and meta-analysis*. Circulation, 2007. **115**(4): p. 459-67.
11. Lorenz, M.W., et al., *Carotid intima-media thickening indicates a higher vascular risk across a wide age range: prospective data from the Carotid Atherosclerosis Progression Study (CAPS)*. Stroke, 2006. **37**(1): p. 87-92.
12. Chambless, L.E., et al., *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**(6): p. 483-94.
13. Dalla Pozza, R., et al., *Beyond intima-media-thickness: Analysis of the carotid intima-media-roughness in a paediatric population*. Atherosclerosis, 2016. **251**: p. 164-169.
14. Jacob, M., et al., *The endothelial glycocalyx affords compatibility of Starling's principle and high cardiac interstitial albumin levels*. Cardiovascular research, 2007. **73**(3): p. 575-586.
15. Stanclova, M., Z. Kokstein, and V. Cerny, *Orthogonal polarization spectral (OPS)/sidestream dark field (SDF) imaging: a new method for the observation of the microcirculation in pediatrics*. Appl Cardiopulm Pathophysiol, 2012. **16**: p. 249-253.
16. González, R., et al., *Evaluation of sublingual microcirculation in a paediatric intensive care unit: prospective observational study about its feasibility and utility*. BMC pediatrics, 2017. **17**(1): p. 75.
17. Chen, K.Y., et al., *Evidence of Microvascular Changes in the Retina following Kawasaki Disease*. Scientific reports, 2017. **7**.
18. Dalla Pozza, R., et al., *Subclinical atherosclerosis, but normal autonomic function after Kawasaki disease*. J Pediatr, 2007. **151**(3): p. 239-43.
19. Nieuwdorp, M., et al., *Measuring endothelial glycocalyx dimensions in humans: a potential novel tool to monitor vascular vulnerability*. J Appl Physiol (1985), 2008. **104**(3): p. 845-52.



|   |   |
|---|---|
| <p><b>10 Versicherung:</b></p>  | <p>Erklärung, dass eine Versicherung abgeschlossen wird /wurde <input type="radio"/></p> <p>Warum eine Versicherung nicht notwendig ist <input checked="" type="checkbox"/> (x)<br/>                 Da es sich um eine Observationsstudie handelt und die durchgeführten Untersuchungen ohne Risiken für die teilnehmenden Probanden sind, ist ein Versicherungsschutz nicht notwendig.</p> <p>Wurde eine Wegeversicherung abgeschlossen</p> <p>Ja <input type="radio"/><br/>                 Nein <input checked="" type="checkbox"/> (x)</p>   |
| <p><b>11 Finanzierung:</b><br/>                 a) Finanzierung des Forschungsprojektes<br/>                 b) Honorierung Ärzte/ Patienten /Probanden</p> | <p>Das Forschungsvorhaben wird von Abteilung für Kinderkardiologie und pädiatrische Intensivmedizin der LMU München unterstützt. Weder Eltern/Erziehungsberechtigten noch Doktoranden oder die Antragstellen erhalten ein Honorar.<br/>                 Es besteht kein Interessenkonflikt.</p>   |
| <p><b>12 Aufwandsentschädigung für die EK:</b></p>  | <p>Die Kosten der Aufwandsentschädigung werden übernommen <input type="radio"/></p> <p>Antrag auf Reduktion der Aufwandsentschädigung (Begründung beifügen) <input checked="" type="checkbox"/> (x)</p> <p>Hiermit beantragen wir eine Reduktion der Aufwands-entschädigung, da die Studie nicht durch Drittmittel unterstützt wird.</p> <p>Rechnungsanschrift<br/>                 Dr. med. André Jakob<br/>                 Kinderkardiologie und pädiatrische Intensivmedizin<br/>                 Dr. v. Hauner'schen Kinderspital<br/>                 Lindwurmstr. 4, 80337 München<br/>                 Tel.: 089/4400-52837; Fax.: 089/4400-52858</p> |



Ethikkommission · Pettenkoferstr. 8 · 80336 München

Dr. André Jakob  
Haunersches Kinderspital  
Lindwurmstraße 4  
80337 München

Vorsitzender:  
Prof. Dr. W. Eisenmenger  
Telefon+49 (0)89 440055191  
Telefax+49 (0)89 440055192  
Ethikkommission@  
med.uni-muenchen.de  
[www.ethikkommission.med.uni-muenchen.de](http://www.ethikkommission.med.uni-muenchen.de)

Anschrift:  
Pettenkoferstr. 8a  
D-80336 München

30.11.2017 Hb /sc

Projekt Nr: **17-692** (bitte bei Schriftwechsel angeben)

### Beratung nach Fakultätsrecht

Studientitel: Untersuchung des kardiovaskulären Langzeitrisikos bei an Kawasaki Syndrom erkrankten Kindern mithilfe der Messungen der Pulse Wave Velocity, Carotis Intima Media Thickness und Roughness, Mikrozirkulation und endothelialen Glykokalyx  
Antragsteller: Dr. André Jakob, Haunersches Kinderspital , Lindwurmstraße 4, 80337 München

Sehr geehrter Herr Dr. Jakob,

besten Dank für Ihr Schreiben mit der Beantwortung unserer Fragen bzw. Erfüllung der Auflagen und den noch ausstehenden bzw. überarbeiteten Unterlagen.

Die Ethikkommission (EK) kann Ihrer Studie nun die ethisch-rechtliche Unbedenklichkeit zuerkennen.

- Vorsorglich möchte ich darauf hinweisen, dass auch bei einer positiven Beurteilung des Vorhabens durch die EK die ärztliche und juristische Verantwortung für die Durchführung des Projektes uneingeschränkt bei Ihnen und Ihren Mitarbeitern verbleibt.
- Änderungen des Studienprotokolls sind der EK mitzuteilen.
- Das Ende der Studie ist anzuzeigen und das Ergebnis der Studie mitzuteilen.

Für Ihre Studie wünsche ich Ihnen viel Erfolg.

Mit freundlichen Grüßen

Prof. Dr. W. Eisenmenger  
Vorsitzender der Ethikkommission

---

#### Mitglieder der Kommission:

Prof. Dr. W. Eisenmenger (Vorsitzender), Prof. Dr. E. Held (Vorsitzender), Prof. Dr. H. Angatwurm, Prof. Dr. C. Bausewein, PD Dr. Th. Beinert, Prof. Dr. C. Beika, Prof. Dr. B. Emmerich, Prof. Dr. St. Endres, Prof. Dr. H. U. Gallwas, Prof. Dr. O. Genzel-Boreviczény, Prof. Dr. A. Gerbes, Prof. Dr. K. Hahn, Prof. Dr. N. Harbeck, Dr. B. Henrikus, Prof. Dr. Ch. Heumann, Prof. Dr. V. Klaus, Prof. Dr. G. Marckmann, Dr. V. Mönch, Prof. Dr. A. Nassehi, Prof. Dr. D. Nowak, Prof. Dr. R. Penning, Prof. Dr. J. Peters, Prof. Dr. K. Pfeifer, Dr. I. Saake, Prof. Dr. M. Schmauss, Prof. Dr. U. Schroth, Prof. Dr. A. Spickhoff, Prof. Dr. O. Steinlein, PD Dr. U. Wandl, Prof. Dr. C. Wendtner, Dr. A. Yassouridis, Dr. Ch. Zach

## 9. Literaturverzeichnis

1. Burns, J.C. and M.P. Glode, *Kawasaki syndrome*. Lancet, 2004. **364**(9433): p. 533-44.
2. Kawasaki, T., et al., *A new infantile acute febrile mucocutaneous lymph node syndrome (MLNS) prevailing in Japan*. Pediatrics, 1974. **54**(3): p. 271-276.
3. Jakob, A., et al., *Kawasaki disease in Germany: a prospective, population-based study adjusted for underreporting*. The Pediatric infectious disease journal, 2016. **35**(2): p. 129-134.
4. Jakob, A., *Kawasaki-Syndrom*. Monatsschrift Kinderheilkunde, 2016. **164**(3): p. 241-256.
5. McCrindle, B.W., 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): p. e927-e999.
6. Newburger, J.W., 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*. Circulation, 2004. **110**(17): p. 2747-71.
7. Yeo, Y., et al., *Incomplete Kawasaki disease in patients younger than 1 year of age: a possible inherent risk factor*.
8. Shulman, S.T.
9. Newburger, J.W., et al., *Altered lipid profile after Kawasaki syndrome*. Circulation, 1991. **84**(2): p. 625-631.
10. Dalla Pozza, R., et al., *Subclinical atherosclerosis, but normal autonomic function after Kawasaki disease*. The Journal of pediatrics, 2007. **151**(3): p. 239-243.
11. Chen, K.Y., et al., *Evidence of Microvascular Changes in the Retina following Kawasaki Disease*. Scientific reports, 2017. **7**.
12. Huang, M.-Y., et al., *Deterioration of cutaneous microcirculatory status of Kawasaki disease*. Clinical rheumatology, 2012. **31**(5): p. 847-852.
13. Knotzer, H. and W. Hasibeder, *Mikrozirkulation beim Intensivpatienten*. Der Anaesthetist, 2008. **57**(2): p. 151-164.
14. Bennighoff, A. and D. Drenckhahn, *Anatomie Bd 2, 16. Aufl.* 2004, Urban & Fischer, München.
15. Wiel, E., B. Vallet, and H. ten Cate, *The endothelium in intensive care*. Critical care clinics, 2005. **21**(3): p. 403-416.
16. Mombouli, J.-V. and P.M. Vanhoutte, *Endothelial dysfunction: from physiology to therapy*. Journal of molecular and cellular cardiology, 1999. **31**(1): p. 61-74.
17. Granger, D.N. and P. Kubes, *The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion*. Journal of leukocyte biology, 1994. **55**(5): p. 662-675.
18. Jacob, M., et al., *The endothelial glycocalyx affords compatibility of Starling's principle and high cardiac interstitial albumin levels*. Cardiovascular research, 2007. **73**(3): p. 575-586.
19. De Backer, D., et al., *Microcirculatory alterations: potential mechanisms and implications for therapy*. Annals of Intensive Care, 2011. **1**(1): p. 27.
20. Orenstein, J.M., et al., *Three linked vasculopathic processes characterize Kawasaki disease: a light and transmission electron microscopic study*. PloS one, 2012. **7**(6): p. e38998.
21. Dietz, S.M., et al., *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): p. e0130913.
22. Reitsma, S., et al., *The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization*. Pflügers Archiv-European Journal of Physiology, 2007. **454**(3): p. 345-359.
23. Nieuwdorp, M., et al., *The endothelial glycocalyx: a potential barrier between health and vascular disease*. Current opinion in lipidology, 2005. **16**(5): p. 507-511.
24. Ikonomidis, I., et al., *Association of impaired endothelial glycocalyx with arterial stiffness, coronary microcirculatory dysfunction, and abnormal myocardial deformation in untreated hypertensives*. The Journal of Clinical Hypertension.

25. Becker, B.F., et al., *Degradation of the endothelial glycocalyx in clinical settings: searching for the sheddases*. British Journal of Clinical Pharmacology, 2015. **80**(3): p. 389-402.
26. Schmidt, R.F., F. Lang, and M. Heckmann, *Physiologie des menschen: mit pathophysiologie*. 2011: Springer-Verlag.
27. Fu, B.M. and J.M. Tarbell, *Mechano-sensing and transduction by endothelial surface glycocalyx: composition, structure, and function*. Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine, 2013. **5**(3): p. 381-390.
28. Van Teeffelen, J.D. and H.P.D. Vink, *Clinical assessment of vascular health with GlycoCheck™ Glycocalyx Measurement Software*, G. B.V., Editor. 2012.
29. Mulivor, A.W. and H.H. Lipowsky, *Inflammation-and ischemia-induced shedding of venular glycocalyx*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2004. **286**(5): p. H1672-H1680.
30. Speziale, S. and S. Sivaloganathan, *Poroelastic theory of transcapillary flow: Effects of endothelial glycocalyx deterioration*. Microvascular research, 2009. **78**(3): p. 432-441.
31. Nieuwdorp, M., et al., *Loss of endothelial glycocalyx during acute hyperglycemia coincides with endothelial dysfunction and coagulation activation in vivo*. Diabetes, 2006. **55**(2): p. 480-486.
32. Ikonomidis, I., et al., *Early detection of left ventricular dysfunction in first-degree relatives of diabetic patients by myocardial deformation imaging: the role of endothelial glycocalyx damage*. International journal of cardiology, 2017. **233**: p. 105-112.
33. Nieuwdorp, M., et al., *Measuring endothelial glycocalyx dimensions in humans: a potential novel tool to monitor vascular vulnerability*. J Appl Physiol (1985), 2008. **104**(3): p. 845-52.
34. Lekakis, J., et al., *Methods for evaluating endothelial function: a position statement from the European Society of Cardiology Working Group on Peripheral Circulation*. European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation, 2011. **18**(6): p. 775-789.
35. Ince, C., *The microcirculation is the motor of sepsis*. Critical care, 2005. **9**(4): p. S13.
36. Stanclova, M., Z. Kokstein, and V. Cerny, *Orthogonal polarization spectral (OPS)/sidestream dark field (SDF) imaging: a new method for the observation of the microcirculation in pediatrics*. Appl Cardiopulm Pathophysiol, 2012. **16**: p. 249-253.
37. González, R., et al., *Evaluation of sublingual microcirculation in a paediatric intensive care unit: prospective observational study about its feasibility and utility*. BMC pediatrics, 2017. **17**(1): p. 75.
38. Nussbaum, C., et al., *Early microvascular changes with loss of the glycocalyx in children with type 1 diabetes*. The Journal of pediatrics, 2014. **164**(3): p. 584-589. e1.
39. de Jongh, S., et al., *Family history of cardiovascular events and endothelial dysfunction in children with familial hypercholesterolemia*. Atherosclerosis, 2002. **163**(1): p. 193-197.
40. Nussbaum, C., et al., *Perturbation of the microvascular glycocalyx and perfusion in infants after cardiopulmonary bypass*. The Journal of thoracic and cardiovascular surgery, 2015. **150**(6): p. 1474-1481. e1.
41. Lee, H., et al., *In adolescence, extreme prematurity is associated with significant changes in the microvasculature, elevated blood pressure and increased carotid intima-media thickness*. Archives of disease in childhood, 2014. **99**(10): p. 907-911.
42. Bruegger, D., et al., *Acute degradation of the endothelial glycocalyx in infants undergoing cardiac surgical procedures*. The Annals of thoracic surgery, 2015. **99**(3): p. 926-931.
43. Nieuwdorp, M., et al., *Perturbation of hyaluronan metabolism predisposes patients with type 1 diabetes mellitus to atherosclerosis*. Diabetologia, 2007. **50**(6): p. 1288-1293.
44. Schmidt, E.P., et al., *The pulmonary endothelial glycocalyx regulates neutrophil adhesion and lung injury during experimental sepsis*. Nature medicine, 2012. **18**(8): p. 1217.
45. Henry, C.B. and B.R. Duling, *TNF- $\alpha$  increases entry of macromolecules into luminal endothelial cell glycocalyx*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2000. **279**(6): p. H2815-H2823.

46. Luo, L., et al., *Serum Levels of Syndecan-1 in Patients With Kawasaki Disease*. The Pediatric Infectious Disease Journal, 2019. **38**(1): p. 89-94.
47. Galeotti, C., et al., *Predisposing factors, pathogenesis and therapeutic intervention of Kawasaki disease*. Drug discovery today, 2016. **21**(11): p. 1850-1857.
48. Ohnishi, Y., et al., *Circulating endothelial glycocalyx components as a predictive marker of coronary artery lesions in Kawasaki disease*. Int J Cardiol, 2019. **292**: p. 236-240.
49. Ostrowski, S.R., et al., *Association between biomarkers of endothelial injury and hypocoagulability in patients with severe sepsis: a prospective study*. Critical Care, 2015. **19**(1): p. 191.
50. Miranda, C.H., et al., *Evaluation of the endothelial glycocalyx damage in patients with acute coronary syndrome*. Atherosclerosis, 2016. **247**: p. 184-188.
51. Mosaad, N.A.E., et al., *Study of serum syndecan-1 levels in a group of Egyptian juvenile systemic lupus erythematosus patients*. Immunology letters, 2017. **181**: p. 16-19.
52. Wheeler-Jones, C., C.E. Farrar, and A.A. Pitsillides, *Targeting hyaluronan of the endothelial glycocalyx for therapeutic intervention*. Curr Opin Investig Drugs, 2010. **11**(9): p. 997-1006.
53. Ontong, P. and V. Prachayasittikul, *Unraveled roles of hyaluronan in severe COVID-19*. EXCLI journal, 2021. **20**: p. 117-125.
54. Hellman, U., et al., *Presence of hyaluronan in lung alveoli in severe Covid-19: An opening for new treatment options?* Journal of Biological Chemistry, 2020. **295**(45): p. 15418-15422.
55. Shah, V., et al., *Cardiovascular status after Kawasaki disease in the UK*. Heart, 2015. **101**(20): p. 1646.
56. König, M., et al., *KD Diagnosis Does Not Increase Cardiovascular Risk in Children According to Dynamic Intima–Media Roughness Measurements*. Journal of Clinical Medicine, 2022. **11**(5): p. 1177.
57. Jakob, A., et al., *Kawasaki disease and increased cardiovascular risk: Is there a link to circulating glycocalyx biomarkers?* Microvascular Research, 2022. **140**: p. 104269.
58. Treu, C., et al., *Sidestream dark field imaging: The evolution of real-time visualization of cutaneous microcirculation and its potential application in dermatology*. Vol. 303. 2010. 69-78.
59. Genzel-Boroviczény, O., et al., *Orthogonal polarization spectral imaging (OPS): a novel method to measure the microcirculation in term and preterm infants transcutaneously*. Pediatric research, 2002. **51**(3): p. 386-391.
60. Weidlich, K., et al., *Changes in microcirculation as early markers for infection in preterm infants—an observational prospective study*. Pediatric research, 2009. **66**(4): p. 461-465.
61. Gan, S.D. and K.R. Patel, *Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay*. J Invest Dermatol, 2013. **133**(9): p. e12.
62. Engvall, E. and P. Perlmann, *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*. Protides of the biological fluids, 1971: p. 553-556.
63. Dobbe, J.G.G., et al., *Measurement of functional microcirculatory geometry and velocity distributions using automated image analysis*.
64. Nakagawa, R., et al., *Arterial stiffness in patients after Kawasaki disease without coronary artery involvement: Assessment by performing brachial ankle pulse wave velocity and cardio-ankle vascular index*. Journal of cardiology, 2015. **66**(2): p. 130-134.
65. Sugimoto, M., et al., *Findings in the pulmonary vascular bed in the remote phase after Kawasaki disease*. The American journal of cardiology, 2012. **109**(8): p. 1219-1222.
66. Yanagawa, H., et al., *Results of the Nationwide Epidemiologic Survey of Kawasaki Disease in 1995 and 1996 in Japan*. Pediatrics, 1998. **102**(6): p. e65.
67. Kato, H., et al., *Long-term consequences of Kawasaki disease: a 10-to 21-year follow-up study of 594 patients*. Circulation, 1996. **94**(6): p. 1379-1385.
68. Kuwabara, M., et al., *Cardiac Lesions and Initial Laboratory Data in Kawasaki Disease: a Nationwide Survey in Japan*. Journal of Epidemiology, 2015. **advpub**.

69. Fujiwara, H. and Y. Hamashima, *Pathology of the Heart in Kawasaki Disease*. Pediatrics, 1978. **61**(1): p. 100.
70. Hirose, S. and Y. Hamashima, *Morphological observations on the vasculitis in the mucocutaneous lymph node syndrome*. European Journal of Pediatrics, 1978. **129**(1): p. 17-27.
71. Ellis, C.G., J. Jagger, and M. Sharpe, *The microcirculation as a functional system*. Critical Care, 2005. **9**(4): p. S3.
72. Verdant, C. and D.D. Backer, *How monitoring of the microcirculation may help us at the bedside*. Current Opinion in Critical Care, 2005. **11**(3): p. 240-244.
73. Chen, K.Y.H., et al., *Kawasaki disease and cardiovascular risk: a comprehensive review of subclinical vascular changes in the longer term*. Acta Paediatrica, 2016. **105**(7): p. 752-761.
74. Pinto, F.F., et al., *Vascular function long term after Kawasaki disease: another piece of the puzzle?* Cardiology in the Young, 2017. **27**(3): p. 488-497.
75. Pinto, F.F., et al., *Long-term evaluation of endothelial function in Kawasaki disease patients*. Cardiology in the Young, 2013. **23**(4): p. 517-522.
76. Dhillon, R., et al., *Endothelial dysfunction late after Kawasaki disease*. Circulation, 1996. **94**(9): p. 2103-2106.
77. McCrindle, B.W., et al., *Are Patients after Kawasaki Disease at Increased Risk for Accelerated Atherosclerosis?* The Journal of Pediatrics, 2007. **151**(3): p. 244-248.e1.
78. Gordon, J.B., A.M. Kahn, and J.C. Burns, *When Children With Kawasaki Disease Grow Up*. Journal of the American College of Cardiology, 2009. **54**(21): p. 1911.
79. Lee, D.H., et al., *Deeper penetration of erythrocytes into the endothelial glycocalyx is associated with impaired microvascular perfusion*. PloS one, 2014. **9**(5): p. e96477-e96477.
80. Ikonomidis, I., et al., *Association of impaired endothelial glycocalyx with arterial stiffness, coronary microcirculatory dysfunction, and abnormal myocardial deformation in untreated hypertensives*. The Journal of Clinical Hypertension, 2018. **20**(4): p. 672-679.
81. Wadowski, P.P., et al., *Sublingual functional capillary rarefaction in chronic heart failure*. European journal of clinical investigation, 2018. **48**(2): p. e12869.
82. Ikemoto, Y., et al., *Evaluation of Preclinical Atherosclerosis by Flow-Mediated Dilatation of the Brachial Artery and Carotid Artery Analysis in Patients with a History of Kawasaki Disease*. Pediatric Cardiology, 2005. **26**(6): p. 782-786.
83. Yamakawa, R., et al., *Coronary Endothelial Dysfunction After Kawasaki Disease: Evaluation by Intracoronary Injection of Acetylcholine 1*. Journal of the American College of Cardiology, 1998. **31**(5): p. 1074-1080.
84. Backer, D.D., et al., *Microvascular Blood Flow Is Altered in Patients with Sepsis*. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2002. **166**(1): p. 98-104.
85. Bateman, R.M., M.D. Sharpe, and C.G. Ellis, *Bench-to-bedside review: Microvascular dysfunction in sepsis –hemodynamics, oxygen transport, and nitric oxide*. Critical Care, 2003. **7**(5): p. 359.
86. Ikeda, M., et al., *Circulating syndecan-1 predicts the development of disseminated intravascular coagulation in patients with sepsis*. Journal of Critical Care, 2018. **43**: p. 48-53.
87. Johansson, P.I., et al., *A High Admission Syndecan-1 Level, A Marker of Endothelial Glycocalyx Degradation, Is Associated With Inflammation, Protein C Depletion, Fibrinolysis, and Increased Mortality in Trauma Patients*. Annals of Surgery, 2011. **254**(2).
88. Anand, D., et al., *Evolution of serum hyaluronan and syndecan levels in prognosis of sepsis patients*. Clinical Biochemistry, 2016. **49**(10): p. 768-776.
89. Stepan, J., et al., *Sepsis and major abdominal surgery lead to flaking of the endothelial glycocalyx*. Journal of Surgical Research, 2011. **165**(1): p. 136-141.
90. e Silva, A.A., et al., *Cardiovascular risk factors after Kawasaki disease: a case-control study*. The Journal of pediatrics, 2001. **138**(3): p. 400-405.
91. Ou, C.-Y., et al., *Significant Relationship Between Serum High-sensitivity C-Reactive Protein, High-density Lipoprotein Cholesterol Levels and Children With Kawasaki Disease and*

- Coronary Artery Lesions*. Journal of the Formosan Medical Association, 2009. **108**(9): p. 719-724.
92. De Backer, D., et al., *How to evaluate the microcirculation: report of a round table conference*. Critical Care, 2007. **11**(5): p. R101.
  93. Guyton, A.C. and J.E. Hall, *Textbook of medical physiology*. Vol. 548. 1986: Saunders Philadelphia.
  94. Klijn, E., et al. *Hyperdynamic Microcirculatory Alterations in Patients with Severe Sepsis and Septic Shock*. in *INTENSIVE CARE MEDICINE*. 2010. SPRINGER 233 SPRING ST, NEW YORK, NY 10013 USA.
  95. Ellis, C.G., et al., *Effect of a maldistribution of microvascular blood flow on capillary O<sub>2</sub> extraction in sepsis*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2002. **282**(1): p. H156-H164.
  96. Bielecka-Dabrowa, A., et al., *The multi-biomarker approach for heart failure in patients with hypertension*. International journal of molecular sciences, 2015. **16**(5): p. 10715-10733.
  97. Chana, R.S., et al., *Low-density lipoprotein stimulates mesangial cell proteoglycan and hyaluronan synthesis*. Nephrology Dialysis Transplantation, 2000. **15**(2): p. 167-172.
  98. Viola, M., et al., *Oxidized low density lipoprotein (LDL) affects hyaluronan synthesis in human aortic smooth muscle cells*. Journal of Biological Chemistry, 2013. **288**(41): p. 29595-29603.
  99. Romão, M., et al., *Elevated hyaluronan and extracellular matrix metalloproteinase inducer levels in women with preeclampsia*. Archives of Gynecology and Obstetrics, 2014. **289**(3): p. 575-579.
  100. Nieuwdorp, M., et al., *Perturbation of hyaluronan metabolism predisposes patients with type 1 diabetes mellitus to atherosclerosis*. Diabetologia, 2007. **50**(6): p. 1288-1293.
  101. Cheung, Y.F., et al., *Increased high sensitivity C reactive protein concentrations and increased arterial stiffness in children with a history of Kawasaki disease*. Heart, 2004. **90**(11): p. 1281-1285.
  102. Mitani, Y., et al., *Elevated Levels of High-Sensitivity C-Reactive Protein and Serum Amyloid-A Late After Kawasaki Disease*. Circulation, 2005. **111**(1): p. 38-43.
  103. De Backer, D., et al., *Monitoring the microcirculation in the critically ill patient: current methods and future approaches*. Intensive Care Medicine, 2010. **36**(11): p. 1813-1825.
  104. Elbers, P.W.G. and C. Ince, *Bench-to-bedside review: Mechanisms of critical illness – classifying microcirculatory flow abnormalities in distributive shock*. Critical Care, 2006. **10**(4): p. 221.
  105. Machin, D.R., et al., *Automated measurement of microvascular function reveals dysfunction in systemic sclerosis: a cross-sectional study*. The Journal of rheumatology, 2017. **44**(11): p. 1603-1611.
  106. Vlahu, C.A., et al., *Damage of the Endothelial Glycocalyx in Dialysis Patients*. Journal of the American Society of Nephrology, 2012. **23**(11): p. 1900.
  107. Lambadiari, V., et al., *Effects of Different Antidiabetic Medications on Endothelial Glycocalyx, Myocardial Function, and Vascular Function in Type 2 Diabetic Patients: One Year Follow-Up Study*. Journal of Clinical Medicine, 2019. **8**(7): p. 983.

## **10. Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben, meinen großen Dank aussprechen.

Besonders hervorheben möchte ich Priv.-Doz. Dr. André Jakob für die Möglichkeit, diese Arbeit unter seiner Betreuung durchführen zu können. Mein Dank gilt sowohl seinen vielfältigen Ideen und den konstruktiven Gesprächen als auch seiner fachkundigen Unterstützung. Die kritische Betrachtung und seine Anregungen waren sehr wertvoll bei der Fertigstellung dieser Arbeit. Ebenso bin ich dankbar für seine Ermutigungen zur Vollendung meiner Dissertation.

Für die gute Zusammenarbeit und gegenseitige Unterstützung möchte ich mich an dieser Stelle herzlich bei Belen Pastor und Miriam König bedanken. Die gemeinsamen Überlegungen und der Zusammenhalt haben wesentlich bei der Erstellung der vorliegenden Arbeit geholfen.

Mein besonderer Dank gilt zudem dem Team der kinderkardiologischen Ambulanz im Dr. von Haunerschen Kinderspital für ihre Unterstützung bei der Terminierung und Durchführung der Untersuchungen.

Des Weiteren möchte ich mich bei meinem Mann, meinen Eltern und meinen Geschwistern für ihre Ermutigungen und vielseitigen Anregungen während der Arbeit an dieser Dissertation bedanken.

## 11. Publikationen

Jakob A, Bohlig S, König M, Nussbaum C, Dalla-Pozza R, Hermann M, Haas NA, Pastor-Villaescusa B. Kawasaki disease and increased cardiovascular risk: Is there a link to circulating glycoalyx biomarkers?.

Microvascular Research. Volume 140. 2022. 104269. ISSN 0026-2862.

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

König M, Ullmann T, Pastor-Villaescusa B, Dalla-Pozza R, Bohlig S, Schmidt-Trucksäss A, Pattathu J, Haas NA, Jakob A. KD Diagnosis Does Not Increase Cardiovascular Risk in Children According to Dynamic Intima–Media Roughness Measurements.

Journal of Clinical Medicine. 2022. 11(5):1177.

<https://doi.org/10.3390/jcm11051177>

## 12. Eidesstattliche Versicherung



LUDWIG-  
MAXIMILIANS-  
UNIVERSITÄT  
MÜNCHEN

Dekanat Medizinische Fakultät  
Promotionsbüro



### Eidesstattliche Versicherung

Bohlig, Sarah Doris

Name, Vorname

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

**Untersuchung der Mikrozirkulation und endothelialen Glykokalix  
bei an Kawasaki-Syndrom erkrankten Kindern, eine Fall-Kontroll-Studie**

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.

Geltendorf, 24.03.2024

Ort, Datum

Sarah Doris Bohlig

Unterschrift Sarah Doris Bohlig