

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**Lékařská fakulta v Plzni**

**Dizertační práce**

**2019**

**Jiří POUSKA**



Univerzita Karlova  
Lékařská fakulta v Plzni

**Endoteliální glykokalyx – možnosti diagnostiky a intervence**

Endothelial glycocalyx – diagnostic approach and intervention assessment

Dizertační práce

Školitel: doc.MUDr.Jan Beneš, PhD.

Plzeň, 2019

MUDr. Jiří Pouska

## ABSTRAKT

Endoteliální glykokalyx (EG) je tenká vrstvička na povrchu endotelu. Její studium v posledních letech vedlo k formulaci Revidovaného Starlingova principu, zpřesňujícího popis chování tekutin v kapilárním řečišti. EG má zásadní vliv na polopropustnost endotelu a tedy pro udržení tekutiny v krevním řečišti a snížení míry filtrace na kapiláře. Stanovit integritu EG je klinicky in vivo obtížné, v současné době jsou dostupné laboratorní a zobrazovací metody stanovení. Do dnešní doby bylo prokázáno několik patologických stavů, které vedou k poškození EG (např. sepse). U mnoha těchto stavů hraje nedílnou součást léčby tekutinová terapie. V rámci našeho výzkumu jsem se zaměřili na stanovení změn EG v závislosti na různém způsobu podání tekutiny a jejím různém složení a změn EG způsobených různými patologickými stavy jako sepse nebo celková anestezie.

### Klíčová slova:

Endotheliální glykokalyx, tekutinová terapie, anestezie, sepse, mikrocirkulace.

## ABSTRACT

Endothelial glycocalyx (EG) is fine structure on the surface of endothelium. After extensive research in past years, revisited Starling principle was finally formulated. It describes fluid physiology in capillaries precisely. EG has pivotal role in keeping endothelium semipermeable and thus avoiding extensive filtration of fluids to interstitium. Assessment of EG is clinically difficult. Many pathological conditions lead to damage of EG (sepsis etc.). Intravenous fluid therapy is mainstay of treatment of such conditions. Our aim was to determine the changes of EG integrity depending on the choice of intravenous fluid and its infusion time in physiological and pathological conditions.

Key words:

Endothelial glycocalyx, infusion therapy, anaesthesia, sepsis, microcirculation.

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Plzni, 5.9.2019

Jiří Pouska

Podpis:

## PŘEHLED POUŽITÝCH ZKRATEK

EG	Endoteliální glykokalyx
ELISA	z angl. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
SDF	Sidestream dark field
IDF	Incident dark field
ESL	Endothelial surface layer; endoteliální povrchová vrstva
ATIII	Antitrombin III
NO	Oxid dusný
LDL	Low-density lipoprotein
SHINE	Shock induced endotheliopathy; šokem indukovaná endotelinopatie
SIRS	Syndrom systémové zánětlivé odpovědi
ISS skóre	Injury Severity Score
TIC	Traumatem indukovaná koagulopatie
I/R	Ischemicko/reperfúzní
STEMI	Infarkt myokardu s ST elevacemi
SOFA	Sequential Organ Failure Assessment score
DIC	Diseminovaná intravaskulární koagulopatie
MLP	Mražená lidská plasma
ANP	Atriální natriuretický peptid
PBR	Perfused boundary region
PVI	Pleth variability index
FR	Fluidresponder
NR	Nonresponder
JIP	Jednotka intenzivní péče
GDT	Goal-directed therapy

OBSAH

<b>ABSTRAKT .....</b>	<b>- 1 -</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>- 2 -</b>
<b>PŘEHLED POUŽITÝCH ZKRATEK .....</b>	<b>- 4 -</b>
<b>OBSAH .....</b>	<b>- 5 -</b>
<b>1 ÚVOD .....</b>	<b>- 7 -</b>
<b>2 PŮVODNÍ PRÁCE .....</b>	<b>- 10 -</b>
<b>3 SOUČASNÝ STAV VĚDECKÉHO POZNÁNÍ PROBLEMATIKY .....</b>	<b>- 12 -</b>
<b>3.1 Anatomie a biochemická struktura EG .....</b>	<b>- 12 -</b>
<b>3.2 Fyziologie EG .....</b>	<b>- 14 -</b>
3.2.1. EG jako základ fyziologie semipermeabilního bariéry endotelu.....	- 14 -
3.2.2.EG jako mechanotransducer .....	- 15 -
3.2.3.EG jako vazebné místo .....	- 16 -
<b>3.3 Možnosti monitorace .....</b>	<b>- 16 -</b>
3.3.1 Laboratorní monitorace .....	- 16 -
3.3.2 Využití zobrazovacích metod .....	- 17 -
<b>3.4.Faktory poškozující EG .....</b>	<b>- 18 -</b>
3.4.1 Endotelinopatie traumatického šoku .....	- 18 -
3.4.2 Poškození EG u ischemie – reperfuze.....	- 19 -
3.4.3 Poškození EG u sepse .....	- 19 -
3.4.4 Ostatní faktory a stavy.....	- 19 -
<b>3.5 Protektivní faktory a možnosti reparace.....</b>	<b>- 20 -</b>
<b>3.6. Hemodynamická koherence.....</b>	<b>- 21 -</b>
<b>4 LEGÁLNÍ A ETICKÉ ASPEKTY STUDIÍ.....</b>	<b>- 23 -</b>
<b>5 CÍLE STUDIÍ .....</b>	<b>- 24 -</b>
<b>6 METODICKÉ ASPEKTY.....</b>	<b>- 25 -</b>
<b>6.1 Užité metody stanovení EG.....</b>	<b>- 25 -</b>
6.1.1 Základy intravitální mikroskopie .....	- 25 -



6.1.2 Praktické získání reprezentativního vzorku .....	- 26 -
6.1.3 Zpracování obrazu pomocí software .....	- 27 -
<b>6.2. Stanovení makrohemodynamiky .....</b>	<b>- 29 -</b>
<b>6.3 Protokoly studií, experimentální skupiny, randomizace .....</b>	<b>- 29 -</b>
6.3.1 Studie I .....	- 30 -
6.3.2 Studie II .....	- 30 -
6.4.3. Studie III .....	- 31 -
<b>7 SOUHRN NEJDŮLEŽITĚJŠÍCH VÝSLEDKŮ A DISKUZE .....</b>	<b>- 32 -</b>
7.1 Studie I .....	- 32 -
7.2 Studie II .....	- 33 -
7.3 Studie III .....	- 36 -
<b>8 SOUHRN NEJDŮLEŽITĚJŠÍCH POZNÁNÍ, ZÁVĚRY PRO PRAXI .....</b>	<b>- 37 -</b>
<b>9 PODPORA- grant .....</b>	<b>- 40 -</b>
<b>10 SOUPIS CITACÍ .....</b>	<b>- 41 -</b>
<b>11 PŘÍLOHY .....</b>	<b>- 47 -</b>
11.1 Příloha č.1 .....	- 47 -
11.2 Příloha č.2 .....	- 53 -
11.3 Příloha č.3 .....	- 64 -
<b>12 PODĚKOVÁNÍ .....</b>	<b>- 75 -</b>

## 1 ÚVOD

Endotheliální glykokalyx (EG) je tenká jemná struktura na vnitřním povrchu endotelu. Ačkoli její existence byla potvrzena za pomoci elektronového mikroskopu již v roce 1966<sup>1</sup>, především kvůli její křehké struktuře a mikroskopickému charakteru unikala po několik dalších desetiletí před zájmem fyziologů, patofyziologů a v neposlední řadě kliniků. Jedním ze zásadních zlomů vedoucích ke zvýšenému zájmu o EG byla práce Chappella et.al<sup>2</sup>, který byl schopný na základě několika dat z experimentů modifikovat do té doby jeden z platných a minimálně zpochybňovaných fyziologických zákonů – Starlingův princip. Tato modifikace, známa též jako „Modifikovaný Starlingův princip“ přisoudila EG naprosto klíčovou roli ve fyziologii a patofyziologii chování kapaliny na endotheliální membráně, konkrétněji krevní plasmy na úrovni krevních kapilár. Od tohoto okamžiku se studium EG v mnoha medicínsky definovaných problémech (např. trauma, sepse) stalo vysoce aktuálním. Potenciál ovlivnění EG během léčby a tím dosáhnout zlepšení výsledků léčby je nyní zájmem intenzivního preklinického i klinického výzkumu.

EG je vrstva látek rozdílné biochemické povahy, především proteoglykanů a glykoproteinů (např. heparan sulfát, chondroitin sulfát, hyaluronan aj.), které k sobě váží rozpustné fragmenty plasmy v lumen kapiláry. K endotheliální buňce je kotvena z luminální strany kotevními molekulami. EG je vysoce dynamická struktura. Neustále je dosahováno rovnováhy mezi vrstvou fragmentů plasmy a krevním tokem ve středu kapiláry. S ohledem na současný stav cirkulace v kapiláře se mění složení i tloušťka EG<sup>3</sup>. Za běžných okolností EG u zdravého člověka obsahuje 1-1,7l takzvané necirkulující krevní plasmy. Její negativní náboj interaguje s krevními elementy a tím se výrazně podílí na udržení rheologických vlastností krve a zabraňuje vzniku mikrotrombů. Přítomnost EG na povrchu endotelu limituje přístup některých krevních makromolekul k jeho povrchu, čímž plní bariérovou funkci, udržuje koloidně osmotický gradient mezi lumen a intersticiálním prostorem a brání nepřiměřené adhezi molekul (především leukocytů) k povrchu endotelu. Na těchto poznacích je vystavěn již zmíněný „Revidovaný Frank-Starlingův princip“ – tenká vrstvička mezi bazální stranou EG a stěnou endotelu je pojmenovaná jako subglykokalyx a je teoreticky zcela bez obsahu albuminu, který je kvůli elektrickému náboji aktivně udržován v lumen. Některé jeho molekuly, které přesto difundovaly přes EG, jsou ze subglykokalyx aktivně odstraňovány fagocytózou. Protože tedy takto nikdy nevzniká onkotický gradient mezi intersticiem a luminální stranou (kde se koloidní tlak u povrchu buňky blíží nule),

na kapiláře neexistuje reabsorpce tekutiny, pouze filtrace – tedy rozdíl filtračních tlaků. Tato filtrace je ovšem zpomalována onkotickým rozdílem mezi plasmou a subglykokalyx. To je naprosto klíčové a zásadní pozorování, které pomohlo vysvětlit několik interakcí známých v akutní klinické medicíně; například rozdílný potenciál substituovat krevní objem u různých objemových náhrad, přičemž tento potenciál se dokonce mění za rozdílných patologických stavů. Současný klinický výzkum se do značné míry soustředí právě tímto směrem a zdá se, že mnohá klinická pozorování, především ohledně infuzní terapie, jsou takto dobře vysvětlitelná. Zhodnocení funkce EG by tak mohlo být do budoucna součástí klinických algoritmů. Další funkcí EG je poskytování vazebných míst pro některé významné makromolekuly – například antitrombin III (ATIII), lipoproteinová lipáza, protein C, některé růstové faktory. Zároveň má funkci do jisté míry mechanoreceptoru s pravděpodobně možným fyzikálním ovlivněním prostupnosti mikrocirkulace. Bohužel klinické využití v těchto oblastech je zatím otázkou budoucnosti. Může působit jako fyzikální detektor střížných sil<sup>4</sup>, jeho konformační změny vedou k lokálnímu uvolnění oxidu dusného, který působí vasodilatačně. Na základě několika experimentů.

Ohledně stanovení integrity a funkce EG, v klinice především „in vivo“, není v současné době dosaženo uspokojivé shody. Jsou vypracována evropská doporučení<sup>5</sup>, která sice poskytují základní definice a informace o využitelnosti různých analytických metod pro kvalitativní stanovení EG, ovšem superiorita konkrétní metody nad jinou není doposud stanovena. V zásadě můžeme rozlišit 2 metody stanovení integrity EG in vivo – totiž laboratorní stanovení degradačních (rozpadových) produktů a jeho přímé hodnocení metodami mikro-zobrazovacími. Protože je EG dynamická struktura v jisté rovnováze mezi vlivy degradačními a restituujícími, je možná detekce těchto rozpadových produktů v cirkulaci. Při zvýšené míře poškození EG a jeho ztenčení je jeho dynamické ekvilibrium porušeno a tudíž množství degradačních produktů v plasmě roste. Nejvíce literárních zkušeností je s molekulou syndecan-1, dále se stanovují další molekuly jako např. hyaluronan, heparan sulfát apod. Tyto látky mají ve vztahu k stanovení EG několik nevýhod. Nejsou EG specifické, a tudíž jejich zvýšenou koncentraci nemusí způsobovat selektivně rozpad EG. Mají vysoký metabolický obrat, jejich odbourávání je závislé na jaterních funkcích. V absolutních číslech nejsou jejich koncentrace porovnatelné, protože chybí standardizace jejich imunochemického stanovení (ELISA). Zobrazovací metody využitelné ke stanovení EG in vivo jsou vesměs založené na analýze sublinguální cirkulace pomocí videomikroskopie. V současné době jsou dostupné dvě technologie – Sidestream dark field

(SDF) a Incident dark field (IDF). V klinických pracích dominuje analýza sublinguální cirkulace, především pro její snadnou dostupnost, ačkoli je třeba vždy mít na mysli fakt, že jde pouze o jisté přiblížení stavu kapilárních řečišť vitálních orgánů, jejichž funkční stav je důležitější. Tato aproximace je ovšem široce přijata. Po získání primárního mikroskopického záznamu EG je nutno tento dále zhodnotit. Jsou dvě možnosti – zhodnocení manuální a automatizované. Manuální zhodnocení je podrobně rozpracováno v doporučeních, nejde jen o jeden konkrétní způsob. Obecně se dá říci, že je zatíženo vysokou pracností a časovou náročností. Proto byl v posledních letech kladen důraz na vznik automatických software, které by bylo schopné generovat výsledky s mnohonásobnou rychlostí. Jedním z těchto software je GlykoCheck (GlykoCheck BV, Maastricht, Holandsko), který byl využit v našem výzkumu.

Do dnešní doby bylo prokázáno několik patologických stavů, které vedou k poškození EG – systémový zánět, ischemicko – reperfúzní (I/R) poškození, sepse, šok, trauma, anestezie aj. Patofyziologie poškození EG za těchto stavů je podobná, ačkoli ne totožná.

U mnoha těchto stavů je nedílnou součástí léčby tekutinová terapie. Pochopení její patofyziologie dostalo v posledních desetiletích mnoha změn – dnes je užití striktně vázáno na očekávaný přínos a jistá benevolence v aplikaci intravenózních tekutin v minulosti není na místě. V tomto kontextu se výrazně rozvinul výzkum, kdy, jakou, v jakém množství a jakou rychlostí intravenózní tekutinu podat. Vzhledem k zaměření našeho pracoviště jsme si tedy pro klinický výzkum změn EG během patologických stavů vybrali porovnání různých způsobů znečitlivění na EG, různý způsob intravenózního podání tekutiny v patologických stavech jako anestezie nebo sepse a vliv složení intravenózně podaného infuzního roztoku na EG. Ukázalo se, že ačkoli je v našich podmínkách složité v rámci výzkumu malých odchylek jemné struktury EG dosáhnout dostatečné robustnosti studií, je vliv zmíněných léčebných intervencí na EG nezanedbatelný.

## 2 PŮVODNÍ PRÁCE

Tato dizertační práce vychází z komentovaného souboru původních vědeckých prací a přehledových článků, jejichž seznam je uveden níže. Nejdůležitější práce diskutované v praktické části jsou součástí disertační práce jako příloha 1-3.

### 2.1 Endotheliální glykokalyx – možnosti diagnostiky a intervence

POUSKA, Jiří; TEGL, Václav; ASTAPENKO, David; ČERNÝ, Vladimír; LEHMANN, Christian; BENEŠ, Jan. Impact of Intravenous Fluid Challenge Infusion Time on Macrocirculation and Endothelial Glycocalyx in Surgical and Critically Ill Patients. *BioMed Research International*. 2018 Nov 1-11; 2018:8925345. IF 2,580

ASTAPENKO, David; POUSKA, Jiri; BENES, Jan; SKULEC, Roman; LEHMANN, Christian; VINK, Hans; CERNY, V. Neuroaxial anesthesia is less harmful to the endothelial glycocalyx during elective joint surgery compared to general anesthesia. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2018 Nov 29. IF 1,910

POUSKA, Jiří; ASTAPENKO, David; TĚGL, Václav; BENEŠ, Jan; ČERNÝ, Vladimír. Podání bolusu 500ml fyziologického roztoku nevede k bezprostřednímu poškození endotheliální glykokalyx stanovitelnému hodnocením sublinguální mikrocirkulace. *Anest intenziv Med*. 2018; 29; 322-327

POUSKA, Jiří; TEGL, Václav; CERNY, Vladimír, BENES, Jan. Influence of fluid challenge administration rate on endothelial glycocalyx and major hemodynamic variables in surgical and septic patients, *Intensive Care Medicine Experimental* 2017, 56 (Suppl 2):44 (P 0012)

### 2.2 Přehledové články

ASTAPENKO, David; POUSKA, Jiří; ČERNÝ, Vladimír; BENEŠ, Jan. Endoteliální glykokalyx a tekutinová terapie v intenzivní a perioperační medicíně. *Anest intenziv Med*. 2017; 28; 289-296

### 2.3 Práce navazující na danou tematiku

BENEŠ, Jan; POUSKA, Jiří. Základy racionální tekutinové terapie. Postgraduální medicína 2016, ročník 18, č.5

### 3 SOUČASNÝ STAV VĚDECKÉHO POZNÁNÍ PROBLEMATIKY

#### 3.1 Anatomie a biochemická struktura EG

Ačkoli je EG jedna z nejrozsáhlejších struktur našeho těla – dle některých autorů je při celkové hmotnosti 1kg jeho plocha  $5000\text{m}^2$ <sup>6</sup>, byla EG poprvé vizualizována teprve před více než 50 lety za použití elektronové mikroskopie. Její skladba a funkce doposud nebyla kompletně objasněna. V posledních několika desetiletích se EG více stala předmětem zájmu pro jeho roli v cévní fyziologii a patologii. Na počátku bylo pozorování nízkých a variabilních hodnot hematokritu v kapiláře za různých okolností – jako například při farmakologické aktivaci endotelu<sup>7</sup>. Tyto změny byly odbouratelné podáním heparinázy. Později tato pozorování dala vzniknout teorii, která předpovídala 1,2 $\mu\text{m}$  silnou vrstvu pomalu se pohybující vrstvy plasmy na povrchu endotelu. Později bylo dalšími pozorováními zjištěno, že šířka EG je v kapilárách kosterního svalu 0,5 $\mu\text{g}$ , ve větších arteriích může její tloušťka dosahovat až 4,5 $\mu\text{g}$ <sup>8</sup>.

EG je tenká vrstvička bohatá na rozvětvené cukerné molekuly na povrchu luminální strany endotelu. K endotelu je připojena tzv. kotvícími molekulami - převážně proteoglykany a glykoproteiny. Tyto tvoří pevnou mikroskopickou síť, do které jsou zavzaty volné molekuly, ať už původem plasmatické či syntetizované buňkami endotelu. Více směrem do středu lumen je EG formován složkami plasmy – plasmatickými proteiny, které jsou spojené mezi sebou přímo, případně pomocí solubilních proteoglykanů a glykosaminoglykanů. Mezi touto vrstvou solubilních komponent a tekoucí krví je neustále udržováno dynamické ekvilibrium, čímž dochází k neustálým změnám v aktuálním složení a tloušťce EG. Zejména enzymatické a/nebo mechanické ztenčování EG (angl. shedding) má význam v mnoha patologických stavech. Celá výše popsaná síť makromolekul je tedy vysoce dynamická struktura s molekulami vázanými k membráně endoteliálních buněk, přičemž tyto molekuly jsou neustále odbourávány a nahrazovány novými. Délka těchto sloučenin může být extrémní – například v případě hyaluronanu až 1 $\mu\text{m}$ . Hranice mezi lokálně syntetizovanými elementy a vnějšími prvky z plasmy není ostrá. Celé uskupení makromolekul se nazývá ESL (Endothelial surface layer). Je vnitřně homogenní bez mikroskopicky prokazatelného rozdílu mezi stranou přivrácenou k endotelu a stranou směrem do lumen<sup>3</sup>. Laboratorní enzymatická degradace kterékoli jednotlivé složky EG vede

k dramatické změně charakteristiky celé vrstvy, což vypovídá o synergických interakcích všech makromolekul EG jako celku.

Dále uvádíme několik stručných charakteristik jednotlivých součástí EG.

- *Proteoglykany* jsou považovány za nejdůležitější molekuly EG stran pevnosti její struktury. Jak název napovídá, skládají se z proteinového jádra a k němu připojených glykosaminoglykanů. Proteinová jádra vykazují velkou variabilitu ve velikosti a schopnosti vázat se k endoteliálnímu povrchu, případně u solubilních ve schopnosti vázat se do sítě EG. Jedno proteinové jádro může vázat promiskuitně glykosaminoglykanové řetězce různého původu. Do skupiny proteoglykanů patří například dnes již rutinně stanovitelné syndecany (jmenovitě syndecan-1).
- *Glykosaminoglykanů* je 5 typů, mezi nimi například heparan sulfát a hyaluronan. Jsou to lineární polymery z disacharidů. Nesou vazebná místa pro proteiny plasmy, jako například AT III. Konfigurace těchto vazebných míst je velmi variabilní, což odpovídá množství různých biologických funkcí těchto sloučenin.
- *Glykoproteiny* hrají důležitou úlohu v připojení EG k membráně endotelu, stejně jako některé proteoglykany. Na rozdíl od nich ale obsahují relativně malé cukerné zbytky (2-15 jednotek). Patří sem endoteliální adhezivní molekuly, což jsou glykoproteiny hrající klíčovou úlohu v interakci krevních elementů a endotelu a v buněčné signalizaci. Dělí se do třech skupin – selektiny, integriny a superrodina imunoglobulinu.
  - *Selektiny* jsou odpovědné za interakci mezi leukocyty a endotelem. Jsou skladovány ve Weibel-Paladeho tělískách, jejichž exocytóza je například indukována trombinem – což je děj významný v akutní traumatické koagulopatii.
  - *Integriny* jsou integrální transmembránové proteiny. Jejich význam je v interakci endotelu s krevními destičkami, dále vážou látky jako kolagen a fibronectin.
  - Vedle adhezivních glykoproteinů obsahuje EG glykoproteiny s významem v kaskádách koagulačních, fibrinolytických a hemostatických. Sem patří například glykoprotein Ib-IX-V, který váže von Willebrandův faktor. Mezi solubilní komponenty EG patří různé druhy proteinů původem z plasmy nebo syntetizované endotelem. Sem patří například albumin, jehož přítomnost má



zásadní roli na udržení elektrického náboje semipermeabilní EG, dále thrombomodulin, superoxid dismutasa, ATIII.

Závěrem můžeme říci, že pravděpodobně nejzásadnější místo ve struktuře EG zastávají dlouhé makromolekuly hyaluronanu spojující se v komplexy, které tvoří kostru pro další molekuly. Odstranění kterékoli jednotlivé složky EG obvykle vede ke ztrátě funkce EG jako celku.

### 3.2 Fyziologie EG

EG má několik fyziologických funkcí. Spoluzodpovídá za mechanické vlastnosti kapiláry jako polopropustné membrány, ale je také vazebným místem důležitým v signálních cestách zodpovědných za správnou funkci homeostázy. :

#### 3.2.1. EG jako základ fyziologie semipermeabilního bariéry endotelu

Lidský organismus je tvořen z 60% vodou. Z tohoto množství je 1/3 extracelulární. Tu dále dělíme na intersticiální (80%) a krevní plasmu (20%, tedy cca. 3l). Důležité je si uvědomit, že v lidském organismu neexistuje bariéra pro vodu zcela nepropustná. V roce 1896 Ernest Starling publikoval model chování tekutiny v kapiláře<sup>9</sup>. Tento model byl přijat a nejméně dalších 100 let uznáván jako platný a je často dodnes vyučován. Množství filtrace tekutiny v kapiláře bylo dáno jako rozdíl dvou protisměrných sil. První je rozdíl hydrostatických tlaků mezi lumen kapiláry a intersticiem, druhý je rozdíl koloidně onkotických tlaků mezi intersticiem (uvažován jako blízky nule) a lumen. Důležitou premisou bylo, že ve venulární části kapiláry, kde je rozdíl hydrostatických tlaků prakticky nulový, dochází ke zpětné reabsorpci tekutiny do lumen. Průběh tekutiny kapilárou je tedy dán jistým „bypassem“ tekutiny přes interstitium.

V posledních 20 letech byla ovšem učiněna některá pozorování, kterým tento jednoduchý princip dostatečně neodpovídal. První kontroverzí se stal Starlingův předpoklad, že je intersticiem koloidně takřka negativní. Výzkumníci měnili koloidní tlak intersticia na kapiláře, aniž by se významně měnilo množství zpětné filtrace<sup>10</sup>. Tedy síla limitující míru filtrace danou rozdílnými hydrostatickými tlaky nebyla dána koloidním tlakem v interstitiu. Druhou nesrovnalostí s původní teorií bylo pozorování, kdy se zvyšoval onkotický tlak uvnitř kapiláry roztoky albuminu; bylo zjištěno, že arteficiální zvýšení koncentrace

albuminu (a tedy onkotického tlaku) nevede k vyšší reabsorpci, ale snižuje význam rozdílu hydrostatických tlaků (tzv. COP paradox)<sup>11</sup>. Zatřetí bylo zjištěno, že tkáňový faktor, aktivní iniciátor koagulace, přítomný ve vysoké koncentraci na povrchu endotelu, je za fyziologických okolností separovaný od tekoucí plasmy. Pokud by docházelo k tzv. „intersticiálnímu bypassu“ tekutiny včetně koagulačních faktorů (např. fibrin), muselo by docházet k neustálé aktivaci enzymatické koagulační kaskády (reakce tkáňový faktor – fibrin).

Starlingův princip se tedy nadále nezdál jako vhodný koncept a byl nahrazen komplexnější teorií známou jako **Revidovaný Starlingův princip**. Jako vlastní vaskulární bariéru neuvažujeme jen struktury endotelu, ale především ESL. Až tato komplexní struktura je biologicky aktivní. EG funguje jako houba, která odděluje koloidně aktivní proteiny plasmy od ultrafiltrátu. Tak vzniká takzvaný „chráněný“ region (synonymně subglykokalyx), zaujímající několik nanometrů, který je prakticky s nulovou koncentrací proteinů, a tedy nulovým onkotickým tlakem. Tento region je ovšem lokalizován na lumenální straně endotelu. Na proteiny chudý ultrafiltrát v subglykokalyx je neustále přesouván přes membrány endotelu do intersticia. Tím se „čistí“ chráněný region a zabraňuje se zpětné difuzi proteinů do subglykokalyx.

Při zvýšení koloidního tlaku plasmy se pouze zvyšuje gradient mezi plasmou a subglykokalyx, čímž se zpomaluje míra filtrace, ale nedochází ke zpětné resorpci tekutiny z intersticia vně kapiláry. Tekutina filtrovaná kdekoli v oběhovém systému může být zpětně vstřebána lymfatickou cestou. Pokud je kapacita lymfatické drenáže překročena, vzniká intersticiální edém. Výjimku z tohoto pravidla tvoří situace, kdy náhle poklesne hydrostatický tlak – nejčastěji při náhlé krevní ztrátě. V tomto případě na základě rozdílných hodnot onkotických tlaků je možné do řečiště mobilizovat tekutinu v objemu přibližně 500ml, ovšem tento efekt trvá pouze po několik minut a je ukončen v situaci, kdy proteiny difundují do subglykokalyx a vyrovnají tak rozdíl onkotických tlaků působících proti filtraci.<sup>12</sup>

### 3.2.2. EG jako mechanotransducer

Endotel je exponovaný mechanickým silám způsobených krevním tokem. Je známo, že tyto síly modifikují funkci a morfologii endotelu. Endotel produkuje oxid dusný (NO), který je důležitým faktorem vaskulárního tonu. Bylo dokázáno<sup>13</sup>, že odbourání EG vede ke

sníženému uvolnění NO. Zároveň se zdá, že by mohla být zpětná vazba mezi mechanickým namáháním cévy a rychlostí rekonpozice EG<sup>14</sup>. Na druhou stranu se ukazuje, že krevní tok je zřejmě podmínkou pro vznik EG. Pečlivým studiem vývojových zárodků křepelek Henderson-Toth a kol. prokázali, že EG se začíná objevovat již ve velmi rané fázi vývoje tedy v okamžiku zahájení proudění krve embryem<sup>15</sup>. Naopak jeho enzymatická degradace v této rané fázi vývoje vedla k zastavení vývoje cévního systému.

### 3.2.3. EG jako vazebné místo

EG funguje jako vazebné místo pro mnoho molekul, čímž zprostředkovává interakci mezi imunním, koagulačním a metabolickým systémem. Vysoká sulfatace komponent EG a navázaný albumin dávají vrstvě negativní náboj, který odpuzuje cirkulující krevní elementy a zároveň může vázat vysoké množství kationtů, např. sodíku (např. při chronickém srdečním selhávání)<sup>16</sup>. V případě, že nějaká látka má vazebné místo na EG, je možno lokálně takto výrazně zvýšit její koncentraci – např. fibroblastový růstový faktor nebo low-density lipoprotein (LDL). Tyto látky mají potenciál buď lokálně měnit signální dráhy případně enzymovou aktivitu, nebo měnit transkripci genů. Velký význam má vazba antikoagulačních látek na EG – ATIII, trombomodulin aj., které zodpovídají za koagulační ekvilibrium. Zdravý endotel je považován za tromborezistentní<sup>17</sup>. EG je dále schopný vázat enzymy s antioxidační úlohou, čímž snižuje oxidativní stres.<sup>18</sup>

## 3.3 Možnosti monitorace

EG lze monitorovat v principu dvěma odlišnými způsoby – laboratorně a zobrazovacími metodami.

### 3.3.1 Laboratorní monitorace

Vlastnosti EG se nepřímo stanovují z jejich komponent detekovatelných v krevní plasmě, jde o tyto látky: syndecan-1, hyaluronan, heparan sulfát, chondroitin sulfát. EG je vysoce dynamická gelová struktura, která se nachází v rovnováze, přičemž její prvky jsou neustále odbourávány a zároveň tvořeny – tedy její složení v čase není identické. Není zcela

objasněná rychlost ani druh metabolismu těchto látek – například hyaluronan má extrémně krátký poločas ( $T_{1/2}$  2-5min)<sup>19</sup> a metabolizuje se hepatálně, u ostatních látek ale často tyto údaje chybí. Kvůli těmto faktorům a dynamickému ekvilibriu s krevní plasmou (za normálních podmínek váže EG asi 1l krevní plasmy) je velmi obtížné použít humorální markery ztenčení EG *in vivo*. Dalším problémem těchto látek je, že ani jedna z nich není specifická pro endotel, tedy na změnách koncentrace se mohou podílet i změny v jiných tkáních. V neposlední řadě je problematická přímo laboratorní diagnostika – nejsou k dispozici spolehlivé a standardizované ELISA testy, tedy porovnatelnost výsledků různých prací je obtížná. Přesto všechna uvedená omezení se stanovení syndecanu-1 stalo relativně častějším v klinickém výzkumu EG.<sup>20</sup>

### 3.3.2 Využití zobrazovacích metod

Přímé zobrazení EG je možné pomocí elektronové mikroskopie. Takto lze zkoumat libovolnou tkáň, ale samozřejmě nikoli *in vivo*. Přímá vizualizace EG *in vivo* je extrémně obtížná kvůli křehké povaze struktury. Naštěstí lze EG monitorovat nepřímou – z určení charakteru proudění červených krvinek na luminální straně kapiláry. Jde o metody takzvané intravitální mikroskopie založené na různých fyzikálních metodách (SDF, nověji IDF). Obvykle se jako vzorek používá sublinguální cirkulace pro její snadnou prosvítitelnost. Ve zvířecím experimentu je ale její užití možné i na např. střevní sliznici u stomovaných zvířat. Pořízení obrazu není zcela jednoduché a je zatíženo vysokým množstvím artefaktů, které je třeba při měření a získávání reprezentativní obrazové smyčky eliminovat. Takto vzniklý obraz lze dále hodnotit manuálně nebo automaticky. Manuálních metod hodnocení je celá řada, ale spíše než samotnou EG charakterizují prostupnost krevních elementů kapilární sítě jako celkem. Nejčastěji bývá hodnocena kapilární denzita a charakter průtoku - MFI (microvascular flow index) a skóre podle De Backera. Některé z těchto parametrů jdou stanovovat také automaticky, přičemž ale nejsou specifické pro EG.

Automatickým softwarem, který analyzuje smyčku pořízenou mikrokamerou, lze získat hodnotu výchylky proudění erytrocytů od středu kapiláry – veličina je nazývána PBR (perfused boundary region). Je specifická pro EG, takto lze nepřímou studovat tloušťku vrstvy EG. (viz dále kap.6.1.3)

### 3.4. Faktory poškozující EG

Poškození endotelu je univerzální proměnou mnoha kritických stavů. Společným jmenovatelem šokových stavů je aktivace sympatoadrenálního systému. Katecholaminy indukované poškození EG je zodpovědné za zvýšenou degradaci (angl. shedding) EG, rozvolnění vazeb mezi buňkami endotelu a následnou zvýšenou kapilární propustností, prokoagulačním prostředím v kapiláře s tvorbou mikrotrombů a následně tedy sníženou perfúzí orgánů se sníženou dodávkou kyslíku. V tomto kontextu je brzká odpověď organismu na šok (ať už na těžké trauma, endotoxémii nebo I/R poškození) velmi podobná a nabízí se uvažovat, že EG a jeho poškození je právě tímto společným jmenovatelem. Dříve používaný termín SIRS (syndrom systémové zánětlivé odpovědi) zřejmě označoval stejnou skutečnost, ačkoli náhled do mikrocirkulace v době jeho vzniku chyběl. Johansson navrhuje tento společný patofyziologický děj nazvat SHINE (shock-induced endothelinopathy) <sup>21</sup>

#### 3.4.1 Endotelinopatie traumatického šoku

Poškození endotelu při traumatickém šoku je dáno rozvinutím systémové odpovědi na mnohočetná poranění. Johansson publikoval observační studii <sup>22</sup>, kde v kohortě traumatizovaných pacientů byla silná asociace mezi závažností traumatu (ISS skóre), hladinou plasmatického adrenalinu, hypokoagulačním stavem a vysokou hladinou cirkulujícího syndecanu-1 a solubilního trombomodulinu. Zajímavostí bylo, že u pacientů se stejně závažným traumatem vysoká hladina syndecanu-1 byla spojena s významným nárůstem mortality. To nepřímo ukazuje na významnost funkčního stavu endotelu na výsledek léčby těchto pacientů. Významným klinickým problémem u závažného traumatu je vznik traumatem indukované koagulopatie (TIC). Podle současných názorů se zdá, že její vznik je patofyziologicky spojen s akutní traumatickou endotelinopatií minimálně dvěma mechanismy.

Prvním z nich je děj zvaný autoheparinizace, kdy při větším porušení EG do krevního oběhu dochází k uvolnění sloučenin jako heparan sulfát, který může mít stejnou funkci jako heparin. Toto bylo prokázáno použitím rotační tromboelastografie.<sup>23</sup> Druhým mechanismem je uvolnění solubilního trombomodulinu, který má antikoagulační funkci a je na předním místě patofyziologické kaskády TIC vedoucí k hypofibrinogémii a především k hyperfibrinolýze.

### 3.4.2 Poškození EG u ischemie – reperfuze

Základem vzniku poškození endotelu a EG u I/R stavů je přechodný nedostatek kyslíku a nutričních substrátů (ischemie). Pravděpodobně se na něm podílí i následný rozvoj volných kyslíkových radikálů po obnovení krevního proudu (reperfuze). Ačkoli míra poškození různých tkání je různá, klíčovou roli zde hraje mikrocirkulace. Dochází k mechanickému poškození endoteliálních buněk, intenzita oxidačního stresu poškozuje EG, který následně exponuje adhezivní receptory pro leukocyty. Výsledkem je porucha funkce kapilární membrány a vznik intersticiálního edému.<sup>24</sup> Rehm et al prokázali<sup>25</sup>, že u I/R poškození byla globální (kardiochirurgičtí pacienti v hluboké hypotermii) i regionální (operace abdominální aorty) ischemie spojená s nárůstem hladiny syndecanu-1 i heparan sulfátu. V populaci pacientů s akutním infarktem myokardu s ST elevacemi (STEMI) přijatých na jednotku intenzivní péče byla hladina syndecanu-1 nezávislým prediktorem srdečního selhání a zvýšené mortality<sup>26</sup>.

### 3.4.3 Poškození EG u sepse

U sepse je endotelinopatie vzhledem k patofyziologii systémového zánětu očekávaným a předvídatelným stavem, přičemž o mikrocirkulační dysfunkci jako hlavním faktoru rozvoje sepse je uvažováno desítky let. EG je velmi rychle degradován mediátory zánětu (TNF alfa, bakteriální lipopolysacharid), oxidačním stresem a specifickými enzymy (např. heparinasa) z extrudovaných lipozomů – výsledkem je ztráta ochranné funkce endotelu a především únik tekutiny extravaskulárně. Septická koagulopatie (často označována i v této souvislosti jako diseminovaná intravaskulární koagulopatie – DIC) byla v minulosti opakovaně udávána jako prediktor násobného zvýšení mortality. Hladina syndecanu-1 koreluje s hodnocením závažnosti orgánové dysfunkce (SOFA)<sup>27</sup>, a zároveň do jisté míry predikuje vznik jaterního a renálního selhání. Nezodpovězenou otázkou zůstává, zdali infuze vazopresorů v rámci léčby sepse nevede sama o sobě k dalšímu poškození EG.

### 3.4.4 Ostatní faktory a stavy

Poškození EG během **anestezie** je dáno rozsahem operačního výkonu a stavem pacienta. Některé anestetika sama o sobě mají potenciál ovlivňovat EG (viz dále). Svoji roli

na poškození EG může sehrát i způsob provedené anestezie, což bylo v jedné z klinických prací naší hypotézou. Samostatný význam má perioperačně vzniklá – a častá hypervolémie, která vede k významnému sekundárnímu poškození EG<sup>28</sup>.

Z dalších onemocnění, které se týkají akutní medicíny okrajově, u nichž je dobře zdokumentován význam EG a jejího poškození, jmenujme **aterosklerózu, chronické renální selhání, diabetes mellitus a onkologická onemocnění** – poslední případ je zajímavý v tom, že se vyvíjejí nová antitumorózní léčiva, která mají naopak aktivně EG tumorózních tkání degradovat<sup>29</sup>.

### 3.5 Protektivní faktory a možnosti reparační

Z předchozího textu plyne, že integrita a správná funkce EG je klíčová pro správnou funkci organismu. Proto se v poslední době ve zvýšené míře objevují experimentální a klinická data, jejichž autoři se snaží identifikovat látky protektivní na EG a případně, které by vedly k reparaci EG. Na izolovaných prasečích kardiomyocytech prokázali Chappell et al., že EG může být při I/R poškození ochráněn preemptivním podáním hydrocortisonu nebo ATIII<sup>30 31 32</sup>. Stejný model ukázal též možnosti ochrany EG podání externího oxidu dusného<sup>33</sup>. V animálním experimentu podávaný aktivovaný protein C u modelu sepse vyvolaného podání lipopolysacharidu krysám vedl k ochraně EG<sup>34</sup>. V myším modelu diabetu mellitu vedlo podání metforminu k zlepšení bariérové funkce EG<sup>35</sup>. V klinických studiích je zdokumentováno podání sulodexidu u pacientů s diabetem 2. typu, toto vedlo ke zvýšení tloušťky EG – bohužel po podávání v řádech měsíců. Navíc bylo prokázáno, že zlepšená kontrola hladiny krevních lipidů a cholesterolu vede k protekci EG<sup>36</sup>. Zajímavá je práce, kdy u kardiochirurgických nemocných vedlo použití pulsatilního mimotělního oběhu k rychlejší regeneraci EG než použití nepulsatilního<sup>37</sup>.

Pokud odhlédneme od konkrétních farmak, je možné uvést některé postupy používané rutinně v akutní medicíně, jež některé vedou k protekci EG ve větší míře než postupy jiné. Nutno dodat, že v současné době jsou ale tyto úvahy založené mnohem více na preklinických pracích než na klinických datech.

Alterace EG **podáním celkových anestetik** byla popsána v minulosti<sup>38</sup>. V naší práci jsme srovnávali podání celkové anestezie a anestezie svodné, kterou je možné poskytnout u limitovaného spektra operačních výkonů. Po užití svodné anestezie měli pacienti EG v signifikantně lepší kondici<sup>39</sup>.

Další samostatnou otázkou je **použití parenterální nutriční**. Zdá se, že některé její běžně používané součásti (fosfolipidy) hrají důležitou roli v zachování EG<sup>40</sup>. Fosfatidylcholin a sfingosin 1 fosfát brání degradaci EG metaloproteinázami. Do budoucna se dá očekávat vývoj nových formulí parenterální nutriční specificky zaměřených na ochranu EG.

Největší a pravděpodobně nejkontroverznější otázkou je **užití infuzní léčby** ve vztahu k EG. Je možno tvrdit, že tento vztah je ambivalentní – chování intravenózní tekutiny v řečišti je determinováno kvalitou EG a zároveň kvalita EG je ovlivněna intravaskulárně podanou tekutinou. Vyhnout se akutní hypervolémii je základní podmínkou protekce EG. Hypervolémie vede k uvolnění atriálního natriuretického peptidu (ANP), který degraduje EG<sup>28</sup>. V situaci intaktní EG je klinicky výrazně vyšší objemový efekt koloidů než krystaloidů, zatímco při poškozené EG je tento efekt pouze mírný<sup>41</sup>. Do jaké míry je možno výběrem typu krystaloidního roztoku měnit míru funkce EG, není doposud známo.

Zajímavý z hlediska kvality důkazů je vliv podání mražené lidské plazmy (MLP) na EG. Haywood-Watson et al.<sup>42</sup> zjistili ve své práci protektivní vliv podání MLP na EG u pacientů po traumatu. Tyto údaje byly předpokládány na základě více animálních experimentů. Dodnes není vyřešena otázka, která část MLP se podílí na reparaci EG – je uvažováno mnoho mechanismů (lepší volumexpanze, přítomnost konkrétních protektivních proteinů apod.), ale žádný z nich není dostatečně literárně obhájen. V nedávno publikované práci VIPER-OCTA vykazovala skupina pacientů po urgentní operaci hrudní aorty s cíleným podáním směsné solvent-detergent ošetřené lidské plazmy lepší výsledky ve smyslu klinického výstupu a reparace EG než kontrolní skupina, u které byly použity krystaloidy a klasická mražená plazma<sup>43</sup>.

### 3.6. Hemodynamická koherence

Pojem „hemodynamické koherence“ popisuje vztah makrohemodynamiky a mikrohemodynamiky v konkrétní situaci. Je definována jako situace, kdy normalizace makrohemodynamických veličin vede ke zlepšení parametrů mikrocirkulace.

Je známo, že poškození či ztráta této koherence především při šokových stavech je spojena s horšími výsledky nemocných<sup>44</sup>. Zavedení tohoto pojmu má význam především z toho důvodu, že primárním cílem správné funkce krevního oběhu je dodávka kyslíku do tkání. Pokud dojde ke ztrátě koherence, může nastat situace, kdy i při normalizaci oběhových



makroparametrů při nedostatečné funkci mikrocirkulace (včetně EG) k adekvátní dodávce nedochází.

#### 4 LEGÁLNÍ A ETICKÉ ASPEKTY STUDIÍ

Všechny experimentální práce byly řádně schváleny Etickými komisemi při Lékařské fakultě UK v Plzni a Lékařské fakultě UK v Hradci Králové. Byl vypracován informovaný souhlas, se kterým byly všichni pacienti a dobrovolníci zařazení do studie předem seznámeni. Pacienti, kteří nemohli v okamžiku zařazení souhlas vyjádřit (například sedovaní pacienti), byli požádáni o souhlas před dimisí, před zařazením do studie byl získán souhlas nezávislého odborníka a vyrozumění nejbližší příbuzní pacienta. Samotný výzkum proběhl na klinických a experimentálních pracovištích LF UK v Plzni a LF UK v Hradci Králové.

## 5 CÍLE STUDIÍ

Cílem našich prací bylo zdokumentovat možnost analýzy EG pomocí intravitální mikroskopie s částečně automatizovanou analýzou softwarem Glykocheck (Glykocheck BV, Maastricht, Holandsko) použitelnou v reálném čase na léčených pacientech a zároveň touto diagnostikou prokázat možnost ovlivnění integrity a funkce EG při použití vybraných intervencí rutinně využívaných v anesteziologii a intenzivní medicíně a to jmenovitě:

- V závislosti na způsobu podání tekutinových náhrad (množství a charakter infuzního roztoku a rychlost jeho podání)
- V souvislosti s užitým způsobem znecitlivění při velkém chirurgickém výkonu – regionální anestezie oproti celkové anestezii
- V neposlední řadě určit, zdali tato případná stanovená změna EG po intervenci má vliv na bezprostřední a/nebo opožděnou morbiditu a mortalitu pacientů

Zároveň paralelně byla stanovena příslušná hemodynamická odpověď pacienta na danou intervenci. Bylo analyzováno, zdali případné změny mikrocirkulačních parametrů odrážejí změny parametrů makrocirkulačních případně zdali se tyto dva aspekty oběhového systému chovají nezávisle.

## 6 METODICKÉ ASPEKTY

### 6.1 Užití metody stanovení EG

#### 6.1.1 Základy intravitální mikroskopie

První intravitální mikroskopy byly uvedeny v devadesátých letech minulého století – první generace pracovala na principu OPS (orthogonal polarization spectral imaging) a první použití je zmiňováno v neurochirurgii<sup>45</sup>. Brzy nato se pozornost výzkumníků zaměřila do intenzivní péče, kde bylo prokázáno, že zhoršení některých parametrů mikrocirkulace vede k zhoršení prognózy kriticky nemocných<sup>46</sup>. Nejčastěji se stejně jako dnes hodnotila sublinguální mikrocirkulace, ačkoli několik literárních údajů je i z hodnocení mikrocirkulace jiných orgánů při chirurgických výkonech. Se zvýšeným zájmem výzkumu o charakteristiku mikrocirkulace šel ruku v ruce vývoj intravitálních mikroskopů – technicky bylo nutné vyvinout přístroje, které světelností a průchodností světla umožňovaly pozorovat mikrocirkulaci pod povrchem sliznice, přičemž v optickém systému musela být přítomna sestava čoček s dostatečným zvětšením.

Druhá generace toto splňovala – byla založena na technologii SDF. Komerčně dostupná je od roku 2007. V principu jde o trubici, po jejímž obvodu jsou umístěny diody (celkem 6) emitující světlo, přičemž tak vzniká ve středu tmavé pole pasivně zářící světelné paprsky do zvětšovací soustavy umístěné v trubici. V našem konkrétním případě bylo diodami emitované světlo zelené o vlnové délce 540 nm, aby bylo možné detekovat hemoglobin procházejících červených krvinek. Zvětšení se obvykle udává 325x při 23 snímcích za vteřinu. Plocha, která je měřena v jednom okamžiku, je 692 μm x 442 μm.

Třetí generace přístrojů se označuje jak IDF. Používá 12 diod s vyšší frekvencí světelných pulsů. Je vylepšen způsob a směr vyzařování světla, čímž je dosaženo vyššího optického rozlišení a vizualizace většího množství kapilár.

Obecně se dá říci, že kvalita pořízeného obrazu je zásadní pro další analýzu. Kvalitu obrazu determinuje pět proměnných:

1. **Světlost obrázku** – u přístroje, který byl využit v našich analýzách, byl tento parametr nastavován automaticky

2. **Zaostření (focus)** – správné zaostření umožňuje přesnou analýzu šířky kapilár a rychlosti krevního toku. Špatné zaostření vede ke ztrátě kontrastu, kapiláry jsou potom hůře viditelné
3. **Doba záznamu** – v jednom místě se doporučuje setrvat 3-10s v klidu, čímž se eliminuje množství artefaktů (především tlakových – viz.dále)
4. **Místo záznamu** – zahrnuje architekturu konkrétní oblasti mikrocirkulace, množství slin, bublin, krve. Doporučuje se najít optimální místo, kde jsou přibližně ve stejné hloubce (tj. ve stejném zaostření) cévy různých velikostí – středních a malých. Sublinguální sliznice je vzhledem k architektuře cévní sítě trojrozměrný prostor, kdy arterioly leží hlouběji než venuly, u povrchu se vyskytují do kliček stočené drobné arterioly, které nejsou vhodné k analýze. Pokud je sliznice pokryta množstvím slin a bublin, tyto lámou paprsky světla a znemožňují analýzu.
5. **Stabilita obrazu** – artefakty vznikají nesprávným držením kamery výzkumníkem případně pohybem pacienta. Někdy se doporučuje držení jazyka proti tvrdému patru, do „ruličky“.
6. **Tlak vyvinutý na tkáň** – pokud je na kameru vyvíjen příliš velký tlak, dochází k mechanické okluzi průtoku krvinek mikrocirkulací. Jako nejlepší indikátor slouží větší venuly – mají velmi tenkou poddajnou stěnu. Tento artefakt je problematický především tím, že jeho přítomnost nemusí být snadné odhalit, ačkoli pravděpodobně výrazně mění výsledky měření.

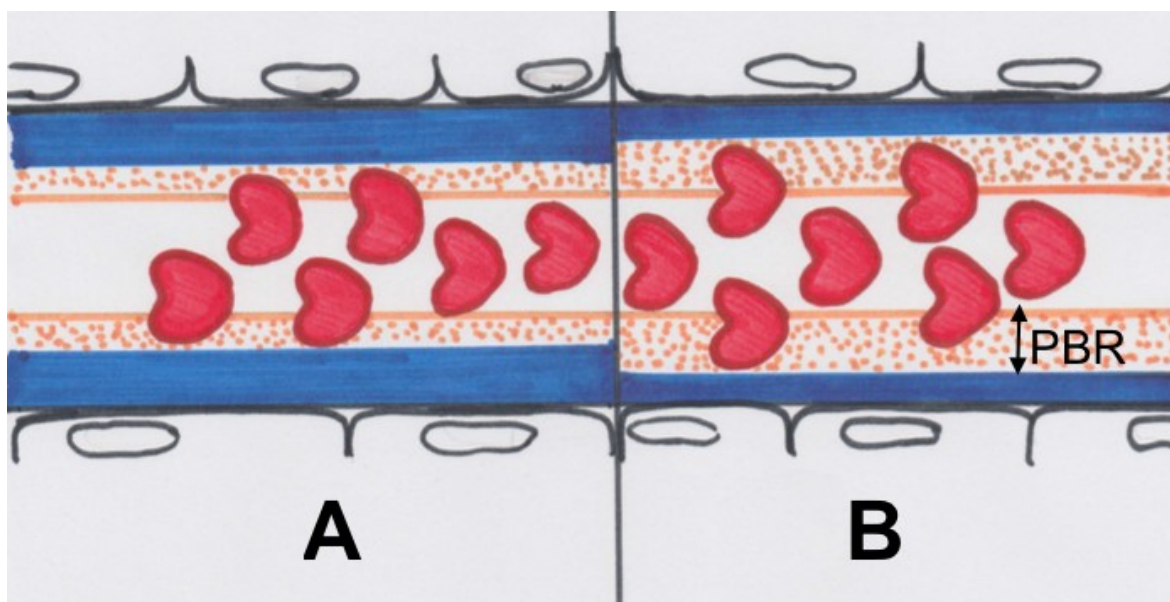
#### 6.1.2 Praktické získání reprezentativního vzorku

Praktický sběr reprezentativních vzorků se lišil u pacientů při vědomí a pacientů ve farmakologicky navozeném bezvědomí (anestezie na operačním sále, sedace na lůžku intenzivní péče). Spolupracující pacienti byli nejprve požádáni, aby vypili několik doušek čiré tekutiny a důsledně polkly obsah dutiny ústní. Následně jim v poloze v sedě byla přiložena SDF mikrokamera do dutiny ústní tak, že její špička směřovala sublinguálně laterálně. Pokud nebylo dosaženo dostatečně kvalitního obrazu, byl pacient požádán, aby stočil jazyk směrem vzhůru, poté byl kamera přiložena na kaudální část jeho spodní sliznice. Následně druhé měření proběhlo na protilehlé straně, vždy bylo získáno jedno měření vlevo a jedno vpravo.

U pacientů v bezvědomí na jednotce intenzivní péče byl získáván obraz stejnou metodikou, pouze volní spolupráce byla ze zřejmých důvodů vyloučena. Pokud z nějakého důvodu (poloha tracheální rourky apod.) nebylo možné získat reprezentativní vzorek ze dvou stranových oblastí sublinguální sliznice, spokojili jsme se s jedním vzorkem u jednoho pacienta. Skupina pacientů anestetizovaných tvořila zvláštní skupiny vzhledem k faktu, že všichni byli operováni v poloze vleže. Vzorek byl získán tak, že byl hrot mikrokamery zasouván do dutiny ústní podél tracheální rourky pacienta, následně mírným sklopením byl získán reprezentativní vzorek. Ukázalo se, že takto získat optimální zobrazení bylo dokonce jednodušší. Další výhodou jsme spatřovali v tom, že pokud jsme u pacientů měřili kvalitu EG ve více časových bodech, většinou bylo možné ponechat mikrokameru *in situ* a tím eliminovat případnou rozdílnost kvality sublinguální cirkulace v různých místech dutiny ústní. Vždy v každém časovém bodě jsme získávali dvě měření, jejichž výsledky jsme průměrovali.

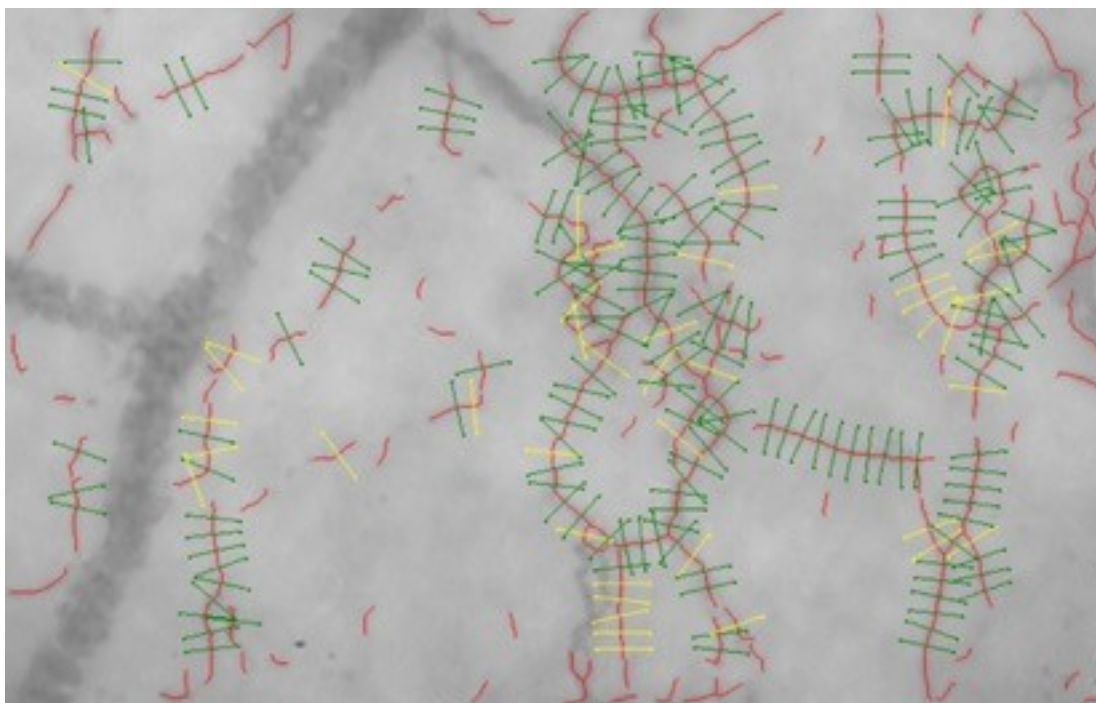
#### 6.1.3 Zpracování obrazu pomocí software

Pro zpracování obrazu byl využit software Glykocheck. Detekuje laterální odchylku pohybu červených krvinek od středu kapiláry a numericky ji vyjadřuje jako parametr Perfused boundary region (PBR), jednotkou jsou mikrometry (Obrázek č.1).



Obrázek 1 - Schéma významu PBR v perfundované kapiláře. (A) – normální EG. (B) – ztenčená EG. Modře výplň – EG. Oranžové tečkovaně – PBR. Při ztenčující se vrstvě EG migrují erytrocyty laterálně od střední čáry, hodnota PBR roste (černá šipka). Volně zpracováno dle [Rovas et al. 2018]

Čím je vrstva EG tenčí při jeho poškození, tím se mohou erythrocyty dostávat blíže k lumenální straně endotelu a v tomto případě tedy hodnota PBR roste. Metoda hodnocení PBR byla použita ve více publikacích<sup>47,48,49</sup>. Hodnocení mikrocirkulace softwarem je poněkud složitější, protože nejde o hodnocení jedné izolované kapiláry. Ve zkratce: v první řadě software detekuje všechny hodnotitelné kapiláry v obraze – ty o průměru menším než 30  $\mu\text{m}$ . Poté každou kapiláru rozdělí longitudinálně na úseky dlouhé 10  $\mu\text{m}$  (obrázek č.2). Pro správné vyhodnocení je třeba získat alespoň 3000 takových segmentů, rychlost závisí na množství perfundovaných kapilár a také kvalitě obrazu. Následně proběhne nové zhodnocení kvality jednotlivých segmentů. Pokud jsou segmenty shledány kvalitními, postupuje se k analýze pozice erythrocytu uvnitř kapiláry – kalkuluje se kumulativní distribuce. Následně lineární regresí vznikne zprůměrovaný graf distribuce erythrocytů a šířky jejich sloupce v kapiláře – z něj lze odečíst hodnotu PBR. V praxi je uživatelské rozhraní velmi zjednodušené a software pouze informuje uživatele o kvalitě měření (počet validních úseků), následně po zpracování dat udává konkrétní hodnotu PBR.



*Obrázek 2 – Analýza kapilár softwarem GlykoCheck*

## 6.2. Stanovení makrohemodynamiky

Ačkoli naším primárním cílem bylo stanovení poškození EG různými intervencemi, snažili jsme se monitoraci subjektů rozšířit o dostupné stanovení makrohemodynamiky. Toto vedlo k přesnění představy o chování intravenózní bolusu tekutiny v časové ose po podání a zároveň bylo možno dále posuzovat vztah makro a mikrohemodynamiky – hemodynamickou koherenci.

Z etických a technických důvodů byl rozsah monitorace makrohemodynamických parametrů mezi skupinami rozdílný. U pacientů podstupujících operaci páteře, kterým byl EG hodnocen periprocedurálně, bylo vedle standartních parametrů (krevní tlak, puls) měřen parametr PVI (Pleth variability index) přístrojem Masimo (Masimo Corporation, Irvine, USA), a to hlavně vzhledem k jeho neinvazivitě a dobré kvalitě zhodnocení reakce na podání tekutiny. U pacientů na jednotce intenzivní péče byla použita již zavedená invazivní monitorace hemodynamiky kalibrovanou termodiluční metodou (PiCCO, Gentinge, Sweden) – takto byla maximalizována možnost detailně posoudit změny makrohemodynamiky po podání intravaskulárního bolusu tekutin, bohužel tito pacienti v našem výzkumu tvořili nejmenší kohortu. Cílem bylo mít u obou skupin možnost posoudit reakci na podání intravenózní tekutiny z hlediska konceptu tekutinové reaktivity. Tento koncept je v současné době široce přijatý<sup>50</sup> a zdá se, že identifikuje jedinou správnou indikaci podání intravenózní tekutiny. To je za situace, kdy krevní oběh po podání tekutiny reaguje zvýšením předtížení myokardu, což na vzestupné části Frank-Starlingovy křivky vede ke zvýšení srdečního výdeje. Pokud po infuzi tekutiny k tomuto nedochází, nemá její podání význam a naopak může vést k oběhovému přetížení se všemi negativními důsledky<sup>51</sup>.

## 6.3 Protokoly studií, experimentální skupiny, randomizace

Proběhlé studie jsme pro účely disertační práce označili takto, pod příslušným číslem jsou uvedeny *in extenso* jako přílohy.

**Studie I** – Podání bolusu 500ml fyziologického roztoku nevede k bezprostřednímu poškození endoteliální glykokalyx stanovitelnému hodnocením sublingvální mikrocirkulace. (Plné znění práce viz příloha č.1)



**Studie II** – Impact of Intravenous Fluid Challenge Infusion Time on Macrocirculation and Endothelial Glycocalyx in Surgical and Critically Ill Patients. (Plné znění práce viz příloha č.2)

**Studie III** – Neuraxial Anesthesia Reduces Endothelial Glycocalyx Injury In Adult Patients Undergoing Elective Hip Or Knee Replacement – a Prospective Observational Study. (Plné znění práce viz příloha č.3)

#### 6.3.1 Studie I

Cílem této prospektivní observační studie bylo ověřit, zda citlivost měřeného parametru PBR může zhodnotit změny EG ihned po podání bolusu fyziologického roztoku (FR) zdravým dobrovolníkům. Všem dobrovolníkům byla změřena hodnota PBR na dvou místech sublinguální oblasti a tyto hodnoty byly zprůměrovány, zároveň byly zaznamenány základní hemodynamické veličiny (krevní tlak, puls) v úvodu. Následně byla podána velmi rychlá infuze 500ml FR. Ihned po aplikaci bylo zopakováno měření PBR a základních hemodynamických veličin. Cílem bylo získat data, zdali dochází takto časně k poškození EG detekovatelnému touto metodou.

Do studie bylo zařazeno celkem 12 zdravých dobrovolníků (výzkumný tým a studenti medicíny).

#### 6.3.2 Studie II

V této prospektivní stratifikované randomizované studii zabývající se změnami mikrocirkulace v závislosti na rychlosti podání bolusu intravenózní tekutiny jsme pracovali s dvěma kohortami pacientů. První kohorta byla tvořena pacienty podstupujícími operační výkon na bederní páteři (OR). Tyto pacienty jsme randomizovali obálkovou metodou do dvou skupin „Fast“ a „Slow“ po 25 pacientech, přičemž každý pacient obdržel právě jeden tekutinový bolus. Šlo o otevřený způsob randomizace bez zaslepení. Druhou kohortou (SEP) byly pacienti v septickém šoku léčeni na jednotce intenzivní péče. Těchto pacientů bylo celkem 16. Randomizací byly rozděleny stejně jako předchozí kohorta na skupiny „Fast“ (7 bolusů) a „Slow“ (9 bolusů). Ve skupinách „Fast“ došlo k podání 500ml balancovaného krystaloidu během 5-10 minut, zatímco ve skupinách „Slow“ to bylo během 25-30 minut.

Protokol studie byl zaměřen na sledování změn mikrocirkulace stanovených videomikroskopem s odpovídajícím software (SDF kamera, Glykocheck) a některých vybraných hemodynamických parametrů v závislosti na rychlosti podání tekutinového bolusu u pacientů, kteří vykazovali známky akutní hypovolémie. Po podání tekutinového bolusu 5ml/kg predikované váhy bylo stanoveno několik časových bodů, ve kterých jsme stanovovali hodnotu PBR a ostatní hemodynamické parametry. Tyto časové body se lišily v obou kohortách – u *OR* pacientů byly stanovovány před podáním, ihned po podání a dále ve 20minutových intervalech do konce operačního výkonu (případně maximálně 5 krát). U *SEP* pacientů byly časové body určeny před podáním, ihned po podání, za 60 a 120 minut po podání. Výhodou tohoto schématu byl fakt, že časový bod 60 minut po podání byl totožný v obou kohortách a umožnil tedy společnou analýzu kohort. Vedle podání tekutiny u pacientů probíhala standartní léčba, ať už zvykle vedená doplňovaná celková anestezie u *OR* či odpovídající léčba sepse u *SEP*. V případě nutnosti podat další množství tekutiny krom udržovací infuze (např. v situaci akutního krvácení), případně změnit dávky léků ovlivňujících hemodynamiku, bylo toto vždy zaznamenáno a získaná data vyloučena z analýzy. Primární cíl studie bylo posoudit změnu PBR u jednotlivých skupin pacientů. Sekundárním cílem bylo posoudit změny makrohemodynamických parametrů ve vztahu k podání tekutiny (pozitivní tekutinová odpověď), na základě této informace rozdělit pacienty obou kohort na *FR* (fluidresponders) a *NR* (nonresponders) a analyzovat změny PBR v těchto podskupinách, s cílem získat informaci o dodržení či ztrátě hemodynamické koherence. Reaktivita na tekutinu byla arbitrárně definována jako nárůst srdečního výdeje o nejméně 15% a/nebo pokles PVI o 5 a více procent.

#### 6.4.3. Studie III

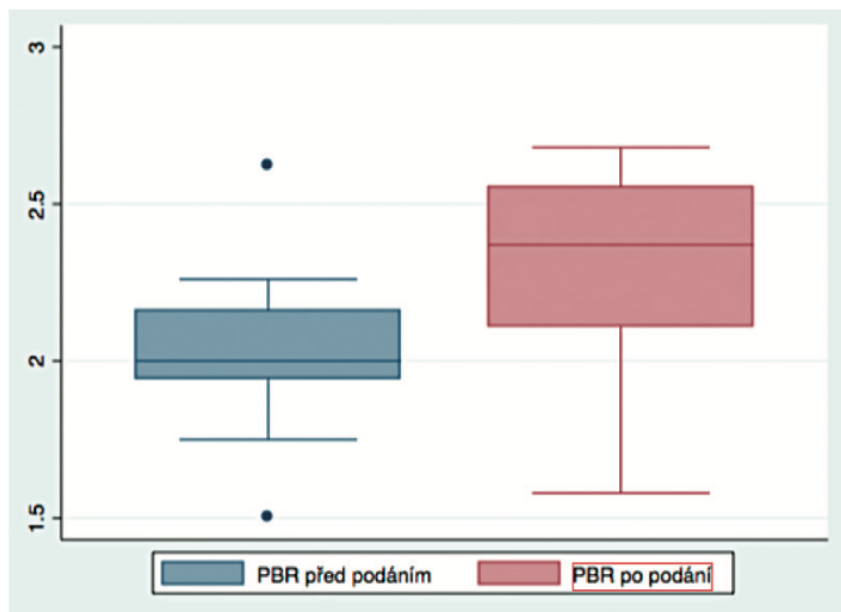
Tato práce se zabývala ovlivněním EG v závislosti na způsobu podání anestezie (celková vs. regionální) u operací alopplastik dolních končetin. Celkem bylo zařazeno 60 pacientů, 30 v každé skupině. Šlo o prospektivní observační studii bez potřeby randomizace.

Změna EG byla opět stanovována parametrem PBR. Příslušný examinator navštívil pacienta jeden den před plánovaným ortopedickým výkonem, kdy naměřil dva validní vzorky sublinguální cirkulace. Druhé měření proběhlo přibližně za 2 hodiny po chirurgickém výkonu, většinou v prostředí jednotky intenzivní péče (JIP). Primárním cílem studie byla změna PBR před a po operačním výkonu v závislosti na způsobu anestezie.

## 7 SOUHRN NEJDŮLEŽITĚJŠÍCH VÝSLEDKŮ A DISKUZE

### 7.1 Studie I

Po podání tekutinového bolusu 500ml fyziologického roztoku nedošlo k signifikatnímu zvýšení hodnoty PBR, jakkoli byl pozorovatelný trend k nárůstu hodnoty (graf č.1). Po podání tekutinového bolusu se signifikantně snížila srdeční frekvence. Hodnoty krevního tlaku se signifikantně nelišily před a po podání tekutiny. Všechny pozorované výsledky jsou dostupné v *in extenso* publikaci – příloha 1.



Graf 1 – PBR hodnoty před podáním a po podání tekutiny. PBR – perfused boundary region

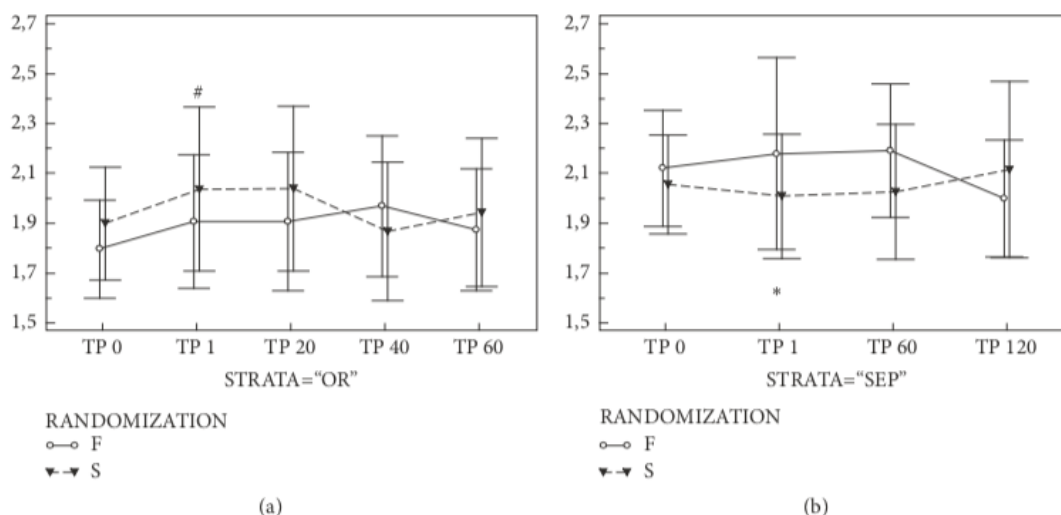
### Diskuze

Důvodů, proč se nepodařilo prokázat zvýšení hodnoty PBR na našem vzorku může být několik. Zprvte tekutinovou výzvu jsme se rozhodli podávat v co nejrychlejší čas (u všech dobrovolníků méně než 10 min), což bylo následováno měřením PBR. Z dostupných literárních údajů nelze stanovit rychlost nástupu poškození EG, tudíž by mohlo být v prvních minutách podhodnoceno. Význam fyziologického roztoku je v současné době upozaděn balancovanými roztoky, které mají lepší výsledky na léčbu<sup>52</sup>. Jeho potenciál na poškození EG se zdá také poněkud větší – tranzientní nebo kumulativní hypernatrémie může přesahovat pufrovací schopnost EG na  $\text{Na}^+$  ionty, což je následováno konformačními změnami heparansulfátu EG<sup>53</sup>.

Použitá metoda stanovení poškození EG pomocí PBR má své limitace (tyto jsou společné a platné pro všechny tři studie). Stanovuje integritu EG pouze nepřímou. Ačkoliv je výpočet automatický, nelze vyloučit vliv techniky měření příslušného vzorku. Automatická analýza není bezvýhradně přijata v doporučených postupech. Bohužel jiný způsob stanovení EG (např. humorální rozpadové produkty) nebyl dostupný. Zároveň nebylo možné získat kontrolní vzorek s větším odstupem od experimentu. Poslední limitací byla velikost skupiny, která vylučovala prokázání malého efektu na EG, přičemž očekávaný efekt nebyl řádově větší než je populační variabilita.

## 7.2 Studie II

V celkové populaci byla vstupní hodnota PBR u obou skupin, tedy *Fast* and *Slow*, porovnatelná. Podání tekutinového bolusu vedlo ke statisticky signifikantnímu navýšení hodnoty PBR u populace všech zařazených pacientů a zároveň odděleně u obou kohort. Zvýšená hodnota PBR přetrvávala také v časovém bodě 60 minut po aplikaci tekutiny. V rámci další analýzy jsme zjišťovali změny mezi kohortami *SEP* a *OR*. U kohorty *SEP* byly vstupní hodnoty PBR signifikantně vyšší. U pacientů *OR* bylo podáním tekutinového bolusu dosaženo zvýšení PBR, zatímco u *SEP* byly hodnoty PBR po podání tekutiny stacionární (graf č.2).



Graf 2 – Změny PBR po podání tekutinového bolusu. (a) kohorta OR. (b) kohorta SEP. TP 0, 1, 20, 40, 60, 120 – jednotlivé časové body před bolusem, ihned po bolusu, v čase 20, 40, 60 a 120 minut po podání bolusu. PBR- perfused boundary region

V rámci sekundární analýzy bylo zhodnoceno procento pozitivních tekutinových výzev v celé populaci nemocných – těch bylo 49%, prakticky rovnoměrně rozdělených v obou kohortách. Zároveň nebyl rozdíl v množství pacientů s pozitivní reakcí na podání tekutiny (responderů) v závislosti na zařazení do skupiny *Fast* nebo *Slow*. Dále jsme hodnotily hemodynamické změny – po podání tekutiny v rychlém režimu se významně zvýšila hodnota krevního tlaku, což nebylo pozorováno ve skupině *Slow*. Tento efekt ve skupině *Fast* vymizel do časového bodu 60 minut po aplikaci. V rámci kohorty *SEP* se lepší makrohemodynamický efekt rychlého podání tekutiny odrazil ve snížení dávky vazopresoru. Při analýze mikrocirkulace u skupin *FR* a *NR* byly vstupní hodnoty PBR bez významného rozdílu. U *FR* pacientů po podání tekutiny došlo k navýšení hodnoty PBR, zatímco u *NR* zůstala stacionární. *FR* měli před podáním bolusu tekutiny vyšší hodnoty dynamických prediktorů tekutinové reaktivity (pulse pressure variation, stroke volume variation), přičemž statické hemodynamické hodnoty se mezi skupinami *FR* a *NR* nelišily. Všechny pozorované výsledky jsou dostupné v *in extenso* publikaci – příloha 2.

#### **Diskuze:**

Studie ukázala, že podání tekutinového bolusu balancovaného krystaloidu vede ke zvýšení hodnoty PBR a tedy ke ztenčení vrstvy EG. Toto poškození v zásadě není rozdílné, pokud podáváme tekutinu velmi rychle (5-10min) anebo pomaleji (25-30min). Hodnoty PBR se vracejí k normálu do 60 minut od ukončení aplikace. Jednou z limitací je zajisté fakt, že poškození EG bylo stanovováno pouze jednou z metod. V literatuře je tento efekt zdokumentován také za pomoci humorálních markerů degradace EG<sup>28,54,55</sup>. Poměrně důležitým nálezem byl rozdíl hodnot PBR vstupně u pacientů jinak zdravých (*OR*) a v sepsi (*SEP*), to potvrzuje nálezy poškození EG v sepsi<sup>56</sup>. Toto potažmo zvyšuje legitimitu klinického požadavku na monitoraci mikrocirkulace a/nebo PBR k posouzení míry poškození. Na druhou stranu je nutno uvést, že nejvyšší nárůst PBR v našem experimentu byl 8%, přičemž uváděná variabilita v populaci pod 10%<sup>57</sup>. U septických nemocných dochází k výraznému zvýšení hodnot PBR u *FR*. Tento fakt by mohl naznačovat komplexnější patofyziologický mechanismus – ačkoli jde o pouhou hypotézu, je možné uvažovat, že toto zvýšení je na vrub prokrvení dosud neperfundovaných kapilár a lokální I/R. Z jiného úhlu pohledu by právě tento efekt mohl být zodpovědný na ztrátu hemodynamické koherence. Znovu je nutno uvést, že jde o hypotézy čekající na přesvědčivé klinické důkazy.

V naší práci nevedla rychlost bolusového podání tekutiny ke zvýšení počtu *FR*, jejich poměr k *NR* je mezi skupinami stejný. Výjimkou byla reakce krevního tlaku u chirurgických pacientů, kdy rozdíl v rychlosti podání tekutiny byl významný – jeho hodnota se dočasně zvedla signifikantně po podání pouze rychlého tekutinového bolusu. Tento efekt byl ale pouze dočasný. Zajímavostí a zároveň i z literatury doloženým faktem je skutečnost, že ačkoli byl protokol navržen na podání tekutiny pouze při klinických známkách tekutinové reaktivity, 51% pacientů na podání tekutiny nereagovalo zlepšením makrohemodynamických parametrů. Hernandez v recentní práci uvádí podobné procento<sup>58</sup>. V našem případě tedy více než polovina pacientů dostala tekutinu neindikovaně. Navíc, u této skupiny *NR* se po podání tekutinového bolusu zvýšila hodnota *PBR*. Jde tedy o ztrátu hemodynamické koherence, kdy přestože makroparametry zůstávají stejné, kvalita mikrocirkulace se zhoršuje.

Studie měla několik limitací. Jednou z nich byl fakt, že u skupiny *OR* jsme tekutinovou reaktivitu stanovovali parametrem *PVI*. Pokročilejší stanovení hemodynamiky jsme v tomto případě nepoužili vzhledem k jeho vyšší invazivitě, v této skupině byli zařazeni pacienti v dobrém fyzickém stavu, podstupovali standardní chirurgický výkon – proto jsme je nechtěli vystavovat vyššímu riziku komplikací při užití invazivnějšího monitoru. Další limitací je skutečnost, že pacienti *OR* byly indikovány ke specifické chirurgii – páteřní výkon v poloze na břiše – zdali jsou výsledky zcela přenositelné do ostatních chirurgických populací (hrudní, cévní chirurgie apod.) není známo. Posledním limitem je nízký počet pacientů zařazených do skupiny *SEP*. Bohužel v době, kdy byl k dispozici měřicí přístroj, neměli jsme možnost na našem pracovišti zařadit více nemocných s diagnózou septický šok.

### 7.3 Studie III

Z výsledků práce plyne, že elektivní náhrada kyčelního nebo kolenního kloubu vede v obou případech k zvýšení hodnoty PBR. V celkové anestezii je po výkonu hodnota PBR signifikantně vyšší než v anestezii svodné. (tabulka č.1). Všechny pozorované výsledky jsou dostupné v *in extenso* publikaci – příloha 3.

PBR [ $\mu\text{m}$ ]	Celková anestezie	Svodná anestezie	p
Před výkonem	2,02 (0,26)	1,95 (0,24)	0,098
Po výkonu	2,20 (0,25)	2,09 (0,19)	0,006
p	<0,001	<0,001	

Tabulka 1. PBR – perfused boundary region

### Diskuze

Mnoho prací zabývajících se změnami EG u chirurgických nemocných uvádí zhoršené parametry EG u pacientů po chirurgickém zákroku ve srovnání před zákrokem.<sup>59,20,60</sup> Mezi patofyziologické mechanismy jsou uvažovány ty obdobné u pacientů s traumatem. Kontrolní skupiny, kdy by byla pacientům podávána anestezie bez chirurgického výkonu a zároveň stanovován její vliv na EG dosud nebyly provedeny. Volba optimálního znecitlivění pro velké ortopedické výkony na dolních končetinách je dosud nezodpovězenou otázkou, ačkoli v poslední době přibývají sdělení mírně favorizující svodné techniky<sup>61</sup>. Můžeme spekulovat o vlivech, které vedli v naší studii k lepším výsledkům svodné anestezie s ohledem na vliv na EG: jsou lépe zablokovány eferentní signály z operovaného místa, což vede k nižší sympatické aktivaci (faktor pravidelně uváděný u endotelinopatie traumatu – viz výše), nepodávání intravenózních anestetik, které modulují vaskulární tonus; nelze ale vyloučit ani vliv dalších (dosud neobjasněných) mechanismů – např. vliv napojení na umělou plicní ventilaci, užití jiných farmak spojených s podáním anestezie (svalová relaxancia, analgetika) jejichž vliv na EG dosud nebyl studován. Tato studie měla několik limitací. EG mohl být poškozován jinými faktory než samotným výběrem anestezie – druh, množství a charakter podaných tekutin, předoperačním lačněním, způsobem rekonvalescence po výkonu, kde jsou drobné rozdíly podle způsobu anestezie (diuréza, vertikalizace, bolestivost).

## 8 SOUHRN NEJDŮLEŽITĚJŠÍCH POZNÁNÍ, ZÁVĚRY PRO PRAXI

Během naší výzkumné práce na téma Endoteliální glykokalyx – možnosti diagnostiky a intervence jsme získali mnoho cenných poznatků aplikovatelných do každodenní klinické péče.

Teoreticky jde především o náhled do komplexní fyziologie kapilárního řečiště, kdy stará paradigmatata (Starlingův princip) byla nahrazena novými. To je jeden z důvodů, jak zpřesnit indikace podávání objemových náhrad. Nyní se zdá teoreticky dobře vysvětlitelný různý objemový efekt koloidů a krystaloidů, kdy v situaci intaktní EG (např. izolované bodné trauma) je objemový efekt koloidů výraznější<sup>62</sup>, kdežto při poškození EG (sepsy) je tento rozdíl nepatrný. Tedy podávání koloidních roztoků v sepsi nemá význam, oproti roztokům krystaloidním je pouze zatíženo větším množstvím nežádoucích účinků. Podávání krystaloidů při poškozené EG je spojeno s vyšším rizikem vzniku hypervolémie, s extravazací a následným tkáňovým edémem zvyšujícím difúzní vzdálenost a tedy snižujícím dodávku kyslíku k buňkám. Zvrátit tento stav zvýšením koloidního tlaku plasmy (např. roztoky albuminu) není možné, nárůst koloidního tlaku uvnitř kapiláry neumožňuje zvýšit míru reabsorbce tekutiny. Tekutinová léčba je každodenní součástí léčby nemocných v kritických stavech a každé zpřesnění jejího užití vede nepochybně k lepším výsledkům pacientů.

Vlastní měření EG pomocí SDF se pro svoji rychlost, částečnou automatizovatelnost, nižší míru závislosti na osobě examinátora a možnost provádět ji bedside jeví do budoucna jako dobře použitelné, za předpokladu jeho dalšího zpřesnění. V současné době je problematická jeho nižší diskriminační hodnota mezi různými patologickými stavy, kdy se často dostáváme do hodnot v mezích populační variability. Na základě nemnohých literárních údajů nelze rozhodnout, zdali je použitelné u všech pacientů u všech patologických stavů. Hodnotí pouze sublinguální mikrocirkulaci, přičemž zatím nemáme výsledky, které by hodnotily vztah mikrocirkulace sublinguální a kapilárních řečišť vitálních orgánů. Pokud v sublinguální mikrocirkulaci nedošlo k poškození EG, nemáme jistotu, že k tomuto nedošlo v jiných, komplexnějších kapilárních řečištích (např. v ledvině). Budoucnost ukáže, zdali ke klinickému hodnocení mikrocirkulačních parametrů a především funkcí a integrity EG se stane metoda videomikroskopie metodou první volby, či ji nahradí jiné, např. dosud nepopsané humorální markery. V každém případě již dnes si dovolíme tvrdit, že stanovení mikrocirkulace bude v budoucnu rutinním opatřením u



pacientů v kritických stavech. Ince hovoří o tzv. hemodynamické koherenci, což je koncept dosud ne pevně mezi kliniky zavedený, nicméně do budoucna dle našeho soudu extrémně využitelný. Dnešní medicína kritických stavů se snaží o individualizaci všech léčebných parametrů včetně makrohemodynamiky. Přesto při její optimalizaci jsou výsledky pacientů různé a ne u všech platí, že „zlepšení“ konkrétního makroparametru vede k nižší morbiditě<sup>63</sup>. Tím, co rozhoduje o efektivitě léčby může být integrita mikrocirkulačních pochodů včetně kvality EG při ztrátě hemodynamické koherence. Léčba kritických stavů s důrazem na optimalizaci validních cílových parametrů mikrocirkulace se může v budoucnu ukázat jako lepší než stávající postupy zaměřené na parametry makrocirkulace. Přestože si uvědomujeme, o jak odvážné tvrzení se jedná, je přesto založeno na konkrétní premise – totiž že krevní oběh slouží primárně k dodávce kyslíku do tkání na úrovni mikrocirkulace. Tuto hypotézu částečně potvrzuje nedávno publikovaná Hernandezova práce, kdy sledování klinicky zhodnotitelných parametrů mikrocirkulace (kapilární návrat atd.) vedlo ke stejným nebo dokonce lepším výsledkům než stávající léčba zaměřená na sérové hladiny laktátu a makrohemodynamické parametry<sup>58</sup>.

Zajímavým výsledkem bylo hodnocení nemocných zařazených do Studie I z hlediska reakce jejich krevního oběhu na podání bolusu intravenózní tekutiny. Jako v ostatních pracech<sup>58</sup> se ukázalo, že i přes maximální snahu indikovat podání intravenózní tekutiny přesně (tedy s cílem u většiny pacientů zvýšit preload a následně srdeční výdej), je poměr těchto pacientů kolem 50%. Podle současných znalostí až na výjimky (korekce vnitřního prostředí apod.) ale nemá smysl tekutinu podávat, pokud ke zvýšení srdečního výdeje po jejím podání nedojde. V tomto případě je při znalosti nežádoucích účinků volumoterapie (především hypervolémie s vlivem na funkci některých orgánů – ledviny, plíce aj.) intravenózní tekutina kontraindikována. Sami jsme se přesvědčili, že koncept tekutinové reaktivity (a s tím související goal-directed therapy, GDT), ačkoli teoreticky jistě správný a literárně nadmíru podložený, v rutinní praxi selhává a bude nutné jeho aplikaci výrazně zpřesnit – například cíleným využitím mikrocirkulačních parametrů.

Na základě výsledků třetí studie zůstává otázkou, zdali jsme v současné době schopni zvolit typ anestezie k chirurgickým výkonům na základě jejího vztahu k mikrocirkulaci a EG. V tomto okamžiku spíše nikoli. Zaprvé dosud není dostatek literárních údajů ospravedlňujících takový přístup a zadruhé je volba anestezie natolik komplexní rozhodnutí, že není možné takto akcentovat jedno konkrétní hledisko. V budoucnu, pokud přibudou literární důkazy, vidíme spíše možnost potencovat či stabilizovat funkci EG pomocí tzv.

preconditioningu například použitím volatilních anestetik nebo jiných látek s protektivním vlivem na EG.

9 PODPORA- grant

Práce byla podpořena grantem AV ČR reg.číslo 15-31881A s hodnocením A.

Práce byla podpořena programem rozvoje UK P36 Prvouk

Práce byla podpořena programem UK Q39 Progres

## 10 SOUPIS CITACÍ

1. Luft JH. Fine structures of capillary and endocapillary layer as revealed by ruthenium red. *Fed Proc.* 1966;25(6):1773-1783. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5927412>.
2. Chappell D, Jacob M, Hofmann-Kiefer K, Conzen P, Rehm M. A Rational Approach to Perioperative Fluid Management. *Anesthesiology.* 2008;109(4):723-740. doi:10.1097/ALN.0b013e3181863117
3. Reitsma S, Slaaf DW, Vink H, Van Zandvoort MAMJ, Oude Egbrink MGA. The endothelial glycocalyx: Composition, functions, and visualization. *Pflugers Arch Eur J Physiol.* 2007;454(3):345-359. doi:10.1007/s00424-007-0212-8
4. Reitsma S, oude Egbrink M, Heijnen V, et al. Endothelial glycocalyx thickness and platelet-vessel wall interactions during atherogenesis. *Thromb Haemost.* 2011;106(11):939-946. doi:10.1160/TH11-02-0133
5. Ince C, Boerma EC, Cecconi M, 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. doi:10.1007/s00134-018-5070-7
6. AIRD WC. Spatial and temporal dynamics of the endothelium. *J Thromb Haemost.* 2005;3(7):1392-1406. doi:10.1111/j.1538-7836.2005.01328.x
7. Klitzman B, Duling BR. Microvascular hematocrit and red cell flow in resting and contracting striated muscle. *Am J Physiol Circ Physiol.* 1979;237(4):H481-H490. doi:10.1152/ajpheart.1979.237.4.H481
8. Megens RTA, Reitsma S, Schiffers PHM, et al. Two-Photon Microscopy of Vital Murine Elastic and Muscular Arteries. *J Vasc Res.* 2007;44(2):87-98. doi:10.1159/000098259
9. Starling EH. On the Absorption of Fluids from the Connective Tissue Spaces. *J Physiol.* 1896;19(4):312-326. doi:10.1113/jphysiol.1896.sp000596
10. Adamson RH, Lenz JF, Zhang X, Adamson GN, Weinbaum S, Curry FE. Oncotic pressures opposing filtration across non-fenestrated rat microvessels. *J Physiol.* 2004;557(Pt 3):889-907. doi:10.1113/jphysiol.2003.058255
11. JACOB M, BRUEGGER D, REHM M, et al. The endothelial glycocalyx affords compatibility of Starling's principle and high cardiac interstitial albumin levels. *Cardiovasc Res.* 2007;73(3):575-586. doi:10.1016/j.cardiores.2006.11.021
12. 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(3):384-394. doi:10.1093/bja/aer515
13. 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(10):e136-42. doi:10.1161/01.RES.0000101744.47866.D5
  14. Tarbell JM, Pahakis MY. Mechanotransduction and the glycocalyx. In: *Journal of Internal Medicine.* Vol 259. ; 2006:339-350. doi:10.1111/j.1365-2796.2006.01620.x
  15. Henderson-Toth CE, Jahnsen ED, Jamarani R, Al-Roubaie S, Jones EAV. The glycocalyx is present as soon as blood flow is initiated and is required for normal vascular development. *Dev Biol.* 2012;369(2):330-339. doi:10.1016/j.ydbio.2012.07.009
  16. Cerny V, Astapenko D, Burkovskiy I, et al. Glycocalyx in vivo measurement. Jünger M, Krüger-Genge A, Jung F, eds. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2017;67(3-4):1-5. doi:10.3233/CH-179235
  17. Egbrink MGO, Van Gestel MA, Broeders MAW, et al. Regulation of microvascular thromboembolism in vivo. *Microcirculation.* 12(3):287-300. doi:10.1080/10739680590925628
  18. Li Q, Bolli R, Qiu Y, Tang XL, Guo Y, French BA. Gene therapy with extracellular superoxide dismutase protects conscious rabbits against myocardial infarction. *Circulation.* 2001;103(14):1893-1898. doi:10.1161/01.cir.103.14.1893
  19. Fraser JR, Laurent TC, Pertoft H, Baxter E. Plasma clearance, tissue distribution and metabolism of hyaluronic acid injected intravenously in the rabbit. *Biochem J.* 1981;200(2):415-424. doi:10.1042/bj2000415
  20. Svennevig K, Hoel T, Thiara A, et al. Syndecan-1 plasma levels during coronary artery bypass surgery with and without cardiopulmonary bypass. *Perfusion.* 2008;23(3):165-171. doi:10.1177/0267659108098215
  21. Johansson PI, Stensballe J, Ostrowski SR. Shock induced endotheliopathy (SHINE) in acute critical illness - a unifying pathophysiologic mechanism. *Crit Care.* 2017;21(1):25. doi:10.1186/s13054-017-1605-5
  22. Johansson PI, Henriksen HH, Stensballe J, et al. Traumatic Endotheliopathy: A Prospective Observational Study of 424 Severely Injured Patients. *Ann Surg.* 2017;265(3):597-603. doi:10.1097/SLA.0000000000001751
  23. Ostrowski SR, Johansson PI. Endothelial glycocalyx degradation induces endogenous heparinization in patients with severe injury and early traumatic coagulopathy. *J Trauma Acute Care Surg.* 2012;73(1):60-66. doi:10.1097/TA.0b013e31825b5c10
  24. Kolářová H, Ambrůzová B, Svihálková Šindlerová L, Klinke A, Kubala L. Modulation of endothelial glycocalyx structure under inflammatory conditions.

- Mediators Inflamm.* 2014;2014:694312. doi:10.1155/2014/694312
25. Rehm M, Bruegger D, Christ F, et al. Shedding of the endothelial glycocalyx in patients undergoing major vascular surgery with global and regional ischemia. *Circulation.* 2007;116(17):1896-1906. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.684852
  26. Ostrowski SR, Pedersen SH, Jensen JS, Mogelvang R, Johansson PI. Acute myocardial infarction is associated with endothelial glycocalyx and cell damage and a parallel increase in circulating catecholamines. *Crit Care.* 2013;17(1):R32. doi:10.1186/cc12532
  27. Johansen M, Johansson P, Ostrowski S, et al. Profound Endothelial Damage Predicts Impending Organ Failure and Death in Sepsis. *Semin Thromb Hemost.* 2015;41(01):016-025. doi:10.1055/s-0034-1398377
  28. Chappell D, Bruegger D, Potzel J, et al. Hypervolemia increases release of atrial natriuretic peptide and shedding of the endothelial glycocalyx. *Crit Care.* 2014;18(5):1-8. doi:10.1186/s13054-014-0538-5
  29. van Wijk XM, Lawrence R, Thijssen VL, et al. A common sugar-nucleotide-mediated mechanism of inhibition of (glycosamino)glycan biosynthesis, as evidenced by 6F-GalNAc (Ac3). *FASEB J.* 2015;29(7):2993-3002. doi:10.1096/fj.14-264226
  30. Chappell D, Jacob M, Hofmann-Kiefer K, et al. Hydrocortisone Preserves the Vascular Barrier by Protecting the Endothelial Glycocalyx. *Anesthesiology.* 2007;107(5):776-784. doi:10.1097/01.anes.0000286984.39328.96
  31. Chappell D, Jacob M, Hofmann-Kiefer K, et al. Antithrombin reduces shedding of the endothelial glycocalyx following ischaemia/reperfusion. *Cardiovasc Res.* 2009;83(2):388-396. doi:10.1093/cvr/cvp097
  32. Chappell D, Hofmann-Kiefer K, Jacob M, et al. TNF- $\alpha$  induced shedding of the endothelial glycocalyx is prevented by hydrocortisone and antithrombin. *Basic Res Cardiol.* 2009;104(1):78-89. doi:10.1007/s00395-008-0749-5
  33. Bruegger D, Rehm M, Jacob M, et al. Exogenous nitric oxide requires an endothelial glycocalyx to prevent postischemic coronary vascular leak in guinea pig hearts. *Crit Care.* 2008;12(3). doi:10.1186/cc6913
  34. Marechal X, Favory R, Joulin O, et al. Endothelial glycocalyx damage during endotoxemia coincides with microcirculatory dysfunction and vascular oxidative stress. *Shock.* 2008;29(5):572-576. doi:10.1097/SHK.0b013e318157e926
  35. 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(1):175. doi:10.1186/1475-2840-12-175

36. Chelazzi C, Villa G, Mancinelli P, De Gaudio AR, Adembri C. Glycocalyx and sepsis-induced alterations in vascular permeability. *Crit Care*. 2015;19(1):26. doi:10.1186/s13054-015-0741-z
37. 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*. 2016;23(1):69-74. doi:10.1111/micc.12260
38. 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(6):12092-12107. doi:10.3390/ijms160612092
39. Astapenko D, Pouska J, Benes J, et al. Neuraxial anesthesia is less harmful to the endothelial glycocalyx during elective joint surgery compared to general anesthesia<sup>1,2</sup>. *Clin Hemorheol Microcirc*. November 2018:1-11. doi:10.3233/CH-180428
40. Zeng Y, Liu X-H, Tarbell J, Fu B. Sphingosine 1-phosphate induced synthesis of glycocalyx on endothelial cells. *Exp Cell Res*. 2015;339(1):90-95. doi:10.1016/j.yexcr.2015.08.013
41. Myburgh JA, Finfer S, Bellomo R, et al. Hydroxyethyl Starch or Saline for Fluid Resuscitation in Intensive Care. *N Engl J Med*. 2012;367(20):1901-1911. doi:10.1056/NEJMoa1209759
42. Haywood-Watson RJ, Holcomb JB, Gonzalez EA, et al. Modulation of Syndecan-1 Shedding after Hemorrhagic Shock and Resuscitation. McNeil P, ed. *PLoS One*. 2011;6(8):e23530. doi:10.1371/journal.pone.0023530
43. Stensballe J, Ulrich AG, Nilsson JC, et al. Resuscitation of Endotheliopathy and Bleeding in Thoracic Aortic Dissections. *Anesth Analg*. 2018;127(4):920-927. doi:10.1213/ANE.00000000000003545
44. Arnemann P, Seidel L, Ertmer C. Haemodynamic coherence — The relevance of fluid therapy. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. 2016;30(4):419-427. doi:10.1016/j.bpa.2016.11.003
45. Mathura KR, Bouma GJ, Ince C. Abnormal microcirculation in brain tumours during surgery. *Lancet*. 2001;358(9294):1698-1699. doi:10.1016/S0140-6736(01)06722-8
46. De Backer D, Creteur J, Preiser J-C, Dubois M-J, Vincent J-L. Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166(1):98-104. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12091178>. Accessed September 3, 2019.
47. Vlahu CA, Lemkes BA, Struijk DG, Koopman MG, Krediet RT, Vink H. Damage of

- the Endothelial Glycocalyx in Dialysis Patients. *J Am Soc Nephrol.* 2012;23(11):1900-1908. doi:10.1681/ASN.2011121181
48. Martens RJH, Vink H, van Oostenbrugge RJ, Staals J. Sublingual Microvascular Glycocalyx Dimensions in Lacunar Stroke Patients. *Cerebrovasc Dis.* 2013;35(5):451-454. doi:10.1159/000348854
  49. Donati A, Damiani E, Domizi R, et al. Alteration of the sublingual microvascular glycocalyx in critically ill patients. *Microvasc Res.* 2013;90:86-89. doi:10.1016/j.mvr.2013.08.007
  50. Monnet X, Marik PE, Teboul JL. Prediction of fluid responsiveness: an update. *Ann Intensive Care.* 2016;6(1):1-11. doi:10.1186/s13613-016-0216-7
  51. Malbrain MLNG, Marik PE, Witters I, et al. Fluid overload, de-resuscitation, and outcomes in critically ill or injured patients: A systematic review with suggestions for clinical practice. *Anaesthesiol Intensive Ther.* 2014;46(5):361-380. doi:10.5603/AIT.2014.0060
  52. Semler MW, Self WH, Wanderer JP, et al. Balanced crystalloids versus saline in Critically Ill adults. *N Engl J Med.* 2018;378(9):829-839. doi:10.1056/NEJMoal711584
  53. Oberleithner H, Peters W, Kusche-Vihrog K, et al. Salt overload damages the glycocalyx sodium barrier of vascular endothelium. *Pflugers Arch Eur J Physiol.* 2011;462(4):519-528. doi:10.1007/s00424-011-0999-1
  54. 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;36:125-129. doi:10.1016/j.jcrc.2016.06.027
  55. 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(4):330-334. doi:10.1016/j.ijoa.2014.06.001
  56. Rovas A, Seidel LM, Vink H, et al. Association of sublingual microcirculation parameters and endothelial glycocalyx dimensions in resuscitated sepsis. *Crit Care.* 2019;23(1):260. doi:10.1186/s13054-019-2542-2
  57. 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(4):e12454. doi:10.1111/micc.12454
  58. Hernández G, Ospina-Tascón GA, Damiani LP, et al. Effect of a Resuscitation



- Strategy Targeting Peripheral Perfusion Status vs Serum Lactate Levels on 28-Day Mortality among Patients with Septic Shock: The ANDROMEDA-SHOCK Randomized Clinical Trial. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2019;321(7):654-664. doi:10.1001/jama.2019.0071
59. Schiefer J, Lebherz-Eichinger D, Erdoes G, et al. Alterations of endothelial glycocalyx during orthotopic liver transplantation in patients with end-stage liver disease. *Transplantation.* 2015;99(10):2118-2123. doi:10.1097/TP.0000000000000680
60. Brettner F, von Dossow V, Chappell D. The endothelial glycocalyx and perioperative lung injury. *Curr Opin Anaesthesiol.* 2017;30(1):36-41. doi:10.1097/ACO.0000000000000434
61. R.L. J, S.L. K, C.M. B, et al. Neuraxial vs general anaesthesia for total hip and total knee arthroplasty: A systematic review of comparative-effectiveness research. *Br J Anaesth.* 2016;116(2):163-176. doi:10.1093/bja/aev455 LK -
62. James MFM, Michell WL, Joubert IA, Nicol AJ, Navsaria PH, Gillespie RS. Resuscitation with hydroxyethyl starch improves renal function and lactate clearance in penetrating trauma in a randomized controlled study: the FIRST trial (Fluids in Resuscitation of Severe Trauma). *Br J Anaesth.* 2011;107(5):693-702. doi:10.1093/bja/aer229
63. Ripollés-Melchor J, Espinosa Á, Martínez-Hurtado E, et al. Perioperative goal-directed hemodynamic therapy in noncardiac surgery: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Anesth.* 2016;28:105-115. doi:10.1016/j.jclinane.2015.08.004

## 11 PŘÍLOHY

### 11.1 Příloha č.1

#### CELKOVÁ ANESTEZIE

#### PŮVODNÍ ČLÁNEK

## Podání bolusu 500 ml fyziologického roztoku nevede k bezprostřednímu poškození endoteliální glykokalyx stanovitelnému hodnocením sublingvální mikrocirkulace

Pouska J.<sup>1,2</sup>, Astapenko D.<sup>3,4</sup>, Tegl V.<sup>1,2,5</sup>, Beneš J.<sup>1,2,5</sup>, Černý V.<sup>3,4,6-9</sup>

<sup>1</sup>Klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny, Fakultní nemocnice Plzeň

<sup>2</sup>Klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny, Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova

<sup>3</sup>Klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny, Fakultní nemocnice Hradec Králové

<sup>4</sup>Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova

<sup>5</sup>Biomedicínské centrum, Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova

<sup>6</sup>Klinika anesteziologie, perioperační a intenzivní medicíny, Univerzita J. E. Purkyně, Masarykova nemocnice Ústí nad Labem

<sup>7</sup>Institut postgraduálního vzdělávání ve zdravotnictví

<sup>8</sup>Centrum pro výzkum a vývoj, Fakultní nemocnice Hradec Králové

<sup>9</sup>Dept. of Anesthesia, Pain Management and Perioperative Medicine, Dalhousie University, Halifax, Kanada

*Anest intenziv Med. 2018;29:322-327*

#### SOUHRN

**Cíl studie:** Zhodnocení podání 500 ml fyziologického roztoku zdravým dobrovolníkům na alteraci endoteliální glykokalyx pomocí perfused boundary region (PBR) parametru.

**Hypotéza:** Podání 500 ml fyziologického roztoku vede k významnému poškození endoteliální glykokalyx.

**Typ studie:** Nerandomizovaná prospektivní dvojcentrická.

**Typ pracoviště:** JIP fakultní nemocnice.

**Materiál a metoda:** Soubor tvořila skupina 12 zdravých dobrovolníků bez akutního onemocnění. Každému dobrovolníkovi byla podána infuze 500 ml fyziologického roztoku (FR). Před podáním a po podání infuze byla zaznamenána základní hemodynamická data a stanoven perfused boundary region (PBR) parametr jako marker integrity endoteliální glykokalyx. Hodnoty před podáním a po podání tekutiny byly vyhodnoceny párovým t-testem s hladinou významnosti 0,05.

**Výsledky:** Podání 500 ml fyziologického roztoku nevedlo ke statisticky významnému zvýšení hodnoty PBR ( $2,00 \pm 0,21$  vs.  $2,21 \pm 0,36$ ,  $p = 0,089$ ). Z hlediska makrohemodynamiky došlo k významnému snížení tepové frekvence.

**Závěr:** Naše studie nevedla k průkazu poškození EG stanovitelnému hodnocením PBR parametru bezprostředně po podání tekutinového bolusu 500 ml FR u zdravých dobrovolníků. Z hlediska makrohemodynamiky vedlo podání infuzního roztoku k významnému snížení tepové frekvence, jiné změny nebyly pozorovány.

#### KLÍČOVÁ SLOVA

mikrocirkulace - intravenózní infuze - endoteliální glykokalyx

#### ABSTRACT

**Pouska J., Astapenko D., Tegl V., Beneš J., Černý V.: Administration of 500 ml of normal saline does not result in immediate damage to the endothelial glycocalyx determinable by sublingual microcirculation assessment**

**Objective:** Assessment of endothelial glycocalyx alteration after infusion of 500 ml of normal saline by perfused boundary region (PBR) parameter in twelve healthy volunteers.

**Hypothesis:** Endothelial glycocalyx will be significantly altered by infusion of 500 ml of normal saline.

**Design:** Non-randomized, prospective, double-centre study.

**Settings:** Two ICUs in University Hospitals.

**Materials and methods:** Twelve healthy volunteers without acute illness were recruited. 500 ml of normal saline was infused to each participant. We collected basic haemodynamic data as well as perfused boundary region as a marker of endothelial glycocalyx integrity before and after the fluid administration. Student T-test (paired) with p-value of 0.05 was used for the statistical analysis.

**Results:** After administration of 500 ml of normal saline there was non-significant change in PBR ( $2.00 \pm 0.21$  vs.  $2.21 \pm 0.36$ ,  $p = 0.089$ ). Concerning the macrohaemodynamics, there was a significant drop in the heart rate after the infusion ( $74 \pm 10$  vs.  $68 \pm 10$ ,  $p = 0.003$ ).

**Conclusion:** Our study did not confirm alteration of the endothelial glycocalyx after intravenous administration of 500 ml of normal saline to healthy volunteers. There was a significant decrease of heart rate after the infusion but no other changes were observed.

**KEYWORDS**

microcirculation – intravenous infusion – endothelial glycocalyx

**ÚVOD**

Endoteliální glykokalyx (EG) je tenká jemná struktura tvořená makromolekulami různého biochemického charakteru a biologické povahy na povrchu endotelu. V posledních letech je uváděn její zásadní podíl na fyziologické regulaci endoteliálních funkcí, jako je aktivní polopropustný charakter membrány (známo též jako revidovaný Starlingův princip) nebo součinnost (ať už humorální, receptorová či mechanická) s koagulačním a imunitním systémem [1, 2]. V současné době je popsáno mnoho patologických nox, které mají potenciál EG poškodovat. Tento fakt pravděpodobně hraje důležitou, ne-li klíčovou roli pro patofyziologii mnoha stavů projevujících se orgánovou dysfunkcí na úrovni mikrocirkulace (např. sepse, anestezie, ischemicko-reperfuční poškození aj.) [3]. V současné době je snaha tyto noxy vyhledávat, definovat a snažit se kvantifikovat míru jejich působení na EG. Na základě literárních údajů z posledních let a z našich předchozích prací je možné se domnívat, že jednou z těchto nox potenciálně poškozujících integritu EG může být intravenózní podání tekutin, jež má své nežádoucí účinky podobně jako podání jakýchkoli jiných farmak [4]. Otázka správné indikace a výběru infuzního roztoku i s ohledem na interakci s mikrocirkulací je vysoce aktuální. Změny koncentrace sodíku v krevní plazmě (hypernatremie) vedou po navázání  $\text{Na}^+$  iontů do struktury EG k narušení makromolekul heparansulfátu, a tím ke ztenčení a malfunkci EG po podání takového roztoku [5]. V literatuře je popsáno, že rychlá intravenózní infuze náhradního roztoku způsobující být krátkodobou hypervolemii 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 [6]. Vzhledem k výše uvedenému by mělo být možné po podání rychlé infuze fyziologického roztoku (FR) zjistit a kvantifikovat poškození EG těmito mechanismy.

V současné době je několik způsobů, jak hodnotit integritu EG [7]. V reálném čase jde o metody založené na intravitální mikroskopii – v humánní fyziologii měření sublingvální cirkulace – metodou

side-stream dark field imaging (SDF). Naše pracoviště užívají tuto metodu v kombinaci s automatickým zhodnocením pomocí softwaru GlykoCheck (GlykoCheck, Maastricht, Nizozemsko). Hlavním parametrem hodnocení je hodnota perfused boundary region (PBR). Cílem naší práce bylo zhodnotit vliv intravenózně podané infuze na EG. Hypotézou naší práce bylo, že rychlé podání 500 mililitrů FR povede ke změně hodnoty PBR u zdravých dobrovolníků.

**SOUBOR A METODY**

Naše prospektivní nerandomizovaná studie probíhala ve dvou fakultních nemocnicích (FN): FN Hradec Králové a FN Plzeň, po souhlasném vyjádření etické komise. 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.

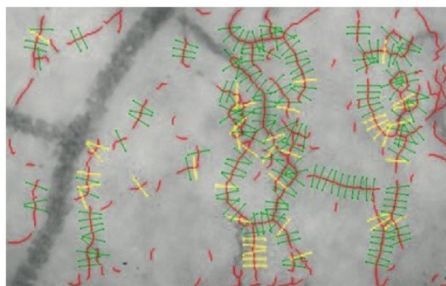
Dobrovolníkům byla zavedena intravenózní kanyla o kalibru 20 G (B. Braun, Melsungen, Německo) na horní končetině (strana dle preference dobrovolníka) a maximální rychlostí byla bolusově podána 500ml infuze fyziologického roztoku ( $\text{NaCl}$  0,9%, B. Braun, Melsungen, Německo) o pokojové teplotě za použití přetlakové manžety s tlakem 300 mmHg. Před podáním infuze (čas T1) byla odebrána základní demografická data, změřen neinvazivní 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 za použití software GlykoCheck (GlykoCheck, Maastricht, Nizozemsko) [8]. Záznam sublingvální mikrocirkulace byl pořízen plně podle navigačního programu. KK kamera (Research Technology Limited, Alliance Court, Honiton, Velká Británie) fungující na principu SDF imaging byla přiložena volně pod jazyk dobrovolníka a po stabilizaci

## PŮVODNÍ ČLÁNEK

obrazu, optimální intenzitě a zaostření začal automaticky záznam, který byl ukončen po uložení nejméně 3 000 kapilárních segmentů o délce 10 mm a průměru 5–25 mm (obr. 1). Program dále automaticky vypočítal průměr středního proudu erytrocytů v kapilárních segmentech a jejich rozptýl odečtením průměru kapiláry od průměrné hodnoty středového sloupce erytrocytů. Výsledný numerický údaj v mm představuje PBR, tedy perfundovanou hraniční zónu, a udává míru penetrace erytrocytů do EG. Čím je vyšší, tím se více erytrocyty přibližují endoteliálním buňkám, což demonstruje ztenčení vrstvy EG. 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'Agostinovým a Pearsonovým omnibus testem. Výsledky po zprůměrování hodnot obou měření byly vyhodnoceny párovým t-testem na hladině významnosti testu 0,05.



**Obr. 1** Vyhodnocování parametru PBR programem GlycoCheck. Červené linky znázorňují cévy o průměru 5–25 mm, zelené linky oddělují hodnocené vaskulární segmenty, žluté linky oddělují neplatné segmenty. (Autor: MUDr. David Astapenko)

### VÝSLEDKY

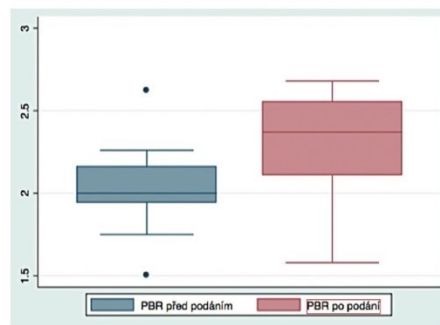
Do studie bylo zařazeno celkem dvanáct dobrovolníků splňujících vstupní kritéria. Průměrný věk dobrovolníků byl 34 let (28–64), bylo zastoupeno celkem 9 mužů (75 %) a 3 ženy (25 %). Každému dobrovolníkovi byl podán právě jeden tekutinový bolus 500 ml FR1/1 pokojové teploty přetlakovou infuzí do žilní kanyly zavedené na paži. Doba infuze nepřesáhla v žádném z případů 10 minut. Každému dobrovolníkovi byla stanovena hodnota PBR 2× v každém časovém bodě, všechna měření byla úspěšná. Podání bolusu FR nevedlo k signi-

fikantnímu zvýšení hodnoty PBR ihned po podání tekutinového bolusu ( $2,00 \pm 0,21$  vs.  $2,21 \pm 0,36$ ,  $p = 0,089$ , obr. 2). Po podání tekutinového bolusu se signifikantně snížila srdeční frekvence ( $74 \pm 10$  vs.  $68 \pm 10$ ,  $p = 0,003$ ). V případě měření neinvazivního arteriálního tlaku nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl v hodnotách před podáním a po podání tekutinového bolusu (tab. 1).

**Tab. 1** PBR a oběhové parametry před podáním bolusu 500 ml FR1/1 a po něm

Parametr	Před bolusem (T1)	Po bolusu (T2)	P value
PBR [mg]	$2,00 \pm 0,21$	$2,21 \pm 0,36$	0,089
SAP [mmHg]	$131 \pm 14$	$127 \pm 13$	0,135
MAP [mmHg]	$78 \pm 10$	$74 \pm 8$	0,133
DAP [mmHg]	$91 \pm 15$	$87 \pm 13$	0,082
HR [1/min]	$74 \pm 10$	$68 \pm 10$	0,003

PBR – perfused boundary region, SAP – systolický arteriální tlak, MAP – střední arteriální tlak, DAP – diastolický arteriální tlak, HR – tepová frekvence



**Obr. 2** PBR hodnoty před podáním a po podání tekutiny  
PBR – perfused boundary region

### DISKUSE

Na vzorku zdravých dobrovolníků v naší studii se nepodařilo prokázat, že rychlé podání tekutinového bolusu vede k signifikantnímu zvýšení hodnoty PBR jako markeru ztenčení, a tedy poškození EG. S ohledem na různorodost údajů o optimální rychlosti podání tekutinového bolusu [9] a zároveň ne zcela jasnému významu rychlosti podání tekutiny na poškození EG jsme se v experimentu rozhodli pro maximální rychlost podání tekutiny (tj. 60 ml/min při užití kanyly G20), která byla limitována pouze průměrem použité nitrožilní kanyly. 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 [9]. Nelze zobecnit, jestli by byl pozorovaný efekt podání tekutinového

bolusu zesílen či zeslaben při volbě jiné rychlosti podání bolusu [4]. Ukor et al. [10] prokázali, že podání 1 l fyziologického roztoku za 30 minut oproti 120 minutám vede k méně stabilní makrohemodynamické odpovědi, což by mohlo do jisté míry ukazovat na dynamičtější patofyziologické změny rychlejšího podání roztoku.

Z hlediska patofyziologie je možné předpokládat několik mechanismů, které by měly vést ke změně tloušťky EG po podání intravenózní tekutiny. Po podání tekutinového bolusu může dojít ke krátkodobému zvýšení srdečního výdeje na základě Frankova-Starlingova mechanismu, toto zvýšení průtoku může vést v mikrocirkulaci k recruitmentu dosud neperfundovaných kapilár, a tím k lokální reperfuzi. Poškození EG reperfuzí je dobře popsáno v literatuře [11]. Dalším vysvětlením by mohlo být zvýšení srdečního výdeje, a tím zvýšení krevního tlaku na prekapilárním konci kapilárního řečiště, čímž dochází ke zvýšení mechanického namáhání (shear stress) kapiláry a následně k jejímu poškození [12]. Roli také může mít případné uvolnění atrilární natriuretického peptidu (ANP) při tranzientní hypervolemii. Ačkoli mechanismus degradace EG působením ANP není zcela jasný, byl v literatuře dobře zdokumentován [6]. Na základě mnoha prací lze tvrdit, že podání intravaskulární tekutiny má vliv na EG [13]. Puskarich et al. [14] zdokumentovali poškození EG po podání tekutiny na základě měření hladiny syndecanu-1, a to přestože stanovení dostupných humorálních markerů poškození EG není zcela specifické pro poškození EG a může být falešně pozitivní v některých situacích (trauma, zánět) [3]. Bohužel není v žádném z těchto patofyziologických konceptů znám přesný časový průběh od počátku působení patologické noxy k detekovatelnému poškození EG případně k poškození EG jinak kvantifikovatelnému (např. maximálnímu). Biochemický proces degradace je pravděpodobně dynamický, a tudíž zachytitelný až po delším čase působení noxy, když 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 0,9% NaCl, tradičně pojmenovaným jako fyziologický. Aktuálně byla publikována multicentrická SMART trial, kde Self et al. [15] na velkém počtu pacientů ( $n > 13\ 000$ ) prokázali kladný efekt podání balancovaných roztoků oproti FR na výsledek léčby. McCluskey et al. [16] prokázali, že kumulativní vyšší hladina chloridů při podání FR perioperačně (autoři uvádějí termín „akutní postoperační hyperchloridemie“) vede u pacientů ke zhoršenému výsledku, přičemž ve-

likost hyperchloridemie je úměrná tomuto zhoršení. Nicméně v některých klinických situacích je podání FR racionální – např. u traumatu mozku s potřebou podání vysoceosmolárních náhrad, případně v situaci hypochloremické alkalózy. O poškození EG vlivem hyperchloridemie nejsou přímé důkazy. Podání většího množství FR vede ovšem také k tranzientní nebo kumulativní hypernatremii. Kusche-Vihrog et al. [17] ukazují biochemickou molekulární podstatu poškození endotelu vysokými dávkami NaCl. EG ze své biochemické podstaty složení funguje jako efektivní pufr  $\text{Na}^+$  iontů – tyto jsou přitahovány negativními náboji makromolekul EG a akumulovány v síťovité struktuře EG. Při expozici významnému množství  $\text{Na}^+$  tato pufrovací schopnost nestačí, což vede ke konformačním změnám negativně nabitých reziduí heparansulfátu v EG. Změna konformace makromolekul způsobuje insuficienci biosignálních drah na povrchu endotelu s jeho dalším poškozením [5]. Bolus právě fyziologického roztoku tedy měl hypoteticky simulovat poškození EG jak tranzientní hypervolemii, tak hypernatremii, nicméně množství podaného roztoku bylo oproti zmíněným pracím pravděpodobně příliš malé, aby došlo k významným změnám ve struktuře EG.

Jako metodu stanovení poškození EG jsme v experimentu stanovovali hodnotu PBR v sublingvální mikrocirkulaci, jejíž změny odrážejí změny tloušťky EG [8, 18]. Výhodou byla snadnost manipulace s měřicím zařízením, možnost provést měření bezprostředně po podání tekutinového bolusu, její neinvazivita a reprodukovatelnost bez interindividuální variability dané lidským faktorem na kvalitu měření. K limitům práce patří fakt, že stanovení PBR bylo jedinou metodou užitou ke stanovení poškození GCX. Ke komplexnějšímu posouzení alterace EG by bylo třeba použít některou z dalších metod souběžně (např. hladinu degradačních produktů EG či elektronmikroskopické vyšetření EG erytrocytů). PBR hodnota stanovuje míru penetrace erytrocytů ze středu kapiláry směrem k endoteliálním buňkám. Poškození EG různorodými vlivy tuto odchylku pohybu erytrocytů zvětšuje, při nepřítomnosti nebo ztenčení (angl. shedding) vrstvy makromolekul EG se erytrocyty při průchodu kapilárou dostávají blíže k vlastnímu povrchu endoteliální buňky, vzdalují se v průměru více od proudu ve středu lumen kapiláry a narůstá tak hodnota PBR. Nutno ovšem uvést, že tato hodnota je zcela automaticky vypočtena na základě softwarového zpracování obrazu získaného mikroskopickou kamerou. V současné době toto zcela automatické zpracování není všeobecně přijato a zdá se, že v některých situacích může přinášet kontroverzní výsledky.

## PŮVODNÍ ČLÁNEK

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 [19]. 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 jinými metodami (např. hodnocením mikroskopického obrazu podle skóre podle De Backera nebo MFI indexem, stanovením 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. Lze uvést, že zlatý standard stanovení integrity a funkce EG nebyl dosud jasně definován.

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 byli instruováni před experimentem dodržet míru „běžné“ hydratace, ačkoli tato nebyla přímo definována. Byli žádáni, aby se v předchozích 48 hodinách před měřením vyvarovali zvýšené námahy a stresu, což je do jisté míry subjektivní. Další limitací práce byl fakt, že nebyla měřena kontrolní skupina, ačkoli je prakticky nereálné očekávat bias vedoucí k „samovolnému“ zlepšení EG během pokusu, které by falešně snižovalo význam intervence v poškozené EG.

## ZÁVĚR

V naší studii jsme neprokázali poškození EG stanovené hodnocením PBR parametru sublingvální mikrocirkulace bezprostředně po podání tekutinového bolusu FR 500 ml v co nejkratším možném čase u skupiny dvanácti zdravých dobrovolníků. Z hlediska makrohemodynamiky vedlo podání infuzního roztoku k signifikantnímu snížení tepové frekvence, jiné změny nebyly pozorovány. Ačkoli jsme nebyli v našem experimentu schopni zaznamenat významnou změnu tloušťky PBR, a tedy poškození EG u zdravých dobrovolníků, nelze zcela vyloučit, že k těmto změnám nemůže dojít při expozici většímu množství intravenózních tekutin na bázi fyziologického roztoku nebo v delším časovém okně.

## SEZNAM ZKRATEK

EG – endoteliální glykokalyx  
 ANP – atriální natriuretický peptid  
 SDF – sidestream dark-field  
 FR – fyziologický roztok  
 PBR – perfused boundary region

## LITERATURA

- Jacob M, Chappell D. Reappraising Starling: The physiology of the microcirculation. *Curr Opin Crit Care*. 2013;19:282–289. doi:10.1097/MCC.0b013e3283632d5e.
- Cerny V, Astapenko D, Brettner F, et al. Targeting the endothelial glycocalyx in acute critical illness as a challenge for clinical and laboratory medicine. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2017;54:343–357. doi:10.1080/10408363.20171379943.
- Murphy LS, Wickersham N, McNeil JB, et al. 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. doi:10.1186/s13613-017-0325-y.
- Vincent JL, Weil MH. Fluid challenge revisited. *Crit Care Med*. 2006;34:1333–1337. doi:10.1097/01.CCM.0000214677.76535.A5.
- Oberleithner H, Peters W, Kusche-Vihrog K, et al. Salt overload damages the glycocalyx sodium barrier of vascular endothelium. *Pflügers Arch Eur J Physiol*. 2011;462:519–528. doi:10.1007/s00424-011-0999-1.
- Chappell D, Bruegger D, Potzel J, et al. Hypervolemia increases release of atrial natriuretic peptide and shedding of the endothelial glycocalyx. *Crit Care*. 2014;18:1–8. doi:10.1186/s13054-014-0538-5.
- Cerny V, Astapenko D, Burkovskiy I, et al. Glycocalyx in vivo measurement. Jünger M, Krüger-Genge A, Jung F, eds. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2017;67:1–5. doi:10.3233/CH-179235.
- Lee DH, Dane MJC, Van Den Berg BM, et al. Deeper penetration of erythrocytes into the endothelial glycocalyx is associated with impaired microvascular perfusion. *PLoS One*. 2014;9:1–8. doi:10.1371/journal.pone.0096477.
- Cecconi M, Hofer C, Teboul JL, et al. Fluid challenges in intensive care: the FENICE study: A global inception cohort study. *Intensive Care Med*. 2015;41:1529–1537. doi:10.1007/s00134-015-3850-x.
- 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;41:254–259. doi:10.1016/j.jcrc.2017.05.036.
- Rehm M, Bruegger D, Christ F, et al. Shedding of the endothelial glycocalyx in patients undergoing major vascular surgery with global and regional ischemia. *Circulation*. 2007;116:1896–1906. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.684852.
- Zeng Y, Tarbell JM. The adaptive remodeling of endothelial glycocalyx in response to fluid shear stress. *Vinci MC, ed. PLoS One*. 2014;9:e86249. doi:10.1371/journal.pone.0086249.
- Powell M, Mathru M, Brandon A, et al. Assessment of endothelial glycocalyx disruption in term parturients receiving a fluid bolus before spinal anesthesia: a prospective observational study. *Int J Obstet Anesth*. 2014;23:330–334. doi:10.1016/j.ijoa.2014.06.001.
- Puskarich MA, Cornelius DC, Tharp J, et al. 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;36:125–129. doi:10.1016/j.jcrc.2016.06.027.

PŮVODNÍ ČLÁNEK

15. Self WH, Semler MW, Wanderer JP, et al. Balanced Crystalloids versus Saline in Noncritically Ill Adults. *N Engl J Med*. 2018;378:819–828. doi:10.1056/NEJMoa1711586.
16. McCluskey SA, Karkouti K, Wijeyesundera D, et al. Hyperchloremia after noncardiac surgery is independently associated with increased morbidity and mortality: A propensity-matched cohort study. *Anesth Analg*. 2013;117:412–421. doi:10.1213/ANE.0b013e318293d81e.
17. Kusche-Vihrog K, Schmitz B, Brand E. Salt controls endothelial and vascular phenotype. *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 2015;467:499–512. doi:10.1007/s00424-014-1657-1.
18. Vlahu CA, Lemkes BA, Struijk DG, et al. Damage of the Endothelial Glycocalyx in Dialysis Patients. *J Am Soc Nephrol*. 2012;23:1900–1908. doi:10.1681/ASN.2011121181.
19. Ince C, Boerma EC, Cecconi M, 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. doi:10.1007/s00134-018-5070-7.

Práce je původní, nebyla publikována ani není zaslána k recenznímu řízení do jiného média.

Autoři prohlašují, že nemají střet zájmů v souvislosti s tématem práce.

Všichni autoři rukopis četli, souhlasí s jeho zněním a zasláním do redakce časopisu *Anesteziologie a intenzivní medicína*.

Projednáni etickou komisí: Etická komise FN Hradec Králové.

Financování: Podpořeno z programového projektu Ministerstva zdravotnictví ČR s reg. č. 15-31881A. Veškerá práva podle předpisů na ochranu duševního vlastnictví jsou vyhrazena.

Do redakce došlo dne 23. 7. 2018.

Do tisku přijato dne 1. 11. 2018.

Adresa pro korespondenci:

**MUDr. Jiří Pouska**  
pouskaj@fnplzen.cz

## 11.2 Příloha č.2

Hindawi  
BioMed Research International  
Volume 2018, Article ID 8925345, 11 pages  
<https://doi.org/10.1155/2018/8925345>



### Clinical Study

## Impact of Intravenous Fluid Challenge Infusion Time on Macrocirculation and Endothelial Glycocalyx in Surgical and Critically Ill Patients

Jiri Pouska,<sup>1,2</sup> Vaclav Tegl,<sup>1,2,3</sup> David Astapenko<sup>4,5</sup>, Vladimír Cerný<sup>4,6,7,8</sup>,  
Christian Lehmann<sup>8</sup>, and Jan Benes<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Dpt. of Anesthesiology and Intensive Care Medicine, Faculty of Medicine in Plzen, Charles University, Plzen, Czech Republic

<sup>2</sup>Dpt. of Anesthesiology and Intensive Care Medicine, University Hospital in Plzen, Plzen, Czech Republic

<sup>3</sup>Biomedical Center, Faculty of Medicine in Plzen, Charles University, Plzen, Czech Republic

<sup>4</sup>Department of Anaesthesiology and Intensive Care, Charles University in Prague, Faculty of Medicine in Hradec Kralove, Hradec Kralove, Czech Republic

<sup>5</sup>Faculty of Medicine in Hradec Kralove, Charles University, Hradec Kralove, Czech Republic

<sup>6</sup>Department of Anaesthesiology, Perioperative Medicine and Intensive Care, J. E. Purkinje University, Masaryk Hospital, Usti nad Labem, Czech Republic

<sup>7</sup>Centrum for Research and Development, University Hospital Hradec Kralove, Hradec Kralove, Czech Republic

<sup>8</sup>Department of Anaesthesia, Pain Management and Perioperative Medicine, Dalhousie University, Halifax, NS, Canada

Correspondence should be addressed to Jan Benes; benesj@fnplzen.cz

Received 22 May 2018; Revised 15 August 2018; Accepted 1 October 2018; Published 1 November 2018

Academic Editor: Sergio Claudio Sacca

Copyright © 2018 Jiri Pouska et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

(i) *Purpose.* The fluid challenge (FC) is a well-established test of preload reserve. Only limited data exist in regard to the FC efficacy based on infusion time. Slow administration may be associated with lack of effect based on fluid redistribution and external conditions changes. On the contrary, fast administration may lead to brisk fluid overload and damage to the endothelium and endothelial glycocalyx (EG). The aim of this trial was to compare the FC infusion time on its hemodynamic effects and EG. (ii) *Methods.* Prospective randomized single-center trial of fast (5-10 minutes) versus slow (20-30 minutes) administration of 500ml balanced crystalloid FC in spinal surgery (cohort OR) and septic shock (cohort SEP) patients. Hemodynamic response was assessed using standard monitoring and blood flow measurements; damage to EG was assessed using the perfused boundary region (PBR) via intravital microscopy monitoring in the sublingual region within relevant time points ranging up to 120 minutes. (iii) *Results.* Overall, 66 FCs in 50 surgical and 16 septic patients were assessed. Fluid administration was associated with increase of PBR in general (1.9 (1.8-2.1) vs. 2.0 (1.8-2.2);  $p=0.008$ ). These changes were transient in OR cohort whereas they were long-lasting in septic fluid responders. The rate of fluid responsiveness after fast versus slow administration was comparable in global population (15 (47%) vs. 17 (50%);  $p=0.801$ ) as well as in both cohorts. (iv) *Conclusions.* Fluid challenge administration was associated with increased PBR (and presumable EG volume changes) which normalized within the next 60 minutes in surgical patients but remained impeded in septic fluid responders. The fluid responsiveness rate after fast and slow FC was comparable, but fast administration tended to induce higher, though transient, response in blood pressure.

### 1. Introduction

Fluid resuscitation is considered standard of care in intensive care medicine and the operating room (OR), respectively. Over the years, adverse effects of fluid administration have

been increasingly acknowledged [1]; therefore the current view stresses the use of fluid responsiveness prediction and rational use of intravenous infusions [2]. The fluid challenge (FC) is a widely accepted test of preload reserve. However, given the data from the recent FENICE study [3], the FC



may differ significantly in several ways (volume, time, type of fluid, variables used for assessment, etc.). Whereas long term effects [4], volume [5], and several other variables have been studied, the rate of administration and its impact on the circulation, and hence test results, remain largely unrevealed. If the administration of crystalloid FC is longer than 10 minutes, the expected time of volume redistribution based on Hahn volume-kinetic studies [6], one can expect to lose some of the FC volume hence making it more prone to false negative assessment. Besides patient's conditions may change dramatically (especially in the OR) debasing the evaluation of fluid response.

Based on the effectivity of mini-FC tests [7] the impact of rapid bolus administration on the central hemodynamic compartment may induce larger increase in venous return and hence test the preload reserve to a larger extent. On the other side, such rush increase in venous return may overcome the reserve in patients on the Frank-Starling curve plateau and may unnecessarily increase the risk of brisk and temporary fluid overload. Hypothetically, such brisk overload may affect the patient's conditions, for instance, by release of natriuretic peptides and endothelial glycocalyx disruption [8]. These conditions may then impact the fluid redistribution and hence final volume effect. In other words, infusion time of FC may significantly alter its macro- and microhemodynamic effects.

Endothelial glycocalyx (EG) is a thin gel-like layer on the outer surface of endothelial cells within the human body. It consists of sugar-based macromolecules such as heparan sulfate or proteoglycan. This structure has been considered as a crucial regulator of endothelial functions such as endothelial permeability or interaction with circulating cells [9]. It is supposed that this layer may get easily harmed by various stimuli and during different disease conditions. The interaction between EG and fluids seems to be bilateral; on one side EG may get disrupted by alterations in circulation volume and pressure and on the other EG is the principal regulator of permeability and fluid extravascular leakage [10, 11]. From this point of view the knowledge of EG behavior during FC and/or fluid therapy is of the utmost importance. However, up until recently only laboratory indirect measures of EG damage (i.e., plasma levels of heparan sulfate or syndecan-1) were available for EG assessment. Monitoring of the sublingual mucosa microcirculation via side-stream dark field (SDF) imaging has been improved over the last decade enabling real-time computation of several characteristics. The perfused boundary region (PBR) has been used by some to inspect the microvascular EG layer thickness hence enabling real-time EG assessment [12, 13]. It describes the extent of penetration of the flowing red blood cells (RBC) in  $\mu\text{m}$  into the luminal surface of the EG by measuring the radial motion of RBC away from the central flow towards the endothelial cells. The more the EG is injured, the deeper the RBC penetrate into the glycocalyx and the higher the PBR is.

The aim of this study was to assess the influence of fluid challenge infusion time on macrohemodynamic variables and PBR in surgical and septic patients. Our hypothesis was that faster fluid challenge leads to bigger macrohemodynamic effects but harms EG more than the slower one.

## 2. Materials and Methods

This was a prospective open randomized trial performed at the Department of Anesthesiology and Intensive Care Medicine in Plzeň (Charles University Hospital, Czech Republic) in two three-month periods between January and December 2016. The study was approved by the local ethical committee, registered under the ACTRN12618000385246, and financially supported by the Ministry of Health grant no. 15-31881A. Informed consent was obtained from all individual participants (or their legal representatives/next of kin) included in the study.

**2.1. Patients' Selection.** Patients undergoing scheduled operative intervention (cohort OR) or admitted to the ICU for sepsis/septic shock (cohort SEP) in the suspected need for fluid administration/response test based on clinical assessment were recruited into the trial.

The first cohort (OR) consisted of patients scheduled for major spinal surgery under general anesthesia of more than one-hour expected length. Inclusion criteria were age over 18 years, ASA physical status I-III, and signed informed consent. Patients with pathology in the oral cavity (bleeding, neoplasia), previously diagnosed systemic microangiopathy, and atrial fibrillation were excluded from the trial. General anesthesia for the operative procedure was induced using propofol, sufentanil, and atracurium; sevoflurane in O<sub>2</sub>/Air mixture was used for maintenance. The patients were orotracheally intubated and prone after induction. Ringerfundin (B Braun Melsungen, Germany) at rate of 1ml/kg/hour was administered throughout the procedure. Standard monitoring of noninvasive blood pressure, pulse oximetry, and electrocardiography was commenced; Massimo rainbow plethysmograph with PVI assessment was used in addition to monitor fluid responsiveness. All patients were mechanically ventilated in volume-controlled mode (tidal volume 8 ml/kg of predicted body weight, PEEP 5 cmH<sub>2</sub>O).

The second cohort (SEP) consisted of patients with sepsis or septic shock admitted to the intensive care within 48 hours from ICU admission (mostly within first 24 hours, i.e., during the fluid-optimization phase). Patients younger than 18 years and those with intraoral bleeding and/or diathesis were excluded. Informed consent of the patients was obtained prior to inclusion. In case of patient's diminished consciousness either next of kin or independent physician was asked for consent; patient's agreement was obtained retrospectively if possible. All patients were initially fluid-resuscitated and monitored using the transpulmonary thermodilution (PiCCO2 device, Pulsion-Gettinge, Munich, Germany) in addition to standard ICU monitoring. If needed vasoactive drugs (norepinephrine, dobutamine) were used to reach generally accepted targets of global perfusion parameters (MAP at least 65 mmHg adapted according to individual baseline characteristics and cardiac performance). Analgesia, sedation, and/or mechanical ventilation were used as appropriate.

**2.2. Randomization and Study Intervention.** Patients were randomized by the research staff using the sealed envelope block randomization scheme (<https://sealedenvelope.com/>)

with predefined stratification (OR and SEP). A fluid challenge of 5 ml/kg predicted body weight of crystalloid (Ringer-fundin, B Braun Melsungen GmbH) was used as a test of fluid response. Patients were randomly separated into two groups: fast administration (group F; bolus within 5-10min using an infusion cuff pressured at 300mmHg) and slow (group S; 25-30 minutes infusion using an infusion pump at calculated appropriate rate). The study was designed as open so neither blinding of the operator nor outcome assessment was provided.

Based on different time course in the OR and SEP cohort the study time points differed slightly. However, T0 (immediately before FC), T1 (immediately after FC), and T60 (60 minutes after FC) time points measurements were performed in both cohorts. In addition, T20 and T40 (20 and 40 minutes after FC) were made in OR cohort and T120 (120 minutes after FC) was performed in SEP patients.

In case of sudden circulating blood volume change (i.e., blood loss) or need for other fluid administration the monitoring was discontinued and following time points were omitted. Relevant cointerventions within the study period were screened (i.e., change in maintenance infusion rate, administration of other fluid volumes for intravenous medication). However, we have tried to restrict such interfering factors to the minimum by postponing them unless vitally important. The change of vasoactive medication in septic patients (SEP cohort) was allowed during the study period to maintain the blood pressure within predefined range (65-75 mmHg in patients without chronic hypertension and 70-80 in those with chronic hypertension).

**2.3. Study Outcomes.** Primary objective was to assess the influence of balanced crystalloid fluid challenge infusion time on the PBR as a marker of endothelial glycocalyx thickness using the SDF imaging in the sublingual circulation.

Secondary outcomes were to assess its effect on macrocirculation (i.e., rate of positive response) and the temporary differences of the hemodynamic and PBR response in different subgroups (fluid responders=FR, nonresponders= NR, cohort OR and SEP).

**2.4. Microcirculation and Fluid Response Assessment.** The perfused boundary region parameter was used to monitor the possible EG damage induced by FC. This parameter (PBR) was designated to determine the extent of penetration of the flowing red blood cells in capillary to its luminal border by calculating the radial motion of red blood cell away from central flow in capillary. In the situation of EG damage through various pathologic stimuli, this spreading closer to endothelial cells is more obvious and thus the PBR value becomes higher. An intravital real-time microscopy of sublingual circulation by specialized hand-held video microscope (KK camera, Research Technology Limited, Alliance Court, Honiton, UK) was performed at each time point. Acquired data were processed with GlycoCheck software version 1.2.5.7211 (GlycoCheck, Maastricht, Netherlands). The software automatically measures PBR in vessels of diameter from 5 to 25  $\mu\text{m}$  and the resulting number stands for an average of PBR that is corrected for the potential changes in the distribution of vessel diameters. The software identifies all available

vessels and places 10  $\mu\text{m}$  long vascular segments along them. Next, a sequence of 40 frames on this spot is recorded with approximately 300 segments in the field. Afterwards, the operator should reposition camera slightly allowing for recording of the next 40-frame sequence. Automated signal quality assessment is performed by the software itself displaying a direct user friendly feedback enabling gathering only valid data. The maximal data-sampling period is 5 minutes making the monitoring less prone to interobserver variability. However, the recording stops automatically when 3000 segments in focus and without movement are acquired; hence under normal conditions much shorter periods (i.e., 1-2 minutes) are needed. Then the software selects segments with sufficient contrast with the background and counts the median RBC column width and its distribution from the intensity profile. From this intensity profile, the perfused diameter of the vessel is calculated by a linear regression analysis. The PBR stands for the distance between RBC column width and perfused diameter according to the equation: (perfused diameter - median RBC column width)/2.

Besides the PBR, automated parameters based on two quality checks, which indirectly align to microvascular perfusion, were assessed in each time point. During first check the so-called "valid vascular segments" are reported (those with more than 60% contrast in vessel segments) making the parameter of valid vessel density. During a second check phase red blood cells (RBC) column is monitored allowing for the calculation of percentage of vascular segments with RBC present in all 40 frames of the monitoring session. Results of the monitoring are available within several minutes after the monitoring period had finished. Detailed description of automatic calculation of PBR, valid and total vascular density, and RBC filling parameters can be found elsewhere [12]. Excellent interobserver validity has been demonstrated by Rovas et al. [14]. In our study, two monitoring procedures were performed (both sides of the sublingual region) and averaged at each time point. JP performed all microcirculatory measurements in the surgical population, whereas JB and VT were responsible for the septic cohort monitoring.

Macrohemodynamic changes were assessed using standard hemodynamic variables based on cohort-defined monitoring. In the OR cohort heart rate, noninvasive blood pressure, pulse pressure, and PVI parameters were used. A drop in PVI of 5% and more between T0 and T1 was measure of a positive fluid response.

In the SEP cohort heart rate, invasive blood pressure (systolic, mean, and pulse pressure values), cardiac output/stroke volume values, stroke volume variation, and thermodilution derived global end-diastolic volume index (GEDI) were assessed. A stroke volume increase of 15% (T1 versus T0) was used to define positive fluid response.

**2.5. Statistical Analysis.** The study was designed as a pilot study, because no baseline data existed regarding both study outcomes (i.e., difference in macrohemodynamic and EG data). A sample of 50 patients in the cohort OR was deemed sufficient to ascertain a 10% difference in the PBR value with alpha error  $\alpha=0.05$  and study power = 0.9. The length of the study limited recruitment into the septic cohort and number

of admitted septic patients therefore underwent no prior sample size calculation.

The usual descriptive statistics was used to compare patients between F and S groups; Kolmogorov-Smirnov test was used for assessing normality. Student's t-test (unpaired) or Mann-Whitney rank sum tests were used to compare intergroup differences; the time-based changes within groups were tested using RM ANOVA or RM ANOVA of Ranks (Friedman) appropriately. Chi square test was used to compare frequency distribution.  $p \leq 0.05$  was deemed statistically significant. MedCalc Statistical Software version 18.2.1 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium; <http://www.medcalc.org>; 2018) was used for statistical analysis.

### 3. Results

In total 66 patients have been included and 66 FCs have been studied during the run of the study; there were no drop-offs. In the OR cohort 50 fluid challenges were performed in 50 patients equally randomized to receive either fast (group F-OR: 25 FCs) or slow (group S-OR: 25 FCs) FC administration. In the SEP cohort in 16 patients, 16 fluid challenges were performed, randomized to fast (group F-SEP: 7 FCs) and slow (group S-SEP: 9 FCs) FC administration; the median time from sepsis onset (or hospital admission for sepsis) and intervention was 16 (7-33) hours. There were no dropouts; the flow of participants through the trial is displayed in e-Figure 1. Baseline demographic and disease characteristics are given in Table 1; no significance has been observed in any of screened parameters.

The perfused boundary region was comparable at the baseline between F and S group (1.8 (1.72-2.05) vs. 1.89 (1.76-2.08);  $p = 0.176$ ). The PBR increased after FC in general (1.88 (1.76-2.08) vs. 1.95 (1.79-2.20);  $p = 0.008$ ) and in both groups in parallel (T1 in F group 1.91 (1.75-2.13) vs. 1.96 (1.85-2.26) in S;  $p = 0.256$ ). The PBR remained increased throughout the next course in both groups (T60 values in F were 1.89 (1.77-2.08) vs. 2.02 (1.72-2.16) in S;  $p = 0.576$ ); see Table 2 for more details. No differences in other microcirculatory parameters (i.e., number of valid vessel density and RBC filling) were observed (see ESM Table 1).

Based on the responsiveness criteria in global 32 FCs (49%) were assessed as positive: 24 (48%) in the OR and eight (50%) in the SEP cohort. No difference in the FC outcome was identified between fast and slow administration neither in global population nor in any of the cohorts (Table 3).

No differences in screened hemodynamic variables were observed at the baseline between F and S groups in any of the cohorts studied (Table 4). However, the blood pressure increase induced directly by fluid infusion occurred in the F group only ( $78 \pm 11$  mmHg in T0 vs.  $86 \pm 12$  mmHg in T1;  $p = 0.004$ ) leading to higher MAP in the F group at T1 ( $86 \pm 12$  mmHg vs.  $77 \pm 12$  mmHg;  $p = 0.003$ ). Interestingly, this increase equalized in the 60 minutes time point ( $84 \pm 11$  mmHg in the F group vs.  $84 \pm 12$  mmHg in the S group;  $p = 0.086$ ). The dynamic variation of stroke volume or plethysmography variability index (PVI) decreased in both groups after the FC and tended to increase back after 60 minutes, but these changes went in parallel in both groups. Pulse pressure

(PP) increased after the fluid challenge in the F group only ( $37$  (32-56) mmHg in T0 vs.  $43$  (36-61) mmHg in T1;  $p = 0.019$ ), but decreased afterwards in the T60 time point. On the contrary, in the S group the PP increase was prolonged reaching its peak at T60. No major differences were observed in heart rate and other hemodynamic parameters; see Table 4 for more details.

**3.1. Differences between Anesthetized and Septic Patients.** In septic patients, the PBR values were significantly higher (2.08 (1.90-2.22) in SEP vs. 1.81 (1.73-2.00) in OR cohort;  $p < 0.001$ ) at the baseline. In the S-OR subgroup there was an increase of the PBR after FC with later return to initial values (Table 2, Figure 1(a)). In the F-OR subgroup the PBR values increased in T1 as well, but without reaching statistical significance. However, no intergroup differences were observed between F-OR and S-OR groups at any time point. In the septic patients both the PBR remained stable without intergroup (i.e., F-SEP vs. S-SEP) or temporary changes (Figure 1(b)). No important variations were observed in number of valid vessel density and RBC filling among study groups within the study period (ESM Table 1).

As mentioned previously in global FC response, there were no differences among any subgroup studied (i.e., OR, SEP; Table 3). The pressure response to FC was apparently faster in the F-OR group than S-OR ( $87 \pm 14$  mmHg in T1 vs.  $75 \pm 13$  mmHg;  $p = 0.003$ ), but equalized within the next 20 minutes ( $91 \pm 13$  mmHg in T20 vs.  $88 \pm 11$  mmHg;  $p = 0.52$ ) and remained comparable throughout the next time points (T40 and T60) (ESM Table 1). A similar pattern was observed in the pulse pressure. The T1 values were higher in the F-OR subgroup ( $37$  (34-43) mmHg vs.  $32$  (28-41) mmHg in S-OR;  $p = 0.048$ ), but equalized during T20, T40, and T60 time points (ESM Table 1). A nonsignificant drop in the value of PVI was observed in both F-OR and S-OR subgroups, without any intergroup differences.

In the SEP cohort there were differences neither in MAP at the T1 ( $77 \pm 10$  mmHg in F-SEP vs.  $82 \pm 9$  mmHg in S-SEP;  $p = 0.404$ ), nor at any other time point afterwards (T60 and T120; ESM Table 1) between F-SEP and S-SEP subgroups. However, the dose of norepinephrine dropped in F-SEP group in T1 and remained decreased until T60 presuming a better pressure response. No important changes in neither the pulse pressure, stroke volume variation, and flow (stroke volume (SV) or cardiac index (CI)) nor the volumetric (global end-diastolic volume index (GEDVI) and extravascular lung water index (ELWI)) parameters were observed between F-SEP and S-SEP groups (ESM Table 1).

**3.2. Analysis Based on Fluid Response.** The PBR values were comparable at the baseline between FR and NR patients. In FR patients the PBR increased after FC (1.85 (1.74 - 2.08) vs. 2.10 (1.86 - 2.78);  $p = 0.014$ ), but remained stable in NR patients. This PBR increase occurred in fluid responders of both OR (1.76 (1.73-2.02) vs. 1.96 (1.79-2.26);  $p = 0.016$ ) and SEP cohort (1.96 (1.85-2.18) vs. 2.28 (2.04-2.52);  $p = 0.039$ ), but in SEP fluid responders the PBR not only increased against baseline value, but rose significantly even in comparison with fluid nonresponders (see Figure 2, panels (a) and (b)).

The fluid nonresponders (NR) tended to have lower baseline value of the PVI in the OR cohort (10 % (6-16) vs.

TABLE I: Baseline characteristics.

	Group F			Group S		
	All (N=32)	Cohort OR (N=25)	Cohort SEP (N=7)	All (N=34)	Cohort OR (N=25)	Cohort SEP (N=9)
Age (years)	60.1 ± 14.7	59.5 ± 12.9	61.1 ± 18.1	60 ± 16.6	61.7 ± 15.2	56.7 ± 19.3
Sex (Female/male)	18/14	14/11	4/3	18/16	15/10	3/6
Height (cm)	167.8 ± 12.5	169.3 ± 11.2	165 ± 26	167.3 ± 11.1	168 ± 8.8	165.9 ± 26.1
Weight (kg)	88.8 ± 26.3	85.6 ± 17.3	95.7 ± 39.3	87.2 ± 26.2	82.9 ± 15.1	95.8 ± 39.8
Predicted body weight (kg)	64.0 ± 11.1	64.0 ± 11.3	64.2 ± 11.5	64.0 ± 9.8	62.3 ± 8.9	65.9 ± 11.2
Fluid challenge infusion rate (ml/min)	46 (39-54)	44 (39-54)	47 (40-52)	11 (9-12)	10 (9-12)	11 (10-13)
<b>Chronic conditions</b>						
ASA grade (1/2/3)	-	5/9/11	-	-	5/13/6	-
APACHE II score	-	-	26.6 ± 7.2	-	-	27.2 ± 9.6
SOFA score	-	-	10 (7.3 – 14.3)	-	-	8 (7.8 – 12.3)
Hypertension (no.)	21	15	3	17	12	4
Smoking (no.)	10	6	3	9	4	2
Diabetes (no.)	10	9	1	6	5	1
<b>Operative procedure</b>						
Laminectomy	-	9	-	-	6	-
Discectomy	-	5	-	-	14	-
Fixation	-	11	-	-	5	-
Intraoperative blood loss (ml)	-	175 (100 – 300)	-	-	300 (188-400)	-
<b>Sepsis origin and nature</b>						
Lungs	-	-	2	-	-	5
Abdomen	-	-	5	-	-	2
Bloodstream	-	-	0	-	-	1
Orofacial	-	-	0	-	-	1
Vasopressor use (no (%))	-	-	6 (86%)	-	-	8 (89%)
Noradrenalin dose (µg/kg/min)	-	-	0.46 (0.13-0.50)	-	-	0.38 (0.24-0.71)
Septic shock	-	-	4 (57%)	-	-	8 (89%)
<b>Baseline biochemistry</b>						
Hematocrit (%)	39.6 ± 6.3	42.6 ± 3.3	33.6 ± 6.6	39.8 ± 5.9	42.5 ± 3.4	34.2 ± 6.2
Sodium (mmol/l)	140.9 ± 3.6	140.7 ± 2.7	141 ± 5.0	140.7 ± 4.2	140.4 ± 2.9	141.3 ± 6.3
Protein (g/l)	63.7 ± 9.8	68.4 ± 7.4	55.6 ± 19.3	66.3 ± 9.7	71.4 ± 11.3	55.6 ± 8.2
Creatinine (umol/l)	103.6 ± 67.4	75 ± 19.2	160.7 ± 91.4	95.5 ± 59.5	71.9 ± 4.1	145.7 ± 85.2
C-reactive protein (mg/l)	-	-	266.6 ± 30.0	-	-	265.2 ± 29.9
Procalcitonin (ug/l)	-	-	16.0 ± 8.5	-	-	16.1 ± 8.5
Serum lactate (mmol/l)	-	-	2.18 ± 1.27	-	-	2.66 ± 0.73

Data are displayed as mean ± standard deviation, median (25th-75th percentile), or number (proportion).  
Abbreviations: APACHE II: Acute Physiology and Chronic Health Evaluation score-second version; ASA: American Society of Anesthesiology physiological status; SOFA: Sequential Organ Failure Assessment.

19 % (13-22) in the FR; p= 0.001) and SVV (9 % (6-12) vs. 10 % (3-15) in NR; p=0.87). The initial values of MAP, PP, HR, SV, CI, GEDI, and ELWI were all comparable between fluid responders and nonresponders at the baseline; for full results, see ESM Table 2. In septic fluid responders the norepinephrine dose was lower in FR already at the baseline (0.23 (0.09-0.45) vs. 0.5 (0.39-1.03) in NR; p= 0.049) and dropped further after FC (0.23 (0.09-0.46) µg/kg/min in T0 to 0.19 (0.05-0.32) in T1) and remained decreased until T120.

No such change occurred in nonresponding patients. On the contrary, the central venous pressure value rose in non-responding septic patients only (ESM Table 2).

#### 4. Discussion

In our trial, fluid administration in form of fluid challenge increased the PBR value independently of the infusion time. However, there may be a weak signal that septic fluid

TABLE 2: Perfused boundary region values.

Variable	group	timepoint	Group Fast (n=32)	Group Slow (n=34)	p value	Non-RESPONDER (n=27)	RESPONDER (n=39)	p value		
all		T0	1.80	1.89	1.76 to 2.08	1.89	1.78 to 2.04	1.76 to 2.10	0.667	
		T1	1.91	1.96	1.85 to 2.13	1.89	<b>1.89</b>	<b>1.86 to 2.10</b>	<b>0.043</b>	
		T60	1.89	2.02	1.72 to 2.16	1.88	1.74 to 2.13	2.04	1.79 to 2.24	0.146
		p value	0.095	0.224		0.521	0.014			
		T0	1.77	<b>1.86</b>	1.76 to 2.04	1.85	1.73 to 1.95	1.76	1.73 to 2.02	0.336
		T1	1.90	<b>1.96*</b>	1.79 to 2.27	1.88	1.78 to 2.12	1.96	1.79 to 2.26	0.286
Perfused boundary region	OR	T20	1.88	2.04	1.72 to 2.21	1.98	1.72 to 2.15	1.99	1.73 to 2.14	0.985
		T40	1.99	1.89	1.62 to 2.05	1.94	1.74 to 2.15	1.87	1.64 to 2.04	0.346
		T60	1.81	1.88	1.71 to 2.16	1.83	1.70 to 1.99	1.90	1.72 to 2.12	0.404
		p value	0.093	<b>0.034</b>		0.078	0.154			
		T0	2.12	2.02	1.89 to 2.22	1.97	1.75 to 2.16	1.96	1.85 to 2.18	0.857
		T1	2.10	1.96	1.90 to 2.08	<b>1.99</b>	<b>1.78 to 2.07</b>	<b>2.28</b>	<b>2.04 to 2.52</b>	<b>0.027</b>
SEP		T60	2.01	2.15	1.84 to 2.17	2.07	1.85 to 2.17	2.19	2.05 to 2.33	0.115
		T120	1.87	2.01	1.91 to 2.29	1.91	1.79 to 2.01	2.05	2.03 to 2.47	0.056
		p value	0.212	0.867		0.376	0.290			

Values are displayed as median (interquartile range). \* Significant difference towards baseline (Friedman test), intergroup significant difference marked in bold letters. Abbreviations: Group Fast: fast administration; Group Slow: slow administration; OR: operative cohort; SEP: patients with sepsis/septic shock.

TABLE 3: Fluid challenge outcome.

Population	Fluid responsive				p (chi sq)
	YES		NO		
	Group F	Group S	Group F	Group S	
Global (N=66)	15	17	17	17	0.801
Cohort OR (N=50)	11	13	14	12	0.575
Cohort SEP (N=16)	4	4	3	5	0.626

Abbreviations: Group F: fast administration; Group S: slow administration; Cohort OR: surgical patients; Cohort SEP: patients with sepsis/septic shock.

TABLE 4: Macrohemodynamic changes induced by fluid challenge in the whole population.

Variable	Time-point	Group F (N=32)	Group S (N=34)	P value (between groups)
MAP (mmHg)	T0	77 ± 11	78 ± 11	0.800
	T1	<b>85 ± 13*</b>	<b>78 ± 12</b>	<b>0.024</b>
	T60	<b>85 ± 11*</b>	<b>85 ± 12*</b>	0.986
	p value	<b>0.027</b>	<b>0.025</b>	
Pulse pressure (mmHg)	T0	37 (30-43)	35 (30-55)	0.893
	T1	40 (35-45)	39 (30-51)	0.338
	T60	38 (31-48)	<b>40 (31-61)*</b>	0.496
	p value	0.205	<b>0.017</b>	
Heart rate (per minute)	T0	69 (60-79)	70 (63-81)	0.603
	T1	64 (59-75)	68 (58-82)	0.812
	T60	68 (63-87)	74 (65-88)	0.481
	p value	0.174	0.209	
Plethysmography Variability index (%) (OR cohort)	T0	13 (7-20)	15 (12-21)	0.281
	T1	10 (7-11)	10 (7-14)	0.276
	T60	13 (8-17)	11 (10-15)	0.879
	p value	0.086	0.087	
Stroke volume variation (%) (SEP cohort)	T0	<b>12 (10-19)</b>	<b>5 (2-9)</b>	<b>0.016</b>
	T1	6 (6-11)	6 (4-10)	0.568
	T60	4 (4-14)	<b>7 (3-12)*</b>	0.936
	p value	0.621	<b>0.013</b>	
Stroke volume index (ml/m <sup>2</sup> ) (SEP cohort)	T0	33 ± 14	40 ± 20	0.515
	T1	32 ± 14	44 ± 20	0.320
	T60	33 ± 13	44 ± 16	0.281
	p value	0.750	0.563	

Values are displayed as either median (interquartile range) or mean ± standard deviation; \*: significant difference towards baseline (RM ANOVA or Friedman test), significance marked in bold letters.

Abbreviations: Group F: fast administration; Group S: slow administration; MAP: mean arterial pressure; PVI: plethysmography variability index; SVV: stroke volume variation; PBR: perfused boundary region; SEP cohort: patients with sepsis/septic shock.

responders seem to be more affected. Secondly, the 5-10 minutes' or 20-30 minutes' infusion time of fluid challenge seems not to play an important role regarding rate of positive fluid response. However, a transient increase of mean arterial pressure and/or decrease in norepinephrine needs was more pronounced after fast administration.

To ascertain the impact of different infusion time on the microcirculation we have used the perfused boundary region parameter. Based on previous observations the PBR may be

linked to the endothelial glycocalyx thickness [12, 13] and hence point to its disruption by the fluids administration. This unwanted effect of fluid boluses has been demonstrated using serum markers of EG damage by several authors [8, 15, 16]. In our trial, the PBR increased after almost any fluid administration. In patients with presumably intact endothelial surface layer (i.e., OR cohort), the increase after slow administration reached statistical significance against baseline. However, in the F-OR the increase went in parallel,

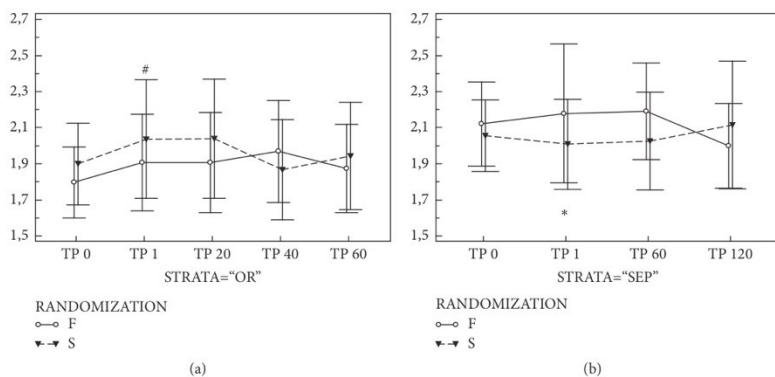


FIGURE 1: Perfused boundary region changes induced by fluid administration. Legend: Panel (a) PBR changes in surgical patients (Cohort OR); Panel (b) PBR changes in patients with sepsis/septic shock (Cohort SEP). Abbreviations: Group F (white): fast administration; Group S (grey): slow administration; PBR: perfused boundary region; TP 0, 1, 20, 40, 60, 120: measurement point immediately before, immediately after, and at 20, 40, 60, and 120 minutes after fluid challenge; #: significant difference against baseline in the slow group; \*: significant difference between fast and slow group.

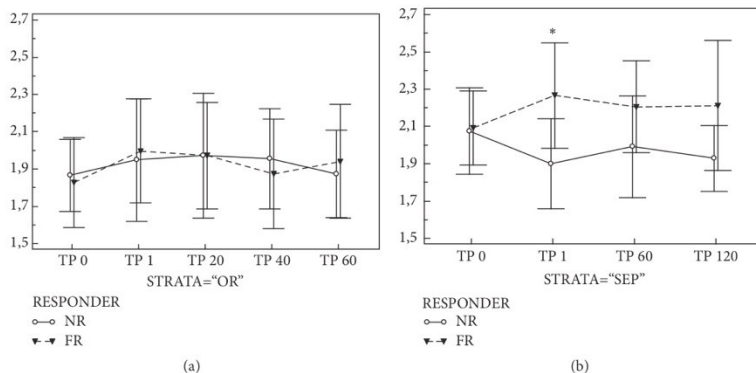


FIGURE 2: Perfused boundary region changes based on fluid challenge response. Legend: Panel (a) PBR changes in surgical patients (Cohort OR); Panel (b) PBR changes in patients with sepsis/septic shock (Cohort SEP). Abbreviations: Responder FR (white): patients with positive hemodynamic response to fluid challenge; NON-Responder NR (grey): patients with negative hemodynamic response to fluid challenge; PBR: perfused boundary region; TP 0, 1, 20, 40, 60, 120: measurement point immediately before, immediately after, and at 20, 40, 60, and 120 minutes after fluid challenge; \*: significant difference between responders and non-responders.

making this finding difficult to address the FC infusion time. Also, the PBR returned to initial values within 60 minutes in both groups. Such fast changes in the PBR parameter, especially the return to initial value, actually point towards a significant EG disruption. Possibly other forms of volume change within the structure (i.e., shrinkage or dilution) may occur explaining this effect.

On the contrary, in the septic patients the PBR pointed towards existing EG damage induced by sepsis and/or previous fluid boluses. Higher PBR values after FC were observed in septic fluid responders than nonresponders, but infusion

time does not seem to play any role. Whether this PBR increase is due to recruitment of capillaries and hence local ischemia/reperfusion remains undetermined. The slightly lower density of valid microvessels and trend towards lower RBC filling support the hypothesis of capillary recruitment associated with hemodilution. Another important fact is that, unlike in OR patients in whom the PBR returned to pre-infusion values within 60 minutes, in septic fluid responders the PBR remained increased for the next 2 hours. Therefore, another explanation could be that the increased systemic flow and precapillary pressure induces higher shear stress [17] to

the already damaged endothelia promoting existing damage. In a recent retrospective evaluation Puskarich et al [15] have demonstrated that higher volumes of resuscitation fluids in septic patients were associated with intubation and increased syndecan-1 levels, observations pointing to the promoted EG damage by fluids in septic patients. Hypothetically, those patients who do respond to initial fluid bolus tend to receive more fluids and based on our observations they are actually more endangered by the EG shedding. However, our findings in septic population are based on very small patient cohort; hence these findings have to be proven on much larger patient population.

The impact of fluids on EG has been studied previously. Mentioned studies by Chappell et al. [8], Powell et al. [16], and Puskarich et al. [15] have demonstrated that fluid administration may induce damage to the EG. Most recently a Slovenian group has demonstrated that intraoperative liberal fluid administration may be associated with EG disruption [18]. Biochemical EG shedding markers (i.e., syndecan-1, hyaluronan, etc.) were used in these studies to demonstrate the unwanted effect of fluids administration. Such markers were not available for our study for technical reasons (unavailability of such analysis in our institution). This may be regarded as an important drawback. However, EG shedding markers are not only endothelium specific. Divergent inflammatory conditions (especially in the SEP cohort) would probably interfere with their levels independently of fluid administration [19, 20]. Also the kinetics of these markers seem to be rather prolonged: in the Slovenian study [18] an increase of syndecan-1 level increased after the surgery, but remained high for the next six hours. Besides, to which extent the plasma increase of such shedding markers mirrors a real decrease in EG thickness or is a sign of increase turnover has never been demonstrated. Described prolonged kinetics and need for off-site analysis preclude the use of such markers as bed-side EG-disruption marker. For this reason, we deem the PBR to be more clinically relevant as a possible marker of endothelial damage. However, amount of data regarding the PBR is still too low to allow us for separation of clinically relevant changes. In our study the highest increase observed among septic responders was 8% which lies on the borderline of the coefficient of variation measured on our population (8%) or mentioned by other authors (less than 10%) [21]. The normal values in population have also not been evaluated yet. In the Netherlands Epidemiology of Obesity study the mean values in the total population (42% lean, 42% overweight, and 16% obese) were 2.14±0.25 [12]. In the GlycoNurse study [14] the median value and interquartile range of PBR in patients admitted into the emergency department for various reasons including sepsis (40%) or acute heart failure (16%) were 2.41 (2.26-2.61). Values measured in our population (both “healthy” surgical and septic patients) were much lower. Interestingly, in recently published Russian population study [21] the PBR values corresponded much more with our own measurements; median and interquartile values were 1.9 (1.75-2.04) with values above 2 pointing towards increased cardiovascular risk. To which extent these differences in absolute values are affected by different SDF camera device (KK Research technology Ltd., UK, in ours and Russian study [21]

vs. MicroVision Medical Inc., Wallingford, PA, in the Dutch study [12]) version of monitoring software (mostly not given) or population is to be further elucidated.

Fluid challenge is a well-established test of preload reserve. Interestingly, the number of fluid responders and non-responders is stable throughout different studies and patients' populations. The fact that rate of fluid challenge should affect its outcome has been postulated already by Weil and Vincent in the original TROL acronym (Type-Rate-Objectives-Limits of safety) [22]. In general, the 20-30 minutes seems to be the right choice. Based on the FENICE trial data the median time of FC administration of 500 ml (median volume) was 24 minutes [3]. However, a wide variety existed. In a recent meta-analysis concerning FC technique [23] the effect of FC was similar among studies with administration lasting <15 and 15-29 minutes (59.2% vs. 57.7% of fluid responders) whereas in those with prolonged infusion, i.e., >30 minutes, the positive response was less frequent (49.9%;  $p=0.045$  for <15min vs. >30 min). However, these data are an indirect comparison only and based on studies included into the meta-analysis (table 1 in Toscani et al. [23]) in the <15 minutes group there was a high predominance of operating theatre studies (70% out of 27 trials) whereas both the other groups (15-29 minutes and >30 minutes) were ICU studies only. Hence, the observed difference may be attributed to the population under study as well. In another recent meta-analysis concerning the FC, none of screened variables (infusion time, sepsis, hypotension, oliguria, and use of colloids) correlated with the FC hemodynamic outcome [24]. Our results do not contradict these observations supporting the fact that FC administered within 30 minutes does not lead to different outcomes in terms of responsive positivity rate. One important fact remains largely underrecognized by a portion of these studies: the FC's volume mostly administered is 500 ml, which is administered in a dedicated time period making the administration rate fixed and comparable between different subjects. However, based on the body size the circulating blood volume may significantly differ among subjects making the actual blood volume expansion and hence hemodynamic response different in comparable time points (i.e., after 15 or 30 minutes). Therefore, in our study, we have used a FC's volume based on patients predicted body weight. This led to different administration rates, but fixed circulating blood volume expansions in the study time points.

The longevity and delayed response to the FC were a secondary measure of our trial. In this regard, both short and prolonged infusions seem to have similar characteristics. In the fast infusion groups, a more pronounced pressure response was observed, but within the next 20-60 minutes, the blood pressure was equal in both groups. Unlike in the study by Aya et al. [4] the effect of crystalloid FC lasted till the end of observation (60 minutes in surgical and 120 minutes in septic patients). Different volume of FC may partially explain this observed difference; in Aya et al.'s study a 5 minutes' bolus FC of 250 ml was used; this corresponds with a relative volume of 3ml/kg (whereas 5ml/kg was used in our study). The same group (Aya et al.) has clearly demonstrated that at least 4ml/kg has to be used in the 5 minutes' FC to induce a clear-cut hemodynamic response [5]. The delayed,



but comparable, hemodynamic effect of slow vs. fast infusion further supports the data observed by Hahn et al. [25] and Ukor et al. [26]. In multiple studies, Hahn et al. postulated based on hemoglobin dilution measurements that the expansion of circulating volume after crystalloid administration (especially after prolonged infusion) is far bigger than theorized. They have also demonstrated a significant context sensitivity of the phenomenon [6]. Ukor et al. compared an infusion of one-liter saline to 6 healthy volunteers over 30 minutes and 2 hours [26]. The 2 hours' infusion produced more stable hemodynamic response as measured via noninvasive technology. Hemoglobin values were not consistently monitored in our patients, but the PiCCO cardiac output device demonstrated a stable profile in hemodynamic in the later course especially after slow FC administration. However, one has to bear in mind that studying one simple intervention (as fluid administration) in a dynamic system (as any clinical situation) for a prolonged times is extremely difficult. Not only does redistribution occur which may be studied on relatively stable conditions of volunteers, but also other influences may contribute to the results (in our case surgery and anesthesia depth in surgical patients, change in vasoactive medications in septic patients). Still, the answer may be of utmost clinical relevance, namely, in the case of fluids administration whose adverse effects coupled with accumulation are nowadays well known. In our trial, we have attempted to minimize the confounders throughout the study period to the minimum: by choosing a relatively stable surgical procedure or by postponing all other medical interventions not vitally indicated (literally, only vasoactive drugs were adapted based on predefined protocol to reach generally accepted MAP targets).

Our study has several important limitations, which need to be accounted for. Firstly, in the OR cohort fluid responsiveness was assessed based on clinically available parameter usually coupled with positive response to fluid administration (decrease in PVI). Use of advanced hemodynamic monitoring would possibly define the secondary outcome more precisely. The reason to use the readily available noninvasive monitoring tools was based on the ethical request not to increase the invasivity of the monitoring used and noninvasive hemodynamic monitor was not technically available at the time of the study. Therefore, we have used parameter, which is routinely available and possibly acceptable for definition of positive fluid response. In addition, the conditions in spinal surgery are rather specific (prone position, no exposure of the body cavities, limited blood loss) limiting the generalizability of our results into other populations (i.e., intra-abdominal, vascular, thoracic surgery, etc.). Secondly, the number of septic patients recruited into the study is low and could influence observed results. As mentioned in the methods section the inclusion of these patients was limited by the time of device availability and we have recruited the whole cohort of septic patients admitted to the ICU throughout the study period. Besides, the negative finding on the influence of fluid challenge infusion time goes in line with previous observations as reviewed by Toscani et al. [23] and Messina et al. [24].

In conclusion, in our trial fluid challenge administration was associated with increased perfused boundary region (and

presumable volume changes of the endothelial glycocalyx) which normalized within the next 60 minutes in surgical patients but remained impeded in septic fluid responders.

The fluid responsiveness rate after fast (5-10 minutes) and slow (20-30 minutes) fluid challenge administration was comparable in our patients. Fast administration tended to induce higher, but transient, response in blood pressure.

### Data Availability

The raw data used to support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

### Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest relevant to the topic of this manuscript.

### Acknowledgments

This study is supported by Ministry of Health of the Czech Republic, grant no. 15-31881A. All rights reserved.

### Supplementary Materials

The ESM consists of two results tables displaying the detailed results of each variable at each time point in the general population and each cohort (i.e., surgical and septic patients). Table 1 concerns the separation based on intervention, i.e., groups separated according to fast or slow administration of fluid challenge. Table 2 compares the groups based on fluid challenge results, meaning based on positive or negative fluid response. In addition, the CONSORT flow chart and reference table were added to the ESM based on the reviewers' comments. (*Supplementary Materials*)

### References

- [1] J. Benes, "Cumulative Fluid Balance: The Dark Side of the Fluid," *Critical Care Medicine*, vol. 44, no. 10, pp. 1945-1946, 2016.
- [2] P. Marik and R. Bellomo, "A rational approach to fluid therapy in sepsis," *British Journal of Anaesthesia*, vol. 116, no. 3, pp. 339-349, 2016.
- [3] M. Cecconi, C. Hofer, J.-L. Teboul et al., "Fluid challenges in intensive care: the FENICE study: a global inception cohort study," *Intensive Care Medicine*, vol. 41, no. 9, pp. 1529-1537, 2015.
- [4] H. D. Aya, I. C. Ster, N. Fletcher, R. M. Grounds, A. Rhodes, and M. Cecconi, "Pharmacodynamic analysis of a fluid challenge," *Critical Care Medicine*, vol. 44, no. 5, pp. 880-891, 2016.
- [5] H. D. Aya, A. Rhodes, I. Chis Ster, N. Fletcher, R. M. Grounds, and M. Cecconi, "Hemodynamic effect of different doses of fluids for a fluid challenge: A quasi-randomized controlled study," *Critical Care Medicine*, vol. 45, no. 2, pp. e161-e168, 2017.
- [6] R. G. Hahn and G. Lyons, "The half-life of infusion fluids," *European Journal of Anaesthesiology*, vol. 33, no. 7, pp. 475-482, 2016.
- [7] M. Biais, H. De Courson, R. Lanchon et al., "Mini-fluid Challenge of 100 ml of Crystalloid Predicts Fluid Responsiveness in the Operating Room," *Anesthesiology*, vol. 127, no. 3, pp. 450-456, 2017.

- [8] D. Chappell, D. Bruegger, J. Potzel et al., "Hypervolemia increases release of atrial natriuretic peptide and shedding of the endothelial glycocalyx," *Critical Care*, vol. 18, no. 5, article 538, 2014.
- [9] V. Cerny, D. Astapenko, F. Brettner et al., "Targeting the endothelial glycocalyx in acute critical illness as a challenge for clinical and laboratory medicine," *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, vol. 54, no. 5, pp. 343–357, 2017.
- [10] T. E. Woodcock and T. M. Woodcock, "Revised Starling equation and the glycocalyx model of transvascular fluid exchange: an improved paradigm for prescribing intravenous fluid therapy," *British Journal of Anaesthesia*, vol. 108, no. 3, pp. 384–394, 2012.
- [11] T. Tatara, "Context-sensitive fluid therapy in critical illness," *Journal of Intensive Care*, vol. 4, no. 1, 2016.
- [12] D. H. Lee, M. J. Dane, B. M. van den Berg et al., "Deeper Penetration of Erythrocytes into the Endothelial Glycocalyx Is Associated with Impaired Microvascular Perfusion," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 5, p. e96477, 2014.
- [13] C. A. Vlahu, B. A. Lemkes, D. G. Struijk, M. G. Koopman, R. T. Krediet, and H. Vink, "Damage of the endothelial glycocalyx in dialysis patients," *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 23, no. 11, pp. 1900–1908, 2012.
- [14] A. Rovas, A. Lukasz, H. Vink et al., "Bedside analysis of the sublingual microvascular glycocalyx in the emergency room and intensive care unit – the GlycoNurse study," *Scandinavian Journal of Trauma, Resuscitation and Emergency Medicine*, vol. 26, no. 1, 2018.
- [15] M. A. Puskarich, D. C. Cornelius, J. Tharp, U. Nandi, and A. E. Jones, "Plasma syndecan-1 levels identify a cohort of patients with severe sepsis at high risk for intubation after large-volume intravenous fluid resuscitation," *Journal of Critical Care*, vol. 36, pp. 125–129, 2016.
- [16] M. F. Powell, M. Mathru, A. Brandon, R. Patel, and M. A. Frölich, "Corrigendum to "Assessment of endothelial glycocalyx disruption in term parturients receiving a fluid bolus before spinal anesthesia: a prospective observational study" (*International Journal of Obstetric Anesthesia* (2014) 23 (330–334) (S0959289X14000843)(10.1016/j.ijoa.2014.06.001))." *International Journal of Obstetric Anesthesia*, vol. 28, p. 100, 2016.
- [17] Y. Zeng, J. M. Tarbell, and M. C. Vinci, "The Adaptive Remodeling of Endothelial Glycocalyx in Response to Fluid Shear Stress," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 1, p. e86249, 2014.
- [18] M. Belavić, V. Sotošek Tokmadžić, E. Fišić et al., "The effect of various doses of infusion solutions on the endothelial glycocalyx layer in laparoscopic cholecystectomy patients," *Minerva Anestesiologica*, vol. 84, no. 9, 2018.
- [19] D. Anand, S. Ray, L. M. Srivastava, and S. Bhargava, "Evolution of serum hyaluronan and syndecan levels in prognosis of sepsis patients," *Clinical Biochemistry*, vol. 49, no. 10–11, pp. 768–776, 2016.
- [20] L. S. Murphy, N. Wickersham, J. B. McNeil et al., "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," *Annals of Intensive Care*, vol. 7, no. 1, 2017.
- [21] A. Y. Gorshkov, M. V. Klimushina, S. A. Boytsov, A. Y. Kots, and N. G. Gumanova, "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*, vol. 25, no. 4, p. e12454, 2018.
- [22] J.-L. Vincent and M. H. Weil, "Fluid challenge revisited," *Critical Care Medicine*, vol. 34, no. 5, pp. 1333–1337, 2006.
- [23] L. Toscani, H. D. Aya, D. Antonakaki et al., "What is the impact of the fluid challenge technique on diagnosis of fluid responsiveness? A systematic review and meta-analysis," *Critical Care*, vol. 21, no. 1, 2017.
- [24] A. Messina, F. Longhini, C. Coppo et al., "Use of the Fluid Challenge in Critically Ill Adult Patients," *Anesthesia & Analgesia*, vol. 125, no. 5, pp. 1532–1543, 2017.
- [25] R. G. Hahn, "Why are crystalloid and colloid fluid requirements similar during surgery and intensive care?" *European Journal of Anaesthesiology*, vol. 30, no. 9, pp. 515–518, 2013.
- [26] I. F. Ukor, A. K. Hilton, M. J. Bailey, and R. Bellomo, "The haemodynamic effects of bolus versus slower infusion of intravenous crystalloid in healthy volunteers," *Journal of Critical Care*, vol. 41, pp. 254–259, 2017.

### 11.3 Příloha č.3

Clinical Hemorheology and Microcirculation 72 (2019) 11–21  
DOI 10.3233/CH-180428  
IOS Press

11

## Neuraxial anesthesia is less harmful to the endothelial glycocalyx during elective joint surgery compared to general anesthesia

David Astapenko<sup>a,\*</sup>, Jiri Pouska<sup>b</sup>, Jan Benes<sup>b</sup>, Roman Skulec<sup>c,d</sup>, Christian Lehmann<sup>e,f,g,h,i</sup>, Hans Vink<sup>j</sup> and Vladimir Cerny<sup>a,c,d,e</sup>

<sup>a</sup>Department of Anaesthesiology and Intensive Care, University Hospital Hradec Kralove, Charles University, Hradec Kralove, Czech Republic; Faculty of Medicine in Hradec Kralove, Hradec Kralove, Czech Republic

<sup>b</sup>Department of Anaesthesiology and Intensive Care, University Hospital Plzen, Charles University, Plzen, Czech Republic; Faculty of Medicine in Plzen, Plzen, Czech Republic

<sup>c</sup>Department of Anaesthesiology, Perioperative Medicine and Intensive Care, J.E. Purkinje University, Masaryk Hospital, Usti nad Labem, Czech Republic

<sup>d</sup>Centrum for Research and Development, University Hospital Hradec Kralove, Hradec Kralove, Czech Republic

<sup>e</sup>Department of Anesthesia, Pain Management and Perioperative Medicine, Dalhousie University, Halifax, NS, Canada

<sup>f</sup>Department of Microbiology and Immunology, Dalhousie University, Halifax, NS, Canada

<sup>g</sup>Department of Pharmacology, Dalhousie University, Halifax, NS, Canada

<sup>h</sup>Department of Physiology and Biophysics, Dalhousie University, Halifax, NS, Canada

<sup>i</sup>Department of Computer Science, Dalhousie University, Halifax, NS, Canada

<sup>j</sup>Department of Physiology, Cardiovascular Research Institute Maastricht, Maastricht, The Netherlands

#### Abstract.

**BACKGROUND:** Damage of the endothelial glycocalyx (EG) has been described during surgery, but the effect of different anesthesia techniques remains unknown. Perfused boundary region (PBR) evaluated by side-stream dark field (SDF) imaging of the sublingual microcirculation enables *in vivo* EG assessment. PBR values are inversely related to the EG thickness.

**OBJECTIVE:** The aim of the observational study was to evaluate the changes of PBR in patients undergoing elective joint surgery under general (GA) vs. neuraxial anesthesia (NA). Our hypothesis was that PBR will be lower in patients in NA.

**METHODS:** Sixty consecutive patients (ASA 1–3) undergoing elective total knee or hip replacement under GA or NA were included in this prospective observational cohort study. PBR in the sublingual microcirculation was recorded in each patient using SDF at two time points - before surgery and 2 hours after surgery.

**RESULTS:** Before surgery, there was no significant difference in baseline PBR between groups (NA: 1.95  $\mu\text{m}$  ( $\pm 0.24$ ); GA: 2.02  $\mu\text{m}$  ( $\pm 0.26$ );  $p = 0.098$ ). Postoperatively (2 hours after surgery) PBR was significantly increased in both groups with respect to baseline values (NA: 2.09  $\mu\text{m}$  ( $\pm 0.19$ ), GA: 2.20  $\mu\text{m}$  ( $\pm 0.25$ );  $p < 0.001$ ). In the GA group, postoperative PBR values were significantly higher than in the NA group ( $p = 0.006$ ).

\*Corresponding author: David Astapenko, M.D. Department of Anesthesiology, Resuscitation and Intensive Care Medicine, University Hospital Hradec Kralove, Sokolska 581, 500005 Hradec Kralove, Czech Republic. Tel.: +420 60 81 77 374; Fax: +420 49 58 32 022; E-mail: Astapenko.d@seznam.cz.

**CONCLUSION:** Joint surgery led to significant increases of PBR. Patients in the GA group had significantly higher PBR values 2 hours after surgery compared to NA group. This might implicate that NA is associated with less EG damage than GA in elective hip/knee surgery.

Keywords: Endothelial glycocalyx, neuraxial anesthesia, joint surgery

### List of abbreviations

EG endothelial glycocalyx  
GA general anesthesia  
ICU intensive care unit  
NA neuraxial anesthesia  
PBR perfused boundary region  
RBC red blood cells.

### 1. Background

Endothelial glycocalyx (EG) is a gel-like sugar-based structure, lining the apical surface of endothelial cells [1, 2]. It has been considered as a major regulator of endothelial functions [3–5]. The key role of EG is to modulate extravascular fluid shifts and prevent a direct contact between endothelial cells and circulating inflammatory or pro-coagulant triggers [6]. Importantly, EG represents not only a passive barrier between intravascular compartment and the endothelial surface, but it plays an important role in the regulation of inflammatory processes, ischemia and reperfusion injury, and modulation of endothelial production of nitric oxide by mechanotransduction of fluid shear stress [7, 8]. The delicate nature of its carbohydrate-based structure predisposes EG to be fragile and to respond rapidly to noxious stimulation of various origins and to date, the role of EG in clinical medicine is being increasingly appreciated [3]. In addition the composition and dimensions of EG fluctuates even in a physiological condition mainly due to the shear stress from the flowing blood elements and it is continuously regenerated by the synthesis from the endothelial cells [9]. The current evidence suggests that under virtually all critical conditions (e.g. sepsis, trauma, hypoxia) a distortion of the structure and function of EG may occur which in turn can contribute to the distortion of the microcirculation, thrombosis [10] and the subsequent development of organ dysfunction and organ failure [11, 12].

Visualization of the EG in humans is extremely difficult, mainly because of its microscopic dimension and fragility. Until recently, direct *in vivo* visualization of EG in humans has been unsuccessful. The EG is partially accessible to flowing red blood cells at its luminal side, a portion called the Perfused Boundary Region (PBR). The EG forms a mechanical, protective barrier that limits radial motion of flowing red blood cells towards the endothelial surface. Damage to glycocalyx results in increased PBR, which can be measured in human sublingual microvasculature recordings obtained by one of the imaging techniques currently available, e.g. Sidestream Dark Field (SDF) or just recently introduced Incident Dark Field (IDF) imaging technology [13, 14].

Changes in EG related to anesthesia and perioperative medicine are lacking detailed exploration so far [15] and more information about the effect of different treatment strategies [16] may significantly affect the way we look at anesthesia and related interventions in terms of their possible impact on EG.

## 2. Objective

The aim of this study was to evaluate PBR value changes as *in vivo* marker of EG thickness in patients undergoing elective hip/knee surgery under general (GA) and neuraxial anesthesia (NA). Our primary hypothesis was that NA affects EG less than GA due to the omission of oxidative stress from general anesthetics.

## 3. Methods

### 3.1. Study design and setting

A prospective observational study that has been approved by a local ethical committee and registered at ClinicalTrials.gov (<https://clinicaltrials.gov>, ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02783443). The study was performed at the University Hospitals Hradec Kralove and Plzen (Czech Republic).

### 3.2. Participants

Adult patients scheduled for elective total knee/hip replacement under GA and NA (either epidural or spinal) were included in this prospective observational study conducted at two university hospitals. Patients were recruited consecutively during a pre-admission clinic visit from October 2015 to December 2016. Inclusion criteria were: age above 18 years, American Society of Anesthesiologists Physical Status (ASA) 1–3, no history of any oncological disease, and not an active smoker. Patients were investigated after obtaining informed consent. Patients were excluded in the case of surgery cancellation or refusal of the second recording of the microcirculation. After enrolment to the study a designated physician followed patients until hospital discharge. GA group of patients were premedicated with morphine 0.1 mg/kg (Morphine, BB Pharma, Prague, Czech Republic) intramuscular injection. Induction of anesthesia by propofol 2 mg/kg (Propofol, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Germany), sufentanil 0.2 µg/kg (Sufentanil Torrex, Chiesi CZ, Prague, Czech Republic) and atracurium 0.4 mg/kg (Tracrium, Aspen Pharma, Dublin, Ireland). The airway was secured by orotracheal intubation. Anesthesia and analgesia was maintained by sevoflurane 0.7–1 MAC (Sevorane, AbbVie, Prague, Czech Republic) in a fresh gas mixture with air and 0.4 F<sub>1</sub>O<sub>2</sub> and sufentanil 0.1 µg/kg. Balanced crystalloid solution was used for fluid therapy (Ringerfundin, BBraun, Melsungen, Germany) at basal rate 2 ml/kg/hour with additional boluses as required during surgery according to the blood loss. NA group of patients were premedicated with oral bromazepam 1.5 mg (Lexaurin, Kabu Pharma, Prague, Czech Republic). Subarachnoid anesthesia was done by lumbar puncture (Quinke needle, 25 G, BBraun, Melsungen, Germany) and injection of 2ml of 0.5% levobupivacaine (Chirocaine, AbbVie, Prague, Czech Republic) and 2.5 µg of sufentanil intrathecally. Balanced crystalloid solution was used for fluid therapy (Ringerfundin, BBraun, Melsungen, Germany) at basal rate 2 ml/kg/hour with additional boluses as required during surgery according to the blood loss and blood pressure drop after subarachnoid blockade. Intraoperative sedation was induced and maintained by midazolam 1 mg intravenously (Accord Healthcare, North Harrow, UK) and sufentanil 5 µg intravenously. Supplementary oxygen was provided by face mask with flow of 5 L/minute. In both groups the blood pressure was kept in a range ± 20% from baseline. If vasopressor was required, an intravenous dose of 10mg of ephedrine (Ephedrin biotika, BB Pharma, Prague, Czech Republic) was used. The tourniquet was used only in knee replacement in patients in NA group on the thigh of the operated leg with pressure of 220 mmHg. The bone cement was used according to the type of alloplastic.

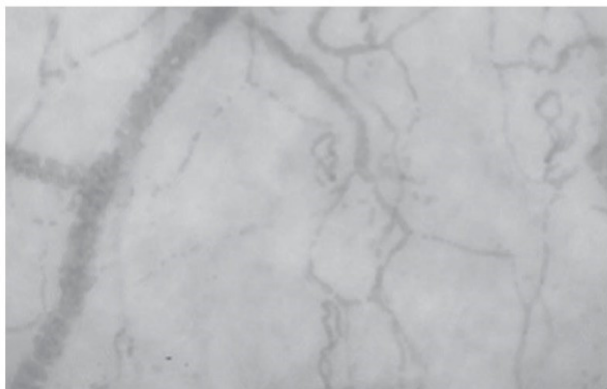


Fig. 1. The original image of the sublingual microcirculation. Surface area: 915x686  $\mu\text{m}$ . Magnification: 325x. Recorded by SDF camera.

The primary outcome of the study was the change in PBR values 2 hours after surgery. Selected clinical and laboratory variables were also recorded preoperatively (age, gender, patient's history - any type of vascular disease, hypertensive on medication, diabetes mellitus (on insulin, oral antidiabetic agents or diet), concomitant medication - beta-blockers, statins, insulin, ACE inhibitors, calcium channel blockers, steroids or immunosuppressing drugs taken longer than one week prior the surgery, routinely ordered laboratory values), during and after anesthesia/surgery (heart rate, blood pressure, pulse oximetry, body temperature, type of anesthesia, type and length of surgery, major and minor intra-operative adverse events (a major adverse event was defined as a complication leading to unplanned admission to intensive care unit (ICU) within 48 hours, a minor adverse event was defined as a complication in the patient documentation that needed therapeutic intervention without admission to ICU), estimated blood loss, amount of fluids/colloids given, amount of transfusion units given during the surgery and up to 2 hours after the surgery).

### 3.3. Perfused boundary region

For each patient, we scheduled two successive visits at the bedside to obtain recordings of the capillary web of the sublingual microcirculation. The first visit was before surgery (T1) and the second 2 hours after surgery (T2). Patients were given a glass of lukewarm water to rinse the saliva off the sublingual mucosa. On each visit, we performed two recordings from one side of the sublingual area. Microcirculation videos were recorded by specialized hand-held video microscope (KK camera, Research Technology Limited, Alliance Court, Honiton, UK; Fig. 1) connected to a laptop computer with specialized recording and analysis software (GlycoCheck, Maastricht, the Netherlands).

Perfused boundary region (PBR) describes the extent of penetration of the flowing red blood cells (RBC) in  $\mu\text{m}$  into the luminal surface of the EG by measuring the radial motion of RBC away from the central flow towards the endothelial cells. The more the EG is injured, the deeper RBC penetrates into the glycocalyx and the higher the PBR is. The software automatically measures PBR in vessels of diameter ranging from 5 to 25  $\mu\text{m}$  (capillaries exclusively) and the resulting number stands for an average of PBR that is corrected for the potential changes in the distribution of vessel diameters. A detailed description of PBR calculation has already been described elsewhere [17]. Briefly, the software identifies all available vessels and places 10  $\mu\text{m}$  long vascular segments along them (Fig. 2).

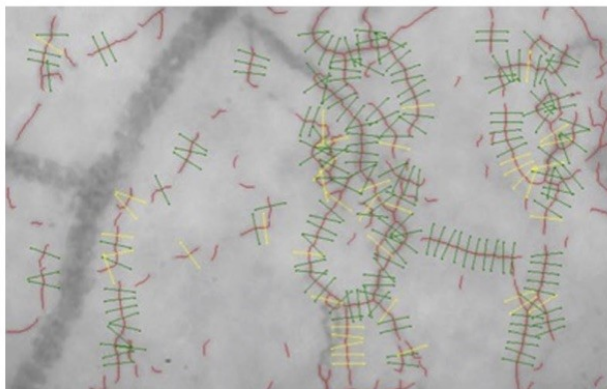


Fig. 2. Image of the software processing of the Fig. 1. Image processing by GlycoCheck analysis software. Red lines trace all available vessels with diameters from 5 to 25 Åm. Green lines are demarking vascular segments selected for the analysis. Yellow lines are bordering invalid segments.

The recording is stopped when 3000 segments are acquired in focus and without movement. Then the software selects segments with sufficient contrast with the background and counts the median RBC column width and its distribution from the intensity profile. From this intensity profile, the perfused diameter of the vessel is calculated by a linear regression analysis. The PBR stands for the distance between RBC column width and perfused diameter according to the equation:  $(\text{Perfused diameter} - \text{median RBC column width})/2$ .

#### 3.4. Statistical analysis

Based on the expected difference in PBR between patients under GA and NA, the alpha error  $I = 0.05$  and study power = 0.99, sample size calculation was 52 patients. We aimed to enrol 60 consecutive patients to reach 30 patients with each type of anesthesia, either general anesthesia or neuraxial.

For statistical analysis, we used Graph Pad Prism v6.0c (GraphPad Software, Inc., CA, USA). All data were tested for normality prior testing by D'Agostino-Pearson omnibus normality test. Data are expressed as mean (and standard deviation) or median (and interquartile range), a value of  $p \leq 0.05$  was considered as statistically significant for paired and unpaired  $t$ -tests. Z-test we used for two populations proportion analysis.

## 4. Results

Sixty-three patients were initially enrolled; one patient was canceled before surgery due to a myocardial infarction and two patients refused to have their microcirculation be recorded again due to the irritating sensation in the mouth and nausea during the first recording. Thirty patients underwent hip/knee replacement surgery under general anesthesia (GA group) and thirty patients under neuraxial anesthesia (NA group). Baseline clinical characteristics of both groups are summarized in Table 1, except for bodyweight (significantly higher weight in GA group) there were no significant differences. There were also no significant differences in selected preoperative and postoperative variables - glycemia, natremia, creatinine and hemoglobin levels, and blood loss or fluid balance response. (Table 2).

Table 1  
Basic demographic and surgery data

Patients' data	GA	NA	<i>p</i> value
Age [years]	66.63 (7.08)	67.13 (9.81)	0.82
Gender [%]	F 53, M 47	F 47, M 53	0.19
Weight [kg]	91.46 (17.29)	81.30 (19.87)	0.04
Height [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
Type of surgery			
Hip replacement	18	21	0.21
Knee replacement	12	9	0.21
Prime - implantation (hip or knee)	27	24	0.14
Revision surgery (hip or knee)	3	6	0.14

Baseline clinical characteristics of both groups. GA - general anesthesia, NA - neuraxial anesthesia. ASA - American Society of Anesthesiologists physical status. M - male, F - female. Data are presented as mean (standard deviation).

Table 2  
Selected laboratory and intraoperative course data

Patients' data	GA	NA	<i>p</i> value
Glycemia [mmol/l]	5.40 (5–6)	5.55 (4.88–6.43)	0.53
Natremia [mmol/l]	140 (2.42)	139.50 (2.35)	0.42
Creatinine [mmol/l]	73 (62.70–77.00)	77 (67.50–86.50)	0.17
Hemoglobin [g/l]	140.90 (13,72)	139.30 (15.97)	0.68
Hematocrit [%]	41.23 (3.72)	42.03 (4.46)	0.45
Blood loss [ml]	400 (237.50–600)	300 (300–500)	0.68
Fluid balance [ml]	1175 (910–1638)	1550 (975–1800)	0.22

Variables related to the intraoperative course. GA - general anesthesia, NA - neuraxial anesthesia. Data are presented as mean (standard deviation) or median (interquartile range).

Patients' medical history is summarised in Table 3. The tourniquet was used in knee replacement surgery in patients in NA (9 patients) as well as bone cement. Before surgery, there was no significant difference in PBR between groups (1.95  $\mu\text{m}$  ( $\pm 0.24$ ) in NA vs. 2.02  $\mu\text{m}$  ( $\pm 0.26$ ) in GA,  $p = 0.098$ ). Two hours after surgery PBR significantly increased in both groups with respect to baseline values (NA: 2.09  $\mu\text{m}$  ( $\pm 0.19$ ),  $p < 0.001$ ; GA: 2.20  $\mu\text{m}$  ( $\pm 0.25$ ),  $p < 0.001$ ). Moreover, PBR significantly differed between NA and GA group 2 hours after surgery ( $p = 0.006$ ) (Table 4, Fig. 3). In NA group, 3 patients (10%) were reported to have a postoperative adverse event. In GA group 14 patients (47%), the difference reached statistical significance ( $p < 0.001$ ). Major adverse events were a pulmonary embolism (one patient in NA group), myocardial infarction (one patient in NA group), deep venous thrombosis (one patient in GA group) and supraventricular arrhythmia (one patient in GA group). Table 5 summarizes minor postoperative adverse events in both groups.



Table 3  
Summarisation of patients' medical history

Patients' history	GA	NA	<i>p</i> value
Hypertension	21	18	0.42
Antihypertensive drugs	21	18	0.42
Diabetes mellitus	5	9	0.22
PAD/insulin	3	7	0.16
Dyslipidaemia	9	10	0.78
Statins	9	10	0.78

GA – general anesthesia, NA – neuraxial anesthesia, PAD – per oral antidiabetic drugs.

Table 4  
The endothelial glycocalyx analysis data

PBR [ $\mu$ m]	GA	NA	<i>p</i> value
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

Results of the endothelial glycocalyx measurement. PBR - perfused boundary region, PBR\_2 – perfused boundary region in 2 hours after the surgery, GA - general anesthesia, NA - neuraxial anesthesia. Data are presented as mean (standard deviation).

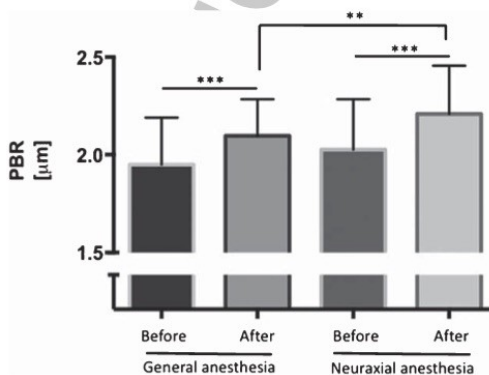


Fig. 3. Graph of the endothelial glycocalyx analysis data. PBR results in both groups. PBR - perfused boundary region. Data are presented as mean (columns) and standard deviation (error bars).

## 5. Discussion

Our study showed that elective joint surgery led to increased PBR dimensions and that patients in GA group had higher PBR 2 hours after surgery compared to NA group. We have chosen this interval of 2 hours after surgery because patients had entirely recovered from both types of anesthesia, and

Table 5  
Postoperative adverse events

Minor postoperative adverse events	GA	NA	p value
Anemia	2	0	0.07
Obstipation	0	1	0.15
PONV	8	0	0.001
Delirium	2	0	0.07
Total	12	1	<0.001

Summary of minor postoperative adverse events.  
PONV - postoperative nausea and vomiting.

in addition EG regenerates in days back to full thickness. Therefore, 2 hours after the surgery, the presumed damage would be best detectable [2]. Since PBR is an indicator of endothelial glycocalyx thickness, obtained data supports the hypothesis that neuraxial anesthesia techniques are associated with a lower extent of EG damage compared to general anesthesia for the given surgical procedure. Different types of surgery under general anesthesia have been associated with glycocalyx injury [18, 19] and a term “endotheliopathy” has been just recently introduced in order to describe changes of vascular endothelium with regard to trauma, which has many common features with elective surgery [20]. There is ongoing discussion whether or not the choice of the anesthetic may affect the outcome after total hip replacement [21–24] and there is limited evidence favouring neuraxial anesthesia techniques in term of better postoperative outcome as shown in a recent systematic review by Johnson et al. [24]. The vascular endothelium is one of the earliest sites of injury during inflammation [25, 26], ischemia-reperfusion injury [25, 27] and trauma [12, 15, 28] - all those events are present during surgery to some extent. Attenuating endothelial injury could be the result of better blocking afferent inputs from the surgical field, reduced systemic inflammatory response to surgery and more efficient sympathetic blockade attributed to neuraxial blockade [29]. However, further mechanisms may play a role - less amount of intravenous anaesthetics given, modulating vascular tone or modulating cell to cell interaction by local anaesthetic agents [29, 30].

Our study has several limitations. Firstly, we used PBR as the only method for the evaluation of EG damage. PBR describes the extent of penetration of the flowing RBC in  $\mu\text{m}$  into the EG by measuring the deviation of RBC from the central flow towards the endothelial cells. EG damage results in deeper penetration of RBC and is reflected by increased PBR value. Despite the fact that PBR was used as an indicator reflecting glycocalyx thickness in various clinical scenarios [9, 31–38], the current report of peri-operative glycocalyx changes would benefit from combining PBR with measuring other humoral markers (e.g. syndecan-1, hyaluronan, heparan sulfate) to estimate glycocalyx shedding *in vivo*. However, none of these circulating glycobiological markers are specific to endothelia. Moreover, they are strongly affected by extravascular tissue damage and changes in hepatic function which is a major obstacle to their use in clinical medicine [26, 35]. Secondly, alterations of EG by factors other than the choice of the anesthetics cannot be ruled out - e.g. preoperative fluid status, the fluid amount given during surgery, types of fluids given, blood loss (in our study none of the patients required transfusion in the first two hours after the surgery), chronic diseases, usage of tourniquet and bone cement (in our study 9 patients out of 60) [30, 36, 37]. We presumed hip and knee surgery were comparable in the severity of surgical trauma. Thirdly, our study was not randomized, and patients entered the study in consecutive fashion at two different departments that may cause bias in patient selection and therefore affect study results.

Due to the key role of EG in humans in protecting the vascular endothelium against capillary leakage, inflammation, and coagulation, the injury of glycocalyx is expected to lead to an increased capillary permeability resulting in tissue edema, a proinflammatory environment, hypercoagulability and loss of vascular reactivity. Any of these mechanisms may contribute to the development of various postoperative non-surgical complications [3, 6, 38]. Limiting damage to the EG by using neuraxial blockade instead of general anesthesia may, therefore, serve as another piece of the puzzle in searching for an explanation why some authors report better outcome after the use of neuraxial anesthesia [26, 39, 40]. In our opinion, our findings support the idea that EG and its damage/dysfunction may play a non negligible role in the clinical outcome of surgical patients. Searching for the “glycocalyx-friendly” anesthesia techniques in order to mitigate EG damage caused by surgery might, therefore, represent an important research area. Preconditioning the EG (e.g. pharmacologically) before major elective surgery may serve as a future target in perioperative medicine.

## 6. Conclusion

Elective joint replacement surgery led to significant changes of PBR dimensions indicating EG damage during the procedure. Undergoing the procedure under neuraxial blockade was associated with less EG damage compared to general anesthesia as measured by PBR. Preservation of the EG may be associated with a decreased rate of postoperative complications.

## Acknowledgments

Supported by Ministry of Health of the Czech Republic, grant no. 15-31881A. All rights reserved.

Authors' contribution: David Astapenko acquired half of the data, collected all data, performed statistics, evaluated the results, was responsible for manuscript writing, editing and submission, images, graph, and tables preparation. Jiri Pouska acquired half of the data. Jan Benes was responsible for manuscript editing and evaluation of the results. Roman Skulec was responsible for manuscript editing. Christian Lehmann evaluated the results, was responsible for manuscript editing and language check. Hans Vink was responsible for manuscript editing. Vladimir Cerny set up the study protocol, calculated the size of the patients' cohorts, evaluated the results and was responsible for manuscript writing, editing, and submission.

All authors read and approved the final manuscript.

David Astapenko, MD, provided images of his sublingual microcirculation for illustration. Petra Hirsova, PhD, contributed to the final shape of the manuscript.

Authors' information: Hans Vink is the Chief Scientific Officer of GlycoCheck BV, Maastricht, The Netherlands.

## Funding

Funding: Ministry of Health of the Czech Republic, grant no. 15-31881A.

Trial registration: ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02783443.

## References

- [1] Reitsma S, Slaaf DW, Vink H, van Zandvoort MAMJ, oude Egbrink MGA. The endothelial glycocalyx: Composition, functions, and visualization. *Pflugers Arch.* 2007;454(3):345-59. doi:10.1007/s00424-007-0212-8

- [2] Schött U, Solomon C, Fries D, Bentzer P. The endothelial glycocalyx and its disruption, protection and regeneration: A narrative review. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med.* 2016;24(1):48. doi:10.1186/s13049-016-0239-y
- [3] Tarbell JM, Cancell LM. The glycocalyx and its significance in human medicine. *J Intern Med.* 2016;280(1):97-113. doi:10.1111/joim.12465
- [4] Chappell D, Westphal M, Jacob M. The impact of the glycocalyx on microcirculatory oxygen distribution in critical illness. *Curr Opin Anaesthesiol.* 2009;22(2):155-62. doi:10.1097/ACO.0b013e328328d1b6
- [5] Alphonsus CS, Rodseth RN. The endothelial glycocalyx: A review of the vascular barrier. *Anaesthesia.* 2014;69(7):777-84. doi:10.1111/anae.12661
- [6] Nieuwdorp M, Meuwese MC, Vink H, Hoekstra JBL, Kastelein JJP, Stroes ESG. The endothelial glycocalyx: A potential barrier between health and vascular disease. *Curr Opin Lipidol.* 2005;16(5):507-11.
- [7] Seal JB, Gewertz BL. Vascular dysfunction in ischemia-reperfusion injury. *Ann Vasc Surg.* 2005;19(4):572-84. doi:10.1007/s10016-005-4616-7
- [8] Potter DR, van Teeffelen J, Vink H, van den Berg BM. Perturbed mechanotransduction by endothelial surface glycocalyx modification greatly impairs the arteriogenic process. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2015;309(4):H711-7. doi:10.1152/ajpheart.00257.2015
- [9] 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(11):1318-25. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.191585.
- [10] Hauser S, Jung F, Pietzsch J. Human Endothelial Cell Models in Biomaterial Research. *Trends Biotechnol.* 2017;35(3):265-77. doi:10.1016/j.tibtech.2016.09.007
- [11] Donati A, Damiani E, Domizi R, et al. Alteration of the sublingual microvascular glycocalyx in critically ill patients. *Microvasc Res.* 2013;90:86-9. doi:10.1016/j.mvr.2013.08.007.
- [12] Johansson PI, Henriksen HH, Stensballe J, et al. Traumatic Endotheliopathy: A Prospective Observational Study of 424 Severely Injured Patients. *Ann Surg.* 2016. doi:10.1097/SLA.0000000000001751
- [13] Goedhart PT, Khalilzada M, Bezemer R, Merza J, Ince C. Sidestream Dark Field (SDF) imaging: A novel stroboscopic LED ring-based imaging modality for clinical assessment of the microcirculation. *Opt Express.* 2007;15(23):15101-14.
- [14] Hutchings S, Watts S, Kirkman E. The Cytocam video microscope. A new method for visualising the microcirculation using Incident Dark Field technology. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2015;62(3):261-71. doi:10.3233/CH-152013
- [15] Clarification of the circulatory patho-physiology of anaesthesia - implications for high-risk surgical patients. *PubMed - NCBI.*
- [16] Brettner F, Chappell D, Nebelsiek T, et al. Preinterventional hydrocortisone sustains the endothelial glycocalyx in cardiac surgery. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2018;1-12. doi:10.3233/CH-180384
- [17] Lee DH, Dane MJC, van den Berg BM, et al. Deeper penetration of erythrocytes into the endothelial glycocalyx is associated with impaired microvascular perfusion. *PLoS One.* 2014;9(5):e96477. doi:10.1371/journal.pone.0096477
- [18] Schiefer J, Leberz-Eichinger D, Erdogmus G, et al. Alterations of Endothelial Glycocalyx During Orthotopic Liver Transplantation in Patients With End-Stage Liver Disease. *Transplantation.* 2015;99(10):2118-23. doi:10.1097/TP.0000000000000680
- [19] Arthur A, McCall PJ, Jolly L, Kinsella J, Kirk A, Shelley BG. Endothelial glycocalyx layer shedding following lung resection. *Biomark Med.* 2016;10(10):1033-8. doi:10.2217/bmm-2016-0163.
- [20] Ostrowski SR, Henriksen HH, Stensballe J, et al. Sympathoadrenal activation and endotheliopathy are drivers of hypocoagulability and hyperfibrinolysis in trauma. *J Trauma Acute Care Surg.* 2016;1. doi:10.1097/TA.0000000000001304
- [21] Kehlet H, Aasvang EK. Regional or general anesthesia for fast-track hip and knee replacement - what is the evidence? *F1000Research.* 2015;4. doi:10.12688/f1000research.7100.1
- [22] Mauermann WJ, Shilling AM, Zuo Z. A comparison of neuraxial block versus general anesthesia for elective total hip replacement: A meta-analysis. *Anesth Analg.* 2006;103(4):1018-25. doi:10.1213/01.ane.0000237267.75543.59
- [23] Hu S, Zhang Z-Y, Hua Y-Q, Li J, Cai Z-D. A comparison of regional and general anaesthesia for total replacement of the hip or knee: A meta-analysis. *J Bone Joint Surg Br.* 2009;91(7):935-42. doi:10.1302/0301-620X.91B7.21538
- [24] Johnson RL, Kopp SL, Burkle CM, et al. Neuraxial vs general anaesthesia for total hip and total knee arthroplasty: A systematic review of comparative-effectiveness research. *Br J Anaesth.* 2016;116(2):163-76. doi:10.1093/bja/aev455
- [25] Jiang D, Liang J, Noble PW. Hyaluronan as an immune regulator in human diseases. *Physiol Rev.* 2011;91(1):221-64. doi:10.1152/physrev.00052.2009
- [26] Kolářová H, Ambrůzová B, Sviháľková Šindlerová L, Klinke A, Kubala L. Modulation of endothelial glycocalyx structure under inflammatory conditions. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:694312. doi:10.1155/2014/694312
- [27] Svennevig K, Hoel T, Thiara A, et al. Syndecan-1 plasma levels during coronary artery bypass surgery with and without cardiopulmonary bypass. *Perfusion.* 2008;23(3):165-71. doi:10.1177/0267659108098215.

- [28] Schmidt EP, Li G, Li L, et al. The circulating glycosaminoglycan signature of respiratory failure in critically ill adults. *J Biol Chem.* 2014;289(12):8194-202. doi:10.1074/jbc.M113.539452
- [29] Hahnenkamp K, Herroeder S, Hollmann MW. Regional anaesthesia, local anaesthetics and the surgical stress response. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* 2004;18(3):509-27.
- [30] 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(6):12092-107. doi:10.3390/ijms160612092.
- [31] Cornelis T, Broers NJH, Titulaer DCLM, et al. Effects of ultrapure hemodialysis and low molecular weight heparin on the endothelial surface layer. *Blood Purif.* 2014;38(3-4):203-10. doi:10.1159/000369055
- [32] Damiani E, Adrario E, Luchetti MM, et al. Plasma free hemoglobin and microcirculatory response to fresh or old blood transfusions in sepsis. *PLoS One.* 2015;10(5):e0122655. doi:10.1371/journal.pone.0122655
- [33] Dane MJC, Khairoun M, Lee DH, et al. Association of kidney function with changes in the endothelial surface layer. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2014;9(4):698-704. doi:10.2215/CJN.08160813.
- [34] Donati A, Damiani E, Botticelli L, et al. The aPC treatment improves microcirculation in severe sepsis/septic shock syndrome. *BMC Anesthesiol.* 2013;13(1):25. doi:10.1186/1471-2253-13-25.
- [35] Subramanian SV, Fitzgerald ML, Bernfield M. Regulated shedding of syndecan-1 and -4 ectodomains by thrombin and growth factor receptor activation. *J Biol Chem.* 1997;272(23):14713-20.
- [36] Casanova J, Simon C, Vara E, et al. Sevoflurane anesthetic preconditioning protects the lung endothelial glycocalyx from ischemia reperfusion injury in an experimental lung autotransplant model. *J Anesth.* 2016;30(5):755-62. doi:10.1007/s00540-016-2195-0
- [37] Kim Y-H, Nijst P, Kiefer K, Tang WHW. Endothelial Glycocalyx as Biomarker for Cardiovascular Diseases: Mechanistic and Clinical Implications. *Curr Heart Fail Rep.* 2017;14(2):117-26. doi:10.1007/s11897-017-0320-5
- [38] Schmidt EP, Yang Y, Janssen WJ, et al. The pulmonary endothelial glycocalyx regulates neutrophil adhesion and lung injury during experimental sepsis. *Nat Med.* 2012;18(8):1217-23. doi:10.1038/nm.2843
- [39] 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, ed. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2014:CD010108. doi:10.1002/14651858.CD010108.pub2
- [40] Lindberg-Larsen V, Ostrowski SR, Lindberg-Larsen M, Røvsing ML, Johansson PI, Kehlet H. The effect of preoperative methylprednisolone on early endothelial damage after total knee arthroplasty: A randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Anaesthesia.* 2017. doi:10.1111/anae.13983

## 12 PODĚKOVÁNÍ

Chtěl bych poděkovat za cenné rady, možnost spolupráce, potřebnou důslednost a nevyčerpatelnou energii při vedení mého studia doc. MUDr. Janu Benešovi, Ph.D.

Děkuji kolegům a přátelům MUDr. Jakubu Kletečkovi, Ph.D. a MUDr. Janu Zatloukalovi, Ph.D. za zkušenosti a zdroj optimismu na cestě postgraduálním studiem.

A především děkuji rodičům, bez nichž bych toto ani magisterské studium neuskutečnil a partnerce Lucii a dceři Anně, které mi na přípravu disertace velkoryse poskytly dostatek prostoru, času a klidu.