Naslov: **Učinki novih metod v kardiokirurgiji**, ARRS J7-7138

Tip raziskave: Temeljni projekt

Financer: Javna agencija za raziskovalno dejavnost RS, ARRS

Bleiweisova cesta 30, 1000 Ljubljana

www.arrs.gov

Trajanje: 2016-2018

Sodelujoči: Univerzitetni klinični center Ljubljana, Ljubljana

Univerza v Ljubljani, Medicinska Fakulteta, Ljubljana

Vodja: prof.dr. Matej Podbregar, e-pošta: matej.podbregar@kclj.si

Etična presoja**:** Komisja za medicinsko etiko RS, http://www.kme-nmec.si/

Mednarodna registracija raziskave: ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02666703 NCT02697786

POVZETEK

Ozadje: Z uporabo zunajtelesnega krvnega obtoka (ZTKO), ki je nepogrešljiv za večino operacij na odprtem srcu, je povezan nezaželen sistemski vnetni odgovor. Ta kompleksna veriga dogodkov ima veliko podobnosti s sepso in lahko prispeva k razvoju pooperativnih zapletov, vse do končne večorganske odpovedi in smrti. Dokazano je bilo, da se lahko med in po ZTKO sproži proti vnetni odgovor. Ravnovesje vnetnih in proti vnetnih posrednikov določa vnetni odgovor in klinični izhod. V skladu s tem si prizadevamo z različnimi metodami in učinkovinami (npr.uporaba kortikosteroidov, spremembo kirurške tehnike ter mehaničnih naprav) zmanjašti vnetne reakcije med ZTKO. Takšen način zdravljenja in obravnave bolnikov zagotovijo izboljšanje izzida zdravljenja. Serumska paroksonaza 1 (PON1) je lipo-laktonaza povezana s HDL, ki ima protivnetno vlogo.Eksosomi so nanovezikli, ki jih izločajo celice, in so pomebni za medcelične signaliziranje. Vprašanje je, če pri uporabi zunajtelesne imunoabsorbcije lahko pride do absorpcije tudi protivnetnih zaščitnih medijatorjev, kot je PON1 , in eksosomov ter kakšen je klinični pomen tega.
Možganske poškodbe po zamenjavi aortne zaklopke (ang. Aortic valve replacement AVR) vključujejo možgansko kap, komo, encefalopatijo, delirij in upad kognitivnih sposobnosti. Intraoperativni možganski emboli so pomemben mehanizem takšne poškodbe, saj lahko plinasti ali trdni emboli v možganih povzročijo ishemijo, vnetje in edem ter posledično povzročajo možganske mikroinfarkte. Zamenjava aortne zaklopke s pristopom preko popolne sternotomije (ang. Full Sternotomy, FS) je standardni kirurški pristop. Aortno zaklopko je možno zamenjati tudi preko delne sternotomije, ko kirurg prereže le del prsnice, takrat govorimo o minimalno invazivni kirurgiji (ang. Minimally invasive surgery MIS). V primerjavi s FS ja za MIS značilno, da je pooperativna bolečina manjša, okrevanje po operaciji je hitrejše, krajši je čas zdravljenja v bolnišnici, manjša je umrljivost in ne nazadnje je estetski učinek boljši. MIS je za kirurga tehnično bolj zahteven postopek, lahko je podaljšan čas trajanja ZTKO, nepopolno odzračevanje srca ob koncu ZTKO pa je lahko povezano s povečanim tveganjem za možgansko plinsko embolizacijo. Zaradi tega izbira MIS v primerjavi FS pri zamenjavi aortne zaklopke predstavlja dodatno tveganje za možgansko poškodbo. Možganske mikroembolične signali (MES) lahko zaznamo v realnem času s transkranialnem doplerskem pregledom (ang.Transcranialni doppler, TCD).

Namen: Z našimi ugotovitvami želimo izboljšati kardiokirurške tehnike, tako da bi kar najbolj zmanjšali vnetni odgovor po ZTKO in zmanjšali upad kognitivnih funkcij. Prvi namen raziskave, ki bo potekala na Kliničnem oddelku za kirurgijo srca in ožilja v UKC Ljubljana, je analizirati učinke neselektivne zunajtelesne imunoadsobcije na razvoj vnetnega imunskega odgovorja in protektivnih mehanizmov po ZTKO. Drugi namen raziskave je primerjati dva kirurška pristopa, ki se uporabljata za AVR. Poudarek bo na detekciji števila intraoperativnih MES in njihov vpliv na raven S100B (marker poškodbe možganskega tkiva), pooperativni možganskožilni reaktivnosti in kognitivni funkciji.

Pričakovani rezultati: Domnevamo, da bodo rezultati raziskave dokazali, da je imunoadsorbcija med ZTKO učinkovita metoda za zmanjšanje koncentracijo vnetnih in proti vnetnih mediatorjev med ZTKO, nima pa vpliva na koncentracijo eksosomov.Rezultati študije bodo pokazali razliko v koncentraciji vnetnih mediatorjev tudi med bolniki operirani na ZTKO s in brez kortikosteroidne profilakse. Pričakujemo, da bomo pojavljanje MES med operacijami zaznali s TCD. Razlika v pogostnosti intraoperativnih MES ne bo statistično pomembna med MIS in FS. Povečano pojavljanje intraoperativnih MES bo povezano s povišano koncentracijo S100B ter stopnjo postoperativnega kognitivnega upada. Pričakujemo, da oba kirurška pristopa povzročata okvaro cerebrovaskularne reaktivnosti v postoperativnem obdobju.

Podroben opis raziskave

Osnovni namen projekta je izboljšava zdravljenja kardiokirurških bolnikov med in po operativnem posegu. Projekt je razdeljen na dva med seboj delno povezana delovna sklopa (DS).
Prvi DS (DS1) bo osredotočen na vpliv novih metod na imunološko stanje bolnikov med in po zunajtelesnem krvnem obtoku (ZTKO) s povdarkom na učinku zunajtelesne imunoadsorpcije med ZTKO na vnetne in protivnetne zaščitne mediatorje ter na celično imunost. Pravtako želimo ovrednotiti vnetni in protivnetni odgovor ter celično imunost pri bolnikih po ZTKO, ki bodo prejeli kortikosteroide v primerjavi s placebom. Glavni namen je omejiti citokinsko nevihto med ZTKO, posledično zmanjšati proti vnetno reakcijo (imunsko paralizo), ki je povezana s sekundarnim infekcijami in večjo smrtnostjo bolnikov.
V drugem DS (DS2) želimo raziskati nevrološke motnje in poškodbo možganov pri zamenjavi aortne zaklopke (ang. aortic valve replacement AVR) z minimalno invazivnim kirurškim (ang. minimally invasive surgery MIS) prisopom ter to primerjati s standardno kirurško tehniko, ko kirurg operira preko popolne sternotomije (full sternotomy FS). Osredotočili se bomo predvsem na obseg možganskih mikro embolizmov, vaskularno reaktivnost in upad kognitivne funkcije. Želimo ugotoviti ali je MIS primerljiva s FS pri zahtevnem kirurškem posegu na srcu kot je AVR, predvsem glede preprečevanja zračnih mikroembolij.

<u>DS1 Učinki zunajtelesne adsorbcije citokinov na imunski odgovor in imunski status po zunajtelesnem krvnem obtoku</u>
Izhodišče. Uporaba ZTKO je povezana s sistemsko vnetno reakcijo (ang. Systemic Inflammatory Respons Syndrome, SIRS), tako imenovano citokinsko nevihto, ki vodi do prekomernega vnetnega odgovora, ki ji sledi močan proti vnetni odgovor (imunska paraliza ali ang. Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome, CARS). SIRS in posledično CARS sta pomebna vzroka za hemodinamsko nestabilnost, motnjo v delovanju organov in organskih sistemov, ki vodi do odpovedi organov, ter tudi sekundarne infekcije in celo smrt bolnika. V telesu ima PON1 encim protektivno vlogo pri vnetjih. Ker je molekularna masa PON1 v območju molekularne mase molekul 5kD-50kD , ki jih odstranimo z zunajtelesno adsorbcijo, je usoda PON1 med zunajtelesno adsorbcijo nejasna.
Namen. Želimo ugotoviti vpliv zunajtelesne adsorpcije citokinov in dajanje kortikosteroidov na imunski odziv in imunski status ter protektivne mehanizme (aktivnost PON1, količino in vsrto eksosomov) bolnika po kompleksni srčni operaciji z uporabo ZTKO.
Specifična cilja v DS1 sta:
DS 1.1. Določitev pooperativnega imunološkega stanja in zaščitnih mehanizmov pri kompleksnih srčnih operacijah z ZTKO in z uporabo imuno-adsorbcijske kapsule CytoSorb® (CytoSorbents Medical Inc.,New Jersey, ZDA)
DS 1.2. Primerjava pooperativnega imunološkega stanja in zaščitnih mehanizmov pri bolnikih po kompleksnih srčnih operacijah z ZTKO, z in brez uporabe capsule CytoSorb® oz. z ali brez uporabe metilprednizolona.
Pomen. Z zmanjšanjem SIRSa med in po ZTKO z zunajtelesno adsorbcijo citokinov pričajujemo zmanjšano stopnjo vnetne citokinske nevihte, kar bo izboljšalo hemodinamsko stabilnost bolnikov, zmanjšalo potrebo po vazoaktivnem in inotropnem zdravljenju, zmanjšalo potrebo po zdravljenju z intravenskimi tekočinami, kar vse vodi k manj pogostim motnjam v delovanju organov, npr. manj akutnih ledvičnih odpovedi. Proti vnetni odgovor, ki je reakcija na vnetni odgovor med ZTKO, bo pri zunajtelesni adsorbciji citokonov med ZTKO manjši, kar je lahko povezano z manjšo incidenco sekundarnih infekcij. V primerjavi z zunaj telesno imunoadsorbcijo uporaba kortikosteroidov med ZTKO verjetno ne omejimo v zadostni meri vnetnega odziva, ampak le ojačajo proti vnetni odziv , ki je povezan z večjim številom sekundarnih infekcij. Z ugotovitvami želimo spremeniti protokol ZTKO, tako da bi najbolj uspešno zmanjšali vnetno citokinsko nevihto in posledično omilili imunsko paralizo pri bolnikih operiranih na srcu, ter tako izboljšali izhod zdravljenja. Z uporabo PON1 ali specifičnih eksosomov v kontinuirani infuziji, bi lahko v prihodnje modulirali vnetni odgovor tudi pri drugih kardiokirurških bolnikih.
Osebe, ki bodo povabljene v raziskavo. Bolniki, ki bodo povabljeni v raziskavo, bodo izbrani med bolniki na Kliničnem oddelku za kirurgijo srca in ožilja, Univerzitetnega Kliničnega Centra v Ljubljani, ki so predvideni za načrtovano, kompleksno srčno operacijo z uporabo ZTKO. Raziskavo je odobrila Komisja za medicinsko etiko RS (št. odobritve: 118/02/15, dne 20.2.2015). Izjavljamo, da vabila ne bodo spremljali pritiski ali neprimerno napeljevanje. Sodelovanje bolnikov bo v vseh ozirih prostovoljno in zanj ne bodo prejeli nikakršnega nadomestila. Na začetku raziskave bo vsak izmed bolnikov na preprost način poučen o poteku raziskave. Podali bodo tudi pisni pristanek na operacijo in anestezijo ter privolitev za sodelovanje v raziskavi**;** bolnikom bomo pisno zagotovili vse potrebne informacije o raziskavi**.**
Bolniki in metode
V raziskavi bomo vključili 60 bolnikov, ki so predvideni za načrtovane in kompleksne operativne posege na srcu z uporabo ZTKO s podaljšanim trajanjem.
Vključitveni kriteriji za raziskavo:

1. Elektivni srčni kirurški posegi s pričakovanim podaljšanim trajanjem ZTKO (dalj kot 2 uri), kot so kombinirani posegi na zaklopkah in koronarnih arterijah, posegi na več zaklopkah, posegi na ascendentni aorti in aortnem loku, reoperacije istega tipa
2. Polnoletnost

Izključitveni kriteriji:
1. Nestrinjanje s sodelovanjem v raziskavi
2. Bolniki mlajši od 18 let

3. Nosečnice
4. Nujni posegi
5. Bolniki za transplantacijo srca
6. Bolniki za implantacijo mehanske cirkulatorne podpore (LVAD (left ventricular assist device), RVAD (right ventricular assist device), TAH (total artificial heart))
7. Bolniki, ki so na zdravljenju z kemoterapijo, imunosupresivno terapijo
8. Bolniki, ki so na zdravljenju s protilevkocitnimi zdravili ali TNF-alfa blokerji
9. Imunokompromitirani bolniki (AIDS), levkopenija (pod $4{,}0x10^9$/L)
10. Bolniki, ki kažejo klinične in laboratorijske znake infekta (CRP > 2 mg/dl [20 mg/L], PCT> 0,5 micg/L, Le > $10{,}0x10^9$ /L)
11. Bolniki s serumskim kreatininom > 2 mg/dl (176 micmol/L)
12. Bolniki z bilirubinom > 2 mg/dl (34,2 micmol/L)
13. Bolniki, ki so utrpeli možgansko kap
14. Kahektični (podhranjeni) bolniki, BMI<18

Bolnike bomo naključno razdelili v tri skupine (po sistemu naključnih števil):

1. **Preiskovana skupina** – **20** bolnikov operiranih na srcu z uporabo podaljšanega ZTKO in uporabo CytoSorb® kapsule med ZTKO
2. **Kontrolna skupina** – **20** bolnikov operiranih na srcu z uporabo podaljšanega ZTKO, brez uporabe CytoSorb® kapsule
3. **Kortikosteroidna skupina** – **20** bolnikov operiranih na srcu z uporabo podaljšanega ZTKO, brez uporabe CytoSorb® kapsule ter z uporabo 1g metilprednizolona med ZTKO.

Predoperativna priprava, medoperativni potek in zgodnje pooperativno zdravljenje bo potekalo po standardnem operativnem postopku (SOP), ki je bil sprejet na KO za anesteziologijo in intenzivno terapijo operativnih strok leta 2009 in ponovno potrjen leta 2013.

Splošna predoperativna preiskava bo vključevala:

Natančno anamnezo,
Klinični pregled,
EKG, rentgenski posnetek pljuč, spirometrijo
ultrazvok srca, koronarografijo
Laboratorijske preiskave krvi: hemogram z diferencijalno krvno sliko (DKS) in sedimentacijo; biokemijske preiskave (krvni sladkor, elektroliti, dušični retenti, jetrni testi, proteinski status, testi strjevanja krvi); določitev vnetnih parametrov (C-reaktivni protein, prokalcitonin); vse te preiskave bomo izvedli pred operacijo, po koncu posega, 24 ur, 48 ur po posegu ter 5-i pooperativni dan kot predvideva protokol zdavljenja v naši ustanovi.

Seznanili se bomo katera zdravila bolnik redno jemlje in se bomo glede na bolnikovo stanje in sprejete smernice odločili katera zdravila bo bolnik jemal redno do dneva operativnega posega.

Opis anestezije

Po predoperativni pripravi in premedikaciji z benzodiazepini, bodo bolniki operirani v splošni anesteziji. Pred uvodom v splošno anestezijo bomo vsakemu bolniku vstavili arterijsko kanilo za invazivno merjenje arterijskega krvnega tlaka ter ostalih hemodinamskih parametrov (FloTrac sensor, Edwards, ZDA). Za intravenski uvod v anestezijo bomo uporabili opioidni analgetik fentanil 5-10 micg/kg, anestetik etomidat 0,2-0,3 mg/kg in mišični relaksant rokuronium 0,6 mg/kg za intubacijo traheje. Po intubaciji traheje bomo bolnike mehanski ventilirali z volumsko ali tlačno kontrolirano ventilacijo z dihalnim volumenom 6-8 ml/kg idealne telesne teže za vzdrževanje CO_2 v izdihanem zraku ($EtCO_2$) 4-5 kPa. Po uvodu v anestezijo bomo pri vsakem bolniku vstavili centralni venski kateter (PreSep central venous oximetry catether, Edwards, ZDA) za hemodinamske meritve in vensko oksimetrijo, ter MAC (multi-access catheter) za nadomeščanje tekočin. Splošno anestezijo bomo do ZTKO vzdrževali s hlapnimi anestetiki in nepretrgano infuzijo opijatnega analgetika remifentanila; med ZTKO bomo za vzdrževanje anestezije uporabili nepretrgani infuzii remifentanila in intravenskega anestetika propofola (4-12 mg/kg/h).

Med operacijo bomo uporabili standardni in razširjeni hemodinamski nadzor bolnika: EKG, neposredno merjenje arterijskega krvnega tlaka, merjenje osrednjega venskega tlaka, minutni volumen srca, sistemski žilni upor, centralna venska nasičenost s kisikom, varijacija pulznega tlaka, varijacija udarnega volumna srca (platforma EV 1000, Edwards, ZDA). Nadzorovali bomo tudi: nasičenost hemoglobina s kisikom, kapnografijo, nasičenost možganskega tkiva s kisikom (NIRS, near infrared spectroscopy), globino anestezije (BIS, bispectral index), telesno temperaturo, urno diurezo, plinske analize arterijske krvi. Beležili bomo tip in trajanje operativnega posega, trajanje ZTKO-ja ter čas zaklemanja aorte, izgubo krvi in količino terapije s tekočinami ter krvjo in krvnimi pripravki, uporaba inotropnih in/ali vazoaktivnih zdravil, uporaba inzulina. Med posegom bomo uporabili tudi transezofagealni ultrazvok srca (TEE) za oceno globalne srčne funkcije, regionalnih motenj krčljivosti, funkcije zaklopk, volumskega statusa, za odzračevanje pred odklemanjem aorte.

Uporabili bomo standardni aparat za ZTKO in standarni tip oksigenatorja (tip oksigenatorja - *Inspire*, Sorin (Milano, Italija), *ali Fusion*, Medtronic (Minneapolis, ZDA)). Sestava priming (tekočine za pripravo sistema za ZTKO): ringer, 20% mannitol, heparin. V preiskovani skupini bolnikov z uporabo CytoSorb® kapsule, ta se vklopi v ZTKO aparat v paralelni krog izventelesne cirkulacije. Pretok preko CytoSorba® kapsule bo reguliran s črpalko (pretok 200 ml/min).

Ob koncu operacije bomo bolnike premestili v Enoto kardiovaskularne intenzivne terapije (KVIT) intubirane, sedirane ter mehansko ventilirane. Bolnike bomo zbudili in ekstubirali po izpolnitvi naslednjih kriterijev: buden, sodelojoč bolnik, s popolno povrnitev nevro-mišične funkcije, z nasičenostjo hemoglobina s kisikom nad 96% ob FiO_2 0,5 ali manj, $EtCO_2$ manj kot 6 kPa, s stabilno hemodinamiko in telesno temperaturo ter z drenažo po retrosternalnem drenu manj, kot 100 ml/h. Pooperativno bolečino pri bolnikih bomo zdravili z nepretrgano intravensko infuzijo kombinacije opijatnega analgetika morfija in nesteroidnega analgetika metamizola.

Izvedba meritev

Dokumentirali bomo demografske značilnosti bolnikov, njihovo predoperativno zdravstveno stanje, kot tudi medoperativne podatke (vrsta in trajanje operacije, trajanje ZTKO-ja, obdobje ishemije, hemodinamske meritve, uporaba inotropne/vazoaktivne terapije, inzulina, tekočine, krvi in krvnih derivatov); trajanje mehaske ventilacije pljuč v KVIT-u, čas intenzivnega zdravljenja, pooperativne zaplete, 30 dnevno mortaliteto. Za cilje raziskave, bomo pooperativne hemodinamske vrednosti beležili v prvih 5 postoperativnih dneh.

Določanje biokemičnih in imunoloških markerjev - Vzorce krvi bomo jemali:

1) pred indukcijo v splošno anestezijo
2) po koncu ZTKO-ja
3) po koncu operativnega posega (ob sprejemu v KVIT)
4) 24 ur po posegu
5) 48 ur po posegu
6) 5-i pooperativni dan

V preiskovani skupini z uporabo CytoSorb® kapsule bomo delali še 2 dodatni preiskavi drugo uro med potekom ZTKO:

7) iz krvi v ZTKO pred kapsulo
8) iz krvi po iztoku iz kapsule.

Parametri, ki jih bomo določali:

1. Pro- in anti-inflamatorni citokini: TNF-alfa , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10 v plazmi (določanje z ELISA)
2. Produkt komplementa C5a
3. PON1 aktivnost, genotip in fenotip (genotip in fenotip bomo določali v prvem bolnikovem vzorcu)
4. Lipidni status (HDL in LDL holesterol)
5. hs-CRP (high sensitivity CRP), PCT (metoda ECLIA), DKS
6. Albumin, fibrinogen
7. Celični imunološki status:

   Limfociti: CD3, CD4, CD8, HLA-DR, CD163,CD 64, CD16+CD56, Treg - določanje s pomočjo protočne citometrije

   Mieloperoksidaza

8. Eksosomi v serumu
9. Uporabljali bomo standardni klinični pristop za odkrivanje okužbe (mikrobiološka izolacija bakterij in gljiv).

Pooperativni zapleti - beležili bomo zaplete, kot so: krvavitve, hemodinamska nestabilnost, motnje dihalne funkcije, poslabšanje ledvične, jetrne in možganske funkcije, okužbe.

Bolnike bomo premestili iz intenzivnege enote na polintenzivni oddelek, ko bodo izpolnjeni pogoji: nasičenost hemoglobina s kisikom 94% ali več pri FiO_2 0,5 ali manj, hemodinamska stabilnost brez hemodinamsko pomembnih aritmij, urne diureze več kot 0,5 ml/kg/uro, brez intravenske inotropne ali vazopresorne terapije in brez epileptične aktivnosti ali delirija ter brez znakov infekta.

Nadaljnje **spremljanje po telefonu** bomo izvajali 30 dni po posegu, osredotočili se bomo na pozno pooperativno obolevnost in umrljivost.

Pričakovani rezultati: V tej klinični študiji bomo testirali hipotezo, da selektivna zunajtelesna imunoabsorbcija med podaljšanim ZTKO v srčni kirurgiji vpliva na pooperativni imuloški status ter na protektivne mehanizme, z modulacijo sistemskega vnetnega odgovora ter protivnetnih parametrov.

Po končani raziskavi in statistični obdelavi podatkov pričakujemo, da bomo lahko:

1. *Identifikacirali ZTKO metodo, ki povzroča manj vnetnih reakcij po srčnih operacijah,*
2. *Identifikacirali ZTKO metodo, ki povzroča manj imunske paralize (manj proti vnetnih reakcij), ki je povezana z višjo incidenco pridobljenih okužb v intenzivni enoti in bolnišnici,*
3. *Ugotovili učinke različnih metod ZTKO na PON1, ki se lahko v prihodnosti uporablja kot sistemsko protivnetno sredstvo.*

<u>DS2 Zaščita živčevja med minimalno invazivnim kirurškim pristopom za zamenjavo aortne zaklopke</u>

Izhodišče Incidenca srčno-žilnih zapletov pri menjavi aortne zaklopke s minimalno invazivno kirurgijo (MIS-AVR) je 4%, po klasičnih operacijah AVR pa 2% (Borger et al. Ann Thorac Surg 2015). Zanima nas ali obstaja povezava s pogostnostjo in stopnjo nevroloških zapletov s tehnično težjim odstranjevanjem zračnih mehurčkov iz srčnih votlin pri manj invazivnem kirurškem pristopu, ko kirurg ne prereže v celoti prsnice (MIS). Poleg mikroembolizmov med oprativnim posegom, je eden

od osnovnih dejavnikov nezadostne možganske perfuzije tudi motena avtoregulacija, saj so med operativnim posegom možna nihahanja sistemskega krvnega tlaka izven avtoregulacijskega območja možganov, kar lahko povzroči pomankanje kisika v možganih.

Namen Želimo primerjati MIS-AVR s FS AVR glede na pojavnost mikroembolov, porastom biomarkerjev možganske poškodbe in incidenco nevroloških zapletov ter upadom kognitivne funkcije. Dodatno želimo proučiti vaskularno reaktivnost možganskega žilja v povezavi s številom mikroembolizmov in možgansko poškodbo med operacijo. Želimo proučiti tudi pomen ohranjene avtoregulacije možganskega pretoka pred operativnim posegom na pojavljanje nevroloških zapletov po operacijah.

Specifična cilja v DS2 so trije:

1. Določitev število embolov med operacijo AVR pri bolnikih operiranih po klasični tehniki v primerjavi z MIS
2. Določitev povezanosti med velikostjo embolizacije s pooperativnimi kazalci poškodbe možganov in srčne mišice.
3. Ugotoviti povezavo med spremebo cerebrovaskularne reaktivnosti in številom mikroembolov in poškodbo možgan med operativnim posegom
4. Ugotoviti vpliv predoperativne cerebrovaskularne reaktivnosti na nevrološke postopertivne zaplete

Pomen. S potrditvijo hipoteze, da je možganska poškodba med MIS-AVR bolj pogosta kot pri klasičnem pristopu s popolno sternotomijo in da je posledica mikroembolij, bi lahko v prihodnje razvili dodatne tehnike in natančnejši nadzor pri odzračevanje srca pri MIS. Ker so kognitivne spremebe po kardiokirurških posegih zelo pogoste, nam bi podatki o reaktivnosti možganskega žilja dali pomembne podatke za razvoj novih diagnostičnih in terpevtkih postopke za natančnejši nadzor bolnikov z moten avtoregulacijo, ki so verjetno bolj podvrženi nevrološkim okvaram.

Bolniki in metode

Raziskava je zasnovana kot prospektivna intervencijska klinična študija, ki bo vključevala 60 bolnikov. Bolnike bomo razdelili naključno v dve skupini glede na vrsto kirurškega pritopa popolna sternotomoija (FS) in minimalno invazivna sternotomija (MIS). Za oceno tveganja smrti po operaciji bomo uporabili EuroSCORE 2 (European System for Cardiac Operative Risk Evaluation score 2, *www.**euroscore**.org*). Kliničnoi raziskavo je odobrila Komisija za medicinsko etiko RS (odločba št. 22k/04/15, dne 23.4.2015).Bolnike se bodo po razlagi raziskave morali strinjati s sodelovanjem in podpisati pisni pristenek za sodelovanje.

Vključitveni kriteriji:

1. izolirane kritična stenoze na aortni zaklopki, kot tudi asimptomatski bolniki z zmanjšano sistolično funkcijo; ali simptomatski bolniki s pomembno aortno stenozo z normalno ali oslabljeno funkcijo levega prekata
2. Bolniki, ki po klasifikaciji ameriškega združenja anesteziologov (ASA) dosegajo stopnje 2 ali 3
3. Bolniki brez prisotne stenozena karotidnih arterijah ali tisti, ki so že imeli uspešno opravljeno revaskularizacijo karotid; TEA ACI ali stentiranje karotid.

Izključitveni kriterij:

1. Že prebolela možganska kap zgodovina možganske kapi
2. iztisni delež levega prekata manj kot 30%
3. zgodovina zlorabe alkohola
4. epilepsija ali zgodovina psihiatričnih bolezni in uporabe antipsihotikov

Bolnike, ki bodo sodelovali v študiji, bo anesteziolog obiskal dan pred operacijo za oceno njihovega splošnega zdravstvenega stanje in opravil kratkega preizkusa mentalnih sposobnosti (Standardised Mini-Mental State Examination, w*ww.ihpa.gov.au/internet/ihpa/publishing.../s**mmse**-guidelines-v2.pdf)*.

Vidni evocirani odgovori hitrosti možganskega krvnega toka (VEFR) za testiranje cerebrovaskularne reaktivnosti *(Inštitut za fiziologijo MF Ljubljana, as.dr. A. Fabjan)*

Eksperimentalno testiranje s transkranialnim doplerjem (TCD) bomo izvedli en teden pred operacijo in en teden po operaciji. Merjenje se bo izvajajo v poltemnem, zvočno izoliranem prostoru s temperaturo približno 22°C. Stalno bomo sprejemljali arterijski krvni tlak (BP) in srčni utrip (HR) neinvazivno z manšeto na prstu na levi roki, ki bo v ravni srca (Finapress 2300 Blood pre, Ohmeda, ZDA). Raven delnega tlaka CO2 v izdihanem zraku ob koncu izdiha CO2 (Et-CO2) bomo spremljali skozi obrazno masko z uporabo kapnometera (Oscaroxy capnometer, Datex, Finska). Na čalado bomo fiksirali doplerske sonde (2Hz)(Transkarnialni dopler, Delica-9 series, SMT Medical, Nemčija) tako, da bomo skozi temporalne kosti transkranialnega ultrazvočnega okna snemali hitrosti toka v P2 segmentu leve zadnje cerebralne arterije, in odsek M1 v desni srednji cerebralni arteriji (Azevedo et al. 2010). V posebno za to namenjen računalniški sistem bomo beležili spremembo krvnega tlaka od utripa do utripa, spremembe pretoka v posamezni cerebralni arteriji, Et-CO2 and označevalec stimulusa. Za stimulacijo bodo bolniki sedeli pred zaslonom, ki ga bo obkrožala svetloba 5 cd/m2. Da bi dobili konstanten premer pupile pred smenanje, se bo vsak bolnik za 10 minut prilagodil na okolišno sobno svetlobo. Vizualna stimulacija bo sastavljena iz polno poljske šahovnice kot vzorca (kontrastnim 80%, povprečna svetilnost 250 cd / m2), ki bo nastala na LCD monitor in se vračala v nasprotni smeri nastanka s hitrostjo 2 / s. Bolniki bodo usmerjeni in skoncentrirani na rdečo piko v sredini zaslona, da se ohrani stabilno pogleda. Protokol vizualno evocirane stimulacije bo vseboval 10 ciklov: faza s počitkom 20 sekund z zaprtimi očmi in stimulativna faza z vizualno stimulacijo 40 sekund. Spremembe med fazami bomo signalizirali z zvokom. Podatke bomo preoblikovani v relativnih podatke s pomočjo ravni hitrosti toka krvi v povprečju za časovno obdobje 5 s pred začetkom stimulacije (Rosengarten et al. 2001). Za spremembe pretoka med stimulacijo bomo upoštevali spremembe v sistoličnih hitrostih skozi možganske arterije, ki so manj podvržene merilnim

napakam (Rosengarten and Kaps 2002). Za analizo bomo uporabili posebaj za ta name napisan računalniški program, tako da bomo primerjali povprečno spremembo pretoka med 40s vizualno stimulacijo z nestimulirano fazo (Fabjan A, et. 2012).

Operativni postopek

Predoperativna priprava, medoperativni potek in zgodnje pooperativno zdravljenje bo potekalo po standardnem operativnem postopku (SOP), ki je bil sprejet na KO za anesteziologijo in intenzivno terapijo operativnih strok leta 2009 in ponovno potrjen leta 2013.

Splošna predoperativna preiskava bo vključevala:

- Natančno anamnezo,
- Klinični pregled,
- EKG, rentgenski posnetek pljuč, spirometrijo
- ultrazvok srca, koronarografijo
- Laboratorijske preiskave krvi: hemogram z diferencijalno krvno sliko (DKS) in sedimentacijo; biokemijske preiskave (krvni sladkor, elektroliti, dušični retenti, jetrni testi, proteinski status, testi strjevanja krvi); določitev vnetnih parametrov (CRP, PCT); vse te preiskave bomo izvedli pred operacijo, po koncu posega, 24 ur, 48 ur po posegu ter 5-i pooperativni dan kot predvideva protokol zdravljenja v naši ustanovi.

Seznanili se bomo katera zdravila bolnik redno jemlje in se bomo glede na bolnikovo stanje in sprejete smernice odločili katera zdravila bo bolnik jemal redno do dneva operativnega posega.

Opis anestezije

Po predoperativni pripravi in premedikaciji z benzodiazepini, bodo bolniki operirani v splošni anesteziji. Pred uvodom v splošno anestezijo bomo vsakemu bolniku vstavili arterijsko kanilo za invazivno merjenje arterijskega krvnega tlaka ter ostalih hemodinamskih parametrov (FloTrac sensor, Edwards, ZDA). Za intravenski uvod v anestezijo bomo uporabili opioidni analgetik fentanil 5-10 μg/kg, anestetik etomidat 0,2-0,3 mg/kg in mišični relaksant rokuronium 0,6 mg/kg za intubacijo traheje. Po intubaciji traheje bomo bolnike mehanski ventilirali z volumsko ali tlačno kontrolirano ventilacijo z dihalnim volumenom 6-8 ml/kg idealne telesne teže za vzdrževanje CO_2 v izdihanem zraku ($EtCO_2$) 4-5 kPa. Po uvodu v anestezijo bomo pri vsakem bolniku vstavili centralni venski kateter (PreSep central venous oximetry catether, Edwards, ZDA) za hemodinamske meritve in vensko oksimetrijo, ter MAC (multi-access catheter) za nadomeščanje tekočin. Splošno anestezijo bomo do ZTKO vzdrževali s hlapnimi anestetiki in nepretrgano infuzijo opijatnega analgetika remifentanila; med ZTKO bomo za vzdrževanje anestezije uporabili nepretrgani infuzii remifentanila in intravenskega anestetika propofola (4-12 mg/kg/h).

Med operacijo bomo uporabili standardni in razširjeni hemodinamski nadzor bolnika: EKG, neposredno merjenje arterijskega krvnega tlaka, merjenje osrednjega venskega tlaka, minutni volumen srca, sistemski žilni upor, centralna venska nasičenost s kisikom, varijacija pulznega tlaka, varijacija udarnega volumna srca (platforma EV 1000, Edwards, ZDA). Nadzorovali bomo tudi: nasičenost hemoglobina s kisikom, kapnografijo, nasičenost možganskega tkiva s kisikom (NIRS, near infrared spectroscopy), globino anestezije (BIS, bispectral index), telesno temperaturo, urno diurezo, plinske analize arterijske krvi. Beležili bomo tip in trajanje operativnega posega, trajanje ZTKO-ja ter čas zaklemanja aorte, izgubo krvi in količino terapije s tekočinami ter krvjo in krvnimi pripravki, uporaba inotropnih in/ali vazoaktivnih zdravil, uporaba inzulina. Med posegom bomo uporabili tudi transezofagealni ultrazvok srca (TEE) za oceno globalne srčne funkcije, regionalnih motenj krčljivosti, funkcije zaklopk, volumskega statusa, za odzračevanje pred odklemanjem aorte.

Tip ZTKO, ki ga bomo uporabljali je standardni (tip oksigenatorja - Inspire, (Sorin, Milano, Italija) ali Fusion, (Medtronic,Minneapolis, ZDA). Sestava priming (tekočine za pripravo ZTKO): ringer, 20% mannitol, heparin.

Med operacijo bomo težili k zadostnosti pretoka, da bi dosegli zadostno cerebralno perfuzijo. Ohranjali bomo ustrezen sistolični arterijski tlak (sistolični sistemski arterijski pritisk od 90 do 100 mmHg, srednji arterijski pritisk 60 do 65 mm Hg), tekočine bomo aplicirani odvisno od centralnega venskega tlaka in drugih znakov zadostne polnitve kot sta sprememba utripnega in pulznega vala. Zaradi stabilnosti možganskega pretoka bomo vzdrževalo parcialni tlak CO2 v arterijskii krvi med 5,0-5,5 k Pa. Peresnovno (krvni sladkor/insulin) in koagulacijsko uravnavanje bo potekalo po ustaljenem porotokoli.

Detekcija mikroembolov s transkranialnim doplerjem med oprativnim posegom

Uporabljali bomo TCD (Waki E, Atys Medical, Francija) za merjenje pretoka slozi možganske arterije in odkrivanje mikroemboličnih signalov (MES) v realnem času.TCD sondi bodo nameščene obojestransko nad temporalne kosti. Skozi to akustično okno bomo sledili pretok krvi v srednjii cerebralni arteriji. MES bomo določali s TCD naslednjih fazah: pred operacijo, po sternotomiji, med kanulacijo aorte, med ZTKO, med odzračevanjem srca, po odstranitvi pretisnjenja aorte ter po končanju ZTKO. Doplerske signale bomo zajemali v dopler in jih nato analizirali s programom (TCD-EMB 10.4, Atys Medica, Francija) na doplerju/osebnem računalniku ter določili število in tip MES v posameznih zgoraj navedenih obdobjih.

Zdravljenje v enoti intenzivne nege

Ob koncu operacije bomo bolnike premestili v Enoto kardiovaskularne intenzivne terapije (KVIT) intubirani, sedirani ter mehansko ventilirani. Bolnike bomo zbudili in ekstubirali po izpolnitvi naslednjih kriterijev: buden, sodelojoč bolnik, s popolno povrnitev nevro-mišične funkcije, z nasičenostjo hemoglobina s kisikom nad 96% z FiO_2 0,5 ali manj, $EtCO_2$ manj kot 6 kPa, s stabilno hemodinamiko in telesno temperaturo ter z drenažo po retrosternalnem drenu manj, kot 100 ml/h. Pooperativno bolečino pri bolnikih bomo zdravili z nepretrgano intravensko infuzijo kombinacije opijatnega analgetika morfija in nesteroidnega analgetika metamizola.

Izvedba meritev

Dokumentirali bomo demografske značilnosti bolnikov, njihovo predoperativno zdravstveno stanje, kot tudi medoperativne podatke (vrsta in trajanje operacije, trajanje ZTKO, obdobje ishemije, hemodinamske meritve, uporaba inotropne/vazoaktivne terapije, inzulina, tekočine, krvi in krvnih derivatov); trajanje mehaske ventilacije pljuč v KVIT-u, čas intenzivnega zdravljenja, pooperativne zaplete, 30 dnevno mortaliteto. Za cilje raziskave bomo pooperativne hemodinamske vrednosti beležili v prvih 5 postoperativnih dneh.

Določanje biokemičnih in imunoloških markerjev - Vzorce krvi bomo jemali:

1.) pred indukcijo v splošno anestezijo
2.) po koncu operativnega posega cca. 6 ur po indukciji (ob sprejemu v KVIT)
3.) 24 ur po posegu
4.) 48 ur po posegu
5.) 7 pooperativni dan

Parametri, ki jih bomo določali v laboratoriju:

1. s100b
2. Pro- in anti-inflamatorni citokini: TNF-alfa, IL-6, IL-8, IL-10 v plazmi (določanje z ELISA)
3. mikrodelce in eksosomov v serumu
4. PON1 aktivnost, genotip in fenotip (genotip in fenotip bosta določena v le v prvem bolnikovem vzorcu)
5. Lipidni status (HDL in LDL holesterol)
6. hs-CRP (visoko občutljivi C-reaktivni protein), prokalcitonin (metoda ECLIA), diferencialna krvna slika, troponin I
7. Uporabljali bomo standardni klinični pristop za odkrivanje okužbe (mikrobiološka izolacija bakterij in gljiv).

Pooperativni zapleti - beležili bomo zaplete, kot so: krvavitve, hemodinamska nestabilnost, motnje dihalne funkcije, poslabšanje ledvične, jetrne in možganske funkcije, okužbe.
Bolnike bomo premestili iz intenzivnege enote na polintenzivni oddelek, ko bodo izpolnjeni pogoji: nasičenost hemoglobina s kisikom 94% ali več pri FiO_2 0,5 ali manj, hemodinamska stabilnost brez hemodinamsko pomembnih aritmij, urne diureze več kot 0,5 ml/kg/uro, brez intravenske inotropne ali vazopresorne terapije in brez epileptične aktivnosti ali delirija ter brez znakov infekta.
Sedmi dan zdravljenja bomo ponovili Standardizirani mini-mentalni test.
Nadaljnje **spremljanje po telefonu** bomo izvajali 30 dni po posegu, sredotočili se bomo na pozno pooperativno obolevnost in umrljivost.

Pričakovani rezultati DS2
V naši raziskavi pričakujemo, da bomo pojavljanje MES med operacijami zaznali s TCD. Razlika v pogostnosti intraoperativnih MES ne bo statistično pomembna med MIS in FS. Pričakujemo, da bo povečano pojavljanje intraoperativnih MES povezano s povišano koncentracijo S100B ter stopnjo postoperativnega kognitivnega upada. Pričakujemo, da bosta oba kirurška pristopa povzročata okvaro cerebrovaskularne reaktivnosti v postoperativnem obdobju. Bolniki, ki bodo imeli že pred operacijo moteno cerebrovaskularno reaktivnost bodo imeli več nevroloških zapletov.

<u>Povzetek učinkov celotnega projekta DS1 in DS2:</u>
Možna sta dva večja učinka našega predlaganega projekta. Prvič, radi bi ugotovili kdaj uporaba ZTKO zmanjša SIRS in posledični CARS. To bi lahko imelo vpliv na večjo hemodinamsko stabilnost bolnika, zmanjšalo incidenco pooperativnih zapletov, predvsem bolnišničnih okužb, ki so glavni vzrok za daljše zdravljenje v intenzivni enoti in bolnišnici, kar poveča stroške zdravljenja, zmanjša kvaliteto življenja po odpustu iz bolnice in poveča umrljivost. V prihodnosti bi bilo mogoče uporabiti PON1 kot učinkovino, ki deluje imunomodulatorno med in po ZTKO.
Drugič, MIS-AVR ima določene prednosti pred klasično AVR, vendar pa bi tehniko lahko še izboljšali predvsem z zmanjšanjem mikro embolizmov, še posebno, če ugotovimo, da so emboli glavni vzrok za nevrološke zaplete.

Laboratorijske metode skupne DS1 in DS2

Sodelujoče podskupine imajo ustrezno znanje in opremo za izvajanje laboratorjskih analiz in cerebralne vaskularne reaktivnosti.

Določanje aktivnosti in molekularno-genetske raziskave PON1 *(Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo: prof. Goličnik, prof. Dolžan)*
Preiskovancem, ki bodo v postopku zdravljenja, bomo za določanje aktivnosti in fenotipizacijo PON1 v serumu odvzeli 3-5 ml arterijske krvi v epruvete brez antikoagulanta. Ko se bo kri strdila, bomo s centrifugiranjem odstranili krvni strdek od seruma. Tako pripravljene serumske vzorce bomo v roku 1 ure zamrznili na - 20°C kjer bodo počakali na analizo. Aktivnost PON1 v serumskih vzorcih se bo določala spektrofotometrično z merjenjem absorbance po času v prisotnosti substrata fenilacetata (Richter et al, 2008). Fenotipizacija na PON1 se bo pri vsakem preiskovancu prav tako določala spektrofotometrično z 2-substratnim testom; tj. fenil acetat in 4-klorometil fenilacetat (Richter et al, 2008).
Pri določanju genskih polimorfizmov PON1 bomo za izolacijo DNA vsakemu preiskovancu enkrat odvzeli 3-5 ml arterijske krvi v epruveto z antikoagulantom (EDTA ali citrat). Krvne vzorce bomo zamrznili na - 20°C kjer bodo počakali na analizo. Po odtajanju bomo DNA iz odvzetega vzorca krvi izolirali s pomočjo komercialno dostopnih kitov (Flexigene DNA kit, Qiagen).

Za določanje genskih polimorfizmov PON1 bomo uporabili visokozmogljivo metodo, ki temeljijo na verižni reakciji s polimerazo (PCR) v realnem času (TaqMan assay, Applied Biosystems).

Imunofenotipizacija limfocitov *(Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Laboratorij za imunologijo: prof. Ihan)*
Preiskava temelji na vezavi monoklonskih protiteles na površinske levkocitne antigene (CD antigeni) limfocitov v vzorcu polne krvi. Monoklonska protitelesa proti specifičnim CD antigenom so označena z različnimi fluorokromi, zato lahko isti vzorec krvi hkrati označimo z različnimi monoklonskimi protitelesi. Določanje limfocitnih populacij s pretočnim citometrom je v osnovi enako metodi fluorescenčne mikroskopije, vendar je odčitavanje odstotka obarvanih celic avtomatizirano, hitrejše in objektivnejše. Za analizo s pretočnim citometrom potrebujemo celice v suspenziji. Za izvedbo preiskave potrebujemo laboratorijske pipete v območju od 10 µL do 2 ml, vorteks, centrifugo, računalnik z ustrezno programsko opremo (FACSDiva Software) in pretočni citometer (BD FACSCanto). Navodila za uporabo in vzdrževanje pretočnega citometra so opisana v N CEL 1_Navodilo za uporabo in vzdrževanje pretočnega citometra. Testni komplet BD FACS 7-Color Setup Beads (BD, Cat. No. 335775) vsebuje epruvetke z liofiliziranimi polietilenskimi kroglicami za kalibracijo in diluent. Testni komplet LYMPHOGRAM (Cytognos, Ref. CYT-C001) vsebuje različno označena monoklonska protitelesa: CD8 FITC (fluorescein izotiocianat), CD19 FITC, CD3 PE (fikoeritrin), CD56 PE in CD4 PECy5 (fikoeritrin cianin 5). Uporablja se za določanje limfocitov B in T, celic T pomagalk, citotoksičnih limfocitov T in celic NK.

Ekspresija CD64 in CD163 na nevtrofilcih, monocitih in limfocitih *(Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Laboratorij za imunologijo: prof. Ihan)*
Preiskava temelji na vezavi monoklonskih protiteles na površinske levkocitne antigene (CD antigeni) limfocitov v vzorcu polne krvi. Monoklonska protitelesa proti specifičnim CD antigenom so označena z različnimi fluorokromi, zato lahko isti vzorec krvi hkrati označimo z različnimi monoklonskimi protitelesi. Za analizo s pretočnim citometrom potrebujemo celice v suspenziji. Testni komplet sestavlja mešanica monoklonskih protiteles CD64 FITC (fluorescein izotiocianat) in CD163 PE (fikoeritrin). Določanje nevtrofilcev z molekulami CD64 s pretočnim citometrom je v osnovi enako metodi fluorescenčne mikroskopije, vendar je odčitavanje odstotka obarvanih celic avtomatizirano, hitrejše in objektivnejše. Po končanem merjenju rezultate izvozimo v FCS datoteko, ki jo odpremo v programu Leuko64, kjer izvedemo analizo, program pa izračuna indekse CD64 in CD163.

Meritve citokinov *(Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Laboratorij za imunologijo: prof. Ihan)*
Citokine in topne receptorje določamo s kemiluminiscenčnim imunometričnim testom, ki temelji na označenih monoklonskih protitelesih. Testna epruvetka, v kateri poteka reakcija, vsebuje nosilec prekrit s protitelesi, specifičnimi za posamezen citokin. V testno epruvetko sistem odpipetira serum (vzorec) in reagent (z alkalno fosfatazo konjugirana protitelesa, specifična za določen citokin). Med inkubacijo se tvorijo kompleksi med specifičnimi protitelesi, ki so vezana na nosilcu, citokinom in protitelesi, ki so konjugirana z alkalno fosfatazo. Sledi spiranje (odstranjevanje nevezanega reagenta) in dodajanje luminogenega substrata. Alkalna fosfataza, ki preko citokina ostane vezana na nosilec, cepi substrat v nestabilen intermediat, ki oddaja svetlobo. Količina oddane svetlobe je premosorazmerna koncentraciji citokina v serumu. Za izvedbo preiskave potrebujemo serum oziroma vensko kri, odvzeto v epruveto za vakuumski odvzem brez antikoagulanta. Kri centrifugiramo. Za izvedbo potrebujemo najmanj 200 µL seruma. Do testiranja vzorce shranjujemo pri 20 °C.Koncentracijo nekaterih citokinov lahko določamo tudi v plazmi (kri, odvzeta v epruveto za vakuumski odvzem z EDTA ali s heparinom). Podrobnejše informacije so v navodilih, ki so priložena testnim kompletom za posamezne citokine.

Analiza mikrodelcev in eksosomov *(Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za farmakologijo: prof. Lipnik-Štangelj, prof. Kržan, dr. Črne in Inštitut za patološko fiziologijo: prof. Marš, dr. Miš)*
Za analizo eksosomov bomo preiskovancem odvzeli 3-5 ml krvi v vacutainerjevo™ epruveto z Na-citratom. Plazmo bomo centrifugirali pri nizkih obratih in del supernatanta shranili pri 4°C za analizo dinamičnega sipanja svetlobe (angl. *dynamic light scattering*, DLS). Z DLS analiziramo fluktuacije/kolebanje v intenziteti sipane svetlobe, ki nastanejo zaradi naključnega Brownovega gibanja sipanih delcev s čimer določimo velikost in količino delcev. S pomočjo DLS meritev lahko izračunamo tudi faktor oblike delcev (?), ki je parameter s katerim določimo obliko delcev. Z njim potrdimo, da so izmerjeni delci res eksosomi, za katere je značilno, da imajo maso skoncentrirano na površini. Iz preostalega supernatanta, ki ga ne bomo uporabili za DLS, bomo očistili in skoncentrirali eksosome s pomočjo sekvenčnega ultracentrifugiranja in usedlino eksosomov zamrznili s tekočom dušikom ter shranili pri -80°C za nadaljne anlize. Karakterizacijo eksosomov bomo izvedli s pomočjo pretočne citometrije. Eksosomi bomo najprej vezali na kroglice iz lateksa nato pa jih inkubirali z monoklonskimi protitelesi proti specifičnim CD antigenom (CD9, CD63, CD81) označenimi s fluorohromi. Za izvedbo analize bomo uprabili pretočni citometer Cell Lab Quanta SC-MPL (Beckmann Coulter), ker Coulter-ov način meritve elektronskega volumna edini omogoča natančno določitev velikosti delcev. Vsebnost eksocitov bomo analizirali z tehnikami Western blot in PCR v realnem času.

ORGANIZACIJA PROJEKTA

Predlagan projekt bo nadziral Usmerjevalni odbor, delo bo usklajevala Usklajevalna skupina. Usklajevalna skupina bo vsakih 6 mesecev redno poročal o napredovanju študije Usmerjevalnemu odboru in enkrat letno Komisiji za medicinsko etiko R Slovenije (KME RS) in Agenciji za raziskave R Slovenije (ARRS). V primerih izrednih dogodkov (npr. hudi zdravstveni zapleti povezani s potekom študije kot je smrt bolnika) bosta vodji obeh delovnih sklopov (DS) ačasno prekinili izvajanje posameznega DS in v roku 48ur poročala Usklajevalni skupini in Usmerjevalnemu odbor, ki bosta nato ustrezno ukrepala (npr. začasna prekinitev študije, skrajna možnost je dokončna prekinitev študije) in o tem obvesetila KME RS ter ARRS.

Usmerjevalni odbor:

prof.dr. Matej Podbregar, vodja, Univerzitetni klnični center (UKC) Ljubljana, Slovenija –vodja raziskav na Kliničnem oddelku za anesteziologijo in intenzivno terapijo operativnih strok, UKC LJubljana
prof.dr. Tomislav Klokočovnik, UKC Ljubljana, Slovenija- predstojnik Kliničnega oddelka za kardiokirurgijo
prof.dr. Metod Lipnik Štangelj, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta (ULJ MF), Inštitut za farmakologijo
doc.dr. Maja Šoštarič, UKC Ljubljana, Klinika za anestezijo in intenzivno terapijo operativnih strok- vodja Enote za srčno-žilno anesteziologijo

Usklajevalna skupina:

doc.dr. Maja Šoštarič, vodja, UKC Ljubljana, Slovenija
Mag. Gordana Taleska, UKC Ljubljana: odgovorna za DS1
Marija Božinovska, UKC Ljubljana: odgovorna za DS2
As.dr. Andrej Fabjan, ULJ MF, Inštitut za fiziologijo
Iz. prof.dr. Marko Goličnik, ULJ MF, Inštitut za biokemijo
Prof.dr. Alojz Ihan, ULJ MF, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, vodja Oddelka za imunologijo
Izr.prof.dr. Milan Skitek, UKC Ljubljana, vodja Centralnega laboratorija UKC
Izr.prof.dr. Tomaž Marš, ULJ MF, Inštitut za patološko fiziologijo
prof.dr. Metoda Lipnik Štangelj, ULJ MF, Inštitut za farmakologijo

Raziskovalni podskupine:

1. **Cerebralna vaskularna reaktivnost in transkranialni dopler** (ULJ, MF, Inštitut za fiziologijo, as.dr.Fabjan A.)
2. **PON1 aktivnost, fenotipizacija in genotipizacija** (ULJ, MF, Inštitut za biokemijo, prof. Goličnik, prof. Dolžan)
3. **Vnetni odgovor in celična imunost** (ULJ, MF, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, prof.Ihan)
4. **Eksosomi in mikro delci** (ULJ, MF, Inštitut za farmakologijo: prof. Kržan, prof. Štangelj Lipnik, dr, Črne in Inštitut za patološko fiziologijo: prof. Marš, dr. Miš)
5. **Ostale laboratorijske analize** (UKC Ljubljana, Osrednji laboratorij, prof. Skitek, dr. Jerina)

Terminski plan v mesecih (M):

0-2 M: pilotno vključitev 2 bolnikov v vsak DS (DS1 in DS2) s preverjanjem celotne logistične poti, meritev in analize krvi
pri 2M: sestanek Usklajevalnega skupine, ki poroča Usmerjevalnemu odboru, ki odloči o začetku projekta
2-12 M: vključevanje bolnikov v DS1 in DS2, laboratorijske analize
pri 6M: vmesna analiza podatkov (vodje DS in Usklajevalna skupina)
pri 12 M: vmesna analiza, sestanek in poročilo (Usklajevalna skupina pripravi poročilo za Usmerjevalni odbor, ARRS in KME RS)
12-24 M: vključevanje bolnikov v DS1 in DS2, laboratorijske analize
pri 18 M: vmesna analiza podatkov (vodje DS in Usklajevalna skupina)
pri 24 M: vmesna analiza, sestanek in poročilo (Usklajevalna skupina pripravi poročilo za Usmerjevalni odbor, ARRS in KME RS)
24-32 M: vključevanje bolnikov v DS1 in DS2, laboratorijske analize
32-35 M: končna analiza podatkov, sestanek in poročilo ter mednarodna objava rezultatov (Usklajevalna skupina pripravi poročilo za Usmerjevalni odbor, ARRS in KME RS)
36 M: končni sestanek in poročilo (Usklajevalna skupina pripravi poročilo za Usmerjevalni odbor, ARRS in KME RS),

TRENUTNI STATUS PROJEKTA

vključevanje bolnikov v DS1 in DS2, laboratorijske analize

vmesna analiza podatkov

ZNANSTVENE OBJAVE

Trenutno ni znanstvenih publikacij iz projketa