

Aus der Klinik für Anaesthesiologie

Klinikum der Universität München

Direktor: Professor Dr. med. Bernhard Zwißler

## **Evaluation der Gefäßbarriere unter klinischen und experimentellen**

### **Gesichtspunkten**



Kumulative Habilitationsschrift

Vorgelegt von Dr. med. Florian Brettner

2020

## Inhaltsverzeichnis

1. Bedeutung für das Fachgebiet	4
2. Hintergrund und Zielsetzung	5
3. Patienten, Material und Methodik	6
3.1. Experimentelle Untersuchung der vaskulären Barriere	6
3.1.1. Versuche am isoliert schlagenden Mäuseherz	6
3.1.1.1. Studienprotokoll Mäuseherz	8
3.1.1.2. Effluatgewinnung, -prozessierung und ELISA-Messung	8
3.1.1.3. Westernblot	8
3.1.1.4. Immunfluoreszenz	9
3.1.1.5. Elektronenmikroskopie	9
3.1.2. Versuche an humanen Nabelschnurvenenendothelzellen (HUVECs)	10
3.1.2.1. Zellkonditionierung	10
3.1.2.2. Immunfluoreszenz	10
3.2. Klinische Untersuchung der vaskulären Barriere	11
3.2.1. Untersuchung der Freisetzung endothelialer Glykokalyxbestandteile bei Kindern während herzchirurgischer Eingriffe	11
3.2.1.1. ELISA-Messung	11
3.2.2. Untersuchung der Entwicklung der Glykokalyxdicke bei Kindern während herzchirurgischen Eingriffen in vivo mittels Intravitalmikroskopie	11
3.2.2.1. Intravitalmikroskopie und Berechnung der Glykokalyxdicke	12
3.2.3. Untersuchung der endothelialen Dysfunktion bei erwachsenen herzchirurgischen Patienten	12
3.2.3.1. ELISA-Messung	12
3.2.4. Untersuchung der Entwicklung der Glykokalyxdicke bei erwachsenen Patienten während Narkoseeinleitung und gynäkologisch-operativen Eingriffen	12
3.2.4.1. Intravitalmikroskopie und Berechnung der Glykokalyxdicke	13
4. Ergebnisse	13
4.1. Experimentelle Untersuchungen der vaskulären Barriere	13
4.1.1. Isoliert schlagendes Mäuseherz in Langendorff-Perfusion	13
4.1.1.1. ELISA Messungen	13
4.1.1.2. Westernblot	13
4.1.1.3. Immunfluoreszenz	14
4.1.1.4. Elektronenmikroskopie	15
4.1.2. Versuche an humanen Nabelschnurvenenendothelzellen (HUVECs)	16
4.2. Klinische Untersuchungen der vaskulären Barriere	18
4.2.1. Untersuchung der Freisetzung endothelialer Glykokalyxbestandteile bei Kindern während herzchirurgischer Eingriffe	18
4.2.2. Untersuchung der Entwicklung der endothelialen Glykokalyxdicke bei Kindern vor und nach herzchirurgischen Eingriffen in vivo mittels Intravitalmikroskopie	18
4.2.3. Untersuchung der endothelialen Dysfunktion bei erwachsenen herzchirurgischen Patienten	21
4.2.4. Untersuchung der Entwicklung der Glykokalyxdicke bei erwachsenen Patienten während Narkoseeinleitung und gynäkologisch-operativen Eingriffen	23

5. Zusammenfassung	24
5.1. Experimenteller Teil	24
5.2. Klinischer Teil	25
6. Ausblick	26
7. Literaturverzeichnis	27
8. Danksagung	29
9. Schriftenverzeichnis	30
10. Publikationen der kumulativen Habilitationsleistung	33

## 1. Bedeutung für das Fachgebiet

Die endotheliale Gefäßbarriere hat eine wesentliche Bedeutung für den Stoffaustausch zwischen dem Blutgefäßsystem, dem Interstitium und damit letztlich für jede einzelne Zelle. Für die Aufrechterhaltung dieser Homöostase ist sie wesentlich mit verantwortlich.

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass die Gefäßbarriere nicht nur aus Endothelzellen und deren Zell-Zell-Verbindungen besteht. Vielmehr ist die luminal auf den Endothelzellen aufgelagerte endotheliale Glykokalyx und deren physiologisch aktive Form der „Endothelial Surface Layer“ verantwortlich für die Regulation der Permeabilität bzw. Impermeabilität dieser Grenzregion. Daneben ist die endotheliale Glykokalyx sehr wichtig für die Regulation von Zell-Adhäsionsvorgängen zirkulierender Blutzellen an die Endothelzellen.

Die endotheliale Glykokalyx kann nun durch verschiedene Einflussfaktoren, wie Inflammation, Hypoxie/Reperfusion, aber auch Hypervolämie geschädigt werden.

In der vorliegenden Arbeit konnten nun Methoden entwickelt werden, um diese sehr vulnerable Struktur zu visualisieren und unter experimentellen Bedingungen sichtbar zu machen. Der Nachweis der Struktur ist unbedingte Voraussetzung, um Einflussfaktoren hinsichtlich Alteration, aber auch Rekonvaleszenz nach Zerstörung der Glykokalyx (Shedding) experimentell untersuchen zu können.

Des Weiteren konnte in mehreren klinischen Arbeiten gezeigt werden, dass die endotheliale Glykokalyx indirekt mittels Intravitalmikroskopie nachgewiesen und auch alteriert werden kann. Das Shedding der Glykokalyx und die vaskuläre Integrität konnte sowohl bei Kindern, als auch bei erwachsenen Patienten gezeigt werden. Dieser Effekt konnte sowohl durch Nachweis von zirkulierenden Glykokalyxbestandteilen im Blut, als auch indirekt in vivo mittels Intravitalmikroskopie nachgewiesen werden.

## 2. Hintergrund und Zielsetzung

Eine intakte Gefäßbarriere ist unter anderem eine wesentliche Voraussetzung für die Trennung zwischen dem Intravasalraum und dem Interstitium, dem Stoffaustausch zwischen diesen Räumen und der Regulation der Zelladhäsion der im Blut zirkulierenden Zellen an das Endothel (16, 17). Lange Zeit ging man aufgrund unzureichender Darstellungsmethoden davon aus, dass die Endothelzellen alleine die vaskuläre Barriere darstellen und die darauf aufgelagerte endotheliale Glykokalyx (EG) nur eine sehr dünne „Zuckerschicht“ ohne physiologische Aufgabe darstellt. In den letzten Jahren hat sich dieses Bild gewandelt (15). Nicht zuletzt konnte von Mitarbeitern der Klinik für Anaesthesiologie der LMU gezeigt werden, dass die EG, welche hauptsächlich aus Proteoglykanen (u.a. Syndecan-1), Heparansulfat und Hyluronan besteht, eine Dimension von bis zu 1 µm aufweist und nahezu das gesamte intakte Gefäßsystem auskleidet (12, 13, 24). Zudem konnte gezeigt werden, dass es verschiedene Einflussfaktoren wie intravasale Hypervolämie (vermittelt durch atriale natriuretische Peptide) (9, 18), Inflammation (vermittelt u.a. durch TNF-alpha) (14) und Ischämie/Reperfusion (24) gibt, welche die EG schädigen. Daneben konnte gezeigt werden, dass es protektive Effekte durch z.B. die präischämische Applikation von Sevofluran (1) oder die Applikation von Albumin (20) gibt. Durch die Einlagerung von Plasmaproteinen (v.a. Albumin) wird die physiologisch aktive Form der EG, der Endothelial Surface Layer (ESL), gebildet (2).

Wesentliche Erkenntnisse wurden dabei experimentell deskriptiv mit Hilfe des isoliert schlagenden Meerschweinchenherzens und konsekutiver Untersuchung des Effluates auf EG Bestandteile, sowie der Elektronenmikroskopie gewonnen (17). Ein klinisches Modell waren Patienten, welche sich großen gefäßchirurgischen Operationen oder herzchirurgischen Eingriffen unterzogen haben, bei denen vor, während und nach dem operativen Eingriff die EG Bestandteile im Serum der Patienten bestimmt wurden (24)

Neben der EG und dem ESL ist die *endothelzelluläre* Komponente der vaskulären Barriere, vor allem in Zusammenschau mit der EG und dem ESL noch nicht ausreichend beleuchtet. Es scheint naheliegend, dass das Angiopoietin-System in den zellulären Anteil der Regulation der Permeabilität der Gefäßbarriere involviert ist. Die Chemokine Angiopoietin-1 und Angiopoietin-2 stellen dabei Antagonisten dar, wobei Angiopoietin-2 eine Zunahme der Permeabilität vermittelt und Angiopoietin-1 eine Abnahme (22). Ebenso involviert in diese Kaskade ist das endothelspezifische Zell-Zell-Adhäsionsmolekül VE-cadherin (25).

Ebenso unklar ist das Verhalten der endothelialen Glykokalyx bei pädiatrischen Patienten, welche einer Ischämie und Reperfusion ausgesetzt sind.

Die bisherig gewonnenen deskriptiven Ergebnisse stellen wichtige Meilensteine im Verständnis der Physiologie und Pathophysiologie der Vorgänge am Gefäßsystem dar und haben auch schon Einzug in den klinischen Alltag gefunden (3, 5, 6, 11, 21). Um jedoch auf einen Mechanismus der Schädigung schließen zu können, ist es erforderlich ein zelluläres Modell zu entwickeln, sowie mit genetisch veränderbaren Spezies (z.B. einem Mausmodell) zu arbeiten.

Mit Hilfe dieses Habilitationsprojektes sollten die bisherigen Erkenntnisse zur endothelialen Glykokalyx auf ein neu zu entwickelndes isoliert schlagendes Mäuseherzmodell übertragen werden, um damit mittels Knock-Out Tieren auf den Mechanismus einer Glykokalyxschädigung schließen zu können. Des Weiteren sollte ein Modell zur Kultivierung von humanen Nabelschnurvenenendothelzellen (HUVECs) entwickelt werden, mit dem die endotheliale Glykokalyx

aufgebaut und konditioniert werden kann. Später kann man diese Strukturen weiteren bildgebenden, deskriptiven und molekularen Untersuchungen zuführen. Sowohl für die Untersuchungen am isoliert schlagenden Mäuseherz, als auch an den HUVECs sollten neue Darstellungstechniken entwickelt werden.

Ein weiteres Ziel des Projektes war die Evaluation des endothelzellulären Anteils der vaskulären Barriere. In die Regulation der zellulär bedingten vaskulären Permeabilitätsänderung scheint das Angiopoietin-System involviert zu sein.

Konkret ließen sich folgende Fragestellungen formulieren:

#### Hauptfragestellungen:

1. Sind die bisherigen Erkenntnisse aus dem isoliert schlagenden Meerschweinchenmodell bezüglich des Sheddings der endothelialen Glykokalyx, auch auf ein neu zu entwickelndes isoliert schlagendes Mäuseherzmodell übertragbar?
2. Ist eine EG auch auf HUVECs unter Zellkulturbedingungen zu erzeugen und damit weiteren Untersuchungen zugänglich?
3. Führt Ischämie/Reperfusion auch bei pädiatrischen Patienten zu einer Degradation der endothelialen Glykokalyx?
4. Kommt es neben einer Schädigung der EG auch zu einer zellulären Schädigung der Gefäßbarriere unter Ischämie/Reperfusion?

### **3. Patienten, Material und Methodik**

Die einzelnen Methoden und Patientenkollektive werden nach den Hauptfragestellungen sortiert und dargestellt.

#### **3.1. Experimentelle Untersuchung der vaskulären Barriere**

##### 3.1.1. Versuche am isoliert schlagenden Mäuseherz

Um die erste Hauptfragestellung zu beantworten, war die Entwicklung eines neuen isoliert schlagenden Mäuseherzmodells erforderlich. Hierfür war nach Beantragung eines neuen Tierversuchsantrages (No. 55.2-1-54-2532.3-73-12) ein umfangreiches Trainingsprogramm erforderlich, um die Etablierung des neuen Modells in mikrochirurgischer Technik zu ermöglichen. Die mikrochirurgische Operationstechnik wurde unter anderem mit Hilfe von Dr. Paul Ritschl (Immunologisches Forschungslabor der Transplantationschirurgie der Medizinischen Universität Innsbruck) in Innsbruck (Österreich) erlernt. Die Tierversuche wurden am Institut für Physiologie (Schillerstr. 44, Ludwig-Maximilians-Universität München) durchgeführt. Die final etablierte Operationstechnik, mit der die Versuche durchgeführt wurden, wird nachfolgend beschrieben:

Zuerst wurde eine Allgemeinanästhesie mit Xylazin und Ketanest-S induziert. Nach Erreichen eines ausreichend tiefen Schlafstadiums wurde die Maus (C57/Bl6J) auf dem Rücken fixiert. Anschließend wurde Sauerstoff vorgelegt. Nach Versicherung einer ausreichenden Anästhesietiefe mit Hilfe des Zwischenzehenreflexes wurde die Maus desinfiziert.

Unter Spontanatmung erfolgte die mediane Laparotomie, sowie rechts und links eine infrathorakale Querinzisionen der Bauchdecke. Die Gallenblase wurde vorsichtig vom Zwerchfell abgelöst. Wenn

eine ausreichende Oxygenierung des Blutes vorlag, erfolgte die Zwerchfellinzision und Ablösung des Zwerchfells vom Thorax in der gesamten vorderen Zirkumferenz, dabei wurden die Lunge und das Herz streng geschont. Anschließend erfolgte die vorsichtige Inzision des dünnen Perikards und sofortige externe Kühlung mit etwa 5ml eiskalter, balancierter, plasmaisotoner Ringer-Acetat Lösung, woraufhin die myokardialen Kontraktionen sistierten.

Nach Durchtrennung des rechten und linken Hemithorax auf Höhe der jeweiligen hinteren Axillarlinie wurde das Xyphoid mit einer Gefäßklemme erfaßt und der Thorax nach oben aufgerollt. Es erfolgte eine nochmalige Kühlung mittels eiskalter Ringer-Acetat Lösung. Das Herz wurde mit Hilfe einer Kompresse, die nochmals mit eiskalter Ringer-Acetat-Lösung getränkt wurde, fixiert. Nun wurden alle Thymusanteile abpräpariert, um freie Sicht auf das obere Mediastinum zu erhalten. Der rechte Truncus brachiocephalicus wurde unterminiert und umschlungen. Ebenso wurde die Aorta ascendens mittels Faden umschlungen.

Anschließend wurde die aortale Perfusionskanüle in Perfusionsposition neben die Aorta ascendens platziert. Mit einer feinen mikrochirurgischen Pinzette und mikrochirurgischer Schere wurde vorsichtig die Aorta ascendens distal des Truncus inzidiert und die Aortenkanüle (stark modifizierte 24 G Stahlkanüle) eingebracht, bis die Spitze gerade noch distal der Aortenklappen sichtbar war. Die Kanüle wurde mit der vorher eingebrachten Umschlingung fixiert. Nach Fixierung erfolgt der Start der Perfusion (< 4 min kalte Präparationszeit, modifizierter Krebs-Henseleit-Puffer, druckkonstant mit 100cm H<sub>2</sub>O). Nach Perfusionsbeginn erfolgte die Inzision in die V. cava inferior suprahepatisch, um Entbluten und Druckentlastung zu ermöglichen. Bei guter Perfusion (Koronargefäße entfärben sich, Kontraktionen beginnen wieder), endgültige Fixierung der Aortenkanüle mit zweiter Umschlingung. Es wurde der rechte Lungenhilus ligiert und die rechte Lunge en bloc reseziert. Anschließend erfolgte die Freipräparation des linken Unterlappens und Luxation des selbigen nach rechts, die Ligatur und Absetzung. Umschlingung des linken Lungenhilus und Belassen der Fäden nach kaudal. Nun wurde das Gewebepaket um die V. cava sup. dex. und V. cava sup. sin. dorsal der Aortenkanüle angeschlungen, ligiert und distal der Ligatur abgesetzt.

Die Pulmonaliskanüle (Kunststoff, Spitze abgeschrägt, ID 0,58mm, OD 0,96mm) wurde im Bereich der Punktionsstelle vorgelegt. Es erfolgte eine vorsichtige, deutlich kleinere Inzision, als in die Aorta ascendens und die Pulmonaliskanüle wurde in den Truncus pulmonalis, ca. 1mm vom Ventrikel entfernt, mit zwei Pinzetten widerstandslos eingebracht. Anschließend wurde die Pulmonaliskanüle umschlungen, wobei der Übergang zwischen Myokard und A. pulmonalis geschont wurde, um die linke Koronararterie nicht zu ligieren. Danach wurde die linke Lunge ligiert und abgesetzt, ebenso die V. cava inferior und der Ösophagus distal des Herzens. Als letztes erfolgte eine große Sammelligatur um das hintere Gefäßpaket (etwaige Lungenvenen, etc.), dorsal des Herzens. Anschließend wurde das schlagende Herz mit der Pulmonalarterienkanüle aus dem Thorax gehoben und in eine Wärmekammer verbracht. Die Pulmonalarterienkanüle wurde ausgeleitet um das Effluat (Krebs-Henseleit-Puffer, der durch die Mikrostrombahn des Herzens geflossen ist und via im Truncus pulmonalis liegender Kanüle ausgeleitet wird), zu asservieren.

Aus den isoliert schlagenden Mäuseherzen wurden zum einen Effluat gewonnen, um mittels ELISA-Technik etwaig gescheddete EG-Bestandteile, bzw. deren Konzentration zu bestimmen. Zum anderen wurden die Mäuseherzen anschließend perfusionsfixiert, um entweder eine Aufarbeitung für die Immunfluoreszenzmikroskopie oder Elektronenmikroskopie durchzuführen.

### 3.1.1.1. Studienprotokoll Mäuseherzen

Aus den Vorversuchen war bekannt, dass eine 37°-Warmischämie einen maximalen EG Schaden verursacht. Daher wurde diese Intervention verwendet, um die Ergebnisse aus dem Meerschweinchenmodell zu vergleichen.

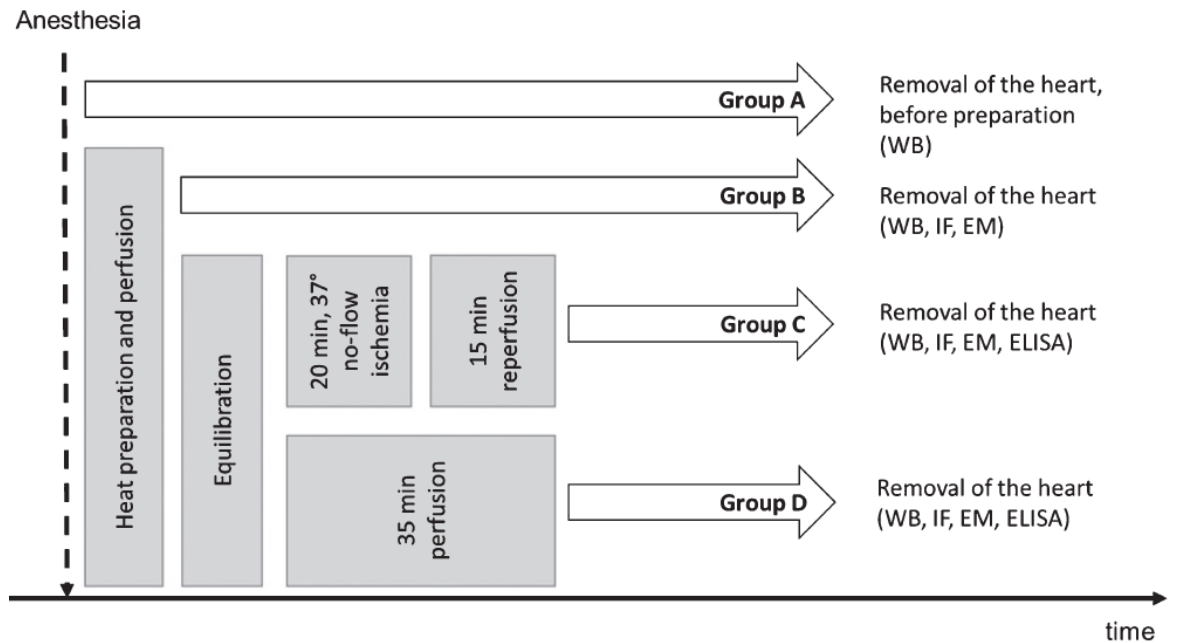


Abbildung 1- Studienprotokoll isoliert schlagendes Mäuseherz: in Gruppe A wurden die Herzen sofort nach Thorakotomie entfernt und lysiert um sie weiter zu untersuchen (mittels Western-Blot, WB)  
In Gruppe B wurden die Herzen kurz perfundiert um sie entweder für einen WB zu lysieren, oder für die Immunfluoreszenz (IF) oder Elektronenmikroskopie (EM) mittels Perfusion zu fixieren.  
In Gruppe C wurden die Herzen wie oben beschrieben perfundiert und einer 20minütigen No-Flow-Ischämie bei 37°C ausgesetzt. Hierbei wurden vorab und während der Reperfusion (15min) Effluats gewonnen um sie mittels ELISA zu untersuchen, ebenso wurden die Effluats mittels WB untersucht. Ein Teil der Herzen wurde für die IF und die EM fixiert.  
Gruppe D (Kontrollgruppe) wurde über 35 min perfundiert, die Effluats für den ELISA und Westernblot gewonnen. Ebenso wurde ein Teil der Herzen für die IF und die Elektronenmikroskopie fixiert (Abbildung modifiziert nach (7)).

### 3.1.1.2. Effluatgewinnung, -prozessierung und ELISA-Messung

Die Effluats wurden nach der Äquilibrationsphase, vor Versuchsbeginn und kontinuierlich in bestimmten definierten Zeitabständen während der Versuche gewonnen und anschließend mittels 3kDa Millipore Ultrafilter ca. 100-fach konzentriert, um eine maximale Ausbeute der darin enthaltenen Proteine und Proteoglykane zu erhalten. Anschließend wurden die Proben zunächst bei -20° und dann bei -80° bis zur eigentlichen Messung gefroren.

Nachdem die Proben gesammelt wurden, wurden die Messungen der Syndecan-1 Konzentrationen wie vom Hersteller (Dialone Research, R&D Systems) vorgegeben durchgeführt (7).

### 3.1.1.3. Westernblot

Der Westernblot wurde angewendet, um die Syndecan-1 Konzentration (Core Protein der EG) zu bestimmen. Herzen der Gruppen A, B, C und D wurden lysiert und die Proteinkonzentration



bestimmt. Ebenso wurde mit den Effluaten aus den Gruppen C (=Gruppe F) und D (=Gruppe E) verfahren. Die Lysate und Effluate wurden bis zur endgültigen Verwendung bei -20° gefroren. Kurz zusammengefasst wurden die Proben auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und, nach üblicher Bearbeitung mit einem primären Antikörper gegen murines CD-138 (Syndecan-1), über Nacht inkubiert. Nach Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Meerrettich-Peroxidase markiert), wurden die Membranen mit einem Chemilumineszenz-Verfahren entwickelt. Humanes beta-Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet (7).

#### 3.1.1.4. Immunfluoreszenz

Um ein etwaiges Shedding der EG nach Ischämie/Reperfusion festzustellen, wurde ein Immunfluoreszenzverfahren, bei dem Syndecan-1 an der Endothelzelloberfläche markiert wurde, durchgeführt. Sämtliche Untersuchungen (im Anschluss an die Perfusionsfixierung) wurden selbst weiterentwickelt, etabliert und am Lehrstuhl Anatomie II in Kooperation mit der AG Prof. Frank durchgeführt.

Zunächst wurden die Herzen der Gruppen B, C und D mit 4,5% Formaldehyd perfusionsfixiert, um ein optimales Fixationsergebnis direkt von luminalseitig zu bekommen. Die Herzen wurden jeweils mit 10ml Fixierlösung fixiert. Nach Fixierung wurden die Herzen in Paraffin gebettet, in 4µm dünne Scheiben semidünn geschnitten und auf einem Objektträger entparaffiniert. Um die Autofluoreszenz zu minimieren, wurden sämtliche Schnitte vor der Immunfluoreszenz für 72h mit UV-Licht nach einem Protokoll des Labors bestrahlt. Die Myokardschnitte wurden mit einem Primärantikörper (anti-mouse syndecan-1, AF3190) inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde ein AlexaFluor 546nm (A11056, AF456 donkey antigoat) verwendet. Abschließend wurden die Schnitte in einem Einbettmedium (Kaiser's) eingedeckelt.

Die Aufnahmen der Mäuseherzschnitte wurden mit einem konventionellen Merkur-Dampflampen Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiophot, Carl Zeiss Jena) und einer Mikroskopkamera (Zeiss AxicomHRc) aufgenommen und anschließend mit der Software Image J (Version 1.48c) analysiert.

Die Zeit zwischen Immunofluoreszenz und Aufnahme der Bilder war für alle Schnitte gleich, ebenso die Einstellungen der Kamera, um eine semiquantitative Auswertung der Bilder hinsichtlich der Emittenz zu ermöglichen (7).

#### 3.1.1.5. Elektronenmikroskopie

Die Herzen der Gruppe B, C und D wurden mittels Elektronenmikroskopie untersucht. Sämtliche Prozessschritte, inklusive der Bildaufnahmen, wurden vom Antragsteller selbstständig an der Anatomischen Anstalt (Lehrstuhl II) durchgeführt.

Hierfür wurde eine ursprünglich von Vogel et al publizierte Methode modifiziert. Ein wesentlicher Unterschied ist die Durchführung einer Perfusionsfixierung, im Gegensatz zur Immersionsfixierung bei den Meerschweinchenherzen. Dabei wurden die Herzen am Ende des jeweiligen Beobachtungszeitpunktes mit 10ml Fixationslösung intrakoronar gespült, welche aus 2,5% Glutaraldehyd, 12% Sucrose, 0,4M Cacodylat Puffer und 4% Lanthan-Nitrat besteht. Dies ermöglicht eine sofortige Fixierung von luminalseitig im gesamten Gefäßbett. Anschließend wurden die fixierten Herzen in 1mm<sup>3</sup> große Würfel geschnitten und immersions-nachfixiert. Bevor die Herzen mit 1% Osmiumtetroxid und 2% Lanthan kontrastiert wurden, wurden sie in einer 0,1N Hydroxid-Lösung gewaschen. Um die Herzstückchen einbetten zu können, mussten sie in einer aufsteigenden

Alkoholreihe entwässert werden. Nach dem Entwässern wurden die Herzen in propylenoxidhaltiges Einbettmedium gelegt und einzeln in kleinen Kammern für 48h bei 60° getrocknet.

Im weiteren Verlauf wurden die dabei entstandenen einzelnen Epoxyd/Präparatwürfel so zugeschnitten, dass die Gewebestückchen einem Semi-Dünnschnitt zugänglich waren. Dieser wurde mit Toluidin-Blau gefärbt und unter dem Lichtmikroskop hinsichtlich interessanter Areale untersucht. Sind relevante Areale identifiziert worden, so wurden diese mit dem Mikrotom in 70nm dünne Scheiben ultradünn geschnitten, auf Kupfer-Grids gebracht und mit Uranyl-Acetat nachkontrastiert. Anschließend wurden die Bilder mit einem TEM Libra 120 Elektronenmikroskop aufgenommen (7).

### 3.1.2. Versuche an humanen Nabelschnurvenenendothelzellen (HUVECs)

Für die Zellkulturversuche musste in vielen Versuchsreihen ein Setting etabliert werden, mit dem es gelang die HUVECs zu isolieren, zu kultivieren und Bestandteile der EG darzustellen. Aus Vorversuchen der Arbeitsgruppe war bekannt, dass bei der Isolation die EG initial geschädigt wird und diese erst wieder aufgebaut werden muss. Es wird das Protokoll vorgestellt, bei der die Zellen über mehrere Tage konditioniert wurden und anschließend Heparansulfat markiert wurde (19).

#### 3.1.2.1. Zellkonditionierung

Sämtliche Zellen wurden aus frischen Nabelschnüren, welche direkt aus dem Sectio-OP (Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe) geholt wurden, isoliert. Nachdem die Zellen völlig anonymisiert verwendet wurden, hat die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der LMU eine ethische Unbedenklichkeitserklärung für dieses Allokationsverfahren ausgestellt.

Nach der Isolation wurden sie zunächst in Endothelzell-Wachstums Medium (Promocell) in einer T-Flasche im Wärmeschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) bis zur Konfluenz vermehrt und nach der 3. Passage für die Versuche verwendet. Um eine EG auf den HUVECs zu erhalten, müssen Flussbedingungen etabliert werden, die einen möglichst laminaren Shear-Stress erzeugen. Dies konnte mit dem Perfusionssystem der Fa. ibidi (Martinsried, Deutschland) realisiert werden. Dabei wurden die isolierten HUVECs in kleine, vorher in einem mehrstufigen Prozess beschichtete, Flusskammern (pro ibidi  $\mu$ Slide, 1,3x10<sup>6</sup> Zellen) gesät. Diese wurden dann unter statischen Bedingungen für 24h im Slide im Brutschrank kultiviert, um eine Konfluenz zu erreichen. Nach Konfluenz wurden die einzelnen Slides im Brutschrank mit dem ibidi-Pumpensystem konnektiert und für 7 Tage einem laminaren, für den Zelltyp physiologischen, Fluss (5 dyn/cm<sup>2</sup>, entspricht 3,8ml Fluss im gewählten Slide) ausgesetzt.

Um einen Glykokalyxschaden auf den Zellen zu erzeugen, wurde für die Zellkulturversuche unter anderem Progesteron verwendet, von dem aus Vorversuchen bekannt ist, dass es zu einer EG Degradation führt (19).

#### 3.1.2.2. Immunfluoreszenz

Bei den HUVECs hat sich die Markierung von Heparansulfat als effektiv erwiesen, weshalb diese hier vorgestellt wird. Nach Ende des Beobachtungszeitraumes bzw. der Intervention, wurden die Zellen mit 0,5% Glutaraldehyd fixiert und gewaschen. Die Immunfluoreszenz wurde nach einem eigens entwickelten Protokoll mit einem primären monoklonalen Anti-Heparansulfat Antikörper (F58-10E4) und einem sekundären fluoreszierenden Antikörper (AlexaFluor) AF488 durchgeführt. Die Zellkerne wurden als Kontrolle mit TO-PRO-3 Iodid gegengefärbt, so dass Heparansulfat im grünen

Wellenlängenbereich emittiert und die Zellkerne im roten. Nach der Immunfluoreszenzmarkierung wurden die Zellen im Slide mit Mounting Medium vor der Bildaufnahme eingebettet. Die Bilder wurden mit einem LEICA-TCS Konfokalmikroskop, einem 20x0,50NA PlanFluorObjektiv und der Software LAS X Core aufgenommen. Jedes Bild enthält dabei etwa 1300 konfluente Zellen. Es wurden zufällig drei Stellen aus jedem Slide ausgewählt. Die Immunfluoreszenz wurde semiquantitativ mit der Gesamt Zell Fluoreszenz (CTFT) mit Hilfe der graphischen Software Image J aufgenommen (19).

### **3.2. Klinische Untersuchungen der vaskulären Barriere**

Für die Untersuchung der vaskulären Barriere in vivo wurden verschiedene klinische Studien durchgeführt. Aus Vorarbeiten war bekannt, dass sich der Ischämiestress von herzchirurgischen Patienten gut eignet, um einen Schaden an der vaskulären Barriere zu induzieren. Es wurden hierfür drei Studien durchgeführt. In zwei Studien sollte erstmalig eine Schädigung der endothelialen Glykokalyx, in Abhängigkeit vom Ausmaß der Ischämie, bei Kindern während und nach herzchirurgischen Eingriffen zeigen. Eine weitere Studie sollte die Beteiligung der Endothelzellen und deren Zell-Zell-Kontakte an der Schädigung der vaskulären Barriere, bei erwachsenen herzchirurgischen Patienten zeigen.

#### **3.2.1. Untersuchung der Freisetzung endothelialer Glykokalyxbestandteile bei Kindern während herzchirurgischer Eingriffe**

Insgesamt 42 Kinder wurden in die Studie eingeschlossen, wobei die Eingriffe entweder mit kardiopulmonalem Bypass unter schlagendem Herzen (regionale Ischämie der Lunge, n=10), kardiopulmonalem Bypass und Klemmen der Aorta (regionale Ischämie von Herz und Lunge, n=24), oder unter tiefem hypothermen Kreislaufstillstand durchgeführt wurden (n=8). Nach Narkoseeinleitung (T0), vor Beginn des Bypasses (T1), fünf Minuten nach Ende des Bypasses (T2) und nach Verlegung auf die Intensivstation (T3) wurde den Patienten Blut entnommen. Das Blut wurde unmittelbar zentrifugiert, zunächst bei -30°C und anschließend bei -80° bis zur Messung von Syndecan-1 und Hyaluronan gefroren (10).

##### **3.2.1.1. ELISA-Messung**

Für die Messung von Syndecan-1 wurde ein ELISA-Kit verwendet (Diaclone Research, Besancon Frankreich), welcher einen monoklonalen B4-Antikörper benützt, der gegen die extrazelluläre Domäne des von humanem Syndecan-1 gerichtet ist. Für die Messung von Hyaluronan wurde ein ELISA-Kit (Echelon Biosciences, Salt Lake City, USA) verwendet, der sowohl niedrig- als auch hochmolekulares Hyaluronan quantitativ erfasst (10).

#### **3.2.2. Untersuchung der Entwicklung der Glykokalyxdicke bei Kindern während herzchirurgischen Eingriffen in vivo mittels Intravitalmikroskopie**

In dieser Studie wurden insgesamt 40 Kinder, welche sich herzchirurgischen Eingriffen unterzogen haben (kardiopulmonaler Bypass n=36, kein kardiopulmonaler Bypass n=4), untersucht. Als Kontrollgruppe dienten Kinder vor und nach Herzkatheteruntersuchung (n=6) sowie vor und nach Lippen-Kiefer-Gaumenspaltenverschluss (n=9) (23).

### 3.2.2.1. Intravitalmikroskopie und Berechnung der Glykokalyxdicke

Um eine Änderung der Glykokalyxdicke zu erfassen, wurde mittels Intravitalmikroskopie (an der Ohrmuschel) in 325-facher Vergrößerung (MicroScan, 5x/0.2; MicroVision Medical, Amsterdam) und „Sidestream Darkfield“ Technologie vor Beginn des chirurgischen Eingriffes (T0), nach Verlegung der Patienten auf die Intensivstation (T1), 24 Stunden nach Ende des Eingriffes (T2) sowie 7 Tage postoperativ (T3) jeweils eine kurze Videosequenz erfasst. Nach dem Erfassen der Videosequenz wurde diese mittels der GlycoCheck-Measurement Software (GlycoCheck BV, Maastricht, Niederlande) ausgewertet. Die Software misst automatisch die Weite der Erythrozytensäule (red blood cell column width=RBCW) in mindestens 3000 Gefäßabschnitten. Daraus wird zunächst der Median und anschließend mittels linearer Regressionsanalyse die maximale RBCW berechnet. Die „perfused boundary region“ (PBR) ist der Bereich im endothelial surface layer (ESL), der für die Erythrozyten gerade noch penetrierbar ist und definiert als  $\frac{1}{2} * (\text{maximum} - \text{median RBCW})$ . Nimmt die Dicke des ESL ab, so können die Erythrozyten näher an die Endothelzellen gelangen und die maximale RBCW und folglich auch die PBR nehmen zu (23).

### 3.2.3. Untersuchung der endothelialen Dysfunktion bei erwachsenen herzchirurgischen Patienten.

In diese Studie wurden insgesamt 30 Patienten eingeschlossen, welche sich elektiven koronaren Bypass-Operationen mit (CCAB, n=15) oder ohne kardiopulmonalem Bypass (OPCAB, n=15) unterzogen haben. Die Untersuchung der Glykokalyxbestandteile dieser Studie wurde bereits in einer früheren Arbeit von Bruegger et al. publiziert. In dieser Arbeit sollte nun das Ausmaß der Ischämie/Reperfusion hinsichtlich einer etwaigen Beteiligung der Endothelzellen bzw. der Endothelzell-Zell Kontakte, an einer Schädigung der vaskulären Barriere, näher untersucht werden. Dafür wurde in beiden Gruppen Blut vor (T0) und nach Einleitung der Allgemeinanästhesie (T1) entnommen. In der CCAB-Gruppe wurde Blut bei Beginn der Herz-Lungen-Maschine (CPB, T2), nach Entfernen der aortalen Klemme (T3), 5 Minuten nach Ende des CPB (T4), sowie eine Stunde nach dem vorherigen Zeitpunkt (T5) entnommen. In der OPCAB-Gruppe hingegen wurde nach Platzierung des Stabilisators (T2), nach Verbringen des Herzens in die Ausgangsposition (T3), nach Beginn der Blutstillung (T4) sowie eine Stunde nach vorherigem Zeitpunkt (T5) Blut entnommen. Alle Proben wurden unmittelbar zentrifugiert und bei -80°C bis zur weiteren Analyse gefroren (4).

#### 3.2.3.1. ELISA Messung

Es wurden zu allen Zeitpunkten die Plasma Konzentrationen von Angiopoietin-1 und Angiopoietin-2 mittels ELISA (R&D Systems, Minneapolis, USA) bestimmt. Ebenso wurde die Plasma-Konzentration von VE-cadherin mittels ELISA (Bender MedSystem, Wien, Österreich) bestimmt. Erstmals bei herzchirurgischen Patienten wurde auch das endothelzell-spezifische Molekül Endocan bestimmt, welches ein Marker für endothelialen Stress darstellt und durch seine Bindung an das Integrin „leukocyte function associated antigen-1“ (LFA1) einen potentiell protektiven Effekt aufweist (4).

### 3.2.4. Untersuchung der Entwicklung der Glykokalyxdicke bei erwachsenen Patienten während Narkoseeinleitung und gynäkologisch-operativen Eingriffen

In diese Studie wurden insgesamt 150 weibliche Patientinnen eingeschlossen, die sich einem gynäkologischen Eingriff unterzogen haben. Davon wurden bei 84 Patientinnen die Glykokalyxdicke gemessen.(8)

### 3.2.4.1. Intravitalmikroskopie und Berechnung der Glykokalyxdicke

Um eine Änderung der Glykokalyxdicke zu erfassen wurde mittels Intravitalmikroskopie (sublingual) in 325-facher Vergrößerung (MicroScan, 5x/0.2; MicroVision Medical, Amsterdam) und „Sidestream Darkfield“ Technologie eine kurze Videosequenz erfasst. Nach dem Erfassen der Videosequenz wurde diese mittels der GlycoCheck-Measurement Software (GlycoCheck BV, Maastricht, Niederlande) ausgewertet. Die Software misst automatisch die Weite der Erythrozytensäule (red blood cell column width=RBCW) in mindestens 3000 Gefäßabschnitten. Daraus wird zunächst der Median und anschließend mittels linearer Regressionsanalyse die maximale RBCW berechnet. Die „perfused boundary region“ (PBR) ist der Bereich im endothelial surface layer (ESL), der für die Erythrozyten gerade noch penetrierbar ist und definiert als  $\frac{1}{2} * (\text{maximum} - \text{median RBCW})$ . Nimmt die Dicke des ESL ab, so können die Erythrozyten näher an die Endothelzellen gelangen und die maximale RBCW und folglich auch die PBR nehmen zu.(8)

## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Experimentelle Untersuchungen der vaskulären Barriere**

#### 4.1.1. Isoliert schlagendes Mäuseherz in Langendorff-Perfusion

##### 4.1.1.1. ELISA-Messungen

Es wurden die 100-fach konzentrierten Effluat der Gruppen C (Kontrollgruppe) und D (20-minütige no-flow-Ischämie bei 37° und 15-minütige Reperfusion) verglichen. Dabei wurden die Effluat hinsichtlich der Konzentration von Syndecan-1 und Heparansulfat untersucht. Obwohl die Standardkurven sich exakt wie vom Hersteller vorgegeben präsentiert haben, konnte entweder kein Unterschied zwischen beiden Gruppen dargestellt oder kein von „null“ unterschiedlicher Wert festgestellt werden. Die ELISA Messungen wurden mit murinen und humanen Kits und mit unterschiedlichen Konzentrationsschritten mehrfach wiederholt. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde das Modell des isoliert schlagenden Mäuseherzens für die quantitative Evaluation der Glykokalixschädigung verlassen, nachdem aus Vorversuchen bekannt war, dass eine 20-minütige Warmischämie eine maximale Schädigung verursacht. Neben den publizierten Gruppen C und D wurde auch die Zugabe von Angiopoietin-2, TNF-alpha und Lipopolysaccharid untersucht. Wie zu erwarten, hat sich auch bei diesen Interventionen in der ELISA-Messung kein Unterschied gezeigt (7).

##### 4.1.1.2. Westernblot

Nachdem die ELISA-Messungen keine quantitative Aussage über eine Glykokalixschädigung im isoliert schlagenden Mausmodell ermöglichten, wurde ein Westernblot sowohl der gesamten und lysierten Mäuseherzen, als auch der konzentrierten Effluat durchgeführt. Da beim Westernblot eine Proteinbestimmung erfolgt, wurde dieses Verfahren nur für Syndecan-1 durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2 zu sehen. Letztlich konnte nur in den noch Blut enthaltenden Herzen Syndecan-1 detektiert werden.



Abbildung 2- Western Blot und Ladekontrolle: A= Leiter, B = Herzlysate mit Blut unmittelbar nach Entfernung aus dem Thorax (Gruppe A), C = kurz perfundiertes Herz (blutfrei, Gruppe B), D/E = ultrakonzentriertes Effluat der Kontroll- (Gruppe D) und Ischämiegruppe. F= Herzlysate von Herzen nach Ischämie/Reperfusion (Gruppe C). Syndecan-1 wurde nur in den Herzen detektiert, welche noch Blut enthalten haben (Abbildung modifiziert nach (7)).

#### 4.1.1.3. Immunfluoreszenz (qualitativ und semiquantitativ)

Die Immunfluoreszenz wurde für die qualitative und semiquantitative Untersuchung einer Glykokalyxschädigung verwendet. Es wurde ein muriner Antikörper gegen Syndecan-1 verwendet. Dabei wurden Herzen untersucht, welche unmittelbar nach Thorakotomie kurz perfundiert wurden, um makroskopische Blutfreiheit in den Koronarien zu erreichen (Gruppe B). Ebenso wurden Herzen der Kontrollgruppe (Gruppe D) und Herzen nach 20-minütiger no-flow-Warmischämie (37°C) und anschließender Reperfusion untersucht. In der qualitativen Analyse (Abbildung 3) sieht man deutliche Unterschiede zwischen Gefäßen von Herzen mit und ohne Ischämie (7).

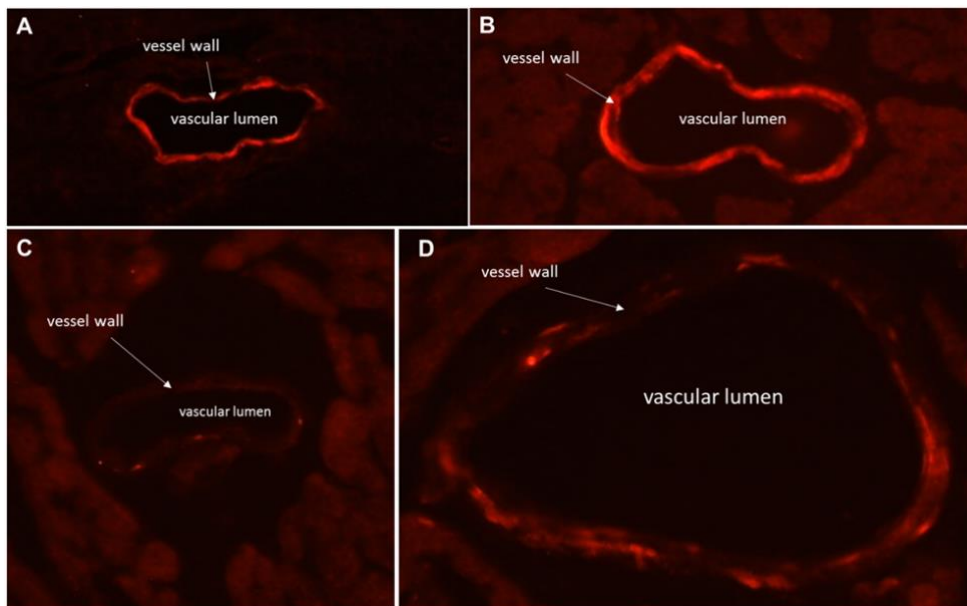


Abbildung 3-Immunfluoreszenzmarkierung von Syndecan-1 in Mauskapillaren (Primärantikörper gegen CD138=Syndecan-1, fluoreszierender Sekundärantikörper AlexaFluor 546nm): Bild A: blutfreie Herzen der Gruppe B mit Syndecan-1 Nachweis in der gesamten Zirkumferenz des Gefäßes. Bild B: Kapillare eines Herzens der Kontrollgruppe (Gruppe D, 15 min Äquilibration und 35 min Perfusion) mit Syndecan-1 Nachweis in der gesamten Zirkumferenz. Bild C und D: Herzen nach 20 minütiger Ischämie und 15 minütiger Reperfusion (Gruppe C) und einer deutlichen Abnahme der Intensität von Syndecan-1 über der gesamten Gefäßwand (Abbildung modifiziert nach (7)).

Aufgrund der negativen Ergebnisse aus den ELISA-Bestimmungen wurden die Immunfluoreszenzbilder semiquantitativ mit ImageJ ausgewertet. Um die einzelnen Aufnahmen vergleichbar zu machen, wurde der zeitliche Abstand zwischen Immunfluoreszenzmarkierung und Aufnahme der jeweiligen Bilder gleich gewählt. Ebenso wurden alle Bilder mit den exakt gleichen Mikroskop- und Kameraeinstellungen durchgeführt. Die mittleren Grauwerte der Gefäßwand wurden bestimmt und von den mittleren Grauwerten des Hintergrundes subtrahiert. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Syndecan-1 Intensität von Herzen der Kontrollgruppe bzw. blutfreien sofort perfusionsfixierten Herzen und Herzen nach Ischämie/Reperfusion (Abbildung 4, (7)).

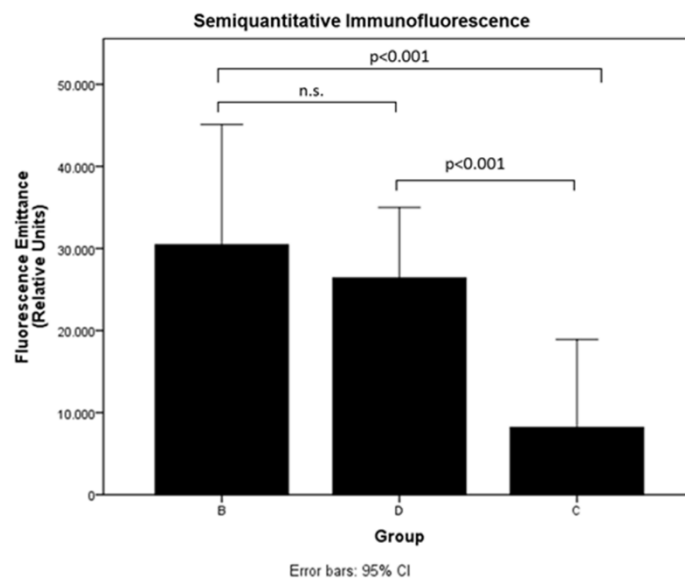


Abbildung 4- semiquantitative Immunfluoreszenz: Gruppe B: Kanülierung der Aorta, kurze Perfusion und Perfusionsfixierung nach makroskopisch intrakoronarer Blutfreiheit. Gruppe D: 15 min Äquilibration und 35 min Perfusion, anschließende Perfusionsfixierung. Gruppe C: 20 min Warmischämie (no-flow, 37°C), anschließend 15 minütige Reperfusion und Perfusionsfixierung (Abbildung modifiziert nach (7)).

#### 4.1.1.4. Elektronenmikroskopie

Für die elektronenmikroskopische qualitative Untersuchung der EG wurden zufällig ausgewählte Gewebewürfel der Gruppen C und D verwendet (Abbildung 5). Es zeigte sich dabei in der Kontrollgruppe eine die gesamte Gefäßwand umfassende EG mit einer Dicke von etwa 150nm (Abbildung 5, Bild A-C) und in der Ischämiegruppe eine dramatische Reduktion der Glykokalyxdicke, bzw. vollständige Schädigung der Glykokalyx (Abbildung 5, Bild D und E, (7)).

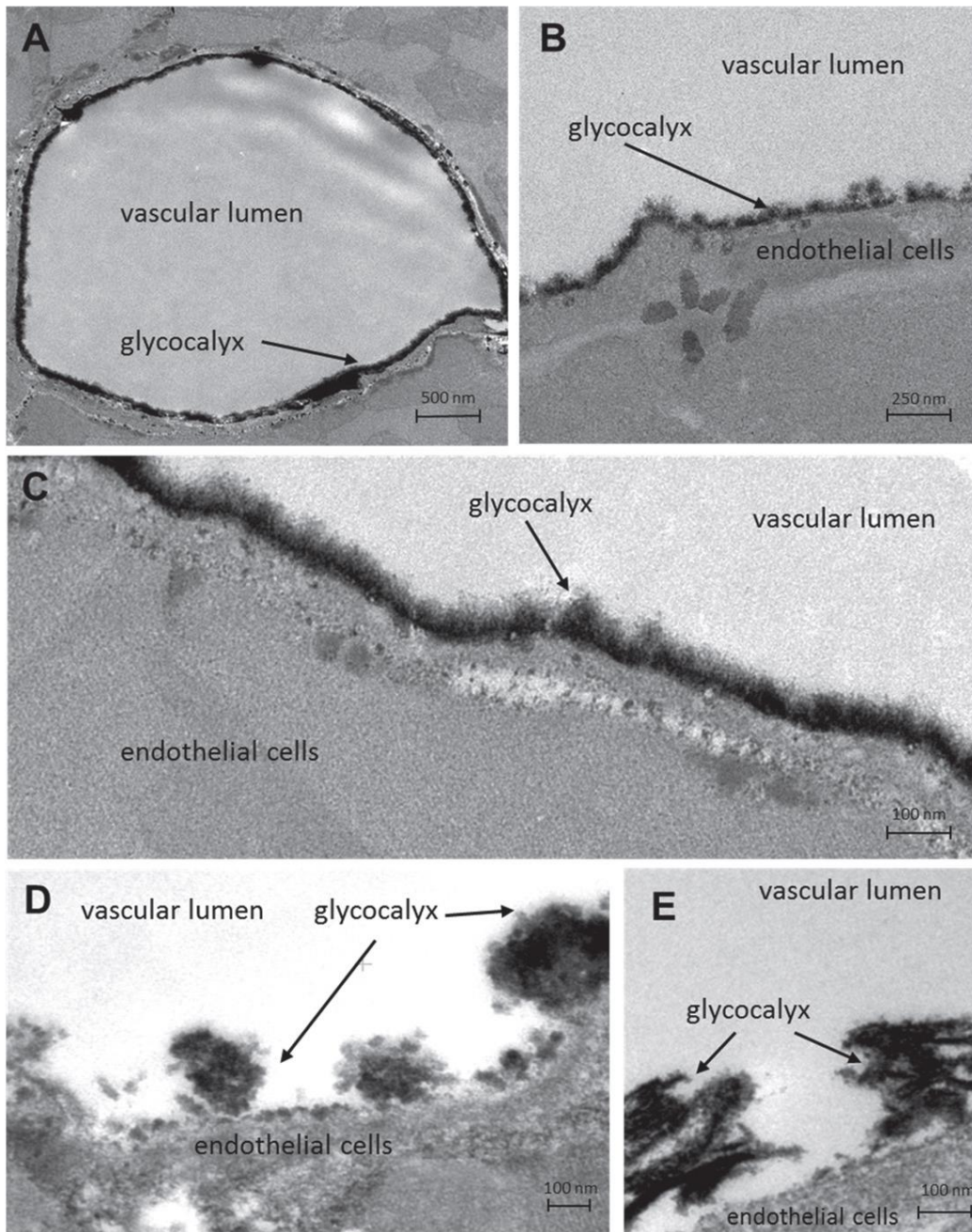


Abbildung 5- Elektronenmikroskopische Aufnahmen einer intakten (Bild A-C) und degradierten Glykokalyx (Bild D und E): Bild A: Überblick einer murinen Kapillare mit einer endothelialen Glykokalyx in der gesamten Zirkumferenz (Gruppe D). Bild B und C: detailliertere Abbildung der erhaltenen Glykokalyx (Gruppe D). Bild D und E: Völlig degradierte EG nach 20-minütiger Warmischämie und 15-minütiger Reperfusion (Gruppe C, Abbildung modifiziert nach (7)).

#### 4.1.2. Versuche an humanen Nabelschnurvenenendothelzellen (HUVECs)

Es konnte gezeigt werden, dass unter der oben beschriebenen Flusskonditionierung, nach etwa 7 Tagen, eine konfluente endotheliale Glykokalyx auf HUVECs induziert werden kann. Nachgewiesen wurde dies qualitativ über eine Immunfluoreszenzmarkierung von Heparansulfat auf den HUVECs in



den  $\mu$ Slides (Abbildung 6, Bild D und E). Ebenso nachgewiesen wurde eine Abnahme der Heparansulfatfluoreszenzintensität nach Inkubation mit Progesteron (Abbildung 6, Bild A und B; Abbildung 7). Progesteron ist in Vorversuchen als ein potentieller Auslöser einer Glykokalyxschädigung identifiziert worden. Semiquantitativ konnte gezeigt werden, dass die CTCF nach Inkubation mit Progesteron um den Faktor 2,03 signifikant ( $p < 0,001$ ) abnimmt (Abbildung 7, (19)).

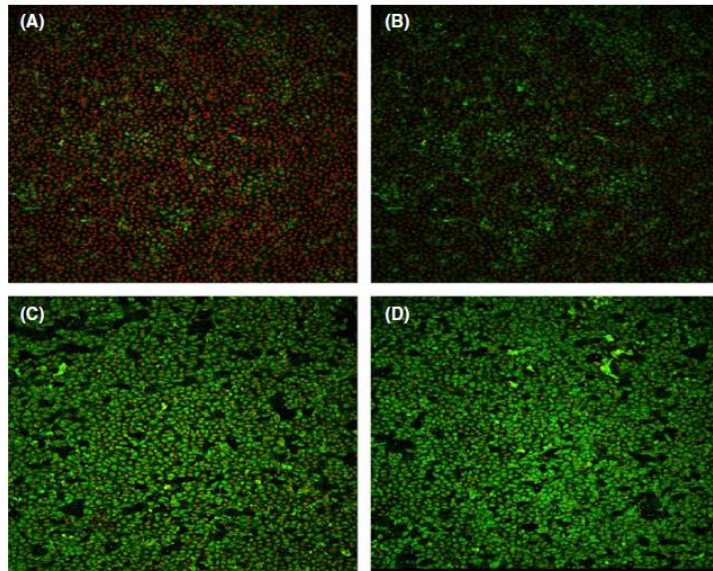


Abbildung 6- HUVECs nach siebentägiger Flusskonditionierung unter shear stress: Immunfluoreszenzmarkierung von Heparansulfat (grün) und Nucleoli (TO-PRO, rot). Konfokalmikroskopie mit 20x0,5NA PlanFluor Objektiv. Bild A, B: Inkubation der Zellen mit Progesteron. Bild B, C: Kontrollgruppe (Abbildung modifiziert nach (19)).

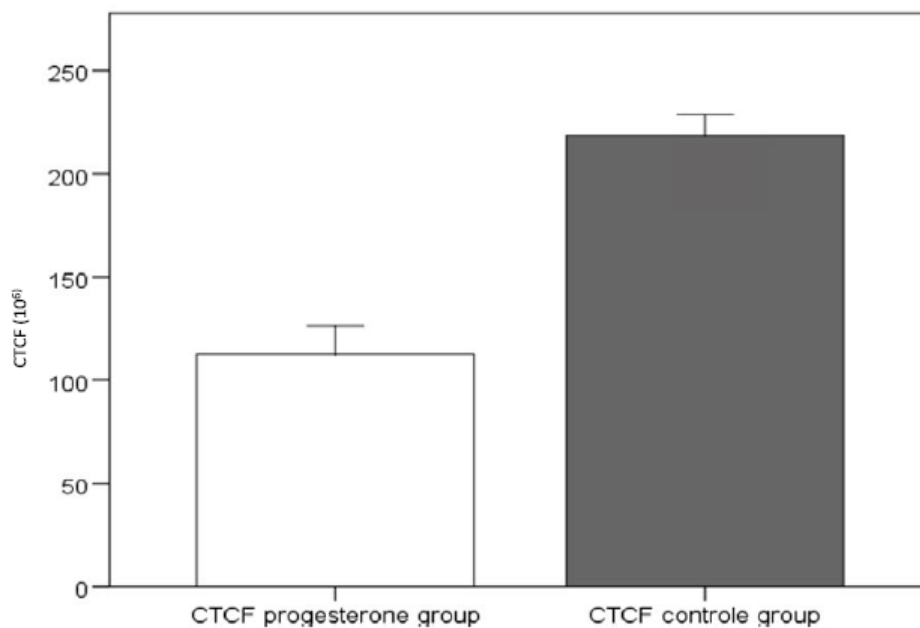


Abbildung 7- Semiquantitative Darstellung der Abnahme der Immunfluoreszenzintensität unter Progesteroneinfluss. CTCF: korrigierte Gesamt Zell Fluoreszenz (Abbildung modifiziert nach (19)).

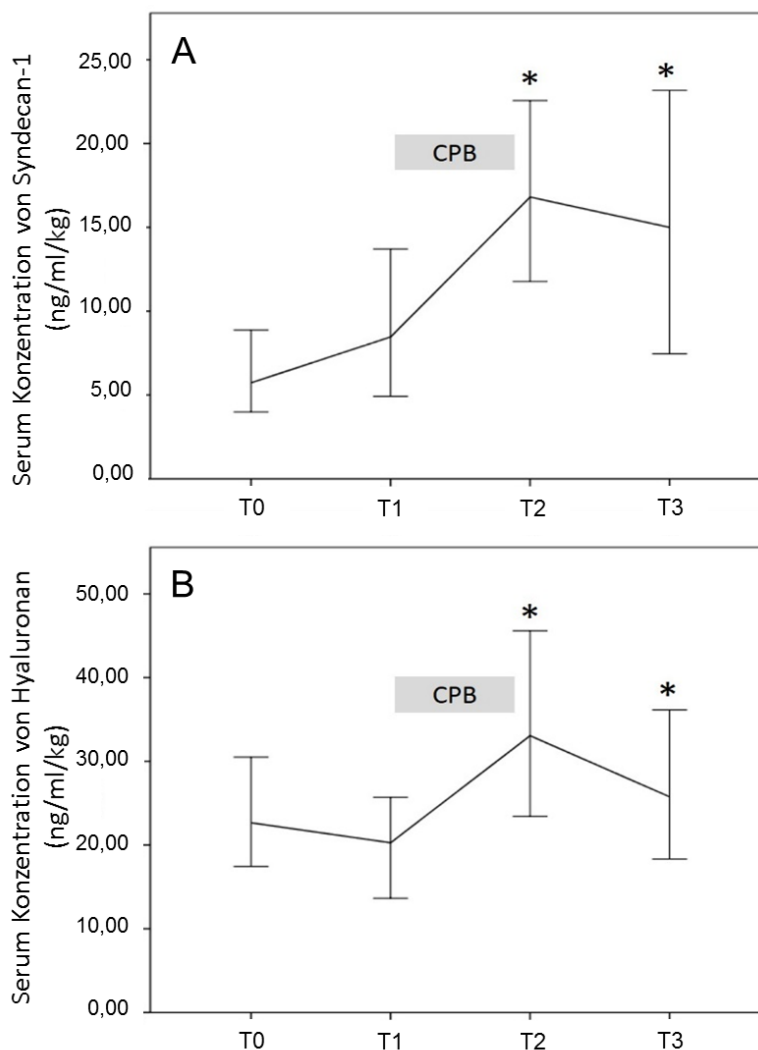
## 4.2. Klinische Untersuchungen der vaskulären Barriere

Zunächst werden in der Habilitationsschrift die Ergebnisse des Einflusses von unterschiedlichem Ischämiestress bei Kindern während herzchirurgischer Eingriffe vorgestellt, bevor auf die Ergebnisse der Untersuchung der vaskulären Barriere bei Erwachsenen eingegangen wird.

### 4.2.1. Untersuchung der Freisetzung endothelialer Glykokalyxbestandteile bei Kindern während herzchirurgischer Eingriffe

In dieser klinischen Studie konnte gezeigt werden, dass es, ähnlich wie bei erwachsenen Patienten, auch bei Säuglingen und Kleinkindern zu einer Schädigung der endothelialen Glykokalyx unter dem Einfluss von Ischämie kommt. Im Gesamtkollektiv konnte ein signifikanter Anstieg von Syndecan-1 und Hyaluronan nach kardiopulmonalem Bypass gezeigt werden (Abbildung 8).

Abbildung 8- Serumkonzentrationen von Syndecan-1 (Bild A) und Hyaluronan (Bild B) bezogen auf das



Körpergewicht von 42 Kindern während herzchirurgischer Eingriffe. T0: nach Narkoseeinleitung, T1: vor Beginn des Bypasses, T2: fünf Minuten nach Ende des Bypasses, T3: nach Verlegung auf die Intensivstation. Die Daten sind als Median mit 95% Konfidenzintervall abgebildet. CPB= kardiopulmonaler Bypass, \*=p<0,05, (Abbildung modifiziert nach (10)).

Unterscheidet man die einzelnen Patienten hinsichtlich des Ausmaßes der Ischämie, so konnte auch ein signifikanter Unterschied im Grad der Freisetzung von Glykokalyxbestandteilen gezeigt werden. So kam es beispielsweise bei Patienten mit tiefer Hypothermie zu einem signifikanten 3,7 fachen Anstieg der Syndecan-1 Konzentration und zu einem 1,7 fachen signifikanten Anstieg von Hyaluronan, 5 Minuten nach Ende des kardiopulmonalen Bypasses. Der Anstieg von Syndecan-1 in der Gruppe, die einen kardiopulmonalen Bypass ohne Klemmung der Aorta hatte, war hingegen nicht signifikant (Abbildung 9, (10)).

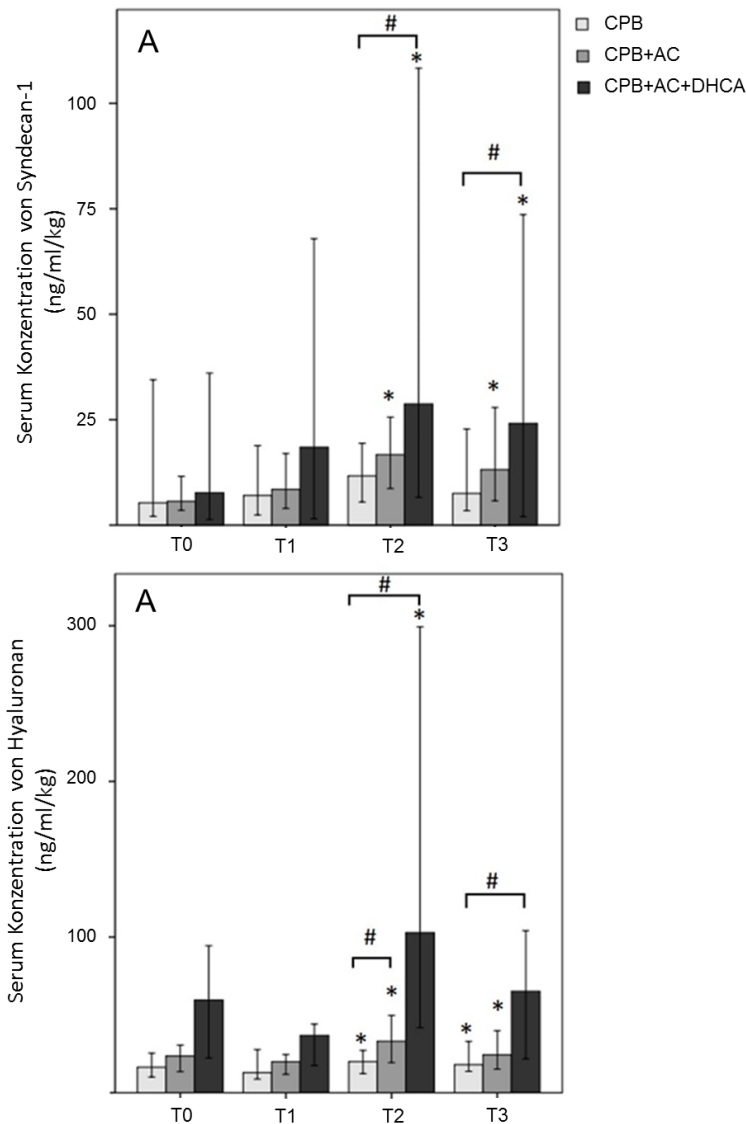


Abbildung 9- Serumkonzentration von Syndecan-1 (Bild A) und Hyaluronan (Bild B) bezogen auf das Körpergewicht. CPB (n=10, regionale Ischämie der Lunge), CPB+AC (n=24, regionale Ischämie von Herz und Lunge), CPB+AC+DHCA (n=8, globale Ischämie). T0: nach Narkoseeinleitung, T1: vor Beginn des Bypasses, T2: fünf Minuten nach Ende des Bypasses, T3: nach Verlegung auf die Intensivstation. Die Daten sind abgebildet als Median mit 95% Konfidenzintervall. \*=signifikanter Unterschied innerhalb der Gruppe zwischen unterschiedlichen Zeitpunkten, #=signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen zu einem Beobachtungszeitpunkt.  $p < 0,05$ , CPB= kardiopulmonaler Bypass, AC=aortale Klemmung, DHCA= Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie (Abbildung modifiziert nach (10)).

#### 4.2.2. Untersuchung der Entwicklung der endothelialen Glykokalyxdicke bei Kindern vor und nach herzchirurgischen Eingriffen in vivo mittels Intravitalmikroskopie

Die Intravitalmikroskopie stellt die bisher einzige in-vivo Möglichkeit dar, um eine Degradation der EG in Echtzeit zu erfassen. Bei insgesamt 40 Kindern (n=36 mit CPB, n=4 ohne CPB), welche sich einem herzchirurgischen Eingriff unterzogen haben und bei sechs Kindern vor und nach Herzkatheteruntersuchung, sowie 9 Kindern vor und nach Verschluss einer Lippen-Kiefer-Gaumenspalte, wurde mittels Intravitalmikroskopie eine Messung und Analyse mit GLYCOCHECK durchgeführt. Letztlich konnten von den ursprünglich 36 Patienten nur Daten von 21 Patienten postoperativ verwendet werden. Es zeigte sich bei den Kindern, welche mit CPB und dementsprechendem ischämischen oder inflammatorischen Stress operiert wurden, eine signifikante Zunahme der PBR und damit Abnahme der EG im Vergleich zu den präoperativen Werten. Im Laufe der ersten sieben postoperativen Tage kam es wieder zu einer Normalisierung der Werte (Abbildung 10, Bild A und B, (23)).

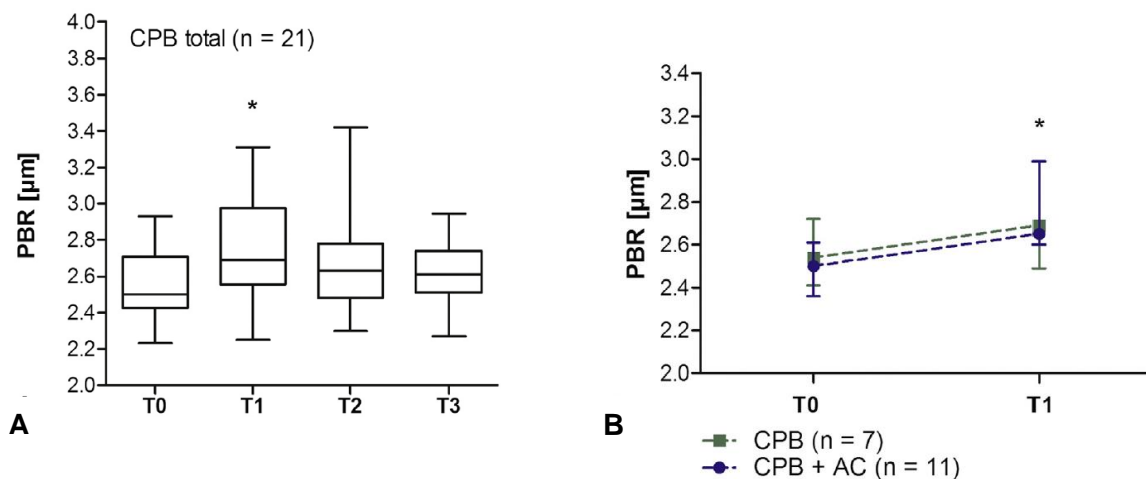


Abbildung 10- Evaluation der EG über Messung der PBR nach herzchirurgischen Eingriffen mit kardiopulmonalem Bypass (CPB): eine Zunahme der PBR bedeutet eine Abnahme der EG Dicke. Bild A: herzchirurgische Eingriffe mit CPB. Bild B: Subgruppen-Analyse zur potentiellen Unterscheidung eines unterschiedlichen Ischämieausmaßes. CPB: kardiopulmonaler Bypass (regionale Ischämie der Lunge), CPB+AC: kardiopulmonaler Bypass mit Klemmung der Aorta (regionale Ischämie von Herz und Lunge), T0=vor Beginn chirurgischer Maßnahmen, T1=unmittelbar postoperativ auf der Intensivstation, T2=24h postoperativ, T3=7 Tage postoperativ; \*=p<0,05 (vs. T0, Abbildung modifiziert nach (23)).

#### 4.2.3. Untersuchung der endothelialen Dysfunktion bei erwachsenen herzchirurgischen Patienten.

Aus Voruntersuchungen ist bekannt, dass es bei erwachsenen herzchirurgischen Patienten zu einer ischämieabhängigen Degradation der endothelialen Glykokalyx kommt. Unklar war jedoch, in wie weit die gesamte vaskuläre Barriere, also auch eine Dysfunktion der Endothelzellen und der Endothel-Zell-Zell-Kontakte von dieser Degradation betroffen ist. Wir entnahmen daher bei insgesamt 30 erwachsenen Patienten mit elektiver koronarer Bypassoperation mit (n=15, CCAB) oder ohne Herz-Lungen-Maschine (n=15, OPCAB) vor, während und nach dem operativen Eingriff zu vergleichbaren Zeitpunkten Blut und bestimmten hierin Angiopoietin-1 (Ang-1), Angiopoietin-2 (Ang-2), vascular endothelial (VE)-cadherin und Endocan. Es zeigte sich in beiden Gruppen ein signifikanter Anstieg von allen erhobenen Parametern in Bezug auf die präoperativen Ausgangswerte. Der maximale Anstieg für Ang-1 war 220% in der CCAB- und 160% in der OPCAB Gruppe, für Ang-2 150% in der CCAB und 20% in der OPCAB-Gruppe (Abbildung 11), für VE-cadherin 87% in der CCAB und 66% in der OPCAB-Gruppe und für Endocan 323% in der CCAB und 72% in der OPCAB-Gruppe. Dabei waren alle maximalen Anstiege signifikant gegenüber T0 ( $p < 0,05$ ). Die schematische Vorstellung der endothelzellulären Aktivierung ist in Abbildung 12 dargestellt (4).

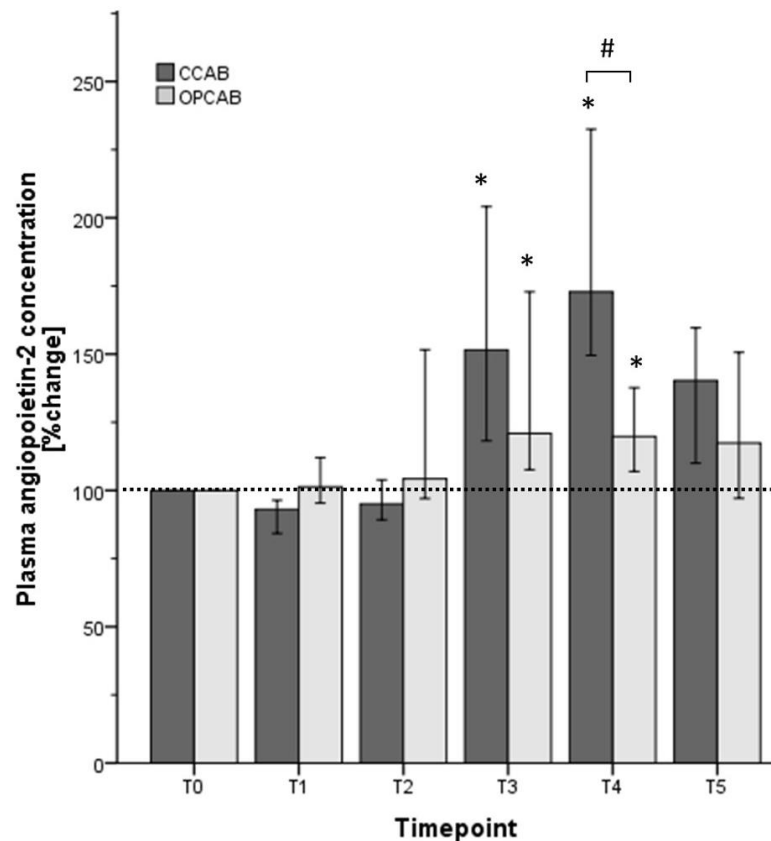


Abbildung 11 – Änderung der Angiopoietin-2 Konzentration von Patienten, welche sich einer elektiven koronaren Bypassoperation mit (CCAB, n=15) oder ohne Herz-Lungen-Maschine (OPCAB, n=15) unterzogen haben. T0 bis T5: vergleichbare Beobachtungszeitpunkte. Um die relativen Anstiege zu sehen, wurden die Ausgangswerte auf 100% relativiert. Um eine intraoperative Hämodilution zu berücksichtigen, wurden die Werte auf den Albuminspiegel normalisiert. Die Daten werden als Median mit 95% Konfidenzintervall dargestellt. \*= $p < 0,05$  vs. T0 innerhalb der jeweiligen Gruppe; #= $p < 0,05$  Unterschied zwischen den Gruppen zum jeweiligen Beobachtungszeitpunkt (Abbildung modifiziert nach (4)).

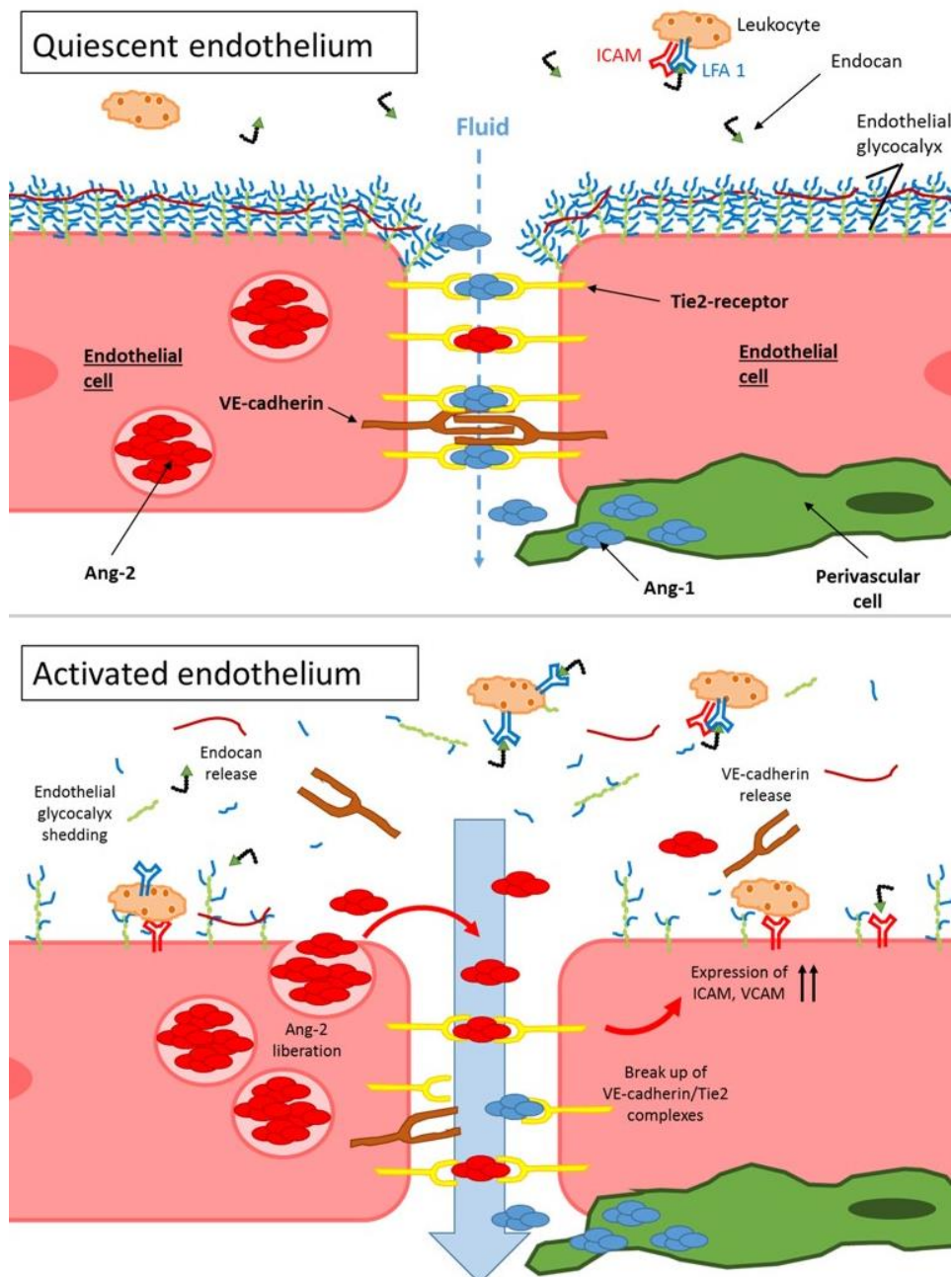


Abbildung 12 – Schematische Darstellung von endothelialen Markern im Ruhezustand und aktiviertem Endothel.

Oberes Bild: Ruhendes Endothel mit intakter endothelialer Glykokalyx und Tie2/VE-cadherin Komplexen. Die Zell-Zell Kontakte sind weitestgehend geschlossen und lassen nur einen geringen Netto-Fluss in Richtung Interstitium zu.

Unteres Bild: Aktiviertes Endothel mit beschädigter endothelialer Glykokalyx und Freisetzung von Angiotensin-2. Daraus resultiert eine Verdrängung von Angiotensin-1 vom Tie2-Rezeptor und Ablösung und Freisetzung der VE-cadherin/Tie2 Komplexe, was letztlich zu einer Auflockerung der Zell-Zell-Kontakte führt. Dies führt hypothetisch auch zu einem größeren Netto-Flüssigkeitsaustritt in Richtung Interstitium.

ICAM=intercellular adhesion molecule, VCAM=vascular cell adhesion molecule (Abbildung modifiziert nach (4)).

#### 4.2.4. Untersuchung der Entwicklung der Glykokalyxdicke bei erwachsenen Patienten während Narkoseeinleitung und gynäkologisch-operativen Eingriffen

In dieser Arbeit wurde an insgesamt 84 Patientinnen die Glykokalyxdicke mittels Intravitalmikroskopie sublingual vor und während Narkoseeinleitung, sowie im Aufwachraum gemessen. Dabei konnte gezeigt werden, dass es während der Narkoseeinleitung zu keiner signifikanten Änderung der Glykokalyxdicke kommt. Im Aufwachraum hingegen wiesen die Patientinnen eine signifikante Reduktion der Glykokalyxdicke- möglicherweise bedingt durch eine Kombination aus Hypervolämie und operativem Stress auf (Abbildung 13, A)(8).

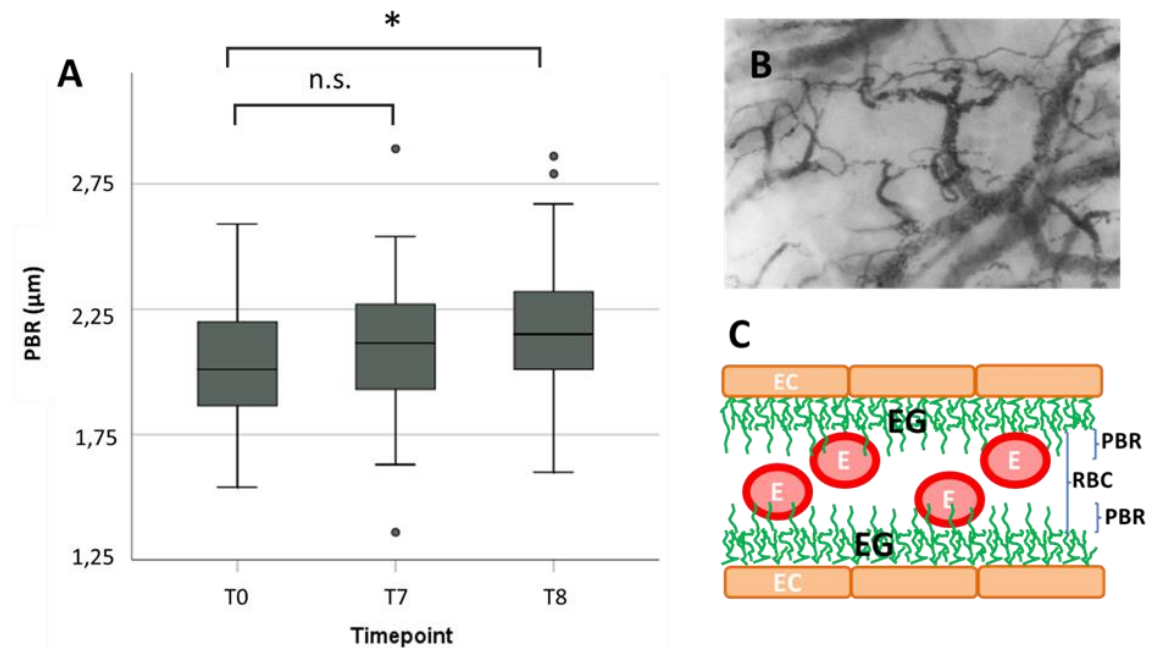


Abbildung 13 –Glykokalyxdicke vor und während Narkoseeinleitung sowie postoperativ. A: Messung der PBR (perfused boundary region) vor Narkoseeinleitung(T0), während der Narkoseeinleitung (T7) und im Aufwachraum (T8). B Screenshot einer Intravitalmikroskopie Videosequenz mit „Sidestream Darkfield“-Technologie. C: Schematische Darstellung einer Kapillare mit Endothelzellen (EC), endothelialer Glykokalyx (EG), den von Erythrozyten permeierten Bereichen (RBC und PBR), modifiziert nach (8).

## 5. Zusammenfassung

In diesem Habilitationsprojekt wurden mehrere Thesen zur vaskulären Barriere bearbeitet. Die Ergebnisse werden an dieser Stelle kommentiert zusammengefasst und diskutiert.

### 5.1. Experimenteller Teil

Um auf den Mechanismus einer Schädigung der endothelialen Glykokalyx zu schließen, sind Versuche an genetisch veränderbaren und veränderten Spezies sinnvoll und notwendig. Es sollte daher ein isoliert schlagendes Mäuseherzmodell entwickelt werden, um die Ergebnisse aus den Versuchen aus dem isoliert schlagenden Meerschweinchenherzen auf die Maus zu übertragen. An genetisch veränderten Spezies sollten unter anderem Angiopoietin-1 und Angiopoietin-2 knock-out Mäuse verwendet werden, um einen etwaigen Einfluss des Angiopoietin-Systems auf die vaskuläre Barriere zu beweisen.

In den Vorversuchen am isoliert schlagenden Meerschweinchenherzen wurde die Konzentrationsbestimmung von Glykokalyxbestandteilen im Effluat als Standardverfahren zur quantitativen Glykokalyxschädigung etabliert. Diese Methode konnte leider nicht in wissenschaftlich verlässlicher Art und Weise auf das isoliert schlagende Mäuseherz übertragen werden. Trotz maximaler Effluat-Ultrakonzentration und diversen Bestimmungen mit humanen und murinen ELISA-Kits konnten keine, mit den isoliert schlagenden Meerschweinchenherzen vergleichbaren Glykokalyxkonzentrationen nachgewiesen werden. Ebenso war eine semiquantitative Konzentrationsbestimmung des Core-Proteins Syndecan-1 aus dem Effluat und auch den Herzlysaten mittels Western-Blot nicht erfolgreich. Die Fortführung weiterer Tierexperimente mit diesem Modell und dieser Fragestellung war aus ethischen und auch wissenschaftlichen Gründen daher nicht gerechtfertigt.

Obwohl die *quantitative* Untersuchung der Glykokalyxbestandteile am isoliert schlagenden Mäuseherz nicht erfolgreich verlief, war die qualitative und semiquantitative Untersuchung der EG im Mäuseherz trotzdem vielversprechend. Mittels eines neu etablierten Immunfluoreszenzprotokolls wurde qualitativ die Existenz einer endothelialen Glykokalyx und semiquantitativ deren ischämiebedingte Schädigung im Mäuseherz eindeutig nachgewiesen. Hierfür wurde Syndecan-1 auf der Endothelzelloberfläche markiert und dessen Emittenz vor und nach Ischämie/Reperfusion gemessen. Es zeigte sich dabei ein signifikanter Abfall der immunfluoreszenzbedingten Emittenz nach 20-minütiger Warmischämie und 15-minütiger Reperfusion. Dies ist als Nachweis einer ischämiebedingten Degradation der endothelialen Glykokalyx im isoliert schlagenden Mäuseherz zu werten.

Um die Morphologie der endothelialen Glykokalyx im Mäuseherz darstellen zu können, wurde die Elektronenmikroskopie verwendet. Es wurde ein neues Protokoll zur elektronenmikroskopischen Fixierung und Aufarbeitung, aufbauend auf dem Protokoll aus den Vorversuchen am Meerschweinchenherz, entwickelt. Damit konnte das Vorhandensein einer endothelialen Glykokalyx im Mäuseherz eindeutig nachgewiesen werden. So konnte eine vollständig erhaltene Glykokalyx in der gesamten Zirkumferenz von Mäusekapillaren dargestellt werden, welche auch in der Morphologie vergleichbar mit der aus den Meerschweinchenherzen zu sein scheint. Ebenso konnte eine ischämiebedingte Schädigung der endothelialen Glykokalyx nach 20-minütiger Warmischämie und 15 minütiger Reperfusion nachgewiesen werden. (7).



Die endotheliale Glykokalyx ist eine vulnerable Struktur, welche in Zellkulturversuchen bisher nicht ohne weiteres nachgewiesen und daher auch Versuchen nicht zugänglich war. In den Versuchen mit den humanen Nabelschnurvenenendothelzellen wurde ein Protokoll etabliert, welches möglichst physiologische Bedingungen für die aus frischen Nabelschnüren isolierten HUVECs imitiert. Dieses Protokoll sah eine Flusskonditionierung unter kontinuierlichem, laminarem shear-Stress vor. Erst dadurch wurde die (Neu)-Bildung einer EG unter Zellkulturbedingungen möglich und konsekutiv einer experimentellen Intervention zugänglich. Um eine semiquantitative Aussage hinsichtlich der Bildung und Schädigung der EG treffen zu können, wurde ein Immunfluoreszenzprotokoll entwickelt, welches Heparansulfat auf der Endothelzelloberfläche markiert. Damit konnte an, mit der Konfokalmikroskopie gewonnenen, Summationsbildern die Bildung einer EG im zeitlichen Verlauf über etwa sieben Tage nachgewiesen und deren Schädigung durch Inkubation mit Progesteron belegt werden. (19).

## **5.2. Klinischer Teil**

Bei erwachsenen Patienten ist eine Schädigung der endothelialen Glykokalyx nach Ischämie und Reperfusion im Gegensatz zu pädiatrischen Patienten hinreichend bekannt. Im klinischen Teil des Projektes wurde erstmalig gezeigt, dass es auch bei Kindern während herzchirurgischer Eingriffe zu einer am ehesten ischämie/reperfusionsabhängigen Degradation der endothelialen Glykokalyx und damit Alteration der vaskulären Barriere kommt. Es wurde nachgewiesen, dass es in Abhängigkeit vom Ausmaß der Ischämie zu einem signifikanten Anstieg von Syndecan-1 und Hyaluronan im Serum bei pädiatrischen Patienten während herzchirurgischen Eingriffen kommt (10).

Durch die Side-Stream Dark-Field Intravitalmikroskopie wird eine systemische Glykokalyx-Degradation einer online Untersuchung zugänglich. Es konnte mit dieser Methode, ebenfalls an Kindern, gezeigt werden, dass es bei Eingriffen mit kardiopulmonalem Bypass zu einer intravitalmikroskopisch nachweisbaren Abnahme der Glykokalyxdicke bzw. Zunahme der PBR führt (23). Ebenso konnte bei erwachsenen Patientinnen gezeigt werden, dass es nach gynäkologisch-operativen Eingriffen zu einer signifikanten Reduktion der Glykokalyxdicke kommt(8).

Die Ergebnisse zur ischämiebedingten Glykokalyxschädigung bei pädiatrischen Patienten schließen eine Lücke und vervollständigen das Wissen und Verständnis der vaskulären Barriere in diesem Altersspektrum. Dies ist umso interessanter, als dass die Glykokalyxdegradation mit zwei unterschiedlichen Methoden- der klassischen Konzentrationsbestimmung mittels ELISA aus dem Serum und der Intravitalmikroskopie- nachgewiesen werden konnte.

Bei erwachsenen herzchirurgischen Patienten konnte gezeigt werden, dass nicht nur die endotheliale Glykokalyx, sondern auch die Endothelzellen selbst, sowie die Endothel Zell-Zell Kontakte durch den ischämischen bzw. inflammatorischen Stress alteriert werden. Angiopoetin-2 wird nach Endothelzellaktivierung aus den Endothelzellen freigesetzt und führt zu einer Auflösung der Tie2/VE-cadherin Komplexe und Auflösung bzw. Auflockerung der Zell-Zell Verbindungen. So wurde bei Patienten, die sich einem herzchirurgischen Eingriff mit ischämischem Stress unterzogen haben, unter anderem ein signifikanter Anstieg von Angiopoetin-2 und VE-cadherin nachgewiesen. Damit wurde neben der schon gezeigten Beteiligung der endothelialen Glykokalyx auch eine endothelzelluläre Beteiligung am ischämie/inflammationsbedingten Schaden an der vaskulären Barriere belegt (4).

Zusammenfassend konnte im experimentellen Teil des Habilitationsprojektes eine endotheliale Glykokalyx und deren ischämiebedingte Schädigung im isoliert schlagenden Mäuseherzmodell sowohl mittels Immunfluoreszenz qualitativ und semiquantitativ, als auch morphologisch mittels Elektronenmikroskopie nachgewiesen werden.

Im Rahmen der Zellkulturversuche an HUVECs konnten Kulturbedingungen entwickelt werden, die ein Wachstum und den Nachweis der EG auf der Endothelzelloberfläche ermöglichten. Dies kann die Grundlage für weitere Experimente sein, welche sich einer Betrachtung des Mechanismus der Glykokalyxschädigung nähern.

Im klinischen Teil des Habilitationsprojektes wurde erstmalig an pädiatrischen herzchirurgischen Patienten mittels Konzentrationsbestimmung im Serum und Intravitalmikroskopie eine Glykokalyxdegradation gezeigt.

Bei erwachsenen Patienten wurde mit dem Nachweis eines Angiopoietin-2 und VEcadherin-Anstieges nach ischämischem Stress eine endothelzelluläre Beteiligung am Schaden an der vaskulären Barriere nachgewiesen. Neben der endothelialen Glykokalyx ist dies eine zweite morphologische Struktur der vaskulären Barriere, deren Schädigung im Rahmen von Ischämie/Reperfusion gezeigt werden konnte.

## **6. Ausblick**

Die Ergebnisse des Habilitationsprojektes stellen weitere wichtige Bausteine in einem Puzzle des Verständnisses der vaskulären Barriere dar. Da es sich um deskriptive Ergebnisse handelt, sollten die gewonnenen Erkenntnisse Grundlage für eine Entwicklung eines mechanistischen Ansatzes der Glykokalyxschädigung darstellen. Dies wäre zum Beispiel mit der Erweiterung auf molekularbiologische Methoden an flusskonditionierten HUVECs möglich. Ein weiterer möglicher klinischer Schritt wäre die Entwicklung eines Panels, welches einen Schaden der vaskulären Barriere auch graduieren kann.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Annecke T, Chappell D, Chen C, Jacob M, Welsch U, Sommerhoff CP, et al. Sevoflurane preserves the endothelial glycocalyx against ischaemia-reperfusion injury. *Br J Anaesth*. 2010;104(4):414-21.
2. Becker BF, Chappell D, Jacob M. Endothelial glycocalyx and coronary vascular permeability: the fringe benefit. *Basic Res Cardiol*. 2010;105(6):687-701.
3. **Brettner F**, Chappell D, Jacob M. The concept of the glycocalyx – Facts that influence perioperative fluid management. *Trends in Anaesthesia & Critical Care*. 2012;2(4):191-8.
4. **Brettner F**, Chappell D, Schwartz L, Lukasz A, Kumpers P, Becker BF, et al. Vascular Endothelial Dysfunction during Cardiac Surgery: On-Pump versus Off-Pump Coronary Surgery. *Eur Surg Res*. 2017;58(5-6):354-68.
5. **Brettner F**, von Dossow V, Chappell D. The endothelial glycocalyx and perioperative lung injury. *Curr Opin Anaesthesiol*. 2017;30(1):36-41.
6. **Brettner F**, Chappell D, Nebelsiek T, Hauer D, Schelling G, Becker BF, et al. Preinterventional hydrocortisone sustains the endothelial glycocalyx in cardiac surgery. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2018.
7. **Brettner F**, Darling J, Baeuml EC, Mannell H, Frank HG, Amini M, et al. Chances and limitations of isolated mouse heart models for investigating the endothelial glycocalyx1. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2018;69(3):393-403.
8. **Brettner F**, Heitzer M, Thiele F, Hulde N, Nussbaum C, Achatz S, et al. Non-invasive evaluation of macro- and microhemodynamic changes during induction of general anesthesia – a prospective observational single-blinded trial. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2020.
9. Bruegger D, Jacob M, Rehm M, Loetsch M, Welsch U, Conzen P, et al. Atrial natriuretic peptide induces shedding of endothelial glycocalyx in coronary vascular bed of guinea pig hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289(5):H1993-9.
10. Bruegger D, **Brettner F**, Rossberg I, Nussbaum C, Kowalski C, Januszewska K, et al. Acute degradation of the endothelial glycocalyx in infants undergoing cardiac surgical procedures. *Ann Thorac Surg*. 2015;99(3):926-31.
11. Cerny V, Astapenko D, **Brettner F**, Benes J, Hyspler R, Lehmann C, et al. Targeting the endothelial glycocalyx in acute critical illness as a challenge for clinical and laboratory medicine. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2017;54(5):343-57.
12. Chappell D, Jacob M, Becker BF, Hofmann-Kiefer K, Conzen P, Rehm M. [Expedition glycocalyx. A newly discovered "Great Barrier Reef"]. *Anaesthesist*. 2008;57(10):959-69.
13. Chappell D, Jacob M, Paul O, Mehringer L, Newman W, Becker BF. Impaired glycocalyx barrier properties and increased capillary tube haematocrit. *J Physiol*. 2008;586(19):4585-6.
14. Chappell D, Hofmann-Kiefer K, Jacob M, Rehm M, Briegel J, Welsch U, et al. TNF-alpha induced shedding of the endothelial glycocalyx is prevented by hydrocortisone and antithrombin. *Basic Res Cardiol*. 2009;104(1):78-89.
15. Chappell D, Jacob M, Paul O, Rehm M, Welsch U, Stoeckelhuber M, et al. The glycocalyx of the human umbilical vein endothelial cell: an impressive structure ex vivo but not in culture. *Circ Res*. 2009;104(11):1313-7.
16. Chappell D, Dorfler N, Jacob M, Rehm M, Welsch U, Conzen P, et al. Glycocalyx protection reduces leukocyte adhesion after ischemia/reperfusion. *Shock*. 2010;34(2):133-9.
17. Chappell D, **Brettner F**, Doerfler N, Jacob M, Rehm M, Bruegger D, et al. Protection of glycocalyx decreases platelet adhesion after ischaemia/reperfusion: an animal study. *Eur J Anaesthesiol*. 2014;31(9):474-81.
18. Chappell D, Bruegger D, Potzel J, Jacob M, **Brettner F**, Vogeser M, et al. Hypervolemia increases release of atrial natriuretic peptide and shedding of the endothelial glycocalyx. *Crit Care*. 2014;18(5):538.

19. Hulde N, Rogenhofer N, **Brettner F**, Eckert NC, Gotzfried I, Nguyen T, et al. The CYCLOCALYX study: Ovulatory cycle affects circulating compartments of the endothelial glycocalyx in blood. *Am J Reprod Immunol.* 2018;79(1).
20. Jacob M, Paul O, Mehringer L, Chappell D, Rehm M, Welsch U, et al. Albumin augmentation improves condition of guinea pig hearts after 4 hr of cold ischemia. *Transplantation.* 2009;87(7):956-65.
21. Kammerer T, **Brettner F**, Hilferink S, Hulde N, Klug F, Pagel J, et al. No Differences in Renal Function between Balanced 6% Hydroxyethyl Starch (130/0.4) and 5% Albumin for Volume Replacement Therapy in Patients Undergoing Cystectomy: A Randomized Controlled Trial. *Anesthesiology.* 2018;128(1):67-78.
22. Lukasz AH, Kumpers P. [Angiopietin-2 regulates endothelial glycocalyx]. *Med Klin Intensivmed Notfmed.* 2018;113(6):497-500.
23. Nussbaum C, Haberer A, Tiefenthaller A, Januszewska K, Chappell D, **Brettner F**, et al. Perturbation of the microvascular glycocalyx and perfusion in infants after cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2015;150(6):1474-81 e1.
24. Rehm M, Bruegger D, Christ F, Conzen P, Thiel M, Jacob M, et al. Shedding of the endothelial glycocalyx in patients undergoing major vascular surgery with global and regional ischemia. *Circulation.* 2007;116(17):1896-906.
25. Rubig E, Stypmann J, Van Slyke P, Dumont DJ, Spieker T, Buscher K, et al. The Synthetic Tie2 Agonist Peptide Vasculotide Protects Renal Vascular Barrier Function In Experimental Acute Kidney Injury. *Sci Rep.* 2016;6:22111.

## 8. Danksagung

Ohne die Unterstützung von Kollegen, Freunden und Familie wäre das Erreichen der Habilitation nicht möglich gewesen. Dafür möchte ich mich sehr herzlich bedanken!

Allen voran bei meinen Arbeitsgruppenleitern Herrn Professor Dr. Daniel Chappell und Herrn Professor Dr. Matthias Jacob, die mir sehr viel Vertrauen und Freiheiten gelassen haben, Ideen weiterzuentwickeln, geholfen haben Ergebnisse zu interpretieren und letztlich diese auch zu publizieren. Diesbezüglich gilt mein ausdrücklicher Dank auch Herrn Professor Dr. Bernhard Becker, der diverse Publikationen durch konstruktive Kritik und Verbesserungsvorschläge vorangebracht hat.

Des Weiteren danke ich Herrn Professor Dr. Peter Conzen- nicht nur für die Möglichkeit Forschungsergebnisse auch auf internationalen Kongressen präsentieren zu können und Herrn Professor Dr. Markus Rehm unter anderem für die Schaffung von Freiräumen auch neben der Klinik wissenschaftlich tätig sein zu können.

Herrn Professor Dr. Zwißer danke ich ganz besonders für die exzellente Ausbildung, die ich sowohl klinisch, als auch wissenschaftlich in fast zehn Jahren an der Universitätsklinik genießen durfte. Ganz herzlichen Dank für Ihr Vertrauen.

Ein weiterer Dank gilt Herrn PD Dr. Dirk Bruegger, Herrn PD Dr. Florian Weis, Frau Professor Dr. Vera von Dossow und Herrn Professor Dr. Erich Kilger für gemeinsame Projekte und die Unterstützung bei der deren Umsetzung.

Für die Hilfe im experimentellen Teil der Arbeit möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Andreas Dendorfer und Frau PD Dr. Hanna Mannell vom Walter-Brendel Zentrum für experimentelle Medizin der LMU und dem Institut für Physiologie der LMU recht herzlich bedanken. Ebenso gilt mein Dank den technischen Assistentinnen Gaby Gröger von der Klinik für Anästhesiologie sowie Astrid Baltruschat und Beate Auschauer stellvertretend für ein herausragendes Team am Lehrstuhl II des Instituts für Anatomie der LMU.

Viele Ideen sind in der Diskussion mit Kollegen entstanden – einige davon auch in unserem „Think Tank“. Für diese und deren Umsetzung bedanke ich mich sehr herzlich bei Herrn Dr. Tobias Kammerer und Herrn Dr. Nikolai Hulde.

Für weitere experimentelle Hilfe und nächtliche gemeinsame Datenerhebungen möchte ich mich ganz besonders bei Frau Dr. Stefanie Tomasi und Herrn Dr. Roland Tomasi bedanken.

Ebenso gilt der Dank allen Doktorandinnen und Doktoranden der AG Endothel- und Organprotektion.

Bei meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Stemmler möchte ich mich ganz persönlich bedanken, weil er bereits während der Anfertigung der Promotion mit viel Engagement Spaß an der Wissenschaft vermittelt hat und diese Freude bis heute anhält.

Am beruflich prägendsten, und damit auch für diese Habilitation am wichtigsten, ist mir jedoch der Dank an meinen Papa, Dr. Franz Brettner, der es geschafft hat und auch immer wieder schafft, seine Begeisterung für diesen wunderbaren Beruf zu teilen.

Am wichtigsten ist mir der Dank jedoch an meine Familie in München und Amberg und allen voran an meine Frau, Dr. Kathrin Brettner, die mich nicht nur hierbei unterstützt, sondern mit unseren Kindern Korbinian und Johannes zeigt, was wirklich wichtig im Leben ist.

## 9. Schriftenverzeichnis

Originalarbeiten als Erst- oder Letztautor

IF	Publikation
1,6 (2018)	<b>Brettner F</b> , Heitzer M, Thiele F, Hulde N, Nussbaum C, Achatz S, Jacob M, Becker BF, Conzen P, Kilger E, Chappell D Non-invasive evaluation of macro- and microhemodynamic changes during induction of general anesthesia – a prospective observational single-blinded trial Clin Hemorheol Microcirc. Accepted for publication 29.11.2019
1,9 (2016)	<b>Brettner F</b> , Chappell D, Nebelsiek T, Hauer D, Schelling G, Becker BF, Rehm M, Weis F Preinterventional hydrocortisone sustains the endothelial glycocalyx in cardiac surgery Clin Hemorheol Microcirc. 2018 May 19. doi: 10.3233/CH-180384. [Epub ahead of print]
1,9 (2016)	<b>Brettner F</b> , Darling J, Baeuml EC, Mannell H, Frank HG, Amini M, Hulde N, Kammerer T, Becker BF, Rehm M, Conzen P, Chappell D. Chances and limitations of isolated mouse heart models for investigating the endothelial glycocalyx. Clin Hemorheol Microcirc. 2018 Feb 2. doi: 10.3233/CH-170327. [Epub ahead of print]
1,4 (2016)	<b>Brettner F</b> , Chappell D, Schwartz L, Lukasz A, Kumpers P, Becker BF, Reichart B, Rehm M, Bruegger D. Vascular Endothelial Dysfunction during Cardiac Surgery: On-Pump versus Off-Pump Coronary Surgery. Eur Surg Res. 2017;58(5-6):354-368. doi: 10.1159/000480431. Epub 2017 Oct 26.
2,8 (2016)	<b>Brettner F</b> , Janitza S, Prüll K, Weninger E, Mansmann U, Küchenhoff H, Jovanovic A, Pollwein B, Chappell D, Zwissler B, von Dossow V. Gender-Specific Differences in Low-Dose Haloperidol Response for Prevention of Postoperative Nausea and Vomiting: A Register-Based Cohort Study. PLoS One. 2016 Jan 11;11(1):e0146746. doi: 10.1371/journal.pone.0146746. eCollection 2016.
3,0 (2015)	Bruegger D, <b>Brettner F</b> , Rossberg I, Nussbaum C, Kowalski C, Januszewska K, Becker BF, Chappell D. Acute degradation of the endothelial glycocalyx in infants undergoing cardiac surgical procedures. Ann Thorac Surg. 2015 Mar;99(3):926-31. doi: 10.1016/j.athoracsur.2014.10.013. Epub 2015 Jan 17.
2,9 (2014)	Chappell D, <b>Brettner F</b> , Doerfler N, Jacob M, Rehm M, Bruegger D, Conzen P, Jacob B, Becker BF. Protection of glycocalyx decreases platelet adhesion after ischaemia/reperfusion: an animal study. Eur J Anaesthesiol. 2014 Sep;31(9):474-81. doi: 10.1097/EJA.0000000000000085.

IF	Publikation
5,8 (2016)	Kammerer T, <b>Brettner F</b> , Hilferink S, Hulde N, Klug F, Pagel J, Karl A, Crispin A, Hofmann-Kiefer K, Conzen P, Rehm M. No Differences in Renal Function between Balanced 6% Hydroxyethyl Starch (130/0.4) and 5% Albumin for Volume Replacement Therapy in Patients Undergoing Cystectomy: A Randomized Controlled Trial. Anesthesiology. 2018 Jan;128(1):67-78. doi: 10.1097/ALN.0000000000001927.
3,0 (2016)	Hulde N, Rogenhofer N, <b>Brettner F</b> , Eckert NC, Götzfried I, Nguyen T, Pagel JI, Kammerer T, Hofmann-Kiefer KF, Schelling G, Dendorfer A, Rehm M, Thaler CJ. The CYCLOCALYX study: Ovulatory cycle affects circulating compartments of the endothelial glycocalyx in blood. Am J Reprod Immunol. 2018 Jan;79(1). doi: 10.1111/aji.12767. Epub 2017 Oct 11.
6,2 (2016)	Meier J, Filipescu D, Kozek-Langenecker S, Llau Pitarch J, Mallett S, Martus P, Matot I; ETPOS collaborators (u.a. <b>Brettner F</b> ). Intraoperative transfusion practices in Europe. Br J Anaesth. 2016 Feb;116(2):255-61. doi: 10.1093/bja/aev456.
3,5 (2015)	Nussbaum C, Haberer A, Tiefenthaller A, Januszewska K, Chappell D, <b>Brettner F</b> , Mayer P, Dalla Pozza R, Genzel-Boroviczeny O. Perturbation of the microvascular glycocalyx and perfusion in infants after cardiopulmonary bypass. J Thorac Cardiovasc Surg. 2015 Dec;150(6):1474-81.e1. doi: 10.1016/j.jtcvs.2015.08.050. Epub 2015 Aug 24.
4,5 (2014)	Chappell D, Bruegger D, Potzel J, Jacob M, <b>Brettner F</b> , Vogeser M, Conzen P, Becker BF, Rehm M. Hypervolemia increases release of atrial natriuretic peptide and shedding of the endothelial glycocalyx. Crit Care. 2014 Oct 13;18(5):538. doi: 10.1186/s13054-014-0538-5.
Bei pubmed gelistet, kein IF	Horster S, Stemmler HJ, Strecker N, <b>Brettner F</b> , Hausmann A, Cnossen J, Parhofer KG, Nickel T, Geiger S. Cardiac Output Measurements in Septic Patients: Comparing the Accuracy of USCOM to PiCCO. Crit Care Res Pract. 2012;2012:270631. doi: 10.1155/2012/270631. Epub 2011 Nov 29.

#### Originalarbeiten als Koautor

#### Kasuistiken

Bei pubmed gelistet, kein IF	Nebelsiek T, Weis F, Angele M, <b>Brettner F</b> . Perioperative intra-aortic balloon counterpulsation in a patient with myocardium at risk undergoing urgent noncardiac surgery. Ann Card Anaesth. 2015 Apr-Jun;18(2):242-5. doi: 10.4103/0971-9784.154491.
---------------------------------------	--

## Übersichtsartikel/Reviews

5,3 (2016)	Cerny V, Astapenko D, <b>Brettner F</b> , Benes J, Hyspler R, Lehmann C, Zadak Z. Targeting the endothelial glycocalyx in acute critical illness as a challenge for clinical and laboratory medicine. Crit Rev Clin Lab Sci. 2017 Aug;54(5):343-357. doi: 10.1080/10408363.2017.1379943. Epub 2017 Sep 29.
2,4 (2016)	<b>Brettner F</b> , von Dossow V, Chappell D. The endothelial glycocalyx and perioperative lung injury. Curr Opin Anesthesiol. 2017 Feb;30(1):36-41. doi: 10.1097/ACO.0000000000000434.
No IF available	<b>F. Brettner</b> , D. Chappell, M. Jacob The concept of the glycocalyx - Facts that influence perioperative fluid management Trends in Anaesthesia and Critical Care (2012) 1-8
0,5 (2012)	Harrasser N, Harnoss T, <b>Brettner F</b> , Liska F, Pauschinger M. Antiplatelet therapy after coronary stenting and its importance in total joint arthroplasty. Orthopade. 2012 Jun;41(6):477-81. doi: 10.1007/s00132-012-1900-4. Review. German.

## Buchkapitel

	M. Loscar, <b>F. Brettner</b> und P. Conzen Volatile Anästhetika Anästhesiologie, Kompendium und Repetitorium zur interdisziplinären Weiter- und Fortbildung Eckart / Jaeger / Möllhoff (Hrsg.)
--	---



## 10. Publikationen der kumulativen Habilitationsleistung

**Brettner, F.**, Heitzer, M., Thiele, F., Hulde, N., Nussbaum, C., Achatz, S., Jacob, M., Becker, B. F., Conzen, P., Kilger, E., Chappell, D. Non-invasive evaluation of macro- and microhemodynamic changes during induction of general anesthesia – a prospective observational single-blinded trial Clin Hemorheol Microcirc accepted for publication 29.11.2019

Nussbaum C, Haberer A, Tiefenthaller A, Januszewska K, Chappell D, **Brettner F**, et al. Perturbation of the microvascular glycocalyx and perfusion in infants after cardiopulmonary bypass. J Thorac Cardiovasc Surg. 2015;150(6):1474-81 e1.

Bruegger D, **Brettner F**, Rossberg I, Nussbaum C, Kowalski C, Januszewska K, et al. Acute degradation of the endothelial glycocalyx in infants undergoing cardiac surgical procedures. Ann Thorac Surg. 2015;99(3):926-31.

**Brettner F**, Chappell D, Schwartz L, Lukasz A, Kumpers P, Becker BF, et al. Vascular Endothelial Dysfunction during Cardiac Surgery: On-Pump versus Off-Pump Coronary Surgery. Eur Surg Res. 2017;58(5-6):354-68.

**Brettner F**, Darling J, Baeuml EC, Mannell H, Frank HG, Amini M, et al. Chances and limitations of isolated mouse heart models for investigating the endothelial glycocalyx1. Clin Hemorheol Microcirc. 2018;69(3):393-403.