

Aus der Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin
der Universität zu Köln
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. B. W. Böttiger

**Auswirkungen
eines kontrollierten Vollblutverlustes von 500ml
auf die Integrität des Endothelialen Surface Layer
in der Geschlechterbetrachtung**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Sabine Groß
aus Köln

promoviert am 03. Juni 2024

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln
Druckjahr 2024

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachter: Professor Dr. med. T. Annecke

2. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. R. J. Wiesner

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgender Person erhalten:

Herrn Dr. Alexander Fuchs
Herrn Prof. Dr. Thorsten Annecke

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Es liegt bereits eine Vorabveröffentlichung von Teilergebnissen dieser Studie vor.

Die in der Blutspendezentrale der Klinik für Transfusionsmedizin der Uniklinik Köln durchgeführten Untersuchungen habe ich unter Aufsicht und in Zusammenarbeit mit dem approbierten Kollegen Herrn Dr. Alexander Fuchs und mit Unterstützung durch Frau Jennifer Dederichs, sowie den Kollegen des Blutspendeteams durchgeführt.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Messergebnisse der Sheddingparameter Heparansulfat, Syndecan-1 und Hyaluronan wurden mittels ELISA-Testverfahren ohne meine Mitarbeit im Labor der Klinik für Dermatologie und Venerologie von Frau Silke Leja unter Leitung von Frau Dr. Anja Illerhaus ermittelt.

Der Ethik-Antrag zur Durchführung dieser klinischen Studie wurde durch Prof. Dr. T. Annecke eingereicht und mit dem Aktenzeichen 19-1168 durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln genehmigt.

Das Einpflegen der anamnestischen Daten, der Vitalparameter und der erhobenen Werte des Blutbildes in Excel erfolgte durch mich selbst. Die Konversion der Excel-Daten, sowie das Einpflegen der Laborergebnisse aus dem ELISA-Testverfahren, sowie den Daten der Intravitalmikroskopie in SPSS erfolgte durch Dr. Alexander Fuchs. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte eigenständig mit Hilfe des Statistikprogramms „IBM SPSS Statistics“ [Version 29.0.0.0 (241)] unter zur Hilfenahme der SPSS-Statistik-Lernvideos von Björn Walther [10, 11]. Eine statische Beratung wurde nicht in Anspruch genommen.

Abbildungen wurden von mir selbst in Anlehnung an die genannten Quellen modifiziert gezeichnet. Die intravitalmikroskopischen Bilder stammen aus Messungen der eigenen Arbeitsgruppe. Die statistischen Abbildungen wurden mit Hilfe des Statistikprogramms „IBM SPSS Statistics“ [Version 29.0.0.0 (241)] erstellt.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 11.03.2024

Unterschrift:

Danksagung

Mein persönlicher Dank geht an...

... Prof. Dr. Thorsten Annecke

für die freundliche und kollegiale Aufnahme in seine Arbeitsgruppe an der Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin des Universitätsklinikums Köln, sowie der daraus resultierenden Möglichkeit dieser Promotionsarbeit. Danke für deine Geduld und die solide Betreuung trotz deines Lehrstuhlwechsels, sowie für deine wissenschaftliche Expertise mit daraus folgenden Denkanstößen und Hilfestellungen.

... Dr. Alexander Fuchs

für die langjährige und stetige Betreuung dieser Promotionsarbeit. Danke für die allzeit unkomplizierte, kollegiale und produktive Zusammenarbeit während der gesamten Datenerhebung, sowie im Laufe des Schreibprozesses.

... Jennifer Dederichs

für eine stets harmonische und problemlose Zusammenarbeit während der gesamten Datenerhebung in der Blutbank.

... das gesamte Team der Blutspendezentrale der Uniklinik Köln

für die Integration unserer Arbeitsgruppe in den laufenden Betrieb der Blutspendezentrale, sowie der allzeit hilfsbereiten Unterstützung und Geduld während der Datenerhebung.

... Silke Leja und Anja Illerhaus

für den kollegialen Austausch und die Ausarbeitung der ELISA-Proben.

... alle Probanden

für die Bereitschaft zur Blutspende, sowie der Bereitschaft zur Teilnahme an der Studie und dem damit verbundenen zeitlichen Mehraufwand.

... meine gesamte Familie

für die moralische Unterstützung, sowie der kurzfristigen oder auch stetigen Übernahme der Kinderbetreuung.

Widmung

In Liebe und Dankbarkeit widme ich diese Dissertation meiner Familie.

In erster Linie richtet sich mein Dank an meinen

Ehemann Alexander Groß.

Danke für dein Verständnis, deine Geduld, deine moralische Unterstützung. Du hast immer an mich geglaubt und mich im Weitermachen bestärkt. Durch die Schaffung von Freiräumen hast du mir die Möglichkeit gegeben mich aufs Studium und auf diese Arbeit zu konzentrieren. Danke für deine bedingungslose Liebe.

Ich weiß, dass es nicht immer einfach war.

Meinen Kindern Elias und Lukas

danke ich von Herzen für Ihre bemerkenswerte Geduld, Ihr Verständnis und ihre grenzenlose Liebe. Danke, dass ihr in den vielen Stunden, in denen ihr auf mich verzichten musstet, so viel Rücksicht genommen habt. Ich hoffe, dass ich euch zeigen konnte, dass es sich lohnt an einer Sache dranzubleiben und dass man mit Fleiß und Ehrgeiz seine Ziele erreichen kann.

Ein letzter und ganz besonderer Dank geht an meine

Schwiegereltern Irmgard und Raimund Groß.

Eure Großzügigkeit, die stetige Übernahme der Kinderbetreuung während des gesamten Studiums, eure aufmunternden Worte und eure Ermutigung diesen universitären Berufsweg zu beschreiten werde ich euch nie vergessen.

Ohne Euch wäre dieser Weg deutlich komplizierter und langwieriger geworden.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	8
1 ZUSAMMENFASSUNG	9
2 EINLEITUNG	10
2.1 Historischer Hintergrund	10
2.2 Endothelial Surface Layer (ESL)	10
2.2.1 Aufbau des ESL	10
2.2.2 Funktionen des ESL	12
2.2.3 Shedding der Glykokalyx	13
2.2.4 Protektion der Glykokalyx	14
2.3 Intravitalmikroskopie	15
2.3.1 Sidestraem Darkfield Imaging (SDF)	15
2.3.2 GlycoCheck™Software	19
2.4 ELISA	20
2.4.1 Direkter ELISA	21
2.4.2 Indirekter ELISA	22
2.4.3 Sandwich-ELISA	23
2.4.4 Kompetetiver ELISA	24
2.5 Blutspende	25
2.5.1 Allgemein	25
2.5.2 Pathophysiologie der hämorrhagischen Hypovolämie	26
2.6 Fragestellung und Hypothese	27
3 MATERIAL UND METHODEN	28
3.1 Votum der Ethikkomission	28
3.2 Versuchsaufbau	28
3.3 Endpunkte und Kriterien	30
3.3.1 Primärer Endpunkt	30
3.3.2 Sekundäre Endpunkte	30
3.3.3 Einschlusskriterien	32

3.3.4	Ausschlusskriterien	32
3.4	Statistische Analyse	32
4	ERGEBNISSE	34
4.1	Studienpopulation und deren Merkmale	34
4.2	Primärer Endpunkt	38
4.3	Sekundäre Endpunkte	39
4.3.1	PBR nach Gefäßgröße	39
4.3.2	RBC-Filling	40
4.4	Parameter der Blutuntersuchung	41
4.4.1	Vitalparameter	48
4.5	Korrelation und Regression	52
4.5.1	PBR versus RBC-filling	52
5	DISKUSSION	55
5.1	Studienpopulation und deren Merkmale	55
5.2	Sidestraem Darkfield Imaging	55
5.3	Ergebnisse der Blutuntersuchungen und der Vitalparameter	56
5.4	Limitationen	56
5.5	Schlussfolgerungen	57
6	LITERATURVERZEICHNIS	59
7	ANHANG	68
7.1	Abbildungsverzeichnis	68
7.2	Tabellenverzeichnis	69
8	VORABVERÖFFENTLICHUNG VON ERGEBNISSEN	70

Abkürzungsverzeichnis

a.e.	<i>am ehesten</i>
ANP	<i>Atriales natriuretisches Peptid</i>
bpm	<i>beats per minute</i>
CPB	<i>Kardiopulmonaler Bypass</i>
ELISA	<i>Enzym-Linked Immunosorbent Assay</i>
GAGs	<i>Glykosaminglykane</i>
GCX	<i>Glykokalyx</i>
Hb	<i>Hämoglobin</i>
Hkt	<i>Hämatokrit</i>
HS	<i>Heparansulfat</i>
HZV	<i>Herzeitvolumen</i>
I/R	<i>Ischämie und Reperfusion</i>
MAD	<i>Mittlerer arterieller Blutdruck</i>
mmHg	<i>Millimeter-Quecksilbersäule</i>
NO	<i>Stickstoffmonoxid</i>
OPS	<i>Orthogonal Polarization Spectral</i>
PBR	<i>Perfused Boundary Region</i>
RBCs	<i>Red blood cells</i>
S1P	<i>Sphingosin-1-Phosphat</i>
SDF	<i>Sidestream Darkfield Imaging</i>
TNF- α	<i>Tumornekrosefaktor-α</i>

1 Zusammenfassung

Das Endothel mit seiner endothelialen Oberflächenschicht (ESL) ist maßgeblich an vielen regulatorischen Prozessen im Körper beteiligt.

Ziel dieser Arbeit war es die unmittelbaren Auswirkungen einer Vollblutspende von 500ml Blutvolumen auf den vaskulären Endothelial Surface Layer (ESL) zu untersuchen. Hierbei war von besonderem Interesse, ob es geschlechtsspezifische Unterschiede in den Anpassungsreaktionen bezüglich des Blutverlustes gibt.

Wir führten unsere Messungen in der Blutspendezentrale der Uniklinik Köln durch. Bei allen teilnehmenden Personen wurde direkt vor und nach Blutspende Blutdruck, Herzfrequenz und die periphere Sauerstoffsättigung erhoben, venöses Blut zur Bestimmung von Blutbildparametern und Glykokalyxkomponenten (Sheddingparametern) entnommen, sowie eine nichtinvasive intravitalmikroskopische Echtzeit-Darstellung der sublingualen Mikrozirkulation mittels Sidestream-Darkfield-Imaging durchgeführt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die systemische Integrität des ESL, sowohl beim Mann als auch bei der Frau, direkt nach einem Blutverlust von 500ml intakt bleibt.

Im Frauenkollektiv bildete sich eine stärkere Reaktion bezüglich der sympathoadrenergen Anpassung, eines Thrombozytenanstieges sowie einer ESL-Reduktion der postkapillären Venolen ohne Freisetzung von Sheddingparametern ab. Dieser Effekt kann dem im Verhältnis zum Mann größeren relativen Blutverlust geschuldet sein.

Es konnte für beide Geschlechter demonstriert werden, dass es zu keiner signifikanten Freisetzung von löslichen Komponenten gekommen ist. Wir interpretieren dies als Fähigkeit des ESL, sich dynamisch an Stresssituationen, wie es bei einem moderaten Blutverlust der Fall ist, anpassen zu können.

2 Einleitung

2.1 Historischer Hintergrund

Das Endothel ist die innerste Schicht unseres Gefäßsystems. Dieser Verband aus einschichtigen, flachen Zellen bildet eine Grenzschicht zwischen dem fließenden Blut und den tieferen Gefäßwandstrukturen und ist an vielen regulatorischen Prozessen zur Aufrechterhaltung der Homöostase beteiligt. [92]

James Frederic Danielli beschrieb 1940 erstmals das mögliche Vorhandensein einer dünnen, nicht-zellulären Proteinschicht auf dem Endothel. [21] Aufgrund von damaligen Färbe-, Fixierungs- und Präparationstechniken, welche die zarte Proteinschicht oftmals zerstörten, war es lange Zeit nicht möglich diese Struktur darzustellen. 1966 gelang erstmals der elektronenmikroskopische Nachweis dieser feinen Endothel-Bedeckung mittels einer Ruthenium-Rot-Färbung durch Luft. [57] Drei Jahrzehnte später gelang Vink und Duhling der intravitalmikroskopische Nachweis einer etwa 0,5 µm dicken endothelialen Oberflächenschicht in Hamster-Cremaster-Muskelkapillaren, welche Makromoleküle und Erythrozyten ausschloss, der heute bekannte Endotheliale Surface Layer (ESL). [93] Zu diesem Zeitpunkt war noch nicht viel über die Funktion und Zusammensetzung dieser Struktur bekannt. In den letzten Jahrzehnten rückte der ESL, dessen Basis die Glykokalyx (GCX) bildet, vermehrt in den Fokus von Untersuchungen. Durch moderne Visualisierungsmöglichkeiten, wie z.B. der Intravitalmikroskopie konnte die zentrale Rolle der Glykokalyx bei physiologischen und pathophysiologischen Prozessen dargestellt werden.

2.2 Endothelial Surface Layer (ESL)

2.2.1 Aufbau des ESL

Der ESL ist eine gelartige Schicht, welche das gesamte Gefäßsystem auskleidet. Er liegt wie ein Schutz- und Regulationsfilm über dem Gefäßendothel und bildet eine Ausschlusszone für Erythrozyten und andere makromolekulare Bestandteile des vorbeifließenden Blutes. [93, 94] Der ESL wird durch die endotheliale Glykokalyx, sowie durch im Blut gelöste Stoffe gebildet. Er weist in Kapillaren eine Dicke von ungefähr 0,5 µm auf und bildet eine immobilisierte Flüssigkeitsschicht, welche sich aus einem dynamischen, netzartigen Geflecht aus Proteoglykanen, Glykoproteinen, Glykosaminglykanen, sowie gelösten Plasmaproteinen bildet. [3, 69, 72, 93]

Die Basis des ESL bildet endothelseitig die Glykokalyx. Eine kohlenhydratreiche Schicht aus Glykoproteinen und Proteoglykanen. [72]

Glykoproteine bestehen jeweils aus einem Protein und daran gebundene kurze, verzweigte Kohlenhydratseitenketten. [69]

Proteoglykane hingegen bestehen aus einem Kernprotein, an welches eine oder mehrere lineare, unverzweigte Polymere aus Disacchariden, die so genannten Glykosaminglykane (GAGs) binden [69, 72].

Kernproteine, wie Syndecan und Glypican, sind dabei fest in bzw. an der Endothelzellen verankert, wo hingegen Biglykan, Mimecan und Perlecan nach ihrer Bildung und anschließender Modifikation mit GAG-Seitenketten als lösliche Komponente aus der Zelle sekretiert werden. Nach der Freisetzung aus der Zelle verbleiben sie entweder in der Glykokalyx oder diffundieren, je nach physiologischer Bedingung über den Blutstrom ab [72]. GAGs werden je nach Art der Disaccharide in 5 Gruppen unterteilt: Heparansulfate (HS), Dermatansulfate, Chondroitinsulfate, Keratansulfate und Hyaluronsäure. [72] HS-Proteoglykane stellen dabei mit 50-90% den größten Anteil der endothelialen Proteoglykane dar [39]. Sie sind außerdem der vorherrschende GAG-Typ auf allen Syndecanen. [44]

Die Hyaluronsäure nimmt eine Sonderform in der Gruppe der Glykosaminglykane ein. Sie ist nicht an ein Kernprotein gebunden, sondern steht über einen CD44-Rezeptor mit der Zellmembran in Verbindung. Sie ist in der Lage mit sich selbst stabile Hyaluronan-Hyaluronan-Komplexe zu bilden und kann im Vergleich zur eigenen Masse sehr große Mengen an Wasser binden. [51, 65, 79]

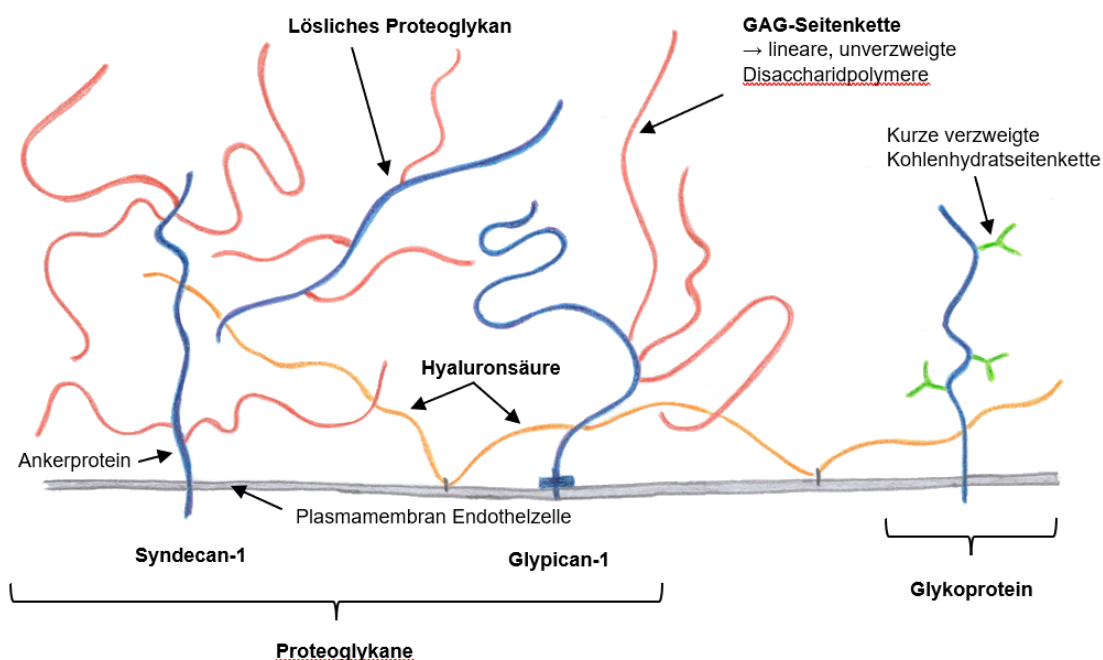


Abbildung 1: Darstellung exemplarischer Proteoglykane und Glykoproteine der Glykokalyx [69, 72, 97]

2.2.2 Funktionen des ESL

In den letzten Jahrzehnten gab es eine Vielzahl an Forschungsarbeiten, die sich sowohl mit der Funktion, aber auch mit struktureller Veränderung des ESL in unterschiedlichen Prozessen beschäftigt haben. Hierbei konnte gezeigt werden, dass der ESL nicht nur als Barriere, sondern auch als Vermittler zwischen den Endothelzellen und dem zirkulierenden Blut fungiert [72, 90].

Als Regulator der Gefäßpermeabilität ist er unter anderem in der Lage den Zugang verschiedener Moleküle zur Endothelzellmembran zu limitieren. Bereits 1996 demonstrierten Vink und Duhling, dass 70 kDa-große Dextran Moleküle unabhängig vom Ladungszustand von den Kapillarwänden ausgeschlossen wurden. Auch Erythrozyten wurden vom Endothel abgestoßen, was an einer endothelnahen Erythrozyten-Ausschlusszone erkennbar war, wohingegen Leukozyten das gesamte Lumen der Gefäße passieren konnten und in den ESL eindringen [93]. Vink und Duhling vertieften ihre Untersuchungen im Jahre 2000 und konnten herausstellen, dass das Durchdringen des ESL nicht nur von der Molekülgröße, sondern auch von deren Ladung und Struktur abhängig war. [94]

Neben der Fähigkeit den Stoffaustausch zu regulieren, spielt der ESL auch eine wichtige Rolle bei Wechselwirkungen von Blutzellen mit dem Endothel. Es wird ihm eine antiinflammatorische Wirkung zugesprochen, indem er die verschiedensten Adhäsionsmoleküle (wie z.B. Selektine, ICAM oder V-CAM) der Endothelzellen gegenüber vorbeifließendem Blut abschirmt und dadurch unkontrollierte Wechselwirkungen mit Leukozyten verhindert. Constantinescu, Vink und Spaan konnten 2003 nachweisen, dass eine Zerstörung des ESL durch Heparinasen eine vermehrte Immobilisierung von Leukozyten zur Folge hatte. [18] Auch im Bereich Gerinnung und Fibrinolyse spielt ein intakter ESL eine wichtige Rolle. Die Freisetzung von Substanzen wie Stickstoffmonoxid (NO), Prostacyclin oder CD39 führen zu einer verminderten Thrombozytenaktivierung und -rekrutierung. [26, 58] Mehrere gerinnungshemmende Mediatoren, wie Antithrombin III, Heparin-Cofaktor II, Thrombomodulin und Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) sind in der Lage an eine intakte Glykokalyx zu binden. Im Zusammenspiel mit den verschiedenen Proteoglykanen und GAGs (vor allem dem HS) entfalten sie ihre gerinnungshemmende Funktion und können so die thromboseresistenten Eigenschaften eines gesunden Endothels aufrechterhalten. [26, 69, 81, 82] Der ESL nimmt ebenfalls Einfluss auf die Fließeigenschaften von Erythrozyten, indem es sich wie eine Schmierschicht verhält und den Strömungswiderstand, welcher durch Unregelmäßigkeiten von Kapillaren entsteht, senkt. [80] Auch die Fähigkeiten zur Signalübertragung und Mechanotransduktion werden dem ESL zugesprochen. Hierbei sind die vollständigen Mechanismen noch nicht abschließend geklärt. Es ist aber beispielsweise bekannt, dass unter anderem Heparansulfate an der Mechanosensorik beteiligt sein könnten. Eine erhöhte scherinduzierte Belastung durch das fließende Blut führt zu einer Freisetzung von

Stickstoffmonoxid (NO) aus den Endothelzellen, was eine Relaxation des Gefäßtonus bewirkt. Florian und Kollegen berichteten 2003, dass eine Entfernung von HS mittels Heparinasen die scherinduzierte NO-Produktion vollständig hemmte. [27, 27, 86]

Die Fähigkeit des ESL seine oben genannten Funktionen auszuüben ist an einen intakten ESL geknüpft. So bewiesen z.B. van Haaren, VanBavel, Vink und Spaan 2003, dass der ESL empfindlich gegenüber phototoxischem Stress ist. Durch eine Fluorchrome-Beleuchtung konnte eine zuvor dargestellte ESL-Ausschlusszone für große fluoreszenz-markierte Dextrane (148 kDa) innerhalb weniger Minuten zerstört werden. [90]

Viele weitere wissenschaftliche Publikationen konnte in den letzten Jahren zeigen, dass diverse potenziell lebensbedrohlichen Erkrankungen, wie z.B. Artherosklerose, Diabetes, Sepsis oder ischämische/strukturelle Herzerkrankungen mit einem gestörten ESL in Zusammenhang stehen [19, 22, 38, 45, 78, 96]. Dies führt zu einer gestörten Permeabilitätsbarriere mit kapillärem Leck, welche mit einem gestörten mikrovaskulären Flüssigkeitsaustausch, Ödembildung, Hyperkoagulation, Inflammation und/oder einer gestörten vaskulären Reaktionsfähigkeit einhergeht. [6, 42, 71, 89]

2.2.3 Shedding der Glykokalyx

Glykokalyx-Shedding bezeichnet den Verlust, bzw. die Abspaltung einzelner Glykokalyx-Bestandteile von dessen Grundgerüst oder von der Endothelmembran selbst. [15]

Henry und Duhling berichteten im Jahr 2000, dass die Behandlung der Hamster-Cremaster-Mikrozirkulation mit Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), einem proinflammatorischen Zytokin, welches im Rahmen jedweder Entzündungsreaktionen durch aktivierte Makrophagen, Monozyten und T-Helferzellen abgesondert wird [5], eine erhöhte makromolekulare Permeation mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markierte Dextrane in die apikale Glykokalyx zur Folge hatte, welche zuvor von dieser ausgeschlossen wurden. [34]

Die Forschungsgruppe um Prof. Weber und Prof. Ludwig konnte zwischen 2008 und 2010 in verschiedenen Arbeiten darlegen, dass die Metalloproteinasen ADAM17 und ADAM10, deren Aktivität innerhalb entzündlicher Prozesse vor allem über TNF- α und Interferon- γ gesteigert wird, zu einem verstärkten Shedding von Syndekanen und dem junctionalen Adhäsionsmolekül JAM-A führte. Das Shedding von JAM-A, welches u.a. von endothelialen Tight-Junctions exprimiert wird, und das Shedding von Syndekanen führte zu einer Permeabilitätssteigerung von Endothelkontakten und einer gestörten Leukozytenrekrutierung. [48, 56, 64]

2005 demonstrierten Brügger und Kollegen an isolierten Meerschweinchen-Herzen, dass eine Behandlung mit atrialem natriuretischem Peptid (ANP) sowohl zu einem GCX-Shedding als auch zu einem histologisch nachweisbaren Abbau der Glykokalyx führte. [12] Die Arbeitsgruppe um Chappell konnte diese Ergebnisse 2014 weiter ergänzen, indem sie

verdeutlichten, dass eine erhöhte Freisetzung von ANP im Rahmen einer Hypervolämie ein GCX-Shedding induzierte. [13]

Kozar und Kollegen konnte in einem Nagetiermodell 2011 belegen, dass der Zustand eines 90-minütigen hämorrhagischen Schocks einen elektronenmikroskopisch nachweisbaren Abbau der GCX zur Folge hatte. [49] Eine prospektiven Beobachtungsstudie aus demselben Jahr von Haywood-Watson und Kollegen brachte ebenfalls das Ergebnis von deutlich erhöhten Syndecan-1-Plasmaspiegeln bei schwerverletzten Patienten im Schock. [33] Johannson demonstrierte zudem 2011, dass ein hoher zirkulierender Syndecan-1-Spiegel bei Traumpatienten einen Marker für einen starken GCX-Abbau und eine deutlich erhöhte Mortalität darstellt. Die Höhe des Syndecan-1-Spiegels korrelierte mit der Schwere des Verletzungsmusters, sowie einem ähnlichen klinischen Erscheinungsbild. Patienten mit hohen Syndecan-1-Spiegeln hatten einen höheren Katecholamin-Bedarf, sowie erhöhte Marker der Inflammation (IL-6 und IL-10), Hyperlaktatämie, Hyperglykämie und Hyperfibrinolyse. [43] Ischämie und Reperfusion (I/R), wie sie z.B. im Rahmen größeren Gefäßoperationen vorkommen, führen ebenfalls zu einer Schädigung der endothelialen Glxkokalyx. [70] Annecke und Kollegen vertieften diese Untersuchungen und publizierten 2011, dass nicht nur Ischämie und Reperfusion, sondern bereits der Zustand einer 5-minütigen Hypoxie ausreichen, um ein eindeutiges Ablösen der endothelialen Glykokalyx mit anschließendem Gefäßleck zu initiieren. [2]

Der Einsatz von kardiopulmonalen-Bypässen (CPB) in der Herzchirurgie führen ebenfalls nachweislich zu einer systemischen Beeinträchtigung des ESL. Dekker und Kollegen zeigten 2019 mit Hilfe von sublingualen Mikrozirkulationsmessungen, dass der Einsatz eines CPBs verminderte sublinguale GCX-Dimensionen zur Folge hatte [22]. Es ist bekannt, dass Herzoperationen mit CPB eine Akut-Phase-Reaktion im Sinne eines systemischen Entzündungsreaktionssyndroms auslösen. Als Auslöser werden der Kontakt zu künstlichen Oberflächen, das operative Trauma, Endotoxämie, sowie Ischämie und Reperfusion diskutiert. Die hieraus resultierende Aktivierung des Gerinnungs- und Komplementsystems, führt zur Synthese und Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, wie u.a. TNF- α , Interleukin-6 und -8 und daraus resultierender weitere Ausschüttung von Substanzen, wie z.B. Stickoxidsynthase (iNOS). [67] Worrall und Kollegen beobachteten bereits 1997, dass TNF- α die systemische vaskuläre Albuminpermeation reversibel erhöhte und dass eine selektive Hemmung von iNOS eine gestörte Gefäßbarriere in Lunge und Leber verhinderte. [98]

2.2.4 Protektion der Glykokalyx

In einer aktuellen In-vitro-Studie aus dem Jahr 2023 demonstrierten Diebel und Kollegen, dass Albumin-Lösungen, welche mit Plasma- und Sphingosin-1-Phosphat beladen waren, eine protektive Wirkung auf eine zuvor durch Schock geschädigte endotheliale GCX-Barriere hatten. [23] Die Arbeitsgruppe um Sawashita konnte diese Ergebnisse in einer In-vivo-Studie

an Ratten in diesem Jahr weiter vertiefen. In ihrer Arbeit demonstrierten sie, dass Albumin die Ausscheidung von myokardialer, durch Ischämie/Reperfusion beeinträchtigter, endothelialer GCX über einen Sphingosin-1-Phosphat-vermittelten-Mechanismus verhinderte. [75] Bereits 2013 berichteten Zeng und Kollegen, dass Sphingosin-1-Phosphat (S1P), ein Signalmolekül, welches hauptsächlich an Albumin und HDL gebunden ist, eine protektive Wirkung auf die GCX hat. An Serumalbumin gebundenes S1P führte zu einer Aktivierung von S1P1-Rezeptoren, welche u.a. von Endothelzellen exprimiert werden. Aktivierte S1P1-Rezeptoren hemmten die Aktivität der Metalloproteasen MMP-9 und MMP-13 und hoben die MMP-abhängige Abspaltung von Syndecan-1 auf. [99]

Die Arbeitsgruppe um Haywood-Watson belegten 2011, dass die Integrität der GCX zwar durch Schock gestört, jedoch durch die Gabe von Fresh Frozen Plasma (FFP) abgeschwächt wurde. [33] Ebenso scheint ein frühzeitiger Fibrinogensatz eine Trauma-induzierte-Endotheliopathie durch Stabilisierung von Syndecan-1 zu reduzieren. [25]

Chappell und Kollegen präsentierten 2007 an isolierten und I/R-ausgesetzten Meerschweinchen-Herzen, dass eine Vorbehandlung mit Hydrocortison sowohl die myokardiale Histamin-Ausschüttung als auch die Ausschüttung von GCX-Komponenten hemmte. [16] Diese GCX-stabilisierende Wirkung konnten sie in einem ähnlichen Versuchsaufbau 2009 ebenfalls für Antithrombin-III (AT-III) nachweisen. [17] Ihre Beobachtungen konnten sie weiter konkretisieren, indem sie demonstrierten, dass nicht nur I/R-induzierte GCX-Schädigung, sondern auch ein durch TNF- α -induziertes GCX-Shedding durch eine Vorbehandlung mit Hydrocortison oder AT-III verhindert werden kann. [14]

2.3 Intravitalmikroskopie

2.3.1 Sidestraem Darkfield Imaging (SDF)

Die SDF-Bildgebung ist eine moderne videomikroskopische, nicht-invasive Technik zur bettseitigen Darstellung der Mikrozirkulation, welche 2005 durch Can Ince erstmalig publiziert wurde [40, 41].

Es stellt eine Weiterentwicklung aus der von Slaaf et al. Ende des 20. Jahrhunderts entwickelten „Orthogonal Polarization Spectral“ (OPS) Bildgebung dar [83] und ermöglicht durch neuere, stromsparendere Technik eine Integration in ein tragbares Gerät, welches die klinische Anwendbarkeit deutlich verbessert [32]. Sie ist ein mittlerweile etabliertes Verfahren zur Visualisierung der Mikrozirkulation. In verschiedenen Studien konnte eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse auch zwischen verschiedenen Anwendern dargestellt werden. [36, 74]

Die Messungen dieses Forschungsprojektes wurden mit dem SDF-Videomikroskop „CapiScope HVCS“ der Firma KK Research Technology Limited (Devon, UK) durchgeführt.

HVCS steht für „Handheld Video Capillary Microscope“ ein handgeführtes, mobiles Video-Mikroskop, welches über eine USB 2.0-Verbindung mit einem Laptop verbunden ist. Mittels einer sterilen Einmalkappe kann die SDF-Sonde abgedeckt und so auf verschiedenen Organen und Geweben platziert werden.

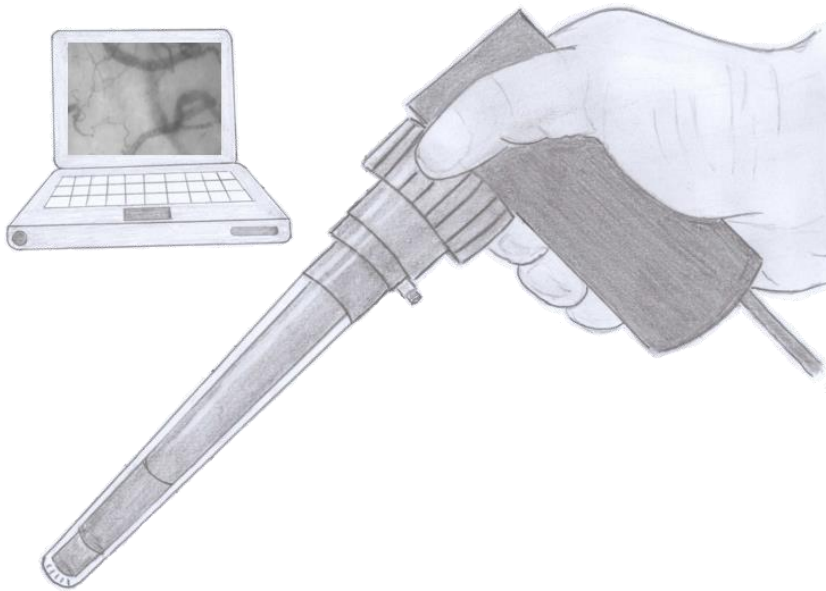


Abbildung 2: CapiScope HVCS Handheld Video Capillaroscopy System [46]

Zur Bildgebung senden konzentrisch angeordnete LEDs grünes Licht mit einer Wellenlänge von 530nm aus, welches unabhängig vom Oxygenierungsstatus des Hämoglobins von Erythrozyten absorbiert und vom sonstigen umliegenden Gewebe gestreut wird [32, 40, 41]. Hierdurch wird die im Gewebe eingebettet Mikrozirkulation beleuchtet (Abb.3a). Zurück gestreutes Licht wird auf einen Charge Coupled Device (CCD)-Sensorchip, ein sehr lichtempfindliches, ladungsgekoppeltes Halbleiterelement, projiziert. Diese äußerst kleinen, lichtempfindlichen, elektronischen Detektoren können Bilddaten anhand der Intensität von Ladungen, welcher einer bestimmten Farbe zugeordnet sind, speichern und daraus ein Bild erzeugen [66]. Zur Feinabstimmung der Schärfentiefe kann der CCD-Chip in Bezug auf das feststehende Linsensystem in der Spitze der SDF-Sonde axial verschoben werden (Abb.3b) [32].

Erythrozyten (Red blood cells, RBCs) stellen sich bei der SDF-Bildgebung als schwarze Kügelchen vor weiß-gräulichem Gewebe dar (Abb.4). Unschärfen aufgrund sich bewogender RBCs, werden durch eine gepulste Belichtung verbessert. Durch diese intravitale, stroboskopische Bildgebung können fließende RBCs im Kapillarbett dargestellt werden [32].

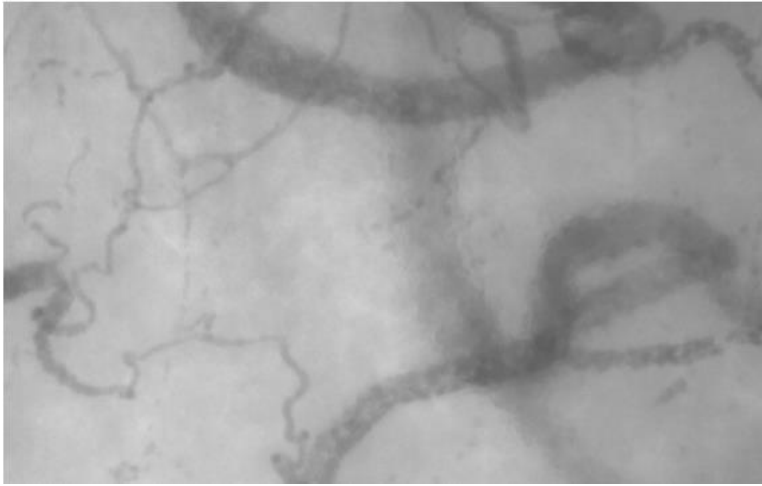


Abbildung 3:: Intravitalmikroskopische Aufnahme einer sublingualen Mucosa mittels SDF-Kamera

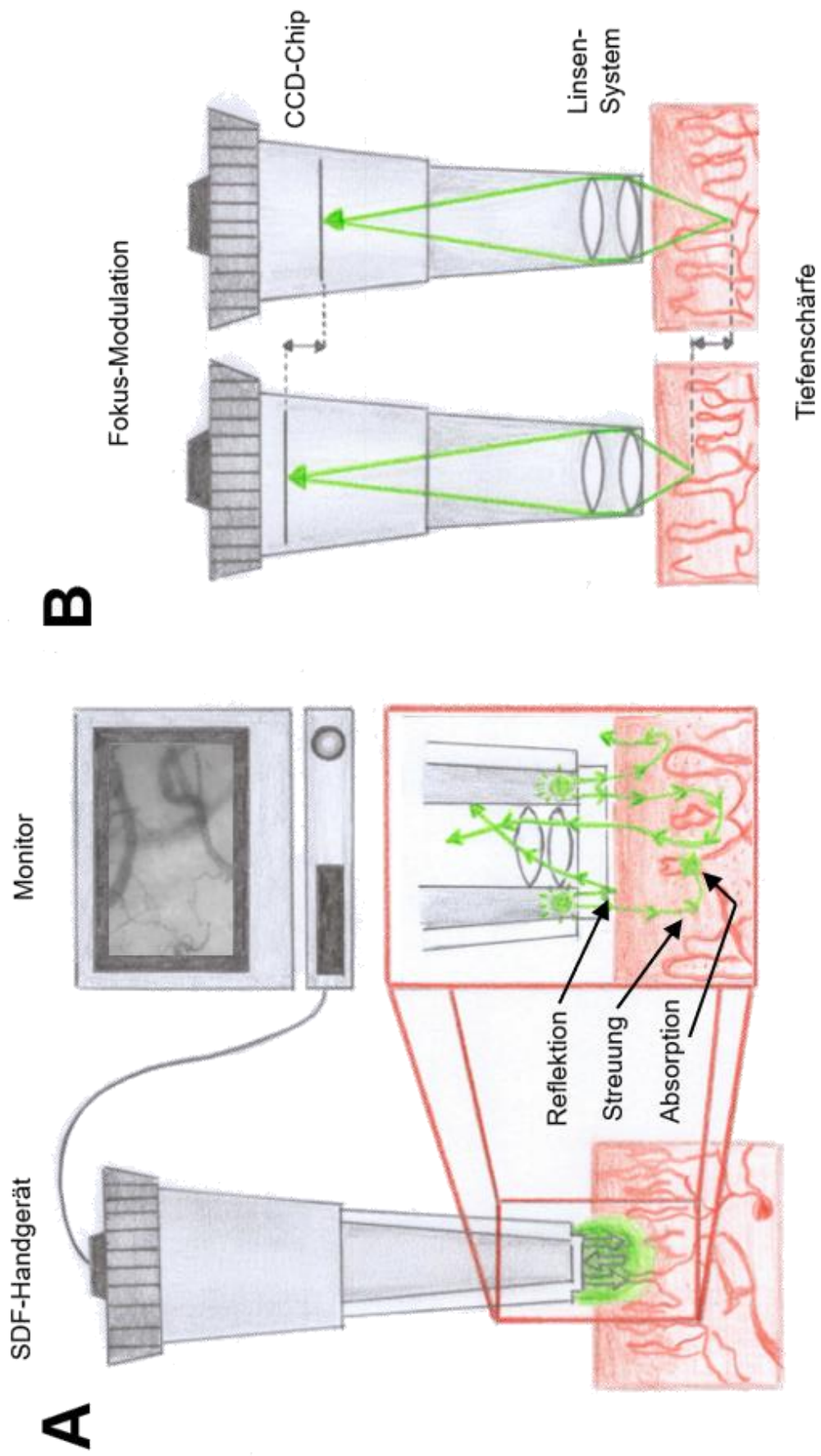


Abbildung 4: Sidestream Dark Field (SDF) Imaging [32]

2.3.2 GlycoCheck™Software

Die Video-Analyse erfolgte vollautomatische mittels der GlycoCheck™Software der Firma „Microvascular Health Solutions LLC“ (Utah, USA).

Die Erfassungs- und Analysesoftware zeichnet automatisch alle Gefäße mit einer Breite von 5-25µm auf, wenn die Kriterien einer hohen Bildqualität (Beleuchtungsintensität, Fokusebene der sublingualen Mikrozirkulation, Gewebebewegung) erfüllt sind. Anschließend werden die identifizierten Gefäße in 10µm große Segmente geteilt. Eine Aufnahmesequenz beinhaltet 40 Einzelbilder mit durchschnittlich 300 Gefäßsegmente. Nach kleinen Positionswechsel der Kamera durch den Anwender werden weitere Bildsequenzen aufgenommen bis insgesamt 3000 Gefäßsegmente aufgezeichnet sind. Durch eine Reihe von Qualitätsprüfungen durch die Software werden ungültige Gefäßsegmente (gelb) verworfen und gültige Gefäßsegmente (grün) weiter analysiert [74, 91].

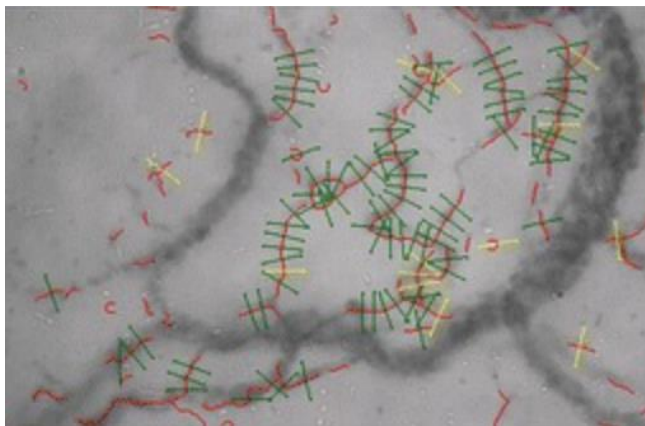


Abbildung 5: Qualitätscheck der GlycoCheck™-Software [74]

Die Software bestimmt in allen gültigen Gefäßsegmenten den Prozentsatz der Erythrozytenfüllung (RBC-filling), die Signalqualität und die Erythrozytenbreite (RBCW). Aus der Differenz der mittleren Erythrozytenbreite (Median P50) jeden einzelnen Segmentes von der Gesamtbreite des durchströmten Gefäßlumens (D_{perf}) wird die Perfused Boundary Region (PBR) definiert [74, 91]:

$$PBR = (D_{perf} - RBCW_{P50}) / 2$$

Die PBR ist somit ein errechneter Parameter und stellt eine indirekte Visualisierungsmöglichkeit des ESL dar.

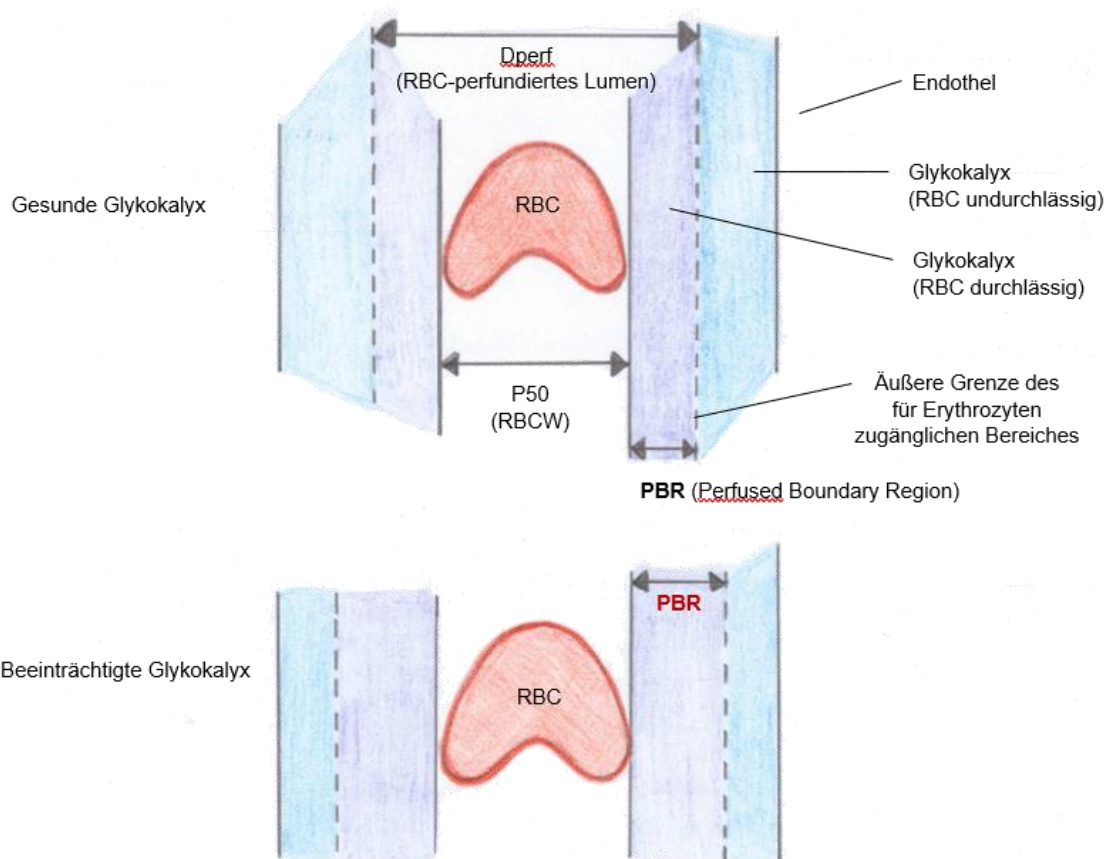


Abbildung 6: Perfused boundary region [91]

Da der ESL das Eindringen von Erythrozyten in Richtung Endothel für gewöhnlich verhindert, entspricht eine erhöhte laterale Penetration der Erythrozyten einer erhöhten PBR und somit einem reduzierten ESL [52].

2.4 ELISA

Das **Enzyme-Linked Immunosorbent Assay** (ELISA) ist ein Enzym verknüpftes Antigen-Antikörper basiertes Nachweisverfahren (Assay). Es ist in der Lage kleinste Mengen von Antigenen, wie beispielsweise Proteine, Peptide, Hormone oder Antikörper nachzuweisen [4, 31, 35, 53].

Das Grundprinzip des ELISA-Verfahrens besteht aus vier Schritten [8, 31, 35]:

1. Beschichtung

Auf die ELISA Mikrotitrierplatte (auch: Well-Platte), welche i.d.R. aus 96 oder 384 Vertiefungen (Wells) besteht, wird ein Antigen oder Antikörper aufgetragen. Dieser fixiert sich an den Wänden und bildet die erste Schicht. Im folgenden Waschgang werden alle ungebundenen Substanzen, sowie überschüssige Flüssigkeit von der Platte entfernt. [8]

2. Blockierung

Freie Bindungsstellen in den Wells werden mit einem neutralen, nicht reagierenden Protein (z.B. Rinderserumalbumin) blockiert. [31]

3. Detektion

In diesem Schritt werden ein oder mehreren Schichten von Antikörpern aufgetragen, die spezifisch an das Zielantigen oder den Zielantikörper binden. Dabei ist der zuletzt aufgetragene Detektions-Antikörper enzymgekoppelt. Auch hier werden nach jedem neuen Auftrag von Substanzen Waschgänge vorgenommen und die Platte von ungebundenem Material gereinigt. [8]

4. Substrataddition + Analyse

Im letzten Schritt wird ein chromogenes Substrat hinzugegeben, welches in Verbindung mit dem enzymgekoppelten Antikörper einen Farbumschlag induziert. In einem Mikroplattenlesegerät kann das Produkt gemessen und anhand von Standardkurven verglichen werden. Die Intensität des Farbumschlages korreliert dabei mit der Menge des Antigens in der Probe. [35]

Generell kann zwischen verschiedenen ELISA-Verfahren unterschieden werden: dem direkten und indirekten ELISA, dem Sandwich-ELISA und dem kompetitiven ELISA [31].

2.4.1 Direkter ELISA

Beim direkten ELISA-Verfahren erfolgt die farbliche Markierung bereits über den primären Antikörper.

Der gesuchte Antikörper oder das gesuchte Antigen wird direkt in den Vertiefungen der Mikrotitrierplatte gebunden. Der darauf folgende Waschgang entfernt alle nicht gebundenen Partikel. Freie Bindungsstellen der Titrierplatte werden anschließend blockiert. Danach wird ein primärer, bereits enzymgekoppelter Antikörper (Immunkonjugat) hinzugefügt. Ungebundenes Konjugat wird im nächsten Schritt ausgewaschen und ein Substrat hinzugefügt, welches einen Farbumschlag induziert. Die Konzentration des Antigens kann dann anhand der Farbreaktion ermittelt werden. [4, 35]

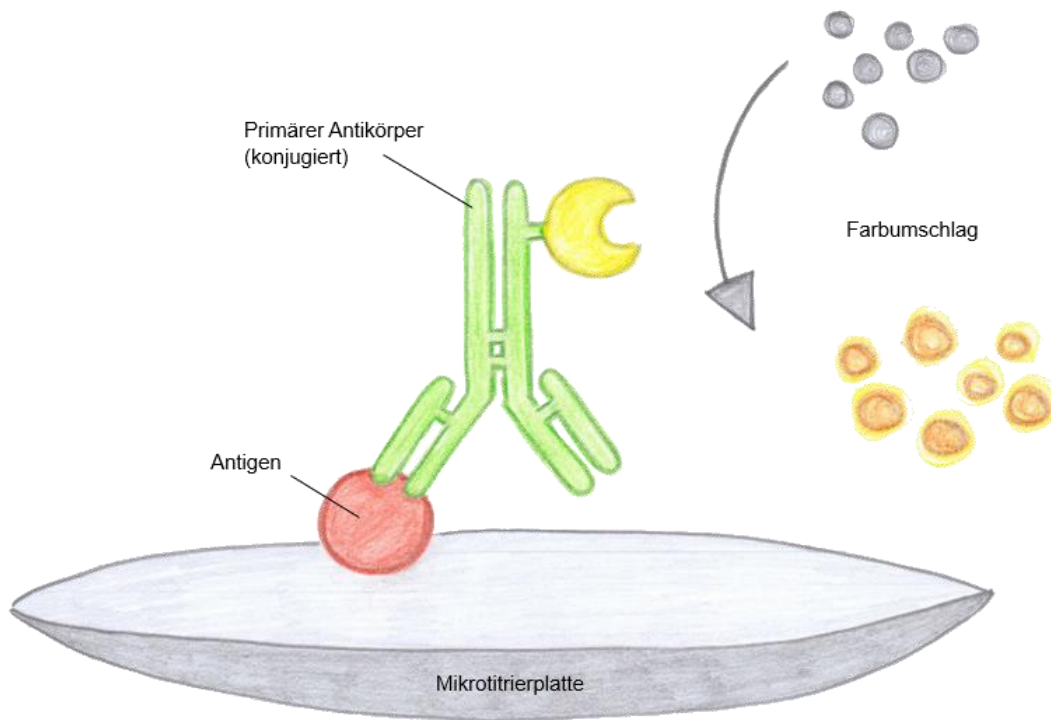


Abbildung 7: Direkter ELISA [61]

2.4.2 Indirekter ELISA

Der indirekte ELISA unterscheidet sich zum direkten ELISA, indem die Farbreaktion nicht über einen primären, sondern erst über einen sekundären Antikörper induziert wird.

Zunächst wird nicht das zu untersuchende Serum, sondern ein für den nachzuweisenden Antikörper spezifisches Antigen auf die Mikrotiterplatte aufgetragen und dort fixiert. Nach einem Waschgang werden noch freie Bereiche, welche nicht mit dem Antigen beschichtet sind, blockiert. Im Anschluss wird die Platte mit dem zu untersuchenden Serum inkubiert. Es bildet sich ein erster Antigen-Antikörper-Komplex. Um diesen Komplex sichtbar zu machen, wird ein zweiter immungekoppelter Antikörper aufgetragen. Nach der Auswaschung von ungebundenem Konjugat, wird das Substrat für das entsprechende Enzym hinzugefügt. Die Farbintensität korreliert nun mit der Menge vorhandener primärer Antikörper im Serum. [4, 35]

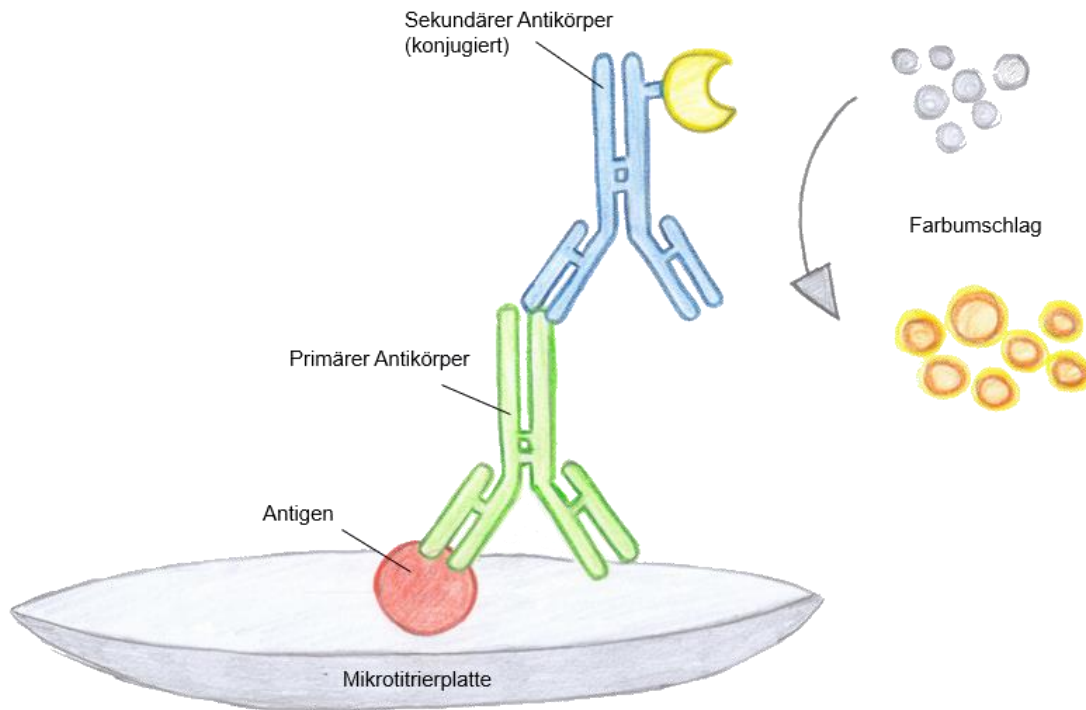


Abbildung 8: Indirekter ELISA [61]

2.4.3 Sandwich-ELISA

Der Sandwich-ELISA findet Verwendung, wenn nur geringe Mengen eines spezifischen Probenantigens vorhanden sind. Das Antigen wird wie ein Sandwich von zwei Antikörper an zwei verschiedenen Stellen gebunden. Der erste Antikörper, ein sogenannter „Capture-Antikörper“, wird am Boden der Mikrotitrierplatte fixiert. Es erfolgt, wie bei den vorangegangenen Verfahren erklärt, eine Waschung und anschließende Blockierung von freien Bindungsstellen auf der Platte. Das antigenhaltige Serum bzw. die antigenhaltige Probe wird auf die Platte aufgetragen und bildet einen ersten Antigen-Antikörper-Komplex. Der zweite Antikörper, der sogenannte Detektionsantikörper, wird hinzugefügt, bindet an einer anderen Region des Probenmoleküls. Dadurch entsteht ein Komplex, welches an ein Sandwich erinnert. Der Detektionsantikörper kann, wie im direkten ELISA bereits ein Enzym tragen. Alternativ wird die Farbreaktion indirekt durch einen weiteren Antikörper nachgewiesen. Der Sandwich-ELISA hat eine hohe Spezifität, da das Antigen über zwei verschiedene oberflächliche Regionen durch zwei verschiedene Antikörper nachgewiesen werden muss. [4, 31, 35]

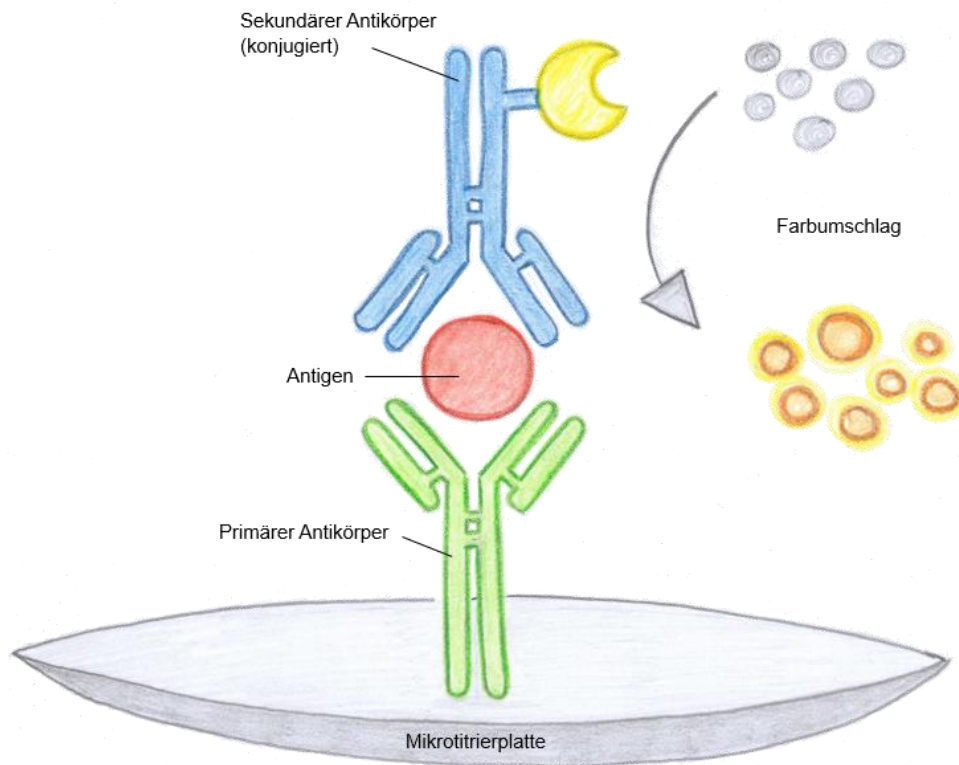


Abbildung 9: Sandwich-ELISA [61]

2.4.4 Kompetitiver ELISA

Der kompetitive ELISA (auch Hemmungs- oder Blockierungs-ELISA) unterscheidet sich zu den vorangegangenen Verfahren darin, dass das Lichtsignal umgekehrt mit der Analytmenge korreliert.

In einem ersten Schritt wird die zu untersuchende Probe unabhängig von der Mikrotiterplatte mit einem markierten, primären Antikörper inkubiert. Anschließend werden die Vertiefungen der Mikrotiterplatte mit einem inhibitorischen, unmarkierten, antigenspezifischen Antikörper oder antikörperspezifisches Antigen beschichtet. Die zuvor inkubierte Probe wird anschließend in die Vertiefungen der Platte gegeben. Die an der Platte fixierten Referenzantigenen können nur an freie primäre Antikörper binden. Bereits zuvor gebildete Antigen-Antikörperkomplexe in der zuvor präparierten Probe haben keine Bindungskapazität mehr. Je mehr Antigen zuvor in der Probe vorhanden war, desto weniger Antikörper können nun an die Referenzantigene binden. In einem folgenden Waschvorgang wird alles ungebundene Material ausgewaschen. Das Substrat wird anschließend hinzugegeben. Die resultierende Färbung ist umso schwächer, je mehr Antigen zuvor in der Probe vorhanden war. [4, 9, 31, 60]

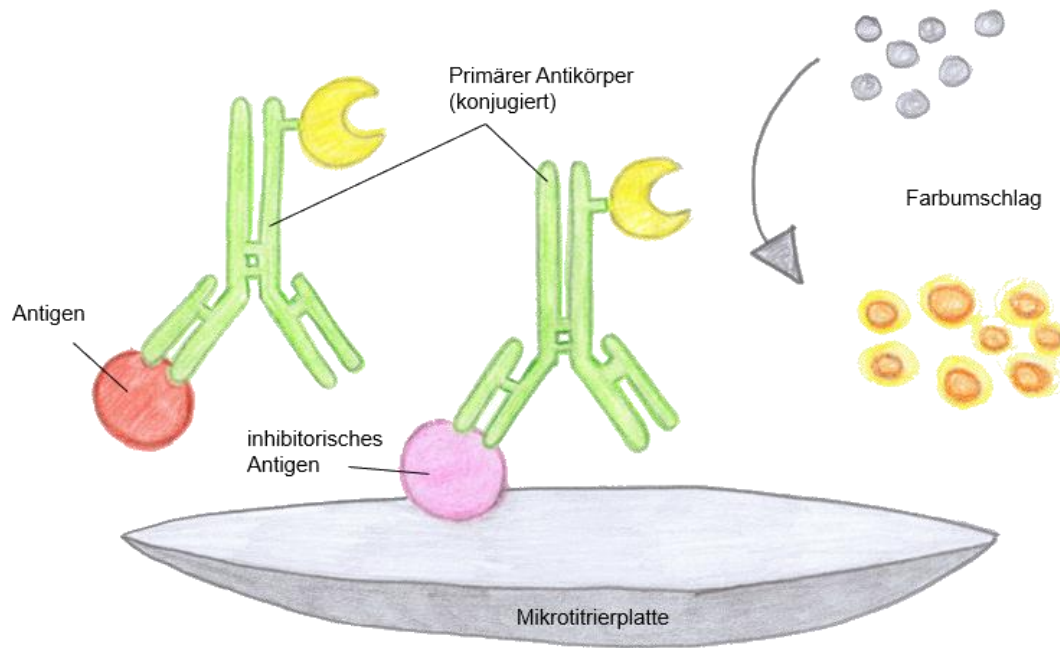


Abbildung 10: Kompetitiver ELISA [61]

2.5 Blutspende

2.5.1 Allgemein

Die Blutspende ist ein unverzichtbares Instrument um Patienten nach Unfällen, bei größeren Operationen oder auch im Rahmen von schweren Grunderkrankungen mit sicheren Blutprodukten zu versorgen. Bisher ist es noch nicht gelungen einen vollwertigen künstlichen Blutersatzstoff zu entwickeln. Die Blutspende stellt daher zurzeit noch das Mittel der Wahl dar, um transfusionspflichtige Patienten adäquat mit Blutprodukten versorgen zu können.

Das Gesamtblutvolumen eines gesunden Erwachsenen beträgt ca. 70 ml pro Kilogramm des Normalgewichtes, also ca. 6-8% der fettfreien Körpermasse [7, 47]. Das entspricht bei einem 70 kg schweren Patienten einem Gesamtblutvolumen von ungefähr 5 Litern. Alter, Geschlecht, Fettanteil und Trainingszustand können jedoch die Menge des Blutvolumens erheblich beeinflussen. [50] Der Anteil des Blutes am Körpergewicht ist beispielsweise bei Frauen mit ~6,5% geringer als bei Männern (~7,5%), bei jüngeren Kindern hingegen größer (8-9%) und bei älteren Menschen wiederum etwas reduziert. [7, 50]

Bei einer Vollblutspende wird dem Spender innerhalb von 5-10 Minuten ungefähr 500 ml Blut entnommen. Das entspricht etwa 10% des gesamten Blutvolumens.

Nach der „Klassifikation des hämorrhagischen Schocks gemäß Advanced Trauma Life Support“ kann eine Blutspende von 500ml als Blutung der Klasse 1 eingeordnet werden. Ein akuter Blutverlust der Klasse 1 mit bis zu 15% des gesamten Blutvolumens kann gewöhnlich

von einem gesunden Körper problemlos kompensiert werden [55]. Ob und inwieweit sich ein Blutverlust dieses Ausmaßes direkt auf den ESL beim Menschen auswirkt, ist zum Zeitpunkt der Datenerhebung noch nicht untersucht worden.

2.5.2 Pathophysiologie der hämorrhagischen Hypovolämie

Von einer hämorrhagischen Hypovolämie spricht man bei einem Vollblutverlust, ohne dass ein größeres Gewebetrauma vorliegt. Wenn dieser Blutverlust nicht gestoppt wird, kommt es in der Folge zu einem intravasalen Volumenmangel, wodurch die Vorlast reduziert, das Schlagvolumen vermindert und in weiterer Folge das Herzzeitvolumen (HZV) herabgesetzt wird. Die Konsequenz ist eine gestörte Makro- und Mikrozirkulation mit einem Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und -nachfrage. Zudem führt die Hämorrhagie aufgrund des Verlustes an Erythrozyten zusätzlich zu einer Anämie, wodurch die Gewebehypoxie weiter verstärkt wird [55, 84, 85].

Diverse kurz- und langfristige Kompensationsmechanismen des Körpers schaffen es jedoch bei jungen und gesunden Menschen einen Volumenverlust von bis zu 30% des Gesamtblutvolumens eine gewisse Zeit zu kompensieren [55].

Kurzfristig nehmen Barorezeptoren im Aortenbogen, sowie am Carotissinus bei einem Volumenmangel eine verminderte Wandspannung wahr, wodurch es über eine Disinhibierung des Sympathikus zu einer ausgeprägten sympathoadrenergen Aktivierung kommt [47]. Durch die Ausschüttung von Adrenalin aus dem Nebennierenmark und Noradrenalin aus den peripheren Nerven kommt es zu einer kompensatorischen Tachykardie, einer Erhöhung der kardialen Kontraktilität, sowie zu einer peripheren Vasokonstriktion. Hierdurch wird die Durchblutung weniger sauerstoffsensibler Organe und Gewebe, wie z.B. dem Splanchnikusgebiet, der Haut und der Skelettmuskulatur reduziert. Das hieraus mobilisierte Blutvolumen führt zu einem direkten Anstieg der Vorlast des Herzens und über den Frank-Starling-Mechanismus zu einem erhöhten Ejektionsvolumen des Herzens. Das dadurch gesteigerte HZV kann so für die lebenswichtigen Organe (Gehirn, Lunge und Herz) bereitgestellt werden [1, 7, 7, 55, 77]. Parallel führt die Konstriktion der Widerstandsgefäße in Kombination mit der Abnahme des venösen Druckes zu einem verringerten Kapillardruck. Dem überarbeiteten Starling-Prinzip zur Folge, welches den kolloidosmotischen Druck der Glykokalyx berücksichtigt, führt dies vorübergehend zu einer sistierenden Flüssigkeitsfiltration der Kapillare nach extravasal, sowie zu einer Flüssigkeitsmobilisierung über die Lymphe und zu einer transienten Absorption von immobilisierter Flüssigkeit ins Gefäßlumen. [54, 59, 62] Solch eine Autotransfusion kann bei einem Erwachsenen den Plasmaverlust einer 500ml starken Hämorrhagie bereits nach 15-30 Minuten zu 80-100% ausgleichen. [77, 92]

Bei der langfristigen Blutdruckregulation spielt vor allem die Niere eine zentrale Rolle. Durch eine verringerte atriale Dehnung im Volumenmangel kommt es zu einer reduzierten Ausschüttung von atrialem natriuretischem Peptid (ANP) aus den Kardiomyozyten und einer

erhöhten Ausschüttung von antidiuretischem Hormon (ADH) aus der Hypophyse. Als Aldosteronantagonist bewirkt eine verminderte ANP-Sekretion eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) der Niere, wodurch Natrium und Chlorid vermehrt resorbiert und Wasser vermehrt zurückgehalten werden kann. ADH steigert zudem über den Einbau von Aquaporinen im distalen Tubulus, sowie den Sammelrohren der Niere die Wasserresorption weiter und wirkt in hohen Dosen ebenfalls vasokonstriktorisches [77, 92]. Auf die längerfristige Blutdruckregulation soll hier jedoch nicht weiter eingegangen werden, da die kurzfristigen makro- und mikrozirkulatorischen Anpassungsreaktionen auf eine Blutung hier im Vordergrund stehen.

Der mittlere arterielle Blutdruck kann also kurzfristig vor allem über den Regelkreis der Barorezeptoren über Adaption von HZV und peripherem Gefäßwiderstand, sowie der Autotransfusion mittels interstitieller Flüssigkeitsverschiebung konstant gehalten werden [77].

2.6 Fragestellung und Hypothese

Ziel dieser Arbeit war es die unmittelbaren Auswirkungen einer Vollblutspende von 500ml Blutvolumen auf den Endothelial Surface Layer (ESL) zu untersuchen.

Hierbei war von besonderem Interesse, ob es geschlechtsspezifische Unterschiede in den Anpassungsreaktionen bezüglich des Blutverlustes gibt.

1. Führt ein kontrollierter Verlust von 500 ml Vollblut bei Blutspendern zu einer geschlechtsspezifischen physiologischen Anpassungsreaktion des ESL im Sinne einer unterschiedlich stark ausgeprägten signifikanten Änderung der Perfused Boundary Region?
2. Bleibt dabei die Integrität der Glykokalyx erhalten, sodass es zu keinem signifikanten Verlust (Shedding) von löslichen Bestandteilen ins Blut kommt?

Wir stellten die Hypothesen auf, dass es 1. zu einer physiologischen Anpassungsreaktion des ESL kommen muss. Durch die Rekrutierung von ESL-assoziiertem Plasmavolumen, erwarteten wir eine verminderte ESL und somit eine erhöhte Perfused Boundary Region (PBR). 2. erwarten wir bei diesem geringen Blutverlust ohne begleitende traumainduzierte Entzündungsreaktion kein Shedding fester Glykokalyxkomponenten, wie Heparansulfat, Syndecan-1 oder Hyaluronansäuren. Da der Anteil des Blutes am Körpergewicht bei Frauen im Verhältnis zu Männern geringer ausfällt [7, 47] erwarten wir 3., dass es im direkten Vergleich bei Frauen zu einer höheren Rekrutierung von Plasmavolumen kommt, was sich in einer im Verhältnis zum Mann erhöhten PBR darstellt.

3 Material und Methoden

3.1 Votum der Ethikkommission

Ein Antrag zur Durchführung dieser klinischen Studie wurde der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln durch Herrn Prof. Annecke vorgelegt. Die Ethikkommission stimmte diesem Antrag mit der Projektnummer 19-1168 am 15. Mai 2019 zu. Die Studie wurde gemäß den ethischen Grundsätzen für die medizinische Forschung am Menschen (Deklaration von Helsinki, 2013) durchgeführt.

3.2 Versuchsaufbau

Für diese prospektive, monozentrische Studie wurden im Zeitraum von 15. Juni bis 19. Juli 2019 insgesamt 51 Testpersonen rekrutiert, welche sich in der Blutspendezentrale der Uniklinik Köln einfanden. Sie erfüllten alle die gesundheitlichen Kriterien, um an einer regulären Vollblutspende teilnehmen zu dürfen. Die Sicherstellung der gesundheitlichen Eignung erfolgte durch die Kollegen der Blutspendezentrale über einen standardisierten Fragebogen, der Erhebung der Vitalparameter Blutdruck, Herzfrequenz und Temperatur, dem aktuellen Hämoglobin-Wert, sowie einem persönlichen Arzt-Patienten-Gespräch durch die ärztlichen Kollegen der Blutspendezentrale.

Nach der Freigabe zur Blutspende durch den Blutspende-Arzt erfolgte eine zufällige Rekrutierung der Probanden. Die Aufklärung über die Studie, sowie das Einholen der schriftlichen Einverständniserklärung wurde von einem approbierten Kollegen der Arbeitsgruppe übernommen. Es wurde eine Anamnese erhoben, die folgende Punkte umfasste:

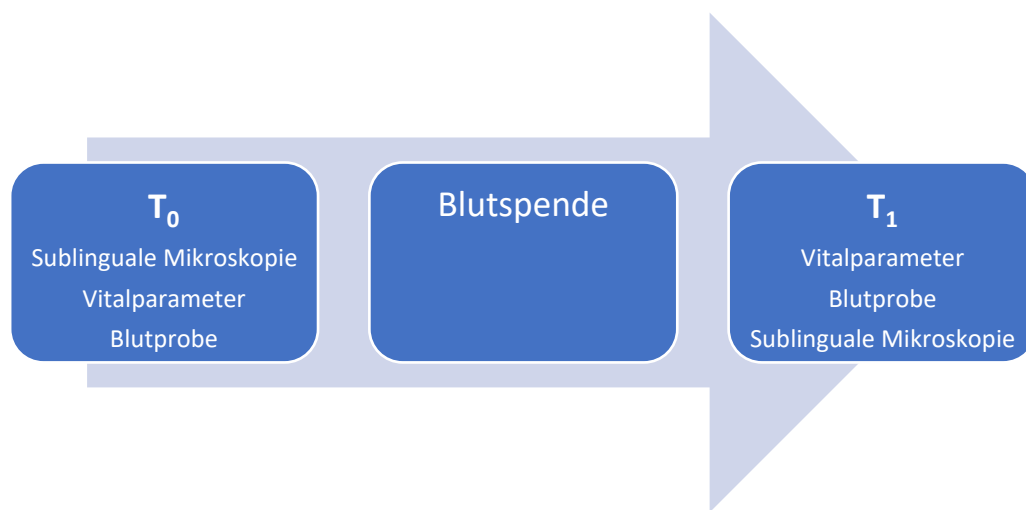
- Alter
- Geschlecht
- Körpergröße + Gewicht
- Raucherstatus
- Vorerkrankungen + Medikamente

Die Messungen wurden unmittelbar vor (Zeitpunkt T₀), sowie unmittelbar nach der eigentlichen Blutspende (Zeitpunkt T₁) durchgeführt.

Die Datenerhebung begannen jeweils mit der nicht-invasiven Echtzeit-Darstellung der sublingualen Mikrozirkulation mittels intravital-mikroskopischer Video-Darstellung. Diese Messung wurde im Blutspendessel, in sitzender Position und je nach motorischer Fähigkeit durch den Patienten selbst oder durch das Studienpersonal durchgeführt. Die intravitalmikroskopische Messung erfolgte jeweils doppelt um aussagekräftige Werte über die Perfused Boundary Region (PBR_{T₀}), sowie die RBC-filling (RBC_{T₀}) zu erhalten. Im Anschluss daran wurden die Vitalparameter Blutdruck (RR_{T₀}) und Herzfrequenz (HF_{T₀}), sowie die

pulsoxymetrisch gemessene Sauerstoffsättigung (SpO_{2T_0}) an der Fingerbeere erhoben. Nach Anschluss an die Blutspende-Einheit durch das medizinisches Fachpersonal der Blutspendezentrale konnte aus dem anfänglichen Verwurfbeutel die T_0 -Blutprobe zur Messung von Hämoglobin (Hb_{T_0}), Hämatokrit (Hkt_{T_0}), Thrombozyten (Thr_{T_0}), Leukozyten (Leu_{T_0}), sowie den Shedding-Parametern Syndecan-1 ($Syn-1_{T_0}$), Heparansulfat (HS_{T_0}) und Hyaluronsäure (HA_{T_0}) gewonnen werden.

Die Messungen T_1 erfolgten nach erfolgreicher Blutspende in umgekehrter Reihenfolge. Zunächst wurden erneut die oben genannten Vitalparameter (RR_{T_1} , HF_{T_1} , SpO_{2T_1}) erhoben. Die T_1 -Blutprobe wurde nach Abschluss der Blutspende aus dem Entnahmeschlauchsystem der Blutspende-Einheit generiert. Zuletzt erfolgte dann die doppelt durchgeführte intravitalmikroskopische Messung zur Erhebung der PBR_{T_1} und RBC_{T_1} nach Blutspende.



Das venöse Blut wurde in EDTA-Röhrchen gesammelt. Die Bestimmung von Hämoglobin, Hämatokrit, Leukozyten und Thrombozyten erfolgte direkt vor Ort mittels dem automatischen Hämatologie-Analysator Sysmex KX-21 (Sysmex, Bornbach, Deutschland). Zur Bestimmung der Marker, welche auf einen Glykokalyxabbau (Shedding) hinweisen, wurden die Blutproben im Anschluss zentrifugiert (882g, 7min, Raumtemperatur) und das überstehende Plasma bis zur weiteren Analyse bei $-80^{\circ}C$ gelagert. Mittels Sandwich-ELISA-Technik wurden die Shedding-Parameter Syndecan-1 (Diacclone SAS, Besancon, Frankreich), Heparansulfat (Cusabio Technology, Houston, Texas, USA) und Hyaluronan (Echelon Biosciences, Salt Lake City, Utah, USA) durch eine Kollegin der Experimentellen Medizin, der Klinik für Dermatologie und Venerologie im Labor in Doppelbestimmung gemessen.

3.3 Endpunkte und Kriterien

3.3.1 Primärer Endpunkt

Die **Perfused boundary region (PBR) 5-25 μ m** ist ein inverser Parameter für den „Endothelial Surface Layer“ (ESL). Sie wird automatisch durch die GlycoCheck-Software berechnet und gibt an, wie tief die Erythrozyten lateral den gelartige ESL penetrieren. Ein stärkeres Eindringen der Erythrozyten in den ESL, stellt eine erhöhte perfundierte Grenzregion dar und steht für einen Verlust und damit einem verminderten ESL. [52] Unsere Aufmerksamkeit zielte hierbei primär auf alle Gefäße mit einem Durchmesser von 5-25 μ m, welche die gesamte mikrozirkulatorische Endstrombahn mit ihren präkapillären Metarteriolen, Kapillaren und postkapillären Venolen abbildet [7].

3.3.2 Sekundäre Endpunkte

Als sekundäre Endpunkte definierten wir:

- **PBR nach Gefäßgröße**

Hierbei differenzierte die Software nach Gefäßen mit einem Durchmesser von

- PBR 5-9 μ m, welche den Kapillaren entsprechen,
- PBR 10-19 μ m, welche a.e. den Metarteriolen (präkapilläre Arteriolen) entsprechen und
- PBR 21-25 μ m, welche a.e. den postkapillären Venolen entsprechen [7, 47, 92].

- **Red Blood Cell Filling (RBC-Filling)**

Die RBC-Filling ist der Prozentsatz an roten Blutkörperchen, welche gültige Gefäßsegmente zum Aufnahmezeitpunkt passieren. Er stellt einen Schätzwert für die mikrovaskuläre Perfusion dar und wird durch die GlycoCheck-Software ermittelt [52].

- **Blutuntersuchung**

Die sequentielle Bestimmung des Blutbildes mit Hämoglobin, Hämatokrit, Leukozyten und Thrombozyten dient der Darstellung des Gesamtblutverlustes. Ein Abfall in allen Zellreihen wäre bei einem Blutverlust mit kompensierender Flüssigkeitsverschiebung zu erwarten. Die löslichen Glykokalyxkomponenten, Syndecan-1, Heparansulfat und Hyaluronsäure weisen auf eine Zerstörung der Glykokalyx hin.

- **Relativer Blutverlust**

Um den relativen Blutverlust jedes Probanden zu ermitteln, erfolgte zunächst eine geschlechtsspezifische Berechnung des zirkulierenden Blutvolumens (BV) in Litern. Dieses wurde mit Hilfe der Formel von Nadler et al. berechnet. In diese Formel gehen drei

geschlechtsspezifische Konstanten, die mit drei potenzierte Körpergröße (KGr) in Metern, sowie das Körpergewicht (KGw) in Kilogramm ein [63]:

$$BV_{fem} = 0,3561 \times KGr^3 + 0,03308 \times KGw + 0,1833$$

$$BV_{male} = 0,3669 \times KGr^3 + 0,03219 \times KGw + 0,6041$$

Im Anschluss wurde der individuelle Blutverlust (iBVL) in Prozent mit Hilfe des zuvor berechneten individuellen Blutvolumens, sowie dem konstanten Blutverlust von 0,5 Litern anhand der folgenden Formel berechnet:

$$iBVL = 100 / BV [l] \times 0,5 l$$

▪ **Vitalparameter**

Folgende allgemeinen Vitalparameter wurden erhoben:

- Systolischer und diastolischer Blutdruck (in Millimeter-Quecksilbersäule [mmHg])
- Herzfrequenz (in beats per minute [bpm])
- periphere Sauerstoffsättigung (in Prozent [%])

Mittels folgender Gleichung wurde aus den systolischen und diastolischen Blutdruckwerten der Mittlere arterielle Blutdruck (MAD) gebildet und zur Analyse der Blutdruckwerte verwendet:

$$MAD = \text{diastolischer Druck} + 1/3 * (\text{systolischer Druck} - \text{diastolischer Druck}) [47]$$

Der Pulsdruck (Synonym: Blutdruckamplitude), welcher sich aus der Differenz von systolischem und diastolischem Blutdruck bildet [88], wurde ermittelt.

Es ist zu erwarten, dass es zu einer sympathischen Anpassungsreaktion des Körpers auf den Blutverlust mit einem stabilen bis leicht verminderten Blutdruck, und einer erhöhten Herzfrequenz kommt. Die diastolischen Blutdruckwerte könnten aufgrund der sympathoadrenergen Aktivierung mit daraus resultierendem erhöhten peripheren Gefäßwiderstand ansteigen, was v.a. in Kombination mit einem erniedrigtem systolischem Blutdruckwert einen erniedrigten Pulsdruck zur Folge hätte. Die Werte der periphere Sauerstoffsättigung sollten sich darunter unbeeindruckt zeigen.

▪ **Anamnese**

Anamnestisch wurden Körpergröße und Gewicht erhoben, um hieraus den Body-Mass-Index (BMI) zu bestimmen. Hierbei bezieht sich die Körpermasse in Kilogramm auf das Quadrat der Körperlänge in Metern (kg/m^2) [92]. Aus dem BMI wurden folgende Gewichtsklassen abgeleitet [5]:

- Untergewicht = BMI < 18,5 kg/m^2
- Normalgewicht = BMI 18,5 – 24,9 kg/m^2

- Präadipositas = BMI 25 – 29,9 kg/m²
- Adipositas Grad I = BMI 30 – 34,9 kg/m²
- Adipositas Grad II = BMI 35 – 39,9 kg/m²
- Adipositas Grad III = BMI ≥ 40 kg/m²

Ebenfalls wurden der Raucherstatus (Nichtraucher, Raucher, Ex-Raucher), Vorerkrankungen und deren Medikation erhoben. Geschlechtsspezifische Unterschiede werden in allen genannten Endpunkten ausgearbeitet.

Weiterhin wurde die Regelmäßigkeit der Blutspendebereitschaft betrachtet. Routinierte Blutspender werden definiert, indem sie zwei oder mehrmals im Jahr und bereits mindestens sechsmal in ihrem Leben gespendet haben. Die Daten zur Blutspendehistorie wurden aus der Datenbank des Blutspendezentrums entnommen.

3.3.3 Einschlusskriterien

Freiwillige Vorstellung zur Blutspende, sowie die Erfüllung der Blutspendebedingungen der Blutspendezentrale der Uniklinik Köln mit Freigabe zur Blutspende durch den Spendearzt:

- Mindestalter 18 Jahre
- gesundheitliche Eignung zur Blutspende

Einwilligung zur Teilnahme an der Studie nach Aufklärung durch einen approbierten Kollegen der Arbeitsgruppe.

3.3.4 Ausschlusskriterien

Die Ausschlusskriterien ergaben sich zwangsläufig aus einer Untauglichkeit zur Blutspende oder einer Ablehnung zur freiwilligen Teilnahme an der Studie.

3.4 Statistische Analyse

Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms „IBM SPSS Statistics“ [Version 29.0.0.0 (241)].

Auf Grundlage vorangegangener Studien mit PBR-Daten gesunder Probanden wurde eine Ausgangs-PBR von 1,82 µm mit einer Standardabweichung von ± 0,16 µm angenommen. [20] Vergleichbare PBR-Daten bei gesunden Probanden konnten in späteren Studien ebenfalls gezeigt werden. [28, 30, 95]

Das Ziel war eine mittlere PBR-Differenz von 0,07 µm (entspricht einer relativen Änderung von 3,8 % der PBR) unter der Annahme einer Standardabweichung von 0,16 µm zu erkennen. Auf Grundlage eines zweiseitigen Student-t-Tests mit einem Typ-I-Fehlerschutz von <0,05 und einer Leistung von > 0,80 wurde eine geschätzte Stichprobengröße von 43 angenommen. Die Berechnung der Stichprobengröße erfolgte mit dem freien Softwareprogramm „R“ der R-Foundation und dem Power-Analysepaket „pwr“ basierend auf Cohen. Um einer

möglicherweise höheren Standardabweichung der Messungen Rechnung zu tragen, wurden acht zusätzliche Teilnehmer in die Studie eingeschlossen. [29]

Zunächst wurden alle Variablen mit Hilfe des Shapiro-Wilk-Test auf eine Normalverteilung hin getestet. Zusätzlich wurde zur graphischen Darstellung der Normalverteilung ein Histogramm mit Normalverteilungskurve, sowie ein QQ-Diagramm erstellt.

Normalverteilte Daten werden via Mittelwert \pm Standardabweichung, nicht normalverteilte Daten durch Median und Interquartilsabstände angegeben.

Die Mittelwertvergleichsanalyse der normalverteilten Variablen erfolgte mittels t-Test für abhängige Stichproben. Nicht normalverteilte Daten wurden mittels eines Wilcoxon-Tests verglichen.

Mit Hilfe der Spearman-Korrelation wurde die Unabhängigkeit zwischen Variablen getestet.

Eine lineare Regressionsanalyse erfolgte, um den Einfluss der PBR auf den RBC-Füllungsprozentsatz zu untersuchen.

4 Ergebnisse

4.1 Studienpopulation und deren Merkmale

An der Studie nahmen insgesamt 51 Probanden teil. Die Geschlechterverteilung gliederte sich in 23 weibliche und 28 männliche Spender. Die Blutspende dauerte bei den Frauen durchschnittlich 6 Minuten und 40 Sekunden [5:29 - 8:15 min:sek] und bei den Männern 4 Minuten und 52 Sekunden [4:34 - 5:53 min:sek].

		Geschlecht		
		Gesamt- population	weiblich	männlich
Studienpopulation	Anzahl	51 ± 100%	23 ± 45%	28 ± 55%
Alter [Jahre]	Minimum	18	23	18
	25. Perzentil	25	25	26
	Median	30	28	30
	75. Perzentil	39	35	47
	Maximum	70	48	70
BMI [kg/m²]	Minimum	19,4	19,4	20,0
	25. Perzentil	21,8	21,5	24,1
	Median	24,4	22,6	25,5
	75. Perzentil	26,0	24,8	26,2
	Maximum	34,3	34,3	28,0
Gewichtsklassen	Normalgewicht	27 ± 53%	18 ± 78%	9 ± 32%
	Präadipositas	22 ± 43%	3 ± 13%	19 ± 68%
	Adipositas Grad I	2 ± 4%	2 ± 9%	0 ± 0%

Tabelle 1: Studienpopulation mit Alter, BMI und Gewichtsklassen in der Gesamtpopulation, sowie im Geschlechtervergleich.

Tabelle 1 bildet zunächst die Größe der Studienpopulation mit der Altersausprägung, dem BMI, sowie der Gewichtsklassifikation ab.

Das durchschnittliche Alter der Gesamtpopulation lag bei 30 [25-39] Jahren. Die Frauen waren im Median 2 Jahre jünger als die Männer und zu 78% normalgewichtig. Die Männer waren hingegen mit 68% zum großen Teil präadipös. Da es sowohl beim Alter als auch beim BMI vereinzelte, aber deutliche Ausreißer gab, werden die Daten zur besseren Darstellung mittels Boxplot dargestellt.

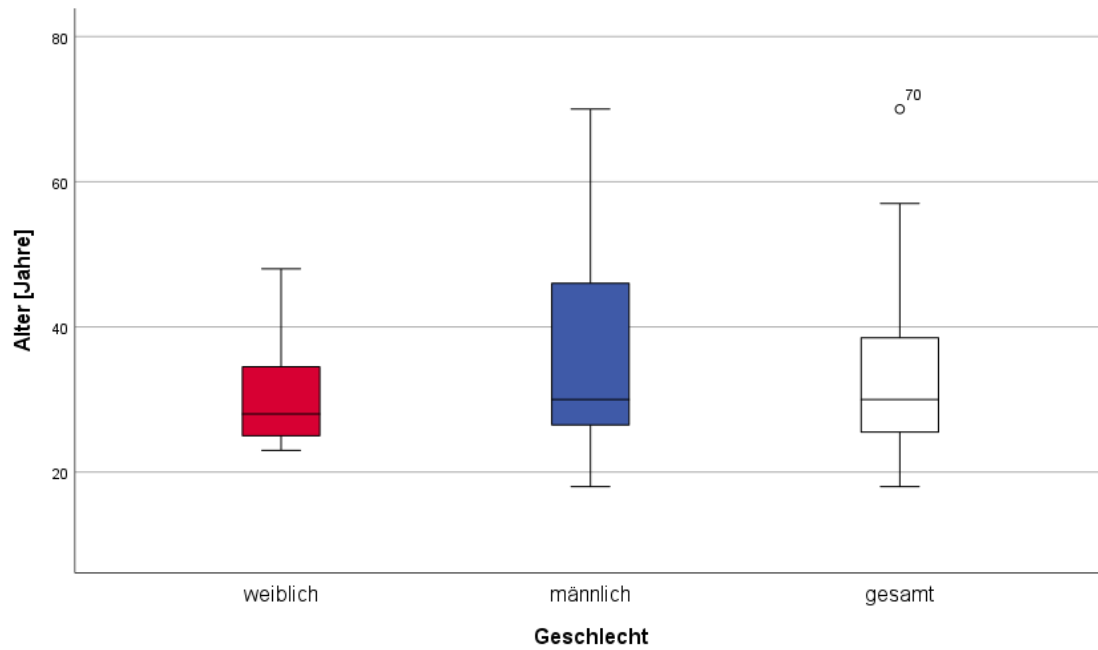


Abbildung 11: Boxplots: Altersausprägung nach Geschlecht

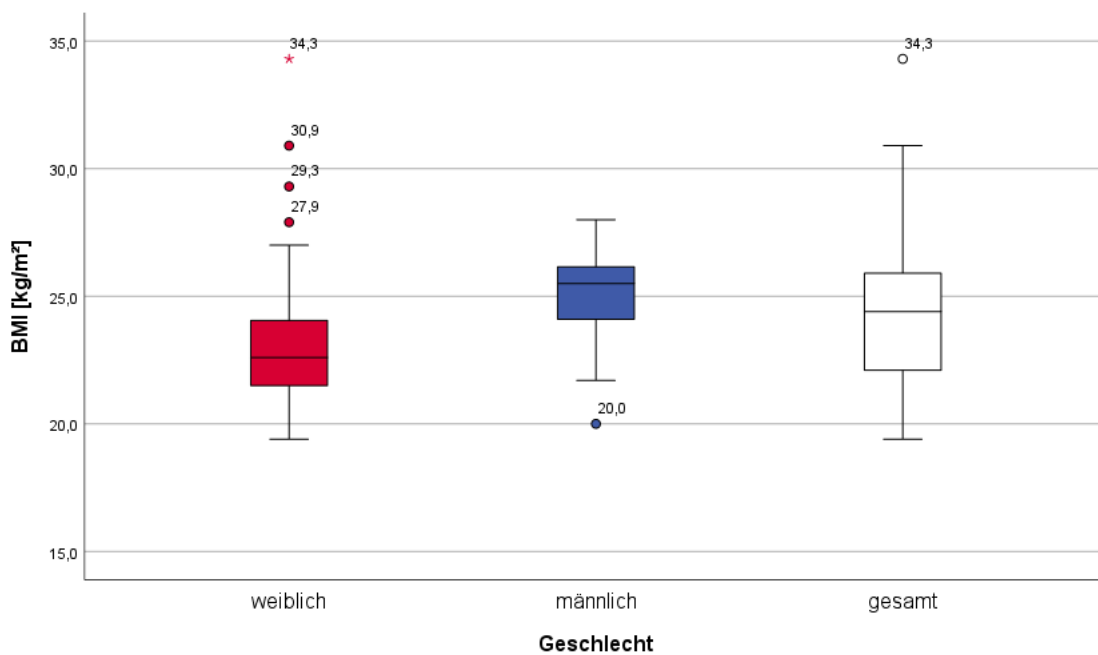


Abbildung 12: Boxplots: BMI-Ausprägung nach Geschlecht

Die geschlechtsspezifische Berechnung des Blutvolumenverlustes ergab mit 12,3 [11,7-12,6] % bei den Frauen einen deutlich höheren relativen Blutverlust im Vergleich zu den Männern mit 8,9 [8,4-9,3] %.

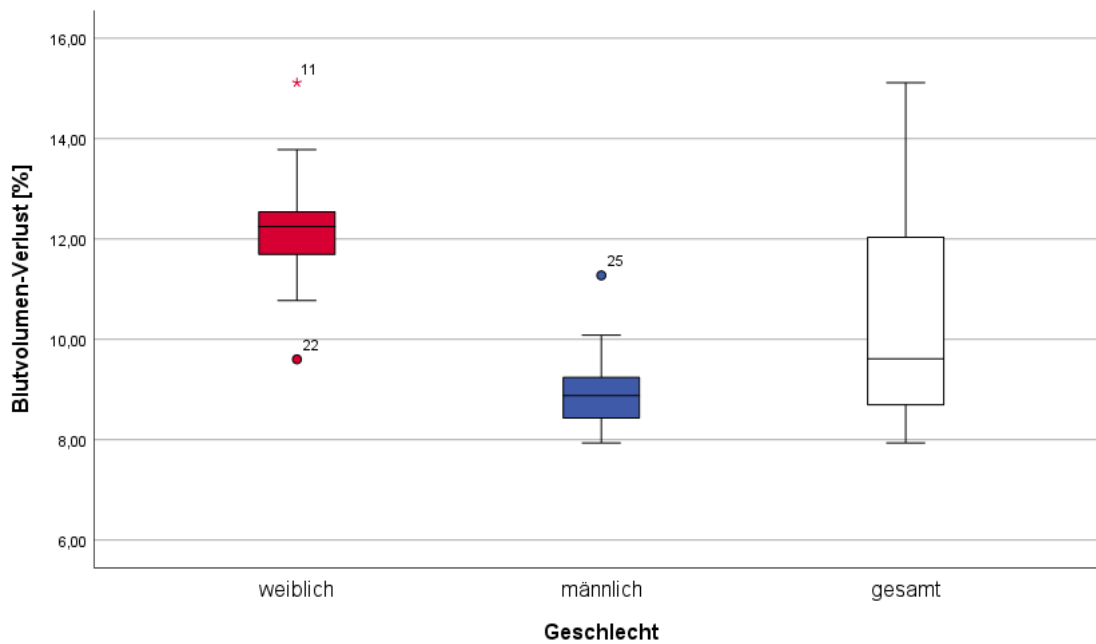
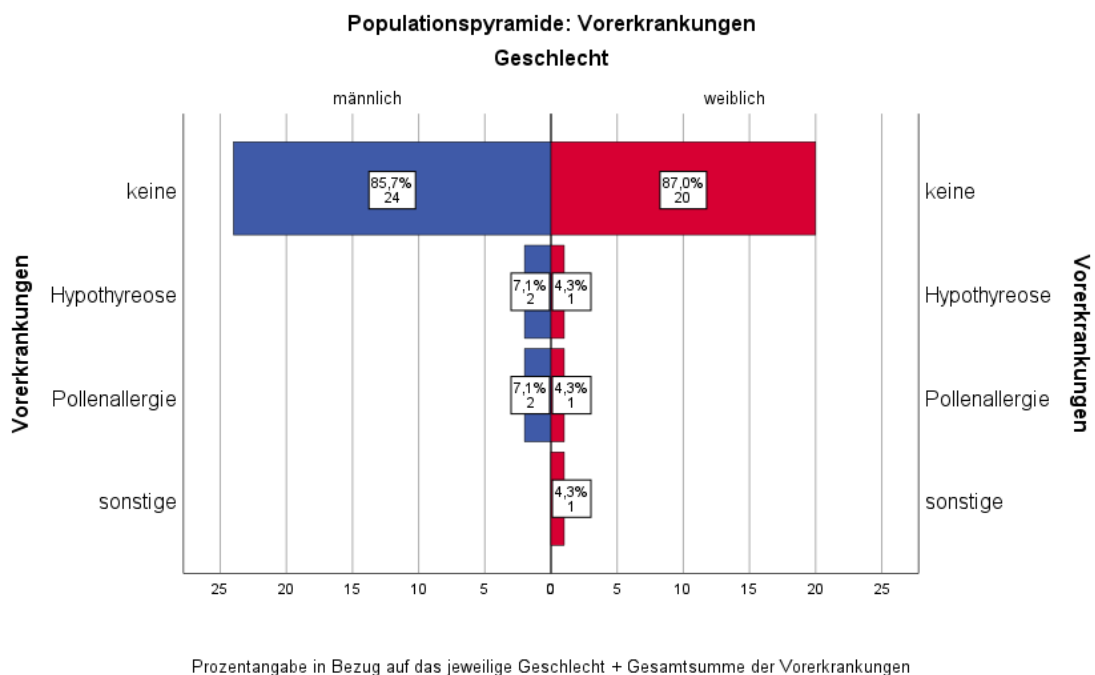


Abbildung 13: Boxplots: Relativer Blutvolumenverlust in %

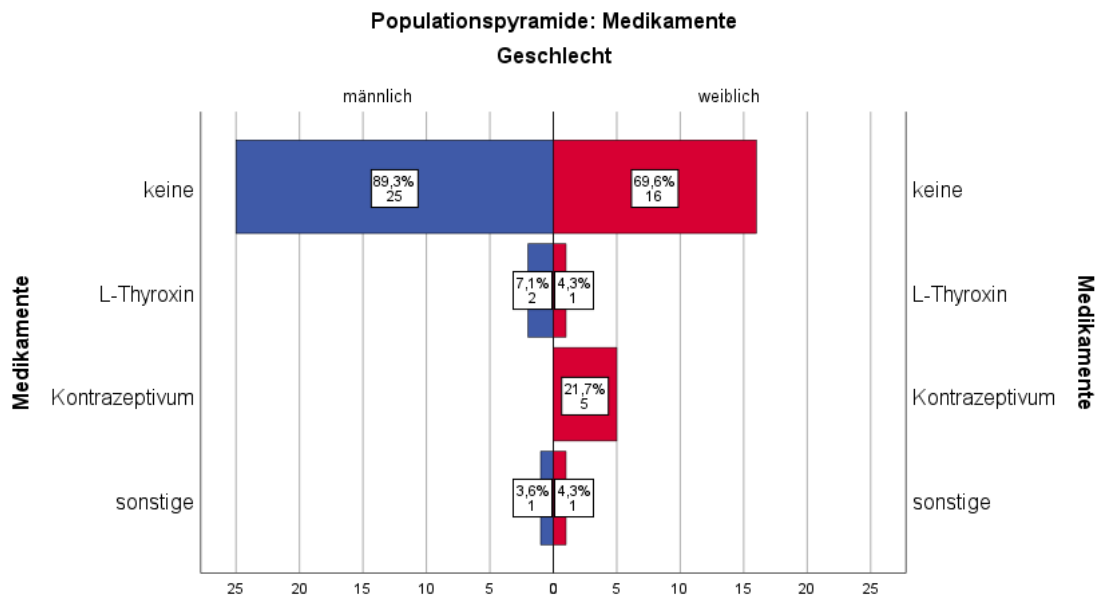
Vorerkrankungen und Medikamenten-Einnahmen, welche häufiger als zweimal in der Gesamtpopulation vorkamen, werden im Verlauf ausformuliert. Alle anderen werden unter „Sonstiges“ zusammengefasst. Mehr als 85% aller Studienteilnehmer wiesen keine Vorerkrankungen auf.

Die folgenden Populationsdiagramme zeigen die Vorerkrankungen in ihrer Gesamtsumme, sowie in Prozentangabe bezogen auf das jeweilige Geschlecht.



Prozentangabe in Bezug auf das jeweilige Geschlecht + Gesamtsumme der Vorerkrankungen

Abbildung 14: Populationspyramide zu den Vorerkrankungen



Prozentangabe in Bezug auf das jeweilige Geschlecht + Gesamtsumme der Medikamenteneinnahme

Abbildung 15: Populationspyramide zu der Medikamenteneinnahme

Tabelle 2 bildet den Raucherstatus in der Gesamtanzahl und in Prozent ab. 78% aller Testpersonen waren zum Zeitpunkt der Datenerhebung Nichtraucher. Ungefähr 29% aller Männer waren aktive Raucher, wohingegen der Anteil der aktiven Raucherinnen mit ca. 4% deutlich geringer ausfiel. Die 8 Raucher rauchten im Median 3 [2-20] Zigaretten pro Tag. Die eine Raucherin rauchte 2 Zigaretten pro Tag.

		Geschlecht		
		gesamt	weiblich	männlich
Gesamtpopulation	Anzahl	51	23	28
Raucherstatus	Nichtraucher	Anzahl 40 ≈ 78%	20 ≈ 87%	20 ≈ 71%
	Raucher	Anzahl 9 ≈ 18%	1 ≈ 4%	8 ≈ 29%
	Ex-Raucher	Anzahl 2 ≈ 4%	2 ≈ 9%	0 ≈ 0%

Tabelle 2: Raucherstatus nach Geschlecht

Frauen gingen im Median 3x/Jahr [2-4] und Männer 4x/Jahr [1-5] zur Blutspende. Insgesamt erfüllten rund 61% aller Männer und 61% aller Frauen die Kriterien für einen routinierten Blutspender (≥ 6 absolvierte Spenden mit einer Spendefrequenz ≥ 2 pro Jahr).

		Bisherige Blutspenden			
		[Anzahl]			
		< 6 Blutspenden		≥ 6 Blutspenden	
		Geschlecht		Geschlecht	
		weiblich	männlich	weiblich	männlich
Blutspendefrequenz pro Jahr [Anzahl]	≤ 1 Spende pro Jahr	3 ≈ 13%	6 ≈ 21%	1 ≈ 4%	1 ≈ 4%
	≥ 2 Spenden pro Jahr	5 ≈ 22%	4 ≈ 14%	14 ≈ 61%	17 ≈ 61%

Tabelle 3: Blutspenderoutine nach Geschlecht

4.2 Primärer Endpunkt

Für die erhobenen Werte der $PBR_{5-25\mu m}$ vor und nach Blutspende konnte in der Geschlechterbetrachtung eine Normalverteilung festgestellt werden.

Die Ausgangs-PBR von Gefäßen mit einem Durchmesser von 5 bis 25 μm vor Blutspende betrug bei den Frauen $1,82 \pm 0,21 \mu m$ und bei den Männern $1,76 \pm 0,28 \mu m$. Nach Blutspende stiegen die Werte bei den Frauen minimal auf $1,86 \pm 0,25 \mu m$ an. Bei den Männern blieben die Werte unverändert. In der Mittelwertvergleichsanalyse mittels t-Tests konnte bei beiden Geschlechtern kein signifikanter Anstieg der $PBR_{5-25\mu m}$ als Folge der Blutspende dargestellt werden (s. Tabelle 4).

	Geschlecht			
	weiblich		männlich	
	Median	p	Median	p
$PBR_{5-25\mu m}$ [prä]	$1,82 \pm 0,21$		$1,76 \pm 0,28$	
$PBR_{5-25\mu m}$ [post]	$1,86 \pm 0,25$		$1,78 \pm 0,16$	
$\Delta PBR_{5-25\mu m}$	$0,05 \pm 0,23$	0,452 ^b	$0,01 \pm 0,32$	0,823 ^b

Tabelle 4: $PBR_{5-25\mu m}$ vor und nach Blutspende

Die Werte werden als Mittelwert \pm Standardabweichung in μm angegeben.

^b Signifikanz-Wert p (zweiseitig) des t-Tests bei gepaarten Stichproben

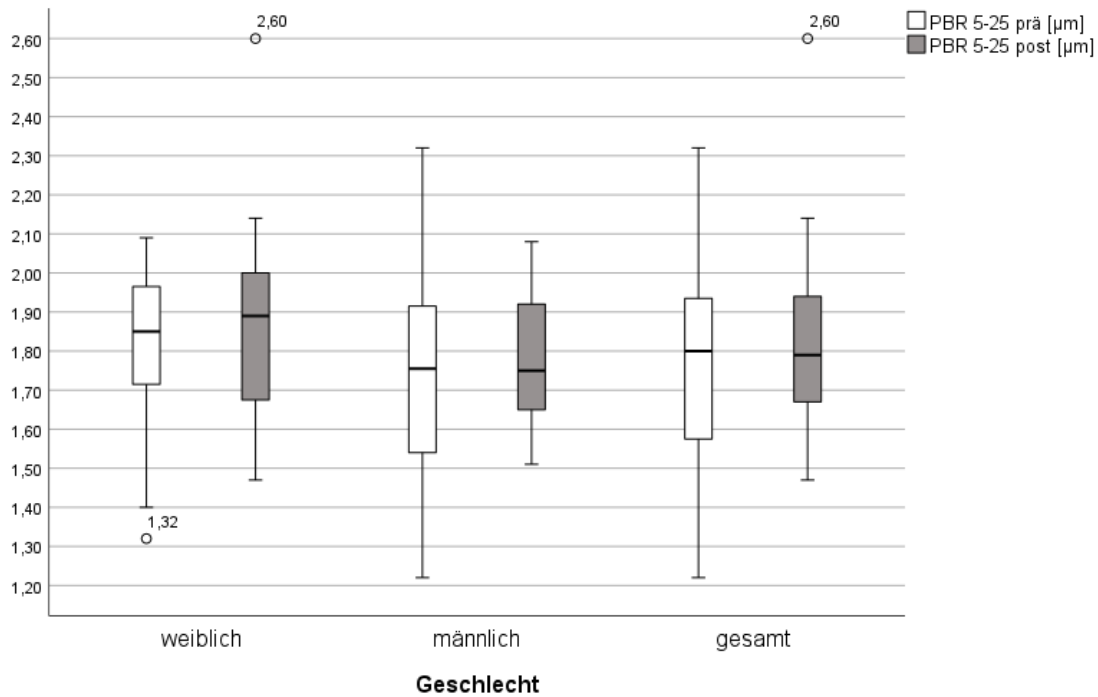


Abbildung 16: Boxplots: PBR₅₋₂₅ [µm] vor und nach Blutspende

4.3 Sekundäre Endpunkte

4.3.1 PBR nach Gefäßgröße

Für die PBR nach Gefäßgrößen sortiert konnte keine konsequente Normalverteilung der Daten festgestellt werden. Die PBR₅₋₉ und PBR₁₀₋₁₉ blieb bei beiden Geschlechtern stabil und zeigte keine signifikanten Veränderungen durch die Blutspende. Bei den weiblichen Probandinnen konnte bei Gefäßen mit einem Durchmesser von 20-25 µm eine Erhöhung der PBR dargestellt werden, welche sich mit einem ΔPBR_{5-25} von $0,15 \pm 0,52\mu\text{m}$ und einem $p = 0,049$ im Wilcoxon-Test signifikant darstellte. Die angehangene Tabelle gibt eine Übersicht bezüglich der Lageparameter vor und nach Blutspende, sowie deren Signifikanz (p) bezüglich einer Veränderung zwischen den Messungen.

	Geschlecht			
	weiblich		männlich	
	Median	p	Median	p
PBR_{5-9µm} prä	1,03 [0,96-1,07]		1,00 [0,97-1,05]	
PBR_{5-9µm} post	1,04 [0,98-1,09]		1,05 [0,94-1,09]	
ΔPBR_{5-9µm}	0,02 ± 0,09	0,417 ^a	0,02 ± 0,11	0,538 ^a
PBR₁₀₋₁₉ prä	2,08 [1,90-2,21]		1,86 [1,69-2,18]	
PBR₁₀₋₁₉ post	2,02 [1,80-2,17]		1,98 [1,76-2,13]	
ΔPBR₁₀₋₁₉	0,00 ± 0,33	0,831 ^a	0,03 ± 0,41	0,564 ^a
PBR₂₀₋₂₅ prä	2,13 [1,89-2,30]		2,11 [1,73-2,49]	
PBR₂₀₋₂₅ post	2,24 [2,08-2,57]		2,09 [1,84-2,41]	
ΔPBR₂₀₋₂₅	0,15 ± 0,52	0,049 ^a	-0,02 ± 0,54	0,946 ^a

Tabelle 5: PBR nach Gefäßgröße vor und nach Blutspende

Die Werte der PBR prä und post werden als Median [25.-75.-Perzentil] in µm angegeben.

Die Werte der ΔPBR werden als Mittelwert ± Standardabweichung in µm angegeben.

^a Signifikanz-Wert p des Wilcoxon-Tests

4.3.2 RBC-Filling

Der Prozentsatz der Erythrozyten-Füllung betrug vor Blutspende bei Frauen durchschnittlich 75,2 % [73,1-80,6] und bei Männern 78,65 % [75,8-82,7].

Die Blutspende hatte keinen signifikanten Effekt auf den Prozentsatz der Erythrozytenfüllung, was in nachfolgender Tabelle dargestellt wird.

	Geschlecht			
	weiblich		männlich	
	Median	p	Median	p
RBC-Filling prä	75,2 [73,1-80,6]		78,7 [75,8-82,7]	
RBC-Filling post	76,6 [72,6-79,5]		76,4 [74,6-79,3]	
ΔRBC-Filling	-0,7 ± 6,1	0,59 ^a	-2,0 ± 5,8	0,09 ^a

Tabelle 6: RBC-Filling vor und nach Blutspende

Die Werte werden als Median [25.-75.-Perzentil] in Prozent angegeben.

Die Werte der ΔRBC-Filling werden als Mittelwert ± Standardabweichung in % angegeben.

^a Signifikanz-Wert p des Wilcoxon-Tests

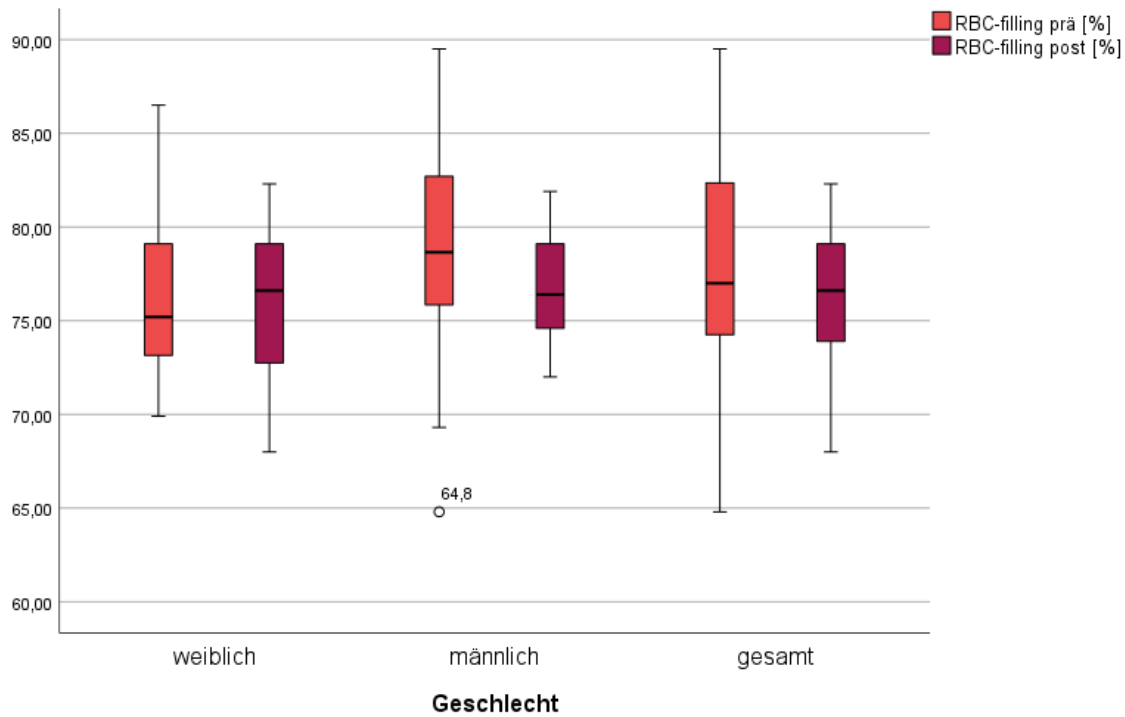


Abbildung 17: Boxplots: RBC-Filling [%] vor und nach Blutspende

4.4 Parameter der Blutuntersuchung

Hämoglobin, Hämatokrit und Leukozyten zeigten nach Blutspende eine signifikante Reduktion ihrer Werte. Die Thrombozyten hingegen blieben bei den Männern stabil und stiegen bei den Frauen an. Mit einem p von 0,052 im t-Test ergab sich jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied. Die Lageparameter, sowie die Ergebnisse der Mittelwertvergleichsanalysen werden in der nachfolgenden Tabelle, sowie den angehangenen Boxplots übersichtlich dargestellt.

	Geschlecht			
	weiblich		männlich	
	Median	p	Median	p
Hämoglobin prä [g/dl]	13,2 [12,9-13,7]		15,0 [14,4-16,0]	
Hämoglobin post [g/dl]	12,6 [12,0-12,8]		14,5 [13,3-15,2]	
Δ Hämoglobin [g/dl]	-0,8 \pm 0,3	<0,001 ^a	-0,7 \pm 0,4	<0,001 ^a
Hämatokrit prä [%]	42,9 [41,6-43,8]		47,4 [46,1-49,9]	
Hämatokrit post [%]	40,0 [38,5-41,8]		45,4 [43,7-48,2]	
Δ Hämatokrit [%]	-2,7 \pm 1,1	<0,001 ^a	-2,5 \pm 1,4	<0,001 ^a
Thrombozyten prä [10 ⁹ /l]	270 \pm 59		237 \pm 47	
Thrombozyten post [10 ⁹ /l]	280 \pm 58		241 \pm 48	
Δ Thrombozyten [10 ⁹ /l]	6 [(-8) -17]	0,052 ^b	3 [(-8) -15]	0,192 ^b
Leukozyten prä [10 ⁹ /l]	5,4 [4,6-6,6]		5,4 [4,6-6,1]	
Leukozyten post [10 ⁹ /l]	4,8 [4,1-6,1]		4,8 [4,1-5,6]	
Δ Leukozyten [10 ⁹ /l]	-0,6 \pm 0,3	<0,001 ^a	-0,5 \pm 0,4	<0,001 ^a

Tabelle 7: Parameter des Blutbildes vor und nach Blutspende

Die Werte werden abhängig des Vorliegens einer Normalverteilung als Mittelwert \pm Standardabweichung oder als Median [25.-75.-Perzentil] angegeben.

^a Signifikanz-Wert p des Wilcoxon-Tests

^b Signifikanz-Wert p (zweiseitig) des t-Tests bei gepaarten Stichproben

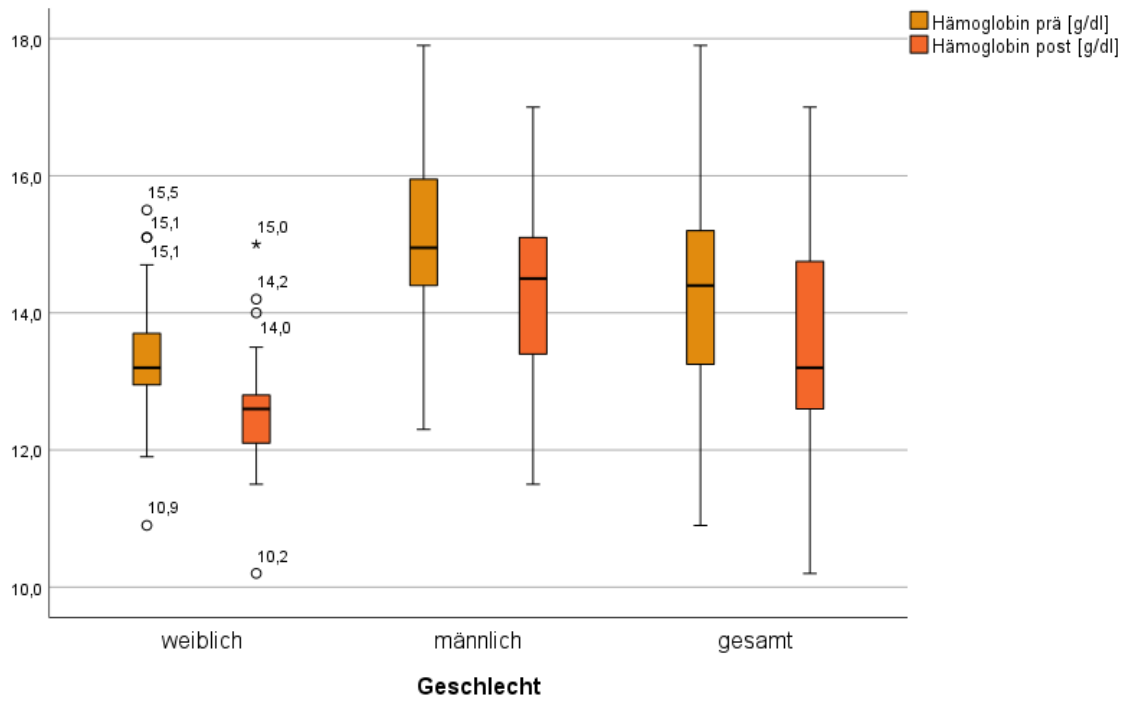


Abbildung 18: Boxplots: Hämoglobin [g/dl] vor und nach Blutspende

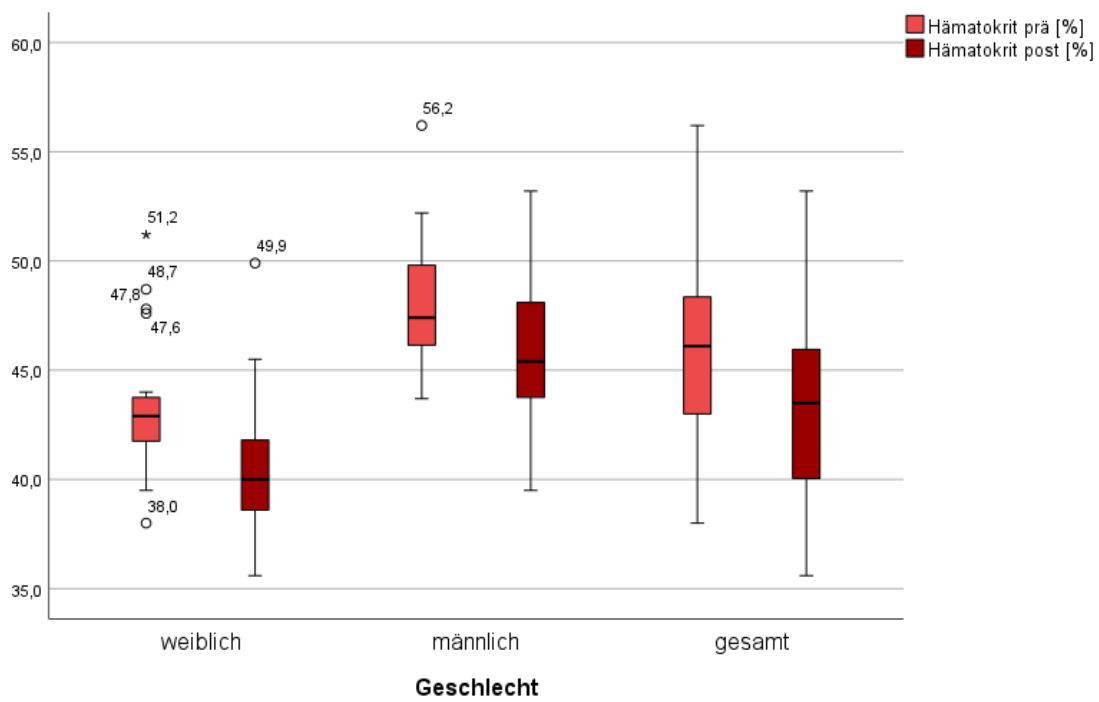


Abbildung 19: Boxplots: Hämatokrit [%] vor und nach Blutspende

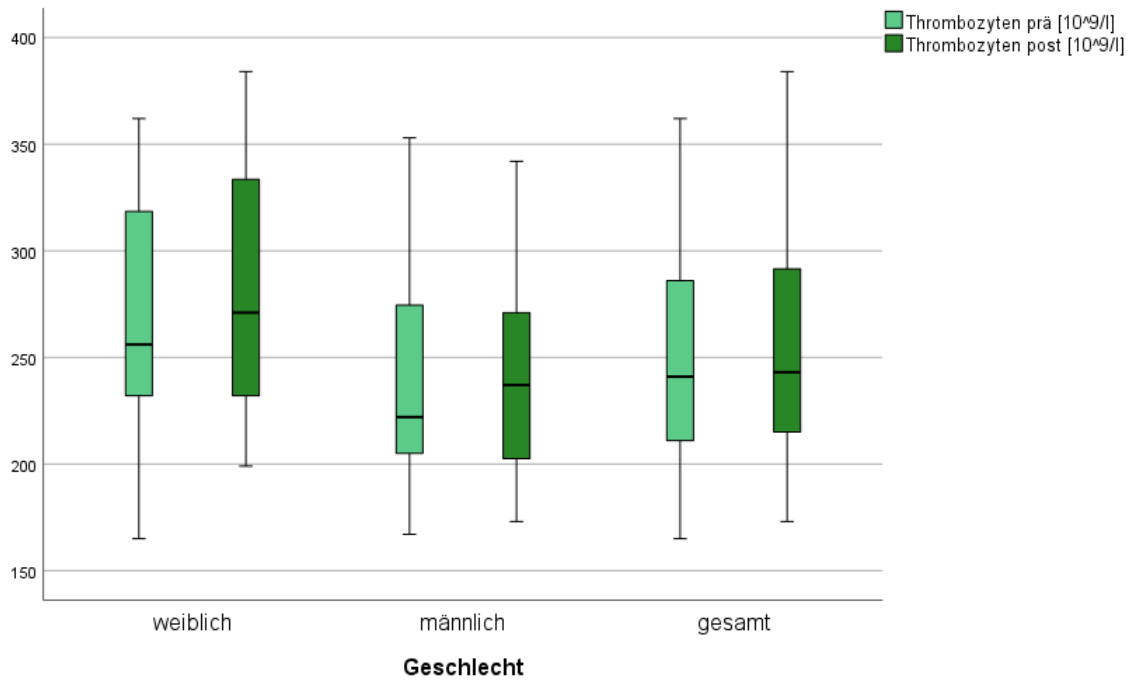


Abbildung 20: Boxplots: Thrombozyten [$10^9/l$] vor und nach Blutspende

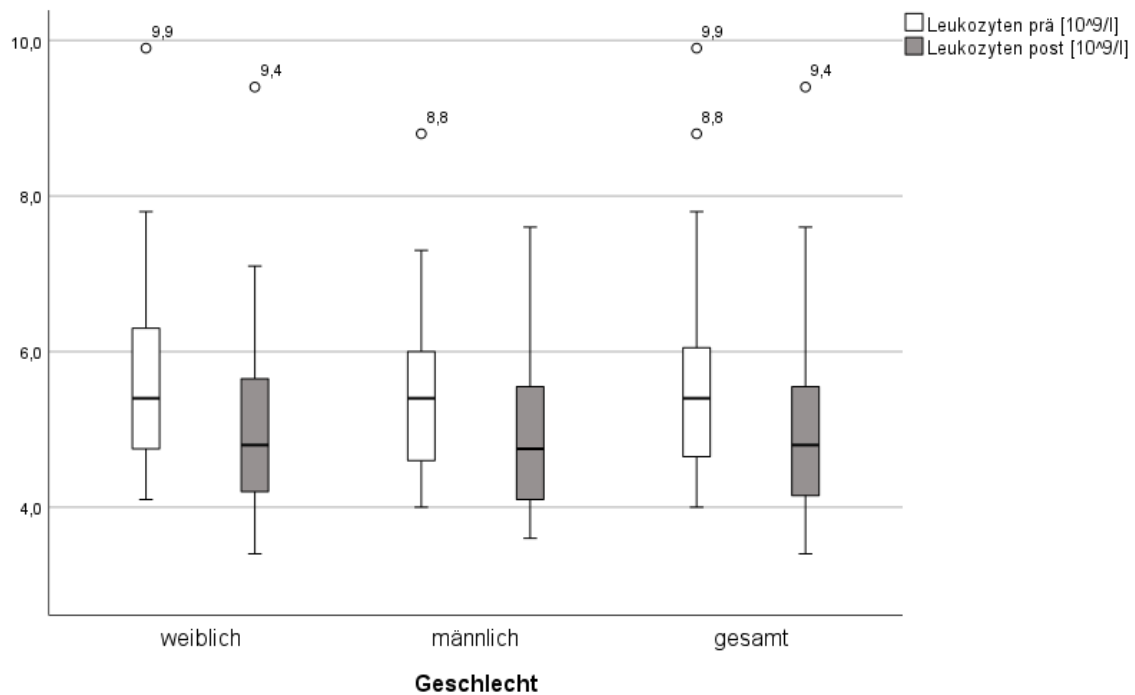


Abbildung 21: Boxplots: Leukozyten [$10^9/l$] vor und nach Blutspende

In die Auswertung der Sheddingparameter gingen nur die ersten 40 Probanden ein (19 weibliche und 21 männliche Probanden).

Bei den Frauen fiel der Heparansulfat Spiegel nach Blutspende signifikant ($p = 0,003$) von 1330 ± 344 ng/ml auf 1206 ± 260 ng/ml. Bei den Männern zeigte sich ebenfalls ein dezenter Abfall, jedoch ohne Signifikanz.

Bei den Syndecan-1-Spiegeln zeigten sich vor allem bei den Männern sehr extreme Ausreißer in den Lageparametern. Insgesamt blieben die Werte aber stabil und zeigten keine signifikanten Veränderungen.

Die Hyaluronan-Spiegel fielen bei beiden Geschlechtern ab. Ein signifikanter Effekt konnte jedoch nur bei den Männern ($p = 0,009$) dargestellt werden.

Die nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über die Lageparameter aller drei erhobenen Sheddingparameter, sowie deren Signifikanz bezüglich der Mittelwertvergleichsanalyse. Da es beim Hyaluronan, aber vor allem beim Syndecan-1 zu extremen Ausreißern gekommen ist, werden die Lageparameter zum besseren Verständnis mittels Boxplots dargestellt.

	Geschlecht			
	Weiblich (n=19)		Männlich (n=21)	
	Median	p	Median	p
Heparansulfat prä	1330 ± 344		1328 ± 297	
Heparansulfat post	1206 ± 260		1265 ± 291	
Δ Heparansulfat	-124 ± 155	0,003 ^b	-63 ± 225	0,215 ^b
Syndecan-1 prä	26,3 [22,3-33,9]		34,0 [27,9-140,8]	
Syndecan-1 post	25,6 [22,2-31,0]		34,5 [28,3-135,6]	
Δ Syndecan-1	-1,9 [(-3,6) -1,5]	0,295 ^a	0,2 [(-1,5) -1,0]	0,590 ^a
Hyaluronan prä	90,4 [77,2-93,7]		92,0 [83,7-105,1]	
Hyaluronan post	85,3 [73,0-90,8]		89,6 [82,5-100,8]	
Δ Hyaluronan	-3,1 ± 7,6	0,070 ^a	-4,9 ± 8,3	0,009 ^a

Tabelle 8: Sheddingparameter vor und nach Blutspende

Die Werte werden abhängig des Vorliegens einer Normalverteilung als Mittelwert ± Standardabweichung oder als Median [25.-75.-Perzentil] in ng/ml angegeben.

^a Signifikanz-Wert p des Wilcoxon-Tests

^b Signifikanz-Wert p (zweiseitig) des t -Tests bei gepaarten Stichproben

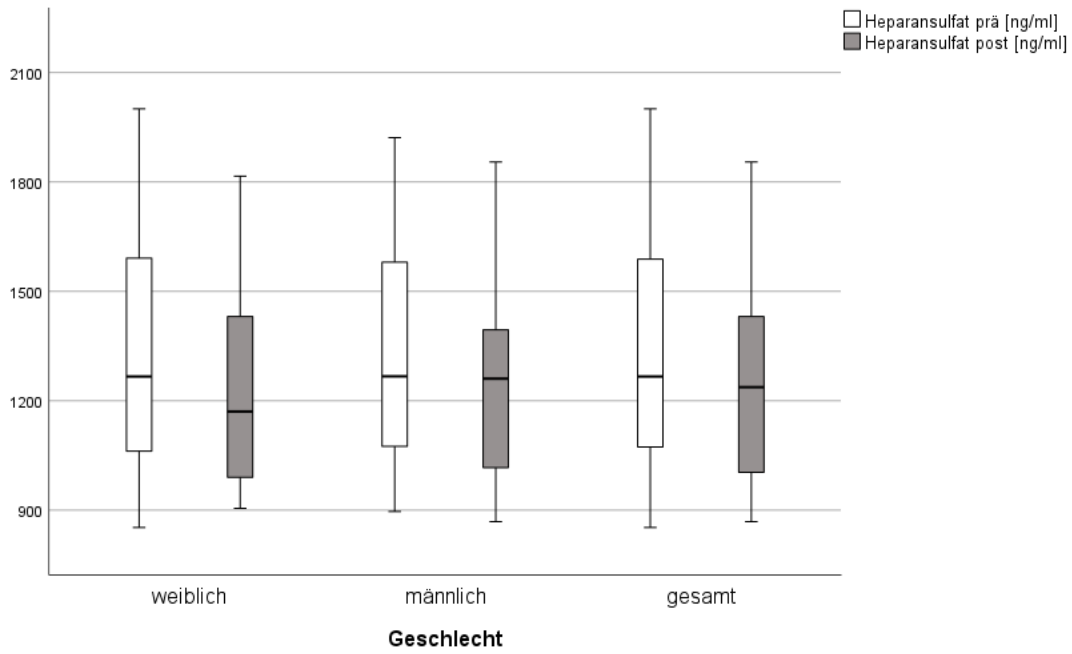


Abbildung 22: Boxplots: Heparansulfat-Spiegel [ng/ml] vor und nach Blutspende

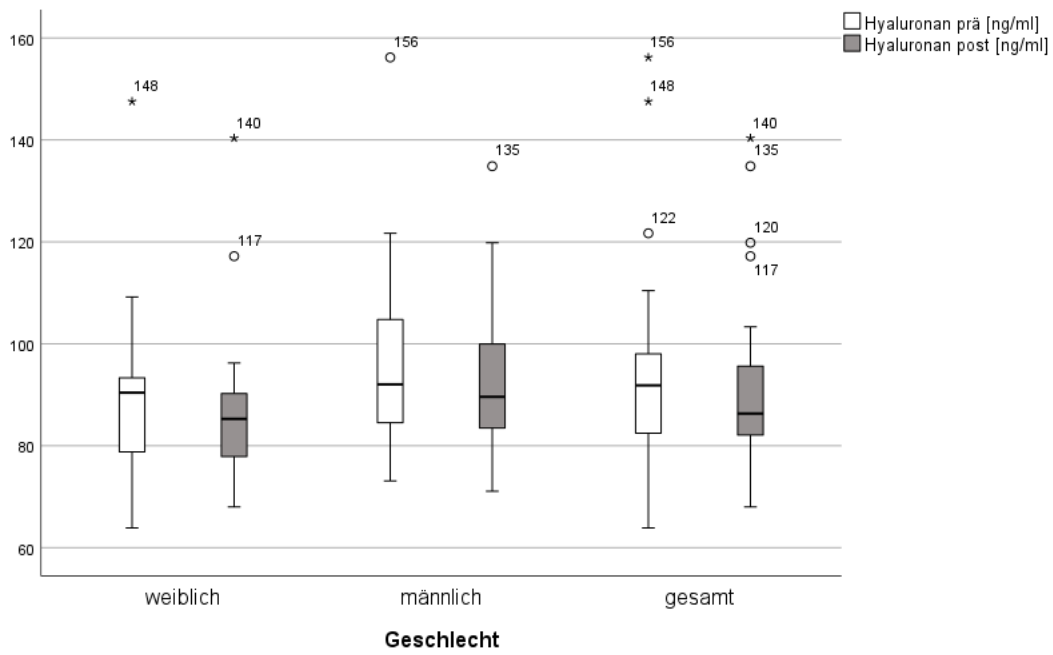


Abbildung 23: Boxplots: Hyaluronan-Spiegel [ng/ml] vor und nach Blutspende

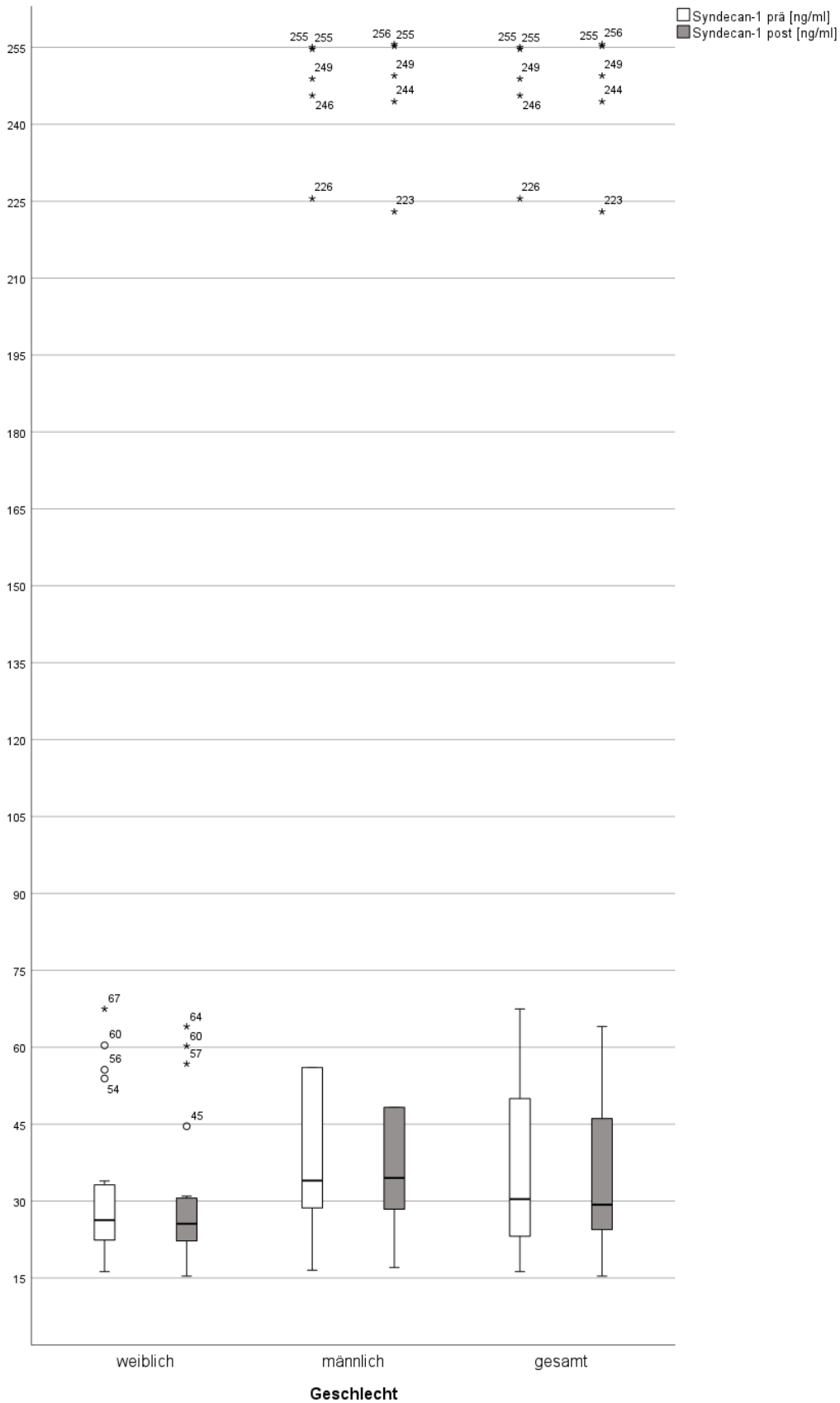


Abbildung 24: Boxplots: Syndecan-1-Spiegel [ng/ml] vor und nach Blutspende

4.4.1 Vitalparameter

Bei den Vitalparametern konnte ein signifikanter Anstieg der Herzfrequenz (78 ± 11 vs. 85 ± 13 bpm., $p = 0,013$) nur bei den Frauen festgestellt werden.

Beide Geschlechter zeigten einen signifikanten Abfall des systolischen Blutdruckes zwischen den beiden durchgeführten Messungen ($\Delta RR_{\text{syst}} = -10 [(-10)-0]$ mmHg mit $p = 0,007$ und $\Delta RR_{\text{syst}} = -10 [(-14)-(-5)]$ mmHg mit $p = <0,001$). Die diastolischen Blutdruckwerte hingegen fielen nur bei den Frauen statistisch relevant ab ($\Delta RR_{\text{diast}} = -5 [(-10)-0]$ mit $p=0,039$).

Aufgrund der reduzierten systolischen Blutdruckwerte zeigte sich sowohl bei den Frauen (94 ± 12 vs. 90 ± 11 mmHg, $p = 0,002$), als auch bei den Männern (100 ± 9 vs. 96 ± 10 mmHg, $p = 0,003$) ein relevanter Abfall des mittleren arteriellen Blutdruckes.

In Folge des reduzierten systolischen Druckes bei stabilen diastolischen Blutdruckwerten kam es nur bei den Männern zu einem signifikant reduzierten Pulsdruck ($\Delta \text{Pulsdruck} = -10 [(-10)-0]$, $p = 0,004$).

Die Werte der periphere Sauerstoffsättigung blieben bei beiden Geschlechtern stabil.

Die nachfolgende Tabelle gibt einen nach Geschlecht differenzierten Überblick bezüglich der Lageparameter von Puls, systolischem und diastolischem Blutdruck, MAD, Pulsdruck und peripherer Sauerstoffsättigung vor und nach Blutspende, sowie tabellarisch die Ergebnisse der Mittelwertvergleichsanalysen. Zum besseren Verständnis werden die Ergebnisse zusätzlich in Form von Boxplots dargestellt.

	Geschlecht			
	Weiblich (n=23)		Männlich (n=28)	
	Median	p	Median	p
Puls prä [bpm]	78 ± 11		78 ± 14	
Puls post [bpm]	85 ± 13		77 ± 12	
ΔPuls [bpm]	7 ± 13	0,013 ^b	-1 ± 14	0,650 ^b
Systolischer Blutdruck prä [mmHg]	120 [115-130]		135 [120-150]	
Systolischer Blutdruck post [mmHg]	120 [105-130]		125 [116-135]	
ΔSystolischer Blutdruck [mmHg]	-10 [(-10)-0]	0,007 ^a	-10 [(-14)-(-5)]	<0,001 ^a
Diastolischer Blutdruck prä [mmHg]	80 [70-85]		80 [80-90]	
Diastolischer Blutdruck post [mmHg]	70 [70-80]		80 [80-89]	
ΔDiastolischer Blutdruck [mmHg]	-5 [(-10)-0]	0,039 ^a	0 [(-10)-0]	0,171 ^a
MAD prä [mmHg]	94 ± 12		100 ± 9	
MAD post [mmHg]	90 ± 11		96 ± 10	
ΔMAD [mmHg]	-4,5 ± 6	0,002 ^b	-4,5 ± 7	0,003 ^b
Pulsdruck prä [mmHg]	45 [40-50]		50 [40-60]	
Pulsdruck post [mmHg]	40 [35-50]		45 [40-50]	
ΔPulsdruck [mmHg]	0 [(-10)-0]	0,229 ^a	-10 [(-10)-0]	0,004 ^a
SpO ₂ prä [%]	99 [98-99]		98 [97-99]	
SpO ₂ post [%]	98 [98-99]		98 [97-98]	
ΔSpO ₂ [%]	0 [(-1) -0]	0,144 ^a	0 [(-1) -1]	0,772 ^a

Tabelle 9: Vitalparameter vor und nach Blutspende

Die Werte werden abhängig des Vorliegens einer Normalverteilung als Mittelwert ± Standardabweichung oder als Median [25.-75.-Perzentil] angegeben.

^a Signifikanz-Wert p des Wilcoxon-Tests

^b Signifikanz-Wert p (zweiseitig) des t-Tests bei gepaarten Stichproben

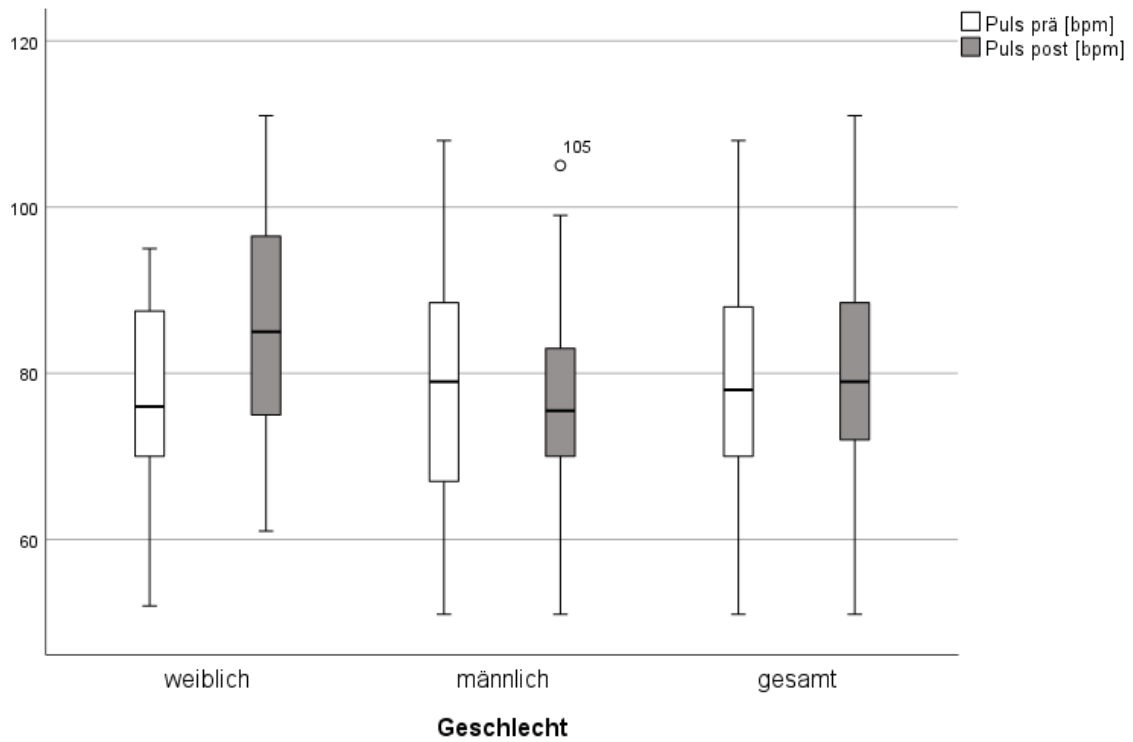


Abbildung 25: Boxplots: Puls [bpm] vor und nach Blutspende

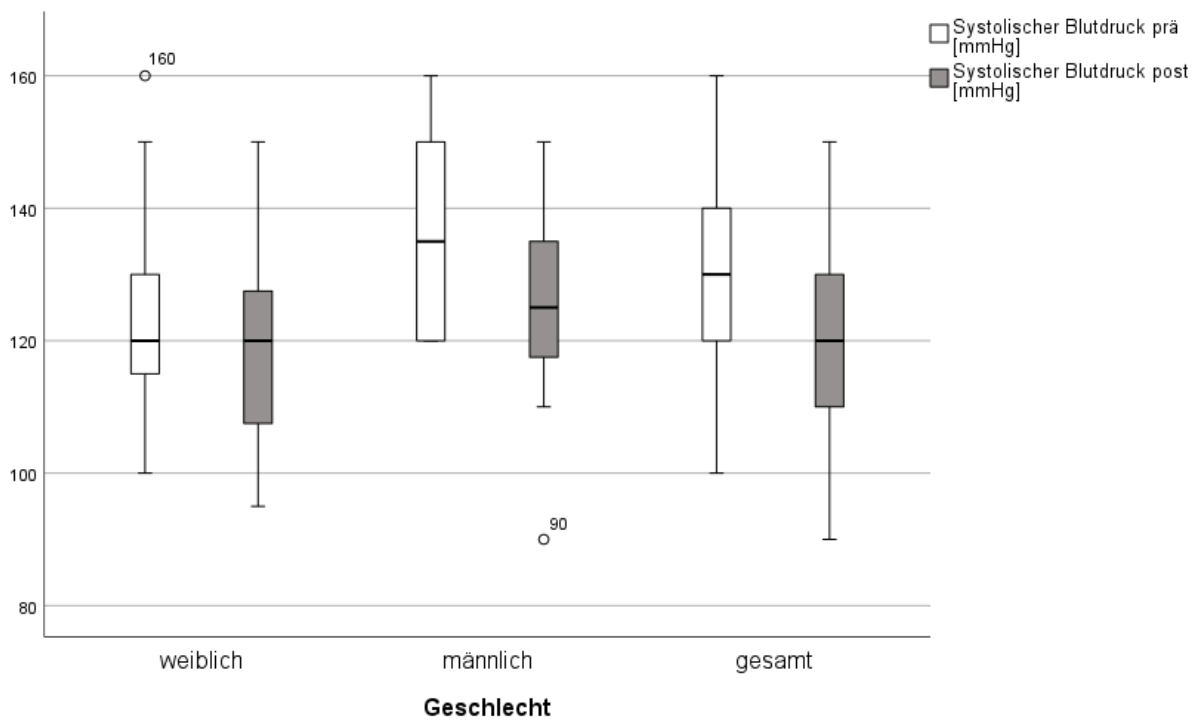


Abbildung 26: Boxplots: Systolischer Blutdruck [mmHg] vor und nach Blutspende

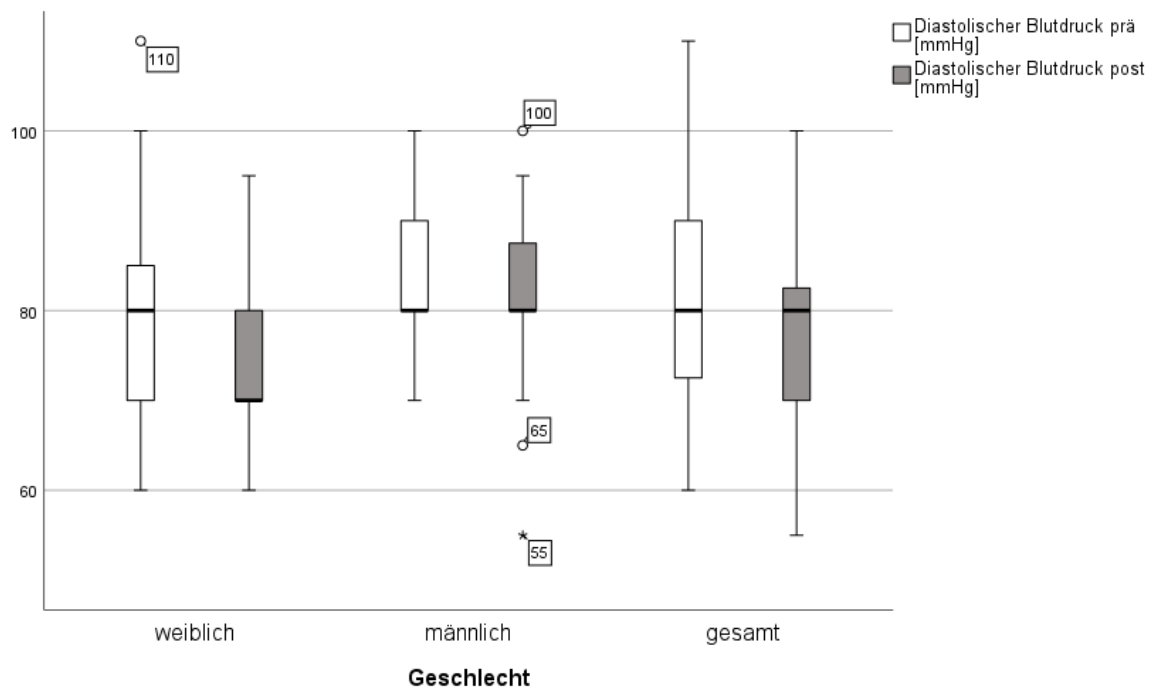


Abbildung 27: Boxplots: Diastolischer Blutdruck [mmHg] vor und nach Blutspende

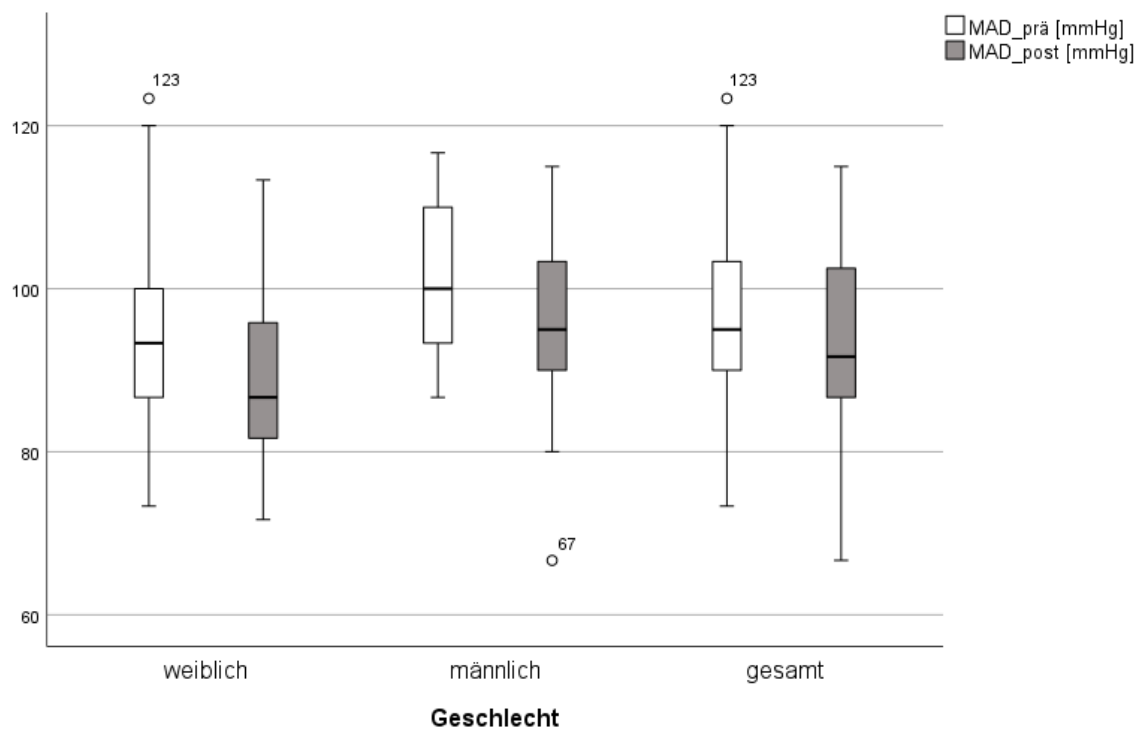


Abbildung 28: Boxplots: MAD [mmHg] vor und nach Blutspende

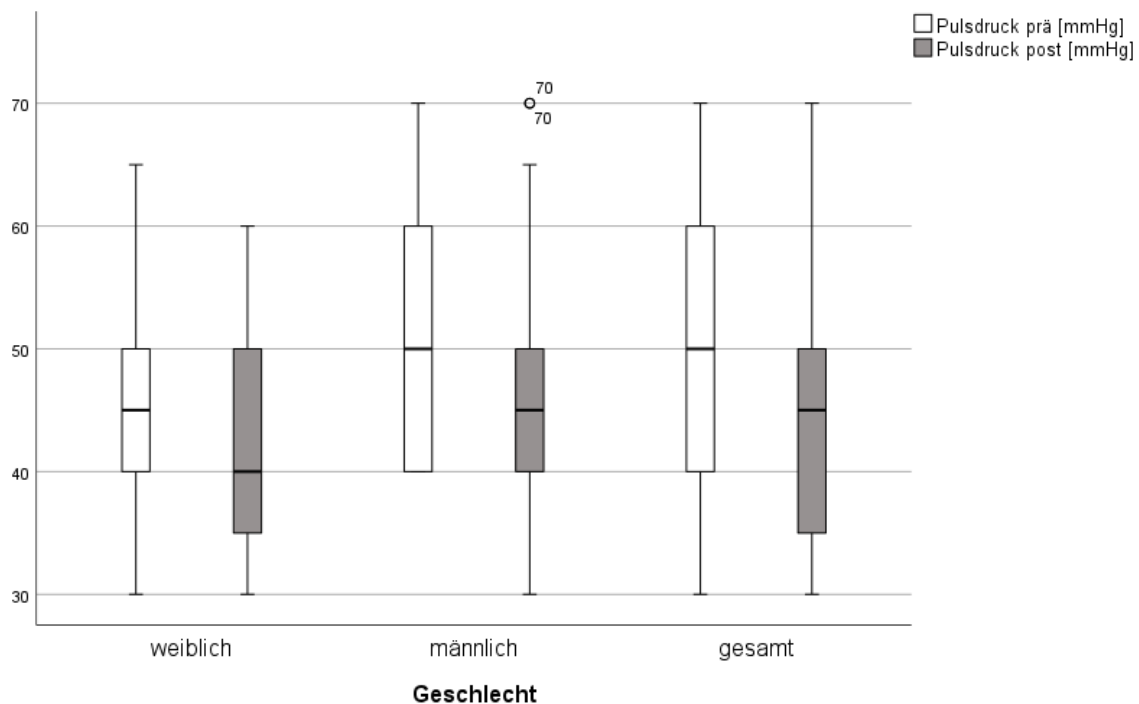


Abbildung 29: Boxplots: Pulsdruck [mmHg] vor und nach Blutspende

4.5 Korrelation und Regression

4.5.1 PBR versus RBC-filling

PBR₅₋₂₅ und RBC-Füllungsprozentsatz zeigten sowohl zu Beginn ($r_{\text{prä}} = -0,665$ und $r_{\text{prä}} = -0,782$, mit jeweils $p = <0,001$) als auch nach absolvierter Blutspende unabhängig vom Geschlecht eine signifikante, stark negative Korrelation ($r_{\text{post}} = -0,738$ und $r_{\text{post}} = -0,618$, mit jeweils $p = <0,001$) an. Je niedriger die PBR, desto höher ist die prozentuale Füllung mit Erythrozyten. Diese negative Korrelation konnte ebenfalls bei der Veränderung der Werte ΔPBR_{5-25} ($\text{PBR}_{5-25\text{post}} - \text{PBR}_{5-25\text{prä}}$) und $\Delta\text{RBC-filling}$ ($\text{RBC-filling}_{\text{post}} - \text{RBC-filling}_{\text{prä}}$) festgestellt werden. Mit Abnahme der PBR, also der Zunahme des ESL, steigt der Füllungsprozentsatz der Erythrozyten. Eine lineare Regressionsanalyse konnte diesen Zusammenhang ebenfalls bestätigen (R^2 siehe Abb.30-32 mit $p = <0,001$ für beide Geschlechter).

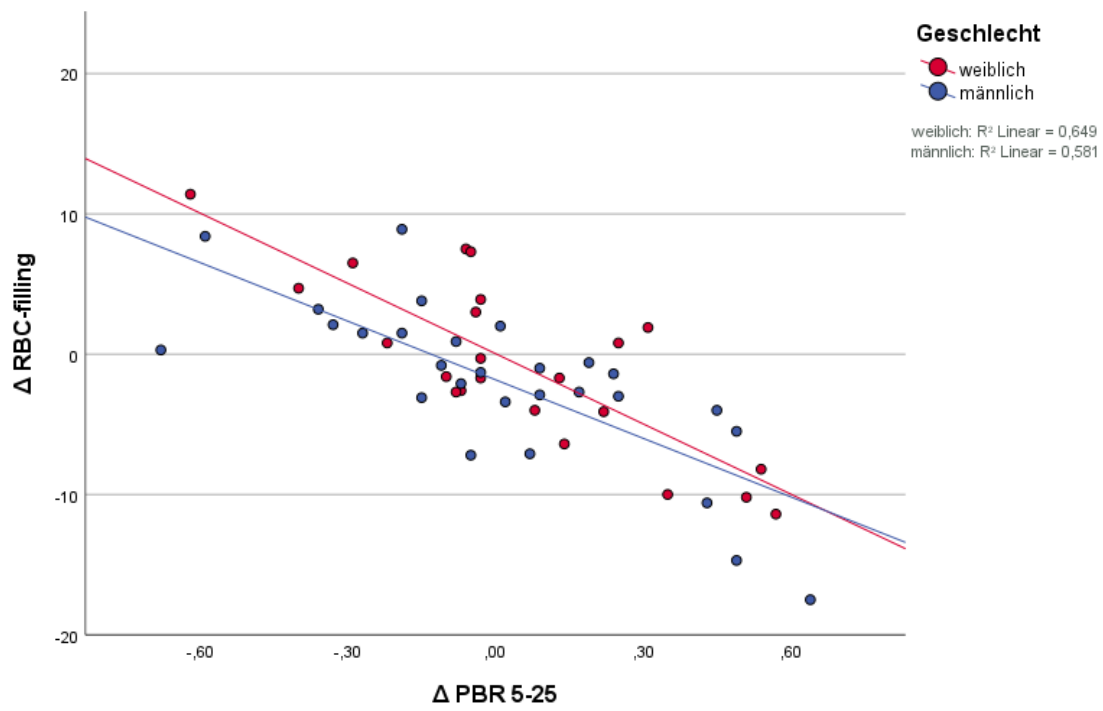


Abbildung 30: Streudiagramm Δ PBR5-25 [μ m] vs. Δ RBC-filling [%]

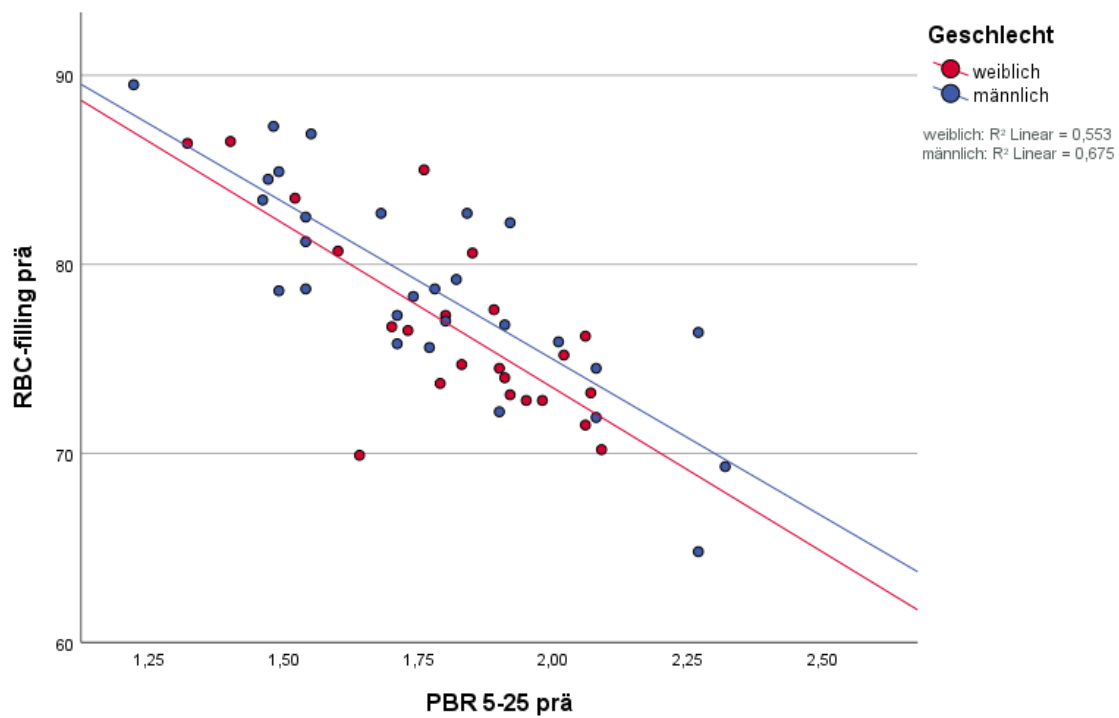


Abbildung 31: Streudiagramm PBR5-25 [μ m] vs. RBC-filling [%] vor Blutspende

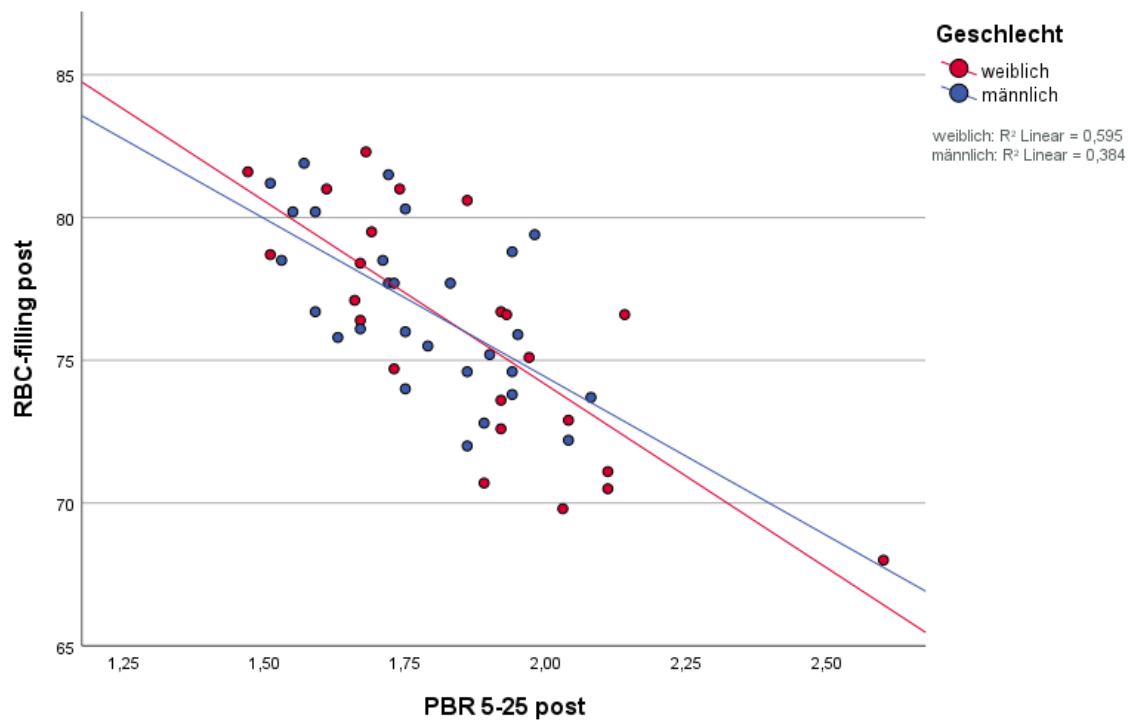


Abbildung 32: Streudiagramm PBR5-25 [μm] vs. RBC-filling [%] nach Blutspende

5 Diskussion

5.1 Studienpopulation und deren Merkmale

In der vorliegenden Arbeit wurde die Auswirkung einer Vollblutspende von 500ml Blut auf den ESL mit besonderem Augenmerk auf Unterschiede zwischen Frauen und Männern untersucht. Das Probanden-Kollektiv zeigte ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen den Geschlechtern. Der überwiegende Teil der Frauen und Männer (>85%) hatten keine Vorerkrankungen, waren Nichtraucher und zeigten eine sehr regelmäßige Blutspende-Bereitschaft. Die Frauen waren mit 78% meist normgewichtig, wohingegen die Männer mit 68% vorwiegend einen präadipösen Habitus mitbrachten.

Der definierte Blutvolumenverlust von 500ml im Rahmen der Blutspende führte bei den Frauen mit 12,3 [11,7-12,6] % im Vergleich zu den Männern mit 8,9 [8,4-9,3] % zu einem deutlich höheren relativen Blutverlust.

5.2 Sidestraem Darkfield Imaging

Die SDF-Messungen vor Blutspende ergaben sowohl bei den Frauen ($1,82 \pm 0,21 \mu\text{m}$) als auch bei den Männern ($1,76 \pm 0,28$) Dimensionen der $\text{PBR}_{5-25\mu\text{m}}$, welche mit Daten von gesunden Probanden aus vorherigen Studien übereinstimmen [28, 30, 95]. Ebenfalls zeigte sich, dass sowohl vor als auch nach Blutspende eine negative Korrelation zwischen der $\text{PBR}_{5-25\mu\text{m}}$ und dem Erythrozyten-Füllungsprozentsatzes bestand. Diese negative Korrelation einer erhöhten RBC-Filling bei verminderter PBR entsprechen ebenfalls Ergebnissen aus vorherigen Studien [52]. Es ist zu vermuten, dass im Endothel mit einer erhöhten ESL optimale Bedingungen für eine effektive Perfusion auch während eines akuten Blutverlustes erzielt werden.

In dieser Studie konnte bei beiden Geschlechtern keine signifikante Verminderung des ESL nach Blutspende im Sinne einer erhöhten $\text{PBR}_{5-25\mu\text{m}}$ festgestellt werden. Ebenfalls konnte keine deutliche Veränderung des Prozentsatzes der Erythrozytenfüllung beobachtet werden. Die Werte der PBR nach Gefäßgröße blieben bei den Männern stabil und zeigten keine signifikante Zu- oder Abnahme nach Blutspende. Bei den Frauen blieben die $\text{PBR}_{5-9\mu\text{m}}$ und $\text{PBR}_{10-19\mu\text{m}}$ stabil, wohingegen es bei der $\text{PBR}_{20-25\mu\text{m}}$ zu einem manifesten Anstieg ($p = 0,049$) nach Blutspende kam, was einem verminderten ESL entspricht. Die Gefäße mit einer PBR zwischen 20-25 μm entsprechen dabei am ehesten den postkapillären Venolen. Bei einer Studie an Ratten aus dem Jahr 2012 konnte bei in-vivo Messungen gezeigt werden, dass eine hämorrhagische Hypotonie bei einem Blutverlust von 40% des Gesamtblutvolumens eine signifikante Reduktion der Glykokalyxdicke in postkapillären Venolen zur Folge hatte. In diesem Experiment wurden jedoch keine löslichen Sheddingparameter gemessen, sodass eine Identifizierung der abgebauten Komponenten (adsorbierte Plasmaproteine, lösliche Glykosaminoglykane oder membrangebundenen Elementen) nicht möglich war. [87] Die

postkapillären Venolen sind ein Ort, an dem eine hohe Permeabilität und somit ein hoher Stoffaustausch stattfindet. Es ist zu vermuten, dass es bei den Frauen, aufgrund des im Verhältnis zum Mann größeren Blutverlustes, zu einer höheren Rekrutierung von Plasmavolumen gekommen ist, was die Reduktion des ESL, ohne Erhöhung der löslichen Sheddingparameter, in den postkapillären Venolen erklären könnte.

5.3 Ergebnisse der Blutuntersuchungen und der Vitalparameter

Die Blutbildparameter Hämoglobin, Hämatokrit und Leukozyten zeigten bei beiden Geschlechtern den zu erwartenden signifikanten Abfall, was auf einen Verdünnungseffekt (Hämodilution) bei kompensierender Flüssigkeitsverschiebung hindeutet. Die Thrombozyten hingegen blieben bei den Männern stabil und stiegen bei den Frauen nicht signifikant ($p=0,052$) an. Ein Ausbleiben des Verdünnungseffektes in Bezug auf die Thrombozyten ist am ehesten als Resultat einer reaktiven Thrombozytose zu erklären, welcher im Rahmen von Stresssituationen, wie einer akuten Blutung auftreten kann [5, 73, 76]. Der deutlichere Anstieg der Thrombozyten bei den Frauen könnte ebenfalls mit dem im Verhältnis zum Körpergewicht größeren Blutverlust bei den Frauen und damit verbundenem höheren Stress für den Körper erklärt werden. Diese Vermutung würde weiterhin die signifikante Pulserhöhung und den Abfall des Blutdruckes nach Blutspende bei den weiblichen Probandinnen im Vergleich zu den Männern erklären.

Bei den Shedding-Parametern zeigte sich ein gemischtes Bild. Bei den Frauen kam es zu einem signifikanten ($p= 0,003$) Abfall des Heparansulfates nach Blutspende. Hyaluronan fiel bei beiden Geschlechtern ab, wobei nur bei den Männern ein signifikanter Effekt ($p= 0,009$) beobachtet wurde. Syndecan-1 hingegen blieb bei beiden Geschlechtern konstant. Das lässt vermuten, dass es bei einem kontrollierten Blutverlust von 500ml zu keinem relevanten Abbau der endothelialen Glykokalyx kommt. Die reduzierten Werte des Heparansulfates und Hyaluronans könnten ebenfalls über den Effekt der Hämodilution und/oder über eine erhöhte Rekrutierung in den ESL erklärt werden.

5.4 Limitationen

Der ESL unterliegt einer ständigen Dynamik und ist so in der Lage sich an veränderte physiologische und pathophysiologische Prozesse anzupassen. Die Untersuchungsergebnisse unserer Messungen deuten darauf hin, dass ein Blutverlust im Rahmen von 500ml die Integrität der Glykokalyx nicht beeinträchtigt. Allerdings ist zu beachten, dass wir unsere intravitalmikroskopischen Messungen und Blutentnahmen direkt vor und vor allem direkt im Anschluss an die Blutspende durchführten, welche im Schnitt 6 Minuten und 40 Sekunden [5:29 - 8:15 min:sek] bei den Frauen und 4 Minuten und 52 Sekunden [4:34 - 5:53 min:sek] bei den Männern dauerte. Es bleibt offen, ob es bei weiteren Messungen zu einem späteren Zeitpunkt zu anderen Messergebnissen mit eventuell

verzögerten Anpassungs-Reaktionen oder auch Schädigungen am ESL mit seiner Glykokalyx gekommen wäre.

In den letzten Jahren haben sich mehrere Studien mit dem Einfluss von Geschlechtshormonen auf die endotheliale Glykokalyx beschäftigt. [68] Diebel und Kollegen zeigten in ihrer Untersuchung an Endothelzellen menschlicher Nabelschnurvenen 2021, dass eine frühzeitige Behandlung mit Östrogen eine traumatische Endotheliopathie (Trauma mit Blutungsschock) abmildern kann. Für die Vergleichsgruppe mit Testosteron konnte diese protektive Eigenschaft nicht dargestellt werden. [24] Auch in der 2017 veröffentlichten CYCLOCALYX-Studie gab es Hinweise auf einen sexualhormonabhängigen Regulationsmechanismus der endothelialen Glykokalyx. Die Plasmaspiegel von Östrogen und Progesteron schwanken je nach Ovulations- bzw. Uteruszyklus. Östrogen schien eine protektive, Gestagen hingegen eine destruktive Wirkung zu haben. [37] In der von uns durchgeführten Studie wurde der Status des weiblichen Zyklus nicht dokumentiert, sodass nicht nachweisbar ist, welches Hormon zum Messzeitpunkt dominierte. Zudem wurde die Art des Kontrazeptivums nicht erhoben.

Auch bleibt zu bedenken, dass wir die Messungen an jungen und gesunden Probanden durchführten. Bei Menschen höheren Alters oder bei Menschen mit den verschiedensten Vorerkrankungen wie arterieller Hypertonie, Diabetes mellitus, Dyslipidämie u.v.m. könnte die Reaktionsfähigkeit des Endothels auf einen Blutverlust völlig anders ausfallen.

Ob und inwieweit die Messungen am sublingualen Gefäßbett repräsentativ für andere Gefäßabschnitte sind, ist ebenfalls fraglich. Hierzu wird weitere Forschungsarbeit notwendig sein.

5.5 Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass ein atraumatischer, moderater Vollblutverlust von 500ml, wie er im Rahmen einer Blutspende auftritt, bei beiden Geschlechtern zunächst keine signifikante direkte Schädigung der Glykokalyx mit Freisetzung derer Bestandteile (Shedding) zur Folge hatte. Der ESL scheint sich demnach dynamisch an akute Stresssituationen, wie einer moderaten, atraumatischen Hämorrhagie, anpassen zu können. Die zuvor aufgestellte Hypothese, dass es durch Rekrutierung von ESL-assoziiertem Plasmavolumen zu einer erhöhten PBR und somit schließlich zu einem reduzierten ESL kommen müsse, konnte nur für das Frauenkollektiv belegt werden. Hier zeigte sich eine Reduktion des ESL in den postkapillären Venolen. Zudem kam es zu einer ausgeprägteren sympathoadrenergen Reaktion, sowie zu einer reaktiven Thrombozytose als Zeichen einer akuten Stresssituation. Dies ist vermutlich dem relativen höheren Blutvolumenverlust der Frauen während der Blutspende zuzuschreiben.

Weitere Hämorrhagie-Versuche am Modell mit zunehmendem Blutverlust und daraus resultierendem Schockgeschehen werden nötig sein, um den Schwellenwert zu definieren, welcher über die kompensatorische Volumenverschiebung des ESL hinaus zu einer

Aktivierung inflammatorischer Sheddasen und damit verbundenem Glykokalyx-Abbau mit deren Konsequenzen (kapilläres Leck, Inflammation, Gerinnungsstörungen, etc.) führt. Hierbei wäre von besonderem Interesse, ob frühzeitig eingeleitete therapeutische Maßnahmen mit stabilisierender Wirkung auf die GCX eine Endotheliopathie mit ihren schwerwiegenden Folgen minimieren oder sogar verhindern könnten.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Adams, H. A. Prof. Dr. med., Baumann, G., Cascorbi, I., Ebener, C., Emmel, M., Geiger, S., Janssens, U., Klima, U., and Klippe, H. 2005. Hypovolämischer Schock. Zur Diagnostik und Therapie der Schockformen Empfehlungen der Interdisziplinären Arbeitsgruppe Schock der DIVI – Teil II*. *Anästh Intensivmed*, 46, 111–124.
- [2] Anneck, T., Fischer, J., Hartmann, H., Tschoep, J., Rehm, M., Conzen, P., Sommerhoff, C. P., and Becker, B. F. 2011. Shedding of the coronary endothelial glycocalyx: effects of hypoxia/reoxygenation vs ischaemia/reperfusion. *British journal of anaesthesia* 107, 5, 679–686.
- [3] AR, P., TW, S., H, J., M, S., K, O., and P, G. 1997 11. Microvascular blood flow resistance: role of endothelial surface layer. *The American journal of physiology* 273, 5 (1997 11), H2272-9.
- [4] Aydin, S. 2015. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides* 72, 4–15.
- [5] 2012. *Basislehrbuch Innere Medizin. Kompakt-greifbar-verständlich*. Urban & Fischer, München.
- [6] Becker, B. F., Chappell, D., Bruegger, D., Anneck, T., and Jacob, M. 2010. Therapeutic strategies targeting the endothelial glycocalyx: acute deficits, but great potential. *Cardiovascular research* 87, 2, 300–310.
- [7] Behrends, J. C., Bischofberger, J., Deutzmann, R., Ehmke, H., Frings, S., Grissmer, S., Hoth, M., Kurtz, A., Leipziger, J., Müller, F., Pedain, C., Rettig, J., Wagner, C., and Wischmeyer, E. 2010. *Duale Reihe Physiologie*. Thieme.
- [8] Berthold Technologies GmbH & Co.KG. 2021. *Das ELISA-Grundprinzip - Berthold Technologies GmbH & Co.KG*. <https://www.berthold.com/de/bioanalytik/anwendungen/elisa/grundprinzip/>. Accessed 7 April 2023.
- [9] Berthold Technologies GmbH & Co.KG. 2021. *ELISA Formate - Berthold Technologies GmbH & Co.KG*. <https://www.berthold.com/de/bioanalytik/anwendungen/elisa/formate/>. Accessed 5 April 2023.
- [10] Björn Walther. *Statistik am PC*.
- [11] Björn Walther. 2023. *Startseite - Björn Walther*. <https://bjoernwalther.com/>. Accessed 16 October 2023.
- [12] Bruegger, D., Jacob, M., Rehm, M., Loetsch, M., Welsch, U., Conzen, P., and Becker, B. F. 2005. Atrial natriuretic peptide induces shedding of endothelial glycocalyx in coronary vascular bed of guinea pig hearts. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 289, 5, H1993-9.

- [13] Chappell, D., Bruegger, D., Potzel, J., Jacob, M., Brettner, F., Vogeser, M., Conzen, P., Becker, B. F., and Rehm, M. 2014. Hypervolemia increases release of atrial natriuretic peptide and shedding of the endothelial glycocalyx. *Critical Care* 18, 5, 538.
- [14] Chappell, D., Hofmann-Kiefer, K., Jacob, M., Rehm, M., Briegel, J., Welsch, U., Conzen, P., and Becker, B. F. 2009. TNF-alpha induced shedding of the endothelial glycocalyx is prevented by hydrocortisone and antithrombin. *Basic research in cardiology* 104, 1, 78–89.
- [15] Chappell, D., Jacob, M., Becker, B. F., Hofmann-Kiefer, K., Conzen, P., and Rehm, M. 2008. Expedition Glykokalyx. Ein neu entdecktes "Great Barrier Reef.". *Der Anaesthesist* 57, 10, 959–969.
- [16] Chappell, D., Jacob, M., Hofmann-Kiefer, K., Bruegger, D., Rehm, M., Conzen, P., Welsch, U., and Becker, B. F. 2007. Hydrocortisone preserves the vascular barrier by protecting the endothelial glycocalyx. *Anesthesiology* 107, 5, 776–784.
- [17] Chappell, D., Jacob, M., Hofmann-Kiefer, K., Rehm, M., Welsch, U., Conzen, P., and Becker, B. F. 2009. Antithrombin reduces shedding of the endothelial glycocalyx following ischaemia/reperfusion. *Cardiovascular research* 83, 2, 388–396.
- [18] Constantinescu, A. A., Vink, H., and Spaan, J. A. E. 2003. Endothelial cell glycocalyx modulates immobilization of leukocytes at the endothelial surface. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 23, 9, 1541–1547.
- [19] Cooper, E. S. and Silverstein, D. C. 2021. Fluid Therapy and the Microcirculation in Health and Critical Illness. *Frontiers in veterinary science* 8, 625708.
- [20] Dane, M. J. C., Khairoun, M., Lee, D. H., van den Berg, B. M., Eskens, B. J. M., Boels, M. G. S., van Teeffelen, J. W. G. E., Rops, A. L. W. M. M., van der Vlag, J., van Zonneveld, A. J., Reinders, M. E. J., Vink, H., and Rabelink, T. J. 2014. Association of kidney function with changes in the endothelial surface layer. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 9, 4, 698–704.
- [21] Danielli, J. F. 1940. Capillary permeability and oedema in the perfused frog. *The Journal of physiology* 98, 1, 109–129.
- [22] Dekker, N. A. M., Veerhoek, D., Koning, N. J., van Leeuwen, A. L. I., Elbers, P. W. G., van den Brom, C. E., Vonk, A. B. A., and Boer, C. 2019. Postoperative microcirculatory perfusion and endothelial glycocalyx shedding following cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. *Anaesthesia* 74, 5, 609–618.
- [23] Diebel, L. N., Liberati, D. M., and Carge, M. 2023. Effect of albumin solutions on endothelial oxidant injury: A microfluidic study. *Surgery* 173, 3, 876–882.
- [24] Diebel, L. N., Wheaton, M., and Liberati, D. M. 2021. The protective role of estrogen on endothelial and glycocalyx barriers after shock conditions: A microfluidic study. *Surgery* 169, 3, 678–685.

- [25] Douin, D. J. and Fernandez-Bustamante, A. 2023. Early Fibrinogen Replacement to Treat the Endotheliopathy of Trauma: Novel Resuscitation Strategies in Severe Trauma. *Anesthesiology* 139, 5, 675–683.
- [26] Egbrink, M. G. O., van Gestel, M. A., Broeders, M. A. W., Tangelder, G. J., Heemskerk, J. M. W., Reneman, R. S., and Slaaf, D. W. 2005. Regulation of microvascular thromboembolism in vivo. *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)* 12, 3, 287–300.
- [27] Florian, J. A., Kosky, J. R., Ainslie, K., Pang, Z., Dull, R. O., and Tarbell, J. M. 2003. Heparan sulfate proteoglycan is a mechanosensor on endothelial cells. *Circulation research* 93, 10, e136-42.
- [28] Fuchs, A., Dederichs, J., Arjune, S., Todorova, P., Wöstmann, F., Antczak, P., Illerhaus, A., Gathof, B., Grundmann, F., Müller, R.-U., and Annecke, T. 2023. Microvascular perfusion, perfused boundary region and glycocalyx shedding in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease: results from the GlycoScore III study. *Clinical kidney journal* 16, 2, 384–393.
- [29] Fuchs, A., Groß, S., Neumann, T., Illerhaus, A., Vink, H., Klasen, G., Gathof, B., and Annecke, T. 2021. Immediate effects of whole blood donation on the endothelial surface layer and glycocalyx shedding. *Blood transfusion = Trasfusione del sangue* 19, 3, 190–196.
- [30] Fuchs, A., Neumann, T., Drinhaus, H., Herrmann, A., Vink, H., and Annecke, T. 2022. Effects of a single aerobic exercise on perfused boundary region and microvascular perfusion: a field study. *Journal of clinical monitoring and computing* 36, 2, 371–377.
- [31] Gan, S. D. and Patel, K. R. 2013. Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Investigative Dermatology* 133, 9, e12.
- [32] Goedhart, P. T., Khalilzada, M., Bezemer, R., Merza, J., and Ince, C. 2007. Sidestream Dark Field (SDF) imaging: a novel stroboscopic LED ring-based imaging modality for clinical assessment of the microcirculation. *Optics express* 15, 23, 15101–15114.
- [33] Haywood-Watson, R. J., Holcomb, J. B., Gonzalez, E. A., Peng, Z., Pati, S., Park, P. W., Wang, W., Zaske, A. M., Menge, T., and Kozar, R. A. 2011. Modulation of syndecan-1 shedding after hemorrhagic shock and resuscitation. *PloS one* 6, 8, e23530.
- [34] Henry, C. B. and Duling, B. R. 2000. TNF-alpha increases entry of macromolecules into luminal endothelial cell glycocalyx. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 279, 6, H2815-23.
- [35] Hornbeck, P. V. 2015. Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. *Current protocols in immunology* 110, 2.1.1-2.1.23.

- [36] Hubble, S. M. A., Kyte, H. L., Gooding, K., and Shore, A. C. 2009. Variability in sublingual microvessel density and flow measurements in healthy volunteers. *Microcirculation* 16, 2, 183–191.
- [37] Hulde, N., Rogenhofer, N., Brettner, F., Eckert, N. C., Götzfried, I., Nguyen, T., Pagel, J.-I., Kammerer, T., Hofmann-Kiefer, K. F., Schelling, G., Dendorfer, A., Rehm, M., and Thaler, C. J. 2018. The CYCLOCALYX study: Ovulatory cycle affects circulating compartments of the endothelial glycocalyx in blood. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* 79, 1.
- [38] Iba, T. and Levy, J. H. 2019. Derangement of the endothelial glycocalyx in sepsis. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 17, 2, 283–294.
- [39] Ihrcke, N. S., Wrenshall, L. E., Lindman, B. J., and Platt, J. L. 1993. Role of heparan sulfate in immune system-blood vessel interactions. *Immunology today* 14, 10, 500–505.
- [40] Ince, C. 2005. Sidestream dark field imaging: an improved technique to observe sublingual microcirculation. *Critical Care* 9, Suppl 1, P72.
- [41] Ince, C. 2005. The microcirculation is the motor of sepsis. *Critical care (London, England)* 9 Suppl 4, S13-9.
- [42] Jacob, M., Bruegger, D., Rehm, M., Welsch, U., Conzen, P., and Becker, B. F. 2006. Contrasting effects of colloid and crystalloid resuscitation fluids on cardiac vascular permeability. *Anesthesiology* 104, 6, 1223–1231.
- [43] Johansson, P. I., Stensballe, J., Rasmussen, L. S., and Ostrowski, S. R. 2011. 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* 254, 2, 194–200.
- [44] Kainulainen, V., Nelimarkka, L., Järveläinen, H., Laato, M., Jalkanen, M., and Elenius, K. 1996. Suppression of syndecan-1 expression in endothelial cells by tumor necrosis factor-alpha. *The Journal of biological chemistry* 271, 31, 18759–18766.
- [45] Khairoun, M., van den Heuvel, M., van den Berg, B. M., Sorop, O., Boer, R. de, van Ditzhuijzen, N. S., Bajema, I. M., Baelde, H. J., Zandbergen, M., Duncker, D. J., Rabelink, T. J., Reinders, M. E. J., van der Giessen, W. J., and Rotmans, J. I. 2015. Early systemic microvascular damage in pigs with atherogenic diabetes mellitus coincides with renal angiotensin dysbalance. *PloS one* 10, 4, e0121555.
- [46] KK Research Technology Ltd, Honiton, Devon. 2010. *CapiScope HVCS Handheld Video Capillaroscopy System.jpg (3016x2048)*. <http://www.kktechnology.com/hvcs.jpg>. Accessed 10 January 2023.
- [47] Klinke, R., Pape, H.-C., and Silbernagl, S. 2005. *Physiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

- [48] Koenen, R. R., Pruessmeyer, J., Soehnlein, O., Fraemohs, L., Zerneck, A., Schwarz, N., Reiss, K., Sarabi, A., Lindbom, L., Hackeng, T. M., Weber, C., and Ludwig, A. 2009. Regulated release and functional modulation of junctional adhesion molecule A by disintegrin metalloproteinases. *Blood* 113, 19, 4799–4809.
- [49] Kozar, R. A., Peng, Z., Zhang, R., Holcomb, J. B., Pati, S., Park, P., Ko, T. C., and Paredes, A. 2011. Plasma restoration of endothelial glycocalyx in a rodent model of hemorrhagic shock. *Anesthesia and analgesia* 112, 6, 1289–1295.
- [50] Kron, J., Mentzel, I., and Kron, S. 2020. Blutvolumenmonitoring bei Hämodialysepatienten. *Dialyse aktuell* 24, 01, 22–26.
- [51] Laurent, T. C. and Fraser, J. R. 1992. Hyaluronan. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 6, 7, 2397–2404.
- [52] Lee, D. H., Dane, M. J. C., van den Berg, B. M., Boels, M. G. S., van Teeffelen, J. W., Mutsert, R. de, den Heijer, M., Rosendaal, F. R., van der Vlag, J., van Zonneveld, A. J., Vink, H., and Rabelink, T. J. 2014. Deeper penetration of erythrocytes into the endothelial glycocalyx is associated with impaired microvascular perfusion. *PLoS one* 9, 5, e96477.
- [53] Lequin, R. M. 2005. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clinical chemistry* 51, 12, 2415–2418.
- [54] Levick, J. R. and Michel, C. C. 2010. Microvascular fluid exchange and the revised Starling principle. *Cardiovascular research* 87, 2, 198–210.
- [55] Lier, H., Bernhard, M., and Hossfeld, B. 2018. Hypovolämisch-hämorrhagischer Schock. *Der Anaesthetist* 67, 3, 225–244.
- [56] Ludwig, A. Prof. Dr. and Weber, C. Prof. Dr. 2023. *Shedding proinflammatorischer Mediatoren durch die Metalloproteinasen ADAM10 und ADAM17 bei der entzündlichen Leukozytenrekrutierung*. <https://gepris.dfg.de/gepris/projekt/57402829?displayMode=print&selectedSubTab=2>. Accessed 26 September 2023.
- [57] Luft, J. H. 1966. Fine structures of capillary and endocapillary layer as revealed by ruthenium red. *Federation proceedings* 25, 6, 1773–1783.
- [58] Marcus, A., Broekman, M., Drosopoulos, J., Pinsky, D., Islam, N., Gayle, R., and Maliszewski, C. 2001. Thromboregulation by endothelial cells: significance for occlusive vascular diseases. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 21, 2, 178–182.
- [59] Michel, C. C., Woodcock, T. E., and Curry, F.-R. E. 2020. Understanding and extending the Starling principle. *Acta anaesthesiologica Scandinavica* 64, 8, 1032–1037.

- [60] Molecular Devices. 2023. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*. <https://de.moleculardevices.com/applications/enzyme-linked-immunosorbent-assay-elisa>. Accessed 7 April 2023.
- [61] Molecular Devices, L. L. 2023. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*. <https://de.moleculardevices.com/applications/enzyme-linked-immunosorbent-assay-elisa>. Accessed 14 April 2023.
- [62] Mortimer, P. S. and Levick, J. R. 2004. Chronic peripheral oedema: the critical role of the lymphatic system. *Clinical medicine (London, England)* 4, 5, 448–453.
- [63] Nadler, S. B., Hidalgo, J. H., and Bloch, T. 1962. Prediction of blood volume in normal human adults. *Surgery* 51, 2, 224–232.
- [64] Naik, U. P. and Eckfeld, K. 2003. Junctional adhesion molecule 1 (JAM-1). *Journal of biological regulators and homeostatic agents* 17, 4, 341–347.
- [65] Nandi, A., Estess, P., and Siegelman, M. H. 2000. Hyaluronan anchoring and regulation on the surface of vascular endothelial cells is mediated through the functionally active form of CD44. *The Journal of biological chemistry* 275, 20, 14939–14948.
- [66] Nasir Alfaraj. 2017. *A review of charge-coupled device image sensors*. DOI=10.13140/RG.2.2.10971.77608.
- [67] Paparella, D., Yau, T. M., and Young, E. 2002. Cardiopulmonary bypass induced inflammation: pathophysiology and treatment. An update. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery* 21, 2, 232–244.
- [68] Potje, S. R., Martins, N. S., Benatti, M. N., Rodrigues, D., Bonato, V. L. D., and Tostes, R. C. 2023. The effects of female sexual hormones on the endothelial glycocalyx. *Current topics in membranes* 91, 89–137.
- [69] Pries, A. R., Secomb, T. W., and Gaehtgens, P. 2000. The endothelial surface layer. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 440, 5, 653–666.
- [70] Rehm, M., Bruegger, D., Christ, F., Conzen, P., Thiel, M., Jacob, M., Chappell, D., Stoeckelhuber, M., Welsch, U., Reichart, B., Peter, K., and Becker, B. F. 2007. Shedding of the endothelial glycocalyx in patients undergoing major vascular surgery with global and regional ischemia. *Circulation* 116, 17, 1896–1906.
- [71] Rehm, M., Zahler, S., Lötsch, M., Welsch, U., Conzen, P., Jacob, M., and Becker, B. F. 2004. Endothelial glycocalyx as an additional barrier determining extravasation of 6% hydroxyethyl starch or 5% albumin solutions in the coronary vascular bed. *Anesthesiology* 100, 5, 1211–1223.

- [72] Reitsma, S., Slaaf, D. W., Vink, H., van Zandvoort, M. A. M. J., and oude Egbrink, M. G. A. 2007. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 454, 3, 345–359.
- [73] Rokkam, V. R. and Kotagiri, R. 2023. *StatPearls. Secondary Thrombocytosis*, Treasure Island (FL).
- [74] Rovas, A., Lukasz, A.-H., Vink, H., Urban, M., Sackarnd, J., Pavenstädt, H., and Kümpers, P. 2018. Bedside analysis of the sublingual microvascular glycocalyx in the emergency room and intensive care unit - the GlycoNurse study. *Scandinavian journal of trauma, resuscitation and emergency medicine* 26, 1, 16.
- [75] Sawashita, Y., Kazuma, S., Tokinaga, Y., Kikuchi, K., Hirata, N., Masuda, Y., and Yamakage, M. 2023. Albumin protects the ultrastructure of the endothelial glycocalyx of coronary arteries in myocardial ischemia-reperfusion injury in vivo. *Biochemical and biophysical research communications* 666, 29–35.
- [76] Schafer, A. I. 2004. Thrombocytosis. *The New England journal of medicine* 350, 12, 1211–1219.
- [77] Schmidt, R. F., Ed. 2007. *Physiologie des Menschen. Mit Pathophysiologie*. Springer-Lehrbuch. Springer-Medizin-Verl., Heidelberg.
- [78] Schouten, M., Wiersinga, W. J., Levi, M., and van der Poll, T. 2008. Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. *Journal of leukocyte biology* 83, 3, 536–545.
- [79] Scott, J. E., Cummings, C., Brass, A., and Chen, Y. 1991. Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution, investigated by rotary shadowing-electron microscopy and computer simulation. Hyaluronan is a very efficient network-forming polymer. *The Biochemical journal* 274 (Pt 3), Pt 3, 699–705.
- [80] Secomb, T. W., Hsu, R., and Pries, A. R. 2002. Blood flow and red blood cell deformation in nonuniform capillaries: effects of the endothelial surface layer. *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)* 9, 3, 189–196.
- [81] Selwyn, A. P. 2003. Prothrombotic and antithrombotic pathways in acute coronary syndromes. *The American journal of cardiology* 91, 12A, 3H-11H.
- [82] Shimada, K., Kobayashi, M., Kimura, S., Nishinaga, M., Takeuchi, K., and Ozawa, T. 1991. Anticoagulant heparin-like glycosaminoglycans on endothelial cell surface. *Japanese circulation journal* 55, 10, 1016–1021.
- [83] Slaaf, D. W., Tangelder, G. J., Reneman, R. S., Jäger, K., and Bollinger, A. 1987. A versatile incident illuminator for intravital microscopy. *International journal of microcirculation, clinical and experimental* 6, 4, 391–397.
- [84] Standl, T., Annecke, T., Cascorbi, I., Heller, A. R., Sabashnikov, A., and Teske, W. 2018. The Nomenclature, Definition and Distinction of Types of Shock. *Deutsches Arzteblatt international* 115, 45, 757–768.

- [85] Striebel, H. W., Ed. 2019. *Die Anästhesie. Grundlagen, Formen der Allgemeinanästhesie, Lokal- und Regionalanästhesie, Besonderheiten, Narkoseprobleme*. Thieme, Stuttgart.
- [86] Tarbell, J. M. and Pahakis, M. Y. 2006. Mechanotransduction and the glycocalyx. *Journal of internal medicine* 259, 4, 339–350.
- [87] Torres Filho, I., Torres, L. N., Sondeen, J. L., Polykratis, I. A., and Dubick, M. A. 2012. In vivo evaluation of venular glycocalyx during hemorrhagic shock in rats using intravital microscopy. *Microvascular research* 85, 128–133.
- [88] Ute Krause. 2023. *Pschyrembel Online | Blutdruckamplitude*. <https://www.pschyrembel.de/Blutdruckamplitude/K03WL>. Accessed 24 October 2023.
- [89] van den Berg, B. M., Vink, H., and Spaan, J. A. E. 2003. The endothelial glycocalyx protects against myocardial edema. *Circulation research* 92, 6, 592–594.
- [90] van Haaren, P. M. A., VanBavel, E., Vink, H., and Spaan, J. A. E. 2003. Localization of the permeability barrier to solutes in isolated arteries by confocal microscopy. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 285, 6, H2848-56.
- [91] van Teeffelen, J. Dr. and Vink, H. Prof. Dr. 2012. *Clinical assessment of vascular health with GlycoCheck™ Glycocalyx Measurement Software. A GlycoCheck™ Whitepaper*. <https://microvascular.com/wp-content/uploads/2020/02/Clinical-Assessment-of-Vascular-Health.pdf>.
- [92] Vaupel, P., Schaible, H.-G., and Mutschler, E. 2015. *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*. Wiss. Verlagsges, Stuttgart.
- [93] Vink, H. and Duling, B. R. 1996. Identification of distinct luminal domains for macromolecules, erythrocytes, and leukocytes within mammalian capillaries. *Circulation research* 79, 3, 581–589.
- [94] Vink, H. and Duling, B. R. 2000. Capillary endothelial surface layer selectively reduces plasma solute distribution volume. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 278, 1, H285-9.
- [95] Wadowski, P. P., Kautzky-Willer, A., Gremmel, T., Koppensteiner, R., Wolf, P., Ertl, S., Weikert, C., Schörghofer, C., and Jilma, B. 2020. Sublingual microvasculature in diabetic patients. *Microvascular research* 129, 103971.
- [96] Ward, B. J. and Donnelly, J. L. 1993. Hypoxia induced disruption of the cardiac endothelial glycocalyx: implications for capillary permeability. *Cardiovascular research* 27, 3, 384–389.
- [97] Weinbaum, S., Tarbell, J. M., and Damiano, E. R. 2007. The structure and function of the endothelial glycocalyx layer. *Annual review of biomedical engineering* 9, 121–167.
- [98] Worrall, N. K., Chang, K., LeJeune, W. S., Misko, T. P., Sullivan, P. M., Ferguson, T. B., and Williamson, J. R. 1997. TNF-alpha causes reversible in vivo systemic vascular

barrier dysfunction via NO-dependent and -independent mechanisms. *The American journal of physiology* 273, 6, H2565-74.

- [99] Zeng, Y., Adamson, R. H., Curry, F.-R. E., and Tarbell, J. M. 2014. Sphingosine-1-phosphate protects endothelial glycocalyx by inhibiting syndecan-1 shedding. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 306, 3, H363-72.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung exemplarischer Proteoglykane und Glykoproteine der Glykokalyx [69, 72, 97]	11
Abbildung 2: CapiScope HVCS Handheld Video Capillaroscopy System [46]	16
Abbildung 3: Intravitalmikroskopische Aufnahme einer sublingualen Mucosa mittels SDF-Kamera	17
Abbildung 4: Sidestream Dark Field (SDF) Imaging [32].....	18
Abbildung 5: Qualitätscheck der GlycoCheck™-Software [74].....	19
Abbildung 6: Perfused boundary region [91].....	20
Abbildung 7: Direkter ELISA [61]	22
Abbildung 8: Indirekter ELISA [61].....	23
Abbildung 9: Sandwich-ELISA [61].....	24
Abbildung 10: Kompetitiver ELISA [61].....	25
Abbildung 11: Boxplots: Altersausprägung nach Geschlecht.....	35
Abbildung 12: Boxplots: BMI-Ausprägung nach Geschlecht.....	35
Abbildung 13: Boxplots: Relativer Blutvolumenverlust in %	36
Abbildung 14: Populationspyramide zu den Vorerkrankungen.....	36
Abbildung 15: Populationspyramide zu der Medikamenteneinnahme	37
Abbildung 16: Boxplots: PBR ₅₋₂₅ [µm] vor und nach Blutspende.....	39
Abbildung 17: Boxplots: RBC-Filling [%] vor und nach Blutspende.....	41
Abbildung 18: Boxplots: Hämoglobin [g/dl] vor und nach Blutspende	43
Abbildung 19: Boxplots: Hämatokrit [%] vor und nach Blutspende.....	43
Abbildung 20: Boxplots: Thrombozyten [10 ⁹ /l] vor und nach Blutspende	44
Abbildung 21: Boxplots: Leukozyten [10 ⁹ /l] vor und nach Blutspende.....	44
Abbildung 22: Boxplots: Heparansulfat-Spiegel [ng/ml] vor und nach Blutspende	46
Abbildung 23: Boxplots: Hyaluronan-Spiegel [ng/ml] vor und nach Blutspende	46
Abbildung 24: Boxplots: Syndecan-1-Spiegel [ng/ml] vor und nach Blutspende	47
Abbildung 25: Boxplots: Puls [bpm] vor und nach Blutspende	50
Abbildung 26: Boxplots: Systolischer Blutdruck [mmHg] vor und nach Blutspende.....	50
Abbildung 27: Boxplots: Diastolischer Blutdruck [mmHg] vor und nach Blutspende.....	51
Abbildung 28: Boxplots: MAD [mmHg] vor und nach Blutspende.....	51
Abbildung 29: Boxplots: Pulsdruck [mmHg] vor und nach Blutspende	52
Abbildung 30: Streudiagramm ΔPBR ₅₋₂₅ [µm] vs. ΔRBC-filling [%]	53
Abbildung 31: Streudiagramm PBR ₅₋₂₅ [µm] vs. RBC-filling [%] vor Blutspende	53
Abbildung 32: Streudiagramm PBR ₅₋₂₅ [µm] vs. RBC-filling [%] nach Blutspende	54

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Studienpopulation mit Alter, BMI und Gewichtsklassen in der Gesamtpopulation, sowie im Geschlechtervergleich.	34
Tabelle 2: Raucherstatus nach Geschlecht	37
Tabelle 3: Blutspenderoutine nach Geschlecht.....	38
Tabelle 4: PBR _{5-25µm} vor und nach Blutspende.....	38
Tabelle 5: PBR nach Gefäßgröße vor und nach Blutspende	40
Tabelle 6: RBC-Filling vor und nach Blutspende.....	40
Tabelle 7: Parameter des Blutbildes vor und nach Blutspende	42
Tabelle 8: Sheddingparameter vor und nach Blutspende	45
Tabelle 9: Vitalparameter vor und nach Blutspende	49

8 Vorabveröffentlichung von Ergebnissen

Im Einvernehmen mit den beteiligten Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftlern wurden Teile dieser Arbeit bereits in einer begutachteten wissenschaftlichen Zeitschrift veröffentlicht:

Fuchs, A., Groß, S., Neumann, T., Illerhaus, A., Vink, H., Klasen, G., Gathof, B., and Annecke, T. 2021. Immediate effects of whole blood donation on the endothelial surface layer and glycocalyx shedding. *Blood transfusion = Trasfusione del sangue* 19, 3, 190–196.