

UNIVERZITA KARLOVA
Lékařská fakulta v Hradci Králové

DISERTAČNÍ PRÁCE

Doktorský studijní program
Chirurgie

**Alterace glykokalyx v kritických stavech a během velkých
operačních výkonů a možnosti jeho protekce**

**Alteration of Glycocalyx in Critical Illness and During Major
Surgery and Approaches for Glycocalyx Protection**

MUDr. David Astapenko

Školitel: prof. MUDr. Vladimír Černý, Ph.D.

Prohlášení autora

Prohlášení:

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy.

Hradec Králové, 2019

podpis autora

Poděkování:

Děkuji svému školiteli panu prof. MUDr. Vladimíru Černému, Ph.D. za dlouholeté vedení, konzultace a cenné rady nejen v odborném životě. Děkuji panu prof. MUDr. Zdeňku Zadákovi, CSc. za odborné konzultace a spolupráci na dalších výzkumných projektech. Děkuji všem dalším kolegům, MUDr. Romanu Škulcovi, Ph.D., MUDr. Radomíru Hyšplerovi, Ph.D., RNDr. Aleně Tiché, Ph.D., doc. MUDr. Janu Benešovi, Ph.D., MUDr. Jiřímu Pouskovi, prof. MUDr. Christianu Lehmannovi, Ph.D., doc. MUDr. Pavlu Dostálovi, Ph.D., MUDr. Vlastě Dostálové, Ph.D., MUDr. Daně Čížkové, Ph.D. a prof. MUDr. Jiřině Martínkové, CSc. Děkuji všem pacientům, jejich příbuzným a všem dobrovolníkům zúčastněným v klinických studiích projektu. Děkuji vedoucí vivária Fakulty vojenského zdravotnictví MVDr. Věře Radochové za spolupráci při realizaci experimentální části projektu.

Práce vznikla za podpory grantu AZV MZ ČR 15–31881A, všechna práva vyhrazena.

Hradec Králové, únor 2019

OBSAH

Seznam použitých zkratk	10
1. ÚVOD DO PROBLEMATIKY	13
1.1 Glykokalyx jako subcelulární struktura	13
1.2 Ultrastruktura a biochemie endoteliálního glykokalyx	15
1.2.1 Proteoglykany	16
1.2.2 Glykosaminoglykany	16
1.2.3 Glykoproteiny	17
1.3 Fyzikální vlastnosti endoteliálního glykokalyx	18
1.3.1 Hustota	18
1.3.2 Permeabilita – fyzikální pohled	18
1.3.3 Deformabilita	18
1.3.4 Výška vrstvy endoteliálního glykokalyx	19
1.4 Fyziologie endoteliálního glykokalyx	19
1.4.1 Funkce ochranná	20
1.4.2 Mechanotransdukce	20
1.4.3 Teorie intravaskulárního kompartmentu	21
1.4.4 Permeabilita – biologický pohled	21
1.4.5 Další funkce endoteliálního glykokalyx	21
1.4.6 Interakce krevních elementů s endoteliálním glykokalyx	22
1.4.7 Funkce jednotlivých komponent glykokalyx	23
1.5 Role endoteliálního glykokalyx v patofyziologii mikrocirkulace	24
1.6 Metody vizualizace a výzkumu endoteliálního glykokalyx	26
1.6.1 Metody přímého zobrazení	26
1.6.2 Metody nepřímého zobrazení a hodnocení stavu endoteliálního glykokalyx	30
2 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	36
2.1 Cíle	36
2.2 Pracovní hypotézy	37
3 METODY, MATERIÁL A SOUBOR NEMOCNÝCH	38
3.1 Experimentální studie	38

3.1.1	Změny výšky vrstvy endoteliálního glykokalyx během náhlé zástavy oběhu na experimentálním modelu srdeční zástavy u prasete domácího	38
3.1.1.1	Úvod a cíle studie	38
3.1.1.2	Metody, příprava zvířat, protokol experimentu a statistická analýza	38
3.1.2	Efekt akutně vzniklé hypernatrémie podáním hypertonického roztoku chloridu sodného na endoteliální glykokalyx u králíka	40
3.1.2.1	Úvod a cíle studie	40
3.1.2.2	Metody, příprava zvířat, protokol experimentu a statistická analýza	40
3.2	Klinické studie	42
3.2.1	Vliv tekutinové výzvy 500 ml fyziologického roztoku na endoteliální glykokalyx v sublingvální oblasti u zdravých dobrovolníků – pilotní studie	42
3.2.1.1	Úvod a cíle studie	42
3.2.1.2	Metody, kohorta pacientů a statistická analýza	43
3.2.2	Neuraxiální anestézie poškozuje endoteliální glykokalyx méně než celková anestézie u pacientů operovaných pro náhradu kyčelního nebo kolenního kloubu	44
3.2.2.1	Úvod a cíle studie	44
3.2.2.2	Metody, kohorty pacientů a statistická analýza	44
3.2.3	Analýza sublingválního mikrovaskulárního endoteliálního glykokalyx u pacientů v intenzivní péči – prospektivní observační studie	46
3.2.3.1	Úvod a cíle studie	46
3.2.3.2	Metody, kohorta pacientů a statistická analýza	46
3.2.4	Vliv podání tukové emulze v rámci parenterální výživy na integritu endoteliálního glykokalyx u pacientů po chirurgickém výkonu – mikroskopická a biochemická pilotní studie	48
3.2.4.1	Úvod a cíle studie	48
3.2.4.2	Metody, kohorta pacientů a statistická analýza	48
3.2.5	Vliv poruch metabolismu lipidů na endoteliální glykokalyx – pilotní observační studie	50
3.2.5.1	Úvod a cíle studie	50
3.2.5.2	Metody, kohorty pacientů a statistická analýza	50

3.2.6	Hodnocení stavu endoteliálního glykokalyx u zdravých dobrovolníků – observační studie	51
3.2.6.1	Úvod a cíle studie	51
3.2.6.2	Metody, kohorta pacientů a statistická analýza	51
3.3	Statistické zpracování	52
4	VÝSLEDKY	53
4.1	Experimentální studie	53
4.1.1	Změny výšky vrstvy endoteliálního glykokalyx během náhlé zástavy oběhu na experimentálním modelu srdeční zástavy u prasete domácího	53
4.1.2	Efekt akutně vzniklé hypernatrémie podáním hypertonického roztoku chloridu sodného na endoteliální glykokalyx u králíka	55
4.2	Klinické studie	61
4.2.1	Vliv tekutinové výzvy 500 ml fyziologického roztoku na endoteliální glykokalyx v sublingvální oblasti u zdravých dobrovolníků – pilotní studie	61
4.2.2	Neuraxiální anestézie poškozuje endoteliální glykokalyx méně než celková anestézie u pacientů operovaných pro náhradu kyčelního nebo kolenního kloubu	63
4.2.3	Analýza sublingválního mikrovaskulárního endoteliálního glykokalyx u pacientů v intenzivní péči – prospektivní observační studie	67
4.2.4	Vliv podání tukové emulze v rámci parenterální výživy na integritu endoteliálního glykokalyx u pacientů po chirurgickém výkonu – mikroskopická a biochemická pilotní studie	75
4.2.5	Vliv poruch metabolismu lipidů na endoteliální glykokalyx – pilotní observační studie	79
4.2.6	Hodnocení stavu endoteliálního glykokalyx u zdravých dobrovolníků – observační studie	84
5	DISKUZE	88
5.1	Metody hodnocení endoteliálního glykokalyx	88
5.2	Diskuze k experimentálním studiím	89

5.2.1	Změny výšky vrstvy endoteliálního glykokalyx během náhlé zástavy oběhu na experimentálním modelu srdeční zástavy u prasete domácího	89
5.2.2	Efekt akutně vzniklé hypernatrémie podáním hypertonického roztoku chloridu sodného na endoteliální glykokalyx u králíka	89
5.3	Diskuze ke klinickým studiím	91
5.3.1	Vliv tekutinové výzvy 500 ml fyziologického roztoku na endoteliální glykokalyx v sublingvální oblasti u zdravých dobrovolníků – pilotní studie	91
5.3.2	Neuraxiální anestézie poškozuje endoteliální glykokalyx méně než celková anestézie u pacientů operovaných pro náhradu kyčelního nebo kolenního kloubu	93
5.3.3	Analýza sublingválního mikrovaskulárního endoteliálního glykokalyx u pacientů v intenzivní péči – prospektivní observační studie	94
5.3.4	Vliv podání tukové emulze v rámci parenterální výživy na integritu endoteliálního glykokalyx u pacientů po chirurgickém výkonu – mikroskopická a biochemická pilotní studie	96
5.3.5	Vliv poruch metabolismu lipidů na endoteliální glykokalyx – pilotní observační studie	98
5.3.6	Hodnocení stavu endoteliálního glykokalyx u zdravých dobrovolníků – observační studie	99
5.4	Postupy a látky působící protektivně na endoteliální glykokalyx	100
5.5	Potenciální témata a směry dalšího výzkumu	102
6	ZÁVĚRY	104
6.1	Experimentální studie	104
6.1.1	Změny výšky vrstvy endoteliálního glykokalyx během náhlé zástavy oběhu na experimentálním modelu srdeční zástavy u prasete domácího	104
6.1.2	Efekt akutně vzniklé hypernatrémie podáním hypertonického roztoku chloridu sodného na endoteliální glykokalyx u králíka	104
6.2	Klinické studie	104
6.2.1	Vliv tekutinové výzvy 500 ml fyziologického roztoku na endoteliální glykokalyx v sublingvální oblasti u zdravých dobrovolníků – pilotní studie	104

6.2.2	Neuraxiální anestézie poškozuje endoteliální glykokalyx méně než celková anestézie u pacientů operovaných pro náhradu kyčelního nebo kolenního kloubu	105
6.2.3	Analýza sublingválního mikrovaskulárního endoteliálního glykokalyx u pacientů v intenzivní péči – prospektivní observační studie	105
6.2.4	Vliv podání tukové emulze v rámci parenterální výživy na integritu endoteliálního glykokalyx u pacientů po chirurgickém výkonu – mikroskopická a biochemická pilotní studie	105
6.2.5	Vliv poruch metabolismu lipidů na endoteliální glykokalyx – pilotní observační studie	106
6.2.6	Hodnocení stavu endoteliálního glykokalyx u zdravých dobrovolníků – observační studie	106
7	POUŽITÁ LITERATURA	107

Seznam použitých zkratk

ANOVA	analýza rozptylu
ANP	atriální natriuretický faktor
APACHE II	<i>Acute Physiology, Age, Chronic Health Evaluation II</i>
ARO	Anesteziologicko – resuscitační oddělení
ASA	<i>American Society of Anesthesiologists</i>
AT III	antitrombin III
BE	přebytek bází (<i>base excess</i>)
BMI	index tělesné hmotnosti (<i>Body Mass Index</i>)
CI	intervaly spolehlivosti
Cl	chlor, chlorémie
CRRT	kontinuální metody náhrady funkce ledvin (<i>Continuous Renal Replacement Therapy</i>)
CS	chondroitin sulfát
CVPD	centrální žilní tlak v systole
CVPS	centrální žilní tlak v diastole
DAMPs	molekulární vzory spojené s poškozením (<i>Damage Associated Molecular Patterns</i>)
DDPV	dlouhodobá domácí parenterální výživa
DF	dechová frekvence
DS	dermatan sulfát
DTK	diastolický krevní tlak
EDHF	endotelem uvolňovaný hyperpolarizační faktor (<i>Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor</i>)
EG	endoteliální glykokalyx
EKG	elektrokardiogram

ELISA	enzymová imunoanalýza (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)
eNOS	endoteliální syntáza oxidu dusnatého
EtCO ₂	koncentrace oxidu uhličitého na konci výdechu
F 1/1	fyzilogický roztok
FMI	fluorescenční mikroskopie
GA	celková anestézie
GAG	glykosaminoglykan
Gly	glykémie
GP	glykoprotein
HA	kyselina hyaluronová
Hb	hemoglobin
HCO ₃ ⁻	bikarbonát
HS	heparan sulfát
Htk	hematokrit
HUVECs	endoteliální buňky lidské pupečníkové žíly (<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>)
ICP	intrakraniální tlak
IDF	<i>Incidental Dark Field imaging</i>
IQR	interkvartilový rozptyl
JIP	jednotka intenzivní péče
KPR	kardiopulmonální resuscitace
MCT	tuk se středně dlouhým řetězcem (<i>Medium Chain Triglycerides</i>)
NA	neuraxiální anestézie
Na	sodík, natrium, natrémie
NaCl	chlorid sodný
NO	oxid dusnatý

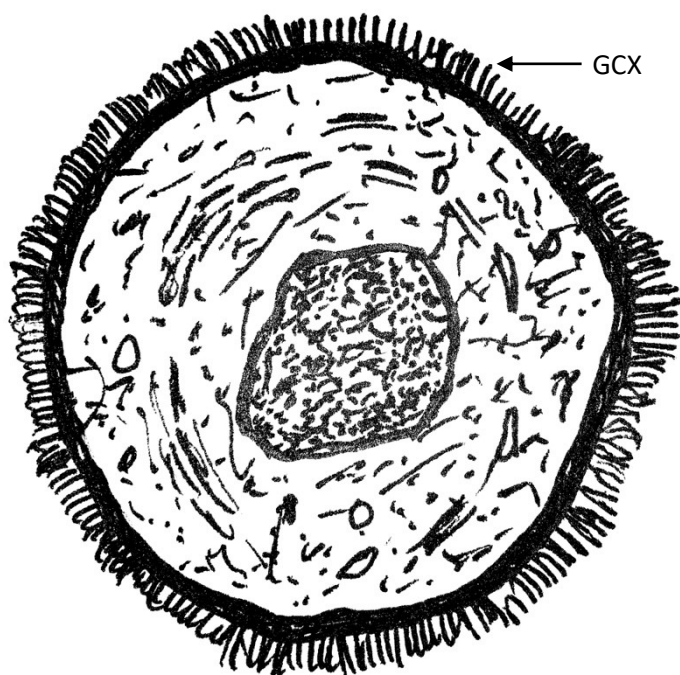
NZO	náhlá zástava oběhu
OPS	<i>Orthogonal Polarized Spectral imaging</i>
Osmo	osmolalita
OUP	Oddělení urgentního příjmu
PBR	perfundovaná hraniční zóna (<i>Perfused Boundary Region</i>)
pCO ₂	parciální tlak oxidu uhličitého v arteriální krvi
PG	proteoglykan
pH	vodíkový exponent
PN	parenterální výživa
pO ₂	parciální tlak kyslíku v arteriální krvi
ROSC	návrat spontánní cirkulace (<i>Return of Spontaneous Circulation</i>)
S1P	sfingozin-1-fosfát
sCVP	střední centrální žilní tlak
SD	směrodatná odchylka
SDF	Side-stream Dark Field imaging
SOFA	Sequential Organ Failure Assessment
SPC	souhrn charakteristik přípravku (<i>Summary of Product Characteristics</i>)
SpO ₂	saturace periferní kapilární krve kyslíkem
STK	systolický krevní tlak
sTK	střední arteriální krevní tlak
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
TF	tepová frekvence
TNF α	faktor nádorové nekrózy (<i>Tumor Necrosis Factor</i>) alfa
TT	tělesná teplota
TTM	protokol cílené tělesné teploty (<i>Targeted Temperature Management</i>)
vWf	Von Willebrandův faktor

1. ÚVOD DO PROBLEMATIKY

1.1 Glykokalyx jako subcelulární struktura

Glykokalyx je evolučně velmi stará oligosacharidová struktura (název z řeckého *glykos* (γλυκός) – cukrový + *kalyx* (καλύξ) – kryt), se kterou se setkáváme již u prokaryontních organismů. Je extrudována na povrch buněk, kde tvoří tenký pericelulární obal a je též někdy nazývána pericelulární matrix (Obr. 1). Glykokalyx představuje kontaktní rozhraní mezi extracelulárním prostředím a buňkou. Funguje jako buněčná ochrana, přenáší mechanické signály z extracelulárního prostředí na buněčný cytoskelet a slouží ke komunikaci buňky s okolním prostředím a s okolními buňkami [1]. Ve vyšších mnohobuněčných organizmech může pokrývat nejen jednotlivé buňky, ale i celé orgány a celý organismus (kluzký povrch šupin ryb je tvořen glykokalyx). Glykokalyx se skládá především z glykoproteinů a proteoglykanů, ovšem její detailní struktura se mění dle buněčného typu a dle funkce, za které jsou dané buňky v organismu zodpovědné a dle druhu organismu [2,3]. Dobře známá je např. glykokalyx v trávicím traktu, kde má v sobě navázány trávicí enzymy, které štěpí oligomerní substráty, jejichž produkty jsou ihned vstřebávány, a tím glykokalyx minimalizuje zvyšování osmotického tlaku uvnitř trávicího traktu [4]. Za podobně specifické funkce zodpovídá glykokalyx v cévním systému, kde se vyskytuje na apikálním (intraluminálním) povrchu endoteliálních buněk [5]. Endoteliální glykokalyx (EG) byl objeven transmisní elektronovou mikroskopií v roce 1966 [6]. Od té doby se v literatuře množí důkazy o jeho velmi důležité roli ve fyziologii cévního systému, zejména v jeho kapilární části, tedy mikrocirkulaci [7–10].

Obr.1: Schéma buňky s přítomností glykokalyx

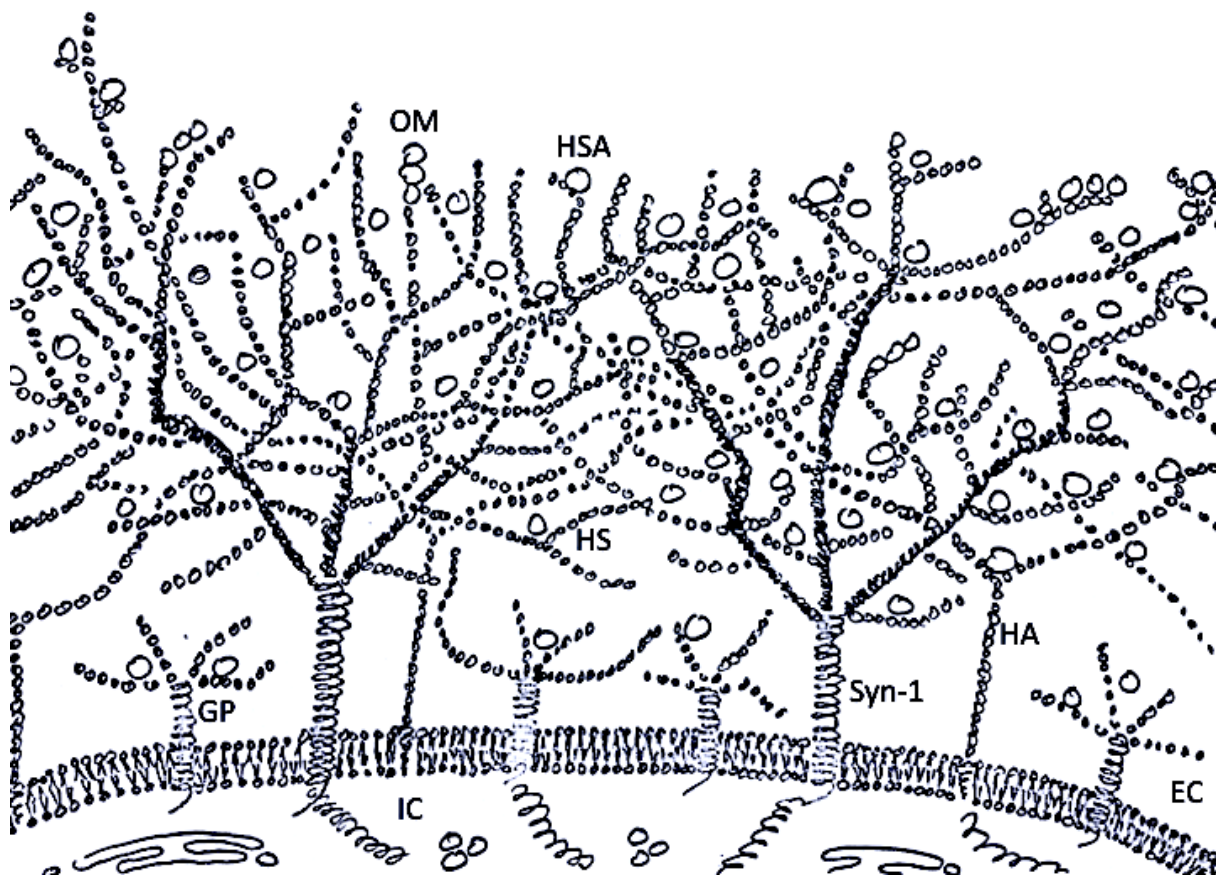


Schématické znázornění přítomnosti glykokalyx lemující cytoplazmatickou membránu na vnějším povrchu buňky. GCX – glykokalyx. © MUDr. David Astapenko.

1.2 Ultrastruktura a biochemie endoteliálního glykokalyx

EG se skládá z proteoglykanů (PG), glykoproteinů (GP) a glykosaminoglykanů (GAG), které tvoří složitou trojrozměrnou síť (Obr. 2). Jednotlivé složky budou dále detailně rozebrány.

Obr. 2: Ultrastruktura endoteliálního glykokalyx



Kresba znázorňuje ultrastrukturu endoteliálního glykokalyx. Centrální proteoglykany jako např. syndekan-1 (Syn-1), procházející přes cytoplazmatickou membránu do intracelulárního prostoru (IC), kde se kotví do buněčného cytoskeletu. Z cytoplazmatické membrány dále vychází glykoproteiny (GP) a kyselina hyaluronová (HA) do extracelulárního prostoru (EC). Na centrální proteiny jsou navázány glykosaminoglykany, zde reprezentovány heparan sulfátem (HS). Ve struktuře glykokalyx jsou vázány plazmatické proteiny: lidský sérový albumin (HSA), orosomukoid (OM). © MUDr. David Astapenko.

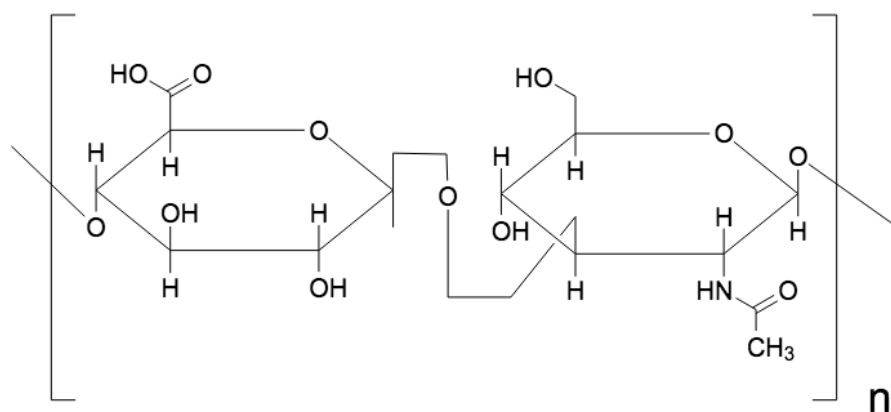
1.2.1 Proteoglykany

PG jsou centrální strukturou EG tvořící podpůrnou kostru, na které jsou navázány GAG. V EG byly popsány: syndekany, glypikany, perlekany, versikany, decoriny, biglykany a mimekany[5]. Největší význam mají syndekany, které jsou vázány přes cytoplazmatickou membránu na struktury cytoskeletu (tubulin, dynamin a α -actinin), ke kterému poutají celou strukturu EG v pravidelných ohniscích [11,12]. Ostatní PG jsou vázány pouze na cytoplazmatickou membránu a dále jsou ve struktuře glykokalyx, kde tvoří rozpustné PG interagující s ostatními GAG. V EG jsou nejvíce přítomny syndekan-1, 2 a 4, na které se vážou z GAG zejména heparan sulfát (HS). Syndekan-1 je ze své rodiny největší (33 kDa) a v EG nejhojnější [13].

1.2.2 Glykosaminoglykany

GAG jsou heteropolysacharidy složené z cyklických disacharidů (kyselina uronová a hexosamin), které jsou různou mírou substituovány sulfáty. Dle typu disacharidů a dle míry sulfatace byly v EG popsány následující typy GAG: HS, chondroitin sulfát (CS), dermatan sulfát (DS), keratan sulfát a hyaluronan (HA, kyselina hyaluronová). HS je v EG nejvíce zastoupen (50 – 90 %), dosahuje až 150 disacharidových jednotek (cca 30 kDa). CS a DS jsou další nejvíce zastoupené GAG. V DS je epimerizací kyseliny glukuronové zastoupena kyselina iduronová. HA je mezi GAG specifický v tom, že jeho struktura je disacharidový polymer s různou délkou (až 3500 kDa) (Obr. 3), který není spojen s centrálním proteinem (syndekany). Místo toho se váže přímo na receptor endoteliálních buněk CD44 [14]. Syntetizuje se jako jediný GAG mimo Golgiho aparát, a to na cytosolové straně cytoplazmatické membrány. Díky svému negativnímu náboji na karboxylových skupinách (bez sulfonizace) má hydratační vlastnosti (podobně jako v prostředí extracelulární matrix) [12,15]. Struktura GAG je ovlivňovaná mimo jiné i pH a iontovými silami (zejména interakce se sodnými kationty) [16] a dále interakcemi se sérovými proteiny (zejména albumin a orosomukoid) [17]. Zmíněné vlivy mohou na EG působit jak protektivně, tak destruktivně [18]. Interakce s proteiny a sodnými kationty do jisté míry může modulovat kapilární permeabilitu a vazbu specifických proteinů, potřebných např. při rozvoji zánětu [5,12].

Obr. 3: Kyselina hyaluronová



Strukturní chemický vzorec kyseliny hyaluronové, která se skládá z opakujících se disacharidových podjednotek: kyseliny D–glukuronové a N–acetylglukosaminu.
© MUDr. David Astapenko.

1.2.3 Glykoproteiny

GP interagující s EG jsou širokou škálou plazmatických proteinů zastávajících různé fyziologické a imunitní funkce. GP tvoří též kotvící struktury EG, na které se váží kyseliny sialové. Jejich počet a zastoupení jednotlivých typů závisí na aktivaci endoteliálních buněk. Mezi jednotlivé typy GP patří: adhezní a signální molekuly, proteiny fluidokoagulační rovnováhy a antioxidační enzymy. Z adhezních molekul jsou popsány selektiny (P–selektin skladovaný ve Weibel–Paladeho tělískách endoteliálních buněk a E–selektin indukovaný působením cytokinů interleukinu–1 a TNF α), integriny (např. α V β 3 důležitý pro interakci s trombocyty) a proteiny z rodiny imunoglobulinů (ICAM–1 a 2, VCAM–1 a PECAM–1, které jsou důležité pro interakce krevních elementů, agregaci trombocytů a diapedézu leukocytů). Z molekul s funkcí ve fluidokoagulační rovnováze je popsán komplex Ib–IX–V, fungující jako receptor vWf, který zprostředkovává adhezi trombocytů [5].

1.3 Fyzikální vlastnosti endoteliálního glykokalyx

Na základě své ultrastruktury nabývá EG specifických fyzikálních vlastností, které determinují jeho chování a fyziologické funkce v mikrocirkulaci.

1.3.1 Hustota

Hustota EG určuje rychlost stlačení a zpětného nabytí přirozeného tvaru po interakci s krevními elementy – po stlačení průchozími erytrocyty a po diapedéze leukocytů. Tento děj je dále významně ovlivňován nábojem EG [12], který je daný interakcí mezi sodnými kationty [19] a plazmatickými proteiny (zejména albuminem) [20]. Jako povšechně v celé biologii i zde můžeme pozorovat tendenci k neutralitě. U EG je tato rovnováha dynamickým procesem, který je neustále vyrovnáván a optimalizován dle aktuálních potřeb tkání v mikrocirkulaci (úroveň metabolismu, zánět, hojení, nádorový růst). Dlouhodobě narušená rovnováha na rozhraní plazma – EG může mít nepříznivý dopad na orgánové funkce [21].

1.3.2 Permeabilita – fyzikální pohled

EG hraje zcela zásadní roli v permeabilitě kapilární membrány. Původně definovaný Starlingův princip položil základní fyzikální vztah výměny tekutiny na arteriálním a venózním konci kapiláry rozdílem hydraulických a onkotických tlaků (rozdílná koncentrace plazmatických proteinů) [22]. Starlingův princip byl ovšem na základě přítomnosti EG revidován a spíše než rozdíl celkových tlaků v kapiláře a intersticiu pro pohyb tekutin se zdá být důležitější kvalita EG, jakožto onkoticky aktivní bariéry, která absorbuje plazmatické proteiny [23].

1.3.3 Deformabilita

EG působí na proudící krevní elementy repulzními silami, které jsou dány dílem elektrostatickým nábojem (kdy je důležitá interakce se sodnými kationty) [24] a dílem mechanickou deformabilitou. Proudící krevní elementy mohou EG významně komprimovat (zejména leukocyty během diapedézy) podobně jako náhle vzniklá iatrogenní hypervolémie [25]. Mechanická komponenta deformability dosud není plně objasněna, přestože je poměrně dobře popsána při diapedéze leukocytů, kdy dochází ke kompresi až na 20 % původní tloušťky EG a zpětného rozepnutí do jedné vteřiny. Zatím byly popsány 3 modely zpětného nabytí

přirozeného tvaru EG: onkotický, elasticko–hydrodynamický a mechanicko–elektrochemický [11,12,26,27]. Onkotický model vychází z předpokladu různé koncentrace proteinů ve struktuře EG a v plazmě a v tenké vrstvě mezi EG a endoteliálními buňkami (tzv. vrstva subglykokalyx) [12,28,29]. Elasticko–hydrodynamický model bere v potaz více mechanické zakřivení struktury EG a narovnění centrálních proteinů nejprve rovnoběžně se směrem působení deformující síly a poté vyrovnání do mřížky, která rovnoměrně rozloží zátěž EG [12]. Mechanicko–elektrochemický model zohledňuje již zmíněnou interakci EG se sodnými kationty a proteiny. Při deformaci EG dojde k vychýlení rovnováhy mezi koncentrací makromolekul a hustotou náboje kationtů a proteinů. Tato rovnováha je navrácena zpětným rozepnutím struktury EG, které se děje samovolně po koncentračním gradientu [12].

1.3.4 Výška vrstvy endoteliálního glykokalyx

Výšku vrstvy EG determinuje mnoho vlivů, které s používanými technikami zobrazení nejsme dosud schopni přesně zmapovat. Je to dáno jednak faktem, že EG se skládá z části pevné, kterou zobrazíme poměrně snadno a z části solubilní [12], která je v dynamické rovnováze s plazmou a je závislá do jisté míry i na jejím složení, které se může (v klinice) rychle měnit (např. tekutinovou výzvou krystaloidním roztokem). Na původních snímcích z transmisní elektronové mikroskopie (TEM) dosahoval EG několika desítek nanometrů [6], nicméně při použití jiných kontrastovacích technik byla zjištěna výška jeho vrstvy až několik mikrometrů. Mezi vlivy určující výšku EG patří přítomnost průtoku [5] v cévě, rychlost průtoku cévou [12] a samotný typ cévy (arterioly, venuly, velká céva, přítomnost fenestrací, sinusoidy) [30]. Dále záleží je–li prováděno měření *in vivo* či *in vitro* [31].

1.4 Fyziologie endoteliálního glykokalyx

EG, jakožto struktura fylogeneticky stará, zastává v mikrocirkulaci velmi důležitou úlohu, a sice zásadním způsobem ovlivňuje její správné fungování. Funkce, které se donedávna připisovaly pouze endotelu (který byl také někdy označován jako největší orgán v těle), musíme dnes připsat EG, bez kterého endotel správně fungovat nedokáže.

1.4.1 Funkce ochranná

Přítomnost EG úzce souvisí s krevním průtokem, který do jisté míry determinuje jeho výšku [32]. Pokud jsou lidské endoteliální buňky umbilikální žíly (HUVECs) v Petriho misce, EG je téměř nedetekovatelný, ovšem při působení proudění jsou HUVECs schopny velmi rychle (v řádu hodin) funkční vrstvu EG vytvořit. Endoteliální buňky se vytvořením EG chrání před fyzikálními vlivy krevních elementů a jejich působení EG na endoteliální buňky přenáší. Navíc EG svým nábojem pomáhá v interakci s erytrocytárním glykokalyx snadnějšímu průtoku v mikrocirkulaci.

1.4.2 Mechanotransdukce

Mechanotransdukce navazuje na ochrannou funkci EG. Deformace struktury glykokalyx je přenášena přes centrální proteiny (syndekan-1) na endoteliální buněčný cytoskelet a zahajuje buněčnou signalizaci [33]. Dle směru, rychlosti a typu proudění (laminární, turbulentní) dochází přes EG ke změnám rozložení a tvaru endoteliálních buněk v cévní stěně (vřetenkovité při rychlém laminárním proudu v arteriích, polygonální bez preference směru rozložení v místech turbulentního proudění zejména ve větvení artérií) a k organizaci aktinových vláken cytoskeletu souběžně s krevním proudem [34]. Existují tři teorie mechanotransdukce EG. První (centralizovaná) predikuje specifické signální molekuly zodpovědné za biologickou odpověď. Druhá (decentralizovaná) bere více v potaz fungování EG jako celku a přenášení smykového tření na více míst v endoteliální buňce a jejich spojení cytoskeletem a třetí teorie zohledňuje lokální koncentrační gradienty společně s transportem iontů, aminokyselin a růstových faktorů. Cílové orgány přenosu smykového tření jsou schopny detekovat smykové tření i bez přítomnosti EG a jsou poté důležité v signalizaci k syntéze EG, kde již byla i experimentálně zjištěna prahová hodnota smykového tření [5,12,34,35]. Další důležitá funkce EG je zprostředkování uvolnění oxidu dusnatého (NO), jakožto relaxačního faktoru na hladkou svalovinu cév. Není dosud jasné, jestli je endoteliální NO-syntáza (eNOS) aktivována přímo EG, nebo prostřednictvím jiného druhého posla. Z GAG nejvíce zodpovědných za tuto funkci je HS a HA [36]. Endotel na základě signalizace z EG vylučuje další parakrinní hormony a substance, jako např. vazodilatačně působící prostacyklin a hyperpolarizační endoteliální faktor (EDHF), který zvyšuje koncentraci draslíku v mezibuněčném prostoru [37]. Naproti těmto relaxačně působícím substancím stojí vazokonstriční endoteliny a tromboxany [5].

1.4.3 Teorie intravaskulárního kompartmentu

Tělesné tekutiny se tradičně dělí pro potřeby fyziologie a klinické medicíny (zejména pro potřeby kalkulace farmakokinetiky podávaných léčiv v čele s intravenózními roztoky) do tělesných oddílů – kompartmentů. Dvě třetiny objemu tělesných tekutin jsou v intracelulárním prostoru a jedna třetina v extracelulárním. Extracelulární kompartment se dále dělí na intravaskulární a intersticiální. Z důvodu existence EG musíme však rozlišit v intravaskulárním kompartmentu ještě kompartment glykokalyx, jelikož EG pro svoje biochemické vlastnosti na sebe váže nezanedbatelný objem plazmy (odhaduje se 1 – 1,7 litrů, přičemž hmotnost EG se odhaduje na 1,5 kg) [38]. EG můžeme v intravaskulárním kompartmentu chápat též jako intravaskulární intersticiem [39]. EG se nejen podobá svojí strukturou extracelulární matrix, ale též zastává v cirkulaci obdobné funkce (signalizace, mechanotransdukce, sekvestrace tekutiny, imunitní dohled atd.). EG tvoří přechod mezi makroskopicky tekutým prostředím krevního proudu a endoteliálními buňkami, což umožňuje jeho solubilní část.

1.4.4 Permeabilita – biologický pohled

Jak již bylo popsáno ve fyzikálních vlastnostech, EG hraje důležitou roli v permeabilitě kapilární membrány. Starlingův princip byl zásadně revidován na základě nově zjištěných souvislostí filtrace přes kapilární membránu a byl založen na faktu, že mezi glykokalyx a endoteliálními buňkami vzniká tenká vrstva (subglykokalyx), která je elektricky neurální s téměř nulovým obsahem proteinů (ty jsou odtud „vymývány“ filtrací přes póry endotelu). Tím se vytvoří efektivní onkoticky aktivní bariéra bránící filtraci. Naproti tomu subglykokalyx s nízkým onkotickým tlakem oponuje tlakům hydrostatickým z intersticia. Takto konstituovaná bariéra minimalizuje filtraci tekutiny do intersticia – tzv. filtrace tekutin 1. typu. Vzhledem k přítomnosti subglykokalyx bez proteinů při vnějším povrchu endoteliální buňky není onkotický tlak mezi lumen kapiláry a intersticiem dostatečný k přesunu tekutiny opačným směrem. K reabsorpci tekutiny do lumen kapiláry fyziologicky tedy ve většině případů nedochází [40].

1.4.5 Další funkce endoteliálního glykokalyx

Interakcí s plazmatickými proteiny nabývá EG důležitých fyziologických funkcí. Vazbou antitrombinu III (AT III) hraje EG důležitou roli v udržování **fluidokoagulační rovnováhy**. Zde se nabízí vysvětlení, proč je hlavním GAG zastoupen HS. Při kritických

stavech, kdy dochází k významnému odlučování složek EG, interaguje volný HS s AT III a tím blokuje koagulační kaskádu (viz dále) [41].

Další proteiny obsažené v EG působí proti adhezi trombocytů, tedy **antiagregačně** [42]. EG kryje důležité adhezní molekuly nejen pro trombocyty (vWf, selektiny, integriny) [43], čili jen svojí přítomností působí antiagregačně. Dále obsahuje ve své struktuře molekuly působící proti funkci trombocytů [44].

EG dále obsahuje adhezní molekuly z rodiny imunoglobulinů [12], které se již stávají dalším centrem zájmu ve výzkumu EG. V **imunitním dohledu** je důležitý i glykokalyx na leukocytech, kde může modulovat zánětovou odpověď [45]. V mezibuněčných interakcích se zdá být zásadní již interakce sialových kyselin na povrchu glykokalyx [46]. Signální molekuly na glykokalyx leukocytů jsou důležité i při rozvoji nádorového postižení. Změna složení glykokalyx na nádorových buňkách jim dovoluje „utéct“ imunitnímu systému [47]. Modulace glykokalyx nádorových buněk může být v budoucnu další modalitou terapie v onkologii [48]. Bakteriální glykokalyx pomáhá bakteriím tvořit biofilm, což významně zvyšuje obtížnost antibakteriální terapie [49]. Účinek některých antibiotik je úzce spojen s bakteriální glykokalyx, které je podobná EG [50,51]. Přes tento fakt je o interakci mezi antibiotiky a EG známo velmi málo [52].

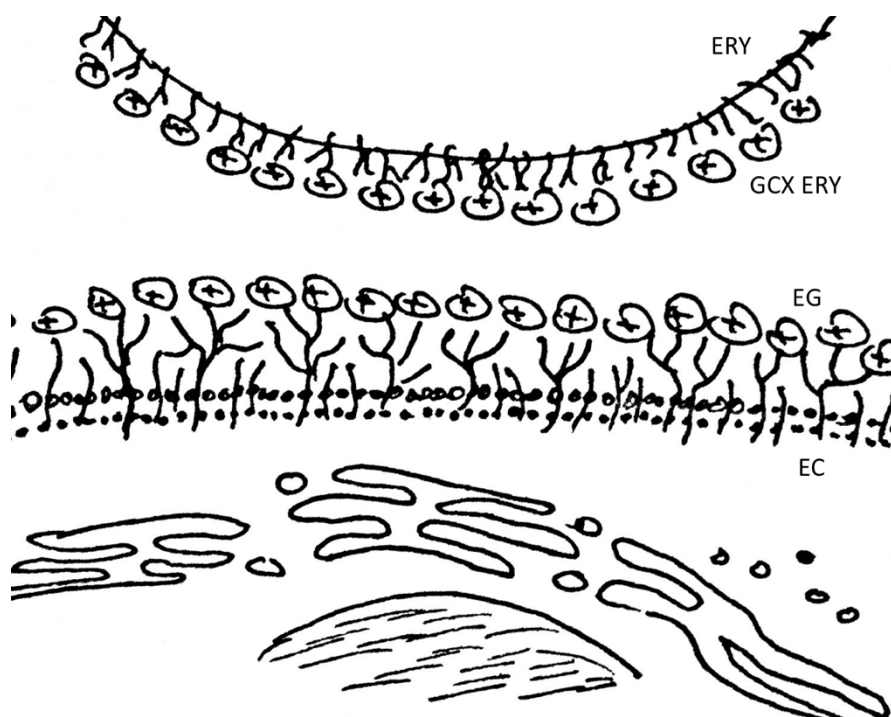
EG je též zodpovědný za **antioxidační ochranu** endotelu. Molekuly superoxid dismutázy jsou vázány přímo ve struktuře EG [5] a ten významně zvyšuje odolnost endotelu při oxidačním stresu spojeném se sepsí [53]. V dlouhodobém měřítku působí oxidačně částice LDL, před kterými se endotel úplně chránit nedovede [54].

1.4.6 Interakce krevních elementů s endoteliálním glykokalyx

Krevní elementy interagují skrze svůj vlastní glykokalyx s EG. Volnému průtoku v mikrocirkulaci a deformaci erytrocytů napomáhají negativní náboje na glykokalyx (Obr. 4). Volný průtok v mikrocirkulaci tedy významně moduluje EG svojí elektrostatickou repulzí a snížením odporu [28,55]. Tento fenomén detekují některé z výzkumných metod vizualizace EG (viz dále). Pomalým prouděním v mikrocirkulaci dále vznikají (vyzdvihovací) vztlakové síly odrážející erytrocyty ke středu kapiláry, které jsou dány průtokem plazmy v síti EG [56]. Erytrocytární glykokalyx může s EG vyměňovat některé své komponenty, z nichž např. sfingozin-1-fosfát (S1P) má regenerační potenciál [57]. Přestože je erytrocytární glykokalyx tisíckrát menší než EG, vzhledem celkovému počtu erytrocytů v cirkulaci představuje významný regenerační rezervoár.

Bílé krvinky se váží přes adhezní molekuly (L–selektin, P–selektin a E–selektin), čímž se zpomaluje jejich proudění v cirkulaci. Tento fenomén se nazývá rolování. EG při tom signalizuje zdravý endotel a rolování moduluje [58]. Poškození EG rolování umocňuje [59] a následně dochází k diapedeze a průniku leukocytů do intersticiálního prostoru v místě zánětu [60].

Obr. 4: Endoteliální a erytrocytární glykokalyx



Znázornění elektrostatické repulze erytrocytů za přítomnosti negativně nabitého glykokalyx, který na sebe váže sodné kationty a plazmatické proteiny (znázorněno řadou pozitivních nábojů). ERY – erytrocyt, GCX ERY – erytrocytární glykokalyx, EG – endoteliální glykokalyx, EC – endoteliální buňka. © MUDr. David Astapenko.

1.4.7 Funkce jednotlivých komponent glykokalyx

Fyziologie EG jako celku vychází z vlastností jednotlivých komponent, které navíc hrají důležitou roli v ontogenezi organismu. **Syndekan–1** se uplatňuje v buněčné signalizaci, proliferaci, interakci mezi buňkami a mezi buňkami a extracelulární matrix [61]. Pro svoji centrální pozici v EG se označuje jako ukazatel míry poškození EG [62], přestože pro existenci struktury EG není nezbytně nutnou komponentou [63]. Změněná struktura syndekanu–1 byla

asociována s angiogenním fenotypem mnohočetného myelomu [64] a dokonce syndekan-1 může sloužit jako onkomarker gliomu [65] a nádoru prsu [66]. Syndekan-1 je tímto zapojen do imunitního systému a uplatňuje se jako modulátor ochrany proti autoimunitě [67]. Syndekan-2 je v EG zastoupen minoritně a nacházíme ho především na mezenchymálních buňkách, fibroblastech a buňkách hladké svaloviny. Může se uplatňovat v angiogenezi [68]. Syndekan-3 je se rovněž nachází mimo EG, a to především v nervové tkáni a v embryogenezi ve tkáních muskulo-skeletálního systému [69]. Syndekan-4 se nachází na různých buněčných typech a v EG se uplatňuje při vyrovnávání endoteliálních buněk paralelně s krevním proudem a ochrání proti ateroskleróze [70]. Ovšem jeho hlavní funkce se nachází opět mimo EG, a sice reguluje strukturu extracelulární matrix a moduluje mezibuněčnou adhezi [71].

HS je v EG zastoupen nejvíce ze všech GAG a zdá se, že jeho struktura je příznačná pro jednotlivé buněčné typy, tedy i pro endoteliální buňky [72]. Fyziologická role HS je především interagovat s proteiny ne vazebnými silami a vázat se na centrální proteiny EG. Tyto proteiny se označují jako „*heparin-binding proteins*“ a patří mezi ně různé enzymy, inhibitory enzymů, cytokiny, růstové faktory, proteiny extracelulární matrix, lipoproteiny a proteiny asociované s různými chorobami [73].

HA je mezi GAG specifický jak svojí strukturou, tak svým zapojením do struktury GAG (popsáno výše). HA může zásadním způsobem modulovat imunitní odpověď podle délky svých řetězců, a sice tak, že krátké fragmenty HA působí prozánětlivě [74]. Míra exprese hyaluronidáz (enzymy degradující HA, popsány dosud 4 izotypy) se mění v závislosti na tíži klinického stavu, jak bylo popsáno u plicních chorob [75]. Co se týká EG i zde může docházet k enzymatickému štěpení HA na krátké fragmenty, které signalizací přes endoteliální cytoskelet rozvolňují mezibuněčné spoje [76]. HA zastává další důležité funkce: hydratace, mezibuněčné interakce, interakce mezi buňkami a extracelulární matrix, buněčná migrace, angiogeneze a hojení [77]. HA je též v buněčném jádru a reguluje transkripci DNA [78]. V EG se dále podílí na regulaci vaskulární bariéry, filtraci [79], pohybu buněk, tonusu buněk hladké svaloviny a hemokoagulaci [80].

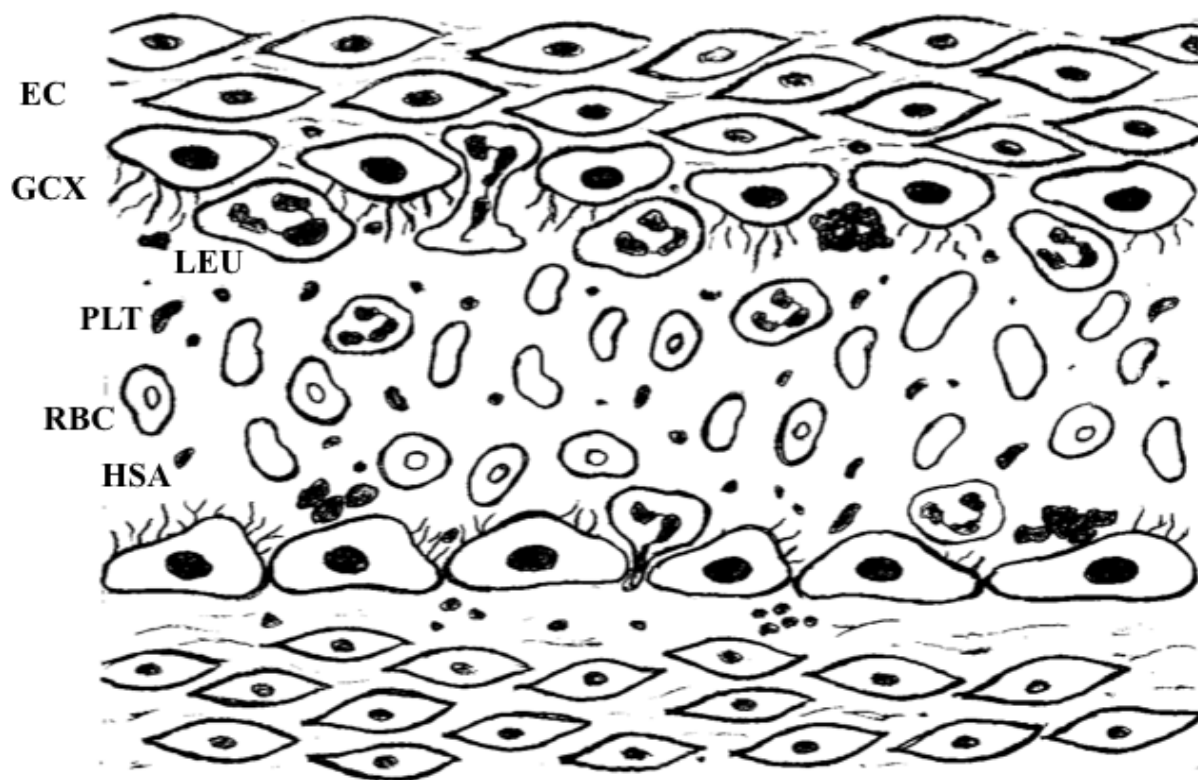
1.5 Role endoteliálního glykokalyx v patofyziologii mikrocirkulace

EG zastává v mikrocirkulaci komplexní funkci, z čehož lze velmi dobře predikovat, že poškození této struktury bude mít na mikrocirkulaci zásadní vliv [15]. Poškození EG jakékoliv etiologie vede k endoteliální dysfunkci, která poškození EG dále potencuje a uzavírá se *circulus*

vittiosus. Dosud není zcela jasné, zdali je první poškozena EG nebo je poškozena až sekundárně [81,82], přestože byly popsány přímo působící noxy: degradační enzymy specifické pro GAG (heparanáza, hyaluronidáza, neuraminidáza), degradační enzymy extracelulární matrix (matrix metaloproteinázy, elastáza) a enzymy asociované se zánětovou odpovědí (trombin, proteináza 3, plazminogen, katepsin B a TNF α) [83]. Sacharidová povaha složení činí EG náchylnou k degradaci, přičemž existuje dynamická rovnováha mezi kontinuální degradací a syntézou za fyziologických okolností, kdy jsou endoteliální buňky intaktní. Tato rovnováha je dlouhodobě neudržitelná např. u chronické hyperglykémie [84], dyslipidémie [54], či aterosklerózy [85], kde je ovšem zachována menší míra syntézy EG a hovoříme o poškození EG. Inzulaty více robustní, jako např. septický šok, ischemie – reperfuze (a následný oxidační stres) nebo polytrauma, vedou k destrukci EG a poškození funkce endoteliálních buněk a kapilární bariéry. Dochází ke zvýšené permeabilitě, rozvolnění mezibuněčných spojů, úniku jak plazmy, tak plazmatických proteinů, neřízené translokaci buněk imunitního systému, rozvoji intravaskulární nástěnné trombózy, intersticiálního edému a depleci náplně cévního systému (Obr. 5). Degradované komponenty EG (syndekan-1, HS, HA, glypikany) [86] působí samy o sobě jako s poškozením asociované molekulární vzory (DAMPs), které dále potencují imunitní odpověď a které se ukazují, že do jisté míry korelují s tíží stavu pacienta [87]. Poškození EG v kritických stavech umocňuje rozvoj multiorgánového selhání [88]. Organ, na kterém se přednostně projeví tento stav jsou ledviny. V glomerulární membráně představuje EG důležitou součást filtrační membrány, zejména pro svůj negativní náboj a schopnost vázat albumin [17]. Poškození EG v ledvinách vede ihned k albuminurii [89]. Poškození koronární EG vede k rozvoji myokardiálního intersticiálního edému, jak bylo prokázáno experimentálně na srdci morčete [90,91].

Další poškozující vliv na EG má hypernatrémie. Sodné kationty interagují s negativními náboji na EG, přičemž struktura glykokalyx do značné míry funguje jako nárazník pro náhlé změny natrémie [16]. Zvýšeným příjmem sodíku v potravě dochází k nasycení EG, což má za následek zvyšování tuhosti EG, snížení přenosu smykového tření, nízkou produkci NO a v konečném důsledku vznik arteriální hypertenze. Stav nasycení EG lze vyšetřit sodíkovým tolerančním testem, který se ovšem v klinice nepoužívá [19,92]. Při poškození EG uniká sodík do intersticia, odkud se dostává výrazně pomaleji než z intravaskulárního prostoru i kvůli poškození glykokalyx v ledvinných glomerulech [18].

Obr. 5: Důsledky poškození endoteliálního glykokalyxu v mikrocirkulaci



Kresba znázorňuje patofyziologii poškození EG (GCX) se všemi důsledky pro mikrocirkulaci. Trombocyty (PLT) agregují na obnažených endoteliálních buňkách (EC) za vzniku nástěnných trombóz. Albumin (HSA) a další plazmatické proteiny unikají do intersticia, kde zapříčiňují vznik edému. Do intersticia dále vycestovávají leukocyty (LEU) diapedézou. RBC – erytrocyty.
© MUDr. David Astapenko, PhDr. Josef Bavor.

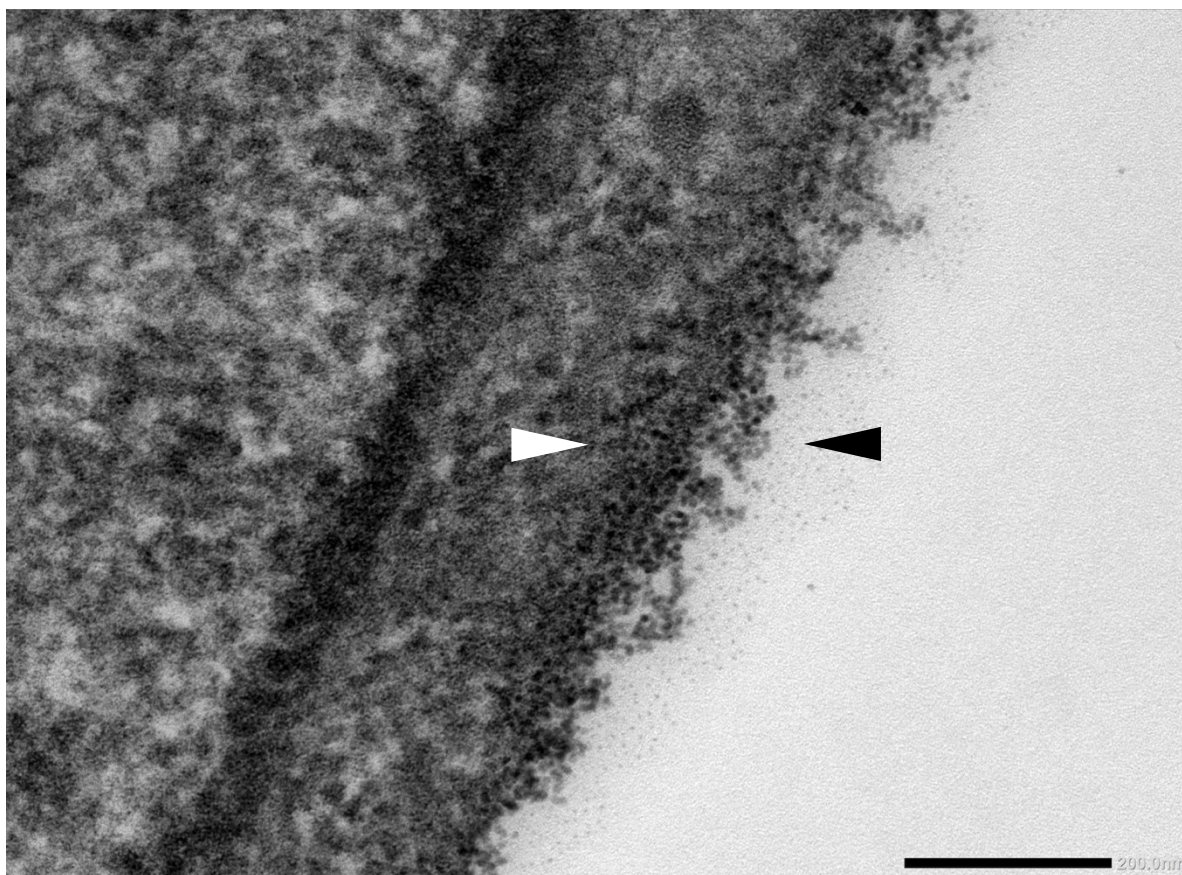
1.6 Metody vizualizace a výzkumu endoteliálního glykokalyxu

1.6.1 Metody přímého zobrazení

Povaha EG ho činí náchylným k degradaci, což ho činí obtížně zobrazitelným běžnými metodami zpracování vzorku. Vůbec první přímé zobrazení EG bylo provedeno transmisí elektronovou mikroskopií (TEM). Vzorek tkáně nesmí být dehydratován ani fixován běžnými histologickými postupy, jinak dochází k poškození EG [3,31]. Dále je důležité použití kontrastu pro zobrazení EG. První byla pro tento účel úspěšně použita ruteniová červeň. V takto

upravených preparátech byl EG výšky několika desítek nanometrů [6]. Další metody pro TEM využívají např. alciánovou modř 8GX [12], flouorokarbon – glutaraldehydovou fixaci [93], lantan nitrát [94], uranyl acetát [95] či vizualizaci pomocí vazby kationizovaného feritinu (Obr. 6) [96]. TEM je velmi přesnou metodou hodnotící ultrastrukturu, ovšem pouze *ex vivo* z biopsie, případně *in vitro*.

Obr. 6: Vizualizace endoteliální glykokalyx v transmisní elektronové mikroskopii



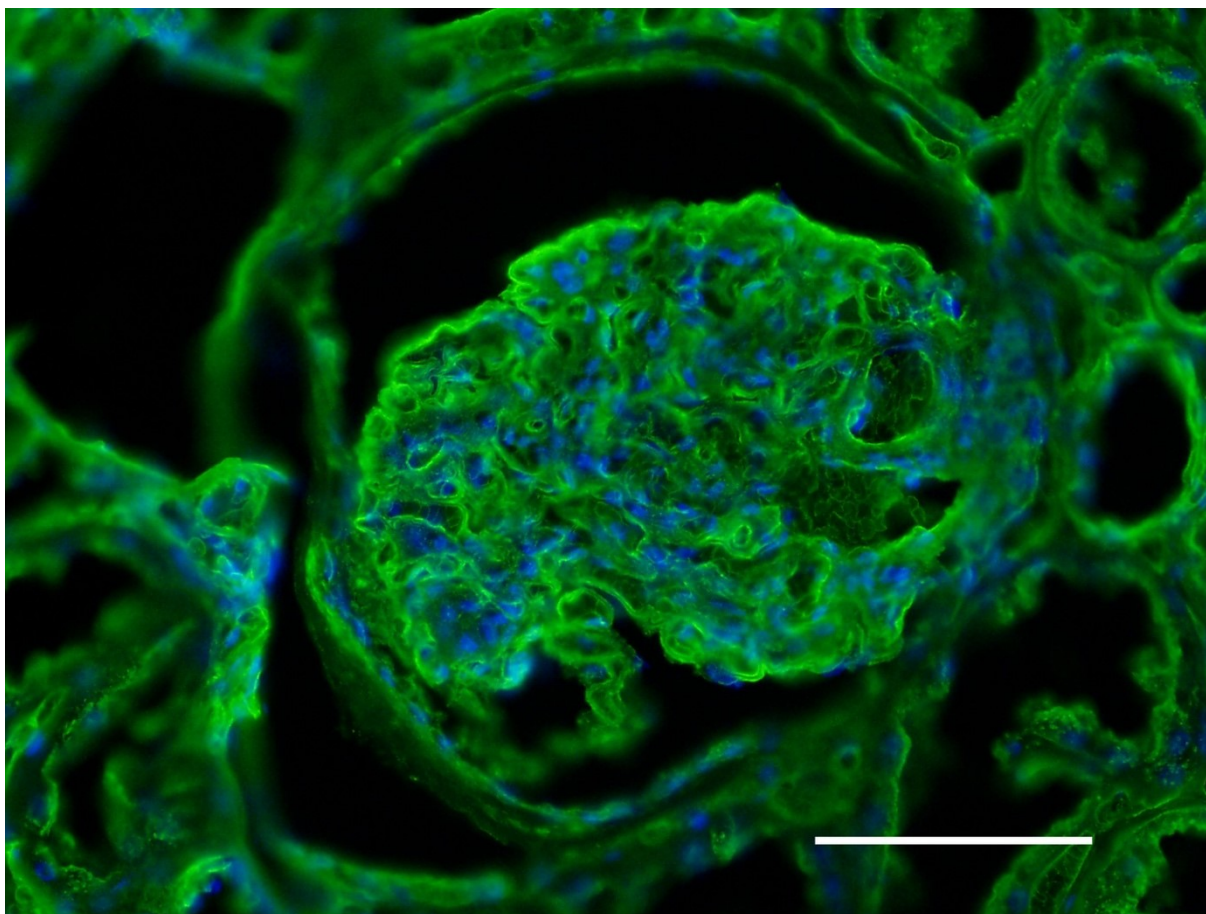
Bílý a černý trojúhelník vymezují vrstvu endoteliálního glykokalyx. Jedná se o buňky linie HUVEC (human umbilical vein endothelial cells). Glykokalyx byl vizualizován pomocí vazby kationizovaného feritinu. Zvětšení 50 000x. Obrázek byl pořízen transmisním elektronovým mikroskopem JEOL JEM-1400Plus na Ústavu histologie Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy. Publikováno s laskavým svolením MUDr. Dany Čížkové, Ph.D. a Mgr. Aleše Bezrouka, Ph.D.

Velmi přesného zobrazení EG lze docílit fluorescenční mikroskopií (FMI), zobrazením navázaných lektinů, které mají vysokou afinitu k sacharidovým strukturám, tedy k EG. Primární protilátky lze zacílit na jakoukoli komponentu z EG, nejčastěji HA, HS a kyselinu sialovou (Obr. 7) [97]. FMI lze dobře vizualizovat i erytrocytární glykokalyx (Obr. 8). Metodu

lze použít opět nejlépe *ex vivo* nebo *in vitro*. Fluorochromem značené lektiny pro zobrazení EG mohou být použity dále v laserové skenovací konfokální mikroskopii a dvoufotonové laserové skenovací mikroskopii. Tyto dvě velmi těžce dostupné metody mohou být použity i pro velké cévy (např. vnitřní krkavice) [98].

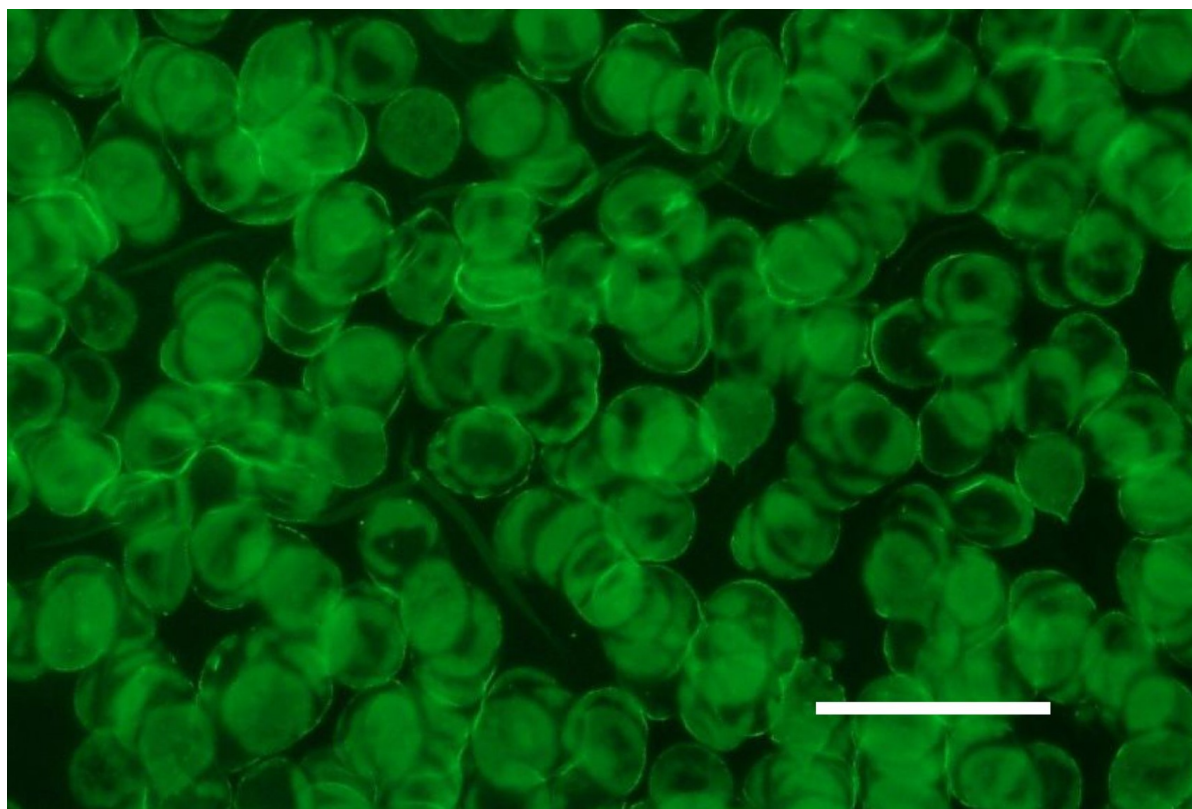
Metody přímého zobrazení EG poskytují přesný morfologický pohled, který nelze ovšem přesně kvantifikovat. Dosud není známo, zdali je vrstva EG kontinuálně neměnné tloušťky, tím spíš, že existuje více druhů typu endoteliální bariéry (např. fenestrovaná, sinusoidální). Dále při TEM nevíme, zdali to, co vidíme je intaktní *in situ* struktura EG či artefakt vzniklý interakcí kontrastních činidel s EG. V některých pracích se objevují obrázky EG připomínající kartáčové výběžky vycházející z endoteliálních buněk při použití fluorokarbon – glutaraldehydové fixace [93]. Naproti tomu tvar EG při použití metody kationizovaného feritinu (Obr. 6) se dá přirovnat k amorfním shlukům nepravidelné tloušťky. Který s těchto dvou rozdílných tvarů EG z TEM se nejvíce blíží realitě je předmětem diskuze. U FMI lze pomocí specializovaných programů hodnotit sílu fluorescence a tím poměrně přesně kvantifikovat tloušťku EG [99].

Obr. 7: Endoteliální glykokalyx ve fluorescenční mikroskopii



Glomerulus z kůry lidské ledviny, na kterém je provedena histochemická detekce N-acetylglukosaminu a kyseliny N-acetylneuraminové (sialové), jakožto součástí EG, pomocí lektinu WGA (*wheat germ agglutinin*) konjugovaného s fluorochromem Alexa Fluor® 488, jádra jsou dobarvena DAPI. Měřítko: 50 μm . Publikováno s laskavým svolením MUDr. Dany Čížkové, Ph.D. z Ústavu histologie a embryologie Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy.

Obr. 8: Erytrocytární glykokalyx ve fluorescenční mikroskopii



Lidské erytrocyty s histochemickou detekcí N-acetylglukosaminu a kyseliny N-acetylneuraminové (sialové), jakožto součástí EG, pomocí lektinu WGA (*wheat germ agglutinin*) konjugovaného s fluorochromem Alexa Fluor® 488. Měřítka: 50 μm . Publikováno s laskavým svolením MUDr. Dany Čížkové, Ph.D. z Ústavu histologie a embryologie Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy.

1.6.2 Metody nepřímého zobrazení a hodnocení stavu endoteliální glykokalyx

EG zobrazená intravitální světelnou mikroskopií představuje tzv. krevní exkluzivní zónu (*blood exclusion zone*), tedy tenkou vrstvu mezi proudícím sloupcem erytrocytů a endoteliálními buňkami. Takto lze vyšetřit např. mikrocirkulaci hlodavců v hřbetní kožní řase nebo kremasterovém svalu [100]. Samotné vypočítání tloušťky krevní exkluzivní zóny je ovšem zdoluhavé a musí být použity specializované grafické programy (např. Image J) s vloženými doplňky (tzv. plugins) [101].

Vývojem neinvazivní intravitální mikroskopie vznikla koncepce ortogonální polarizované spektrální mikroskopie (OPS – *Orthogonal Polarized Spectral*), která využívá odraz polarizovaného světla v zeleném spektru od hemoglobinu proudících erytrocytů

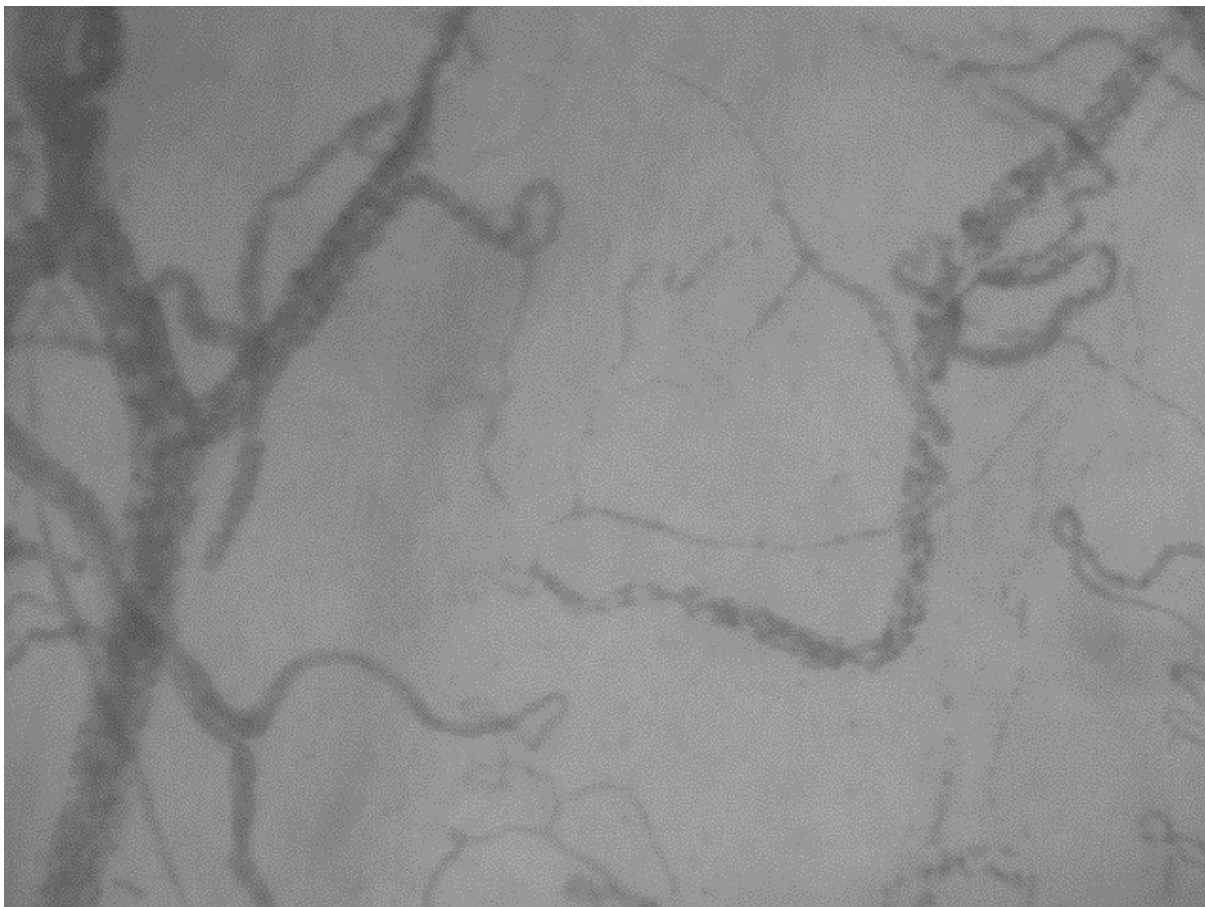
v mikrocirkulaci. Světlo je vysíláno v pulzech, takže se jedná o odrazovou stroboskopickou spektrometrii. Mikroskop se dá držet v ruce a jeho vysílací a zároveň i přijímací hrot se vloží na požadovanou plochu. Nejčastěji se takto vyšetřuje mikrocirkulace v sublingvální oblasti, ale metoda se dá použít i na střevní mikrocirkulaci [102], na povrch orgánů (játra, ledviny, mozek) nebo na kůži novorozenců, kteří mají tenkou vrstvu podkožního tuku [103–105]. Vývoj OPS technologie pokračoval technologií SDF (*Side-stream Dark Field imaging*), která má vyšší rozlišitelnost a v posledních letech technologií IDF (*Incidental Dark Field imaging*), jejíž rozlišení je zatím nejvyšší. Pro výzkum EG byl ve spojení s těmito technologiemi vyvinut automatizovaný program GlykoCheck (GlykoCheck B.V., Maastricht, Nizozemí), který nepřímo hodnotí jeho tloušťku parametrem PBR (*Perfused Boundary Region*) – perfundovaná hraniční zóna. Záznam sublingvální mikrocirkulace je pořízen plně dle navigace programu. Kvalitního rozlišení plně kompatibilního se softwarem dosahuje KK kamera (Research Technology Limited, Alliance Court, Honiton, Velká Británie) (Obr. 9) fungující na principu SDF. Po stabilizaci obrazu, optimální intenzitě a zaostření, začne automatický záznam (Obr. 10), který je ukončen po uložení nejméně 3000 kapilárních segmentů o délce 10 μm a průměru 5–25 μm (Obr. 11). Program dále automaticky vypočítává průměr středního proudu erytrocytů v kapilárních segmentech a jejich rozptyl odečtením průměru kapiláry od průměrné hodnoty středového sloupce erytrocytů. Výsledný numerický údaj v μm představuje PBR a udává míru penetrace erytrocytů do EG (Obr. 12). Čím je vyšší, tím více se erytrocyty přibližují endoteliálním buňkám, což demonstruje ztenčení vrstvy EG. U zdravých jedinců jsou hodnoty PBR nižší než 2 μm . Hodnoty vyšší než 2,5 μm jsou asociovány s těžkým poškozením EG.

Obr. 9: KK kamera



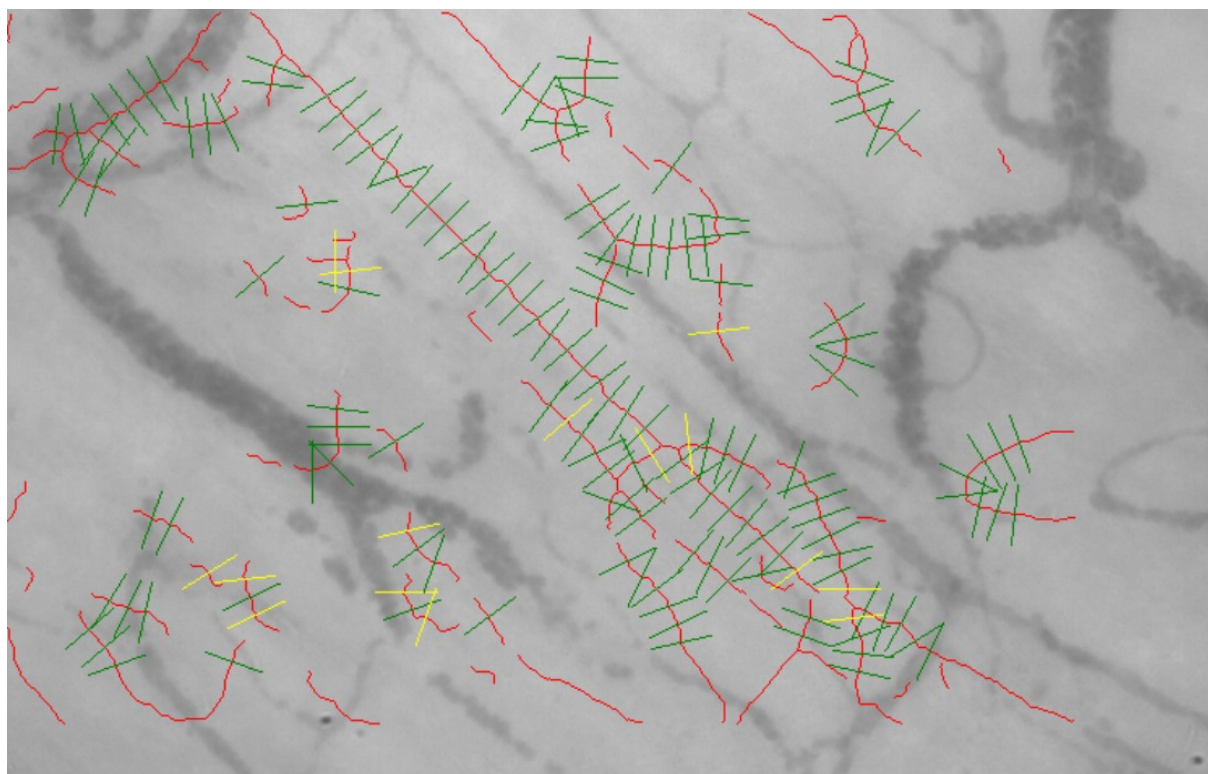
KK kamera fungující na principu technologie SDF (*Side-stream Dark Field imaging*). Tělo kamery tvoří válec (fixován v ruce nebo ve stojanu), který je spojený s hrotem zakončeným LED diodami. LED diody vysílají zelené světlo o dané frekvenci a mezi nimi je vstup pro příjem světla odraženého. Hrot je uložen v plastovém krytu a při své bázi je připojen k tělu kamery přes zaostřující otočný válec. © MUDr. David Astapenko.

Obr. 10: Obraz sublingvální mikrocirkulace získaný KK kamerou



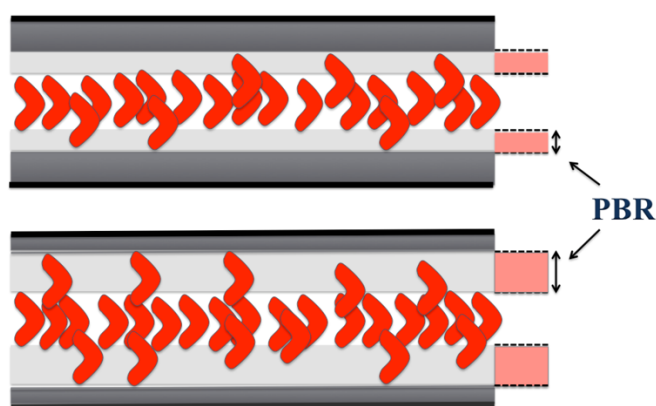
Sublingvální mikrocirkulace získaná mikroskopickou metodou SDF (*Side-stream Dark Field technology imaging*). Zobrazená plocha sliznice: 915 x 686 μm . Zvětšení: 325x. Pozitivní signál tvoří proudící erytrocyty. © MUDr. David Astapenko.

Obr. 11: Zpracování získaného obrazu sublingvální mikrocirkulace programem GlycoCheck



Zpracování obrazu sublingvální mikrocirkulace metodou SDF (*Side-stream Dark Field technology imaging*) programem GlycoCheck. Červené linky sledují kapiláry vhodného rozměru, zelené úsečky oddělují kapilární segmenty vybrané k analýze, žluté úsečky oddělují vyřazené úseky. © MUDr. David Astapenko.

Obr. 12: Grafické znázornění parametru perfundované hraniční zóny (PBR)



Obrázek znázorňuje dvě cévy. Horní má endoteliální glykokalyx zachovalý a erytrocyty mají menší rozptyl od středového proudícího sloupce. Naopak je tomu u spodní cévy, kdy se PBR zvyšuje. PBR – *perfused boundary region* – perfundovaná hraniční zóna. © MUDr. David Astapenko.

Stav EG je nejčastěji hodnocen sérovou (někdy i močovou) koncentrací svých jednotlivých komponent. Věří se, že HS a HA při svém uložení výše v EG jsou více náchylné k odštěpení a hlubší komponenty, zejména syndekan-1, jsou odlučovány od endoteliálních buněk až při těžkých inzultech (seps, polytrauma). Tito tzv. biochemičtí ukazatelé míry degradace EG se v literatuře používají velmi často a jsou téměř považovány za zlatý standart. Jejich koncentrace se určuje metodou ELISA (enzyme linked immunosorbent assay).

Byl předpovězen přímý vztah mezi poškozením EG a erytrocytární glykokalyx. Hodnocením stavu glykokalyx na erytrocytech tedy můžeme získat nepřímo informace o EG. Pro tento účel je použitelná metoda rozdílné rychlosti sedimentace erytrocytů v roztocích o rozdílné koncentraci sodíku. Čím rychleji erytrocyty sedimentují, tím menší nesou náboj a tím větší poškození jejich glykokalyx u nich předpokládáme [92].

2. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

2.1 Cíle

1) Popis endoteliální glykokalyx ve vybraných klinických stavech a experimentálních modelech:

- Reakce EG na náhlou zástavu oběhu a bezprostředně po návratu spontánní cirkulace.
- Vliv tekutinové terapie na EG, zejména nesprávně vedené tekutinové resuscitace a navozené iatrogenní hypernatrémie.
- Vliv rozdílných anesteziologických technik na EG (celková anestézie, neuraxiální anestézie).
- Dynamika poškození EG u pacientů v intenzivní péči a vliv náhrad orgánových funkcí na EG.
- Vliv nitrožilního podání tukové emulze jako součást parenterální výživy na EG.
- Vliv poruch metabolismu lipidů na EG.
- Stav EG u zdravých dobrovolníků.

2) Identifikace protektivních postupů a látek pro zachování a reparaci EG.

3) Kritické zhodnocení metody perfundované hraniční zóny (*perfused boundary region*, PBR).

2.2 Pracovní hypotézy

- 1) Náhlá zástava oběhu vede k poškození EG.
- 2) Nadměrně rychlá tekutinová resuscitace a navozená iatrogenní hypernatrémie poškozuje EG.
- 3) Celková anestézie poškozuje EG více než neuraxiální anestézie.
- 4) Závažnost stavu pacientů v intenzivní péči a metody náhrady orgánových funkcí poškozují EG.
- 5) Nitrožilní podání tukové emulze poškozuje EG.
- 6) Porucha metabolismu lipidů koreluje s poškozením EG.

3. METODY, MATERIÁL A SOUBOR NEMOCNÝCH

3.1 Experimentální studie

3.1.1 Změny výšky vrstvy endoteliálního glykokalyx během náhlé zástavy oběhu na experimentálním modelu srdeční zástavy u prasete domácího

3.1.1.1 Úvod a cíle studie

Přestože degradace EG po náhlé zástavě oběhu (NZO) a úspěšné resuscitaci byla prokázána v klinické studii měřením koncentrace rozpadových produktů EG (syndekan-1 a HS) [106], parametr PBR pro tento klinický stav nebyl použit. Provedli jsme experimentální studii na modelu NZO u samic prasete domácího (*sus scrofa f. domestica*), ve které jsme předpokládali, že EG bude poškozen při celotělové ischemii a reperfuzi při NZO s úspěšnou kardiopulmonální resuscitací KPR, přičemž doba zástavy oběhu bude minimálně 15 minut.

3.1.1.2 Metody, příprava zvířat, protokol experimentu a statistická analýza

Experiment byl proveden ve viváriu Fakulty vojenského zdravotnictví, Univerzity obrany. Projekt pokusů byl schválen Odbornou komisí pro výzkum na zvířatech Univerzity obrany v Brně, Fakulty vojenského zdravotnictví v Hradci Králové (28. 7. 2015, číslo jednání 45–21/2015–6848). Všem experimentálním zvířatům byla poskytnuta humánní péče v souladu s institucionálními pokyny a s doporučenými postupy Mezinárodní asociace konsenzu veterinárních vydavatelů o humánní etice a dobrých životních podmínkách zvířat.

Zvířata byla premedikována intramuskulární injekcí azaperonu (2.0 mg/kg), atropinu (0.2 mg/kg) a ketaminu (20,0 mg/kg) 30 minut před zahájením protokolu. Po přivezení zvířat na operační sál byl zaveden periferní žilní katetr velikosti 18G do ušní žíly v supinační poloze (Vasofix® Safety, BBraun, Melsungen, Německo). Po tracheální intubaci byla zahájena umělá plicní ventilace anesteziologickým přístrojem (Cirrus Trans2/Vent 2, Datex, Helsinky, Finsko), při dechové frekvenci 19 za minutu a inspirační koncentraci kyslíku 40 %. Dechové objemy byly upraveny pro vydechované rozmezí koncentrace oxidu uhličitého (EtCO₂) 35 – 45 mmHg. Anestézie byla udržována kontinuální infuzí fentanylu v dávce 5 – 20 µg/kg/h (Fentanyl

Torrex, Chiesi Pharmaceuticals GmbH, Vienna, Rakousko) a inhalačně inspirační koncentrací isofluranu 1,5 % (Forane, AbbVie Inc., Chicago, IL, USA). Udržovací tekutinová terapie byla nastavena na kontinuální infuzi balancovaného krystaloidu Plasmalyte (Baxter SA, Belgie) při pokojové teplotě a rychlosti 50 ml/h. Fyziologické funkce, včetně EKG, byly kontinuálně monitorovány. Hrudní aorta byla kanylována cestou společné krkavice vpravo pomocí 7 F 200 mm katetru Certofix Duo (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Německo) pro kontinuální monitoring a záznam aortálního krevního tlaku. 8,5 F perkutánní zavaděč (Intro-Flex, Edwards Lifesciences LLC, Irvine, CA, USA) byl zaveden přes pravou vnitřní jugulární žílu do horní duté žíly pro usnadnění zavedení bipolární stimulační elektrody a pro kontinuální záznam tlaku v pravé srdeční síni. Byla provedena kraniotomie návrtem o průměru 5 mm v horní části frontální kosti vlevo pro zavedení intrakraniálního tlakového čidla 20 mm do čelního laloku (Codman, Johnson & Johnson, Raynham, MA, USA).

Po přípravě a stabilizaci byla celkem 11 zvířatům o průměrné hmotnosti 33 ± 2 kg po nočním hladovění navozena fibrilace komor střídavým proudem o 5 – 10 za použití nitrosrdeční bipolární stimulační elektrody, která byla zavedena do pravé komory. Srdeční zástava byla potvrzena ve chvíli, kdy pulz na femorální i krční tepně již nebyl hmatný. Zvířata byla po indukci NZO ponechána 2 minuty bez intervence, poté 3 minuty resuscitována kontinuální nepřímou srdeční masáží použitím přístroje pro nepřímou srdeční masáž (Lucas 2 – Lund University cardiopulmonary assist system, Physio-Control, Redmond, WA, USA), a poté 10 minut kombinací 30 stlačení hrudníku a 2 vdechy přes tracheální rourku v souladu s doporučením Evropské resuscitační rady z roku 2015 [107]. V patnácté minutě byla zvířata defibrilována a byl obnoven spontánní oběh (ROSC). Sublingvální mikrocirkulace byla vyšetřena ručním mikroskopem (KK kamera, Research Technology Limited, Alliance Court, Honiton, Velká Británie) a její nahrávky následně automaticky hodnoceny programem GlycoCheck (GlykoCheck B.V., Maastricht, Nizozemí) s využitím parametru PBR (další popis této metody viz kapitola 1.6.2). Mikrocirkulace byla vyšetřena ve třech časových údobích: před indukcí (PBR_B), po návratu spontánní cirkulace (PBR_ROSC) a 20 minut po návratu spontánní cirkulace (PBR_ROSC_20). Po skončení experimentu byla zvířata utracena nitrožilním podáním preparátu T61 v dávce dle výrobce dle hmotnosti zvířete.

Pro statistické hodnocení byla otestována normalita dat D'Agostino–Pearson omnibus testem a použit test analýzy rozptylu (ANOVA) pro hodnoty s Gaussovým rozložením a Kruskal – Wallisův test pro hodnoty bez Gaussova rozložení. Pro porovnání dvou skupin byl použit párový Studentův t-test, na hladině významnosti $p = 0,05$. Data jsou prezentována jako průměr a směrodatná odchylka, nebo medián a kvartilové rozpětí.

3.1.2 Efekt akutně vzniklé hypernatrémie podáním hypertonického roztoku chloridu sodného na endoteliální glykokalyx u králíka

3.1.2.1 Úvod a cíle studie

Hypernatrémie představuje častou klinickou situací, která je asociována se zvýšenou morbiditou a mortalitou [108,109]. Na druhou stranu existují silné klinické i experimentální důkazy o tom, že hypertonický chlorid sodný (NaCl) v terapii intrakraniální hypertenze, těžkého poranění mozku a krvácení z aneuryzmatu, či při subarachnoidálním krvácení zlepšuje výsledek léčby [110,111]. EG může být hypernatrémii poškozován [19] podobně jako ostatními výše uvedenými vlivy [15]. Negativní vliv hypernatrémie byl již hodnocen v několika klinických i experimentálních studiích [112–115], ale vliv náhle vzniklé hypernatrémie na EG dosud popsán nebyl. EG by mohl být poškozen hyperosmolaritou séra a přímým iontovým působením na strukturu EG. Studie si kladla za cíl popsat vztah mezi akutně navozenou hypernatrémii hypertonickým roztokem 10 % NaCl a stavem EG popsaným intravitální mikroskopií v sublingvální a piální mozkové mikrocirkulaci.

3.1.2.2 Metody, příprava zvířat, protokol experimentu a statistická analýza

Experiment byl proveden ve viváriu Fakulty vojenského zdravotnictví, Univerzity obrany. Projekt pokusů byl schválen Odbornou komisí pro výzkum na zvířatech Univerzity obrany v Brně, Fakulty vojenského zdravotnictví v Hradci Králové (1. 6. 2016, číslo jednání 50–37/2016–6848). Experiment byl proveden na dvaceti králících (novozélandský bílý králík, 10 samců a 10 samic; váha: 2,5–3,0 kg; VELA3 34081/2008-10001, CZ 21906828, Unětice, Česká republika). Zvířata byla ustájena při pokojové teplotě 21 °C s 12–hodinovým denním cyklem s přístupem ke krmivu a kohoutkové vodě *ad libitum*. Po týdenní aklimatizaci zvířat byl zahájen experiment.

Po nočním hladovění byli králíci uvedeni do celkové anestézie intramuskulární injekcí ketaminu (40 mg/kg) a xylazinu (4 mg/kg). Zvířata byla instrumentována v supinační poloze na operačním stole. Byla jim vyholena místa pro zamýšlené zavedení nitrožilních vstupů, EKG elektrod a tracheostomie. Nitrožilní kanyly (24G, resp. 22G) (Vasofix® Safety, BBraun, Melsungen, Německo) byly zavedeny do marginální ušní žíly a pravé centrální ušní tepny pro kontinuální záznam krevního tlaku, možnost vyšetřování tepenných krevních plynů a souvislou infuzi balancovaného krystaloidního roztoku (Plasmalyte, Baxter SA, Belgie, 3 ml/kg/h),

anestetik a svalových relaxancií. Střední arteriální tlak (sTK) byl udržován v hodnotách < 55 mmHg infuzí noradrenalinu dle potřeby.

Po hemodynamické stabilizaci po úvodu do celkové anestézie byla zvířatům provedena tracheostomie a zavedena tracheální kanyla o vnějším průměru 2,5 mm bez těsnícího balónku mezi třetí a čtvrtý tracheální prstenec. Po kontrole správné pozice tracheální kanyly poslechem byla zahájena umělá plicní ventilace použitím anestetického přístroje (Cirrus Trans2/Vent 2, Datex, Helsinki, Finsko) s primárním nastavením tlakově kontrolované ventilace, pozitivního tlaku na konci výdechu 3 cm H₂O (nulová hodnota nebyla možná pro technické nastavení ventilátoru), dechové frekvence 40 dechů/min a dechového tlaku 13 – 16 cm H₂O dle hmotnosti králíka, EtCO₂ a výsledků analýzy krevních plynů v tepenné krvi. Střední arteriální tlak (sTK), srdeční frekvence a teplota v konečníku byly zaznamenávány v průběhu experimentu v pravidelných intervalech po pěti minutách. Teplota byla udržována v rozmezí 38,5 – 39,5 °C použitím vyhřívané podložky a izolační příkrývky. Balancovaná anestézie byla udržována isofluranem 0,6 – 1,0 objemových procent (Forane, AbbVie Inc., Chicago, IL, USA) v nosné směsi 1 litr/min kyslíku a 1,2 litru/min vzduchu, tedy inspirační koncentrací kyslíku 50 – 55 %, souvislou intravenózní infuzí fentanylu v dávce 0,4 µg/kg/min (Fentanyl Torrex, Chiesi Pharmaceuticals GmbH, Vienna, Rakousko) a blokátorem svalového přenosu pipecuronium bromide v dávce 0.6 mg/kg/h (Arduan, Gedeon Richter Plc., Budapešť, Maďarsko).

Každé zvíře bylo po uvedení do celkové anestézie přetočeno do supinační polohy a byla mu oholena pravá temporo–parieto–okcipitální oblast hlavy. Byl proveden kožní řez a řez lebečním periostem. Krvácení bylo ošetřeno bipolární elektrokoagulací. Okraje odkryté oblasti byly vymezeny mediální rovinou, bází pravého boltce, *protuberantia occipitalis externa* a pravým dolním nadočnicovým výběžkem. Byla vyvrtána 3 mm široká kraniotomie skrze exponovanou lebku a dále rozšířena peánem typu moskito a Kerrisonovými štípacími kleštěmi. Krvácení z diploe bylo zastaveno použitím kostního vosku. Dura mater byla vystřižena mikronůzkami. Rozměry kraniálního okénka byly přibližně 12 × 8 mm s neporušenou arachnoideou při bázi kraniotomie. Během 15 minutového stabilizačního období po kontrole krvácení byla kraniotomie vyplachována fyziologickým roztokem o teplotě 37 °C, zaznamenávána hemodynamická data, provedena analýza krevních plynů z tepny (parciální tlaky kyslíku, oxidu uhličitého, acidobazická rovnováha, natrémie, chloridémie, glykémie, hladina hemoglobinu, hematokrit) a odběr na stanovení syndekanu–1. Po skončení experimentu byla zvířata utracena letální dávkou thiopentalu (50 mg/kg, VUAB Pharma a.s., Roztoky, Česká republika).

Dle našeho protokolu byla zvířatům podána intravenózní infuze roztoku 10 % NaCl (B. Braun Melsungen AG, Německo) lineárním dávkovačem (BBraun Medical Inc., 824 Twelfth Avenue Bethlehem, Pensylvánie, USA) v dávce 5 ml/kg během 20 minut.

Hodnoty sublingvální a piální mikrocirkulace mozku byly změřeny vždy 2x. První bylo před zahájením infuze (T1) a druhé 20 minut po infuzi 10 % NaCl (T2). K záznamu mikrocirkulace byl použit videomikroskop (KK kamera, Research Technology Limited, Alliance Court, Honiton, Velká Británie) fungující na principu SDF (Side-stream Dark Field imaging). Analýza EG byla provedena automaticky programem GlycoCheck (GlycoCheck, Maastricht, Nizozemí) poskytujícím parametr PBR (další popis této metody viz kapitola 1.6.2).

Hladiny syndekanu-1 v plazmě a v moči byly analyzovány metodou ELISA (Rb SDC1/CD138, Blue gene, Čína) dle návodu výrobce. Dále byl použit analyzátor krevních plynů (ABL 800FLEX, radiometer, Dánsko) a osmometr (Arkray, Japonsko).

Pro statistické zhodnocení byl proveden test pro normalitu dat D'Agostino–Pearson omnibus testem. Data jsou prezentována jako průměr a směrodatná odchylka, nebo medián a interkvartilové rozpětí. Studentův jednovýběrový t-test byl použit pro zhodnocení bazálních dat a párový Studentův t-test a Wilcoxonův test byly použity pro porovnání mezi skupinami. Pearsonův korelační koeficient byl použit pro ozřejmění vztahu mezi měřenými veličinami. Hodnota $p = 0,05$ byla považována za statisticky významnou.

3.2 Klinické studie

3.2.1 Vliv tekutinové výzvy 500 ml fyziologického roztoku na endoteliální glykokalyx v sublingvální mikrocirkulaci u zdravých dobrovolníků – pilotní studie

3.2.1.1 Úvod a cíle studie

Na základě literárních údajů z posledních let a z našich předchozích prací je možné se domnívat, že jedním z vlivů potenciálně narušujících integritu EG může být intravenózní podání tekutin. To má své nežádoucí účinky, podobně jako podání jakýchkoli jiných farmak [116]. Otázka správné indikace a výběru infuzního roztoku i s ohledem na interakci s mikrocirkulací je vysoce aktuální. Změny koncentrace sodíku v krevní plazmě (hypernatrémie) vedou po navázání Na^+ iontů do struktury EG k narušení makromolekul heparansulfátu, a tím ke ztenčení a malfunkci EG po podání takového roztoku [19]. V literatuře je popsáno, že rychlá intravenózní infuze náhradního roztoku způsobující byť krátkodobou hypervolémií vede k degradaci EG. Uváděnými mechanismy jsou ischemicko–reperfuční

poškození, mechanické namáhání endoteliálních buněk kapilár a zvýšená produkce atriálního natriuretického peptidu (ANP), který EG degraduje [117]. Vzhledem k výše uvedenému by mělo být možné po podání rychlé infuze fyziologického roztoku (F 1/1) zjistit a kvantifikovat poškození EG těmito mechanismy.

Cílem naší práce bylo zhodnotit vliv nitrožilně podané infuze na EG. Hypotézou naší práce bylo, že rychlé podání 500 ml F 1/1 povede ke změně hodnoty PBR zdravých dobrovolníků.

3.2.1.2 Metody, kohorta pacientů a statistická analýza

Prospektivní nerandomizovaná studie probíhala ve dvou fakultních nemocnicích (FN): FN Hradec Králové a FN Plzeň po souhlasném vyjádření etické komise obou institucí (FN Hradec Králové: 17. 7. 2014, jednací číslo 201408 S15P; FN Plzeň: 12. 8. 2014, jednací číslo nebylo vydáno). Kohortu tvořili zdraví dospělí dobrovolníci (muži a ženy), kteří podepsali informovaný souhlas se studií. Vyřazovací kritéria byla: přítomnost systémového nebo jiného chronického onemocnění, požití jakékoli systémové medikace 72 hodin před provedením studie, nadměrný fyzický nebo psychický stres nejméně 48 hodin před provedením studie, kouření a akutní onemocnění.

Dobrovolníkům byla zavedená žilní kanyla o velikosti 20 G (BBraun, Melsungen, Německo) na předloktí (strana dle preference dobrovolníka) a maximální rychlostí byla bolusově podána infuze 500 ml F 1/1 (NaCl 0,9 %, BBraun, Melsungen, Německo) o pokojové teplotě za použití přetlakové manžety s tlakem 300 mmHg. Před podáním infuze – čas T1, byla odebrána základní demografická data, neinvazivně změřen krevní tlak, pulz a natočen záznam sublingvální mikrocirkulace pro automatizované stanovení parametru PBR. Hodnota tlaku a pulzu a záznam mikrocirkulace byly provedeny v čase T2 bezprostředně po ukončení podávání infuze.

Vyhodnocení parametru PBR bylo automatické, použitím software GlykoCheck (GlykoCheck, Maastricht, Nizozemí) bližší popis metodiky viz kapitola 1.6.2. Pro zhodnocení PBR v každém časovém bodě byl použit průměr vždy dvou měření z každé strany jazyka.

Pro statistické zhodnocení dat byl použit program Graph Pad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., CA, USA). Velikost souboru byla kalkulována na 12 dobrovolníků (síla testu 0,9, rozdíl mezi měřeními 0,5 jednotky, směrodatná odchylka 0,22, hladina významnosti 0,05). Normalita dat byla hodnocena D'Agostino–Pearsonovým omnibus testem. Výsledky po zprůměrování hodnot obou měření byly vyhodnoceny párovým Studentovým t-testem na hladině významnosti $p = 0,05$.

3.2.2 Neuraxiální anestézie poškozují endoteliální glykokalyx méně než celková anestézie u pacientů operovaných pro náhradu kyčelního nebo kolenního kloubu

3.2.2.1 Úvod a cíle studie

Změny EG ve vztahu k anestézii a perioperační medicíně zatím nebyly detailně prozkoumány [118]. Více informací o různých strategiích perioperační péče [119] může významně změnit náš pohled na anestézii a s ní spojené intervence a jejich dopad na EG a mikrocirkulaci. Cílem naší prospektivní multicentrické nerandomizované studie bylo popsat změny PBR jako *in vivo* nepřímého ukazatele mohutnosti vrstvy EG u pacientů podstupujících náhradu kyčelního, nebo kolenního kloubu v celkové anestézii (GA), nebo neuraxiální anestézii (NA). Předpokládali jsme, že NA poškodí EG méně než GA, jelikož postrádá oxidační stres způsobený celkovými anestetiky.

3.2.2.2 Metody, kohorty pacientů a statistická analýza

Prospektivní observační studie byla schválena etickou komisí FN Hradec Králové (17. 7. 2014, jednací číslo 201408 S15P) a FN Plzeň (12. 8. 2014, jednací číslo nebylo vydáno) a registrována na webovém portálu ClinicalTrials.gov s identifikačním označením NCT02783443. Studie probíhala ve Fakultní nemocnici Hradec Králové a Fakultní nemocnici Plzeň.

Do studie byli zařazeni dospělí pacienti podstupující náhradu kyčelního, nebo kolenního kloubu v GA nebo NA. Pacienti byli do studie zařazováni konsekutivně během předanestetické vizity v období od října 2015 do prosince 2016. Zařazovací kritéria byla: věk nad 18 let, klasifikace fyzického stavu pacienta dle ASA (*American Society of Anesthesiologists*) 1 – 3 a anamnéza negativní na onkologické onemocnění. Vyřazovací kritéria byla: pacientův nesouhlas, aktivní kouření cigaret, zrušení operace nebo pacientův nesouhlas s druhým vyšetřením po operaci. Všichni zařazení pacienti podepsali informovaný souhlas se studií. Pacienti byli vyšetřováni jedním lékařem pověřeným sběrem dat do studie. Skupina pacientů GA měla premedikaci morfinem 0.1 mg/kg (Morphine, BB Pharma, Praha, Česká republika) v intramuskulární injekci. Indukce do celkové anestézie byla provedena intravenózním podáním propofolu v dávce 2 mg/kg (Propofol, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Německo), sufentanilu v dávce 0,2 µg/kg (Sufentanil Torrex, Chiesi CZ, Prague, Česká republika) a atrakuria v dávce 0,4 mg/kg (Tracrium, Aspen Pharma, Dublin, Irsko). Dýchací cesty byly zajištěny orotracheální intubací. Balancovaná anestézie a analgezie byly udržovány sevofluranem v dávce MAC 0,7 – 1

(Sevorane, AbbVie, Praha, Česká republika) v nosné směsi kyslíku se vzduchem s vdechovanou koncentrací kyslíku 40 objemových procent a bolusy sufentanilu v dávce 0,1 µg/kg. Pro peroperační tekutinovou terapii byl použit roztok balancovaného krystaloidu (Ringerfundin, BBraun, Melsungen, Německo) v základní infuzi rychlostí 2 ml/kg/hod. Bolusy tohoto roztoku byly dále podávány dle peroperační krevní ztráty. Pacientům v NA skupině byla podána premedikace *per os* 1,5 mg bromazepamu (Lexaurin, Kabu Pharma, Praha, Česká republika). Subarachnoideální anestézie byla provedena lumbální punkcí jehlou se skoseným hrotem (Quinke needle, 25G, BBraun, Melsungen, Německo) a intratekálním podáním 2 ml 0,5 % levobupivakainu (Chirocaine, AbbVie, Praha, Česká republika) a 2,5 µg sufentanilu (podání mimo SPC). Tekutinová terapie byla vedena balancovaným krystaloidem se základní rychlostí infuze 2ml/kg/hod s bolusovým podáním v průběhu operace dle peroperační krevní ztráty a poklesu tlaku po indukci subarachnoidální anestézie. Peroperačně byla pacientům podána sedace midazolamem v nitrožilních bolusových dávkách 1 mg midazolamu (Midazolam, Accord Healthcare, North Horrow, Velká Británie) a 5 µg sufentanilu. Při poklesu saturace kapilární krve (měřeno pulzním oxymetrem) byl podáván kyslík obličejovou maskou s minutovým průtokem 2 – 5 litrů za minutu. V obou skupinách byl udržován střední arteriální tlak v rozmezí ± 20 % dle základního tlaku změřeného před operací. Při poklesu tlaku byl podáván bolusově efedrin (Ephedrin biotika, BB Pharma, Praha, Česká republika). U pacientů s náhradou kolenního kloubu v NA skupině byl peroperačně použit turniket naložený na stehno na tlak 220 mmHg. Kostní cement byl použit dle typu zvolené kloubní náhrady.

Primární sledovaný ukazatel byla hodnota PBR 2 hodiny po operaci. Dále byla zaznamenána demografická data (věk, pohlaví, výška, váha), anamnestická data (onemocnění kardiovaskulárního systému, hypertenze na medikaci, diabetes mellitus na perorálních antidiabetických lécích, na inzulinu nebo na dietě), léková anamnéza (betablokátory, statiny, ACE inhibitory, blokátory kalciových kanálů a kortikosteroidy) a laboratorní vyšetření před operací (krevní obraz, základní biochemie séra – natremie, glykémie a kreatininémie). Během operace byly monitorovány: tepová frekvence, krevní tlak, pulzní oxymetrie, tělesná teplota v axile, typ anestézie, typ a délka operačního výkonu, peroperační krevní ztráta, množství a typ podaných náhradních nitrožilních roztoků a transfuzních jednotek (podaných do 2 hodin po operaci) a malé a velké perioperační komplikace. Velká perioperační komplikace byla definována jako neplánované přijetí na jednotku intenzivní péče (JIP) během 48 hodin po operaci a malou perioperační komplikaci definoval zápis do dekurzu pacienta bez nutnosti přijetí na JIP.

EG byl vyšetřen před operací (T1) a dvě hodiny po operaci (T2). Pacienti si před vyšetřením vypláchli ústa vlažnou vodou. Sublingvální mikrocirkulace byla vyšetřena

videomikroskopickou metodou na principu SDF a výška EG byla vyhodnocena automaticky programem GlycoCheck udáním parametru PBR v μm . Detailní popis metodiky viz kapitola 1.6.2.

Velikost souboru byla vypočítána na 52 pacientů (dle rozdílu v PBR mezi skupinami pacientů, chyby alfa I = 0,05 a síly studie 0,99). Měli jsme cíl zařadit 60 pacientů po 30 v obou skupinách dle typu anestézie. Pro statistickou analýzu byl použit program Graph Pad Prism v6.0c (GraphPad Software, Inc., CA, USA). Veškerá data byla testována na normalitu D'Agostino–Pearsonovým omnibus testem, prezentována jako průměr a směrodatná odchylka, nebo medián a kvartilové rozpětí. Pro analýzu dat v jednotlivých skupinách a mezi skupinami byly použity nepárový a párový Studentův t-test a Z-test pro proporcionální analýzu dat mezi dvěma populacemi. P hodnota ≤ 0.05 byla považována za statisticky významnou.

3.2.3 Analýza sublingválního mikrovaskulárního endoteliálního glykokalyx u pacientů v intenzivní péči – prospektivní observační studie

3.2.3.1 Úvod a cíle studie

Klinické studie o dynamice změn EG u pacientů v průběhu intenzivní péče jsou ojedinělé [120,121]. Práce zabývající se vlivem postupů přístrojové podpory orgánových funkcí jsme v dostupných zdrojích nenalezli. Nejvíce údajů je z oblasti mimotělního oběhu u srdečních operací [122]. S ohledem na současné poznatky o degradaci EG u kritických stavů jsme formulovali hypotézu, že existuje vztah mezi mírou degradace EG a tíží klinického stavu.

Cílem studie bylo sledování dynamiky EG u pacientů přijatých do intenzivní péče a posouzení vztahu mezi stavem EG, závažností klinického stavu a přítomností vybraných intervencí přístrojové podpory či modulace orgánových funkcí.

3.2.3.2 Metody, kohorta pacientů a statistická analýza

Prospektivní observační monocentrická studie byla schválena Etickou komisí Fakultní nemocnice Hradec Králové (č.j. 201408 S15P). U všech pacientů zařazených do studie byl získán informovaný souhlas s účastí ve studii (u ventilovaných pacientů byl získán po zlepšení stavu a extubaci, případně od rodinných příslušníků).

Plánovaná doba pro zařazování pacientů do studie byla 12 měsíců (1. 1. 2016 – 31. 12. 2016), reálné zařazování pacientů probíhalo až do 31. 8. 2018. Studie probíhala na lůžkovém oddělení (dále uváděno jako JIP) Kliniky anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny Fakultní nemocnice Hradec Králové.

Do studie byli zařazeni dospělí pacienti s potřebou invazivní ventilační podpory při přijetí a předpokladem doby pobytu na JIP delší než 7 dní. Sledované ukazatele byly: typ/kategorie pacientů (trauma, pooperační stav, nechirurgický stav – tzv. interní profil, stav po KPR), přítomnost vybraných komorbidit (*diabetes mellitus* II. typu, arteriální hypertenze, ischemická choroba srdeční, hyperlipidémie, hypotyreóza), APACHE II skóre při přijetí, SOFA skóre (nejnižší hodnota v průběhu prvních 24 hodin od přijetí), přítomnost sepse a septického šoku, přítomnost kontinuální eliminační metody náhrady ledvin (CRRT), přítomnost cílené regulace tělesné teploty (protokol řízené hypotermie u pacientů po KPR), kumulovaná bilance tekutin (korigovaná na tělesnou hmotnost) jednotlivé dny pobytu na JIP, vznik deliria v průběhu pobytu na JIP (definováno existencí záznamu o rozvoji delirantního stavu s použitím farmakologické, nebo nefarmakologické intervence ve zdravotnické dokumentaci), klinický výsledek (přežití, nepřežití), PBR - parametr nepřímého posouzení výšky vrstvy EG (popis viz kapitola 1.6.2) byl měřen při příjmu na JIP (PBR–b), 1. den (PBR–1), 3. den (PBR–3), 5. den (PBR–5) a 7. den (PBR–7) pobytu na JIP (Obr. 13).

Obr. 13: Sledování parametru PBR v čase



PBR – perfundovaná hraniční zóna (*Perfused Boundary Region*).

Kalkulace minimálního počtu souboru 30 pacientů vycházela z předpokladu rozdílu v hodnotách PBR jako nepřímého indikátoru poškození EG mezi zdravými dobrovolníky a pacienty v kritickém stavu, za předpokladu korelace mezi tíží klinického stavu a mírou poškození EG (odhad korelačního koeficientu 0,6), definování chyby typu I = 0,05 a síly studie = 0,9.

Kontinuální data jsou prezentována jako průměr a směrodatná odchylka (SD), hodnoty PBR jsou prezentovány jako medián a interkvartilové rozpětí (IQR). Rozdíly mezi skupinami byly podle typu dat kalkulovány, srovnávány nepárovým Studentovým t-testem, Mann Whitneyovým pořadovým testem a analýzou rozptylu jednoduchého třídění (*One-Way ANOVA*). K posouzení korelace mezi hodnotou PBR a hodnotou APACHE II, SOFA a tekutinové bilance byl použit Pearsonův korelační koeficient s intervalem spolehlivosti 95 % (CI 95 %). K posouzení schopnosti PBR (senzitivita a specificita) predikovat septický šok nebo pozitivní tekutinovou bilanci byla kalkulována ROC křivka (*Receiver Operating Characteristic*). Za statisticky významné byly považovány rozdíly s hodnotou $p < 0,05$.

3.2.4 Vliv podání tukové emulze v rámci parenterální výživy na integritu endoteliálního glykokalyx u pacientů po chirurgickém výkonu – mikroskopická a biochemická pilotní studie

3.2.4.1 Úvod a cíle studie

Poškození EG hraje důležitou roli při vzniku aterosklerózy [123–125] a je zajímavé, že terapie rosuvastatinem vedla k částečné obnově poškozené EG [126]. Mnozí se důkazují o tom, že EG integruje signalizace různých biologických impulzů pro udržení své celistvosti, např. smykové tření, působení chemokinů, cytokinů a v neposlední řadě S1P [57,127]. Nitrožilní podání tukové emulze je esenciální součástí parenterální výživy (PN). Její podání se zdá být bezpečné, pacienti dobře tolerované a bylo dokázáno, že snižuje zánětovou odpověď u chirurgických pacientů s těžkými zánětlivými stavy [128]. Nicméně dosud nebyla publikována žádná práce popisující vliv tukové emulze jako součást PN na integritu EG.

Cílem studie bylo zhodnotit efekt podání tukové emulze v šestihodinové infuzi pacientům na JIP po chirurgickém výkonu použitím videomikroskopické metody a analýzou hladin rozpadových produktů EG v plazmě syndekanu–1 a syndekanu–4.

3.2.4.2 Metody, kohorta pacientů a statistická analýza

Monocentrická prospektivní observační studie byla provedena na lůžkovém oddělení ARO Kliniky anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny, JIP chirurgické kliniky a JIP kardiologické kliniky Fakultní nemocnice Hradec Králové v období od 1. 1. 2018

do 31. 3. 2018. Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas se studií, která byla schválena lokální etickou komisí. Studie probíhala v souladu s Helsinskou deklarací lidských práv, aktuální verze správné klinické praxe a nařízení dle direktivy klinických studií. Číslo registrace databázi clinicaltrials.gov bylo NCT03216850.

Zařazující kritéria do studie byla věk mezi 18 a 85 lety, neschopnost per orálního či enterálního příjmu potravy po přijetí na JIP dle aktuálních doporučení ESPEN pro parenterální výživu v chirurgii [129]. Vylučující kritéria byla: předchozí PN před vstupem do studie, klinické či laboratorní známky orgánové hypoperfuze, alergie na ryby, vejce, sóju, podzemnici olejnou či jakoukoli jinou aktivní ingredienci tukové emulze použité ve studii, hyperlipidémie (cholesterol nad 5 mmol/l), hypertriglyceridémie (> 2 mmol/l), jaterní selhávání, chronická pankreatitida, chronická renální insuficience, chemoterapie v anamnéze do 1 měsíce před zařazením do studie a podání propofolu během 24 hodin před zařazením do studie.

Pacientům zařazeným do studie byla centrálním žilním katetrem podávána PN z „all-in-one“ obsahující SMOFlipid 20 % (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Německo) po dobu 6 hodin. Zbytek obsahu vaku (tedy aminokyseliny, glukóza, elektrolyty, vitamíny a stopové prvky) byl podán až následně. Dávka tuku v infuzi byla 1 g/kg tělesné hmotnosti. Složení SMOFlipid 20 % uvádí tabulka 16 v kapitole 4.2.4.

U zařazených pacientů byla zaznamenána demografická data a osobní anamnéza. Fyziologické funkce byly zaznamenávány kontinuálně: krevní tlak, tepová frekvence, pulzní oxymetrie. Vybrané laboratorní hodnoty byly zaznamenány před podáním tukové emulze (čas T0) a 30 minut po šestihodinové infuzi tukové emulze (čas T6). Vzorky krve byly získány přes arteriální linku, pokud byla zavedena, jinak preferenčně přes periferní žilní vstup. Z laboratorních hodnot byly vyšetřovány sérové koncentrace: triacylglyceroly (TAG), lipoproteiny s vysokou (HDL) a nízkou denzitou (LDL), cholesterol, elektrolyty a glykémie. Dále byl odebrán alikvot na určení hladiny syndekanu-1 a syndekanu-4 metodou ELISA (RayBiotech, Norcross, Georgia, USA, Human Syndecan ELISA kit) v časech T0 a T6.

Použitá videomikroskopická metoda nepřímého hodnocení výšky vrstvy EG byla založena na principu SDF a získané nahrávky byly vyhodnoceny automatickým programem GlycoCheck určující parametr PBR (viz kapitola 1.6.2).

Bylo plánováno zařadit 15 pacientů dle kalkulované velikosti souboru pilotní studie. Výsledky byly sumarizovány za použití deskriptivní statistiky a jsou prezentovány jako průměr (SD) pro kontinuální data, nebo medián (IQR) pro data bez normálního rozložení. Normalita dat byla testována Shapiro–Wilk testem. Pro zjištění rozdílu mezi skupinami měření (T0 a T6) byl použit párový Studentův t-test. Pearsonův a Spearmanův korelační koeficient byly použity pro zjištění

vztahu mezi hodnotami PBR a hladinami syndekanu-1 a syndekanu-4. Hladina významnosti testů byla $p = 0,05$. Byly použity statistické programy MedCalc verze 7.6.0 (MedCalc Software, Ostend, Belgie) a Graph Pad Prism 6c pro iOS (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

3.2.5 Vliv poruch metabolismu lipidů na endoteliální glykokalyx – pilotní observační studie

3.2.5.1 Úvod a cíle studie

Vliv poruch lipidového metabolismu jako proaterogenního vlivu na EG dosud nebyl prozkoumán. Proto jsme provedli pilotní klinickou observační studii u pacientů se dvěma typy poruchy metabolismu lipidů: pacienti s léčenou korigovanou dyslipoproteinémií a pacienti s dlouhodobou domácí parenterální výživou (DDPV).

Cílem naší pilotní studie bylo popsat kvalitu EG u pacientů s dvěma typy poruchy lipidového metabolismu: pacienti s dyslipoproteinémií léčenou statiny a pacienti na DDPV. Pro studii byla použita kombinace neinvazivní videomikroskopie a detekce rozpadového produktu EG v séru, syndekanu-1 a syndekanu-4. Dále bylo naším cílem najít možný vztah mezi poškozením EG a mírou poruchy lipidového metabolismu, kterou jsme předpokládali hlubší u pacientů na DDPV.

3.2.5.2 Metody, kohorty pacientů a statistická analýza

Kohorty tvořili 2 skupiny pacientů: 10 pacientů z lipidologické poradny s dyslipoproteinémií léčenou statiny (skupina dyslipidémie) a 10 pacientů z poradny pro DDPV podávanou přes Broviacův katetr (skupina DDPV), kteří měli zachovalý příjem *per os*.

Pilotní prospektivní observační studie byla provedena ve Fakultní nemocnici Hradec Králové po schválení lokální etickou komisí. Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas.

Vylučovací kritéria byla následující: nesouhlas se studií, akutní onemocnění, aktivní kuřák (více než 5 cigaret týdně), aktivní onkologické onemocnění, akutní infekční onemocnění.

EG byla vyšetřena dvěma postupy, jejichž kombinace se nám osvědčila. K nepřímému morfologickému zhodnocení EG byla použita světelná mikroskopie založená na principu SDF,

kterou byla vyšetřena mikrocirkulace sliznice pod jazykem. Výška EG byla z nahrávek mikrocirkulace vyhodnocena automaticky programem GlycoCheck udáním parametru PBR (detailní popis metody viz kapitola 1.6.2). Koncentrace rozpadového produktu EG – syndekanu-1 a syndekanu-4 byla stanovena pomocí metody ELISA (RayBiotech, Norcross, Georgia, USA, Human Syndecan ELISA kit).

Statistická analýza byla provedena programem GraphPad Prism verze 8.0.1 pro iOS (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Data byla testována pro normalitu D'Agostino-Pearson omnibus testem (na hladině významnosti $p = 0.05$) a jsou prezentována ve tvaru průměr (směrodatná odchylka), nebo medián (interkvartilový rozptyl). Pro porovnání dat mezi dvěma skupinami byl použit nepárový dvouvýběrový Studentův t-test a Mann-Whitney test. Hodnoty $p < 0,05$ byly považovány za statisticky významné.

3.2.6 Hodnocení stavu endoteliální glykokalyx u zdravých dobrovolníků – observační studie

3.2.6.1 Úvod a cíle studie

EG byl dosud předmětem studií zaměřujících se na patologické stavy (intenzivní péče, velké chirurgické výkony, chronické poškození *diabetes mellitus*, aterosklerotická choroba) [44,130–132] a iatrogenní poškození [117,133,134]. Data popisující stav EG u zdravých jedinců jsou však vzácná [135]. Většina studií je nastavena tak, že používá jejich účastníky jako kontroly sobě samým [136–139] a jen málo studií zahrnuje i kohortu zdravých jedinců jako samostatnou kontrolní skupinu [140–142]. Proto jsme provedli prospektivní observační studii na skupině mladých zdravých jedinců a popsali stav EG nepřímo mikroskopickou (zhodnocením parametru PBR) a biochemickou (hladiny syndekanu-1) metodou. Naše výsledky jsme srovnali s daty dostupnými v literatuře, abychom našli reprezentativní hodnoty zdravých jedinců, které by bylo možno použít ke srovnání v intervenčních studiích.

3.2.6.2 Metody, kohorta dobrovolníků a statistická analýza

Kohortu dobrovolníků tvořilo 21 studentů druhého ročníku Lékařské fakulty v Hradci Králové Univerzity Karlovy. Studie byla schválena etickou komisí Fakultní nemocnice Hradec Králové a děkanem lékařské fakulty. Dobrovolníci nevykonávali den předem zvýšenou

fyzickou námahu a měli lehkou snídani (jeden kus pečiva). Byli to nekuřáci s negativní osobní anamnézou a bez chronické medikace. Všichni dobrovolníci podepsali informovaný souhlas se studií. EG byl hodnocen nepřímo videomikroskopicky v sublingvální mikrocirkulaci použitím videomikroskopu na principu SDF a získané nahrávky byly hodnoceny automaticky programem GlycoCheck, který poskytl parametr PBR (detailní popis metody viz kapitola 1.6.2). Biochemickou analýzou séra byly získány hladiny rozpadového produktu EG syndekanu-1 metodou ELISA (RayBiotech, Norcross, Georgia, USA, Human Syndecan ELISA kit). Studenti si vzájemně odebrali vzorky krve (v rámci výuky předmětu Fyziologie).

Ke statistické analýze získaných dat byl použit program Graph Pad Prism verze 6.0c (GraphPad Software, Inc., CA, USA). Výsledky byly testovány na normalitu D'Agostino-Pearsonovým omnibus testem a jsou prezentovány jako průměr (SD), nebo medián (IQR). Jednovýběrový Studentův t-test a Wilcoxonův test byly použity pro porovnání získaných dat s populačními mediány (2,01 μm pro PBR a 17,0 ng/ml pro syndekan-1). Hodnota $p \leq 0,05$ byla považována za statisticky významnou.

3.3 Statistické zpracování

K určení počtu pacientů/zvířat k testování hypotéz jednotlivých studií byly použity on-line kalkulátory (www.statisticalcalculation.net, www.statstodo.com). Získaná data byla analyzována pomocí statistického programu Graph Pad Prism verze 5, 6 a 8 pro operační systém iOS (GraphPad Software, Inc., CA, USA) a MedCalc (verze 14.8.1). Podle povahy dat a testované hypotézy byly použity odpovídající statistické metody (viz popis u jednotlivých studií). Ve všech klinických studiích byla po zařazení prvních 10 pacientů provedena předběžná analýza výsledků pro případnou úpravu velikosti souboru s cílem dosažení optimálního počtu pacientů k potvrzení nebo vyloučení testované hypotézy. V žádné ze studií nebylo nutno počet pacientů dle předběžné analýzy upravovat.

4. VÝSLEDKY

4.1 Experimentální studie

4.1.1 Změny výšky vrstvy endoteliálního glykokalyx během náhlé zástavy oběhu na experimentálním modelu srdeční zástavy u prasete domácího

Průměrná hmotnost prasat byla 33 kg. Kardiopulmonální resuscitace trvala v průměru 16 minut a 55 vteřin. Kompletní data parametru PBR byla získána u 11 prasat a prošla testem normality. Zvýšení PBR po návratu spontánní cirkulace, ani 20 minut poté, nebylo statisticky významné (ANOVA, $p = 0,47$). PBR před navozením NZO bylo 2,13 μm (0,21) a PBR_ROSC bylo 2,21 μm (0,27). PBR_ROSC_20 bylo 2,18 μm (0,19), data jsou prezentována jako průměr (směrodatná odchylka). Hodnoty parametru PBR nekorelovaly s délkou NZO (Pearsonův korelační koeficient $r = -0,16$). Data o stavu EG uvádí tabulka 1 a Graf 1. Hodnoty monitorovaných fyziologických funkcí v průběhu experimentu uvádí tabulka 2.

Tab. 1: Výsledky stavu endoteliálního glykokalyx po náhlé zástavě oběhu

PBR [μm]	Průměr	Směrodatná odchylka	Medián	Interkvartilové rozpětí	95% CI průměru
PBR	2,13	0,21	2,11	1,97 – 2,27	2,05 – 2,21
PBR_ROSC	2,21	0,27	2,19	2,03 – 2,42	2,10 – 2,31
PBR_ROSC_20	2,18	0,19	2,22	1,99 – 2,31	2,10 – 2,27

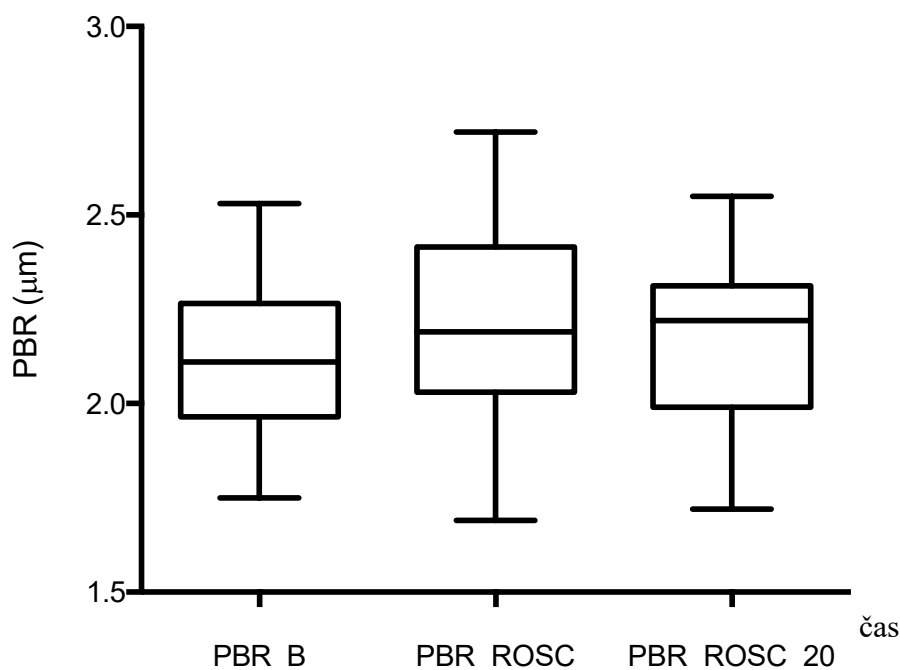
PBR_B – základní hodnota PBR, PBR_ROSC – hodnota PBR po návratu spontánní cirkulace, PBR_ROSC_20 – hodnota PBR ve 20. minutě po obnově spontánní cirkulace. PBR – perfundovaná hraniční zóna (*Perfused Boundary Region*). 95 % CI – intervaly spolehlivosti.

Tab. 2: Data monitorovaných fyziologických funkcí v průběhu experimentu

Fyziologické funkce	Základní hodnoty	Po obnově cirkulace	20 minut po obnově cirkulace	p hodnota
DF	25,1 (8,67)	31,33 (14,35)	30,83 (11,65)	0,36
SpO ₂	98,33 (2,43)	97,00 (3,41)	98,50 (94,50 – 100,00)	0,49
EtCO ₂	5,95 (0,73)	5,55 (5,63 – 6,53)	5,41 (1,05)	0,26
TF	96 (88,25 – 108,5)	114,20 (25,6)	96,83 (24,73)	0,16
STK	95,25 (8,45)	85,50 (60,5 – 105,3)	53,17 (10,15)	< 0,0001
DTK	57,42 (8,3)	44,83 (12,40)	34,50 (9,22)	< 0,0001
sTK	70,03 (8,16)	58,83 (43,42 – 73,08)	40,72 (9,08)	< 0,0001
CVPS	13,00 (4,37)	21,17 (3,71)	19,08 (4,52)	0,0001
CVPD	7,33 (3,28)	9,50 (6,00 – 13,00)	11,00 (8,25 – 12,75)	0,08
sCVP	10,00 (9,00 – 11,75)	13,75 (2,49)	14,00 (11,50 – 15,00)	0,004
TT v jícnu	36,31 (0,47)	36,10 (0,64)	36,05 (0,73)	0,56
ICP	15,08 (2,07)	16,00 (13,50 – 17,75)	14,50 (13,00 – 17,00)	0,63

DF – dechová frekvence, SpO₂ – saturace periferní kapilární krve kyslíkem, EtCO₂ – koncentrace oxidu uhličitého na konci výdechu, TF – tepová frekvence, STK – systolický krevní tlak, DTK – diastolický krevní tlak, sTK – střední arteriální krevní tlak, CVPS – centrální žilní tlak v systole, CVPD – centrální žilní tlak v diastole, sCVP – střední centrální žilní tlak, TT – tělesná teplota, ICP – intrakraniální tlak. Výsledky jsou ve tvaru: průměr (směrodatná odchylka), nebo medián (interkvartilové rozpětí). P hodnota náleží testu variací one-way ANOVA.

Graf 1: Výsledky stavu endoteliálního glykokalyx hodnoceny parametrem PBR



Krabicový graf shrnující výsledky stavu EG hodnoceného parametrem PBR. PBR_B – základní hodnota PBR, PBR_ROSC – hodnota PBR po návratu spontánní cirkulace, PBR_ROSC_20 – hodnota PBR ve 20. minutě po obnově spontánní cirkulace. Chybové úsečky představují směrodatnou odchylku a úsečky v krabicových grafech medián. PBR – perfundovaná hraniční zóna (*Perfused Boundary Region*).

4.1.2 Efekt akutně vzniklé hypernatrémie podáním hypertonického roztoku chloridu sodného na endoteliální glykokalyx u králíka

Kompletní výsledky jsme získali u 20 králíků. Mezi základními hodnotami hemodynamiky a laboratorními hodnotami nebyl mezi zvířaty statisticky významný rozdíl (Tab. 3). Taktéž nebyl statisticky významný rozdíl mezi zvířaty co do krevní ztráty během chirurgické přípravy, ani v dávce noradrenalinu. V sérových hladinách sodíku jsme zaznamenali statisticky významný vzestup po podání infuze 10 % NaCl: 140 (3,07) resp. 157 (2,57) mmol/l ($p < 0,0001$) (Tab. 4, Graf 2). Stejně tak v parametru PBR sublingvální mikrocirkulace: 1,98 (0,3) resp. 2,17 (0,18) μm ($p = 0,05$) (Tab. 5, Graf 3). Mezi natrémii a hodnotami PBR v sublingvální mikrocirkulaci byla velmi slabá korelace ($r = 0,35$, 95 % CI 0,08 – 0,58, $p = 0,013$). Hladina sérového syndekanu-1 se zvýšila statisticky nevýznamně: 1,23

(0,36) resp. 1,31 (0,33) ng/l ($p = 0,3$) (Tab. 6, Graf 4). PBR v piální mikrocirkulaci nedoznalo změn po podání 10 % NaCl: 1,87 (0,33) resp. 1,85 (0,36) μm ($p = 0,55$). Vybraná hemodynamické a laboratorní data a výsledky analýzy stavu EG uvádí tabulky 4, 5 a 6.

Tab. 3: Základní hemodynamické a laboratorní hodnoty

Ukazatel	Průměr/medián	SD/IQR	p hodnota
Hmotnost [kg]	2,95	0,24	0,99
STK [mm Hg]	87	13,07	0,84
DTK [mmHg]	66	12,57	0,95
sTK [mmHg]	75	12,43	0,93
TF [/min]	196	31,19	0,98
SpO ₂ [%]	100	100-100	0,14
EtCO ₂ [mmHg]	56	6,1	0,95
Osmo [mmol/l]	297	6,37	0,96
Na [mmol/l]	140	3,07	0,65
Cl [mmol/l]	103	4,6	0,8
Gly [mmol/l]	12,7	1,99	0,97
pH	7,44	0,06	0,98
pCO ₂ [kPa]	5,4	0,61	0,95
pO ₂ [kPa]	23,5	2,6	0,98
BE [mmol/l]	3,3	3,27	0,98
HCO ₃ ⁻ [mmol/l]	27	2,96	0,59
Hb [g/l]	92	8,27	0,88
Htk [poměr]	0,29	0,03	0,68

Data jsou zobrazena jako průměr (směrodatná odchylka), p – hodnoty náleží párovému t-testu a Wilcoxonovu testu. STK – systolický krevní tlak, DTK – diastolický krevní tlak, sTK – střední arteriální krevní tlak, TF – tepová frekvence, SpO₂ – saturace periferní kapilární krve kyslíkem, EtCO₂ – koncentrace oxidu uhličitého na konci výdechu, Osmo – osmolalita, Na – sérová koncentrace sodíku, Cl – sérová koncentrace chloridu, Gly – sérová glykémie, pH – vodíkový exponent, pCO₂ – arteriální parciální tlak oxidu uhličitého, pO₂ – arteriální

parciální tlak kyslíku, BE – přebytek bází (base excess), HCO_3^- – sérová koncentrace bikarbonátu, Hb – koncentrace hemoglobinu, Htk – hematokrit.

Tab. 4: Vybrané laboratorní hodnoty před (T1) a po podání (T2) infuze 10 % NaCl

Ukazatel	T1	T2	p hodnota
Osmo [mmol/l]	297 (6,37)	329 (5,3)	< 0,0001
Na [mmol/l]	140 (3,07)	157 (2,57)	< 0,0001
Cl [mmol/l]	103 (4,6)	122 (3,21)	< 0,0001
Gly [mmol/l]	12,7 (1,99)	11,4 (2,5)	0,001
pH	7,44 (0,06)	7,37 (0,04)	< 0,0001
pCO ₂ [kPa]	5,4 (0,61)	5,8 (0,54)	0,0007
pO ₂ [kPa]	23,5 (2,6)	22,9 (2,43)	0,25
BE [mmol/l]	3,3 (3,27)	- 0,25 (2,63)	< 0,0001
HCO_3^- [mmol/l]	27 (2,96)	25 (2,42)	< 0,0001
Hb [g/l]	92 (8,27)	88 (8,92)	0,01
Htk [poměr]	0,29 (0,03)	0,27 (0,027)	0,02

Data jsou zobrazena jako průměr (směrodatná odchylka), p hodnoty náleží párovému t-testu. Osmo – osmolalita, Na – sérová koncentrace sodíku, Cl – sérová koncentrace chloridu, Gly – sérová glykémie, pCO₂ – arteriální parciální tlak oxidu uhličitého, pO₂ – arteriální parciální tlak kyslíku, BE – přebytek bází (base excess), HCO_3^- – sérová koncentrace bikarbonátu, Hb – koncentrace hemoglobinu, Htk – hematokrit.

Tab. 5: Výsledky analýzy sublingvální a piální mikrocirkulace před (T1) a po podání (T2) infuze 10 % NaCl

Ukazatel	T1	T2	p hodnota
PBR [μm]	1,98 (0,3)	2,17 (0,18)	0,05
syndekan-1[ng/l]	1,23 (0,36)	1,31 (0,33)	0,3
PBR_mozek [μm]	1,88 (0,33)	1,85 (0,36)	0,55

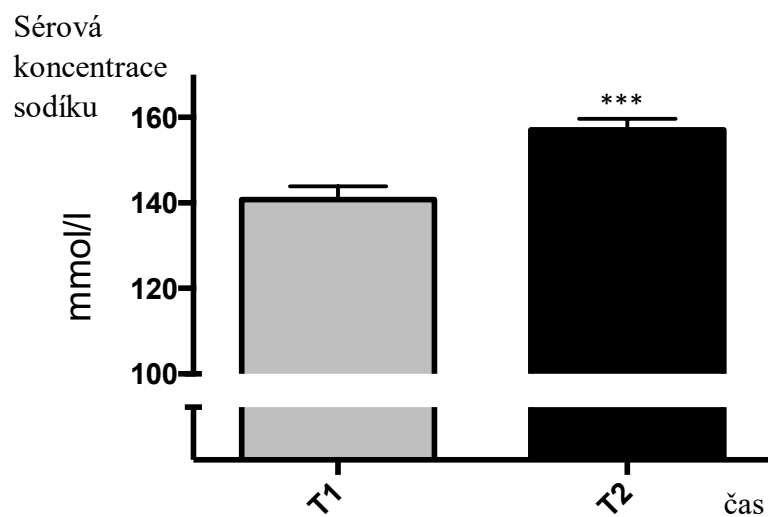
Data jsou zobrazena jako průměr (směrodatná odchylka), p hodnoty náleží párovému t-testu. PBR – perfundovaná hraniční zóna (Perfused Boundary Region) v sublingvální mikrocirkulaci, PBR_mozek – perfundovaná hraniční zóna v piální mikrocirkulaci.

Tab. 6: Monitorovaná hemodynamická data před (T1) a po podání (T2) infuze 10 % NaCl

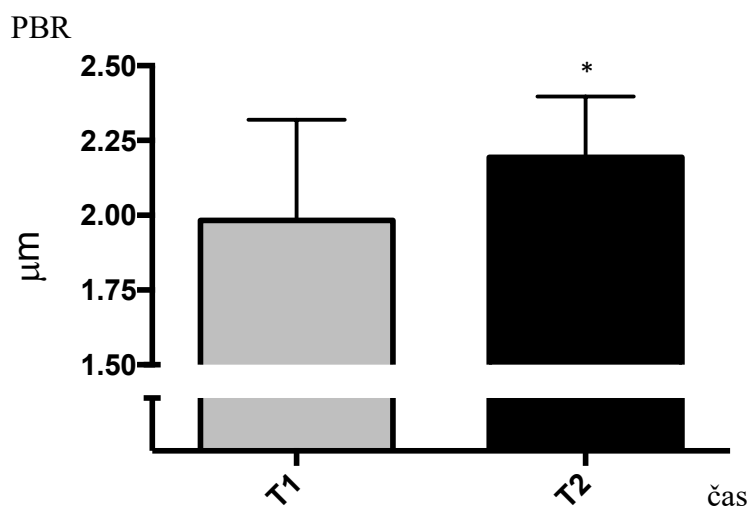
Ukazatel	T1	T2	p hodnota
STK [mmHg]	87 (13,07)	83 (8)	0,19
DTK [mmHg]	66 (12,57)	64 (10,35)	0,45
sTK [mmHg]	75 (12,43)	72 (9,74)	0,38
TF [min^{-1}]	196 (31,19)	223 (20,55)	0,005
SpO ₂ [%]	100 (100-100)	100 (100-100)	0,75
EtCO ₂ [mmHg]	56 (6,1)	58 (6)	0,01

Data jsou zobrazena jako průměr (směrodatná odchylka), medián (kvartilové rozpětí), p hodnoty náleží párovému t-testu a Wilcoxonovu testu. STK – systolický krevní tlak, DTK – diastolický krevní tlak, sTK – střední arteriální tlak, TF – tepová frekvence, SpO₂ – saturace periferní kapilární krve kyslíkem, Et CO₂ – koncentrace oxidu uhličitého na konci výdechu.

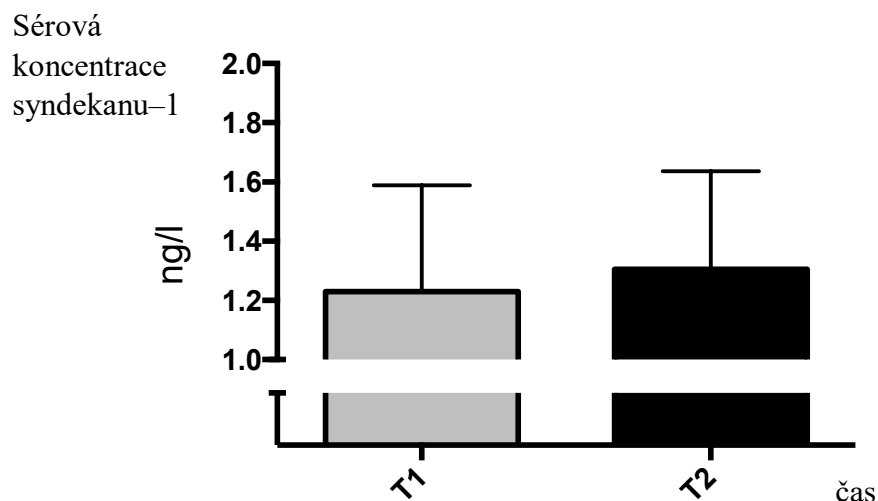
Graf 2: Sérové koncentrace sodíku před (T1) a po podání (T2) infuze 10 % NaCl



Graf 3: Hodnoty perfundované hraniční zóny (PBR) před (T1) a po podání (T2) infuze 10 % NaCl



Graf 4: Sérové koncentrace syndekanu-1 před (T1) a po podání (T2) infuze 10 % NaCl



4.2 Klinické studie

4.2.1 Vliv tekutinové výzvy 500 ml fyziologického roztoku na endoteliální glykokalyx v sublingvální mikrocirkulaci u zdravých dobrovolníků – pilotní studie

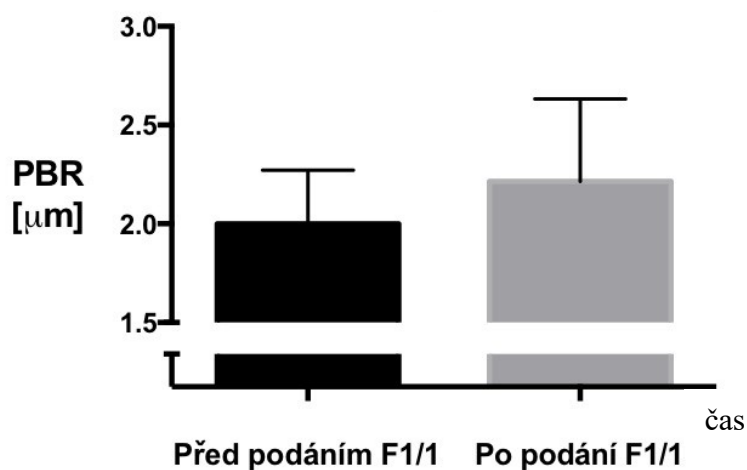
Do studie bylo zařazeno celkem dvanáct dobrovolníků splňujících vstupní kritéria. Průměrný věk dobrovolníků byl 34 let (28 – 64), celkem bylo zastoupeno 9 mužů (75 %) a 3 ženy (25 %), nikdo z dobrovolníků nebyl aktivní kuřák. Každému dobrovolníkovi byl podán jeden tekutinový bolus 500 ml F1/1 pokojové teploty přetlakovou infuzí do žilní kanyly zavedené na paži. Doba infuze nepřesáhla v žádném z případů 10 minut. Každému dobrovolníkovi byla stanovena hodnota PBR dvakrát v každém časovém bodě, všechna měření byla úspěšná. Podání bolusu F 1/1 vedlo ihned ke zvýšení PBR, ale rozdíl nebyl statisticky signifikantní: 2,00 (0,21) resp. 2,21 (0,36) μm , $p = 0,089$ (Graf 5). Po podání tekutinového bolusu se signifikantně snížila srdeční frekvence: 74 (10) resp. 68 (10) tepů za minutu, $p = 0,003$. V případě měření neinvazivního arteriálního tlaku nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl v hodnotách před a po podání tekutinového bolusu (Tab. 7).

Tab. 7: Výsledky analýzy tloušťky endoteliální glykokalyx a vybraná hemodynamická data před (T0) a po podání (T1) infuze F1/1

Ukazatel	Před F1/1 (T0)	Po (T1)	p hodnota
PBR [μm]	2,00 (0,21)	2,21 (0,36)	0,089
STK [mmHg]	131 (14)	127 (13)	0,135
DTK [mmHg]	91 (15)	87 (13)	0,082
sTK [mmHg]	78 (10)	74 (8)	0,133
TF [min^{-1}]	74 (10)	68 (10)	0,003

PBR – perfundovaná hraniční zóna (Perfused Boundary Region), STK – systolický krevní tlak, DTK – diastolický krevní tlak, sTK – střední arteriální tlak, TF – tepová frekvence.

Graf 5: Perfundovaná hraniční zóna (PBR) před (T0) a po podání (T1) infuze F1/1



PBR – perfundovaná hraniční zóna (Perfused Boundary Region), F1/1 – fyziologický roztok (0,9 % NaCl).

4.2.2 Neuraxiální anestézie poškozují endoteliální glykokalyx méně než celková anestézie u pacientů operovaných pro náhradu kyčelního, nebo kolenního kloubu

Do studie bylo zařazeno 63 pacientů, operace jednoho pacienta musela být zrušena pro vznik akutního infarktu myokardu a dva pacienti odmítli druhé vyšetření po operaci kvůli nepříjemného pocitu v ústech z hrotu videomikroskopu. Ve studii tedy bylo ve skupině s celkovou anestézií (GA) 30 pacientů a ve skupině s neuraxiální anestézií (NA) též 30 pacientů. Základní klinická data jsou v Tab. 8. Mezi skupinami nebyl v základních klinických datech statisticky významný rozdíl kromě tělesné hmotnosti, která byla statisticky významně vyšší u pacientů ve skupině GA. Statisticky významný rozdíl nebyl ani ve vybraných laboratorních hodnotách před a po operaci (glykémie, natrémie, kreatininémie, koncentrace hemoglobinu), krevní ztrátě a tekutinové bilanci (Tab. 9). Osobní anamnéza pacientů je shrnuta v Tab. 10. Během operace náhrady kolenního kloubu byl použit turniket ve výši stehna nafouknutý na tlak o 2200 mmHg vyšší než STK pacienta a kostní cement ve skupině NA (9 pacientů).

Mezi hodnotami PBR před operací nebyl statisticky významný rozdíl mezi skupinami: 1,95 μm (0,24) ve skupině NA a 2,02 μm (0,26) ve skupině GA, $p = 0,098$. Dvě hodiny po operaci bylo PBR statisticky významně zvýšeno oproti hodnotě před operací: 2,09 μm (0,19) ve skupině NA a 2,20 μm (0,25) ve skupině GA, $p < 0,001$. Navíc bylo PBR ve skupině GA 2 hodiny po operaci statisticky významně vyšší oproti skupině NA ($p = 0,006$) (Tab. 11, Graf 6). Ve skupině NA měli tři pacienti malou pooperační komplikaci, ve skupině GA to bylo 14 pacientů (Tab. 12). Rozdíl mezi skupinami byl statisticky významný ($p < 0,001$). Velké pooperační komplikace byly: plicní embolie (jeden pacient ze skupiny NA), infarkt myokardu (jeden pacient ze skupiny NA), hluboká žilní trombóza (jeden pacient ze skupiny GA) a supraventrikulární tachyarytmie (jeden pacient ze skupiny GA).

Tab. 8: Základní demografická a klinická data

Ukazatel	GA	NA	p hodnota
Věk [roky]	66,63 (7,08)	67,13 (9,81)	0,82
Pohlaví [%]	F 53, M 47	F 47, M 53	0,19
Hmotnost [kg]	91,46 (17,29)	81,30 (19,87)	0,04
Výška [cm]	172,10 (8,42)	168,60 (10,92)	0,17
ASA			
I	2	0	0,07
II	21	19	0,54
III	7	11	0,13
Typ chirurgického výkonu			
Náhrada kyčle	18	21	0,21
Náhrada kolene	12	9	0,21
Primoimplantace	27	24	0,14
Revizní operace	3	6	0,14

Základní klinická charakteristika obou skupin pacientů. GA – celková anestézie, NA – neuraxiální anestézie, ASA – klasifikace *American Society of Anesthesiologists* fyzického stavu pacienta, M – muž, F – žena. Hodnoty jsou prezentovány jako průměr (směrodatná odchylka).

Tab. 9: Vybrané laboratorní a perioperační hodnoty

Ukazatel	GA	NA	p hodnota
Gly [mmol/l]	5,4 (5 – 6)	5,55 (4,88 – 6,43)	0,53
Na [mmol/l]	140 (2,42)	139,50 (2,35)	0,42
Krea [mmol/l]	73 (62,70 – 77,00)	77 (67,50 – 86,50)	0,17
Hb [g/l]	140,90 (13,72)	139,30 (15,97)	0,68
Htk [%]	41,23 (3,72)	42,03 (4,46)	0,45
Krevní ztráta [ml]	400 (237,50 – 600)	300 (300 – 500)	0,68
Tekutinová bilance [ml]	1175 (909,80 – 1638)	1550 (975 – 1800)	0,22

GA – celková anestézie, NA – neuraxiální anestézie. Hodnoty jsou ve tvaru průměr (směrodatná odchylka), nebo medián (kvartilové rozpětí). Gly – glykémie, Na – natremie, Krea – kreatininémie, Hb – koncentrace hemoglobinu, Htk – hematokrit. P hodnoty náleží párovému Studentovu t-testu.

Tab. 10: Shrnutí osobní anamnézy pacientů

Ukazatel	GA	NA	p hodnota
Hypertenze	21	18	0,42
Antihypertenziva	21	18	0,42
<i>Diabetes mellitus</i>	5	9	0,22
PAD/inzulín	3	7	0,16
Dyslipidémie	9	10	0,78
Statiny	9	10	0,78

GA – celková anestézie, NA – neuraxiální anestézie, PAD – perorální antidiabetika.

Tab. 11: Výsledky analýzy endoteliálního glykokalyx

PBR [μm]	GA	NA	p hodnota
PBR	2,02 (0,26)	1,95 (0,24)	0,098
PBR_2	2,20 (0,25)	2,09 (0,19)	0,006
	PBR – PBR_2		< 0,001
	PBR – PBR_2		< 0,001

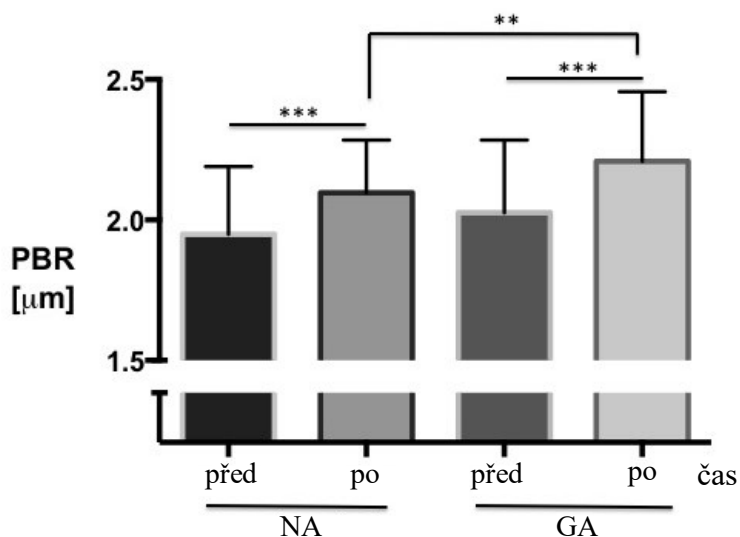
GA – celková anestézie, NA – neuraxiální anestézie. PBR – perfundovaná hraniční zóna (perfused boundary region) – hodnoty před operací, PBR_2 – hodnoty PBR 2 hodiny po operaci. Výsledky jsou uvedeny jako průměr (směrodatná odchylka), nebo medián (kvartilové rozpětí). P hodnoty náleží párovému Studentovu t-testu.

Tab. 12: Malé pooperační komplikace

Ukazatel	GA	NA	p hodnota
Anémie	2	0	0,07
Obstipace	0	1	0,15
PONV	8	0	0,001
Delírium	2	0	0,07
Celkem	12	1	< 0,001

PONV – pooperační nauzea a zvracení.

Graf 6: Grafické znázornění výsledku analýzy endoteliální glykokalyx

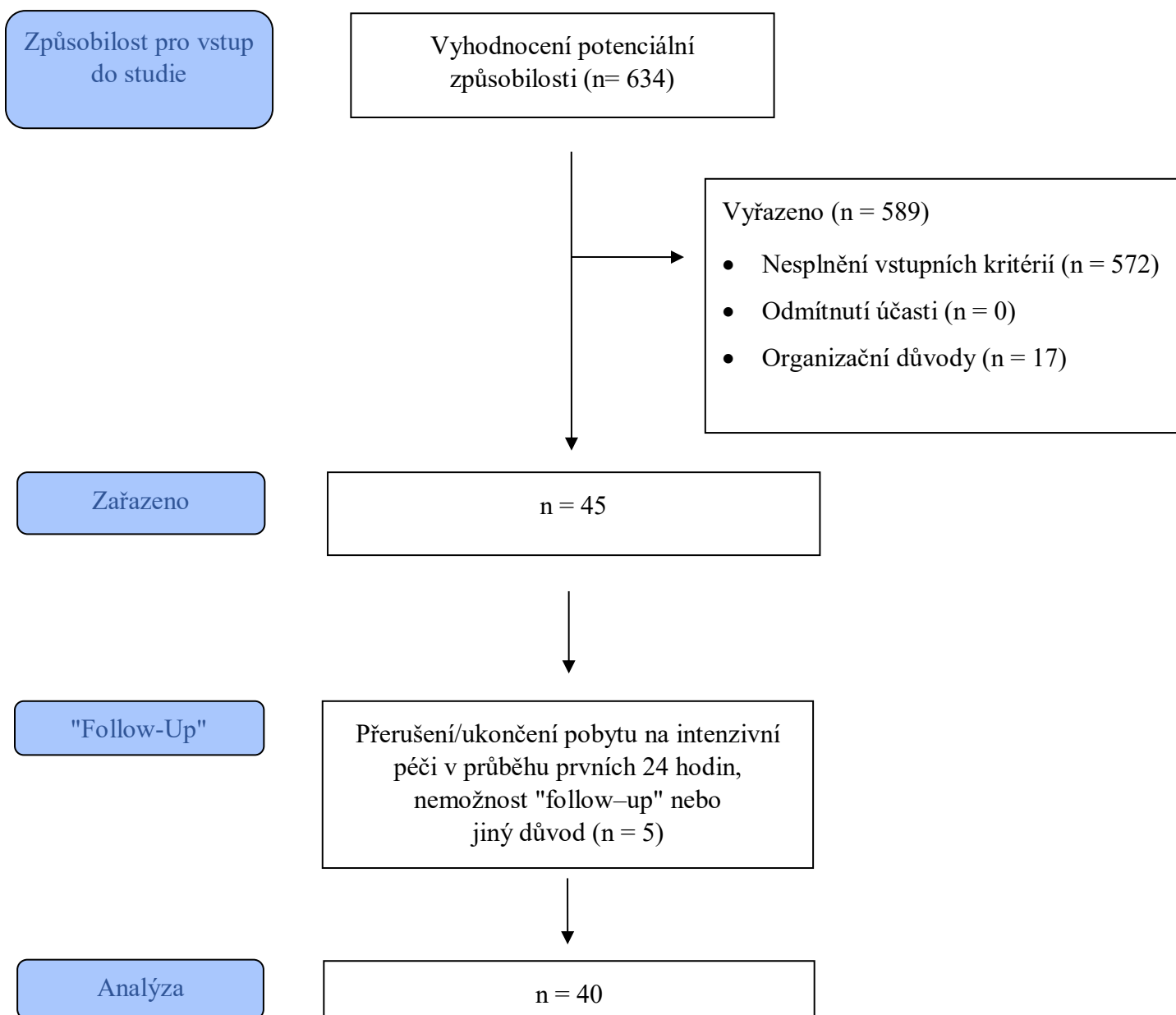


PBR – perfundovaná hraniční zóna (*Perfused Boundary Region*). NA – neuraxiální anestézie, GA – celková anestézie. Výsledky jsou znázorněny jako průměr (sloupce) a směrodatná odchylka (chybové úsečky).

4.2.3 Analýza sublingvální mikrovaskulární endoteliální glykokalyx u pacientů v intenzivní péči – prospektivní observační studie

V průběhu sledovaného období bylo provedeno screeningové vyšetření u 634 pacientů, do studie bylo zahrnuto 45 pacientů, finální analýza byla provedena u 40 pacientů (Obr. 14).

Obr. 14: Průběh zařazování pacientů do studie



Demografické údaje souboru uvádí tabulka 13. Hodnota PBR–b, uváděná jako medián (IQR), celého souboru byla 1,97 μm (1,75 – 1,12). V hodnotě PBR–b jsme nenalezli statisticky významný rozdíl mezi muži a ženami: 1,95 μm (1,77 – 2,12) resp. 2,02 μm (1,71 – 2,15), $p = 0,75$. Rovněž jsme nezjistili statisticky významný rozdíl mezi vstupními hodnotami PBR v závislosti na sledovaných komorbiditách. Pacienti s hyperlipidémií měli statisticky nevýznamně vyšší hodnoty PBR–b ve srovnání s pacienty bez hyperlipidémie: 2,05 μm (1,8 – 2,35) vs. 1,92 μm (1,73 – 2,09), $p = 0,07$.

Mezi hodnotami PBR celého souboru v průběhu pobytu na JIP jsme nenalezli statisticky významné rozdíly (Tab. 14, Graf 7). Hodnota PBR–b nekorelovala s APACHE II ($r = 0,2852$, 95 % CI -0,0289 – 0,5480, $p = 0,0745$) ani se SOFA skóre při přijetí ($r = 0,3083$, 95 % CI -0,0035 – 0,5655, $p = 0,0529$). Nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly v hodnotách PBR–b mezi pacienty se sepsí a pacienty bez sepse: 2,02 μm (1,92 – 2,20) vs. 1,93 μm (1,69 – 2,11), $p = 0,37$. Hodnoty PBR od přijetí až k 5. dni vykazovaly vyšší trend u pacientů se septickým šokem ve srovnání s pacienty se sepsí bez šoku, rozdíly nedosahovaly statistické významnosti. Schopnost vstupní hodnoty PBR predikovat septický šok byla nízká (plocha pod ROC křivkou = 0,650, 95 % CI 0,483 – 0,793), hodnota PBR > 1,82 μm měla 100 % senzitivitu a 35 % specifitu (Obr. 15). Dodatečná analýza kumulativních hodnot PBR vykazuje statisticky významně vyšší hodnoty PBR u pacientů se septickým šokem ve srovnání s pacienty se sepsí bez septického šoku: 2,10 μm (2,00 – 2,20) vs. 1,94 μm (1,76 – 2,10), $p = 0,01$ (Graf 8).

Tab. 13: Charakteristika souboru pacientů zahrnutých do studie (n= 40)

Ukazatel	Hodnota
Věk [roky]	60,3 (17,9)
Pohlaví [M/F]	25/15
Tělesná hmotnost [kg]	81,3 (16,5)
Výška [cm]	172,7 (9,8)
BMI	27,16 (1,65)
APACHE II skóre při přijetí [body]	21,9 (7,0)
SOFA skóre den 1 [body]	8,8 (3,3)
Kumulativní bilance tekutin 1. den [ml]	2381 (1505)
Kumulativní bilance tekutin 3. den [ml]	3440 (2342)
Kumulativní bilance tekutin 5. den [ml]	4278 (3707)
Delirium, n / %	16 / 40
CRRT, n / %	5 / 12,5
TTM, n / %	14 / 35
Doba pobytu na JIP [dny] (minimum; maximum)	8 (6;11)
Přežití JIP, n / %	33 / 83
Typ/profil pacientů, n / %	
• nechirurgický	20 / 50
• nechirurgický (po KPR)	7 / 17
• pooperační	3 / 8
• trauma	8 / 20
• trauma (po KPR)	2 / 5
Sepse při přijetí, n / %	13 / 33
• seps bez septického šoku	7 / 17

• septický šok	6 / 16
Komorbidity, n / %	
• diabetes mellitus typ 2	5 / 13
• hypertenze	16 / 40
• ischemická choroba srdeční	8 / 20
• dyslipidémie	16 / 40
• hypotyreóza	1 / 2
• revmatoidní artritida	3 / 8

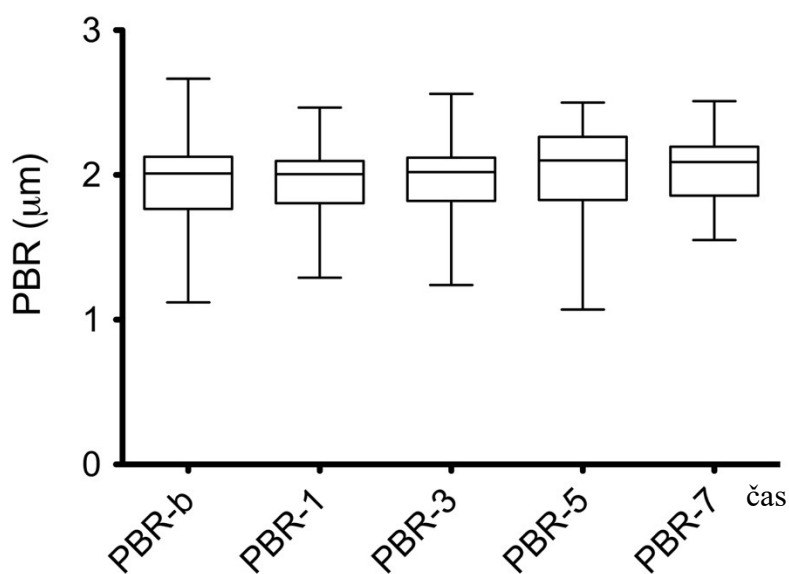
Data jsou uváděna jako průměr (SD), nebo jako absolutní hodnoty (%). BMI – *body mass index*, M – muži, F – ženy, APACHE II skóre – Acute Physiology and Chronic Health Evaluation score, SOFA skóre – Sequential Organ Failure Assessment score, CRRT – kontinuální eliminační metody náhrady ledvin, TTM – cílená regulace tělesné teploty, JIP – jednotka intenzivní péče, KPR – kardiopulmonální resuscitace.

Tab. 14: Deskriptivní statické hodnoty perfundované hraniční zóny (PBR, *Perfused Boundary Region*) ve sledovaných časových bodech

Ukazatel	PBR-b	PBR-1	PBR-3	PBR-5	PBR-7
Medián	1,971	2	1,986	2,075	2,065
25% Percentil	1,751	1,791	1,808	1,825	1,815
75% Percentil	2,125	2,069	2,115	2,26	2,18
Průměr	1,933	1,926	1,94	1,925	1,953
Směrodatná odchylka	0,3934	0,3512	0,3932	0,4901	0,474

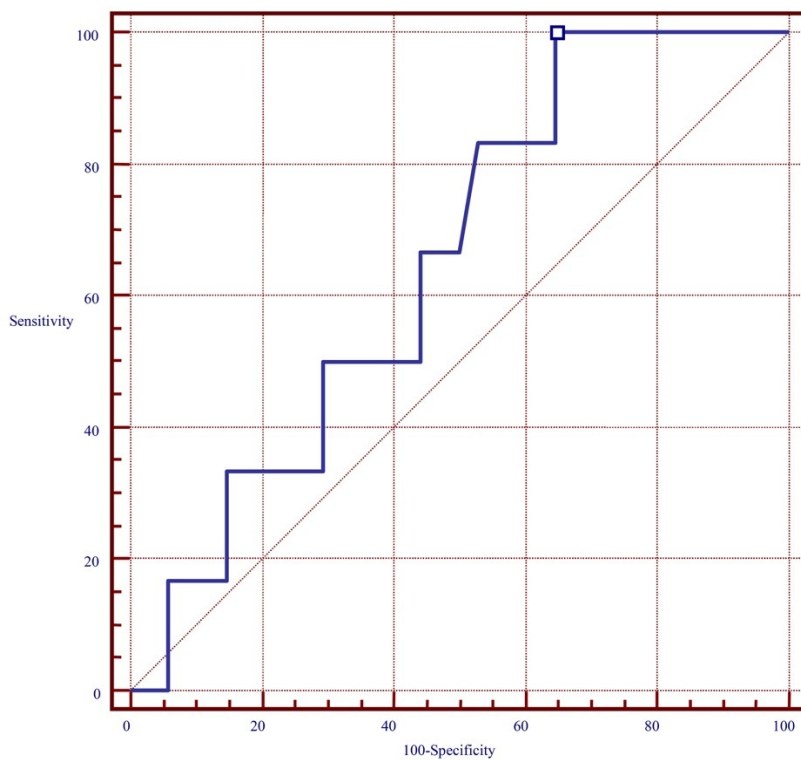
Hodnoty PBR jsou uvedeny v μm .

Graf 7: Grafické znázornění souhrnu výsledků analýzy endoteliálního glykokalyx sublingvální mikrocirkulace pacientů v intenzivní péči



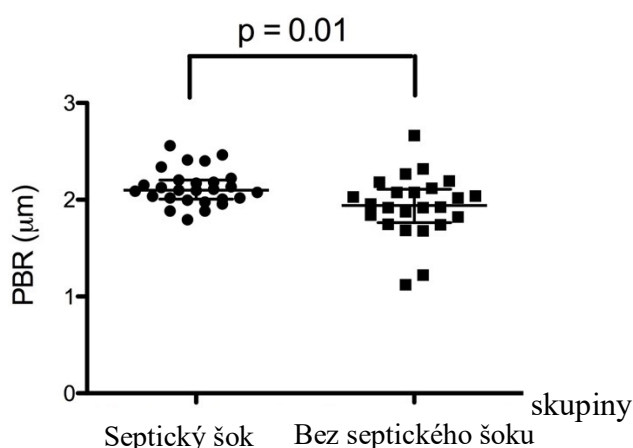
PBR – perfundovaná hraniční zóna (*Perfused Boundary Region*).

Obr. 15: ROC křivka senzitivity a specificity PBR v predikci septického šoku



Hodnota PBR > 1,82 µm vykazuje 100 % senzitivitu (*Sensitivity*) a 35 % specifitu (*100 – Specificity*).

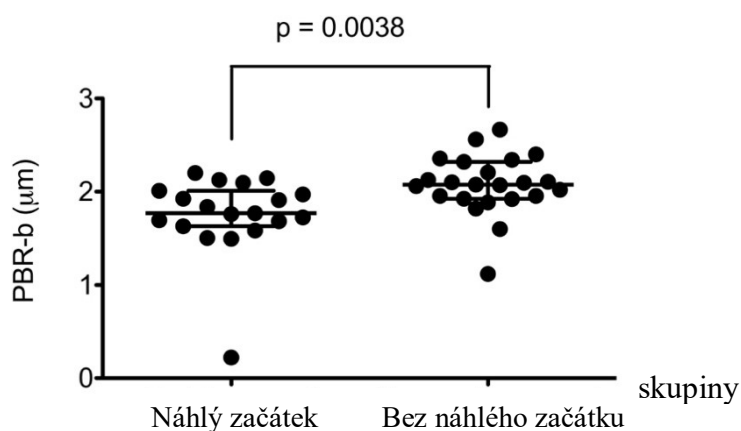
Graf 8: Individuální hodnoty PBR během pobytu na JIP u pacientů se septickým šokem a bez septického šoku.



PBR – perfundovaná hraniční zóna (*Perfused Boundary Region*).

U pacientů s náhlým vznikem kritického stavu (trauma, stav po KPR, $n = 19$) byly nalezeny ve srovnání se skupinou pacientů bez náhlého vzniku kritického stavu (nechirurgický typ, $n = 21$) nižší hodnoty PBR po celou dobu pobytu na JIP. Statisticky významný rozdíl v PBR byl identifikován pouze v čase přijetí na JIP: $1,77 \mu\text{m}$ ($1,63 - 2,01$) vs. $2,07 \mu\text{m}$ ($1,92 - 2,32$), $p = 0,0038$ (Graf 9). Nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly v hodnotách PBR u pacientů s delíriem a bez deliria.

Graf 9: Individuální hodnoty PBR během pobytu na JIP u pacientů s náhlým vznikem kritického stavu (KPR, trauma) a pacientů bez náhlého vzniku kritického stavu

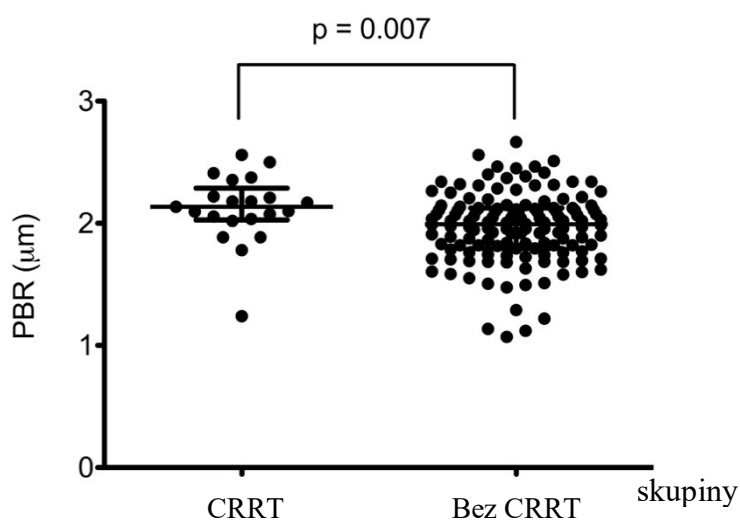


PBR – perfundovaná hraniční zóna (*Perfused Boundary Region*).

Nebyl nalezen statisticky významný vztah mezi hodnotou PBR–b a velikostí kumulativní tekutinové bilance v den přijetí ($r = 0,1401$, 95 % CI: $-0,1792 - 0,4327$, $p = 0,3886$) a hodnotou PBR–1 a tekutinovou bilancí za první den pobytu na JIP ($r = 0,0755$, 95 % CI = $-0,2417 - 0,378$, $p = 0,6433$). Prediktivita vstupní hodnoty PBR predikovat pozitivní tekutinovou bilanci v pásmech 30, 40 a 50 ml/kg v den přijetí na JIP byla nízká (plocha pod ROC křivkou = 0,509, 95 % CI 0,346 – 0,670, resp. 0,529, 95 % CI 0,365 – 0,688, resp. 0,657, 95 % CI 0,490 – 0,800).

Dodatečné srovnání kumulativních hodnot PBR ukázalo statisticky významně vyšší hodnoty mezi pacienty s CRRT ($n = 5$) a bez CRRT ($n = 35$): $2,13 \mu\text{m}$ ($2,02 - 2,28$) vs. $1,99 \mu\text{m}$ ($1,79 - 2,12$), $p = 0,007$ (Graf 10). U pacientů s protokolem řízené hypotermie nebyly nalezeny rozdíly v hodnotách PBR v žádném ze sledovaných časových bodů ve srovnání s pacienty bez protokolu řízené hypotermie.

Graf 10: Individuální hodnoty PBR během pobytu na JIP u pacientů s CRRT a bez CRRT



CRRT – kontinuální eliminační metody náhrady ledvin, PBR – perfundovaná hraniční zóna (*Perfused Boundary Region*).

4.2.4 Vliv podání tukové emulze v rámci parenterální výživy na integritu endoteliálního glykokalyxu u pacientů po chirurgickém výkonu – mikroskopická a biochemická pilotní studie

Do studie bylo celkem zařazeno 15 pacientů, 8 žen a 7 mužů. Finální analýza byla provedena u 9 pacientů (Obr. 16). Základní demografická a laboratorní data uvádí tabulka 15. Tuková emulze SMOFlipid 20 % (Tab. 16) byla dobře tolerována všemi pacienty. Pacientům, kteří dokončili studii byla podána cílová dávka (1 g / kg) tuku dle předpisu jejich PN. Videomikroskopie sublingvální mikrocirkulace byla provedena u 13 pacientů s dostatečnou kvalitou, u dvou pacientů nebylo možno kvality dosáhnout (automatická kontrola programem GlycoCheck) a tito pacienti byly vyřazeni ze studie. Sérové koncentrace syndekanů byly úspěšně změřeny u 9 pacientů ze 13, kteří postoupili dále do studie, neboť u čtyř vzorků došlo k preanalytické chybě. Mezi časovými body T0 a T6 nebyl statisticky významný rozdíl v hodnotách krevního tlaku, tepové frekvence a SpO₂. Hodnoty TAG, HDL, LDL, cholesterolu a glykémie uvádí tabulka 17. V čase T6 došlo ke statisticky významnému nárůstu sérových koncentrací TAG, LDL a glykémie.

Tab. 15: Základní demografická a laboratorní data pacientů

Ukazatel	Hodnota
Věk [roky]	64 (12)
Hmotnost [kg]	84 (13)
Výška [cm]	168 (10)
BMI	29,76 (1,3)
Hb [g/l]	111,2 (18,59)
Htk [%]	33 (5)
Na [mmol/l]	139,7 (3,2)
Krea [mmol/l]	88,15 (29,11)

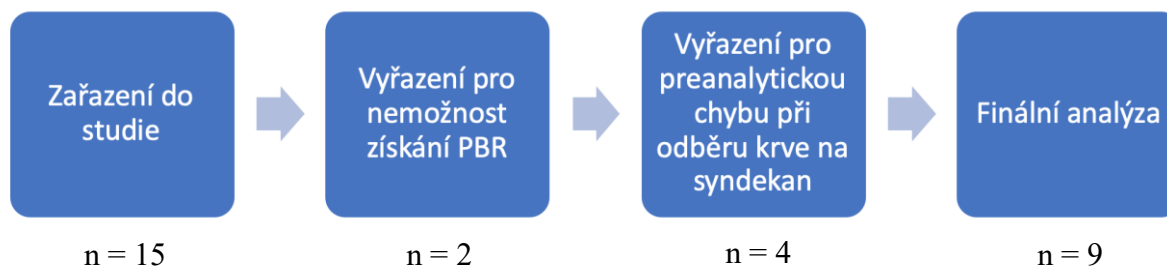
Hodnoty jsou udány ve tvaru průměr (směrodatná odchylka). BMI – *body mass index*, Hb – hemoglobin, Htk – hematokrit, Na – natriémie, Krea – kreatininémie.

Tab. 16: Složení tukové emulze SMOFlipid 20 %

Ukazatel	Hodnota
Sójový olej [g/l]	60
MCT [g/l]	60
Olivový olej [g/l]	50
Rybí olej [g/l]	30
Vitamín E [mg α -tokoferol/l]	cca 200
Vaječné fosfolipidy [g/l]	12
Glycerol [g/l]	25
Celková energie [kcal/l]	2000
pH	7,5 – 8,8
Osmolarity [mosmol/l]	273

MCT – mastné kyseliny se středně dlouhým řetězcem (*medium chain triglycerides*).

Obr. 16: Průběh účasti pacientů ve studii



PBR – perfundovaná hraniční zóna (*Perfused Boundary Region*).

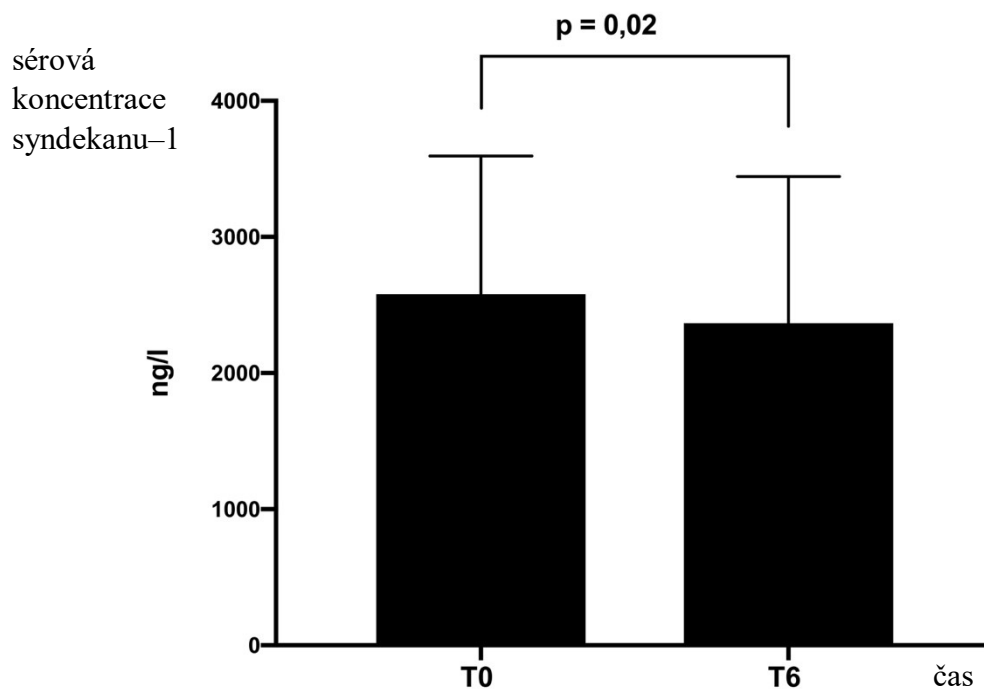
Tab. 17: Vybrané laboratorní hodnoty v časech T0 a T6 po podání infuze tukové emulze SMOFlipid 20 %

Ukazatel	T0	T6	p hodnota
Cholesterol [mmol/l]	3,26 (0,79)	3,15 (0,89)	0,43
HDL [mmol/l]	1,1 (0,35)	1,01 (0,23)	0,21
LDL [mmol/l]	1,75 (0,88)	1,35 (0,9)	0,0007
TAG [mmol/l]	0,91 (0,34)	3,9 (2,4)	0,006
Glykémie [mmol/l]	7,2 (2,0)	8,3 (1,4)	0,0003

HDL – lipoproteiny s vysokou denzitou, LDL – lipoproteiny s nízkou denzitou, TAG – triacylglyceroly. Data jsou prezentována jako průměr (směrodatná odchylka). P hodnota náleží dvou výběrovému nepárovému Studentovu t–testu.

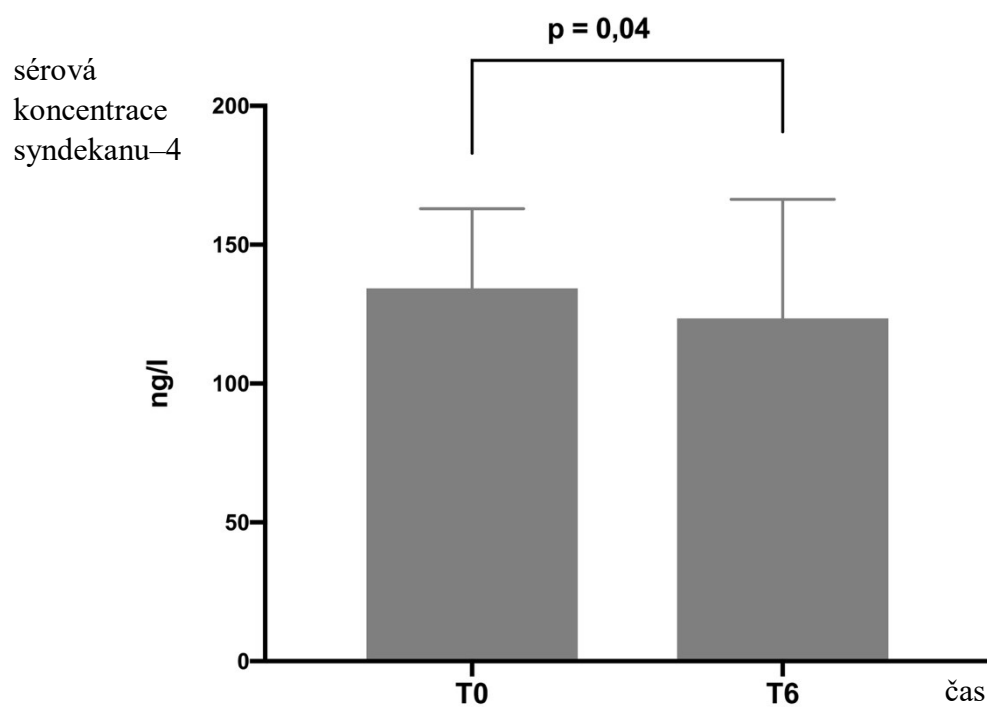
Mezi hodnotami PBR nebyl v čase T0 a T6 statisticky významný rozdíl: 2,10 (1,97 – 2,33) vs. 2,28 (2,11 – 2,45), $p = 0,13$ (hodnoty vyjádřeny jako medián (IQR) v μm) V obou skupinách byly statisticky významně rozdílné výsledky v hodnotách PBR, syndekanu–1 a syndekanu–4 ($p < 0,0001$). Hladiny syndekanu–1 v plazmě byly statisticky signifikantně nižší po podání tukové emulze SMOFlipid 20 %: 2580 (1014) ng/l vs. 2366 (1077) ng/l, $p = 0,02$, stejně tak jako hladiny syndekanu–4: 134 (29) ng/l vs. 123 (43) ng/l, $p = 0,04$ (data uváděna ve tvaru průměr (SD)) (Graf 11, 12). Nebyla pozorována korelace mezi hodnotami PBR a syndekanu–1, resp. syndekanu–4.

Graf 11: Výsledky hodnot plazmatických koncentrací syndekanu-1 před (T0) a po podání (T6) infuze tukové emulze



Výsledky jsou prezentovány jako průměr (sloupce) a SD (chybové úsečky).

Graf 12: Výsledky hodnot plazmatických koncentrací syndekanu-4 před (T0) a po podání (T6) infuze tukové emulze



Výsledky jsou prezentovány jako průměr (sloupce) a SD (chybové úsečky).

4.2.5 Vliv poruch metabolismu lipidů na endoteliální glykokalyx – pilotní observační studie

Do studie byly zařazeny dvě desetičlenné skupiny pacientů. Ve skupině pacientů s dyslipidemií jsme získali data od všech deseti pacientů. Průměrný věk byl 63 (11,2) let, BMI 27 (5,12) a ve skupině bylo 8 mužů a 2 ženy. Další demografická data, fyziologické funkce a základní relevantní laboratorní nálezy jsou v tabulce 18. Průměrná hodnota PBR byla 1,88 μm (0,32), syndekanu-1 1,55 ng/ml (0,35) a syndekanu-4 0,18 ng/ml (0,05). Data analýzy EG jsou v tabulce 19. Analýza lipidogramu pacientů s léčenou dyslipoproteinémií přinesla následující výsledky (Tab. 20): cholesterol 4,62 mmol/l (4,43 – 5,28), HDL 1,48 mmol/l (0,48), LDL 2,84 mmol/l (1,14) a TAG 2,03 mmol/l (1,52). Hodnota syndekanu-1 korelovala nejvíce s (Pearsonův korelační koeficient) LDL: -0,4 (95 % CI: -0,82 – 0,31) a HDL: 0,3 (95 % CI: 0,41 – 0,78); PBR korelovalo nejvíce s LDL: -0,51 (95 % CI: -0,86 – 0,18). Etiologie dyslipidémie v této skupině pacientů: metabolický syndrom, familiární hypercholesterolemie a steatóza jater.

Ve skupině pacientů s DDPV jsme získali kompletní data od 9 pacientů. Průměrný věk byl 44 (16) let, BMI 23 (3,7) a ve skupině byly 3 muži a 6 žen. Další demografická data, fyziologické funkce a základní relevantní laboratorní nálezy jsou v tabulce 18. Průměrná hodnota PBR byla 2,23 μm (0,25), syndekanu-1 2,01 ng/ml (0,48) a syndekanu-4 0,17 ng/ml (0,14 – 0,19) (Tab. 19). Analýza lipidogramu byla následující (Tab. 20): celkový cholesterol 2,65 mmol/l (0,71), HDL 0,93 mmol/l (0,31), LDL 1,42 mmol/l (0,47) a TAG 0,86 mmol/l (0,37). Indikace k DDPV byl syndrom krátkého střeva po mnohočetných resekci na podkladě: cévního ileu, cystické fibrózy, familiární viscerální myopatie, postiradiační kolitidy pro adenomatózní polypózu střev, traumatu břicha při polytraumatu, chronické postiradiační enteritidě, Hirschsprungově chorobě, Crohnovy choroby a salmonelové enteritidy. Syndekanu-1 koreloval nejvíce s celkovým cholesterolem: 0,61 (95 % CI: -0,1 – 0,91) a LDL: 0,67 (95 % CI: 0 – 0,92); PBR nejvíce s HDL: 0,4 (95 % CI: -0,36 – 0,84). Kompletní data analýzy EG jsou v tabulce 19. PBR bylo ve skupině s DDPV statisticky významně vyšší než ve skupině s dyslipidemií ($p = 0,017$) (Graf 13), podobně jako syndekanu-1 ($p = 0,027$) (Graf 14). Sérové koncentrace syndekanu-4 byly téměř bez rozdílu (Graf 15).

Tab. 18: Demografická data, fyziologické funkce a základní relevantní laboratorní hodnoty.

Ukazatel	Dyslipidémie	DDPV	p hodnota
Věk [roky]	63 (11,2)	44 (16)	0,007
Pohlaví [muži / ženy]	8 / 2	3 / 6	N/A
BMI	27 (5,12)	23 (3,7)	0,07
sTK [mmHg]	100 (9,02)	87 (12)	0,02
TF [min ⁻¹]	69 (68 – 72)	78 (15)	0,28
Hb [g/l]	149 (143,8 – 156)	143 (15)	0,23
Htk [%]	43 (3)	42 (4,1)	0,58
Na [mmol/l]	139,6 (1,43)	138 (2,2)	0,15
Gly [mmol/l]	5,65 (1)	5,5 (0,63)	0,79
Krea [mmol/l]	76 (63,25 – 85,5)	65 (52 – 88)	0,36

BMI – *body mass index*, DDPV – dlouhodobá domácí parenterální výživa, sTK – střední arteriální tlak, TF – tepová frekvence, Hb – hemoglobin, Htk – hematokrit, Na – natremie, Gly – glykémie, Krea – kreatininémie. Data jsou prezentována jako průměr (směrodatná odchylka), nebo medián (interkvartilové rozpětí). N/A – není použitelné.

Tab. 19: Data analýzy endoteliálního glykokalyx

Ukazatel	Dyslipidémie	DDPV	p hodnota
PBR [μm]	1,88 (0,32)	2,23 (0,25)	0,017
Syndekan-1 [ng/ml]	1,55 (0,35)	2,01 (0,48)	0,027
Syndekan-4 [ng/ml]	0,18 (0,05)	0,17 (0,14 – 0,19)	0,61

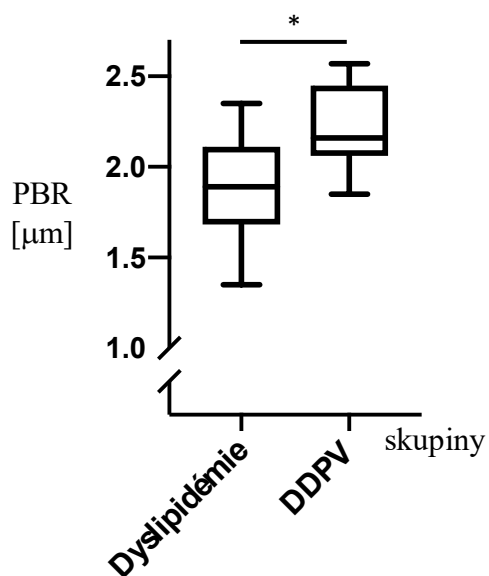
DDPV – dlouhodobá domácí parenterální výživa, PBR – perfundovaná hraniční zóna (*Perfused Boundary Region*). Data jsou prezentována jako průměr (směrodatná odchylka), nebo medián (interkvartilové rozpětí).

Tab. 20: Výsledky analýzy lipidogramu

Ukazatel	Dyslipidémie	DDPV	p hodnota
Cholesterol [mmol/l]	4,62 (4,43 – 5,28)	2,66 (0,71)	< 0,0001
HDL [mmol/l]	2,85 (1,14)	0,94 (0,31)	0,0002
LDL [mmol/l]	1,48 (0,48)	1,42 (0,47)	0,78
TAG [mmol/l]	2,02 (1,52)	0,86 (0,37)	0,04

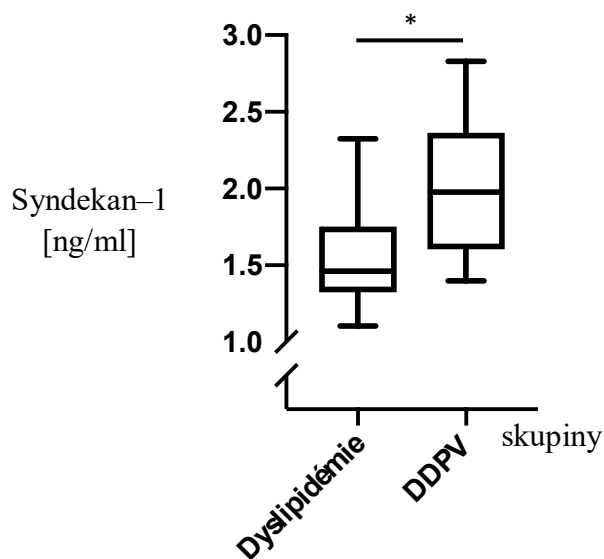
DDPV – dlouhodobá domácí parenterální výživa, HDL – lipoproteiny s vysokou denzitou, LDL – lipoproteiny s nízkou denzitou, TAG – triacylglyceroly. Data jsou prezentována jako průměr (směrodatná odchylka), nebo medián (interkvartilové rozpětí).

Graf 13: Porovnání hodnoty PBR u obou skupin



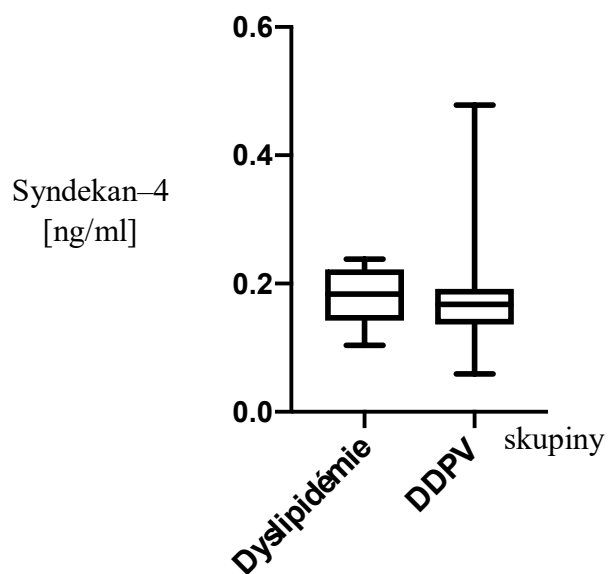
DDPV – dlouhodobá domácí parenterální výživa, PBR – perfundovaná hraniční zóna (*Perfused Boundary Region*). Výsledky jsou zobrazeny jako průměr (příčné úsečky v krabicových grafech) a SD (chybové úsečky).

Graf 14: Porovnání hodnoty syndekan-1 u obou skupin



DDPV – dlouhodobá domácí parenterální výživa, Výsledky jsou zobrazeny jako průměr (příčné úsečky v krabicových grafech) a směrodatná odchylka (chybové úsečky).

Graf 15: Porovnání hodnoty syndekanu-4 u obou skupin



DDPV – dlouhodobá domácí parenterální výživa, Výsledky jsou zobrazeny jako průměr (příčné úsečky v krabicových grafech) a směrodatná odchylka (chybové úsečky).

4.2.6 Hodnocení stavu endoteliálního glykokalyx u zdravých dobrovolníků – observační studie

Vyšetřili jsme 21 mladých zdravých dobrovolníků, 10 mužů a 11 žen průměrného věku 20,7 (0,78) let. Základní demografická a klinická data jsou v tabulce 21. U všech dobrovolníků jsme úspěšně získali všechna data z analýzy mikrocirkulace a krevní vzorky. Průměrné PBR bylo 1,88 μm (0,20) (95 % CI: 1,79 – 1,97), medián byl 1,82 μm (1,69 – 2,01). Populační medián PBR z dat současné dostupné literatury byl 2,01 μm (n = 2006, Tab. 22). Medián koncentrace syndekanu-1 byl 0,3 ng/ml (0,23 – 0,39) (95 % CI: 0,27 – 0,49). Spearmanův korelační koeficient mezi hodnotami PBR a syndekanu-1 byl $r = 0,017$ (95 % CI: -0,44 – 0,47). Populační medián z dat současné dostupné literatury pro syndekan-1 byl 17,00 ng/ml (n = 223, Tab. 23). Výsledky syndekanu-1 nelze analyzovat parametrickými testy. Výsledek jednoho dobrovolníka byl vyřazen jako odlehlá hodnota. Analýzy EG shrnuje tabulka 24.

Tab. 21: Základní demografická a klinická data skupiny zdravých dobrovolníků (n = 21)

Ukazatel	Hodnota
Věk [roky]	20,70 (0,78)
Pohlaví [muži/ženy]	10 / 11
BMI	23,52 (2,86)
sTK [mmHg]	94,19 (10,40)
TF [min^{-1}]	76,19 (11,21)

BMI – *body mass index*, sTK – střední arteriální krevní tlak, TF – tepová frekvence. Výsledky jsou ve tvaru průměr (SD).

Tab. 22: Studie související s hodnocením parametru PBR u zdravých jedinců

Studie	PBR [μm]	Počet jedinců	Popis skupiny
Naše studie	1,88 (0,2)	21	Mladí zdraví dospělí, smíšené pohlaví
Astapenko [136]	1,95 (0,24) 2,02 (0,26)	63 ve dvou skupinách	Pacienti v perioperační péči, smíšené pohlaví
Pouska [134]	1,80 (1,72 – 2,05) 1,89 (1,76 – 2,08)	66 ve dvou skupinách	Pacienti se sepsí a v pooperační péči, smíšené pohlaví
Ikonomidis [143]	1,77 (0,31)	160	Kontrolní skupina zdravých, míšené pohlaví
Gu [144]	2,01 (0,28) 2,0 (0,27) 1,88 (0,25)	252 220 254	Populační studie, 3 etnika, smíšené pohlaví
Martens [9]	2,08 (0,24)	19	Kontrolní skupina zdravých, míšené pohlaví
Lee [145]	2,14 (0,25)	915	Populační studie, smíšené pohlaví
Dane [140]	1,82 (0,16)	10	Kontrolní skupina zdravých, míšené pohlaví
Donati [120]	2,46 (2,37 – 2,59)	16	Kontrolní skupina zdravých, míšené pohlaví

Tabulka 22: Hodnoty jsou ve tvaru průměr (směrodatná odchylka) nebo medián (interkvartilové rozpětí).

Tab. 23: Studie související s hodnocením hladin syndekanu-1 u zdravých jedinců

Studie	Syndekan-1 [ng/ml]	Počet jedinců	Popis skupiny
Naše studie	0,3 (0,23 – 0,39)	20	Mladí zdraví dospělí, smíšené pohlaví
Nemme [138]	21,0 (3,6)	7	Ženy v pooperační péči
Hulde [146]	11,7 (2,0)	16	Zdravé ženy
Hofmann-Kiefer [147]	66,4 (50,7 – 69,7)	10	Těhotné ženy
Rehm [148]	1,2 (0,72 – 1,42)	32	Pacienti v pooperační péči, pohlaví nespecifikováno
Nelson [141]	26 (23 – 31)	18	Kontrolní skupina zdravých, smíšené pohlaví
Anttonen [149]	17 (0 – 308)	110	Zdraví muži
Dane [140]	2,09 (1,16)	10	Kontrolní skupina zdravých, smíšené pohlaví

Hodnoty jsou ve tvaru průměr (směrodatná odchylka) nebo medián (interkvartilové rozpětí).

Tab. 24: Výsledky analýzy endoteliálního glykokalyx

Parametry EG	n	průměr	SD	medián	IQR	95 % CI	Ψ	p hodnota
PBR [μm]	21	1,88	0,20	1,82	1,69 – 2,01	1,79 – 1,97	2,01	0,014
Syndekan-1 [ng/ml]	20	0,38	0,24	0,30	0,23 – 0,39	0,27 – 0,49	17,00	< 0,0001

PBR – perfundovaná hraniční zóna (perfused boundary region), SD – směrodatná odchylka, CI – intervaly spolehlivosti, IQR – interkvartilové rozpětí. Ψ – populační medián (hodnoty vypočítány z dat dostupných v současné literatuře).

5. DISKUZE

5.1 Metody hodnocení endoteliálního glykokalyx

Ve výzkumu EG jsme limitováni jednotlivými použitými metodami. Z povahy složité morfologie EG je i složité tuto strukturu analyzovat. Žádná metoda vyšetření EG nebyla validována, jelikož dosud neexistuje model poškození EG, který by sloužil jako pozitivní kontrola. Důležitý aspekt každé metody je interindividuální rozdíl v odečítání hodnot. Tento problém měla vyřešit automatizace analýzy videozáznamu mikrocirkulace získanou např. KK kamerou ze sublingvální sliznice programem GlycoCheck. Ačkoli se metoda jeví velmi slibně, setkávali jsme se během výzkumu s výrazným rozptylem hodnot jednotlivých měření i při několika po sobě jdoucích měřeních na jednom pacientovi. Z tohoto důvodu je pro parametr PBR nutné pro získání dostatečné síly studie a předpokládaného statisticky významného rozdílu mezi pacienty použít více početné skupiny. Metoda analýzy slizniční mikrocirkulace zhodnotí jen velmi malý okresek tkáně. K představě o globálním celotělovém stavu EG je vhodná analýza rozpadových produktů EG (syndekan-1, HS, HA). Je ovšem nutné mít na paměti, že EG je struktura, které se skládá z části pevné a z části solubilní, která je v dynamické rovnováze s proudící plazmou. Z této povahy nelze ani přesně určit výšku vrstvy EG, natož posoudit, jaká je ještě „normální“ hladina těchto rozpadových produktů u zdravých jedinců. Dále, poločas těchto molekul v plazmě je velmi krátký (u HA 2–5 minut) [150]. Odběry tedy musí být provedeny opakovaně v čase působení předpokládaného inzultu. V neposlední řadě je nutno brát v úvahu i závislost jejich koncentrací na funkci ledvin [151]. Tyto ukazatele tedy spíše mohou ozřejmit trend dynamiky stavu EG. O změnách koncentrace těchto ukazatelů v moči víme ještě méně, ačkoliv se též začínají používat v klinickém výzkumu [152]. Sledování ultrastruktury EG je sice velmi ilustrativní, nicméně pro klinický výzkum nepoužitelné, jelikož se jedná opět o velmi malou oblast tkáně (biopsie) a neexistuje referenční kontrastní metoda pro odečet výšky vrstvy EG v TEM.

5.2 Diskuze k experimentálním studiím

5.2.1 Změny výšky vrstvy endoteliálního glykokalyx během náhlé zástavy oběhu na experimentálním modelu srdeční zástavy u prasete domácího

Srdeční zástava dle doby trvání způsobí více či méně vyjádřený syndrom ischemie – reperfuze, nazývaný syndrom po srdeční zástavě (post cardiac arrest syndrome). Ten vede k oxidačnímu poškození EG a jeho degradaci [15]. Naše výsledky naznačují, že samotná zástava oběhu nemá na EG vliv při použití analýzy EG pomocí parametru PBR. Nebyla ani nalezena korelace mezi dobou srdeční zástavy a hodnotou PBR. K významnému zvýšení PBR nedošlo ani po 20 minutách celotělového reperfučního syndromu, ale můžeme předpokládat, že by se hodnota PBR dále zvyšovala (a tím i poškození EG). Poškození EG v rámci syndromu po srdeční zástavě bylo již dokumentováno v klinickém výzkumu analýzou hladin degradačních produktů EG, které byly až dvojnásobně zvýšené u pacientů bezprostředně po úspěšné resuscitaci [106]. Kontrolní skupinu tvořili hemodynamicky stabilní pacienti s akutním koronárním syndromem. V rámci syndromu po srdeční zástavě dochází k zánětové odpovědi mnoha orgánů i samotných cév. Tento stav byl označen za zánět endotelu, tedy „endotelitidu“ [153]. Jako indikátor endoteliálního poškození lze použít sérovou hladinu syndekanu-1. Ukázalo se, že tato hladina koreluje s indikátorem zánětu (interleukin 6), aktivací endotelu (E-selektin) a poškozením endotelu (trombomodulin) [154]. Limitací naší experimentální studie bylo použití jediné metody k analýze EG. PBR se ukazuje jako nedostatečná metoda k hodnocení EG při malém počtu zařazených subjektů kvůli vysokému rozptylu hodnot jednotlivých měření. Další limitací je poměrně krátká doba sledování zvířat po návratu spontánní cirkulace, jelikož lze předpokládat, že se plně vyjádřený syndrom po zástavě oběhu rozvine v delším časovém intervalu.

5.2.2 Efekt akutně vzniklé hypernatrémie podáním hypertonického roztoku chloridu sodného na endoteliální glykokalyx u králíka

Několik experimentálních a klinických studií se věnovalo tématu vlivu hypernatrémie na mikrocirkulaci a interakci mezi leukocyty a endoteliálními buňkami [113,155–157]. Velmi málo prací se zaměřilo přímo na EG [19]. Výsledky našeho experimentu dokumentují vliv

akutně vzniklé hypernatrémie na EG. Provedeno bylo nepřímé měření vzestupu parametru PBR v sublingvální mikrocirkulaci. Nicméně sérová hladina syndekanu-1 nebyla významně hypernatrémii ovlivněna, což by jinak znamenalo dle některých autorů strukturální poškození EG [21,158]. Vzestup parametru PBR by mohl stínovat vznik drobných trhlin ve struktuře EG se zvýšením penetrace erytrocytů blíže endoteliálním buňkám [159]. Z povahy pouhého zvýšení PBR, nikoliv syndekanu-1, můžeme předpokládat spíše než strukturální poškození EG, jeho funkční změnu, což bylo již dokumentováno v práci Victorina, kde prokázali přímou závislost mezi osmolaritou podávaného roztoku a kapilární propustností v mezenteriální mikrocirkulaci potkanů [160]. Takovéto zvýšení kapilární propustnosti můžeme považovat za známku nepřímého poškození EG. V experimentu s podáváním aldosteronu po pět dnů vedlo zvýšení koncentrace sodíku ze 135 na 150 mmol/l k úbytku EG o přibližně 50 % [19]. Role sodíku v patofyziologii EG byla diskutována v kapitole 1.5. Alterace EG v našem experimentu mohlo být zapříčiněno i náhle vzniklou intravaskulární hypervolémií a změnou náboje na EG, spíše než přímým fyzickým poškozením. Hypervolémie vede k uvolnění atriálního natriuretického faktoru (ANP), který byl spojen s poškozením EG v experimentu i v klinických studiích [117,161,162]. Dále hypernatrémie vede k přesunu většího množství sodíku do endoteliálních buněk a přes intracelulární signalizaci může vést k endoteliální dysfunkci [163]. Infuze hypertonického NaCl též vedla k poklesu pH směrem k hyperchloremické metabolické acidóze, což mohlo působit synergisticky negativně na EG [164]. Naše experimentální studie má několik limitací. Analýza PBR programem GlycoCheck není validovaná pro použití u zvířat (pouze pro použití u lidí), což považujeme za největší limitaci výsledků PBR této práce. Dále je poněkud problematické interpretovat výsledky PBR získané z piální mikrocirkulace, protože program GlycoCheck je vyvinut pro hodnocení sublingvální mikrocirkulace. Teoreticky bychom mohli spekulovat o vlivu hematoencefalické bariéry na automatickou analýzu mikrocirkulace, která mohla být ovlivněna přítomností perivaskulárních astroglálních výběžků. Struktura hematoencefalické bariéry včetně své glykokalyx je pravděpodobně vůči vlivu hypernatrémie více odolná. V neposlední řadě, zvířata dostávala nepravidelně malé dávky noradrenalinu, který byl též popsán jako možný poškozující faktor [165].

Přes všechny limitace naší experimentální studie je evidentní, že přechodné zvýšení plazmatické koncentrace sodíku vede k alteraci EG. Naše výsledky jsou též relevantní co do diskuse o bezpečnosti nitrožilního podávání hypertonických krystaloidních roztoků jako klinické intervence. Přes výhody např. u pacientů s refrakterní nitrolební hypertenzí, o bezpečnosti hypertonického NaCl ve vztahu k EG panují velké pochyby.

5.3 Diskuze ke klinickým studiím

5.3.1 Vliv tekutinové výzvy 500 ml fyziologického roztoku na endoteliální glykokalyx v sublingvální mikrocirkulaci u zdravých dobrovolníků – pilotní studie

V naší studii se nám nepodařilo prokázat na vzorku zdravých dobrovolníků, že rychlé podání tekutinového bolusu vede k signifikantnímu zvýšení hodnoty PBR jako indikátoru ztenčení, a tedy poškození EG. S ohledem na různorodost údajů o optimální rychlosti podání tekutinového bolusu [166] a zároveň ne zcela jasnému vlivu rychlosti podání tekutiny na poškození EG, jsme se v experimentu rozhodli pro maximální rychlost podání tekutiny (tj. 60 ml/min), která byla limitována pouze průměrem použité nitrožilní kanyly (G 20). U všech pozorovaných objektů byl čas podání nižší než deset minut, ačkoli v klinické praxi se uvádí průměrná doba podání 500 ml krystaloidu 24 minut [166]. Nelze zobecnit, jestli by byl pozorovaný efekt podání tekutinového bolusu zesílen či zeslaben při volbě jiné rychlosti podání [116]. Ukor et al. prokázal, že podání 1 litru F1/1 za 30 minut oproti 120 minutám vede k méně stabilní hemodynamické odpovědi, což by mohlo do jisté míry ukazovat na dynamičtější fyziologické změny rychlejšího podání roztoku [167].

Z hlediska patofyziologie je možné předpokládat několik mechanismů, které by mohly vést ke změně výšky EG po podání nitrožilního bolusu tekutin. Může dojít ke krátkodobému zvýšení srdečního výdeje na základě Frank-Starlingova mechanismu. Toto zrychlení cirkulace může vést v mikrocirkulaci k rekrutmentu dosud neperfundovaných kapilár a tím k lokální reperfuzi. Dalším vysvětlením by mohlo být zvýšení srdečního výdeje, a tím zvýšení krevního tlaku na prekapilárním konci kapilárního řečiště. Tím dochází ke zvýšení mechanického namáhání (shear stress) kapiláry a následně jejímu poškození [148]. Roli také může mít případné ANP při přechodné hypervolémii, ačkoli mechanismus degradace EG působením ANP není zcela jasný. Puskarich et al. [168] zdokumentoval poškození EG po podání tekutiny na základě měření hladiny syndekanu-1, a to přestože stanovení dostupných humorálních ukazatelů poškození EG není zcela specifické pro poškození EG a může být falešně pozitivní v některých situacích (trauma, zánět) [169]. Bohužel není v žádné z těchto patofyziologických koncepcí znám přesný časový průběh od objevení se patologické noxy k detekovatelnému poškození EG. Biochemický proces degradace je pravděpodobně dynamický, a tudíž zachytitelný až po delším časovém úseku od působení noxy, kdy se degradace EG dostane na rozlišovací schopnost metody. Bohužel, hodnocení s větším časovým odstupem nebylo v naší práci prováděno.

V současné době je ve většině klinických situací preferováno podání balancovaných roztoků před roztokem F 1/1, tradičně pojmenovaným jako fyziologický. Aktuálně byla publikována multicentrická SMART trial, kde Self et al. [170] na velkém počtu pacientů ($n > 13000$) prokázali kladný efekt podání balancovaných roztoků oproti F 1/1. McCluskey et al. [171] prokázali, že kumulativní vyšší hladina chloridů při podání F 1/1 perioperačně (autoři uvádějí termín „akutní postoperační hyperchlorémie“) vede ke zhoršenému výsledku, přičemž velikost hyperchlorémie je úměrná tomuto zhoršení. Nicméně v některých klinických situacích je podání F 1/1 racionální – např. u traumatu mozku s potřebou podání vysoce osmolárních náhrad, případně v situaci hypochloremické alkalózy. O poškození EG vlivem hyperchlorémie neexistují přímé důkazy. Podání většího množství F 1/1 vede ovšem také k přechodné, nebo kumulativní hypernatrémii. Kusche-Vihrog et al. [172] ukazují biochemickou molekulární podstatu poškození endotelu vysokými dávkami NaCl. Bolus fyziologického roztoku by tedy měl hypoteticky simulovat poškození EG jak přechodnou hypervolémií, tak hypernatrémii. Nicméně množství podaného roztoku je oproti zmíněným pracím pravděpodobně příliš malé, aby došlo k významným změnám ve struktuře EG.

K limitacím práce patří fakt, že stanovení PBR bylo jedinou metodou užitou ke stanovení poškození EG. Ke komplexnějšímu posouzení alterace EG by bylo třeba použít některou z dalších metod souběžně (např. hladinu degradačních produktů EG či elektronová mikroskopie erytrocytární glykokalyx). Další limitace automatického hodnocení parametru PBR byly již diskutovány. Podle současných evropských doporučení je softwarová analýza EG „slibná“, ačkoli je třeba ji „validovat v klinické praxi“ a z tohoto důvodu nemůže být zatím klinicky přijata [173]. Stanovení morfologie mikrocirkulace výhradně v sublingvální oblasti je dnes v humánní medicíně bráno jako dostatečné k zobecněné představě o morfologii EG ve většině tkání. V principu by bylo možné stanovit integritu EG během experimentu dalšími metodami (např. hodnocení mikroskopického obrazu dle skóre podle De Backera nebo MFI index, stanovení humorálních markerů degradace EG z krve – viz výše), ale s ohledem na současnou dostupnost a proveditelnost těchto metod bylo pro naše účely stanovení hodnoty PBR vhodnější. Standardizace stanovení integrity a funkce EG nebyla dosud definována.

Ačkoli při stanovování PBR jde o softwarové zpracování obrazu a nejsme si vědomi faktu, že by bylo možné toto zpracování examínátorem ovlivnit, studie nebyla randomizována ani zaslepena. Dobrovolníci byly instruováni před experimentem dodržet míru „běžné“ hydratace, ačkoli tato nebyla přímo definována. Byli žádáni, aby se v předchozích 48 hodinách před měřeními vyvarovali zvýšené námahy a stresu. Další limitací práce byl fakt, že nebyla měřena kontrolní skupina, ačkoli je prakticky nereálné očekávat chybu vedoucí ke „samovolnému“ zlepšení EG během pokusu, které by falešně snižovalo význam intervence v poškození EG.

5.3.2 Neuraxiální anestézie poškozují endoteliální glykokalyx méně než celková anestézie u pacientů operovaných pro náhradu kyčelního nebo kolenního kloubu

Naše studie demonstruje, že chirurgický výkon kloubní náhrady kyčle, nebo kolene zvyšuje parametr PRB 2 hodiny po operaci, a že pacienti v celkové anestézii měli hodnoty PBR vyšší 2 hodiny po operaci než pacienti v neuraxiální anestézii. Dobu 2 hodin jsme zvolili proto, že jsme očekávali plné zotavení ze zbytkové přetrvávající anestézie bezprostředně po výkonu a nebylo popsáno, že by EG regenerovala do původních rozměrů během hodin. Tedy jsme předpokládali, že po 2 hodinách bude poškození EG stále dobře detekovatelné. Výsledky analýzy PBR podporují tezi, že NA je spojena s menší mírou alterace EG ve srovnání s GA pro daný chirurgický výkon. Různé typy chirurgických výkonů byly spojeny s poškozením EG [174,175] a termín „endoteliopatie“ byl zaveden nedávno pro popis změn endoteliální bariéry ve vztahu k traumatu, které se v mnoha pohledech shoduje s chirurgickým výkonem [176]. Diskuze nad tématem typu anestézie a klinického výsledku pacientů po kyčelní náhradě je shrnuta v přehledovém článku Johnsona, který uzavírá, že pro preferenci NA existuje velmi málo důkazů [177]. Nicméně my se domníváme, že právě NA vedla k menším hodnotám PBR v naší studii, jelikož NA blokuje ze všech anesteziologických technik nejefektivněji nociceptivní podněty z operačního pole a tím i snižuje zánětovou odpověď na chirurgický výkon [178]. Nicméně k výsledku mohla přispívat i celkově nižší dávka anestetik (během výkonu v NA byly použity jen malé dávky pro sedaci), modulace tonusu cév a intercelulární interakce intratekálně podaným lokálním anestetikem [179].

Limitace této klinické studie jsou následující. Zaprvé, parametr PBR byl použit jako jediná metoda k vyšetření stavu EG. Tento fakt a plynoucí důsledky i přidané hodnocení degradačních produktů EG byly již diskutovány. Zadruhé, na EG perioperačně působí více vlivů než čistě volba typu anestézie (stav hydratace pacienta před operací, tekutinová terapie, kumulativní tekutinová bilance, krevní ztráta, podávané krevní náhrady, komorbidity, použití turniketu a končetinová ischemie a použití kostního cementu [179–181]). Předpokládali jsme, že kyčelní a kolenní náhrada jsou výkony obdobného chirurgického stresu. Zatřetí, naše studie nebyla randomizovaná. Pacienty jsme zařazovali po sobě jdoucím pořadí ve dvou fakultních nemocnicích, a tedy výsledky mohou být ovlivněny chybou z nenáhodného výběru.

Poškození EG mezi všemi ostatními vlivy může přispívat ke vzniku nechirurgických perioperačních komplikací a náš výsledek nižší alterace EG při použití anesteziologické techniky NA je další indicie k vysvětlení někdy popisovaného lepšího klinického výsledku pacientů, kteří měli NA [178,182,183]. Dle našeho názoru a našich výsledků usuzujeme, že alterace a poškození EG může mít nezanedbatelný dopad na výsledek léčby u pacientů

po chirurgickém výkonu a na intenzitu pooperační nemoci. Hledání postupů šetřících EG zůstává důležitou oblastí výzkumu.

5.3.3 Analýza sublingválního mikrovaskulárního endoteliálního glykokalyx u pacientů v intenzivní péči – prospektivní observační studie

Získané výsledky představují další rozšíření odborného poznání změn EG v průběhu kritického stavu. Role EG v patogenezi patologických stavů v řadě klinických oborů nabývá na významu, společným jmenovatelem je endoteliální dysfunkce [81,174,184–187].

Metoda PBR, jako nepřímého indikátoru poškození EG, byla použita jen v omezeném počtu studií zaměřených na populaci kriticky nemocných [9,121,142]. Naše výsledky z pohledu naměřených hodnot PBR na souboru kriticky nemocných jsou odlišné a u většiny pacientů nedosahují hodnoty uváděné pro populaci pacientů v intenzivní péči [142]. Donati a spolupracovníci ve své práci našli u pacientů v intenzivní péči vyšší mediány hodnot PBR (2.7 μm) ve srovnání s tzv. zdravou populací 2.46 μm , medián hodnot našich pacientů byl 1.97 μm . Dle dřívějších studií při srovnání pacientů se sepsí a bez sepse nebyly rovněž nalezeny signifikantní rozdíly v PBR, přestože trendově pacienti se sepsí měli vyšší hodnoty [142]. V naší práci nebyl zjištěn signifikantní rozdíl v PBR mezi pacienty se sepsí a bez sepse, nicméně hodnoty PBR od přijetí až k 5. dni vykazovaly vyšší trend u pacientů se septickým šokem ve srovnání s pacienty se sepsí bez šoku, kumulativní hodnoty PBR mezi pacienty se septickým šokem byly v naší práci statisticky významně vyšší ve srovnání s pacienty se sepsí bez septického šoku. Diskriminační hodnota PBR pro predikci sepse byla v naší práci rovněž nižší (1.87 μm) ve srovnání s 2.76 μm v Donatiho studii. Je velmi pravděpodobné, že tíže poškození EG stoupá se závažností septického šoku, a že v případném hodnocení PBR musí být vzaty do úvahy její výchozí hodnoty, jsou-li dostupné. Identicky se studií Donatiho jsme nenalezli statisticky významnou korelaci mezi hodnotou PBR a APACHE II nebo SOFA skóre.

Vyšší hodnoty PBR byly rovněž nalezeny v recentní práci Rovase et al. sledující PBR u kriticky nemocných pacientů na JIP a na oddělení urgentního příjmu (OUP) [121]. Medián hodnoty PBR na JIP byl 2.58 μm , resp. 2.32 μm na OUP. Odlišná "pásma" hodnot PBR souboru kriticky nemocných v naší práci a ve výše uvedených studiích jsou zjevná. Za nejvíce pravděpodobné vysvětlení považujeme (při automatizovaném snímání videosekvencí sublingvální mikrocirkulace a následné plně automatizované analýzy PBR) vysokou variabilitu hodnot PBR,

na které se může podílet řada chronických i akutních proměnných se vztahem k pacientovi (např. věk, komorbidity, kouření, farmakoterapie, stav náplně krevního řečiště, hladiny natria, anémie a řada dalších) [19,81,117,163,188]. Vysokou interindividuální variabilitu parametru PBR konstatuje jak zmíněná práce Rovase, tak ji potvrzují i vlastní hodnoty PBR v rozpětí 1,61 – 2,25 μm získané od 21 zdravých mladých dobrovolníků (nepublikovaná data, rukopis v recenzním řízení). Z toho důvodu je obtížné jak definování velikosti souboru na počátku studie, tak hodnoty PBR u zdravé populace (ve většině prací je tato hodnota nižší než 2 μm) a výsledky u jednotlivých autorů tím nekorespondují. V naší studii bychom hypoteticky při širší kohortě pacientů mohli získat jiná data.

Z pohledu role EG v patogenezi kritických stavů považujeme za důležité diskutovat tři výsledky naší práce. Za první, nález vyšší hodnoty PBR u stavů, které vznikaly s velkou pravděpodobností postupně. Výsledky podporují tezi, že chronické stavy mohou negativně ovlivňovat integritu EG a že EG pacientů s dlouhodobými komorbiditami (např. *diabetes mellitus*, kardiovaskulární choroby) v čase vzniku kritického stavu může být v horší "kondici" než u pacientů bez předchozího onemocnění, kde dojde ke zhoršení stavu vlivem akutního inzultu (trauma, zástava oběhu). Asociace dysfunkce EG s chronickými chorobami je prokázána [189], srovnání PBR mezi populacemi JIP akutně vzniklých stavů a stavů vzniklých progresí chronické choroby jsme v dostupné literatuře nenašli. Zda může akutnímu inzultu předcházející poškození EG fungovat jako "preconditioning", nebo naopak zda takovéto dlouhodobé "poškození" činí EG více zranitelnou i vůči (za jiných okolností) podprahovým podnětům, nelze na základě dostupné evidence jednoznačně formulovat. Za druhé, vyšší hodnoty PBR u pacientů s CRRT ve srovnání s nemocnými bez CRRT podle našeho názoru jednoznačně podporují potenciální negativní roli všech intervencí, založených na mimotělní cirkulaci krve, na integritu EG, přestože reálný biologický a klinický význam podílu CRRT může být v kontextu ostatních proměnných ovlivňujících EG velmi malý. Degradace EG je opakovaně popsána u pacientů s mimotělním oběhem pro operace [190] i při použití hemodialýzy, přestože se např. u hemodialyzovaných pacientů na dysfunkci EG může podílet i případná hypervolemie [191,192].

Za třetí, u pacientů s hyperlipidémií jsme zjistili trend k vyšším hodnotám PBR ve srovnání s pacienty, kde hyperlipidémie nebyla přítomna. Role lipidů ve vztahu k integritě EG je studována řadu let, primární zájem byl především v kontextu aterogeneze [123,124], nověji se diskutují koncepce ochrany EG např. glykolipidy [193–195]. Výsledky navazujícího výzkumu autorů práce umožňují rovněž formulovat hypotézu případného ochranného efektu podávaných tukových emulzí na integritu EG u kriticky nemocných (zatím nepublikovaná data, ale rukopis přijat k publikaci).

Za hlavní limit studie považujeme kromě počtu analyzovaných pacientů především metodu hodnocení EG, resp. fakt, že PBR byl jedinou použitou metodou kvantifikace změn EG. Jakkoliv je analýza sublingvální mikrocirkulace s využitím parametru PBR v současnosti prakticky jedinou klinicky využitelnou metodou k nepřímému posouzení EG, variabilita parametru PBR je podle názoru autorů práce tak veliká, že všechny práce zabývající se sledováním EG by měly využívat minimálně ještě jednu další metodu kvantifikace poškození EG, založenou na jiném principu, než je PBR, např. sledování některého z degradačních produktů EG. Též zatím nelze určit, zdali je hodnotnější sledování absolutní hodnoty PBR či jejího trendu v čase.

Role EG v patogenezi chorobných stavů je studována s narůstajícím zájmem řady klinických oborů (kardiologie, diabetologie, nefrologie, revmatologie, hematologie, onkologie). Patologie endotelu se ukazuje jako jeden z klíčových momentů rozvoje orgánového poškození u pacientů v intenzivní péči. Výzkum EG představuje jeden ze směrů, který v budoucnu může přinést do akutní medicíny řadu nových koncepcí a/nebo přinést nové pohledy na dosavadní praxi - např. tekutinová terapie (rychlost infuzní terapie, složení roztoků) nebo změny koncentrace sodíku v séru [25] mohou modulovat stav EG. Prohloubení stavu odborného poznání o případném vlivu našich léčebných postupů na EG může v budoucnu (z)měnit dosavadní pohled na jejich použití [15].

5.3.4 Vliv podání tukové emulze v rámci parenterální výživy na integritu endoteliálního glykokalyx u pacientů po chirurgickém výkonu – mikroskopická a biochemická pilotní studie

Hlavním výsledkem studie byla absence detekovatelného poškození EG po podání tukové emulze SMOFlipid 20 % u pacientů v chirurgické intenzivní péči parametrem PBR a hladinami rozpadového produktu EG syndekanu-1. EG představuje místo prvotního působení podaných léků, intervencí a odezvy organismu na noxu [196,197], tedy otestování vlivu našich terapeutických intervencí, včetně PN, co do působení na EG by mělo být prvotním zájmem.

Minimální změna v parametru PBR se dá interpretovat několika směry. Zaprvé, podání lipidové emulze může skutečně mít na EG minimální vliv. Zadruhé, jak již bylo diskutováno v jiných pracích, metoda zjištění parametru PBR má velkou variabilitu, v této studii byly hodnoty PBR ve skupinách se statisticky významnou variabilitou. Zatřetí, parametr PBR mohl reflektovat jiné

vlivy: typ anestézie, perioperační stav hydratace, typ použitých náhradních roztoků, podané transfuze, krevní ztráta, chronické onemocnění v osobní anamnéze atd. [15]. Také na pokles hladin obou typů syndekanu musíme pohlížet opatrně, přestože bychom mohli tvrdit, že poklesem jejich hladin jsme prokázali protektivní působení podané tukové emulze na EG. Fyziologie a patofyziologie komponent EG byla popsána a diskutována v kapitole 1.4.7 a 1.5. Hladiny syndekanu-1 byly v naší studii srovnatelné s ostatními klinickými studii hodnotícími degradaci EG při těžkých úrazech a chirurgických výkonech. [62,87,198] Dále nelze vyloučit jiné vlivy působící na EG co do potenciálního zvýšení či snížení hladiny syndekanu-1: chronická renální insuficience, chronická jaterní insuficience, terapie katecholaminy, ischemie a reperfuze vlivem perioperační hypotenze, použití propofolu, hypervolemie, plicní embolizace a infekce [87,117,151,179,198–206]. Klinické studie hodnotící syndekan-4 jako degradační produkt EG jsou méně časté a zatím nepřinášejí jasné výsledky [203].

Hypoteticky by mohlo protektivní působení tukové emulze být důvodem obsahu S1P. Jeho koncentraci ve SMOFlipid 20 % jsme neměřili, protože může být velmi variabilní z povahy výroby emulze (obsah v rybím oleji, obsah fytoosterolů). Ceramidy jsou v centru metabolismu sfingolipidů [128]. Metabolity jako sfingozin, S1P a ceramid-1-fosfát jsou dobře známé biologicky aktivní substance regulující mnoho metabolických drah, přestože jejich komplexní role v našem organismu nebyla dosud kompletně zmapována. S1P má potenciál reparovat EG přes indukci opravy HS [57,127,194,207,208]. S1P je typ membránového fosfolipidu fungujícího jako signální molekula endoteliálních buněk s dopadem na buněčné přežívání, ochranu, trombózu a zánět [124]. Experimentální práce zaměřující se na modulaci, regeneraci a syntézu EG prokázali S1P jako bioaktivní molekulu, která indukuje obnovu EG přes syntézu HS a [194] navíc exogenně podaný S1P obnovuje mezibuněčné endoteliální spoje a tím regulaci transendoteliální propustnosti [57,127,207]. Kompletní mechanismus S1P v obnově EG zatím není jasný. Spolupodílet se může dále např. snížení LDL, které bylo popsáno po podání tukové emulze [209]. HDL též může hrát roli. Podle recentní studie mohou hladiny HDL mezi 1,8 a 2,6 mmol/l modulovat a ochraňovat endoteliální funkce u pacientů s arteriální hypertenzí [210].

Nezměněná výška EG hodnocená parametrem PBR a sníženými hladinami syndekanu-1 a syndekanu-4 po podání tukové emulze SMOFlipid 20 % navrhuje tvrzení, že tuková emulze může potenciálně modulovat a ochraňovat EG. Role S1P a ostatních komponent tukové emulze je v tomto působení neobjasněna.

Výsledky této pilotní studie přinášejí další důkaz o bezpečnosti podávání tukových emulzí v rámci PN pacientům v intenzivní péči. Výzkum zaměřený na akutní endoteliální dysfunkci

v kombinaci s výsledkem léčby se stále rozšiřuje [211]. Podobnou studii zabývající se vlivem PN na EG jsme nenašli. Doufáme, že naše výsledky podpoří výzkum v této oblasti.

5.3.5 Vliv poruch metabolismu lipidů na endoteliální glykokalyx – pilotní observační studie

Naše studie přináší unikátní analýzu mikrocirkulace se zaměřením na EG u pacientů s poruchou metabolismu tuků. Skupiny pacientů jsme zvolili dle předpokládaného rozdílu v poškození EG. Na jedné straně korigovaná dyslipoproteinémie na terapii statinem, na straně druhé pacienti po opakovaných resekcích se syndromem krátkého střeva, jejichž přežití je závislé na pomocné DDPV. Srovnáním laboratorních výsledků lze usoudit, že tato skupina pacientů měla hlubší poruchu metabolismu tuků, a tedy jsme i předpokládali vyšší míru poškození EG. Interakce lipidů s EG nejsou zatím dobře popsány, a navíc na celkovém poškození EG a mikrocirkulace se podílí celá řada faktorů tvořící i výsledný klinický stav pacienta [15], který byl ve skupině s DDPV těžší. Tito pacienti jsou často v relativní malnutrici [212] a mají sníženou aktivitu imunitního systému [213], což může významnou měrou přispívat i k poškození EG. Zatím dobře dokumentovaný pozitivní vliv na EG byl popsán u S1P, který byl již diskutován v předchozí studii. V naší studii jsme prokázali středně silnou korelaci hladiny syndekanu-1 a hladiny cholesterolu a LDL. EG je jedním z protektivních faktorů aterogeneze [214] a do budoucna se zdá být velmi slibným terapeutickým cílem [193]. Dokumentováno bylo poškození EG vlivem oxidovaných LDL částic [54], s čímž naše výsledky korespondují. Těž byl prokázán protektivní vliv terapie statiny na EG [126,209], což opět koresponduje s naším nálezem menší míry poškození EG u pacientů s dyslipidemií na léčbě statiny. Hodnoty PBR u této skupiny pacientů v naší studii byly srovnatelné s hodnotami se zdravou populací (manuskript odeslán k recenznímu řízení). EG může být velmi významně ovlivněna poruchou funkce ledvin [215] a hypernatrémii [16]. U obou skupin byl tento vliv vyloučen (Tab. 18). Hladiny syndekanu-4 jsou u obou skupin srovnatelné. Na jednu stranu toto můžeme považovat za příznivý faktor, na druhou stranu význam syndekanu-4 je v klinické medicíně zatím nejasný. Ač syndekan-1 a PBR mohou vykazovat pozitivní trend, není mezi nimi těsný vztah, což je dáno i vysokou variabilitou hodnot PBR [136].

Limitace naší studie jsou následující. Zvolili jsme skupiny, které jsou vůči sobě velmi variabilní (poměr muži – ženy, věk, komorbidita, fyzická kondice) a tím mezi sebou těžko porovnatelné, nicméně v naší studii jsme se zaměřili spíše na popis stavu EG u daných skupin, než jejich

porovnání. Dále, skupiny byly malé na to, abychom mohli formulovat jasný závěr. Kvůli rozptýlu výsledků zvolených metod u zdravé populace by musela být populace pacientů vyšší (řádově několik desítek jedinců). Naše studie byla pilotní a snažili jsme se zjistit, zdali mezi skupinami bude pozitivní signál rozdílu měřených veličin.

5.3.6 Hodnocení stavu endoteliálního glykokalyx u zdravých dobrovolníků – observační studie

Práce se zabývala popisem stavu EG u zdravých dobrovolníků. Studii, která by se zabývala stejným tématem jsme nenašli, přestože v posledních letech se rychle množí práce o EG, ve kterých většina autorů používá jako kontrolní skupinu vlastní kohortu, která je předmětem studie před plánovanou studovanou intervencí nebo stavem. Také byly publikovány již dvě populační studie [144,216]. Všechny publikované výsledky jsme porovnali s námi získanými daty, abychom získali představu o stavu EG u zdravých jedinců (Tab. 22 a 23). K popisu EG byly použity dvě metody, se kterými máme nejvíce zkušeností a které jsou v literatuře rozšířeny nejen v souvislosti s výzkumem EG u lidí: videomikroskopickou automatizovanou metodu hodnotící parametr PBR v sublingvální mikrocirkulaci a biochemickou analýzu degradačního produktu EG syndekanu–1. Klinické použití, výhody a nevýhody obou metod byly již diskutovány v předchozím textu.

Rozborem dostupné literatury jsme se snažili najít hodnoty parametru PBR u zdravých jedinců, resp. u kontrolních skupin (Tab. 22), přičemž jsme získali dvě hraniční hodnoty: PBR menší než 2,0 μm nepřímou reflektuje fyziologickou vrstvu EG u zdravých jedinců, naproti tomu hodnoty PBR nad 2,5 μm jsou spojeny s významným poškozením EG v kritických stavech (septický šok, syndrom po zástavě oběhu a po mimotělním oběhu) [190]. Ze všech dostupných dat (včetně výsledků diskutované studie) jsme získali hypotetický populační medián hodnoty PBR 2,01 μm .

Mimo syndekan–1 lze měřit mnoho dalších solubilních komponent EG a sledovat jejich trend při narušení celistvosti EG (HS, HA, glypikany, perlekany). Jejich hladiny mají však v plazmě velkou variabilitu [217,218], přestože v akutní fázi dochází k jejich zvýšení a mohou korelovat s intenzitou inzultu [219,220]. Rozborem hodnot syndekanu–1 z dostupné literatury včetně našich výsledků (Tab. 23), které byly řádově od nedetekovatelných hladin po několik set

nanogramů na mililitr, jsme získali hypotetickou hodnotu reprezentující populaci zdravých jedinců 17,00 ng/ml.

Abychom mohli námi získané hodnoty obou popisných metod stavu EG považovat za skutečné fyziologické základní hodnoty u zdravých jedinců, bylo by třeba provést velkou kohortovou studii za přesně definovaných podmínek. Další limitací naší studie je, že jsme u dobrovolníků nehodnotili krevní obraz. Předpokládali jsme totiž, že všichni dobrovolníci jsou zdraví, pravidelně sportují a nikdo z nich neměl klinické příznaky anémie. Dále jsme nehodnotili glykémii, natrémii ani kreatininémii, jelikož jsme předpokládali, že všichni dobrovolníci nejsou diabetici a mají normálně fungující ledviny. Též jsme nezjišťovali u žen fázi menstruačního cyklu, přestože je popsáno, že hladiny syndekanu-1 se mohou při ovulaci významně zvyšovat a mohou dokonce předznamenávat rozvoj premenstruačních otoků [146]. Nakonec jsme v hodnotách syndekanu-1 vynechali jednu odlehlou hodnotu, která byla o jeden řád vyšší než ostatní hodnoty. Dobrovolník, kterému hodnota náležela, přiznal, že před odběrem vykouřil cigaretu, ačkoli nebyl pravidelný kuřák. Odlehlá hodnota syndekanu-1 byla 7,3 ng/ml. Hodnota parametru PBR tohoto dobrovolníka byla 1,81 μm , což vznáší otázku dostatečné citlivosti parametru PBR na akutně vzniklé změny EG.

5.4 Postupy a látky působící protektivně na endoteliální glykokalyx

Nejen z výsledků našeho výzkumu je zřejmé, že každou terapeutickou intervencí bychom měli hodnotit i co do vlivu na mikrocirkulaci, případně endoteliální glykokalyx. Přestože dosud nebyla identifikována přesná, široce použitelná, rychlá a reprodukovatelná metoda hodnotící stav EG ani standardizovaný model poškození EG, je z výsledků dosud publikovaných prací možno najít zavedenými metodami postupy a látky, které EG chrání a napomáhají jeho regeneraci.

Tekutinová terapie je terapeutický postup prokazatelně vedoucí k poškození EG, který byl předmětem dvou diskutovaných studií a opakovaně diskutován v jiných studiích. V přístupu k pacientovi s nutností tohoto typu intervence musí být proto EG zohledněn.

Volba anesteziologické techniky, která je v rukou anesteziologa, může též ovlivnit kvalitu EG a potenciálně i mikrocirkulace, což bylo též předmětem jedné z diskutovaných studií.

Další postupy a látky působící protektivně na EG byly předmětem mnoha prací a přehledových článků [15]. Současnou evidenci shrnuje tabulka 25.

Tab. 25: Látky a postupy s prokázaným protektivním vlivem na endoteliální glykokalyx

Protektivní látka	Mechanismus	Poznámka	Studie (citace)
Sulodexid	Snížený transkapilární únik albuminu, snížená aktivita hyaluronidázy,	Pacienti s diabetem mellitem II. typu	Broekhuizen et al. 2010 [99]
Albumin	Snížená extravazace tekutin, menší intrakoronární retence leukocytů	Experiment na srdci morčete	Jacob et al. 2006, 2009 [221,222]
S1P	Regenerace a zachování vrstvy EG, snížení hladin syndekanu-1, blokování matrixmetaloproteináz	Studie <i>in vitro</i>	Zeng et al. 2014, [195] Zhang et al. 2016, [127] Hsia et al. 2017 [208]
HA, chondroitin sulfát	Regenerace EG po působení hyaluronidázy	Experiment na kremasterovém svalu křečka	Henry, Duling 1999 [79]
Hydrokortizon, antitrombin	Nižší oxidační stres, uvolňování histaminu a adheze leukocytů	Experiment na srdci morčete	Chappell et al. 2007, 2009, 2009, 2010 [90,223–225]
N-acetylcystein	Ochrana EG při akutní hyperglykémii	Studie s dextranem značenými erytrocyty	Nieuwdorp et al. 2006 [226]
Oxid dusnatý	Snížená extravazace tekutin	Experiment na srdci morčete	Bruegger et at. 2008 [227]
Protein C	Snížení oxidačního stresu	Experimentální model sepse u potkanů	Marechal et al. 2008 [53]
Hydroxyetyl škrob	Snížení filtrace přes kapilární membránu a intersticiální otok	Experiment na srdci morčete	Rehm et al. 2004, [38] Jacob et al. 2006 [222]

Metformin	Zvýšená clearance dextranů	Model <i>diabetes mellitus</i> na myši	Eskens et al. 2013 [228]
Lidoflazin	Zachování výdeje levé srdeční komory	Pacienti indikování s mnohočetnému AKB	Flameng1983 et al. [229]
Sevofluran	Snížená adheze leukocytů a trombocytů	Experiment na srdci morčete	Chappell et al. 2011 [230]

S1P – sfingozin-1-fosfát, EG – endoteliální glykokalyx, HA – kyselina hyaluronová, AKB – aortokoronární bypass.

5.5 Potenciální témata dalšího výzkumu

Stejně tak jak dynamická je struktura EG, tak dynamicky se rozvíjí jeho výzkum v experimentální i klinické oblasti. Velmi důležitým tématem jsou nitrožilně podávané roztoky, jelikož jsou ihned v přímém kontaktu s EG a mohou tedy ihned na EG působit. Revize Starlingova principu filtrace tekutin na kapilárním konci cévního řečiště je jen jednou z oblastí fyziologie mikrocirkulace, kde EG hraje zásadní roli. Inovace klinicky používaných roztoků v souvislosti se strukturou EG může zcela zásadně ovlivnit jejich chování v těle a jejich působení na lidský organismus, tedy jejich farmakokinetiku a farmakodynamiku. Nastala by potom nutnost revize dalších principů a biologických axiomů, které byly formulovány v době, kdy se o přítomnosti a velmi komplexní fyziologii EG nevědělo.

EG má velký potenciál být použit ve specifických klinických situacích, kdy může zásadním způsobem napomoci vyřešit v klinice často kladenou otázku, zdali pacienta intervenovat. Díky své komplexní fyziologii může být EG nápomocen v různých oborech medicíny:

- 1) Preeklampsie je patologický stav v těhotenství, který vychází z narušené rovnováhy placentální mikrocirkulace a který může rodičku, a tím i plod ohrožovat na životě. Již byly popsány změny v hladinách degradačních produktů EG v souvislosti s progresí preeklampsie a jejich detailní znalost a dynamika by mohli pomoci načasovat indukci plicní zralosti plodu a indikaci k císařskému řezu [231,232].

- 2) Transfuze představuje ve své podstatě transplantaci tekutého orgánu se všemi imunologickými riziky pro příjemce. V urgentní medicíně existuje koncepce oběhové resuscitace bez použití plazmy a prvotního ošetření zdrojů krvácení před podáním krevních převodů (umožňuje-li to stav pacienta) [233]. Dynamika změn EG by mohla pomoci načasování transfuzního protokolu ve snaze minimalizovat imunitní zátěž organismu.
- 3) Oběhová nestabilita na oddělení urgentního příjmu, v prostředí intenzivní péče či na operačním sále může pacienty vážně ohrožovat na životě. Používané látky, ať tělu vlastní či nikoli, které navracejí krevní tlak a srdeční výdej do standardizovaných rozmezí mohou významně ovlivňovat mikrocirkulaci [234]. Laboratorní indikátory oběhové nestability nám někdy mohou pomoci adekvátně nastavit léčbu a EG má velký potenciál být dalším poměrně spolehlivým kazatelem oběhové nestability, a tedy dalším vodítkem v léčbě.
- 4) Nádorová onemocnění jsou definována změnou genotypu a fenotypu buněk. K podobným změnám dochází i v glykokalyx [187], což představuje další neprobádanou oblast výzkumu. Velmi slibnou metodou je průtoková *cytoflowmetrie*, kterou bychom mohli zachytit díky změnám v glykokalyx časně metastazující buňky.
- 5) Na poli výzkumu regenerace EG jsou horkou novinkou nanomateriály a nanonosiče. Jak bylo experimentálně prokázáno, EG může dodáním svých komponent samovolně regenerovat [37,235]. Osud těchto nanočástic je zatím v organismu mimo cílenou funkci neznámý a než se s nimi začne pracovat v klinickém výzkumu, je nejprve třeba zodpovědět mnoho otázek souvisejících s bezpečností a hygienou.
- 6) V neposlední řadě stále přetrvává nutnost standardizace metod hodnocení EG a hledání modelu standardizovaného poškození EG pro možnost testování léčebných postupů jak již zavedených, tak nových, které mohou být v první fázi zacíleny pouze na EG, případně na mikrocirkulaci.

6. ZÁVĚRY

6.1 Experimentální studie

6.1.1 Změny výšky endoteliálního glykokalyx během náhlé zástavy oběhu na experimentálním modelu srdeční zástavy u prasete domácího

Náhlá zástava oběhu s následující 20 minut trvající obnovou spontánní cirkulace nevedly k významnému zvýšení parametru PBR, a tedy k alteraci EG na modelu srdeční zástavy na praseti.

Hypotéza, že náhlá zástava oběhu vede k poškození EG, nebyla potvrzena.

6.1.2 Efekt akutně vzniklé hypernatrémie podáním hypertonického roztoku chloridu sodného na endoteliální glykokalyx u králíka

Akutně vzniklá hypernatrémie navozená nitrožilním podáním hypertonického roztoku NaCl byla spojena se zvýšením parametru PBR v sublingvální mikrocirkulaci. Zvýšení parametru PBR nebylo doprovázeno podobným zvýšením plazmatické koncentrace syndekanu-1, což naznačuje přechodný a pravděpodobně jen funkční efekt na EG spíše než přímé poškození.

Hypotéza, že iatrogeně navozená hypernatrémie poškozuje EG, nebyla úplně potvrzena.

6.2 Klinické studie

6.2.1 Vliv tekutinové výzvy 500 ml fyziologického roztoku na endoteliální glykokalyx v sublingvální mikrocirkulaci u zdravých dobrovolníků – pilotní studie

V naší studii jsme neprokázali poškození EG stanovitelné hodnocením parametru PBR bezprostředně po podání tekutinového bolusu 500 ml F 1/1 v co nejkratším možném čase u skupiny 12 zdravých dobrovolníků. Z hlediska makrohemodynamiky vedlo podání infuzního roztoku k významnému snížení tepové frekvence, jiné změny nebyly pozorovány. Ačkoli jsme nebyly v našem experimentu schopni zaznamenat významnou změnu parametru PBR, a tedy

alterace EG u zdravých dobrovolníků, nelze zcela vyloučit, že k těmto změnám nemůže dojít při expozici většího množství nitrožilně podaných roztoků na bázi F 1/1 nebo v delším časovém úseku.

Hypotéza, že nadměrně rychlá tekutinová resuscitace vede k poškození EG, nebyla jasně potvrzena.

6.2.2 Neuraxiální anestézie poškozuje endoteliální glykokalyx méně než celková anestézie u pacientů operovaných pro náhradu kyčelního nebo kolenního kloubu

Elektivní náhrada kyčelního nebo kolenního kloubu vedla k významnému zvýšení parametru PBR, což poukazuje na poškození EG během chirurgického výkonu. Podstoupení výkonu v neuraxiální anestézii vedlo k významně menšímu zvýšení parametru PBR ve srovnání s celkovou anestézií což naznačuje menší dopad na mikrocirkulaci volbou anesteziologické techniky a bylo spojeno s menším výskytem pooperačních komplikací.

Hypotéza, že celková anestézie poškozuje EG více než celková anestézie, byla potvrzena.

6.2.3 Analýza sublingválního mikrovaskulárního endoteliálního glykokalyx u pacientů v intenzivní péči – prospektivní observační studie

Hodnoty PBR pacientů v intenzivní péči vykazovaly vysokou variabilitu, která neumožňuje jejich praktické využití v predikci sepse nebo pozitivní bilance tekutin. Vyšší hodnoty PBR byly spojeny se septickým šokem, pozvolným vznikem kritického stavu a přítomností CRRT. Hodnocení EG v klinických studiích by mělo být založeno na kombinaci více metod.

Hypotéza, že tíže stavu pacienta v intenzivní péči a metody náhrady orgánových funkcí poškozují EG, nebyla plně prokázána.

6.2.4 Vliv podání tukové emulze v rámci parenterální výživy na integritu endoteliálního glykokalyx u pacientů po chirurgickém výkonu – mikroskopická a biochemická pilotní studie

Infuze tukové emulze trvající šest hodin nebyla spojena s významnými změnami EG hodnocenými parametrem PBR a plazmatickou koncentrací syndekanu-1.

Hypotéza, že podání tukové emulze poškozuje EG, nebyla potvrzena.

6.2.5 Vliv poruch metabolismu lipidů na endoteliální glykokalyx – pilotní observační studie

V naší pilotní studii jsme prokázali statisticky významně rozdílnou míru poškození EG u pacientů s korigovanou dyslipidémií na terapii statiny a u pacientů se syndromem krátkého střeva s pomocnou DDPV. Hodnoty zvolených ukazatelů stavu EG byly u pacientů s dyslipidémií srovnatelné se zdravou populací, což poukazuje na možný protektivní vliv statinů na EG. Prokázali jsme středně silnou korelaci mezi rozpadovým produktem EG, syndekanem-1 a celkovým cholesterolem a LDL částicemi. Naše nálezy korespondují s údaji v literatuře a potvrzují, že EG může být jedním z terapeutických cílů v prevenci vzniku aterosklerózy.

Hypotéza, že porucha metabolismu tuků koreluje s poškozením EG, byla potvrzena.

6.2.6 Hodnocení stavu endoteliálního glykokalyx u zdravých dobrovolníků – observační studie

Studie prezentuje hodnocení EG u mladých zdravých jedinců použitím videomikroskopické metody s parametrem PBR a biochemického stanovení koncentrace syndekanu-1. Výsledky mohou být použity k porovnání s kohortami stejně starých jedinců nebo v přehledových člácích.

7. POUŽITÁ LITERATURA

1. Becker SM, Kuznetsov A V., Kapellos GE, Alexiou TS. Modeling Momentum and Mass Transport in Cellular Biological Media: From the Molecular to the Tissue Scale. *Transp Biol Media* 2013; 1–40.
2. Costerton JW, Irvin RT, Cheng KJ. The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* 1981; 35:299–324.
3. Potter DR, Damiano ER. The hydrodynamically relevant endothelial cell glycocalyx observed in vivo is absent in vitro. *Circ Res* 2008; 102:770–6.
4. Egberts HJ, Koninkx JF, van Dijk JE, Mouwen JM. Biological and pathobiological aspects of the glycocalyx of the small intestinal epithelium. A review. *Vet Q* 1984; 6:186–99.
5. Reitsma S, Slaaf DW, Vink H, van Zandvoort MAMJ, oude Egbrink MGA. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflugers Arch* 2007; 454:345–59.
6. Luft JH. Fine structures of capillary and endocapillary layer as revealed by ruthenium red. *Fed Proc* 25:1773–83.
7. Gorshkov AY, Klimushina M V, Boytsov SA, Kots AY, Gumanova NG. Increase in perfused boundary region of endothelial glycocalyx is associated with higher prevalence of ischemic heart disease and lesions of microcirculation and vascular wall. *Microcirculation* 2018; 25:e12454.
8. Kim TK, Nam K, Cho YJ, Min JJ, Hong YJ, Park KU, Hong DM, Jeon Y. Microvascular reactivity and endothelial glycocalyx degradation when administering hydroxyethyl starch or crystalloid during off-pump coronary artery bypass graft surgery: a randomised trial. *Anaesthesia* 2016; 72:204–13.
9. Martens RJH, Vink H, Van Oostenbrugge RJ, Staals J. Sublingual microvascular glycocalyx dimensions in lacunar stroke patients. *Cerebrovasc Dis* 2013; 35:451–4.
10. Koning NJ, Vonk ABA, Vink H, Boer C. Side-by-side alterations in glycocalyx thickness and perfused microvascular density during acute microcirculatory alterations in cardiac surgery. *Microcirculation* 2015; 23:69–74.

11. Weinbaum S, Zhang X, Han Y, Vink H, Cowin SC. Mechanotransduction and flow across the endothelial glycocalyx. *Proc Natl Acad Sci* 2003; 100:7988–95.
12. Weinbaum S, Tarbell JM, Damiano ER. The structure and function of the endothelial glycocalyx layer. *Annu Rev Biomed Eng* 2007; 9:121–67.
13. Bass MD, Morgan MR, Humphries MJ. Syndecans shed their reputation as inert molecules. *Sci Signal* 2009; 2:pe18.
14. Suenaga N, Mori H, Itoh Y, Seiki M. CD44 binding through the hemopexin-like domain is critical for its shedding by membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *Oncogene* 2005; 24:859–68.
15. Cerny V, Astapenko D, Brettner F, Benes J, Hyspler R, Lehmann C, Zadak Z. Targeting the endothelial glycocalyx in acute critical illness as a challenge for clinical and laboratory medicine. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2017; 54:343–57.
16. Korte S, Wiesinger A, Straeter AS, Peters W, Oberleithner H, Kusche-Vihrog K. Firewall function of the endothelial glycocalyx in the regulation of sodium homeostasis. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 2012; 463:269–78.
17. Fridén V, Oveland E, Tenstad O, Ebefors K, Nyström J, Nilsson UA, Haraldsson B. The glomerular endothelial cell coat is essential for glomerular filtration. *Kidney Int* 2011; 79:1322–30.
18. Oberleithner H. Vascular endothelium: a vulnerable transit zone for merciless sodium. *Nephrol Dial Transplant* 2014; 29:240–6.
19. Oberleithner H, Peters W, Kusche-Vihrog K, Korte S, Schillers H, Kliche K, Oberleithner K. Salt overload damages the glycocalyx sodium barrier of vascular endothelium. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 2011; 462:519–28.
20. Becker BF, Chappell D, Bruegger D, Annecke T, Jacob M. Therapeutic strategies targeting the endothelial glycocalyx: acute deficits, but great potential. *Cardiovasc Res* 2010; 87:300–10.
21. Nijst P, Verbrugge FH, Grieten L, Dupont M, Steels P, Tang WHW, Mullens W. The pathophysiological role of interstitial sodium in heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2015; 65:378–88.
22. Starling EH. On the Absorption of Fluids from the Connective Tissue Spaces. *J Physiol* 1896; 19:312–26.

23. Levick JR, Michel CC. Microvascular fluid exchange and the revised Starling principle. *Cardiovasc Res* 2010; 87:198–210.
24. Oberleithner H, Wilhelmi M. Vascular Glycocalyx Sodium Store - Determinant of Salt Sensitivity? *Blood Purif* 2015; 39:7–10.
25. Astapenko D, Dostalova V, Dostalova V, Kraus J, Radochova V, Dostal P, Ticha A, Hyspler R, Lehmann C, Cerny V. Effect of acute hypernatremia induced by hypertonic saline administration on endothelial glycocalyx in rabbits. *Clin Hemorheol Microcirc* 2018; 1–10.
26. Gittes F, Mickey B, Nettleton J, Howard J. Flexural rigidity of microtubules and actin filaments measured from thermal fluctuations in shape. *J Cell Biol* 1993; 120:923–34.
27. Potter DR, Jiang J, Damiano ER. The recovery time course of the endothelial cell glycocalyx in vivo and its implications in vitro. *Circ Res* 2009; 104:1318–25.
28. Pries AR, Secomb TW, Jacobs H, Sperandio M, Osterloh K, Gaehtgens P. Microvascular blood flow resistance: role of endothelial surface layer. *Am J Physiol* 1997; 273:H2272–9.
29. Secomb TW, Hsu R, Pries AR. A model for red blood cell motion in glycocalyx-lined capillaries. *Am J Physiol* 1998; 274:H1016–22.
30. Savery MD, Damiano ER. The endothelial glycocalyx is hydrodynamically relevant in arterioles throughout the cardiac cycle. *Biophys J* 2008; 95:1439–47.
31. Chappell D, Jacob M, Paul O, Rehm M, Welsch U, Stoeckelhuber M, Conzen P, Becker BF. The glycocalyx of the human umbilical vein endothelial cell: an impressive structure ex vivo but not in culture. *Circ Res* 2009; 104:1313–7.
32. Zeng Y, Tarbell JM. The Adaptive Remodeling of Endothelial Glycocalyx in Response to Fluid Shear Stress. *PLoS One* 2014; 9:e86249.
33. Tarbell JM, Pahakis MY. Mechanotransduction and the glycocalyx. *J Intern Med* 2006; 259:339–50.
34. Davies PF. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev* 1995; 75:519–60.
35. Thi MM, Tarbell JM, Weinbaum S, Spray DC. The role of the glycocalyx in reorganization of the actin cytoskeleton under fluid shear stress: a ‘bumper-car’ model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:16483–8.

36. Florian JA, Kosky JR, Ainslie K, Pang Z, Dull RO, Tarbell JM. Heparan sulfate proteoglycan is a mechanosensor on endothelial cells. *Circ Res* 2003; 93:e136–42.
37. Ebong E, Kumar R, Sridhar S, Webster T, Cheng M. Endothelial glycocalyx conditions influence nanoparticle uptake for passive targeting. *Int J Nanomedicine* 2016; Volume 11:3305–15.
38. Rehm M, Zahler S, Lötsch M, Welsch U, Conzen P, Jacob M, Becker BF. Endothelial glycocalyx as an additional barrier determining extravasation of 6% hydroxyethyl starch or 5% albumin solutions in the coronary vascular bed. *Anesthesiology* 2004; 100:1211–23.
39. Astapenko D, Pouska J, Černý V, Beneš J. The endothelial glycocalyx and fluid therapy in critical care and perioperative medicine. *Anesteziol a Intenziv Med* 2017; 28:287–94.
40. Woodcock TE, Woodcock TM. Revised Starling equation and the glycocalyx model of transvascular fluid exchange: an improved paradigm for prescribing intravenous fluid therapy. *Br J Anaesth* 2012; 108:384–94.
41. Spiess BD. Heparin: Effects upon the Glycocalyx and Endothelial Cells. *J Extra Corpor Technol* 2017; 49:192–7.
42. Wodicka J, Chambers A, Sangha G, Goergen C, Panitch A. Development of a Glycosaminoglycan Derived, Selectin Targeting Anti-Adhesive Coating to Treat Endothelial Cell Dysfunction. *Pharmaceuticals* 2017; 10:36.
43. Kalagara T, Moutsis T, Yang Y, Pappelbaum KI, Farken A, Cladder-Micus L, Vidal-y-Sy S, John A, Bauer AT, Moerschbacher BM, Schneider SW, Gorzelanny C. The endothelial glycocalyx anchors von Willebrand factor fibers to the vascular endothelium. *Blood Adv* 2018; 2:2347–57.
44. Mitra R, O’Neil GL, Harding IC, Cheng MJ, Mensah SA, Ebong EE. Glycocalyx in Atherosclerosis-Relevant Endothelium Function and as a Therapeutic Target. *Curr Atheroscler Rep* 2017; 19:63.
45. Shahraz A, Kopatz J, Mathy R, Kappler J, Winter D, Kapoor S, Schütza V, Scheper T, Gieselmann V, Neumann H. Anti-inflammatory activity of low molecular weight polysialic acid on human macrophages. *Sci Rep* 2015; 5:16800.
46. Lübbers J, Rodríguez E, van Kooyk Y. Modulation of Immune Tolerance via Siglec-Sialic Acid Interactions. *Front Immunol* 2018; 9:2807.

47. Lin B, Wu X, Zhao H, Tian Y, Han J, Liu J, Han S. Redirecting immunity via covalently incorporated immunogenic sialic acid on the tumor cell surface. *Chem Sci* 2016; 7:3737–41.
48. Xiao H, Woods EC, Vukojicic P, Bertozzi CR. Precision glycoalkyx editing as a strategy for cancer immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci* 2016; 113:10304–9.
49. Gristina AG, Shibata Y, Giridhar G, Kreger A, Myrvik QN. The glycoalkyx, biofilm, microbes, and resistant infection. *Semin Arthroplasty* 1994; 5:160–70.
50. Gristina AG, Costerton JW. Bacterial adherence and the glycoalkyx and their role in musculoskeletal infection. *Orthop Clin North Am* 1984; 15:517–35.
51. Dall L, Keilhofner M, Herndon B, Barnes W, Lane J. Clindamycin effect on glycoalkyx production in experimental viridans streptococcal endocarditis. *J Infect Dis* 1990; 161:1221–4.
52. Lipowsky HH, Lescanic A. The effect of doxycycline on shedding of the glycoalkyx due to reactive oxygen species. *Microvasc Res* 2013; 90:80–5.
53. Marechal X, Favory R, Joulin O, Montaigne D, Hassoun S, Decoster B, Zerimech F, Neviere R. Endothelial glycoalkyx damage during endotoxemia coincides with microcirculatory dysfunction and vascular oxidative stress. *Shock* 2008; 29:572–6.
54. Vink H, Constantinescu AA, Spaan JA. Oxidized lipoproteins degrade the endothelial surface layer : implications for platelet-endothelial cell adhesion. *Circulation* 2000; 101:1500–2.
55. Oberleithner H. Vascular endothelium leaves fingerprints on the surface of erythrocytes. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* 2013; 465:1451–8.
56. Secomb TW, Hsu R, Pries AR. Motion of red blood cells in a capillary with an endothelial surface layer: effect of flow velocity. *Am J Physiol Circ Physiol* 2001; 281:H629–36.
57. Mensah SA, Cheng MJ, Homayoni H, Plouffe BD, Coury AJ, Ebong EE. Regeneration of glycoalkyx by heparan sulfate and sphingosine 1-phosphate restores inter-endothelial communication. *PLoS One* 2017; 12:e0186116.
58. Constantinescu AA, Vink H, Spaan JAE. Endothelial cell glycoalkyx modulates immobilization of leukocytes at the endothelial surface. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:1541–7.

59. McDonald KK, Cooper S, Danielzak L, Leask RL. Glycocalyx Degradation Induces a Proinflammatory Phenotype and Increased Leukocyte Adhesion in Cultured Endothelial Cells under Flow. *PLoS One* 2016; 11:e0167576.
60. Nourshargh S, Alon R. Leukocyte Migration into Inflamed Tissues. *Immunity* 2014; 41:694–707.
61. Tkachenko E, Rhodes JM, Simons M. Syndecans: new kids on the signaling block. *Circ Res* 2005; 96:488–500.
62. Johansson PI, Stensballe J, Rasmussen LS, Ostrowski SR. 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. *Ann Surg* 2011; 254:194–200.
63. Savery MD, Jiang JX, Park PW, Damiano ER. The endothelial glycocalyx in syndecan-1 deficient mice. *Microvasc Res* 2013; 87:83–91.
64. Lamorte S, Ferrero S, Aschero S, Monitillo L, Bussolati B, Omedè P, Ladetto M, Camussi G. Syndecan-1 promotes the angiogenic phenotype of multiple myeloma endothelial cells. *Leukemia* 2012; 26:1081–90.
65. Indira Chandran V, Welinder C, Månsson A-S, Offer S, Freyhult E, Pernemalm M, Lund SM, Pedersen S, Lehtiö J, Marko-Varga G, Johansson MC, Englund EM, Sundgren PC, Belting M. Ultrasensitive immunoprofiling of plasma extracellular vesicles identifies syndecan-1 as a potential tool for minimally invasive diagnosis of glioma. *Clin Cancer Res* 2019; clincanres.2946.2018.
66. Qiao W, Liu H, Guo W, Li P, Deng M. Prognostic and clinical significance of syndecan-1 expression in breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Surg Oncol* 2018; 18:32041–9.
67. Jaiswal AK, Sadasivam M, Hamad ARA. Unexpected alliance between syndecan-1 and innate-like T cells to protect host from autoimmune effects of interleukin-17. *World J Diabetes* 2018; 9:220–5.
68. De Rossi G, Evans AR, Kay E, Woodfin A, McKay TR, Nourshargh S, Whiteford JR. Shed syndecan-2 inhibits angiogenesis. *J Cell Sci* 2014; 127:4788–99.
69. Theocharis AD, Skandalis SS, Tzanakakis GN, Karamanos NK. Proteoglycans in health and disease: novel roles for proteoglycans in malignancy and their pharmacological targeting. *FEBS J* 2010; 277:3904–23.

70. Baeyens N, Mulligan-Kehoe MJ, Corti F, Simon DD, Ross TD, Rhodes JM, Wang TZ, Mejean CO, Simons M, Humphrey J, Schwartz MA. Syndecan 4 is required for endothelial alignment in flow and atheroprotective signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111:17308–13.
71. Elfenbein A, Simons M. Syndecan-4 signaling at a glance. *J Cell Sci* 2013; 126:3799–804.
72. Esko JD, Lindahl U. Molecular diversity of heparan sulfate. *J Clin Invest* 2001; 108:169–73.
73. Xu D, Esko JD. Demystifying Heparan Sulfate–Protein Interactions. *Annu Rev Biochem* 2014; 83:129–157.
74. Jiang D, Liang J, Noble PW. Hyaluronan as an immune regulator in human diseases. *Physiol Rev* 2011; 91:221–64.
75. Singleton PA, Lennon FE. Acute Lung Injury Regulation by Hyaluronan. *J Allergy Ther* 2011; Suppl 4.
76. Lennon FE, Singleton PA. Hyaluronan regulation of vascular integrity. *Am J Cardiovasc Dis* 2011; 1:200–13.
77. Slevin M, Krupinski J, Gaffney J, Matou S, West D, Delisser H, Savani RC, Kumar S. Hyaluronan-mediated angiogenesis in vascular disease: uncovering RHAMM and CD44 receptor signaling pathways. *Matrix Biol* 2007; 26:58–68.
78. Tammi R, Rilla K, Pienimaki JP, MacCallum DK, Hogg M, Luukkonen M, Hascall VC, Tammi M. Hyaluronan enters keratinocytes by a novel endocytic route for catabolism. *J Biol Chem* 2001; 276:35111–22.
79. Henry CB, Duling BR. Permeation of the luminal capillary glycocalyx is determined by hyaluronan. *Am J Physiol* 1999; 277:H508–14.
80. Davis GE, Senger DR. Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization. *Circ Res* 2005; 97:1093–107.
81. Zhang X, Sun D, Song JW, Zullo J, Lipphardt M, Coneh-Gould L, Goligorsky MS. Endothelial cell dysfunction and glycocalyx – A vicious circle. *Matrix Biol* 2018; 71–72:421–31.
82. Liu W, Wang Y, Zheng J, Song D, Zheng S, Ren L, Wang Y, Yao Y, Wang Y, Liu Y,

- Bai R, Dong J, Liu T. Syndecan-1 as an independent risk factor for the incidence of adverse cardiovascular events in patients having stage C and D heart failure with non-ischemic dilated cardiomyopathy. *Clin Chim Acta* 2019; 490:63–8.
83. Becker BF, Jacob M, Leipert S, Salmon AHJ, Chappell D. Degradation of the endothelial glycocalyx in clinical settings: searching for the sheddases. *Br J Clin Pharmacol* 2015; 80:389–402.
84. Diebel LN, Diebel ME, Martin J V, Liberati DM. Acute hyperglycemia exacerbates trauma-induced endothelial and glycocalyx injury: An in vitro model. *J Trauma Acute Care Surg* 2018; 85:960–7.
85. Noble MIM, Drake-Holland AJ, Vink H. Hypothesis: arterial glycocalyx dysfunction is the first step in the atherothrombotic process. *QJM* 2008; 101:513–8.
86. Fisher J, Linder A, Bentzer P. Elevated plasma glypicans are associated with organ failure in patients with infection. *Intensive Care Med Exp* 2019; 7:2.
87. Wei S, Gonzalez Rodriguez E, Chang R, Holcomb JB, Kao LS, Wade CE, Holcomb JB, Wade CE, et al. Elevated Syndecan-1 after Trauma and Risk of Sepsis: A Secondary Analysis of Patients from the Pragmatic, Randomized Optimal Platelet and Plasma Ratios (PROPPR) Trial. *J Am Coll Surg* 2018; 227:587–95.
88. Nelson A, Johansson J, Tydén J, Bodelsson M. Circulating syndecans during critical illness. *APMIS* 2017; 125:468–75.
89. Salmon AHJ, Satchell SC. Endothelial glycocalyx dysfunction in disease: albuminuria and increased microvascular permeability. *J Pathol* 2012; 226:562–74.
90. Chappell D, Dörfler N, Jacob M, Rehm M, Welsch U, Conzen P, Becker BF. Glycocalyx protection reduces leukocyte adhesion after ischemia/reperfusion. *Shock* 2010; 34:133–9.
91. Zausig YA, Chappell D, Becker BF, Potschka D, Busse H, Nixdorf K, Bitzinger D, Jacob B, Jacob M. The impact of crystalloidal and colloidal infusion preparations on coronary vascular integrity, interstitial oedema and cardiac performance in isolated hearts. *Crit Care* 2013; 17:R203.
92. Oberleithner H. Sodium selective erythrocyte glycocalyx and salt sensitivity in man. *Pflugers Arch* 2015; 467:1319–25.
93. Rostgaard J, Qvortrup K. Electron microscopic demonstrations of filamentous molecular sieve plugs in capillary fenestrae. *Microvasc Res* 1997; 53:1–13.

94. Chevalier L, Selim J, Genty D, Baste JM, Piton N, Boukhalfa I, Hamzaoui M, Pareige P, Richard V. Electron microscopy approach for the visualization of the epithelial and endothelial glycocalyx. *Morphologie* 2017; 101:55–63.
95. Cerny V, Astapenko D, Burkovskiy I, Hyspler R, Ticha A, Trevors MA, Lehmann C. Glycocalyx in vivo measurement. *Clin Hemorheol Microcirc* 2017; 67:499–503.
96. Yen W-Y, Cai B, Zeng M, Tarbell JM, Fu BM. Quantification of the endothelial surface glycocalyx on rat and mouse blood vessels. *Microvasc Res* 2012; 83:337–46.
97. Kataoka H, Ushiyama A, Kawakami H, Akimoto Y, Matsubara S, Iijima T. Fluorescent imaging of endothelial glycocalyx layer with wheat germ agglutinin using intravital microscopy. *Microsc Res Tech* 2016; 79:31–7.
98. Megens RTA, Reitsma S, Schiffers PHM, Hilgers RHP, De Mey JGR, Slaaf DW, oude Egbrink MGA, van Zandvoort MAMJ. Two-photon microscopy of vital murine elastic and muscular arteries. Combined structural and functional imaging with subcellular resolution. *J Vasc Res* 2007; 44:87–98.
99. Broekhuizen LN, Lemkes BA, Mooij HL, Meuwese MC, Verberne H, Holleman F, Schlingemann RO, Nieuwdorp M, Stroes ESG, Vink H. Effect of sulodexide on endothelial glycocalyx and vascular permeability in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia* 2010; 53:2646–55.
100. Bagher P, Segal SS. The Mouse Cremaster Muscle Preparation for Intravital Imaging of the Microcirculation. *J Vis Exp* 2011; 52:2874.
101. Liuhanen S, Sallialmi M, Pettilä V, Oksala N, Tenhunen J. Indirect measurement of the vascular endothelial glycocalyx layer thickness in human submucosal capillaries with a plug-in for ImageJ. *Comput Methods Programs Biomed* 2013; 110:38–47.
102. Boerma EC, van der Voort PHJ, Spronk PE, Ince C. Relationship between sublingual and intestinal microcirculatory perfusion in patients with abdominal sepsis. *Crit Care Med* 2007; 35:1055–60.
103. Cerný V, Turek Z, Parízková R. In situ assessment of the liver microcirculation in mechanically ventilated rats using sidestream dark-field imaging. *Physiol Res* 2009; 58:49–55.
104. Astapenko D, Jor O, Lehmann C, Cerny V. In situ assessment of the renal microcirculation in mechanically ventilated rats using sidestream dark-field imaging. *J Microsc* 2015; 257:161–5.

105. Sitina M, Turek Z, Pařízková R, Cerný V. In situ assessment of the brain microcirculation in mechanically-ventilated rabbits using sidestream dark-field (SDF) imaging. *Physiol Res* 2011; 60:75–81.
106. Grundmann S, Fink K, Rabadzhieva L, Bourgeois N, Schwab T, Moser M, Bode C, Busch H-J. Perturbation of the endothelial glycocalyx in post cardiac arrest syndrome. *Resuscitation* 2012; 83:715–20.
107. Monsieurs KG, Nolan JP, Bossaert LL, Greif R, Maconochie IK, Nikolaou NI, Perkins GD, Soar J, Truhlář A, et al. European Resuscitation Council Guidelines for Resuscitation 2015. *Resuscitation* 2015; 95:1–80.
108. Tsipotis E, Price LL, Jaber BL, Madias NE. Hospital-Associated Hyponatremia Spectrum and Clinical Outcomes in an Unselected Cohort. *Am J Med* 2018; 131:72–82.e1.
109. Braun MM, Mahowald M. Electrolytes: Sodium Disorders. *FP Essent* 2017; 459:11–20.
110. Asehnoune K, Lasocki S, Seguin P, Geeraerts T, Perrigault PF, Dahyot-Fizelier C, Paugam Burtz C, et al. Association between continuous hyperosmolar therapy and survival in patients with traumatic brain injury – a multicentre prospective cohort study and systematic review. *Crit Care* 2017; 21:328.
111. Pasarikovski CR, Alotaibi NM, Al-Mufti F, Macdonald RL. Hypertonic Saline for Increased Intracranial Pressure After Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: A Systematic Review. *World Neurosurg* 2017; 105:1–6.
112. Vachharajani V, Vital S, Russell J, Granger DN. Hypertonic saline and the cerebral microcirculation in obese septic mice. *Microcirculation* no date; 14:223–31.
113. Härtl R, Medary MB, Ruge M, Arfors KE, Ghahremani F, Ghajar J. Hypertonic/hyperoncotic saline attenuates microcirculatory disturbances after traumatic brain injury. *J Trauma* 1997; 42:S41–7.
114. Assadi A, Desebbe O, Rimmelé T, Florence A, Goudable J, Chassard D, Allaouchiche B. Small-volume hypertonic saline/pentastarch improves ileal mucosal microcirculation in experimental peritonitis. *Infect Dis Rep* 2012; 4:e22.
115. Cryer HM, Gosche J, Harbrecht J, Anigian G, Garrison N. The effect of hypertonic saline resuscitation on responses to severe hemorrhagic shock by the skeletal muscle, intestinal, and renal microcirculation systems: seeing is believing. *Am J Surg* 2005;

- 190:305–13.
116. Vincent JL, Weil MH. Fluid challenge revisited. *Crit Care Med* 2006; 34:1333–7.
 117. Chappell D, Bruegger D, Potzel J, Jacob M, Brettner F, Vogeser M, Conzen P, Becker BF, Rehm M. Hypervolemia increases release of atrial natriuretic peptide and shedding of the endothelial glycocalyx. *Crit Care* 2014; 18:538.
 118. Wolf CB, Green DW. Clarification of the circulatory patho-physiology of anaesthesia - implications for high-risk surgical patients. *Int J Surg* 2014; 12:1348–56.
 119. Brettner F, Chappell D, Nebelsiek T, Hauer D, Schelling G, Becker BF, Rehm M, Weis F. Preinterventional hydrocortisone sustains the endothelial glycocalyx in cardiac surgery. *Clin Hemorheol Microcirc* 2018; 1–12.
 120. Donati A, Damiani E, Domizi R, Romano R, Adrario E, Pelaia P, Ince C, Singer M. Alteration of the sublingual microvascular glycocalyx in critically ill patients. *Microvasc Res* 2013; 90:86–89.
 121. Rovas A, Lukasz A-H, Vink H, Urban M, Sackarnd J, Pavenstädt H, Kümpers P. Bedside analysis of the sublingual microvascular glycocalyx in the emergency room and intensive care unit – the GlycoNurse study. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med* 2018; 26:16.
 122. Nussbaum C, Haberer A, Tiefenthaller A, Januszewska K, Chappell D, Brettner F, Mayer P, Dalla Pozza R, Genzel-Boroviczény O. Perturbation of the microvascular glycocalyx and perfusion in infants after cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2015; 150:1474–81.e1.
 123. Stancu CS, Toma L, Sima A V. Dual role of lipoproteins in endothelial cell dysfunction in atherosclerosis. *Cell Tissue Res* 2012; 349:433–46.
 124. Reitsma S, oude Egbrink M, Heijnen V, Megens R, Engels W, Vink H, Slaaf D, van Zandvoort M. Endothelial glycocalyx thickness and platelet-vessel wall interactions during atherogenesis. *Thromb Haemost* 2011; 106:939–46.
 125. Cancel LM, Ebong EE, Mensah S, Hirschberg C, Tarbell JM. Endothelial glycocalyx, apoptosis and inflammation in an atherosclerotic mouse model. *Atherosclerosis* 2016; 252:136–46.
 126. Meuwese MC, Mooij HL, Nieuwdorp M, van Lith B, Marck R, Vink H, Kastelein JJP, Stroes ESG. Partial recovery of the endothelial glycocalyx upon rosuvastatin therapy in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. *J Lipid Res* 2009; 50:148–

- 53.
127. Zhang L, Zeng M, Fan J, Tarbell JM, Curry F-RE, Fu BM. Sphingosine-1-phosphate Maintains Normal Vascular Permeability by Preserving Endothelial Surface Glycocalyx in Intact Microvessels. *Microcirculation* 2016; 23:301–10.
128. Hannun YA, Obeid LM. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9:139–50.
129. Singer P, Blaser AR, Berger MM, Alhazzani W, Calder PC, Casaer MP, Hiesmayr M, Mayer K, Montejo JC, Pichard C, Preiser J-C, van Zanten ARH, Oczkowski S, Szczeklik W, Bischoff SC. ESPEN guideline on clinical nutrition in the intensive care unit. *Clin Nutr* 2019; 38:48–79.
130. Nieuwdorp M, Mooij HL, Kroon J, Atasever B, Spaan JAE, Ince C, Holleman F, Diamant M, Heine RJ, Hoekstra JBL, Kastelein JJP, Stroes ESG, Vink H. Endothelial glycocalyx damage coincides with microalbuminuria in type 1 diabetes. *Diabetes* 2006; 55:1127–32.
131. Goligorsky MS. Vascular endothelium in diabetes. *Am J Physiol - Ren Physiol* 2017; 312:F266–75.
132. Sieve I, Münster-Kühnel AK, Hilfiker-Kleiner D. Regulation and function of endothelial glycocalyx layer in vascular diseases. *Vascul Pharmacol* 2018; 100:26–33.
133. Astapenko D, Pouska J, Cerny V, Benes J. The endothelial glycocalyx and fluid therapy in critical care and perioperative medicine. *Anest Intenziv Med* 2017; 28:289–96.
134. Pouska J, Tegl V, Astapenko D, Cerny V, Lehmann C, Benes J. Impact of Intravenous Fluid Challenge Infusion Time on Macrocirculation and Endothelial Glycocalyx in Surgical and Critically Ill Patients. *Biomed Res Int* 2018; 2018:1–11.
135. Liew H, Roberts MA, Macginley R, McMahon LP. Endothelial glycocalyx in health and kidney disease: Rising star or false Dawn? SUMMARY AT A GLANCE. 2017; 22:940–6.
136. Astapenko D, Pouska J, Benes J, Skulec R, Lehmann C, Vink H, Cerny V. Neuraxial anesthesia is less harmful to the endothelial glycocalyx during elective joint surgery compared to general anesthesia^{1,2}. *Clin Hemorheol Microcirc* 2018; 1–11.
137. Belavić M, Sotošek Tokmadžić V, Fišić E, Brozović Križan A, Strikić N, Lončarić Katušin M, Žunić J. The effect of various doses of infusion solutions on the endothelial

- glycocalyx layer in laparoscopic cholecystectomy patients. *Minerva Anesthesiol* 2018; 84:1032–43.
138. Nemme J, Hahn RG, Krizhanovskii C, Ntika S, Sabelnikovs O, Vanags I. Minimal shedding of the glycocalyx layer during abdominal hysterectomy. *BMC Anesthesiol* 2017; 17:107.
139. Powell M, Mathru M, Brandon A, Patel R, Frölich M. Assessment of endothelial glycocalyx disruption in term parturients receiving a fluid bolus before spinal anesthesia: a prospective observational study. *Int J Obstet Anesth* 2014; 23:330–4.
140. Dane MJC, Khairoun M, Lee DH, van den Berg BM, Eskens BJM, Boels MGS, van Teeffelen JWGE, Rops ALWMM, van der Vlag J, van Zonneveld AJ, Reinders MEJ, Vink H, Rabelink TJ. Association of Kidney Function with Changes in the Endothelial Surface Layer. *Clin J Am Soc Nephrol* 2014; 9:698–704.
141. Nelson A, Berkestedt I, Schmidtchen A, Ljunggren L, Bodelsson M. Increased levels of glycosaminoglycans during septic shock: relation to mortality and the antibacterial actions of plasma. *Shock* 2008; 30:623–7.
142. Donati A, Damiani E, Domizi R, Romano R, Adrario E, Pelaia P, Ince C, Singer M. Alteration of the sublingual microvascular glycocalyx in critically ill patients. *Microvasc Res* 2013; 90:86–9.
143. Ikonomidis I, Voumvourakis A, Makavos G, Triantafyllidi H, Pavlidis G, Katogiannis K, Benas D, Vlastos D, et al. Association of impaired endothelial glycocalyx with arterial stiffness, coronary microcirculatory dysfunction, and abnormal myocardial deformation in untreated hypertensives. *J Clin Hypertens* 2018; 20:672–9.
144. Gu Y-M, Wang S, Zhang L, Liu Y-P, Thijs L, Petit T, Zhang Z, Wei F-F, Kang Y-Y, Huang Q-F, Sheng C-S, Struijker-Boudier HAJ, Kuznetsova T, Verhamme P, Li Y, Staessen JA. Characteristics and Determinants of the Sublingual Microcirculation in Populations of Different Ethnicity. *Hypertension* 2015; 65:993–1001.
145. Lee DH, Dane MJC, van den Berg BM, Boels MGS, van Teeffelen JW, de Mutsert R, den Heijer M, Rosendaal FR, van der Vlag J, van Zonneveld AJ, Vink H, Rabelink TJ. Deeper penetration of erythrocytes into the endothelial glycocalyx is associated with impaired microvascular perfusion. *PLoS One* 2014; 9:e96477.
146. Hulde N, Rogenhofer N, Brettner F, Eckert NC, Götzfried I, Nguyen T, Pagel J-I, Kammerer T, Hofmann-Kiefer KF, Schelling G, Dendorfer A, Rehm M, Thaler CJ. The CYCLOCALYX study: Ovulatory cycle affects circulating compartments of the

- endothelial glycocalyx in blood. *Am J Reprod Immunol* 2018; 79:e12767.
147. Hofmann-Kiefer KF, Knabl J, Martinoff N, Schiessl B, Conzen P, Rehm M, Becker BF, Chappell D. Increased serum concentrations of circulating glycocalyx components in HELLP syndrome compared to healthy pregnancy: an observational study. *Reprod Sci* 2013; 20:318–25.
 148. Rehm M, Bruegger D, Christ F, Conzen P, Thiel M, Jacob M, Chappell D, Stoeckelhuber M, Welsch U, Reichart B, Peter K, Becker BF. Shedding of the endothelial glycocalyx in patients undergoing major vascular surgery with global and regional ischemia. *Circulation* 2007; 116:1896–906.
 149. Anttonen A, Leppä S, Ruotsalainen T, Alfthan H, Mattson K, Joensuu H. Pretreatment serum syndecan-1 levels and outcome in small cell lung cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. *Lung Cancer* 2003; 41:171–7.
 150. Cerny V, Astapenko D, Burkovskiy I, Hyspler R, Ticha A, Trevors MA, Lehmann C. Glycocalyx in vivo measurement. *Clin Hemorheol Microcirc* 2017; 67:1–5.
 151. Hahn RG, Hasselgren E, Björne H, Zdolsek M, Zdolsek J. Biomarkers of endothelial injury in plasma are dependent on kidney function. *Clin Hemorheol Microcirc* 2019; 1–8.
 152. Saboia ZMRM, Meneses GC, Martins AMC, Daher EF, Silva Junior GB. Association between syndecan-1 and renal function in adolescents with excess weight: evidence of subclinical kidney disease and endothelial dysfunction. *Brazilian J Med Biol Res = Rev Bras Pesqui Medicas e Biol* 2018; 51:e7174.
 153. Callaway CW. Endothelial damage after cardiac arrest—“Endotheliitis.” *Resuscitation* 2012; 83:667–8.
 154. Bro-Jeppesen J, Johansson PI, Hassager C, Wanscher M, Ostrowski SR, Bjerre M, Kjaergaard J. Endothelial activation/injury and associations with severity of post-cardiac arrest syndrome and mortality after out-of-hospital cardiac arrest. *Resuscitation* 2016; 107:71–9.
 155. Dostal P, Schreiberova J, Dostalova V, Dostalova V, Tyll T, Paral J, Abdo I, Cihlo M, Astapenko D, Turek Z. Effects of hypertonic saline and mannitol on cortical cerebral microcirculation in a rabbit craniotomy model. *BMC Anesthesiol* 2015; 15:88.
 156. Dostalova V, Schreiberova J, Dostalova V, Paral J, Kraus J, Ticha A, Radochova V, Dostal P. Effects of Hypertonic Saline and Sodium Lactate on Cortical Cerebral

- Microcirculation and Brain Tissue Oxygenation. *J Neurosurg Anesthesiol* 2018; 30:163–70.
157. Zakaria ER, Tsakadze NL, Garrison RN. Hypertonic saline resuscitation improves intestinal microcirculation in a rat model of hemorrhagic shock. *Surgery* 2006; 140:579-87; discussion 587–8.
 158. Frati-Munari AC. [Medical significance of endothelial glycocalyx]. *Arch Cardiol Mex* 2013; 83:303–12.
 159. Oberleithner H, Wälte M, Kusche-Vihrog K. Sodium renders endothelial cells sticky for red blood cells. *Front Physiol* 2015; 6:188.
 160. Victorino GP, Newton CR, Curran B. Effect of hypertonic saline on microvascular permeability in the activated endothelium. *J Surg Res* 2003; 112:79–83.
 161. Bruegger D, Schwartz L, Chappell D, Jacob M, Rehm M, Vogeser M, Christ F, Reichart B, Becker BF. Release of atrial natriuretic peptide precedes shedding of the endothelial glycocalyx equally in patients undergoing on- and off-pump coronary artery bypass surgery. *Basic Res Cardiol* 2011; 106:1111–21.
 162. Bruegger D, Jacob M, Rehm M, Loetsch M, Welsch U, Conzen P, Becker BF. Atrial natriuretic peptide induces shedding of endothelial glycocalyx in coronary vascular bed of guinea pig hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289:H1993–9.
 163. Oberleithner H, Riethmüller C, Schillers H, MacGregor GA, de Wardener HE, Hausberg M. Plasma sodium stiffens vascular endothelium and reduces nitric oxide release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104:16281–6.
 164. Albert V, Subramanian A, Agrawal D, Pati H, Gupta S, Mukhopadhyay A. Acute Traumatic Endotheliopathy in Isolated Severe Brain Injury and Its Impact on Clinical Outcome. *Med Sci* 2018; 6:5.
 165. Martin J V., Liberati DM, Diebel LN. Disparate effects of catecholamines under stress conditions on endothelial glycocalyx injury: An in vitro model. *Am J Surg* 2017; 214:1166–72.
 166. Cecconi M, Hofer C, Teboul JL, Pettila V, Wilkman E, Molnar Z, Della Rocca G, Aldecoa C, Artigas A, Jog S, Sander M, Spies C, Lefrant JY, De Backer D, on behalf of the FENICE Investigators. Fluid challenges in intensive care: the FENICE study: A global inception cohort study. *Intensive Care Med* 2015; 41:1529–37.
 167. Ukor IF, Hilton AK, Bailey MJ, Bellomo R. The haemodynamic effects of bolus versus

- slower infusion of intravenous crystalloid in healthy volunteers. *J Crit Care* 2017; 41:254–9.
168. Puskarich MA, Cornelius DC, Tharp J, Nandi U, Jones AE. Plasma syndecan-1 levels identify a cohort of patients with severe sepsis at high risk for intubation after large-volume intravenous fluid resuscitation. *J Crit Care* 2016; 36:125–9.
169. Murphy LS, Wickersham N, McNeil JB, Shaver CM, May AK, Bastarache JA, Ware LB. Endothelial glycocalyx degradation is more severe in patients with non-pulmonary sepsis compared to pulmonary sepsis and associates with risk of ARDS and other organ dysfunction. *Ann Intensive Care* 2017; 7:102.
170. Self WH, Semler MW, Wanderer JP, Wang L, Byrne DW, Collins SP, Slovis CM, Lindsell CJ, Ehrenfeld JM, Siew ED, Shaw AD, Bernard GR, Rice TW. Balanced Crystalloids versus Saline in Noncritically Ill Adults. *N Engl J Med* 2018; 378:819–28.
171. McCluskey SA, Karkouti K, Wijeyesundera D, Minkovich L, Tait G, Beattie WS. Hyperchloremia after noncardiac surgery is independently associated with increased morbidity and mortality: A propensity-matched cohort study. *Anesth Analg* 2013; 117:412–21.
172. Kusche-Vihrog K, Schmitz B, Brand E. Salt controls endothelial and vascular phenotype. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* 2015; 467:499–512.
173. Ince C, Boerma EC, Cecconi M, de Backer D, Shapiro NI, Duranteau J, Pinsky MR, Artigas A, et al. Second consensus on the assessment of sublingual microcirculation in critically ill patients: results from a task force of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med* 2018; 1–19.
174. Schiefer J, Leberherz-Eichinger D, Erdoes G, Berlakovich G, Bacher A, Krenn CG, Faybik P. Alterations of Endothelial Glycocalyx During Orthotopic Liver Transplantation in Patients With End-Stage Liver Disease. *Transplantation* 2015; 99:2118–23.
175. Arthur A, McCall PJ, Jolly L, Kinsella J, Kirk A, Shelley BG. Endothelial glycocalyx layer shedding following lung resection. *Biomark Med* 2016; 10:1033–8.
176. Ostrowski SR, Henriksen HH, Stensballe J, Gybel-Brask M, Cardenas JC, Baer LA, Cotton BA, Holcomb JB, Wade CE, Johansson PI. Sympathoadrenal activation and endotheliopathy are drivers of hypocoagulability and hyperfibrinolysis in trauma. *J Trauma Acute Care Surg* 2017; 82:293–301.

177. Johnson RL, Kopp SL, Burkle CM, Duncan CM, Jacob AK, Erwin PJ, Murad MH, Mantilla CB. Neuraxial vs general anaesthesia for total hip and total knee arthroplasty: a systematic review of comparative-effectiveness research. *Br J Anaesth* 2016; 116:163–76.
178. Hahnenkamp K, Herroeder S, Hollmann MW. Regional anaesthesia, local anaesthetics and the surgical stress response. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 2004; 18:509–27.
179. Lin M-C, Lin C-F, Li C-F, Sun D-P, Wang L-Y, Hsing C-H. Anesthetic Propofol Overdose Causes Vascular Hyperpermeability by Reducing Endothelial Glycocalyx and ATP Production. *Int J Mol Sci* 2015; 16:12092–107.
180. Casanova J, Simon C, Vara E, Sanchez G, Rancan L, Abubakra S, Calvo A, Gonzalez FJ, Garutti I. Sevoflurane anesthetic preconditioning protects the lung endothelial glycocalyx from ischemia reperfusion injury in an experimental lung autotransplant model. *J Anesth* 2016; 30:755–62.
181. Kim Y-H, Nijst P, Kiefer K, Tang WHW. Endothelial Glycocalyx as Biomarker for Cardiovascular Diseases: Mechanistic and Clinical Implications. *Curr Heart Fail Rep* 2017; 14:117–26.
182. Guay J, Choi P, Suresh S, Albert N, Kopp S, Pace NL. Neuraxial blockade for the prevention of postoperative mortality and major morbidity: an overview of Cochrane systematic reviews. In: Guay J, editor. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2014. p. CD010108.
183. Lindberg-Larsen V, Ostrowski SR, Lindberg-Larsen M, Rovsing ML, Johansson PI, Kehlet H. The effect of pre-operative methylprednisolone on early endothelial damage after total knee arthroplasty: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Anaesthesia* 2017; 72:1217–24.
184. Chignalia AZ, Yetimakman F, Christiaans SC, Unal S, Bayrakci B, Wagener BM, Russell RT, Kerby JD, Pittet J-F, Dull RO. THE GLYCOCALYX AND TRAUMA. *Shock* 2016; 45:338–48.
185. Ince C, Mayeux PR, Nguyen T, Gomez H, Kellum JA, Ospina-Tascón GA, Hernandez G, Murray P, De Backer D, ADQI XIV Workgroup. THE ENDOTHELIUM IN SEPSIS. *Shock* 2016; 45:259–70.
186. Tarbell JM, Cancel LM. The glycocalyx and its significance in human medicine. *J Intern Med* 2016; 280:97–113.

187. Kang H, Wu Q, Sun A, Liu X, Fan Y, Deng X. Cancer Cell Glycocalyx and Its Significance in Cancer Progression. *Int J Mol Sci* 2018; 19:2484.
188. Dogné S, Flamion B, Caron N. Endothelial Glycocalyx as a Shield Against Diabetic Vascular Complications. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2018; 38:1427–39.
189. Godo S, Shimokawa H. Endothelial Functions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2017; 37:e108–e114.
190. Myers GJ, Wegner J. Endothelial Glycocalyx and Cardiopulmonary Bypass. *J Extra Corpor Technol* 2017; 49:174–81.
191. Mitsides N, Cornelis T, Broers NJH, Diederens NMP, Brenchley P, van der Sande FM, Schalkwijk CG, Kooman JP, Mitra S. Extracellular overhydration linked with endothelial dysfunction in the context of inflammation in haemodialysis dependent chronic kidney disease. *PLoS One* 2017; 12:e0183281.
192. Vlahu CA, Lopes Barreto D, Struijk DG, Vink H, Krediet RT. Is the systemic microvascular endothelial glycocalyx in peritoneal dialysis patients related to peritoneal transport? *Nephron Clin Pract* 2014; 128:159–65.
193. Mitra R, O’Neil GL, Harding IC, Cheng MJ, Mensah SA, Ebong EE. Glycocalyx in Atherosclerosis-Relevant Endothelium Function and as a Therapeutic Target. *Curr Atheroscler Rep* 2017; 19:63.
194. Zeng Y, Liu X-H, Tarbell J, Fu B. Sphingosine 1-phosphate induced synthesis of glycocalyx on endothelial cells. *Exp Cell Res* 2015; 339:90–5.
195. Zeng Y, Adamson RH, Curry F-RE, Tarbell JM. Sphingosine-1-phosphate protects endothelial glycocalyx by inhibiting syndecan-1 shedding. *Am J Physiol Circ Physiol* 2014; 306:H363–72.
196. Tuma M, Canestrini S, Alwahab Z, Marshall J. Trauma and Endothelial Glycocalyx. *SHOCK* 2016; 46:352–7.
197. Di Battista AP, Rizoli SB, Lejnieks B, Min A, Shiu MY, Peng HT, Baker AJ, Hutchison MG, Churchill N, Inaba K, Nascimento BB, de Oliveira Manoel AL, Beckett A, Rhind SG. Sympathoadrenal Activation is Associated with Acute Traumatic Coagulopathy and Endotheliopathy in Isolated Brain Injury. *SHOCK* 2016; 46:96–103.
198. Naumann DN, Hazeldine J, Dinsdale RJ, Bishop JR, Midwinter MJ, Harrison P, Hutchings SD, Lord JM. Endotheliopathy is associated with higher levels of cell-free DNA following major trauma: A prospective observational study. *PLoS One* 2017;

12:e0189870.

199. Bruegger D, Brettner F, Rossberg I, Nussbaum C, Kowalski C, Januszewska K, Becker BF, Chappell D. Acute degradation of the endothelial glycocalyx in infants undergoing cardiac surgical procedures. *Ann Thorac Surg* 2015; 99:926–31.
200. Bro-Jeppesen J, Johansson PI, Kjaergaard J, Wanscher M, Ostrowski SR, Bjerre M, Hassager C. Level of systemic inflammation and endothelial injury is associated with cardiovascular dysfunction and vasopressor support in post-cardiac arrest patients. *Resuscitation* 2017; 121:179–86.
201. Lehnert P, Johansson PI, Ostrowski SR, Møller CH, Bang LE, Olsen PS, Carlsen J. Coagulopathy in patients with acute pulmonary embolism: a pilot study of whole blood coagulation and markers of endothelial damage. *Scand J Clin Lab Invest* 2017; 77:19–26.
202. Osuka A, Kusuki H, Yoneda K, Matsuura H, Matsumoto H, Ogura H, Ueyama M. Glycocalyx Shedding is Enhanced by Age and Correlates with Increased Fluid Requirement in Patients with Major Burns. *Shock* 2018; 50:60–5.
203. Smart L, Macdonald SPJ, Burrows S, Bosio E, Arendts G, Fatovich DM. Endothelial glycocalyx biomarkers increase in patients with infection during Emergency Department treatment. *J Crit Care* 2017; 42:304–9.
204. Meneses GC, Cavalcante MG, da Silva Junior GB, Martins AMC, Neto R da JP, Libório AB, De Francesco Daher E. Endothelial Glycocalyx Damage and Renal Dysfunction in HIV Patients Receiving Combined Antiretroviral Therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2017; 23:165–71.
205. Metwaly HA, Al-Gayyar MMH, Eletreby S, Ebrahim MA, El-Shishtawy MM. Relevance of Serum Levels of Interleukin-6 and Syndecan-1 in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Sci Pharm* 2012; 80:179–88.
206. Svennevig K, Hoel T, Thiara A, Kolset S, Castelheim A, Mollnes T, Brosstad F, Fosse E, Svennevig J. Syndecan-1 plasma levels during coronary artery bypass surgery with and without cardiopulmonary bypass. *Perfusion* 2008; 23:165–71.
207. Zhang L, Zeng M, Fu BM. Sphingosine-1-phosphate reduces adhesion of malignant mammary tumor cells MDA-MB-231 to microvessel walls by protecting endothelial surface glycocalyx. *Cell Mol Biol* 2017; 63:16.
208. Hsia K, Yang M-J, Chen W-M, Yao C-L, Lin C-H, Loong C-C, Huang Y-L, Lin Y-T,

- Lander AD, Lee H, Lu J-H. Sphingosine-1-phosphate improves endothelialization with reduction of thrombosis in recellularized human umbilical vein graft by inhibiting syndecan-1 shedding in vitro. *Acta Biomater* 2017; 51:341–50.
209. Demir V, Dođru MT, Ede H, Yılmaz S, Alp C, Celik Y, Yıldırım N. The effects of treatment with atorvastatin versus rosuvastatin on endothelial dysfunction in patients with hyperlipidaemia. *Cardiovasc J Afr* 2018; 29:162–6.
210. Kang H, Fan Y, Sun A, Deng X. Compositional or charge density modification of the endothelial glycocalyx accelerates flow-dependent concentration polarization of low-density lipoproteins. *Exp Biol Med* 2011; 236:800–7.
211. Ekeloef S, Godthaab C, Schou-Pedersen AM V, Lykkesfeldt J, Gögenur I. Peri-operative endothelial dysfunction in patients undergoing minor abdominal surgery: An observational study. *Eur J Anaesthesiol* 2019; 36:130–4.
212. Winkler MF, Smith CE. Clinical, Social, and Economic Impacts of Home Parenteral Nutrition Dependence in Short Bowel Syndrome. *J Parenter Enter Nutr* 2014; 38:32S–7.
213. Miko BA, Kamath SS, Cohen BA, Jeon C, Jia H, Larson EL. Epidemiologic Associations Between Short-Bowel Syndrome and Bloodstream Infection Among Hospitalized Children. *J Pediatric Infect Dis Soc* 2015; 4:192–7.
214. van den Berg BM, Spaan JAE, Rolf TM, Vink H. Atherogenic region and diet diminish glycocalyx dimension and increase intima-to-media ratios at murine carotid artery bifurcation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290:H915–20.
215. Neves FM de O, Meneses GC, Sousa NEA, Pessoa Bezerra de Menezes RRP, Parahyba MC, Martins AMC, Libório AB. Syndecan-1 in Acute Decompensated Heart Failure—Association With Renal Function and Mortality –. *Circ J* 2015; 79:1511–9.
216. Lee DH, Dane MJC, van den Berg BM, Boels MGS, van Teeffelen JW, de Mutsert R, den Heijer M, Rosendaal FR, van der Vlag J, van Zonneveld AJ, Vink H, Rabelink TJ. Deeper penetration of erythrocytes into the endothelial glycocalyx is associated with impaired microvascular perfusion. *PLoS One* 2014; 9:e96477.
217. Kolářová H, Ambrůzová B, Svihálková Šindlerová L, Klinke A, Kubala L. Modulation of endothelial glycocalyx structure under inflammatory conditions. *Mediators Inflamm* 2014; 2014:694312.
218. Subramanian S V, Fitzgerald ML, Bernfield M. Regulated shedding of syndecan-1 and

- 4 ectodomains by thrombin and growth factor receptor activation. *J Biol Chem* 1997; 272:14713–20.
219. Li J-P, Kusche-Gullberg M. Heparan Sulfate: Biosynthesis, Structure, and Function. In: *International review of cell and molecular biology*. 2016. p. 215–73.
220. LaRivière WB, Schmidt EP. The Pulmonary Endothelial Glycocalyx in ARDS: A Critical Role for Heparan Sulfate. In: *Current topics in membranes*. 2018. p. 33–52.
221. Jacob M, Paul O, Mehringer L, Chappell D, Rehm M, Welsch U, Kaczmarek I, Conzen P, Becker BF. Albumin Augmentation Improves Condition of Guinea Pig Hearts After 4 hr of Cold Ischemia. *Transplantation* 2009; 87:956–65.
222. Jacob M, Bruegger D, Rehm M, Welsch U, Conzen P, Becker BF. Contrasting effects of colloid and crystalloid resuscitation fluids on cardiac vascular permeability. *Anesthesiology* 2006; 104:1223–31.
223. Chappell D, Hofmann-Kiefer K, Jacob M, Rehm M, Briegel J, Welsch U, Conzen P, Becker BF. TNF- α induced shedding of the endothelial glycocalyx is prevented by hydrocortisone and antithrombin. *Basic Res Cardiol* 2008; 104:78–89.
224. Chappell D, Jacob M, Hofmann-Kiefer K, Bruegger D, Rehm M, Conzen P, Welsch U, Becker BF. Hydrocortisone preserves the vascular barrier by protecting the endothelial glycocalyx. *Anesthesiology* 2007; 107:776–84.
225. Chappell D, Jacob M, Hofmann-Kiefer K, Rehm M, Welsch U, Conzen P, Becker BF. Antithrombin reduces shedding of the endothelial glycocalyx following ischaemia/reperfusion. *Cardiovasc Res* 2009; 83:388–96.
226. Nieuwdorp M, van Haften TW, Gouverneur MCLG, Mooij HL, van Lieshout MHP, Levi M, Meijers JCM, Holleman F, Hoekstra JBL, Vink H, Kastelein JJP, Stoes ESG. Loss of endothelial glycocalyx during acute hyperglycemia coincides with endothelial dysfunction and coagulation activation in vivo. *Diabetes* 2006; 55:480–6.
227. Bruegger D, Rehm M, Jacob M, Chappell D, Stoeckelhuber M, Welsch U, Conzen P, Becker BF. Exogenous nitric oxide requires an endothelial glycocalyx to prevent postischemic coronary vascular leak in guinea pig hearts. *Crit Care* 2008; 12:R73.
228. Eskens BJ, Zuurbier CJ, van Haare J, Vink H, van Teeffelen JW. Effects of two weeks of metformin treatment on whole-body glycocalyx barrier properties in db/db mice. *Cardiovasc Diabetol* 2013; 12:175.
229. Flameng W, Borgers M, Van der Vusse GJ, Demeyere R, Vandermeersch E, Thoné F,

- Suy R. Cardioprotective effects of lidoflazine in extensive aorta-coronary bypass grafting. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1983; 85:758–68.
230. Chappell D, Heindl B, Jacob M, Annecke T, Chen C, Rehm M, Conzen P, Becker BF. Sevoflurane reduces leukocyte and platelet adhesion after ischemia-reperfusion by protecting the endothelial glycocalyx. *Anesthesiology* 2011; 115:483–91.
231. Sukhikh GT, Ziganshina MM, Nizyaeva NV, Kulikova GV, Volkova JS, Yarotskaya EL, Kan NE, Shchyogolev AI, Tyutyunnik VL. Differences of glycocalyx composition in the structural elements of placenta in preeclampsia. *Placenta* 2016; 43:69–76.
232. Gandley RE, Althouse A, Jeyabalan A, Bregand-White JM, McGonigal S, Myerski AC, Gallaher M, Powers RW, Hubel CA. Low Soluble Syndecan-1 Precedes Preeclampsia. *PLoS One* 2016; 11:e0157608.
233. Vymazal T. Massive hemorrhage management – a best evidence topic report. *Ther Clin Risk Manag* 2015; 11:1107.
234. Khanna AK. Tissue Perfusion and Prognosis in the Critically Ill—Is Renin the New Lactate?*. *Crit Care Med* 2019; 47:288–90.
235. Möckl L, Hirn S, Torrano AA, Uhl B, Bräuchle C, Krombach F. The glycocalyx regulates the uptake of nanoparticles by human endothelial cells *in vitro*. *Nanomedicine* 2017; 12:207–17.