

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ STRUKTURNE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Tjaša FIDERŠEK

**VPLIV RAZLIČNIH VRST CENTRALNIH VENSKIH
KATETROV NA POŠKODBE KRVNIH CELIC**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ STRUKTURNE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Tjaša FIDERŠEK

**VPLIV RAZLIČNIH VRST CENTRALNIH VENSKIH KATETROV
NA POŠKODBE KRVNIH CELIC**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja

**THE INFLUENCE OF DIFFERENT TYPES OF CENTRAL VENOUS
CATHETERS ON BLOOD DAMAGES**

M. SC. THESIS
Master study programmes

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študija Strukturne in funkcionalne biologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Eksperimentalen del naloge je bil opravljen v Laboratoriju za pretočno citometrijo, Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinske fakultete, Univerze v Ljubljani.

Po sklepu Študijske komisije za študij 1. in 2. stopnje in na osnovi Pravilnika o magistrskem delu je bil za mentorja magistrskega dela imenovan prof. dr. Alojz Ihan, dr. med., za somentorico doc. dr. Andreja Nataša Kopitar, univ. dipl. biol. in za recenzenta prof. dr. Rok Kostanjšek, univ. dipl. biol.

Komisija za oceno in zagovor:

- Predsednik: prof. dr. Marko KREFT
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- Član: prof. dr. Alojz IHAN
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo
- Članica: doc. dr. Andreja Nataša KOPITAR
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo
- Recenzent: prof. dr. Rok KOSTANJŠEK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 7. 7. 2016

Podpisana izjavljam, da je magistrska naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reprodiciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Tjaša FIDERŠEK

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD	Du2
DK	UDK 616.1(043.2)=163.6
KG	CVK/poškodbe eritrocitov/mikropartikli/
AV	FIDERŠEK, Tjaša, diplomirana biologinja (UN)
SA	IHAN, Alojz (mentor)/KOPITAR, Andreja Nataša (somentorica)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij Strukturne in funkcionalne biologije
LI	2016
IN	VPLIV RAZLIČNIH VRST CENTRALNIH VENSKIH KATETROV NA POŠKODBE KRVNIH CELIC
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)
OP	XIV, 74 str., 8 pregl., 54 sl., 5 pril., 84 vir.
IJ	sl
JJ	sl/en
AI	Uporaba centralnih venskih katetrov (CVK) se v sodobni medicini povečuje, saj omogočajo izboljšanje zdravja pacientov. Vendar pa, lahko CVK prispevajo k različnim nezaželenim zapletom, kot so okužbe, nastanek krvnih strdkov in poškodbe krvnih celic. Namen našega dela je bil oceniti kako različen pretok (33 ml/min in 500 ml/min), ki poganja eritrocitni koncentrat skozi CVK, in različni parametri CVK (material, prevleka, geometrija, premer lumna, dolžina) vplivajo na poškodbe eritrocitov. Poškodbe eritrocitov smo opredelili s hematološko analizo in analizo mikropartiklov. Dokazali smo, da število lumnov vpliva na razlike v poškodbah eritrocitov, pri katetrih z več lumni je bilo manj poškodb. Dokazali smo tudi, da ima število lumnov večji vpliv na poškodbe kot geometrija tunela, in da geometrija nima vpliva na razlike v poškodbah eritrocitov. Pri nižjem pretoku prevleka, dolžina katetra in premer lumna niso imeli vpliva na razlike v poškodbah. Pri višjem pretoku je prevleka imela vpliv na razlike v poškodbah, dolžina katetra in premer lumna pa ne, oziroma je imela prevleka večji vpliv kot dolžina in premer. Katetri, ki so imeli prevleko, so pri višjem pretoku povzročali manj poškodb eritrocitov kot katetri brez prevleke. Nismo pa dokazali, da višji pretok povzroča več poškodb kot nižji pretok. Višji pretok je povzročal manj poškodb kot nižji pretok.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

DN	Du2
DC	UDC 616.1(043.2)=163.6
CX	CVC/damages of erythrocytes/microparticles
AU	FIDERŠEK, Tjaša
AA	IHAN, Alojz (supervisor)/KOPITAR, Andreja Nataša (co-advisor)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Structural and functional biology
PY	2016
TI	THE INFLUENCE OF DIFFERENT TYPES OF CENTRAL VENOUS CATHETERS ON BLOOD DAMAGES
DT	M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
NO	XIV, 74 p., 8 tab., 54 fig., 5 ann., 84 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	<p>The use of central venous catheters (CVC) in modern medicine is increasing, as they enable to improve the health of the patients. However, CVC could also contribute to various undesirable complications such as infections, blood clots formations and damages of blood cells. The aim of our study was to evaluate how different flow rate (33 and 500 ml/min), which drives the erythrocyte concentrate through CVC, and various parameters of CVC (material, coating, geometry, lumen diameter, length) affect on red blood cells damages. Damages of red blood cells were defined with haematological analysis and analysis of microparticles. We demonstrated that the number of lumen affects on the differences in erythrocytes damages, and that there was less damages at CVC with multiple lumens. We have also demonstrated that the number of lumens have greater influence on damages than geometry of the tunnel and that the geometry doesn't have affects on damages. At lower flow rate the coating, the length of the CVC and the lumen diameter had no influence on the differences in damages. At higher flow rate coating had an influence on the differences in damages, length of CVC and lumen diameter had no influence on damages, respectively, coating had greater influence than length and diameter. At higher flow rate CVC with coating causing less damages than CVC without coating. But we didn't demonstrated that higher flow rate cause more damages than lower flow rate. Higher flow rate has caused less damages than lower flow.</p>

KAZALO VSEBINE

	KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
	KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
	KAZALO VSEBINE	V
	KAZALO PREGLEDNIC	VIII
	KAZALO SLIK	IX
	KAZALO PRILOG	XII
	OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIII
1	UVOD	1
1.1	NAMEN DELA	3
1.2	DELOVNE HIPOTEZE	3
2	PREGLED OBJAV	4
2.1	CENTRALNI VENSKI KATETRI (CVK)	4
2.1.1	Namen uporabe CVK	4
2.1.2	Glavni zapleti povezani s CVK	4
2.1.3	Mesto vstavitve CVK	6
2.1.4	Material CVK	7
2.1.5	Vrste CVK	7
2.1.5.1	Netunelirani	8
2.1.5.2	Tunelirani	8
2.1.5.3	Periferno vstavljeni centralni katetri (PICC)	9
2.1.5.4	Vsajene venske dostopne naprave (Port)	10
2.2	HEMOREOLOGIJA	10
2.3	HEMATOLOŠKI PARAMETRI	12
2.3.1	Hematokrit	12
2.3.2	Hemoglobin	13
2.3.3	Hemoliza	13
2.4	MIKROPARTIKLI (MP)	13
2.4.1	Klasifikacija MP	14
2.4.1.1	Eksosomi	14
2.4.1.2	Eksosomom podobni vezikli	15

2.4.1.3	Mikrovezikli (MV)	15
2.4.1.4	Membranski partikli	15
2.4.1.5	Apoptotski vezikli	15
2.4.2	Sestava mikropartiklov	16
2.4.2.1	Lipidi	16
2.4.2.2	Proteini	17
2.4.3	Funkcija mikropartiklov	17
2.4.4	Nastanek mikropartiklov	18
2.4.4.1	Celična aktivacija	19
2.4.4.2	Celična apoptoza	20
2.4.5	Metode za preučevanje mikropartiklov	21
2.4.6	Mikropartikli glede na celico izvora	22
2.4.6.1	Eritrocitni mikropartikli	22
2.5	ANTIGENI, KI SMO JIH UPORABILI ZA DOKAZ MP ERITROCITNEGA IZVORA	23
2.5.1	Aneksin V (Ann V)	23
2.5.2	CD235a (Glikoforin A)	23
2.5.3	Karboksifluorescein sukcinimidil ester (CFSE)	23
3	MATERIAL IN METODE	25
3.1	PRIPRAVA VZORCEV	25
3.2	IZOLACIJA MIKROPARTIKLOV	25
3.3	OZNAČEVANJE MIKROPARTIKLOV	25
3.3.1	Priprava vzorca za ugotavljanje števila in koncentracije mikropartiklov in označevanje s CFSE	25
3.3.2	Priprava vzorca in označevanje mikropartiklov s CFSE, aneksinom V in CD235a	26
3.4	ANALIZA MIKROPARTIKLOV S PRETOČNIM CITOMETROM	26
3.4.1	Princip delovanja pretočnega citometra	26
3.4.2	Analiza vzorcev	27
3.5	HEMATOLOŠKI TESTI	30
3.6	HEMOREOLOŠKI IZRAČUNI	30

4	REZULTATI	33
4.1	UMERITVENE KRIVULJE	33
4.2	HEMATOLOŠKI REZULTATI IN REZULTATI MP	35
4.2.1	Nižji pretok (33 ml/min)	36
4.2.1.1	Primerjava CVK z enim lumnom, različnih proizvajalcev	36
4.2.1.2	Primerjava distalnih lumnov CVK s petimi lumni, različnih proizvajalcev	37
4.2.1.3	Primerjava CVK z enim lumnom in CVK s petimi lumni, istega proizvajalca	40
4.2.1.3.1	CVK proizvajalca A	40
4.2.1.3.2	CVK proizvajalca B	42
4.2.1.3.3	CVK proizvajalca C	42
4.2.1	Višji pretok (500 ml/min)	43
4.2.1.1	Primerjava CVK z enim lumnom, različnih proizvajalcev	43
4.2.1	Primerjava CVK z enim lumnom, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min in CVK z enim lumnom, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 500 ml/min, istega proizvajalca	46
4.2.1.1	CVK proizvajalca A	46
4.2.1.2	CVK proizvajalca B	49
4.2.1.3	CVK proizvajalca C	52
5	RAZPRAVA	56
5.1	VPLIV PREVLEKE	56
5.2	VPLIV DOLŽINE	57
5.3	VPLIV PREMERA LUMNA	58
5.4	VPLIV GEOMETRIJE TUNELA	60
5.5	VPLIV ŠTEVILA LUMNOV	61
5.6	VPLIV PRETOKA	62
6	SKLEPI	64
7	POVZETEK	65
8	VIRI	67
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Lastnosti CVK z enim lumnom proizvajalcev A, B in C.....	31
Pregl. 2: Lastnosti CVK s petimi lumni proizvajalcev A in B	31
Pregl. 3: Povprečna vrednost in standardna napaka celokupnega Hb, prostega Hb, Ht, hemolize, celokupnih MP in eritrocitnih MP pri različnih proizvajalcih CVK z enim lumnom, skozi katere je stekel eritrocitni koncentrat s pretokom 33 ml/min.	36
Pregl. 4: Povprečna vrednost in standardna napaka srednje in strižne hitrosti, strižne napetosti, časa izpostavljenosti in dinamične viskoznosti pri CVK z enim lumnom, različnih proizvajalcev, skozi katere je stekel eritrocitni koncentrat s pretokom 33 ml/min.	36
Pregl. 5: Povprečna vrednost in standardna napaka celokupnega Hb, prostega Hb, Ht, hemolize, celokupnih MP in eritrocitnih MP pri različnih proizvajalcih CVK s petimi lumni, skozi katere je stekel eritrocitni koncentrat čez distalni lumen s pretokom 33 ml/min.	38
Pregl. 6: Povprečna vrednost in standardna napaka srednje in strižne hitrosti, strižne napetosti, časa izpostavljenosti in dinamične viskoznosti pri CVK s petimi lumni, različnih proizvajalcev, skozi katere je stekel eritrocitni koncentrat čez distalni lumen s pretokom 33 ml/min	38
Pregl. 7: Povprečna vrednost in standardna napaka celokupnega Hb, Ht, celokupnih MP in eritrocitnih MP pri različnih proizvajalcih CVK z enim lumnom, skozi katere je stekel eritrocitni koncentrat s pretokom 500 ml/min	43
Pregl. 8: Povprečna vrednost in standardna napaka srednje in strižne hitrosti, strižne napetosti, časa izpostavljenosti in dinamične viskoznosti pri CVK z enim lumnom, različnih proizvajalcev, skozi katere je stekel eritrocitni koncentrat s pretokom 500 ml/min	43

KAZALO SLIK

Sl. 1: Shematski prikaz adsorpcije proteinov in adhezije krvnih celic na umetne površine ..2	2
Sl. 2: Shematski prikaz potencialnih virov okužb	5
Sl. 3: Shematski prikaz trombotskih okluzij	6
Sl. 4: Pre vlečeni katetri (levo) in neprevlečeni katetri (desno)	7
Sl. 5: Shematski prikaz netuneliranega katetra vstavljenega v notranjo jugularno veno	8
Sl. 6: Shematski prikaz tuneliranega katetra vstavljenega v veno subklavijo	9
Sl. 7: Shematski prikaz periferno vstavljenega centralnega katetra v veno na roki z izstopom katetrske konice v veni cavi	9
Sl. 8: Shematski prikaz vsajene venske dostopne naprave (Port) v veno	10
Sl. 9: Strižna hitrost.....	10
Sl. 10: Odvisnost viskoznosti od strižne hitrosti pri nenevtonskih tekočinah	11
Sl. 11: Povezava strižne hitrosti in strižne napetosti pri newtonskih in nenevtonskih tekočinah	11
Sl. 12: Odvisnost viskoznosti od hematokrita pri nenevtonskih tekočinah.....	12
Sl. 13: Odvisnost viskoznosti od premera žile pri nenevtonskih tekočinah.....	12
Sl. 14: Shematski prikaz klasične in direktne poti nastanka eksosomov	14
Sl. 15: Nastanek MP s celično aktivacijo	20
Sl. 16: Fluorosfere, ki smo jih ločevali glede na velikost	27
Sl. 17: Točkovni diagram populacije MP.....	28
Sl. 18: Fluorosfere, ki omogočajo štetje MP	28
Sl. 19: CFSE pozitivni MP (Q4).....	28
Sl. 20: Eritrocitni mikropartikli, ki so pozitivni na CD235a in CFSE (Q2).....	29
Sl. 21: Negativna kontrola za Ann V	30
Sl. 22: Diagram razčlenbe populacije MP.....	30
Sl. 23: Delež FITC v odvisnosti od koncentracije CFSE.....	33

Sl. 24: Delež APC v odvisnosti od volumna Ann V	34
Sl. 25: Delež PE v odvisnosti od volumna CD235a	34
Sl. 26: Strižna hitrost eritrocitnega koncentrata pri CVK z enim lumnom, proizvajalcev A, B in C, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min	37
Sl. 27: Strižna napetost pri CVK z enim lumnom, proizvajalcev A, B in C, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min	37
Sl. 28: Stopnja hemolize pri distalnem lumnju CVK s petimi lumni, proizvajalcev A in B, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min	39
Sl. 29: Strižna hitrost eritrocitnega koncentrata pri distalnem lumnju CVK s petimi lumni, proizvajalcev A in B, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min	39
Sl. 30: Strižna napetost pri distalnem lumnju CVK s petimi lumni, proizvajalcev A in B, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min	40
Sl. 31: Stopnja hemolize pri CVK proizvajalca A z enim in s petimi lumni, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min	41
Sl. 32: Koncentracija MP pri CVK proizvajalca A z enim in s petimi lumni, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min	41
Sl. 33: Stopnja hemolize pri CVK proizvajalca B z enim in s petimi lumni, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min	42
Sl. 34: Koncentracija celokupnega hemoglobina pri CVK z enim lumnom, proizvajalcev A, B in C, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 500 ml/min	44
Sl. 35: Delež hematokrita pri CVK z enim lumnom, proizvajalcev A, B in C, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 500 ml/min	44
Sl. 36: Strižna hitrost eritrocitnega koncentrata pri CVK z enim lumnom proizvajalcev A, B in C, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 500 ml/min	45
Sl. 37: Strižna napetost pri CVK z enim lumnom proizvajalcev A, B in C, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 500 ml/min	45
Sl. 38: Koncentracija celokupnega hemoglobina pri CVK z enim lumnom, proizvajalca A, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min in 500 ml/min	46
Sl. 39: Delež hematokrita pri CVK z enim lumnom, proizvajalca A, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min in 500 ml/min	47
Sl. 40: Koncentracija MP pri CVK z enim lumnom, proizvajalca A, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min in 500 ml/min	47

Sl. 41: Strižna hitrost eritrocitnega koncentrata pri CVK z enim lumnom, proizvajalca A, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min in 500 ml/min	48
Sl. 42: Strižna napetost pri CVK z enim lumnom, proizvajalca A, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min in 500 ml/min	48
Sl. 43: Čas izpostavljenosti eritrocitnega koncentrata pri CVK z enim lumnom, proizvajalca A, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min in 500 ml/min	49
Sl. 44: Koncentracija celokupnega hemoglobina pri CVK z enim lumnom, proizvajalca B, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min in 500 ml/min	49
Sl. 45: Koncentracija MP pri CVK z enim lumnom, proizvajalca B, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min in 500 ml/min.....	50
Sl. 46: Strižna hitrost eritrocitnega koncentrata pri CVK z enim lumnom, proizvajalca B, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min in 500 ml/min	51
Sl. 47: Strižna napetost pri CVK z enim lumnom, proizvajalca B, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min in 500 ml/min	51
Sl. 48: Čas izpostavljenosti eritrocitnega koncentrata pri CVK z enim lumnom, proizvajalca B, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min in 500 ml/min	52
Sl. 49: Koncentracija celokupnega hemoglobina pri CVK z enim lumnom, proizvajalca C, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min in 500 ml/min	53
Sl. 50: Delež hematokrita pri CVK z enim lumnom, proizvajalca C, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min in 500 ml/min.....	53
Sl. 51: Koncentracija MP pri CVK z enim lumnom, proizvajalca C, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min in 500 ml/min.....	54
Sl. 52: Strižna hitrost eritrocitnega koncentrata pri CVK z enim lumnom, proizvajalca C, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min in 500 ml/min	54
Sl. 53: Strižna napetost pri CVK z enim lumnom, proizvajalca C, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min in 500 ml/min	55
Sl. 54: Čas izpostavljenosti eritrocitnega koncentrata pri CVK z enim lumnom, proizvajalca C, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min in 500 ml/min	55

KAZALO PRILOG

Pril. A 1: P vrednosti statistične analize CVK z enim lumnom, proizvajalcev A, B in C, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min.....	76
Pril. A 2: P vrednosti statistične analize CVK s petimi lumni, proizvajalcev A in B, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min.....	76
Pril. A 3: P vrednosti statistične analize CVK z enim lumnom in s petimi lumni, istega proizvajalca, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min.....	76
Pril. A 4: P vrednosti statistične analize CVK z enim lumnom, proizvajalcev A, B in C, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 500 ml/min.....	77
Pril. A 5: P vrednosti statistične analize CVK z enim lumnom, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min in 500 ml/min, istega proizvajalca.....	77

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Ann V	aneksin V
APC	alofikocianin
ATP	adenozin trifosfat
CD4	koreceptor za molekule MHC II
CD14	monocitni diferenciacijski antigen
CD28	kostimulatorni protein potreben za T celično aktivacijo
CD45	receptorski tip tirozin fosfataze c
CD61	integrin $\beta 3$
CD62	P selektin
CD63	tetraspanin 30
CD81	tetraspanin 28
CD82	tetraspanin 27
CD133	prominin-1
CD235a	glikoforin A
CFSE	karboksifluorescein sukcinimidil ester
CVK	centralni venski katetri
ELISA	encimski imunski test
FITC	fluorescein izotiocianat (ang. »fluorescein isothiocyanate«)
FSC	fotodetektor v smeri vira svetlobe, ki meri velikost (ang. Forward-scattered light)
Hb	hemoglobin
HEPES	bipolarni ionski pufer
Ht	hematokrit
ILV	intraluminalni vezikel

MCH	povprečna vrednost hemoglobina v enem eritrocitu
MCHC	povprečna koncentracija hemoglobina v eritrocitu
MCV	povprečna prostornina eritrocitov
miRNA	mikro RNA (ang. »micro RNA«)
MP	mikropartikli
MV	mikrovezikli
MVE	multivezikularni endosom
PE	fikoeritrin
PICC	periferno vstavljeni katetri
ROCK 1	ang. »Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1«
SSC	fotodetektor, ki meri sipano svetlobo (ang. Side-scattered light)
TF	tkivni faktor

1 UVOD

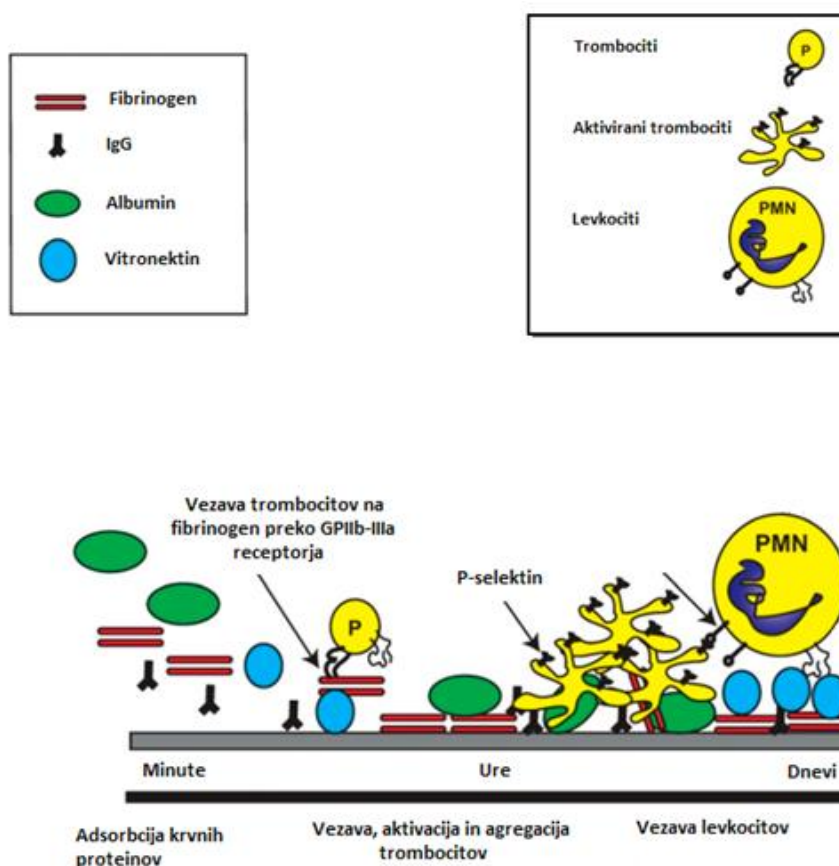
Krvne celice se lahko poškodujejo, če so v stiku z umetnimi površinami (plastika, kovina, steklo) (Vogler in Siedlecki, 2009), s kavitacijo, s trki med celicami (Baskurt, 2012) in s turbulentni tokovi (Vercaemst, 2008). Med potencialnimi viri poškodb krvnih celic so tudi katetri (Lippi in sod., 2013).

Uporaba katetrov in drugih zunajtelesnih in znotrajtelesnih pripomočkov se v sodobni medicini nenehno povečuje. Čeprav katetri omogočajo izboljšanje zdravja pacientov, hidrofobni značaj površinskih materialov njihovih površin pospešuje adsorpcijo proteinov in adhezijo celic, zaradi česar pride do različnih nezaželenih zapletov (Chauhan in sod., 2014). Najpogostejši zapleti pri uporabi kardiovaskularnih pripomočkov so poškodbe krožečih krvnih komponent, nastanek krvnih strdkov, aktivacija komplementnega sistema in drugih imunoloških poti (Ratner in sod., 1996), hemoliza in sprostitvev hemoglobina v plazmo (Vercaemst, 2008). Adsorpcija proteinov in adhezija krvnih celic, ter nastanek krvnih strdkov, lahko ogrozijo funkcijo pripomočkov, na ta način, da ovirajo pretok skozi njih (Ratner in sod., 1996).

Ko je kri izpostavljena pripomočkom se najprej začne adsorbirati proteinska plast na njihove umetne površine (Ratner in sod., 1996). Proteinska plast doseže debelino od 2 do 10 nm (Tengvall in sod., 1998). Adsorpcija krvnih plazemskih proteinov je hiter proces, ki v nekaj sekundah ustvari biološko aktivno površino, ki lahko reagira z drugimi krvnimi mehanizmi (Nygren in sod., 1997). Plazemski proteini, ki se adsorbirajo so albumini, globulini, fibrinogen, trombin ... Med tem ko adsorbirani proteini vzpostavljajo ravnovesno stanje, se začne adhezija krvnih celic (trombociti, eritrociti, levkociti) na proteinsko plast (Colman in sod., 2006). Dinamika adsorpcije proteinov je povezana z vrsto beljakovine, ter kemijskimi in fizikalnimi lastnostmi površine (Tran in sod., 2000). Hidrofobne površine adsorbirajo več proteinov kot hidrofilne (Wilson in sod., 2005).

Adhezivni receptorji trombocitov prepoznajo adsorbirane proteine na umetnih površinah, kar lahko vodi do adhezije, širjenja in aktivacije trombocitov. Potencialni mediatorji za adhezijo trombocitov so fibrinogen, fibronektin, vitronektin, imunoglobulini in Willebrandov faktor (slika 1). Ključni protein za adhezijo trombocitov je fibrinogen (Tsai in sod., 2002), med tem ko fibronektin, imunoglobulini in Willebrandov faktor kažejo le podporne učinke, ki so lahko povezani z aktivacijo trombocitov (Grunkemeier in sod., 2000). Količina adsorbiranega fibrinogena, ki je potrebna za adhezijo trombocitov je zelo majhna - 7 ng/cm^2 (Tsai in sod., 1999). Adhezija trombocitov na hidrofobnih površinah steče v manj kot 5 s, na hidrofilnih pa v manj kot 30 s (Yayapour in Nygren, 1999). Adsorpcija določenih prokoagulantov na umetne površine lahko aktivira intrinzični sistem koagulacije krvi, kar pa lahko vodi do nastanka krvnih strdkov (Colman in sod., 2006). Takšen je na primer faktor XII, ki se avtoaktivira na umetnih površinah (Vogler in

Siedlecki, 2009). V aktivacijo sistema intrinzične koagulacije krvi lahko vodi tudi adhezija levkocitov na umetne površine, preko izpostavljenosti tkivnega faktorja na plazemski membrani vezanih celic (Colman in sod., 2006). Nekatere študije predpostavljajo, da se začetna pritrnitev trombocitov na umetne površine poveča, če se poveča pretok krvi, oziroma če se poveča strižna hitrost (ang. »shear rate«). Pritrditev trombocitov je odvisna od vrste materiala in pretoka (Ratner in sod., 1996). Kameneva in Antaki (2007) pa opisujeta, da se, pri uporabi kardiovaskularnih naprav, pri nizkem pretoku in nizki strižni hitrosti poveča viskoznost in lahko pride do agregacije eritrocitov *in vivo* in *in vitro*. Frieke in sodelavci (2005) opisujejo, da se s povečanjem strižne hitrosti zmanjša viskoznost krvi (znano je, da povišana viskoznost krvi napeljuje k kardiovaskularnim boleznim). Strižna hitrost pa se poveča s povečanjem pretoka. Westerhof in sodelavci (2010) prav tako opisujejo, da se viskoznost zmanjša kadar se strižna hitrost poveča. Pri visoki strižni hitrosti se eritrociti usmerijo v smer toka in viskoznost je nižja. Pri nizkih strižnih hitrostih pa lahko pride do agregacije eritrocitov, kar poveča viskoznost.



Slika 1: Shematski prikaz adsorpcije proteinov in adhezije krvnih celic na umetne površine (prirejeno po Slee in sod., 2014)

Na adsorbirano proteinsko plast se trombociti in levkociti (še posebej nevtrofilci) vežejo pogosto in v velikem številu. Toda zdi se, da se eritrociti slabo vežejo na umetne površine. Dokazano je bilo, da se eritrociti *in vitro* vežejo na umetne površine z majhnim območjem na plazemski membrani, vendar morfološke študije hemodializnih membran kažejo, da se *in vivo* veže relativno malo eritrocitov na umetne površine (Colman in sod., 2006).

Eritrociti so med svojim življenjskim obdobjem izpostavljeni mehanskim obremenitvam na različnih ravneh krvožilnega sistema. Na te učinke odgovorijo s spreminjanjem oblike (Baskurt, 2012). Če eritrociti krožijo skozi umetne organe ali pripomočke, ki črpajo in procesirajo kri, so lahko poškodovani ali uničeni (Paul in sod., 2003). Poškodbe eritrocitov so opredeljene s hemolizo, sprostitvijo hemoglobina iz celice, morfološkimi spremembami, življenjsko dobo eritrocitov ... Fizične sile, ki lahko vplivajo na poškodbe eritrocitov so strižna napetost (ang. »shearing stress«), različen tlak in neposreden vpliv trdnih površin (Nevaril in sod., 2004). Med potencialnimi viri poškodb eritrocitov so katetri. V številnih študijah je bilo dokazano, da je pri uporabi katetrov precejšnje tveganje hemolize (Lippi in sod., 2013).

1.1 NAMEN DELA

Namen magistrskega dela je bilo oceniti kako različni parametri (material, prevleka, geometrija tunela, dolžina, premer lumna, število lumnov) centralnih venskih katetrov in pretok skozi centralne venske katetre vplivajo na poškodbe eritrocitov.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- H1: Posamezne lastnosti centralnih venskih katetrov (material, prevleka, geometrija tunela, dolžina, premer lumna, število lumnov) vplivajo na število nastalih mikroparticlov iz eritrocitov.
- H2: Posamezne lastnosti centralnih venskih katetrov (material, prevleka, geometrija tunela, dolžina, premer lumna, število lumnov) vplivajo na hematološke parametre (koncentracija prostega in celokupnega hemoglobina, delež hematokrita in stopnja hemolize).
- H3: Višji pretok, ki poganja eritrocitni koncentrat skozi centralne venske katetre, povzroča več poškodb eritrocitov kot nižji pretok.

2 PREGLED OBJAV

2.1 CENTRALNI VENSKI KATETRI (CVK)

Izraz centralni venski kateter se nanaša na intravenski kateter, katerega konica leži v veliki centralni veni. Obstajajo različne vrste CVK, vendar je vsem skupno, da konica katetra prosto lebdi znotraj krvnega obtoka v veliki veni, vzporedno z vensko steno (Priročnik Central venous catheter care guidelines, 2011).

2.1.1 Namen uporabe CVK

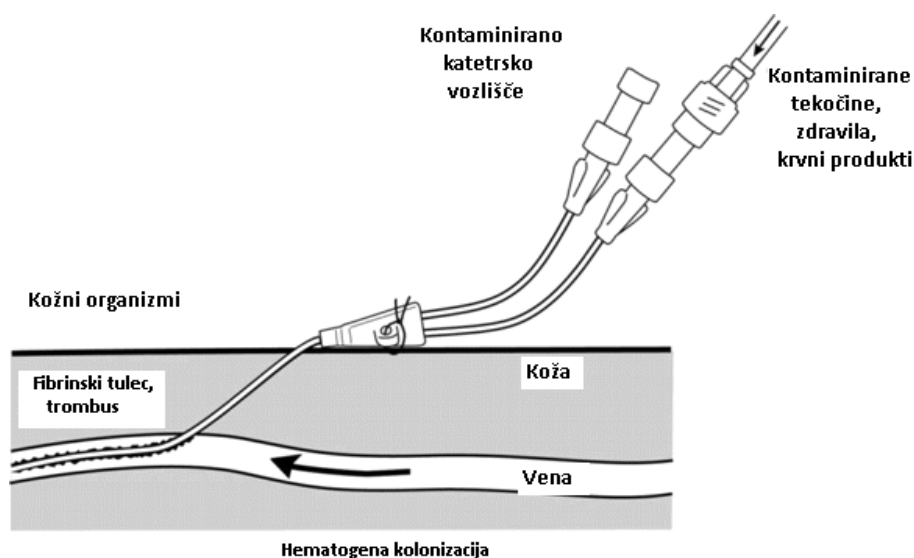
Centralni venski katetri se uporabljajo za:

- spremljanje zdravja pacientov,
- zagotavljanje zdravil,
- citotoksično terapijo in ostale kompleksne terapije z zdravili,
- infuzijo hipotoničnih in hipertoničnih raztopin, raztopin z ekstremnim pH in osmolarnostjo,
- neposreden vnos hrane v kri,
- neposredno meritev krvnega tlaka velike ali centralne vene,
- pogost odvzem krvnega vzorca,
- povezavo osebe z okvarjeno ledvico s hemodializnim aparatom,
- vstavljanje desnega srčnega katetra (Swan Ganz kateter) (Culverwell, 2013; Fahy in Sockrider, 2007; May in sod., 2015).

2.1.2 Glavni zapleti povezani s CVK

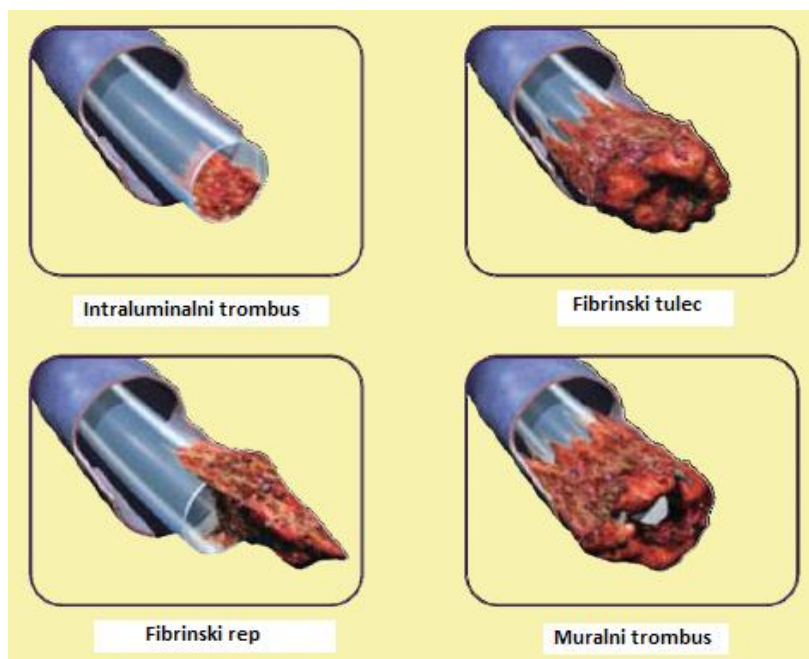
Največji zaplet pri uporabi CVK so okužbe, ki se pojavijo pri 3 – 8 % vseh vstavljenih katetrah. Pred okužbo pride najprej do kolonizacije endovaskularne konice katetra po ekstraluminalni ali intraluminalni poti (Frasca in sod., 2010). Patogeneza infekcij povezanih s CVK je odvisna od vrste katetra. Kratkoročni katetri so povezani z ekstraluminalno kolonizacijo – mikroorganizmi vstopijo v krvni obtok preko kože, na vstopnem mestu katetra (slika 2) (Crnich in Maki, 2002). Vsaka cevka (kateter), ki vstopa v telo, lahko olajša bakterijam, da preidejo iz kože v krvni obtok (Fahy in Sockrider, 2007). Koža je primarni vir infekcije, ki je lahko sistemska ali lokalna (Culverwell, 2013).

Dolgoročni katetri so povezani z intraluminalno kolonizacijo – mikroorganizmi vstopijo v krvni obtok najpogosteje preko katetrskega vozlišča (ang. »catheter hub«), lahko pa tudi preko kontaminiranih tekočin, zdravil in krvnih produktov (slika 2). Redkeje lahko pride do hematogene kolonizacije iz oddaljenih infekcij, ki niso povezane s katetri (Crnich in Maki, 2002). Gostiteljevi proteini (npr. fibronektin), ki so pogosto prisotni na konici katetrov, olajšajo kolonizacijo mikroorganizmov. Najpogostejši mikroorganizmi ki so povezani z infekcijo so koagulaza negativni stafilokoki, *Staphylococcus aureus*, *Candida sp.* (Frasca in sod., 2010), *Staphylococcus epidermidis* (May in sod., 2015), tudi enterokoki in gram-negativni bacili (Frasca in sod., 2010).



Slika 2: Shematski prikaz potencialnih virov okužb (prirejeno po Crnich in Maki, 2002: 3)

Uporaba katetrov lahko povzroči okluzije (zapore), ki so trombotskega, netrombotskega ali mehanskega vzroka. Okluzija katetra je definirana kot delna ali popolna obstrukcija (zamašitev) katetra, ki omejuje ali preprečuje možnost izstopa krvi, spiranje, dovajanje zdravil in raztopin (Culverwell, 2013). Trombotska okluzija vključuje intraluminalni trombus, fibrinski rep, fibrinski tulec in muralni trombus (slika 3) (Culverwell, 2013). Po adsorpciji proteinov in adheziji trombocitov se trombociti aktivirajo in pospešijo koagulacijsko kaskado, kar lahko vodi do tvorbe fibrinskega tulca vzdolž naprave v roku 24 h (May in sod., 2015). Fibrinska ovojnica je nekakšna vrsta tulca iz kolagenih snovi, ki se lahko tvorijo okoli katetra v krvnem obtoku. Netrombotske okluzije vključujejo oborine zdravil in depozite lipidov. Do mehanskega vzroka okluzije lahko pride, če je, na primer, vstavljena katetrsko konica prevelika oziroma je žila premajhna (Priročnik Central venous catheter care guidelines, 2011).



Slika 3: Shematski prikaz trombotičnih okluzij (prirejeno po Winfield in Kanji, 2008: 4)

Ostali zapleti, ki se pojavijo pri uporabi CVK so krvavitve, predstavljajo nelagodje za pacienta med samo umestitvijo (Fahy in Sockrider, 2007) in lahko pride do zračnega embolizma (Culverwell, 2013).

2.1.3 Mesto vstavitve CVK

Čeprav je v telesu veliko ven, jih je le nekaj primernih za vstavitve CVK (Culverwell, 2013). Mesto vstavitve CVK je odvisno od vrste in dolžine terapije (Priročnik Central venous catheter in adult patients, 2011). Zaradi razlik v lokalni gostoti flore kože lahko mesto vstavitve vpliva na infekcije (Frasca in sod., 2010).

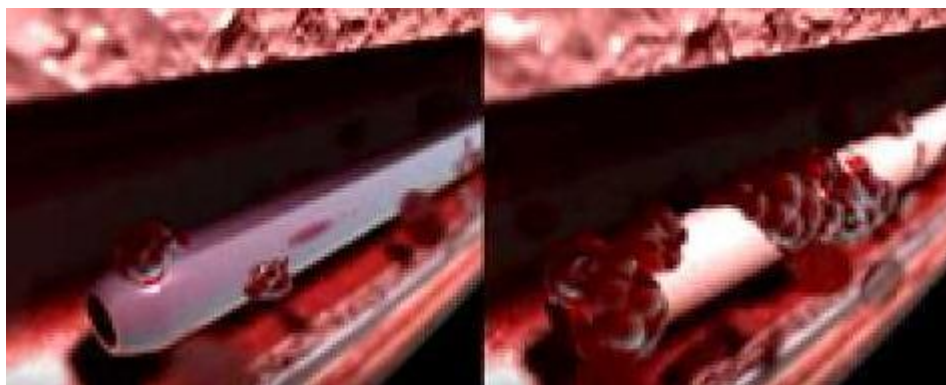
Centralni venski katetri so vstavljeni na:

- vratu ali zgornjem delu prsnega koša (notranja jugularna vena, zunanja jugularna vena, vena subklavija),
- roki (brahialna, cefalična, bazilarna vena) in
- v dimljah (femoralna vena) (Priročnik Central venous catheter in adult patients, 2011).

2.1.4 Material CVK

Pomemben dejavnik pri preprečevanju okužb in ostalih zapletov, ki lahko nastanejo pri uporabi katetrov je njihova vrsta materiala. Material mora biti biokompatibilen, hemokompatibilen, biostabilen, kemično nevtralen in aplicirana zdravila ga ne smejo spremeniti. Teflonski in poliuretanski katetri so povezani z manjšim številom infekcijskih zapletov, kot katetri iz polivinil-klorida in polietilena (Frasca in sod., 2010). Večina katetrov, ki se uporabljajo v sodobni medicini je iz poliuretana (May in sod., 2015) in silikona (Culverwell, 2013). Poliuretan zagotavlja prožnost, odpornost (May in sod., 2015), je omehčan v veni, je trombo-odporen, omogoča višje pretoke in visoko stopnjo biokompatibilnosti. Silikon zagotavlja prožnost, je mehak, odporen na mnoge kemikalije, vendar je manj trombo-odporen, ima slabo toleranco na tlak in zdravila lahko pronicajo v material (Culverwell, 2013).

Katetri so lahko prevlečeni z antimikrobnimi in antiseptični sredstvi, ki zmanjšajo adhezijo mikroorganizmov in nastanek biofilma in s tem nevarnost infekcij povezanih s katetri. Prevlečeni katetri, v primerjavi s standardnimi katetri, zmanjšajo kolonizacijo in okužbe. Sredstva s katerimi so lahko katetri prevlečeni so klorheksidin, srebrov sulfadiazin, minociklin in rifampin (Frasca in sod., 2010). Lahko imajo tudi heparinske prevleke, ki zmanjšajo nastajanje krvnih strdkov (slika 4) (Priročnik Central venous catheter in adult patients, 2011).



Slika 4: Prevlečeni katetri (levo) in neprevlečeni katetri (desno) (Vir slike: <https://www.youtube.com/watch?v=84Z4Lu7CfIQ>)

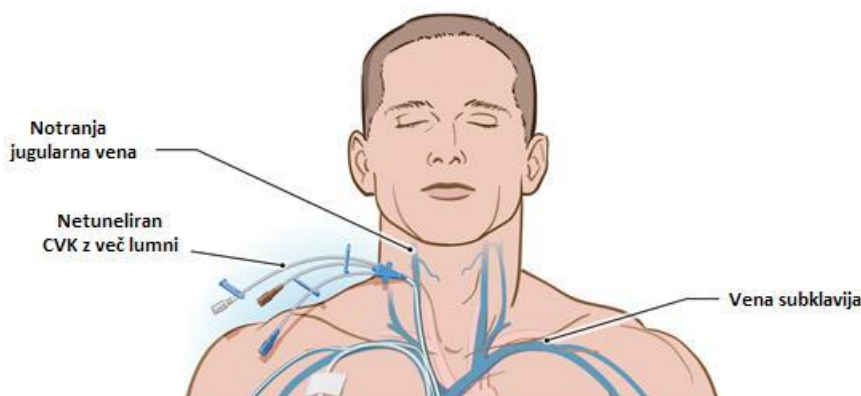
Slika prikazuje neprevlečene in prevlečene katetre. Razvidno je, da prevlečeni katetri zmanjšajo nastajanje krvnih strdkov v primerjavi z neprevlečenimi.

2.1.5 Vrste CVK

Katetri so različni po velikosti in imajo enega ali več lumnov (Culverwell, 2013). Pri katetrih z več lumni vsak posamezen lumen omogoča neodvisen dostop v venski krvni obtok. To omogoča dajanje dveh nezdružljivih zdravil ob istem času in ločeno dovajanje vazopresorjev in prehrane (Frasca in sod., 2010).

2.1.5.1 Netunelirani

Vstavljeni so neposredno (perkutano) v centralno veno (notranjo jugularno veno, veno subklavijo, femoralno veno) skozi kožo (slika 5). So kratkoročni silikonski ali poliuretanski katetri, vstavljeni manj kot 3 tedne (Priročnik Preventing central line – associated bloodstream infections, 2012). Imajo enega ali več lumnov (Priročnik Central venous catheter in adult patients, 2011).



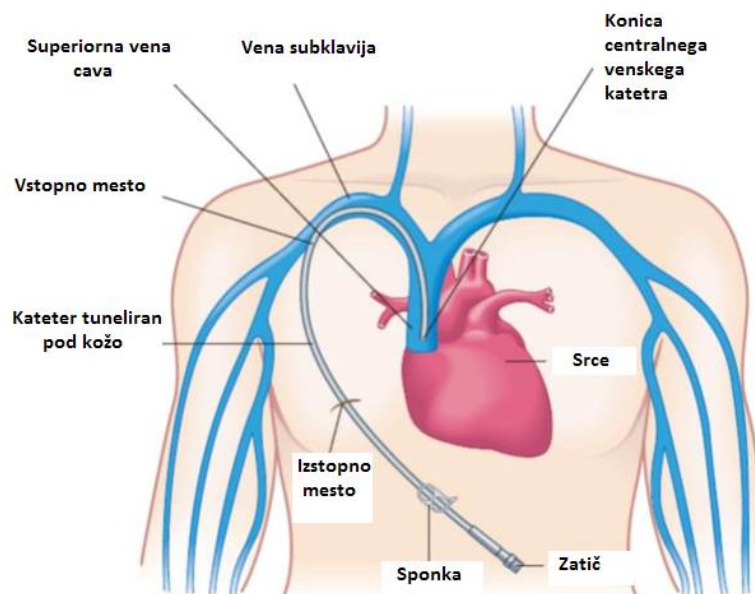
Slika 5: Shematski prikaz netuneliranega katetra vstavljenega v notranjo jugularno veno (prirejeno po Kirby in Corrigan, 2013)

2.1.5.2 Tunelirani

Vstavljeni so v notranjo jugularno veno, veno subklavijo in femoralno veno. So kirurško tunelirani pod kožo in izstopijo iz kože nekaj centimetrov stran od vene (slika 6) (Priročnik Preventing central line – associated bloodstream infections, 2012). Podkožno tuneliranje zmanjša pojavnost okužb, predvidoma zaradi povečane razdalje med vstopnim mestom v veni in vstopnim mestom v koži. Študije so pokazale, da tunelirani katetri zmanjšajo kolonizacijo za 39 % in infekcijo krvi za 40 % v primerjavi z netuneliranimi. Prednost tunelov je tudi boljša fiksacija katetra (Frasca in sod., 2010). So dolgoročni poliuretanski ali silikonski katetri (Priročnik Preventing central line – associated bloodstream infections, 2012), ki so vstavljeni več mesecev (do enega leta) in zapustijo kožo preko podkožnega tunela. Lahko imajo enega, dva ali tri lumne. Uporabljajo se za apliciranje zdravil, parentalne prehrane, hemodializo, vzorčenje in dajanje krvi in krvnih produktov (Priročnik Central venous catheter in adult patients, 2011).

Fideršek T. Vpliv različnih vrst centralnih venskih katetrov na poškodbe krvnih celic.

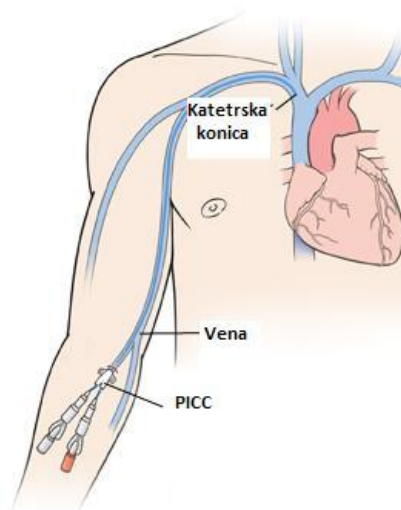
Mag. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij strukturne in funkcionalne biologije, 2016



Slika 6: Shematski prikaz tuneliranega katetra vstavljenega v veno subklavijo (vir slike: <http://www.lymphomas.org.uk/about-lymphoma/treatment/chemotherapy-lymphoma>)

2.1.5.3 Periferno vstavljeni centralni katetri (PICC)

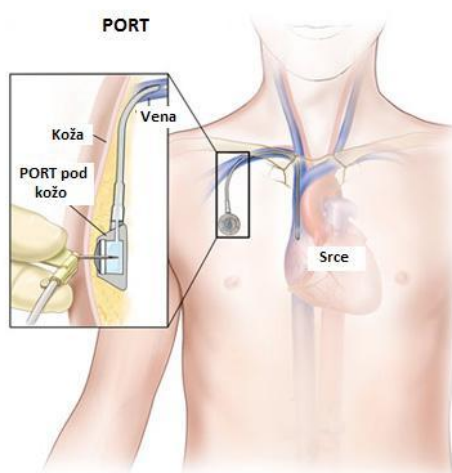
Vstavljeni so perkutano v bazilarno, brahialno ali cefalično veno in vstopijo v superiorno veno cavo (slika 7). So dolgoročni katetri (Priročnik Preventing central line – associated bloodstream infections, 2012), ki so vstavljeni nekaj tednov ali mesecev. Uporabljajo se pri pacientih, ki potrebujejo intravensko (IV) terapijo (Priročnik Central venous catheter in adult patients, 2011).



Slika 7: Shematski prikaz periferno vstavljenega centralnega katetra v veno na roki z izstopom katetrski konice v veni cavi (vir slike: <http://www.uofmchildrenshospital.org/healthlibrary/Article/85527>)

2.1.5.4 Vsajene venske dostopne naprave (Port)

Vstavljene so v veno subklavijo in notranjo jugularno veno. So kirurško v celoti vstavljene (tunnelirane) pod kožo (slika 8). So dolgoročne ali stalne naprave, iz plastike, titana ali nerjavečega jekla (Priročnik Preventing central line – associated bloodstream infections, 2012).

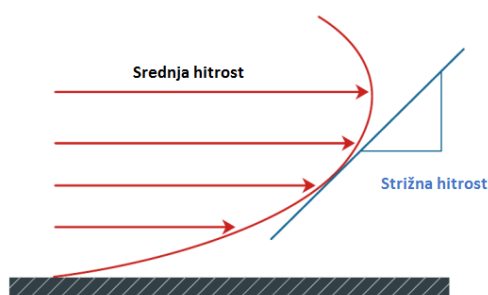


Slika 8: Shematski prikaz vsajene venske dostopne naprave (Port) v veno (vir slike: <http://curesearch.org/Central-Lines>)

2.2 HEMOREOLOGIJA

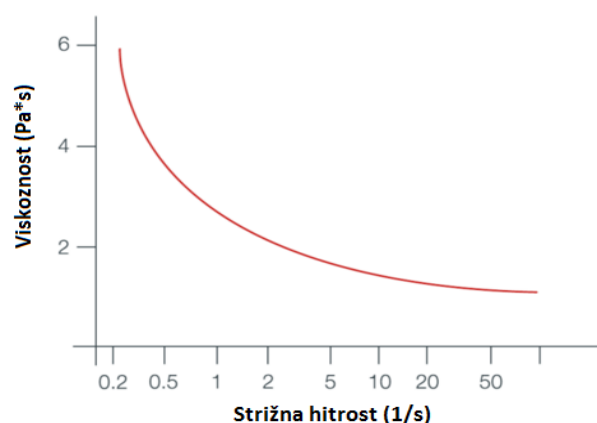
Hemoreologija je veda o fizikalnih lastnostih pretoka krvi v cirkulatornem sistemu (<http://www.merriam-webster.com/medical/hemorheology>, januar 2016).

Različni sloji krvi se gibljejo z različno hitrostjo. Razlika v hitrosti med dvema različnima slojema tekočine (krvi), z ozirom drug na drugega, je strižna hitrost. V splošnem je strižna hitrost nagib hitrostnega profila (slika 9). Ko se dva sloja krvi z različno hitrostjo dotikata drug drugega pride med njima do strižne napetosti (Westerhof in sod., 2010). Srednja hitrost, imenovana tudi središčna hitrost, je hitrost v sredini cevi - katetra (slika 9) (Rubenstein in sod., 2015).

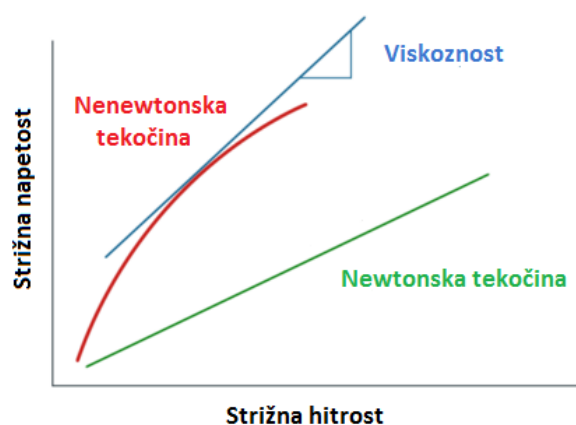


Slika 9: Strižna hitrost (prirejeno po Westerhof in sod., 2010)

Kri je nekoč veljala za newtonsko tekočino. Danes je znano, da je kri nenevtonska tekočina. Lastnost, ki dela kri nenevtonsko je viskoelastičnost, ki je osnova reološke lastnosti krvi in je odvisna od elastičnosti eritrocitov (Abdel Baieth, 2008). Pri nenevtonskih tekočinah je viskoznost odvisna od strižne hitrosti (slika 10), pri newtonskih tekočinah pa viskoznost ni odvisna od strižne hitrosti (Cokelet, 2011). Povezava strižne hitrosti in strižne napetosti pri newtonskih tekočinah je linearna, pri nenevtonskih tekočinah pa nelinearna (slika 11) (Westerhof in sod., 2010).

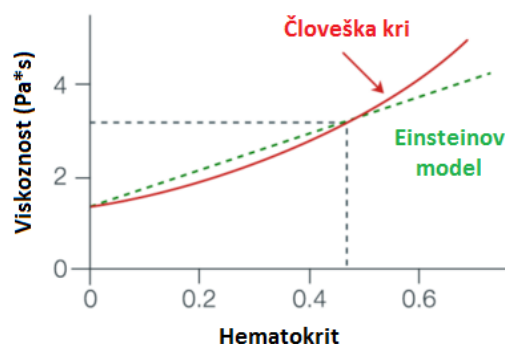


Slika 10: Odvisnost viskoznosti od strižne hitrosti pri nenevtonskih tekočinah (prirejeno po Westerhof in sod., 2010)

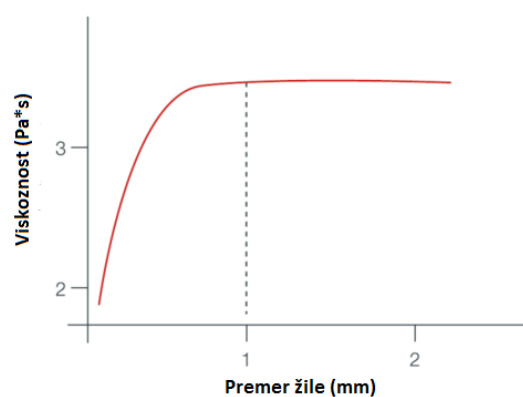


Slika 11: Povezava strižne hitrosti in strižne napetosti pri newtonskih in nenevtonskih tekočinah (prirejeno po Westerhof in sod., 2010)

Viskoznost krvi je odvisna tudi od viskoznosti plazme, deformabilnosti eritrocitov, deleža hematokrita (slika 12) in od premera žile (slika 13) (Westerhof in sod., 2010)



Slika 12: Odvisnost viskoznosti od hematokrita pri nenewtonskih tekočinah (prirejeno po Westerhof in sod., 2010)



Slika 13: Odvisnost viskoznosti od premera žile pri nenewtonskih tekočinah (prirejeno po Westerhof in sod., 2010)

2.3 HEMATOLOŠKI PARAMETRI

V hematologiji sta struktura in metabolizem eritrocitov opisani preko različnih parametrov, ki vključujejo število eritrocitov, koncentracijo hemoglobina, delež hematokrita, povprečno prostornino eritrocitov (MCV), povprečno vrednost hemoglobina v enem eritrocitu (MCH) in povprečno koncentracijo hemoglobina v eritrocitu (MCHC) (Lippi in sod., 2012).

2.3.1 Hematokrit

Beseda hematokrit izvira iz grške besede »hema«, ki pomeni kri in »krites«, ki pomeni umerjanje ali presojanje krvi. Hematokrit (Ht) je razmerje med volumnom eritrocitov in volumnov celotne krvi (Billett, 1990). Normalne vrednosti so 0,41 – 0,53 pri moških in 0,36 – 0,46 pri ženskah (Lippi in sod., 2012). Njegovo vrednost lahko določimo neposredno z mikrohematokritsko centrifugo in posredno s hematološkim analizatorjem. Mikrohematokritska centrifuga je pripomoček, ki vrtil kapilarno cevko pri visoki hitrosti,

pri čemer se ločijo celične komponente od tekočine. Pri uporabi hematološkega analizatorja je hematokrit elektronsko izračunan, pri čemer se upošteva število eritrocitov in volumen (Estridge in sod., 2000).

2.3.2 Hemoglobin

Hemoglobin je glavna komponenta eritrocitov (Lippi in sod., 2012) in je protein, ki je specializiran za prenos kisika (Fosbery in sod., 2001). Daje rdečo barvo eritrocitom in krvi. Njegova primarna funkcija je transport kisika iz pljuč do tkiv in prenos ogljikovega dioksida iz tkiv v pljuča, kjer se CO₂ izloči. Hemoglobin je sestavljen iz dveh delov, iz hema in globina (Estridge in sod., 2000). V vsaki molekuli hemoglobina so štirje polipeptidi, dva α -globina in dva β -globina. Vsak polipeptid ima terciarno strukturo, v sredini katerega je molekula hema. Molekula hema pa ima v sredini atom železa na katerega se veže kisik. To pomeni, da ena molekula hemoglobina lahko nosi štiri atome kisika (Fosbery in sod., 2001).

2.3.3 Hemoliza

Beseda hemoliza izhaja iz grške besede »*hemo*«, ki pomeni kri in »*lysis*«, ki pomeni razpad. Je patološki proces, ki je ovrednoten z razpadom eritrocitov in se kaže v sprostitvi hemoglobina in drugih znotrajceličnih komponent v krvno plazmo. Hemoliza je povezana s povečano koncentracijo prostega hemoglobina. Izhaja lahko iz dveh virov, *in vivo* in *in vitro*. Vzroki za hemolizo *in vivo* so napake v sintezi hemoglobina ali membrane eritrocitov, okvarjen metabolizem eritrocitov, infekcije, mehanske poškodbe v obtoku, transfuzija krvi z drugačno krvno skupino in drugi. Vzroki za hemolizo *in vitro* so odvisni od pacienta in medicinskega osebja, od medicinskih pripomočkov, od obdelave vzorca, transporta in shranjevanja vzorca (Lippi in sod., 2012). Študije kažejo, da je povečana stopnja hemolize povezana tudi z uporabo katetrov (Danielis, 2014).

2.4 MIKROPARTIKLI (MP)

MP so bili prvič identificirani leta 1967, med Wolfovo raziskavo strjevanja krvi, kot produkt trombocitov, ki ga je poimenoval trombocitni prah (VanWijk in sod., 2003).

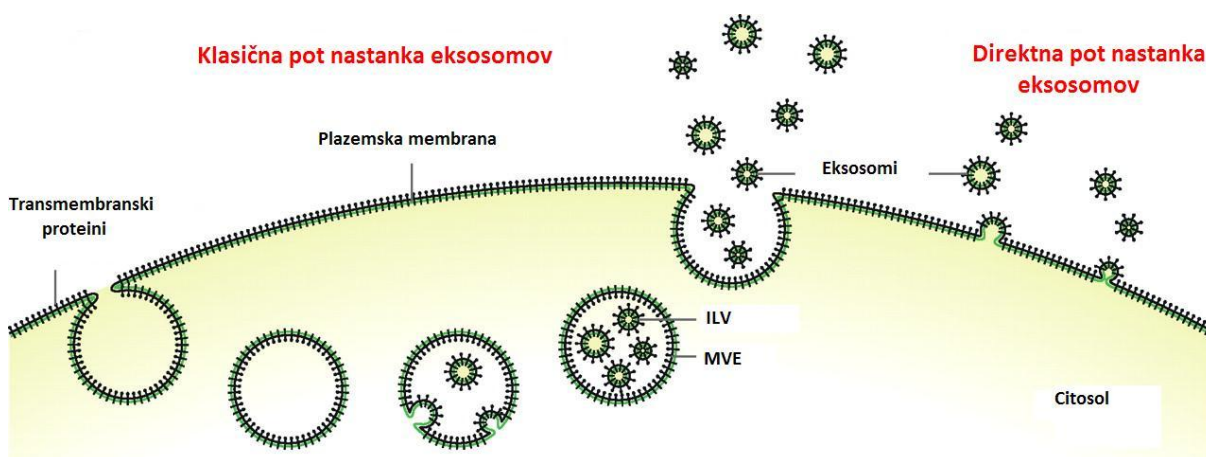
Danes velja, da so heterogena populacija (Morel in sod., 2011) submikronskih fosfolipidnih veziklov, ki izvirajo iz različnih vrst celic (Hargett in Bauer, 2013) - levkocitov, trombocitov, eritrocitov, monocitov, endotelnih celic (Kent in sod., 2014) in granulocitov (Morel in sod., 2011).

2.4.1 Klasifikacija MP

Klasifikacija MP temelji na njihovem celičnem izvoru, mehanizmu nastanka (Orozco in Lewis, 2010) in velikosti (Gyorgy in sod., 2011). MP, ki izvirajo iz znotrajceličnih multivezikularnih telesc, ki se zlijejo s plazemsko membrano, se imenujejo eksosomi in eksosomom podobni vezikli. MP, ki nastanejo z brstenjem plazemske membrane so mikrovezikli, membranski partikli in apoptotična telesa (Orozco in Lewis, 2010).

2.4.1.1 Eksosomi

So majhni transportni vezikli, ki so prisotni v številnih ali morda celo v vseh bioloških tekočinah, vključno z urinom, krvjo, likvorjem, materinim mlekom, slino in frakcijo telesnih tekočin (serum, plazma) (Van der Pol in sod., 2012). Nastanejo po klasični ali direktni poti (slika 14). Klasična pot vključuje nastanek intraluminalnih veziklov (ILV) znotraj multivezikularnih endosomov (MVE). MVE se lahko zlijejo z lizosomom za razgradnjo tovora ali s plazemsko membrano za izločanje ILV, ki so potem sproščeni kot eksosomi. Direktna pot vključuje sproščanje veziklov neposredno iz plazemske membrane in jih ni mogoče ločiti od eksosomov, ki nastanejo po klasični poti, saj imajo podobno gostoto in velikost (Van der Pol in sod., 2012). So skodeličaste oblike (Taylor in Gercel-Taylor, 2013) in v premeru merijo od 50 do 100 nm (Orozco in Lewis, 2010). Njihova gostota je od 1,13 do 1,19 g/ml in običajno so izolirani s centrifugiranjem pri $100\,000 - 200\,000 \times g$ (Barteneva in sod., 2013).



Slika 14: Shematski prikaz klasične in direktne poti nastanka eksosomov (prirejeno po Van der Pol in sod., 2012: 7)

Eksosomi vsebujejo RNA in miRNA, vendar ne vsebujejo DNA (Orozco in Lewis, 2010). Obdani so s fosfolipidno membrano, ki vsebuje relativno visoke vrednosti holesterola, sfingomielina in ceramida (Van der Pol in sod., 2012), ter na detergent odporne membranske domene - lipidne rafte (Orozco in Lewis, 2010). Membrana običajno ne izraža fosfatidilserina (Barteneva in sod., 2013) in ne veže aneksina V, oziroma ima nizko

kapaciteto njegove vezave (Mause in Weber, 2010). Njihovi označevalci so CD63, CD81 in CD82 (Van der Pol in sod., 2012).

2.4.1.2 Eksosomom podobni vezikli

So nepravilne oblike (Taylor in Gercel-Taylor, 2013) in imajo podobne značilnosti kot eksosomi, vendar so nekoliko manjše velikosti (30 - 90 nm) in ne vsebujejo lipidnih raftov (Orozco in Lewis, 2010).

2.4.1.3 Mikrovezikli (MV)

Mikrovezikli, pogosto imenovani tudi mikropartikli ali ekotosomi (Barteneva in sod., 2013), so izrazi za vezikle, ki so nepravilnih oblik (Taylor in Gercel-Taylor, 2013) in se sproščajo iz plazemske membrane. Ta izraz se pogosto uporablja tudi za opis celotne populacije veziklov izoliranih iz bioloških tekočin. MV so prisotni v večini, če ne vseh bioloških tekočinah. Čeprav velja, da so MV večji od eksosomov in običajno raziskovalci poročajo o velikostnem razponu med 100 nm in 1,0 μ m v premeru, je še vedno veliko zmede. Gostota MV je neznana, običajno so izolirani s centrifugiranjem pri 10 000 - 20 000 \times g (Van der Pol in sod., 2012). Membrana MV izraža fosfatidilserin in ima visoko vezavno kapaciteto za aneksin V. Njihovi označevalci so integrini, selektini in drugi antigeni izvirne celice (Barteneva in sod., 2013).

2.4.1.4 Membranski partikli

Membranski partikli so okrogle oblike, s premerom od 50 do 80 nm. Imajo podobno velikost kot eksosomi, vendar imajo nižjo gostoto (1,032 – 1,068 g/ml) in ne izražajo CD63. Membranski partikli izražajo CD133. Izvirajo iz plazemske membrane epitelnih celic in se pojavljajo v telesnih tekočinah, ki so v stiku z epitelom (slina, urin, semenska tekočina) ter sobivajo z eksosomi v slini (Van der Pol in sod., 2012).

2.4.1.5 Apoptotski vezikli

Ko so celice v procesu apoptoze sproščajo vezikle, ki izpostavljajo fosfatidilserin, in jih imenujemo apoptotična telesa ali apoptotski vezikli. Bistvena razlika med apoptotskimi vezikli in drugimi celičnimi vezikli je njihova velikost. Premer apoptotski veziklov je od 1 do 5 μ m. To je v velikostnem razredu trombocitov v človeški krvi. Trombocitna apoptotska telesa je težko ločiti od aktiviranih trombocitov ali trombocitov, kjer poteka proces, ki spominja apoptozo, saj vsi izražajo fosfatidilserin in imajo podobno velikost. Gostota apoptotskih veziklov je 1,16 – 1,28 g/ml in se delno prekriva z gostoto eksosomov. Njihova morfologija je običajno bolj heterogena od drugih celičnih veziklov. Apoptotične

celice sproščajo vsaj dve imunološko različni vrsti apoptotskih veziklov. Apoptotski vezikli, ki izvirajo iz plazemske membrane vsebujejo fragmentirano DNA in histone, medtem ko apoptotski vezikli, ki izvirajo iz endoplazemskega retikuluma ne vsebujejo DNA in histonov, vendar izpostavljajo nezrele glikoepitope (Van der Pol in sod., 2012). Običajno so izolirni s centrifugiranjem pri $16\,000 \times g$. Imajo visoko vezavno kapaciteto za aneksin V. Njihovi označevalci so histoni (Mause in Weber, 2010).

2.4.2 Sestava mikropartiklov

MP so obdani s fosfolipidnim dvoslojem, ki izpostavlja transmembranske proteine in receptorje, ter obkroža komponente citoplazme starševske celice (Morel in sod., 2011).

Membrana MP je sestavljena predvsem iz lipidov in proteinov (Orozco in Lewis, 2010). Natančna vsebnost lipidov in proteinov je odvisna od celice iz katere izvirajo in od vrste dražljaja, ki sodeluje pri njihovem nastanku (Weerheim in sod., 2002).

Plazma MP vsebujejo številne biomolekule:

- proteine (signalni proteini in receptorji, citoskeletni in efektorki proteini),
- lipide in
- nukleinske kisline (miRNA, mRNA in celo DNA) (Barteneva in sod., 2013).

2.4.2.1 Lipidi

V mirujočih celicah so različne vrste fosfolipidov asimetrično porazdeljene v lipidnem dvosloju (VanWijk in sod., 2003). Ta asimetrična razporeditev fosfolipidov je običajno motena med tvorbo MP, kar vodi do izpostavljenosti negativno nabitih fosfolipidov (fosfatidilserin in fosfatidiletanolamin) na zunanjo stran membrane MP (Weerheim in sod., 2002).

Fosfolipidna sestava trombocitnih MP pri zdravih ljudeh je pretežno iz fosfatidilholina (približno 60 %), preostanek sestoji iz sfingomielina, fosfatidiletanolamina in fosfatidilserina, in se jasno razlikuje od fosfolipidne sestave plazemske membrane starševske celice (Weerheim in sod., 2002).

Fourcade in sodelavci (1995) so poročali, da MP iz sinovijske tekočine vnetih sklepov bolnikov z artritiso vsebujejo fosfatidilholin, fosfatidiletanolamin, sfingomielin in lizofosfolipid (20 – 25 %) in majhne količine fosfatidilserina. Ta sestava se jasno razlikuje od MP izoliranih pri zdravih ljudeh. MP iz sinovijske tekočine so v glavnem levkocitnega izvora. To lahko pomeni, da se fosfolipidna sestava MP razlikuje med različnimi tipi celic,

ali da vnetni dražljaji proizvajajo MP z drugačno fosfolipidno sestavo (VanWijk in sod., 2003).

Huber in sodelavci (2002) so poročali o prisotnosti oksidiranih fosfolipidov v MP iz endotelijskih celic, ki so bile izpostavljene oksidativnemu stresnemu dražljaju, med tem ko so oksidirani fosfolipidi odsotni v MP pri endotelijskih celicah, stimuliranih z kalcijevim ionoforjem.

2.4.2.2 Proteini

MP izpostavljajo membranske antigene, ki so specifični za celice iz katerih izvirajo (VanWijk in sod., 2003), kar omogoča identifikacijo MP glede na njihov celičen izvor: trombocitni, levkocitni, eritrocitni, endotelijski in iz drugih tkiv. Vendar, MP niso replika starševske celice in njene plazemske membrane, kar kaže stopnjo selektivnosti pri njihovem nastanku (Kriebardis in sod., 2012).

MP, ki izvirajo iz limfocitov T pomagalk na svoji površini izražajo CD4. MP, ki izvirajo iz endotelijskih celic na svoji površini izražajo E-selektin. Trombocitni MP izražajo P-selektin in glikoprotein 53 (VanWijk in sod., 2003).

Površinski proteini mikropartiklov se lahko razlikujejo od proteinov v plazemski membrani celice iz katere MP izvirajo (Barteneva in sod., 2013). Na primer, MP limfocitov T primanjkuje proteinov CD28 in CD45, ki so med najbolj obilno prisotnimi proteini starševske celične membrane (VanWijk in sod., 2003).

Vključitev proteinskih molekul v MP je selektivna in odvisna od dražljaja in mikrookolja starševske celice (Barteneva in sod., 2013).

2.4.3 Funkcija mikropartiklov

Dolgo je veljalo, da so MP celični ostanki brez biološke funkcije. V zadnjem času so številne raziskave pokazale, da imajo pomembno vlogo pri:

- MEDCELIČNI KOMUNIKACIJI

Imajo pomembno vlogo pri transportu in dostavljanju bioaktivnih molekul in signalov. Na tarčne celice lahko delujejo z neposredno stimulacijo preko površinsko izraženih ligandov ali s prenosom površinskih receptorjev iz ene celice do druge (Italiano in sod., 2010).

- VNETJU

V času različnih sistemskih vnetnih stanjih se število MP v sistemskem obtoku poveča. Mesri in sodelavci (1999) so opisali heterogeno populacijo MP pri zdravih ljudeh. Ta se je

podvojila ob dodatku vnetnega dražljaja. MP lahko sprožijo produkcijo tkivnega faktorja (TF) in vnetnih citokinov z aktivacijo tarčne celice (Van der Pol in sod., 2012).

- KOAGULACIJI

MP, še posebej trombocitni, so efektorji koagulacijskega sistema (Morel in sod., 2006). Z izpostavljenostjo negativno nabitega fosfatidilserina zagotavljajo dodatno prokoagulantno površino, na katero se, v prisotnosti kalcijevih ionov, vežejo koagulacijski faktorji, s čimer spodbujajo koagulacijo (Van der Pol in sod., 2012). Število MP, ki so povezani s koagulacijo, je povečano pri različnih boleznih, kot je idiopatska trombocitopenija, paroksizmalna nočna hemoglobinurija in koronarni sindrom. Zmanjšana koncentracija MP, v kombinaciji z okvaro izpostavljenosti fosfatidilserina na aktiviranih trombocitih, je povezana z nagnjenostjo h krvavitvam, kot pri bolnikih s Scottovim sindromom, Castamanovo napako in Glanzmannovo bolezenijo. Ker je koagulacija ena od značilnosti bolezni srca in ožilja, in ker so raziskovalci poročali o spremenjenem številu in prokoagulantnem obnašanju MP pri več boleznih srca in ožilja, MP igrajo vzročno vlogo pri razvoju koagulacije in boleznih srca in ožilja (VanWijk in sod., 2003).

- ŽILNI FUNKCIJI

Imajo lahko koristne ali škodljive učinke na žilno integriteto. Lahko sprožijo apoptozo gladkih mišičnih celic žil ali regeneracijo žil (Van der Pol in sod., 2012). Pri kardiovaskularnih boleznih, ki jih opredeljuje endotelijska disfunkcija (akutni koronarni sindrom, hipertenzija, ateroskleroza) se število MP poveča in spremeni se njihova sestava. Prav tako so opazne visoke vrednosti MP pri aterosklerotičnih plakih. Ti MP v glavnem izvirajo iz monocitov in limfocitov (VanWijk in sod., 2003).

- HOMEOSTAZI (Dinkla in sod., 2013)

- HEMOSTAZI, CELIČNI PROLIFERACIJI IN DIFERENCIACIJI (Morel in sod., 2011)

- METASTAZIRANJU (Kent in sod., 2014)

MP so vključeni tudi v širok spekter patoloških stanj, kot so avtoimunske bolezni (Gyorgy in sod., 2011), tromboza, diabetes, okužbe, ter bolezni srca in ožilja (Grisendi in sod., 2015).

2.4.4 Nastanek mikropartiklov

Celice so obdane s plazemsko membrano, ki je sestavljena iz fosfolipidnega dvosloja. Vsaka stran ima drugačno lipidno sestavo. Pod normalnimi fiziološkimi pogoji sta negativno nabita aminofosfolipida (fosfatidilserin in fosfatidiletanolamin) običajno

koncentrirana na notranji strani membrane, med tem ko sta nevtralna fosfatidilholin in sfingomielin koncentrirana na zunanji strani membrane (Morel in sod., 2011).

Asimetrična porazdelitev fosfolipidov v plazemski membrani celice je aktivno vzdrževana s tremi encimskimi sistemi: flipaze, flopaze in skramblaze (Rubin in sod., 2012). Flipaza je od ATP odvisna translokaza, flopaza je prav tako od ATP odvisna translokaza, vendar manj specifična in počasnejša od flipaze. Skramblaza je od ATP neodvisna translokaza, toda od kalcija odvisen encim (Beyers in sod., 1999). V mirujočih celicah aktivirane flipaze internalizirajo negativno nabit fosfolipid in vzdržujejo asimetrijo v fosfolipidnem dvosloju. Flopaze in skramblaze pa so neaktivne, vsaj dokler je koncentracija citoplazemskega kalcija nizka (Rubin in sod., 2012).

Na splošno velja, da se MP tvorijo, ko se izgubi asimetrična razporeditev lipidnega dvosloja. Njihov nastanek opazimo, ko so celice podvržene celični aktivaciji, poškodbi ali apoptozi (Morel in sod., 2011). Celična aktivacija in celična apoptoza sta dva dobro znana celična procesa, ki lahko vodita do nastanka MP. Trenutno se še ne ve ali vodita v nastanek podobnih MP v smislu velikosti, lipidne in proteinske sestave ter patofizioloških učinkov. Vendar pa obstajajo razlike v mehanizmih, ki se kažejo v njihovem oblikovanju (VanWijk in sod., 2003).

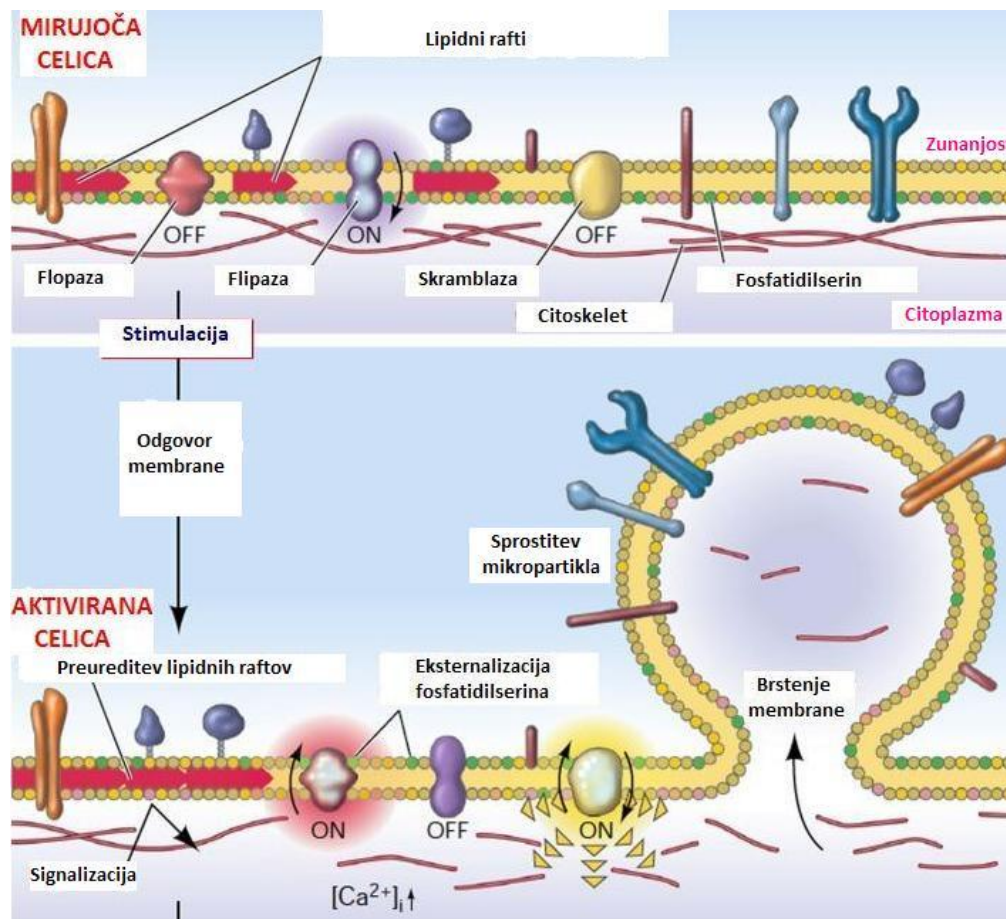
2.4.4.1 Celična aktivacija

MP lahko nastanejo med celično aktivacijo z mnogimi agonisti. Na primer, trombociti sprostijo MP po aktivaciji s trombinom, kalcijevim ionoforom A23187, ADP plus kolagenom in terminalnim komplementnim kompleksom C5b-9. Monociti, endotelijske celice, hepatociti in celice gladkih mišic arterij sprostijo MP po aktivaciji z bakterijskimi lipopolisaharidi, citokini (kot so tumorski nekrozni faktor- α ali interlevkin-1), C5b-9 kompleksom ali hidroperoksidom (VanWijk in sod., 2003).

Eden od prvih znakov aktivacije celic je povečanje znotrajcelične koncentracije kalcija, zlasti na mestu nastajanja veziklov. Posledica je inhibicija flipaze in aktivacija flopaze in skramblaze (VanWijk in sod., 2003). Flopaza eksternalizira fosfatidilserin in fosfatidiletanoalamin (negativen fosfolipid), skramblaza pa sodeluje pri prenosu negativnega fosfolipida nespecifično skozi membrano, kar se kaže v izgubi asimetrične porazdelitev membrane (Morel in sod., 2011). Z dodatno preureditvijo lipidnih raftov postane membrana še manj stabilna (slika 15) (Rubin in sod., 2012).

Povečana znotrajcelična koncentracija kalcija aktivira tudi proteaze, kot so kaspaze (Morel in sod., 2011), gelsolin (Barteneva in sod., 2013) in kalpain, ki cepi talinsko povezavo med membranskimi in citoskeletnimi beljakovinami (VanWijk in sod., 2003). Pride do preureditve citoskeleta in sproščanja MP (slika 15) (Barteneva in sod., 2013).

Na splošno velja, da je sprostitvev MP, ki so povezani s celično aktivacijo, časovno in od kalcija odvisna. Odcepljanje se začne v nekaj minutah po vezavi agonista (VanWijk in sod., 2003).



Slika 15: Nastanek MP s celično aktivacijo

Plazemska membrana je dobro strukturiran subjekt, za katero je značilna nadzorovana prečna porazdelitev lipidov in proteinov med zunanjo in notranjo stranjo membrane, in tudi lateralna organizacija domen, ki jih imenujemo rafti. Po stimulaciji pride do prerazporeditve, kar vodi do preureditve raftov, eksternalizacije fosfatidilserina in sproščanja MP (prirejeno po Alaarg in sod., 201: 4).

2.4.4.2 Celična apoptoza

Za celično apoptozo je značilna celična kontrakcija, fragmentacija DNA in dinamična membranska vezikulacija. Takšni vezikli se lahko razlikujejo od veziklov, ki nastanejo s celično aktivacijo v velikosti, lipidni in proteinski sestavi ter (pato-)fizioloških učinkih. Moč kontrakcije, ki jo ustvari aktinsko - miozinska citoskeletna struktura, verjetno vpliva na nastanek veziklov. Apoptotska membranska vezikulacija je odvisna od aktivacije ROCK I (Rho kinaza I). ROCK I spodbuja povečanje nastanka aktinsko - miozinske sile in pari aktinsko - miozinske filamente s plazemsko membrano. Pri nastanku apoptotstkih veziklov imajo posredno vlogo kaspaze (VanWijk in sod., 2003). Kaspaze so cisteinske proteaze, ki hidrolizirajo peptidne vezi in sodelujejo pri vnetnih procesih in apoptozi.

Zdrave celice vsebujejo številne kaspaze, ki imajo majhno katalitsko aktivnost (so neaktivne). Ko kaspaze prejmejo apoptotski signal (npr. mutacija DNA) se aktivirajo in sprožijo proces apoptoze (Kumar, 2007; McIlwain in sod., 2015). Med apoptozo kaspaze aktivirajo in razcepijo ROCK I. Aktivacija ROCK I in, kot posledica, membranska vezikulacija sta potrebni za prerazporeditev fragmentirane DNA iz jedrske regije v membranske vezikle in apoptotska telesa. Takšno nastajanje MP med apoptozo je rezultat aktivacije ROCK I in posledično motnje v strukturi membranskega skeleta. Taki MP lahko vsebujejo fragmente DNA (VanWijk in sod., 2003).

2.4.5 Metode za preučevanje mikropartiklov

Trenutno še ne obstaja standardna metoda za analizo MP v krvnih vzorcih (Grisendi in sod., 2015). Najpogostejši pristopi za preučevanje MP so elektronska mikroskopija, mikroskopija na atomsko silo, masna spektroskopija, Western blot, funkcionalni testi in pretočna citometrija (Barteneva in sod., 2013).

Elektronska mikroskopija podaja premer posameznih MP, vendar vedno ne zagotavlja količinskih podatkov o populaciji MP, še posebej kadar se uporablja negativno barvanje. Določitev števila MP in njihovega izvora sta omejena (Barteneva in sod., 2013).

Mikroskopija na atomsko silo ima omejeno določitev števila in celičnega izvora MP. Lahko pride do napak zaradi prisotnosti celičnega drobirja in plazemskih proteinov (Barteneva in sod., 2013).

Z masno spektroskopijo ne moremo določiti števila MP, lahko pa določimo celičen izvor, vendar je potrebna velika količina začetnega materiala (Barteneva in sod., 2013). Lahko določimo tudi lipidno in proteinsko sestavo (Van der Pol in sod., 2012).

Z Western blot lahko določamo število MP semikvantitativno, lahko določimo izvor, vsebnost proteinov in lipidov (Van der Pol in sod., 2012), vendar je potrebna velika količina začetnega materiala (>10 µg MP) (Barteneva in sod., 2013).

Funkcionalni testi (prokoagulantna aktivnost, test nastanka trombina, ELISA) omogočajo določitev števila MP, vendar z njimi ne moremo določiti celičnega izvora (Barteneva in sod., 2013).

Pretočna citometrija omogoča določitev števila in izvora MP. Metoda je omejena z velikostjo delcev in proteinskimi agregati, ki lahko vodijo do napak v občutljivosti na pretočnem citometru (Barteneva in sod., 2013). MP je potrebno pred analizo s pretočnim citometru najprej izolirati. Izolacijo izvedemo z diferencialnim centrifugiranjem, s katerim odstranimo nezaželene celice. Na učinkovitost izolacije MP vpliva poleg gostote in velikosti tudi oblika, volumen, viskoznost, temperatura in čas centrifugiranja. Trenutno še ni standardiziranega protokola centrifugiranja. Običajno se najprej uporabi počasnejša

hitrost centrifugiranja za odstranitev celic in drobirja, drugo in tretje centrifugiranje je hitrejša in je odvisno od tega, kateri tip MP želimo izolirati. Za odstranitev celic in celičnih ostankov je potrebno $200 - 1500 \times g$, $10\,000 - 20\,000 \times g$ za odstranitev veziklov večjih od 100 nm in $100\,000 - 200\,000 \times g$ za odstranitev veziklov manjših od 100 nm . Ločevanje različnih vrst MP v vzorcu temelji na podlagi različnih parametrov, kot so zrnatost in izražanje različnih markerjev na njihovi površini. S pretočnim citometru določamo velikost s sprednjim detektorjem sipanja (»forward scatter light«, FSC) in zrnatost s stranskim detektorjem sipanja (»side scatter light«, SSC) (Orozco in Lewis, 2010). Za določitev celičnega izvora MP je najbolj pogost pristop barvanje s fluorescentno označenimi protitelesi direktno proti antigenu starševske celice. Na primer: CD41 (Italiano in sod., 2010), CD61 in CD62 za trombocite, glikoforin A (CD235a) za eritrocite, CD45 za levkocite in CD14 za monocite. Za določitev števila MP se uporabljajo merilne kroglice, ki so polistirenske ali sintetične (Barteneva in sod., 2013).

Vsi testi si prizadevajo dobiti vpogled v biološki mehanizem, ki sodeluje pri nastajanju in funkciji MP. Večina preiskovalcev uporablja pretočno citometrijo, ki omogoča identifikacijo in štetje MP po označevanju z različnimi označevalci (Kriebardis in sod., 2012).

2.4.6 Mikropartikli glede na celico izvora

2.4.6.1 Eritrocitni mikropartikli

Večina po krvi krožečih MP je eritrocitnega in trombocitnega izvora (Dinkla in sod., 2013). Do nastanka eritrocitnih MP *in vivo* pride med 120 dnevno življenjsko dobo eritrocitov, kot del normalnega fiziološkega procesa staranja. Posledica tega je izguba 30 % volumna in 20 % površine eritrocitov (Kriebardis in sod., 2012). Vezikulacija je lahko sredstvo za eritrocite, da se znebijo škodljivih dejavnikov, kot so denaturiran hemoglobin, C5b-9 kompleks komplementa in imunoglobulin G, ki se kopičijo v času njihove življenjske dobe. Preko sproščanja MP se lahko eritrociti znebijo teh molekul, medtem ko so še vedno viabilni, in tako preprečijo predčasno odstranitev iz krvnega obtoka (Rubin in sod., 2012). MP so *in vivo* hitro odstranjeni z retikuloendotelijskim sistemom (Kriebardis in sod., 2012).

V eritrocitnih koncentratih se med skladiščenjem v banki krvi število MP postopoma povečuje s časom shranjevanja, kar lahko prispeva k neželenim učinkom transfuzije (Grisendi in sod., 2015). V okviru transfuzijske medicine MP veljajo za lezije shranjevanja eritrocitov in so lahko vključeni v nekatere stranske učinke, opisane pri bolnikih s transfuzijo krvi skladiščeno več kot 21 dni (Rubin in sod., 2012).

Glavne značilnosti eritrocitnih MP so podobne značilnostim MP, ki izvirajo iz drugih celic. Njihova velikost je na splošno bolj homogena in je okoli 0,15 μm . Eritrocitni MP predstavljajo približno od 4 do 8 % vseh MP. Kot za druge MP, tudi fiziološka vloga eritrocitnih MP še ni povsem pojasnjena (Rubin in sod., 2012).

Sestava eritrocitnih MP se lahko razlikuje glede na dražljaj, ali med *in vitro* in *in vivo* pogojih, in se razlikuje od sestave starševskih eritrocitov (Kriebardis in sod., 2012). Lahko jih identificiramo s pretočno citometrijo zaradi njihovega izražanja glikoforina A (protein, ki ga izražajo eritrociti) in fosfatidilserina. Fosfatidilserin je običajno izpostavljen na notranji strani celične membrane, toda med celično aktivacijo in apoptozo postane izpostavljen na zunanji strani membrane, ter tako postane zaznaven z vezavo aneksina V. Čeprav se ta pristop pogosto uporablja, lahko pride do napak, zaradi obarvanja celičnih fragmentov in ostankov poleg MP. Med drugim je bilo v zadnjem času dokazano, da vsi MP ne izražajo fosfatidilserina (Grisendi in sod., 2015).

2.5 ANTIGENI, KI SMO JIH UPORABILI ZA DOKAZ MP ERITROCITNEGA IZVORA

2.5.1 Aneksin V (Ann V)

Ann V je od 35 do 36 kDa velik protein, ki je odvisen od Ca^{2+} in ima visoko afiniteto za vezavo fosfatidilserina, ko je le ta izpostavljen na zunanji strani membrane. Ann V je lahko konjugiran s fluorokromi, med tem pa ohranja svojo visoko afiniteto za vezavo s fosfatidilserinom in služi kot občutljiv marker za analizo s pretočnim citometrom (Hingorani in sod., 2011). Uporablja se kot označevalec apoptotskih celic in za analizo MP. (Hargett in Bauer, 2013).

2.5.2 CD235a (Glikoforin A)

CD235a je sialoglikoprotein z molekulsko maso 10 kD. Prisoten je na celični membrani kot homodimer. Izraža se na eritroidnih prekurzorjih in eritrocitih (<http://www.biolegend.com/fitc-anti-human-cd235a-glycophorin-a-antibody-6701.html>).

2.5.3 Karboksifluorescein sukcinimidil ester (CFSE)

Je znotrajcelično fluorescentno barvilo, ki se uporablja za karakterizacijo kinetike celičnih delitev v imunskem sistemu in kot specifičen označevalec eritrocitov (De Boer in sod., 2006; Giarratana in sod., 2005). S pomočjo CFSE lahko spremljamo število celičnih delitev v času proliferacije (Hawkins in sod., 2007). Kovalentno vezan CFSE se enakomerno razdeli med hčerinske celice, kar omogoča razlikovanje zaporednih krogov

Fideršek T. Vpliv različnih vrst centralnih venskih katetrov na poškodbe krvnih celic.

Mag. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij strukturne in funkcionalne biologije, 2016

celičnih delitev. Lahko se uporablja *in vitro* in *in vivo* (Lyons in sod., 2013). Je priljubljeno sredstvo za spremljanje delitve limfocitov (Quah in Parish, 2010).

Lastnost CFSE, da pasivno difundira skozi membrano, tam pa se hidrolizira z znotrajcelično esterazo in tako postane fluorescenten smo izkoristili za jasno razlikovanje MP z intaktno membrano od celičnega drobirja (Grisendi in sod., 2015).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 PRIPRAVA VZORCEV

Raziskavo smo izvedli na 57 CVK treh različnih proizvajalcev – Arrow (nadalje v nalogi A), Kimal (nadalje v nalogi B), in Certofix (nadalje v nalogi C). Testirali smo CVK z enim lumnom proizvajalcev A, B in C, ter CVK s petimi lumni proizvajalcev A in B. Pri pet lumenskih katerih smo kri spustili le skozi distalni lumen. Na Zavodu za transfuzijsko medicino smo dobili eritrocitne koncentrate štirih različnih darovalcev. V kirurškem bloku, v UKC Ljubljana, smo z uporabo aparature za vzpostavitev zunanjega krvnega obtoka izvedli pretok eritrocitnega koncentrata skozi CVK. Uporabili smo dva različna pretoka, in sicer, 33 ml/min in 500 ml/min. V epruvete smo zbirali po 5 ml eritrocitnega koncentrata, ki je prešel CVK.

3.2 IZOLACIJA MIKROPARTIKLOV

Mikropartikle smo izolirali na Inštitutu za imunologijo in mikrobiologijo. Celoten postopek je potekal pri sobni temperaturi.

V prvem koraku smo eritrocitni koncentrat centrifugirali 15 minut pri $2500 \times g$. Po tem smo odpipetirali plazmo 1 ml nad višino usedlih eritrocitov.

V drugem koraku smo plazmo ponovno centrifugirali 15 minut pri $2500 \times g$. Nato smo v Eppendorfove mikrocentrifugirke odpipetirali 0,5 ml supernatanta. S tem smo dobili plazmo z majhno količino trombocitov (plazma revna s trombociti). Vzorce smo shranili pri $-80^{\circ} C$.

3.3 OZNAČEVANJE MIKROPARTIKLOV

Vzorce smo odtajali pri sobni temperaturi in jih premešali na vibracijskem stresalniku pri nizkih obratih (12 obratov/minuto).

3.3.1 Priprava vzorca za ugotavljanje števila in koncentracije mikropartiklov in označevanje s CFSE

V epruveto smo odpipetirali 30 μL razredčenih mikropartiklov (1:3) in 110 μL pufra HEPES, premešali na vibracijskem stresalniku pri nizkih obratih in inkubirali 15 minut v temi pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo dodali 4,5 μM CFSE (Life Technologies), premešali na vibracijskem stresalniku pri nizkih obratih in inkubirali v temi 15 minut pri

sobni temperaturi. Po inkubaciji smo dodali 50 μL polietilenskih kroglic za štetje (Beckman Coulter) in premešali na vibracijskem stresalniku pri nizkih obratih. Tako je bil vzorec pripravljen za analizo s pretočnim citometrom.

3.3.2 Priprava vzorca in označevanje mikropartiklov s CFSE, aneksinom V in CD235a

V epruveto smo odpipetirali 30 μL razredčenih mikropartiklov (1:3) in 70 μL aneksin vezavnega pufra (HEPES), premešali na vibracijskem stresalniku pri nizkih obratih in inkubirali v temi 15 minut pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo dodali 4,5 μM CFSE, 10 μL aneksin V (BD Biosciences) in 5 μL CD235a (BD Biosciences), premešali na vibracijskem stresalniku pri nizkih obratih in inkubirali v temi 15 minut pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo dodali 200 μL pufra HEPES in centrifugirali 30 minut pri $17600 \times g$ in 20°C . Po centrifugiranju smo odpipetirali 200 μL supernatanta in ga zavrgli. Usedlino (obarvani mikropartikel) smo resuspendirali s 100 μL pufra HEPES. Mikropartikel so bili pripravljeni za analizo s pretočnim citometrom.

Pri negativni kontroli za aneksin V smo v epruvete odpipetirali 30 μL razredčenih mikropartiklov (1:3) in 70 μL pufra HEPES brez CaCl_2 , premešali na vibracijskem stresalniku pri nizkih obratih in inkubirali v temi 15 minut pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo dodali 10 μL aneksin V, premešali na vibracijskem stresalniku pri nizkih obratih in inkubirali v temi 15 minut pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo dodali 200 μL pufra HEPES brez CaCl_2 , premešali na vibracijskem stresalniku pri nizkih obratih in centrifugirali 30 minut pri $17600 \times g$ in 20°C . Po centrifugiranju smo odpipetirali 200 μL supernatanta in ga zavrgli. Usedlino smo resuspendirali s 100 μL pufra HEPES brez CaCl_2 in pripravili za merjenje s pretočnim citometrom.

3.4 ANALIZA MIKROPARTIKLOV S PRETOČNIM CITOMETROM

3.4.1 Princip delovanja pretočnega citometra

Pri analizi s pretočnim citometrom potujejo MP eden za drugim v tankem curku mimo vira svetlobe. Svetlobni žarek, ki zadane MP, se odbije ali lomi, ali pa se absorbira v določenih fluorokromih, ki nato izsevajo svetlobo večjih valovnih dolžin. Spremembe beleži sistem fotosprejemnikov.

Glavni sestavni deli pretočnega citometra so:

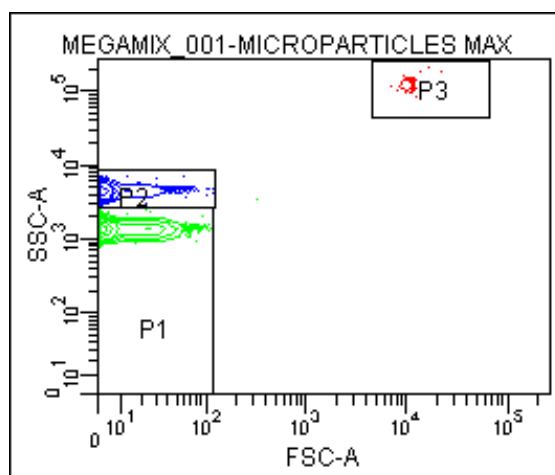
- vir svetlobe (laserski žarek),

- pretočna komora z optičnim sistemom ogledal, leč in filtrov,
- elektronika, ki spreminja svetlobne impulze v električne in slednje v digitalne in
- računalnik, ki zbira, analizira in usklajuje podatke ter uravnava delovanje aparata.

Pretočni sistem je zgrajen predvsem iz pretočne komore, skozi katero tečejo MP v izotonični raztopini. Ob prehodu snopa žarkov odda posamezen MP signal. Dva fotodetektorja merita odboj ali lom svetlobe, eden iz smeri vira – FSC in drugi pravokotno na smer vpadne svetlobe – SSC. Detektor FSC je pomemben za ugotovitev velikosti MP, detektor SSC pa sprejema od MP odbito svetlobo, skladno z zrnatostjo in površinsko strukturo MP. V detektorjih, ki so opremljeni z barvnimi filtri, merimo izsevano svetlobo. Vse dobljene podatke ureja in analizira računalnik. Rezultate prikažemo grafično in matematično (Kotnik in sod., 2010).

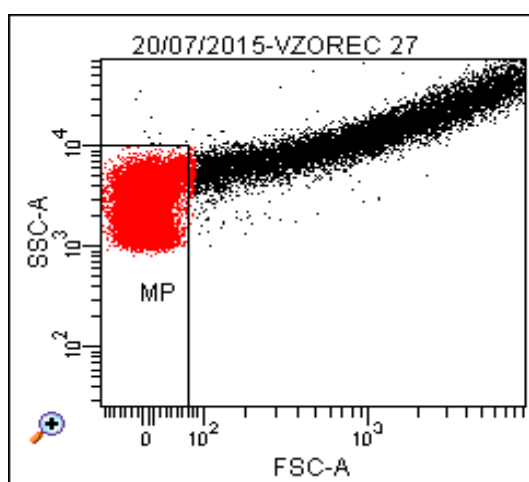
3.4.2 Analiza vzorcev

V prvem koraku smo z mešanico velikostno kalibriranih fluorescentnih kroglic (fluorosfere) naredili nastavitve na pretočnem citometru. Na Y osi smo imeli izraženo zrnatost (SSC), na X osi pa velikost (FSC) fluorosfer (slika 16). Glede na granularnost lahko s pretočnim citometrom ločimo 0,5 μm in 0,9 μm fluorosfere, glede na velikost pa 3 μm fluorosfere.



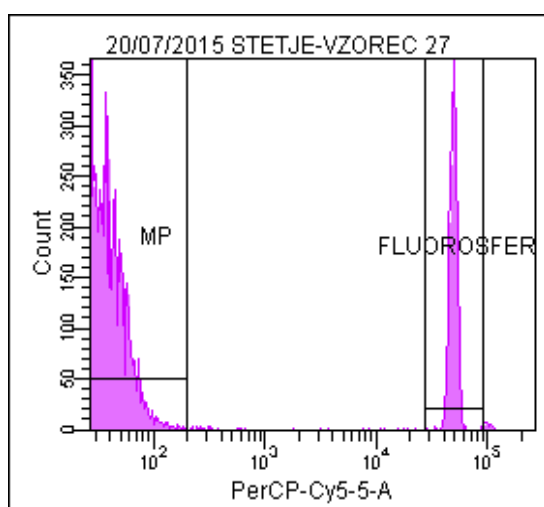
Slika 16: Fluorosfere, ki smo jih ločevali glede na velikost

Velikostno kalibrirane fluorescentne kroglice so omogočile izgradnjo vrat (ang. »construction of gates«) za MP (slika 17).

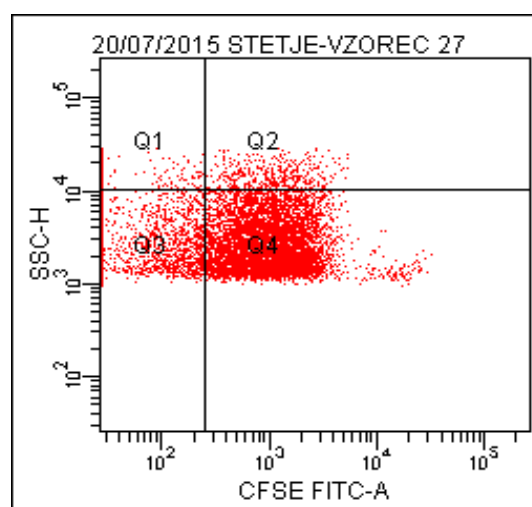


Slika 17: Točkovni diagram populacije MP

V drugem koraku smo s pretočnim citometrom preučevali delež vseh mikroparticlov. Vzorcju so bile dodane fluoresferne sfere, ki so omogočale štetje (slika 18). Mikroparticli pa so bili označeni s CFSE, pri čemer smo na Y osi imeli izraženo zrnatost MP (SSC), na X osi pa fluorescenco CFSE (slika 19).



Slika 18: Fluoresferne sfere, ki omogočajo štetje MP



Slika 19: CFSE pozitivni MP (Q4)

Za izračun koncentracije vseh MP smo uporabili enačbo:

$$c(\text{MP}/V_{\text{plazme}}) = R \times \frac{N(\text{MP})}{N(\text{FS})} \times \frac{V(\text{FS})}{V(\text{MP})} \times c(\text{FS}) \quad \dots (1)$$

Pri čemer je:

R faktor redčenja

$$R = V \text{ plazme izoliranih MP} / \text{končni V resuspendiranih MP} \quad \dots (2)$$

N (MP) število mikropartiklov, ki jih izmeri pretočni citometer

N (FS) število fluorosfer, ki jih izmeri pretočni citometer

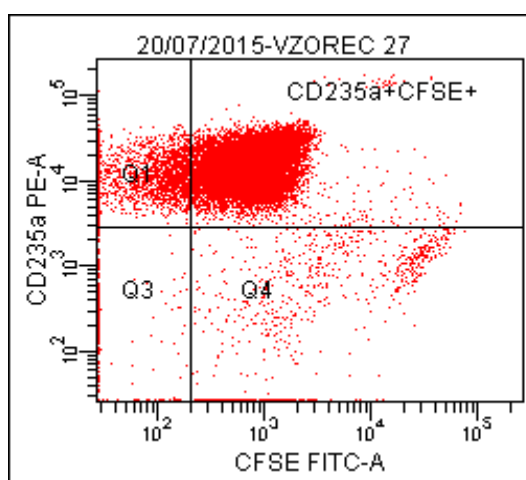
V (MP) volumen vzorca resuspendiranih mikropartiklov, ki smo jih uporabili za analizo s pretočnim citometrom

V (FS) prostornina dodanih fluorosfer za merjenje s pretočnim citometrom

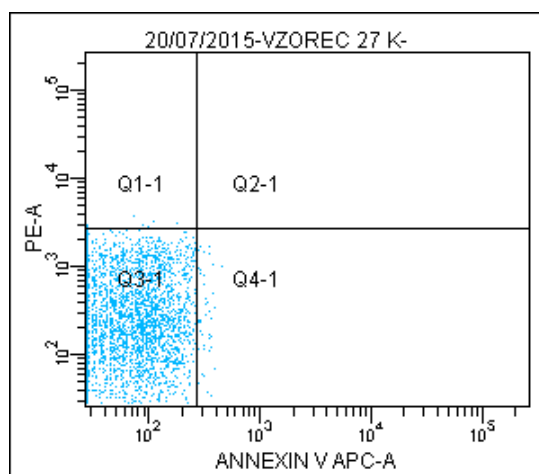
C (FS) originalna koncentracija fluorosfer

Koncentraciji fluorosfor sta bili $0,954 \times 10^6 / \text{ml}$ in $1,005 \times 10^6 / \text{ml}$

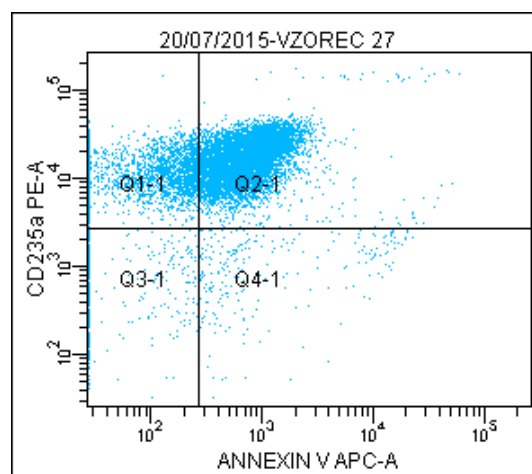
V tretjem koraku smo s pretočnim citometrom preučevali delež eritrocitnih mikropartiklov, ki so bili označeni z Ann V (APC), CD235a (PE) in CFSE (FITC). Analizirali smo samo CFSE pozitivne mikropartikle. Na Y osi smo imeli izražene mikropartikle, ki so sevali fluorescenco PE in so bili pozitivni na CD235a, na X osi pa mikropartikle, ki so sevali fluorescenco FITC ter so bili pozitivni na CFSE (slika 20). V tem primeru smo naredili negativno kontrolo za Ann V (slika 21), za določitev meje med Ann V pozitivnimi in negativnimi mikropartikli (slika 22). V negativni kontroli smo mikropartikle označili z Ann V v odsotnosti Ca^{2+} ionov. Odčitali smo delež eritrocitnih MP, ki so bili pozitivni na CD235a in Ann V (slika 22).



Slika 20: Eritrocitni mikropartikli, ki so pozitivni na CD235a in CFSE (Q2)



Slika 21: Negativna kontrola za Ann V



Slika 22: Diagram razčlenbe populacije MP na Ann V negativne (Q1-1) in pozitivne (Q2-1)

Za izračun koncentracije eritrocitnih MP smo uporabili enačbo:

$$\text{Koncentracija eritrocitnih MP (Ann V + CD235a + CFSE +)} = (\text{koncentracija vseh MP} \times \text{delež Ann V + CD235a + CFSE +}) / 100 \% \quad \dots(3)$$

3.5 HEMATOLOŠKI TESTI

Hematološke teste so nam izvedli v diagnostičnem laboratoriju Adria lab, izračune pa smo naredili sami. Za izračun stopnje hemolize smo uporabili enačbo:

$$\text{Hemoliza (\%)} = (100 - \text{hematokrit}) \times \text{prosti Hb} / \text{celokupni Hb} \quad \dots (4)$$




3.6 HEMOREOLOŠKI IZRAČUNI

V tabelah so podane posamezne lastnosti centralnih venskih katetrov z enim lumnom (pregl. 1) in s petimi lumni (pregl. 2).


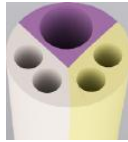
Fideršek T. Vpliv različnih vrst centralnih venskih katetrov na poškodbe krvnih celic.

Mag. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij strukturne in funkcionalne biologije, 2016

Preglednica 1: Lastnosti CVK z enim lumnom proizvajalcev A, B in C

	A	B	C
Material	poliuretan	poliuretan	poliuretan
Prevleka	/	/	poliheksanid metakrilat
Dolžina	16 cm	15 cm	20 cm
Premer lumna	1,7 mm	1,5 mm	1,7 mm
Geometrija			

Preglednica 2: Lastnosti CVK s petimi lumni proizvajalcev A in B

	A	B
Material	poliuretan	poliuretan
Prevleka	/	/
Dolžina	16 cm	15 cm
Premer distalnega lumna	1,7 mm	1,5 mm
Geometrija		

Za izračun časa izpostavljenosti eritrocitnega koncentrata CVK smo uporabili enačbo:

$$t = \frac{V}{\Phi} \quad \dots (5)$$

Pri čemer je:

V – volumen eritrocitnega koncentrata

Φ – pretok eritrocitnega koncentrata

Za izračun srednje hitrosti eritrocitnega koncentrata smo uporabili enačbo:

$$v = \frac{\Phi}{S} \quad \dots (6)$$

Pri čemer je:

Φ – pretok eritrocitnega koncentrata

S – površina prereza ($S = \pi r^2$)

Za izračun strižne hitrosti eritrocitnega koncentrata smo uporabili enačbo:

$$\gamma = \frac{v}{h} \quad \dots (7)$$

Pri čemer je:

γ – strižna hitrost, merjena v vzajemnih sekundah (1/s)

h - razdalja med dvema stenama katetra

v - srednja hitrost

Za izračun strižne napetosti smo uporabili enačbo:

$$\tau = \eta \times \gamma \quad \dots (8)$$

Pri čemer je:

η – viskoznost krvi

γ – strižna hitrost

Za izračun dinamične viskoznosti eritrocitnega koncentrata smo uporabili Einsteinovo enačbo:

$$\eta = \eta_{plazme} \times (1 + 2,5 \times Ht) \quad \dots (9)$$

Pri čemer je:

η_{plazme} - viskoznost plazme

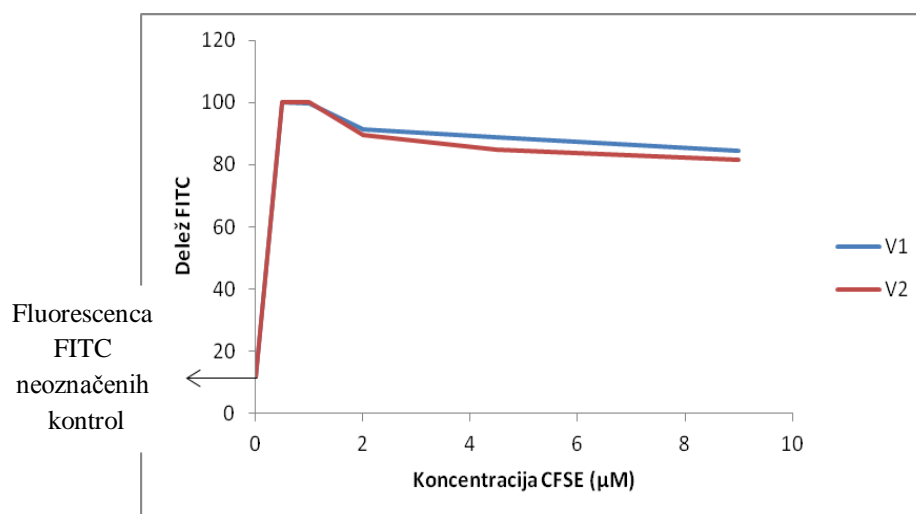
$\eta_{plazme} = 1,5 \text{ cP} = 1,5 \times 10^{-3} \text{ Pa}\cdot\text{s}$

4 REZULTATI

Raziskovalno delo je potekalo pri dveh različnih pretokih eritrocitnega koncentrata skozi CVK. Pri nižjem pretoku (33 ml/min) smo testirali 30 CVK z enim lumnom (10 katetrov proizvajalca A, 10 katetrov proizvajalca B in 10 katetrov proizvajalca C) in 6 CVK s petimi lumni - distalni lumen (3 katetre proizvajalca A in 3 katetre proizvajalca B). Pri višjem pretoku (500 ml/min) smo testirali 21 CVK z enim lumnom (7 katetrov proizvajalca A, 7 katetrov proizvajalca B in 7 katetrov proizvajalca C). Skupaj smo testirali 57 CVK različnih proizvajalcev, ki so se razlikovali glede na prisotnost prevleke, geometrijo tunela, dolžino, premer lumna in število lumnov (preglednici 1 in 2). Pridobili in analizirali smo 135 vzorcev. Poškodbe krvnih celic (eritrocitov), ki jih povzročajo CVK, smo opredelili s hematološkimi rezultati (delež hematokrita, koncentracija celokupnega in prostega Hb ter stopnja hemolize) in analizo MP (delež in koncentracija celokupnih in eritrocitnih MP) s pretočnim citometrom.

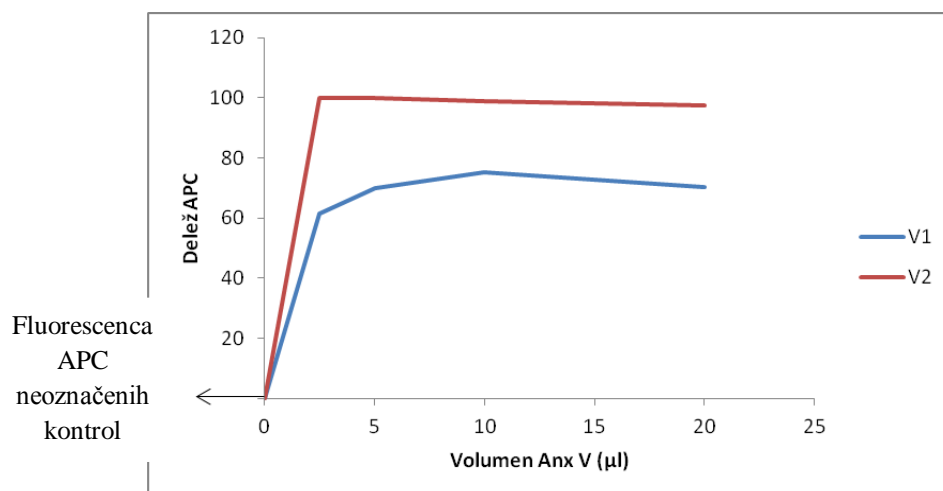
4.1 UMERITVENE KRIVULJE

Naredili smo titracijo za aneksin V, CD235a in CFSE. Rezultate smo grafično prikazali, da smo lahko odčitali optimalno koncentracijo CFSE (slika 23), aneksina V (slika 24) in CD235a (slika 25). Pri ugotavljanju optimalne koncentracije CFSE smo opazovali delež MP, ki so bili CFSE pozitivni in so sevali zeleno fluorescenco valovne dolžine 521 nm. Pri ugotavljanju optimalne koncentracije aneksina V označenega s fluorokromom APC, smo opazovali delež MP, ki so bili alofikocianin (APC) pozitivni (660 nm). Pri ugotavljanju optimalne koncentracije CD235a, konjugiranega s PE, pa smo opazovali delež PE (573 nm) pozitivnih MP.



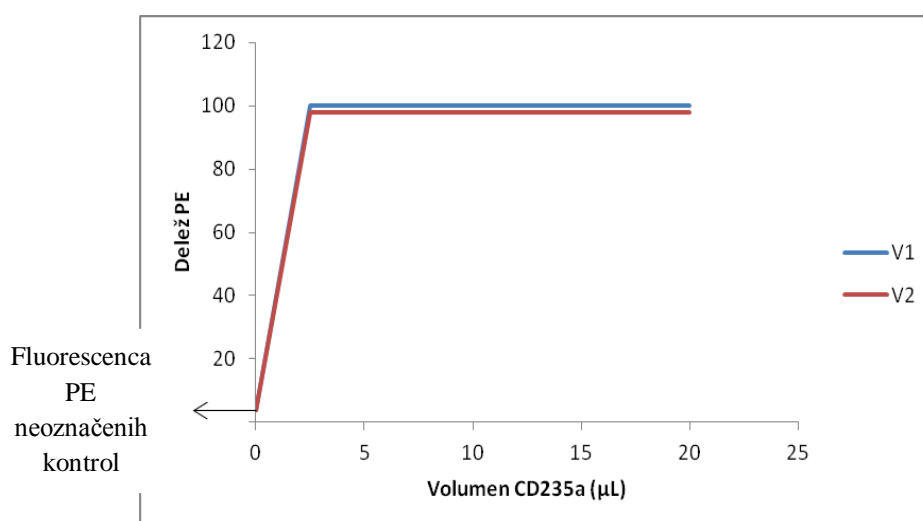
Slika 23: Delež FITC v odvisnosti od koncentracije CFSE

Prikazan je delež FITC pri različnih koncentracijah CFSE, ki smo jih uporabili pri titraciji. Koncentracije, ki smo jih uporabili so bile: 9 µM, 4,5 µM, 2 µM, 1 µM in 0,5 µM.



Slika 24: Delež APC v odvisnosti od volumna Anx V

Prikazan je delež APC pri različnih volumnih Anx V, ki smo jih uporabili pri titraciji. Volumni, ki smo jih uporabili so bili: 20 μL , 10 μL , 5 μL in 2,5 μL .



Slika 25: Delež PE v odvisnosti od volumna CD235a

Prikazan je delež PE pri različnih volumnih CD235a, ki smo jih uporabili pri titraciji. Volumni, ki smo jih uporabili so bili: 20 μL , 10 μL , 5 μL in 2,5 μL .

4.2 HEMATOLOŠKI REZULTATI IN REZULTATI MP

V tem poglavju so predstavljeni hematološki rezultati (delež hematokrita, stopnja hemolize, koncentracija celokupnega in prostega Hb) in rezultati MP (koncentracija celokupnih in eritrocitnih MP), s katerimi smo opredelili poškodbe krvnih celic (eritrocitov), ki jih povzročajo CVK.

Predstavljeni so tudi rezultati hemoreoloških parametrov (srednja hitrost, strižna hitrost, strižna napetost, čas izpostavljenosti in dinamična viskoznost) s katerimi smo interpretirali hematološke rezultate in rezultate MP.

Statistične analize smo naredili v programu Excel s Studentovim neparnim t testom. Med seboj smo primerjali:

1. CVK treh različnih proizvajalcev (A, B in C) z enim lumnom, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min.
2. CVK dveh različnih proizvajalcev (A in B) s petimi lumni, pri katerih smo pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min prevajali samo skozi distalni del katetra.
3. CVK z enim lumnom in CVK s petimi lumni istega proizvajalca, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min.
4. CVK treh različnih proizvajalcev (A, B in C) z enim lumnom, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 500 ml/min.
5. CVK z enim lumnom, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min in CVK z enim lumnom skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 500 ml/min, istega proizvajalca.

4.2.1 Nižji pretok (33 ml/min)

4.2.1.1 Primerjava CVK z enim lumnom, različnih proizvajalcev

V tabelah so podane povprečne vrednosti in standardne napake za hematološke parametre, koncentracijo MP (pregl. 3) in hemoreološke parametre (pregl. 4). P vrednosti statistične analize za hematološke parametre in koncentracijo MP so podane v prilogah (priloga A1).

Preglednica 3: Povprečna vrednost in standardna napaka celokupnega Hb, prostega Hb, Ht, hemolize, celokupnih MP in eritrocitnih MP pri različnih proizvajalcih CVK z enim lumnom, skozi katere je stekel eritrocitni koncentrat s pretokom 33 ml/min. *Legenda:* N – število vzorcev, SE – standardna napaka

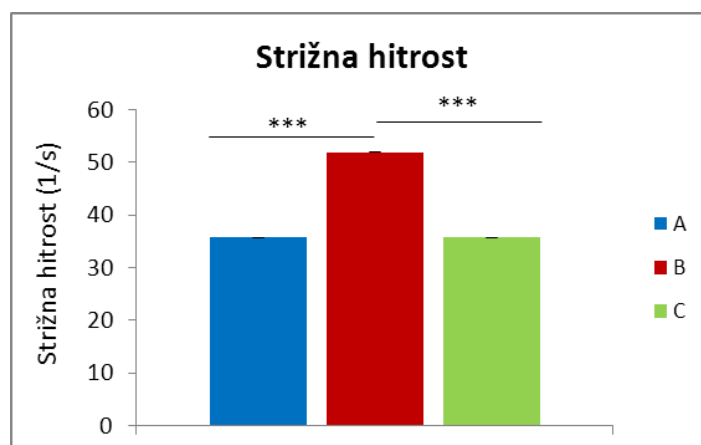
	A (N=20)		B (N=20)		C (N=20)	
	Povprečje	SE	Povprečje	SE	Povprečje	SE
Celokupni Hb (g/L)	195,70	1,96	200,00	4,46	203,30	3,83
Prosti Hb (g/L)	5,40	0,44	5,90	0,49	5,90	0,49
Hematokrit	0,68	0,01	0,69	0,01	0,70	0,01
Hemoliza (%)	0,91	0,08	0,88	0,06	0,86	0,08
Mikropartikli (MP/ml)	557629	89550	553899	120653	588968	114092
Eritrocitni MP (MP/ml)	270462	46708	288358	80665	322014	71361

Preglednica 4: Povprečna vrednost in standardna napaka srednje in strižne hitrosti, strižne napetosti, časa izpostavljenosti in dinamične viskoznosti pri CVK z enim lumnom, različnih proizvajalcev, skozi katere je stekel eritrocitni koncentrat s pretokom 33 ml/min. *Legenda:* N – število vzorcev, SE – standardna napaka

	A (N=20)		B (N=20)		C (N=20)	
	Povprečje	SE	Povprečje	SE	Povprečje	SE
Srednja hitrost (cm/s)	6,06	0	7,79	0	6,06	0
Strižna hitrost (1/s)	35,67	0	51,94	0	35,67	0
Strižna napetost (Pa)	0,14	0,001	0,21	0,003	0,15	0,002
Čas izpostavljenosti (s)	9,09	0	9,09	0	9,09	0
Din. viskoznost (Pa · s)	0,00403	0,00003	0,00408	0,00005	0,00413	0,00005

Med CVK z enim lumnom, različnih proizvajalcev, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min, ni bilo statistično značilnih razlik v hematoloških parametrih in koncentraciji MP. Opazili pa smo statistične razlike v hemoreoloških parametrih med CVK proizvajalcev A in B, ter B in C. In sicer v strižni hitrosti in strižni napetosti.

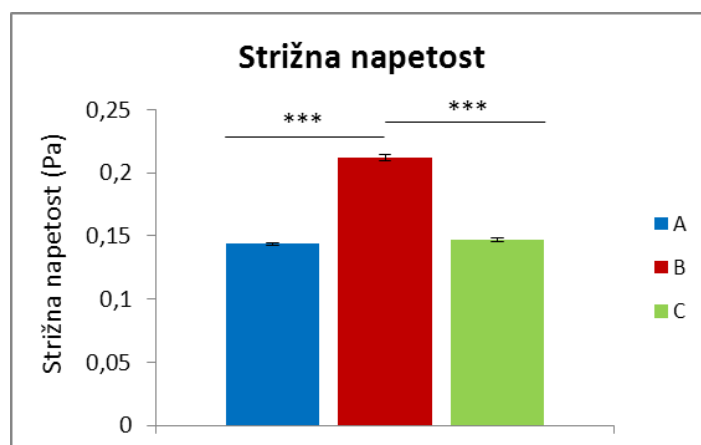
Iz grafa (slika 26) je razvidno, da je bila strižna hitrost eritrocitnega koncentrata pri CVK proizvajalca B statistično značilno višja kot pri proizvajalcu A ($p < 0,001$) in proizvajalcu C ($p < 0,001$). Med CVK proizvajalcev A in C ni bilo statistično značilnih razlik v strižni hitrosti eritrocitnega koncentrata ($p = 0,32$).



Slika 26: Strižna hitrost eritrocitnega koncentrata pri CVK z enim lumnom, proizvajalcev A, B in C, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min

Prikazana je povprečna strižna hitrost eritrocitnega koncentrata (\pm SE) pri CVK z enim lumnom, proizvajalcev A (N=20), B (N=20) in C (N=20), skozi katere je stekel eritrocitni koncentrat s pretokom 33 ml/min. S Studentovim neparnim t testom smo opazili statistično razliko v strižni hitrosti med CVK z enim lumnom proizvajalcev A in B (***) $p < 0,001$), ter B in C (***) $p < 0,001$).

Iz grafa (slika 27) je razvidno, da je bila strižna napetost pri CVK proizvajalca B statistično značilno višja kot pri proizvajalcu A ($p < 0,001$) in proizvajalcu C ($p < 0,001$). Med CVK proizvajalcev A in C ni bilo statistično značilnih razlik v strižni napetosti ($p = 0,71$).



Slika 27: Strižna napetost pri CVK z enim lumnom, proizvajalcev A, B in C, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min

Prikazana je povprečna strižna napetost (\pm SE) pri CVK z enim lumnom, proizvajalcev A (N=20), B (N=20) in C (N=20), skozi katere je stekel eritrocitni koncentrat s pretokom 33 ml/min. S Studentovim neparnim t testom smo opazili statistično značilno razliko v strižni napetosti med CVK z enim lumnom proizvajalcev A in B (***) $p < 0,001$), ter B in C (***) $p < 0,001$).

4.2.1.2 Primerjava distalnih lumnov CVK s petimi lumni, različnih proizvajalcev

V tabelah so podane povprečne vrednosti in standardne napake za hematološke parametre, koncentracijo MP (pregl. 5) in hemoreološke parametre (pregl. 6). P vrednosti statistične analize za hematološke parametre in koncentracijo MP so podane v prilogah (priloga A2).

Preglednica 5: Povprečna vrednost in standardna napaka celokupnega Hb, prostega Hb, Ht, hemolize, celokupnih MP in eritrocitnih MP pri različnih proizvajalcih CVK s petimi lumni, skozi katere je stekel eritrocitni koncentrat čez distalni lumen s pretokom 33 ml/min. *Legenda:* N – število vzorcev, SE – standardna napaka

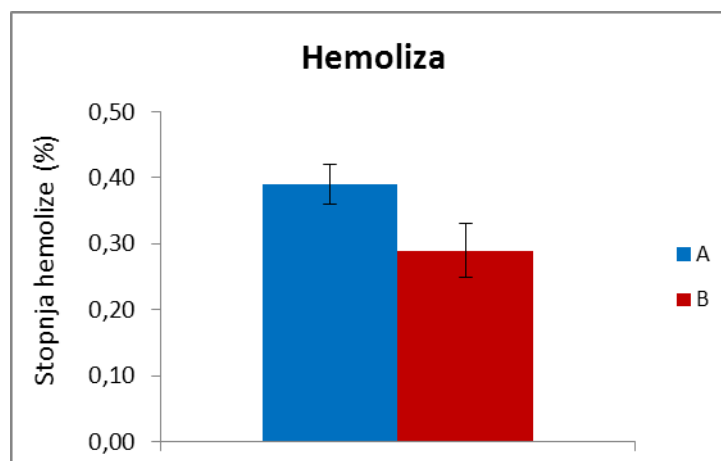
	A (N=10)		B (N=6)	
	Povprečje	SE	Povprečje	SE
Celokupni Hb (g/L)	194,40	3,44	200,00	4,75
Prosti Hb (g/L)	2,40	0,16	2,00	0,37
Hematokrit	0,69	0,01	0,69	0,01
Hemoliza (%)	0,39	0,03	0,29	0,04
Mikropartikli (MP/ml)	198430	78799	256958	132521
Eritrocitni MP (MP/ml)	85398	32539	79606	32676

Preglednica 6: Povprečna vrednost in standardna napaka srednje in strižne hitrosti, strižne napetosti, časa izpostavljenosti in dinamične viskoznosti pri CVK s petimi lumni, različnih proizvajalcev, skozi katere je stekel eritrocitni koncentrat čez distalni lumen s pretokom 33 ml/min. *Legenda:* N – število vzorcev, SE – standardna napaka

	A (N=10)		B (N=6)	
	Povprečje	SE	Povprečje	SE
Srednja hitrost (cm/s)	6,06	0	7,79	0
Strižna hitrost (1/s)	35,67	0	51,94	0
Strižna napetost (Pa)	0,15	0,002	0,21	0,003
Čas izpostavljenosti (s)	9,09	0	9,09	0
Din. viskoznost (Pa · s)	0,00408	0,000043	0,00411	0,000055

Med distalnimi lumni CVK s petimi lumni, proizvajalcev A in B, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min, ni bilo statistično značilnih razlik v koncentraciji MP. MP smo opredelili kot delce, manjše od 2 μm , ki na svoji površini izražajo CD235a in fosfatidilserin označen z Annexinom V. MP so bili CFSE pozitivni, kar pomeni, da so MP zaprte strukture - vezikli. CFSE je znotrajcelično barvilo, katerega lastnost je, da pasivno difundira skozi membrano in se hidrolizira z znotrajcelično esterazo in tako postane fluorescenten.

Opazili smo manjše razlike v stopnji hemolize, in sicer, so imeli CVK proizvajalca B v povprečju nižjo stopnjo hemolize kot CVK proizvajalca A. Vendar pa, je iz grafa (slika 28) razvidno, da stopnja hemolize med CVK proizvajalca A in proizvajalca B ni bila statistično značilno različna ($p=0,07$).

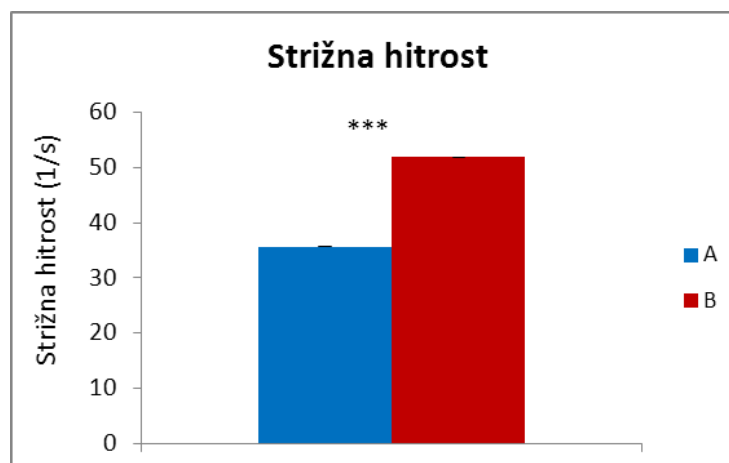


Slika 28: Stopnja hemolize pri distalnem lumnu CVK s petimi lumni, proizvajalcev A in B, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min

Prikazana je povprečna stopnja hemolize (\pm SE) pri distalnem lumnu CVK s petimi lumni, proizvajalcev A (N=10) in B (N=6), skozi katere je stekel eritrocitni koncentrat s pretokom 33 ml/min. Statistično značilne razlike v stopnji hemolize med CVK s petimi lumni proizvajalcev A in B nismo opazili ($p > 0,05$).

Opazili pa smo statistično značilne razlike v hemoreoloških parametrih med CVK proizvajalcev A in B.

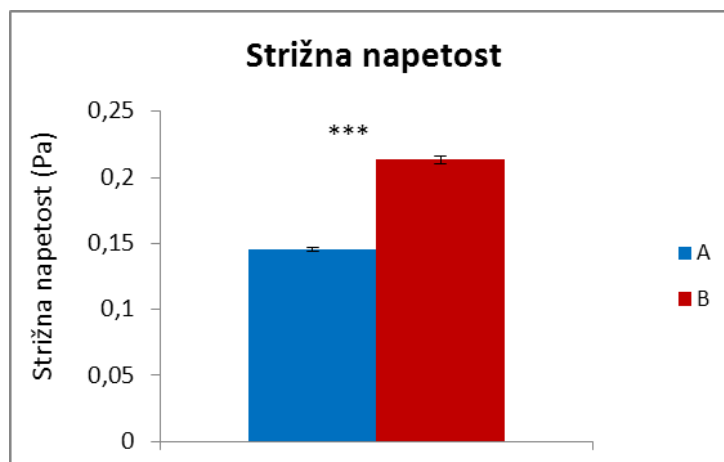
Iz grafa (slika 29) je razvidno, da je bila v povprečju strižna hitrost eritrocitnega koncentrata pri CVK proizvajalca B statistično značilno višja kot pri proizvajalcu A ($p < 0,001$).



Slika 29: Strižna hitrost eritrocitnega koncentrata pri distalnem lumnu CVK s petimi lumni, proizvajalcev A in B, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min

Prikazana je povprečna strižna hitrost eritrocitnega koncentrata (\pm SE) pri distalnem lumnu CVK s petimi lumni, proizvajalcev A (N=10) in B (N=6), skozi katere je stekel eritrocitni koncentrat s pretokom 33 ml/min. S Studentovim neparnim t testom smo opazili statistično značilno razliko v strižni hitrosti med CVK s petimi lumni proizvajalcev A in B (***) $p < 0,001$).

Iz grafa (slika 30) je razvidno, da je bila strižna napetost pri CVK proizvajalca B statistično višja kot pri proizvajalcu A ($p < 0,001$).



Slika 30: Strižna napetost pri distalnem lumnu CVK s petimi lumni, proizvajalcev A in B, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min

Prikazana je povprečna strižna napetost (\pm SE) pri distalnem lumnu CVK petimi lumni, proizvajalcev A (N=10) in B (N=6), skozi katere je stekel eritrocitni koncentrat s pretokom 33 ml/min. S Studentovim neparnim t testom smo opazili statistično značilno razliko v strižni napetosti med CVK s petimi lumni proizvajalcev A in B (***) $p < 0,001$).

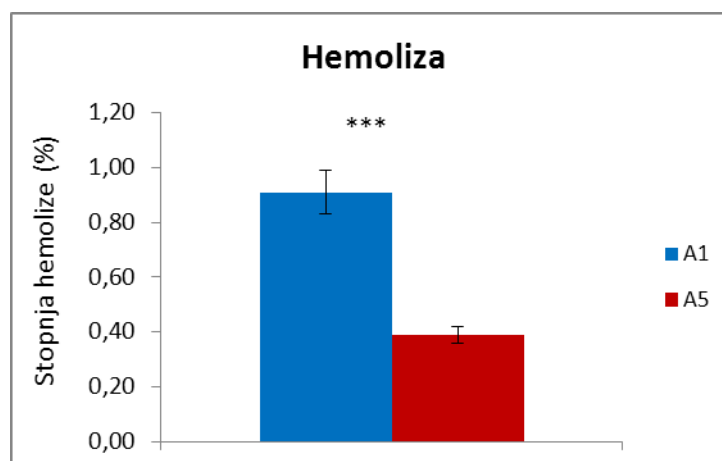
4.2.1.3 Primerjava CVK z enim lumnom in CVK s petimi lumni, istega proizvajalca

Povprečne vrednosti in standardne napake za hematološke parametre, koncentracijo MP in hemoreološke parametre, pri CVK z enim lumnom, so podane v preglednicah 3 in 4. Povprečne vrednosti in standardne napake za hematološke parametre, koncentracijo MP in hemoreološke parametre, pri CVK s petimi lumni, so podane v preglednicah 5 in 6. P vrednosti statistične analize za hematološke parametre in koncentracijo MP so podane v prilogah (priloga A3).

4.2.1.3.1 CVK proizvajalca A

Pri primerjavi CVK z enim in s petimi lumni, proizvajalca A, smo opazili statistično značilne razlike v stopnji hemolize in koncentraciji MP.

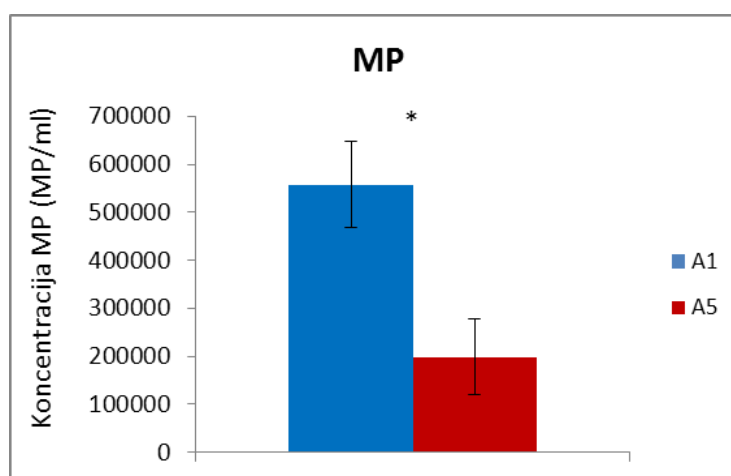
Iz grafa (slika 31) je razvidno, da je bila stopnja hemolize pri CVK proizvajalca A z enim lumnom statistično značilno višja kot pri CVK proizvajalca A s petimi lumni ($p = 0,00007$).



Slika 31: Stopnja hemolize pri CVK proizvajalca A z enim in s petimi lumni, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min

Prikazana je povprečna stopnja hemolize (\pm SE) pri CVK proizvajalca A z enim (N=20) in s petimi lumni (N=10), skozi katere je stekel eritrocitni koncentrat s pretokom 33 ml/min. S Studentovim neparnim t testom smo opazili statistično značilno razliko v stopnji hemolize med CVK z enim in s petimi lumni pri proizvajalcu A (***) $p < 0,001$).

Iz grafa (slika 32) je razvidno, da je bila koncentracija MP pri CVK proizvajalca A z enim lumnom statistično višja kot pri CVK proizvajalca A s petimi lumni ($p = 0,015$).



Slika 32: Koncentracija MP pri CVK proizvajalca A z enim in s petimi lumni, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min

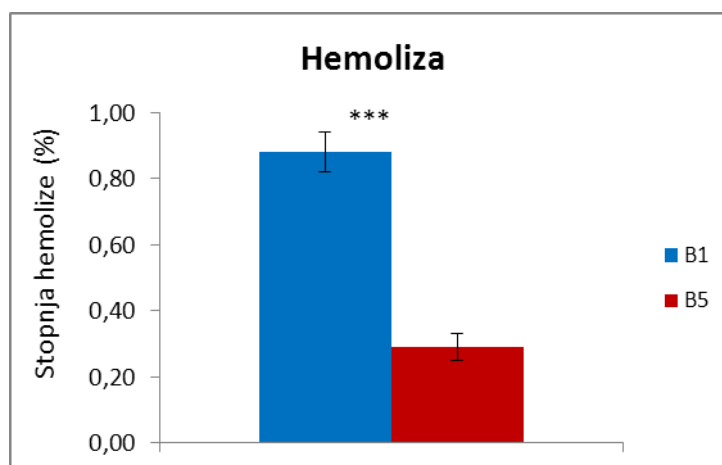
Prikazana je povprečna koncentracija MP (\pm SE) pri CVK proizvajalca A z enim (N=20) in s petimi lumni (N=10), skozi katere je stekel eritrocitni koncentrat s pretokom 33 ml/min. S Studentovim neparnim t testom smo opazili statistično značilno razliko v koncentraciji MP med CVK z enim in s petimi lumni pri proizvajalcu A (*) $p < 0,05$).

Med CVK z enim in s petimi lumni, proizvajalca A, ni bilo statistično značilnih razlik v hemoreoloških parametrih.

4.2.1.3.2 CVK proizvajalca B

Pri primerjavi CVK z enim in s petimi lumni, proizvajalca B, ni bilo statistično značilnih razlik v koncentraciji MP.

Opazili pa smo statistično značilno razliko v stopnji hemolize. Iz grafa (slika 33) je razvidno, da je bila stopnja hemolize pri CVK proizvajalca B z enim lumnom statistično višja kot pri CVK proizvajalca B s petimi lumni ($p=0,000026$).



Slika 33: Stopnja hemolize pri CVK proizvajalca B z enim in s petimi lumni, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min

Prikazana je povprečna stopnja hemolize (\pm SE) pri CVK proizvajalca B z enim ($N=20$) in s petimi lumni ($N=6$), skozi katere je stekel eritrocitni koncentrat s pretokom 33 ml/min. S Studentovim neparnim t testom smo opazili statistično značilno razliko v stopnji hemolize med CVK z enim in s petimi lumni pri proizvajalcu B (***) ($p<0,001$).

Med CVK z enim in s petimi lumni, proizvajalca B, ni bilo statistično značilnih razlik v hemoreoloških parametrih.

4.2.1.3.3 CVK proizvajalca C

Ker v raziskavi nismo imeli na voljo CVK s petimi lumni proizvajalca C, primerjave in s tem razlik med CVK z enim in s petimi lumni ni bilo mogoče določiti in izračunati.

4.2.1 Višji pretok (500 ml/min)

4.2.1.1 Primerjava CVK z enim lumnom, različnih proizvajalcev

V tabelah so podane povprečne vrednosti in standardne napake za hematološke parametre, koncentracijo MP (pregl. 7) in hemoreološke parametre (pregl. 8). P vrednosti statistične analize za hematološke parametre in koncentracijo MP so podane v prilogah (priloga A4).

Preglednica 7: Povprečna vrednost in standardna napaka celokupnega Hb, Ht, celokupnih MP in eritrocitnih MP pri različnih proizvajalcih CVK z enim lumnom, skozi katere je stekel eritrocitni koncentrat s pretokom 500 ml/min. *Legenda:* N – število vzorcev, SE – standardna napaka

	A (N=18)		B (N=20)		C (N=21)	
	Povprečje	SE	Povprečje	SE	Povprečje	SE
Celokupni Hb (g/L)	216,50	0,85	198,45	3,71	222,86	1,51
Hematokrit	0,75	0	0,69	0,01	0,78	0,01
Mikropartikli (MP/ml)	268723	54641	434352	83019	257923	35026
Eritrocitni MP (MP/ml)	110036	21764	173025	33484	111177	18920

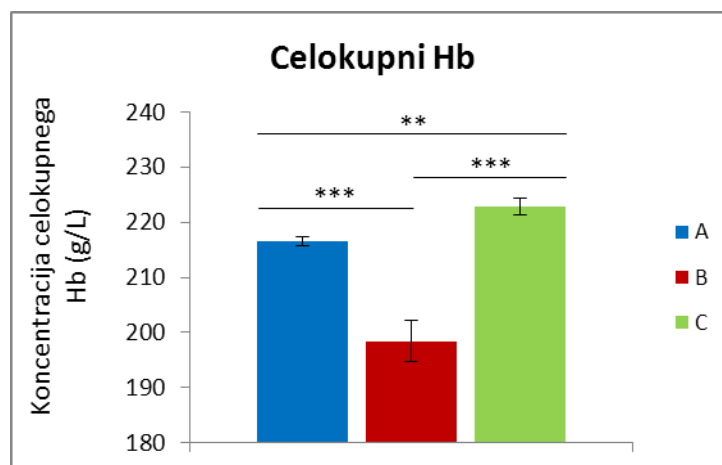
Preglednica 8: Povprečna vrednost in standardna napaka srednje in strižne hitrosti, strižne napetosti, časa izpostavljenosti in dinamične viskoznosti pri CVK z enim lumnom, različnih proizvajalcev, skozi katere je stekel eritrocitni koncentrat s pretokom 500 ml/min. *Legenda:* N – število vzorcev, SE – standardna napaka

	A (N=18)		B (N=20)		C (N=21)	
	Povprečje	SE	Povprečje	SE	Povprečje	SE
Srednja hitrost (cm/s)	91,84	0	117,99	0	91,84	0
Strižna hitrost (1/s)	540,24	0	786,59	0	540,24	0
Strižna napetost (Pa)	2,33	0,01	3,24	0,04	2,39	0,01
Čas izpostavljenosti (s)	0,60	0	0,60	0	0,60	0
Din. viskoznost (Pa · s)	0,00432	0,000014	0,00412	0,000048	0,00443	0,000021

Med CVK z enim lumnom, različnih proizvajalcev, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 500 ml/min, ni bilo statistično značilnih razlik v koncentraciji MP.

Vendar pa, smo opazili razlike v koncentraciji celokupnega Hb in deležu hematokrita med posameznimi katetri.

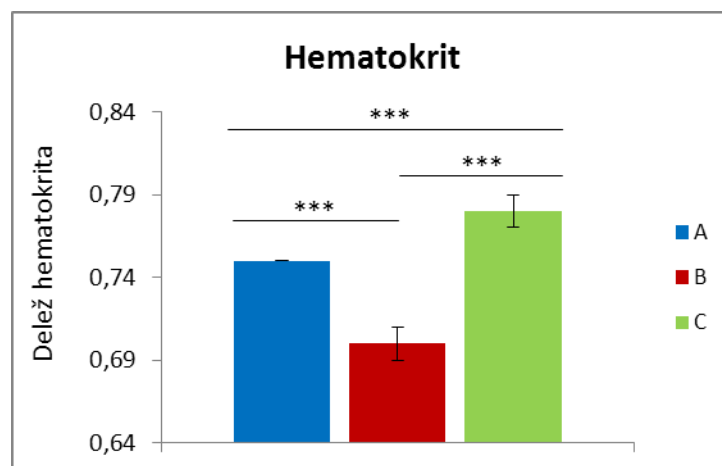
Iz grafa (slika 34) je razvidno, da je bila koncentracija celokupnega Hb pri CVK proizvajalca C statistično višja kot pri proizvajalcu A ($p=0,0012$) in proizvajalcu B ($p=0,00000027$), ter višja pri CVK proizvajalca A kot pri proizvajalcu B ($p=0,000066$).



Slika 34: Koncentracija celokupnega hemoglobina pri CVK z enim lumnom, proizvajalcev A, B in C, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 500 ml/min

Prikazana je povprečna koncentracija celokupnega hemoglobina (\pm SE) pri CVK z enim lumnom proizvajalcev A (N= 18), B (N= 20) in C (N=21), skozi katere je stekel eritrocitni koncentrat s pretokom 500 ml/min. S Studentovim neparnim t testom smo opazili statistično razliko v koncentraciji celokupnega Hb med CVK z enim lumnom proizvajalcev A in B (***) $p < 0,001$), A in C (** $p < 0,01$), ter B in C (***) $p < 0,001$).

Iz grafa (slika 35) je razvidno, da je bil delež hematokrita pri CVK proizvajalca C statistično višji kot pri proizvajalcu A ($p=0,00023$) in proizvajalcu B ($p=0,0000006$), ter višji pri CVK proizvajalca A kot pri proizvajalcu B ($p=0,00052$).

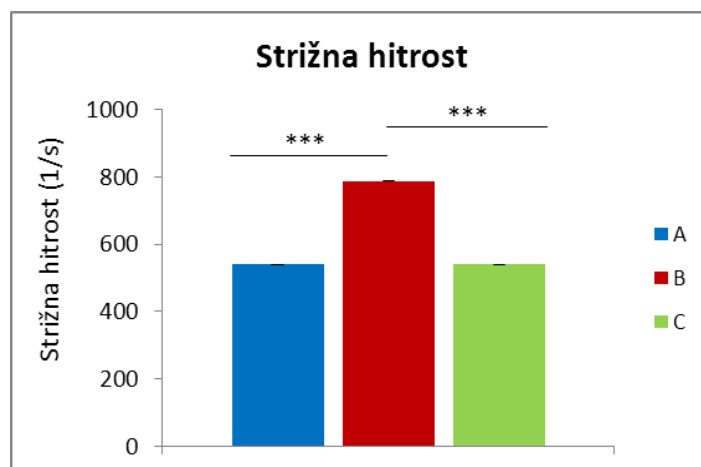


Slika 35: Delež hematokrita pri CVK z enim lumnom, proizvajalcev A, B in C, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 500 ml/min

Prikazan je povprečen delež hematokrita (\pm SE) pri CVK z enim lumnom proizvajalcev A (N=18), B (N=20) in C (N=21), skozi katere je stekel eritrocitni koncentrat s pretokom 500 ml/min. S Studentovim neparnim t testom smo opazili statistično razliko v deležu hematokrita med CVK z enim lumnom proizvajalcev A in B (***) $p < 0,001$), A in C (***) $p < 0,001$), ter B in C (***) $p < 0,001$).

Med CVK z enim lumnom, proizvajalcev A, B in C so bile prisotne razlike tudi v različnih parametrih hemoreologije. In sicer, pri strižni hitrosti (slika 36) in strižni napetosti (slika 37).

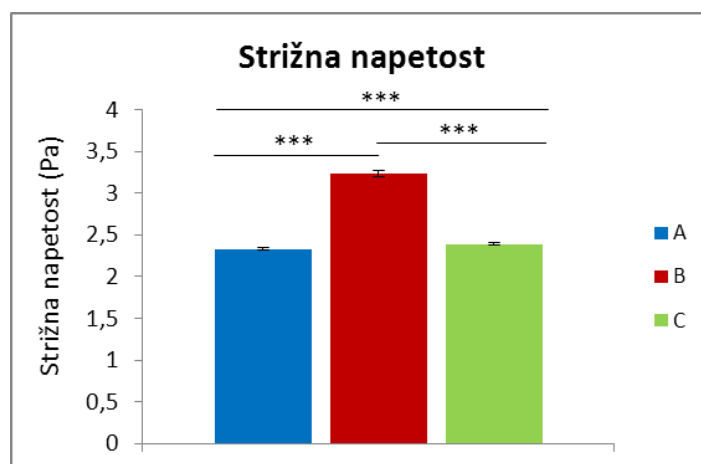
Iz grafa (slika 36) je razvidno, da je bila v povprečju strižna hitrost eritrocitnega koncentrata pri CVK proizvajalca B statistično višja kot pri proizvajalcu A ($p < 0,001$) in proizvajalcu C ($p < 0,001$). Med CVK proizvajalcev A in C ni bilo statistično značilnih razlik v strižni hitrosti eritrocitnega koncentrata ($p = 0,29$).



Slika 36: Strižna hitrost eritrocitnega koncentrata pri CVK z enim lumnom proizvajalcev A, B in C, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 500 ml/min

Prikazana je povprečna strižna hitrost eritrocitnega koncentrata (\pm SE) pri CVK z enim lumnom proizvajalcev A (N=18), B (N=20) in C (N=21), skozi katere je stekel eritrocitni koncentrat s pretokom 500 ml/min. S Studentovim neparnim t testom smo opazili statistično razliko v strižni hitrosti med CVK z enim lumnom proizvajalcev A in B (***) $p < 0,001$), ter B in C (***) $p < 0,001$).

Iz grafa (slika 37) je razvidno, da je bila strižna napetost pri CVK proizvajalca B statistično značilno višja kot pri proizvajalcu A ($p < 0,001$) in proizvajalcu C ($p < 0,001$), ter statistično višja pri CVK proizvajalca C kot pri proizvajalcu A ($p = 0,00024$).



Slika 37: Strižna napetost pri CVK z enim lumnom proizvajalcev A, B in C, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 500 ml/min

Prikazana je povprečna strižna napetost (\pm SE) pri CVK z enim lumnom proizvajalcev A (N=18), B (N=20) in C (N=21), skozi katere je stekel eritrocitni koncentrat s pretokom 500 ml/min. S Studentovim neparnim t testom smo opazili razliko v strižni napetosti med CVK z enim lumnom proizvajalcev A in B (***) $p < 0,001$), A in C (***) $p < 0,001$), ter B in C. (***) $p < 0,001$).

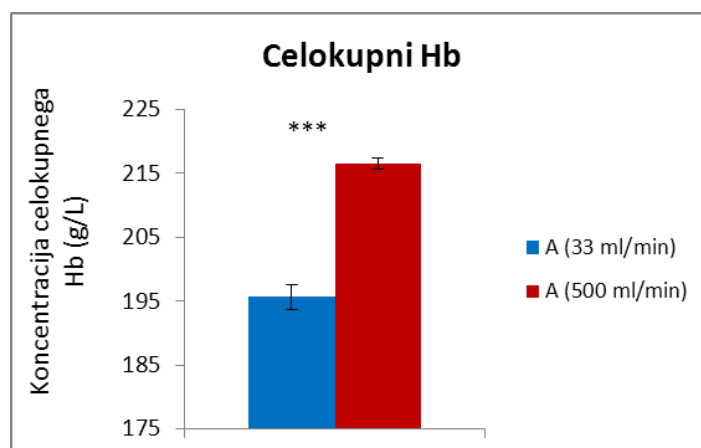
4.2.1 Primerjava CVK z enim lumnom, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min in CVK z enim lumnom, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 500 ml/min, istega proizvajalca

Povprečne vrednosti in standardne napake za hematološke parametre, koncentracijo MP in hemoreološke parametre, pri nižjem pretoku, so podane v preglednicah 3 in 4. Povprečne vrednosti in standardne napake za hematološke parametre, koncentracijo MP in hemoreološke parametre, pri višjem pretoku, so podane v preglednicah 7 in 8. P vrednosti statistične analize za hematološke parametre in koncentracijo MP so podane v prilogah (priloga A5).

4.2.1.1 CVK proizvajalca A

Med CVK z enim lumnom, proizvajalca A, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min in 500 ml/min smo opazili statistično značilne razlike v koncentraciji celokupnega hemoglobina, deležu hematokrita in koncentraciji MP.

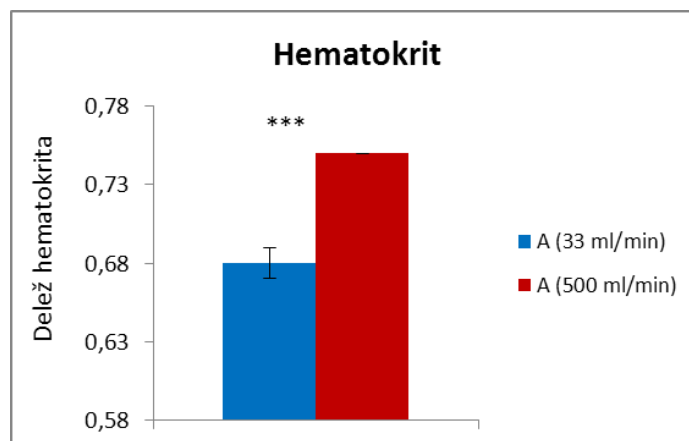
Iz grafa (slika 38) je razvidno, da je bila koncentracija celokupnega Hb pri CVK proizvajalca A, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min, statistično značilno nižja kot pri CVK skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 500 ml/min ($p=0,000000000003$).



Slika 38: Koncentracija celokupnega hemoglobina pri CVK z enim lumnom, proizvajalca A, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min in 500 ml/min

Prikazana je povprečna koncentracija celokupnega Hb (\pm SE) pri CVK proizvajalca A skozi katere je stekel eritrocitni koncentrat pri visokem ($N=18$) in nizkem ($N=20$) pretoku. S Studentovim neparnim t testom smo opazili statistično značilno razliko v koncentraciji celokupnega Hb pri nizkem in visokem pretoku (***) ($p<0,001$).

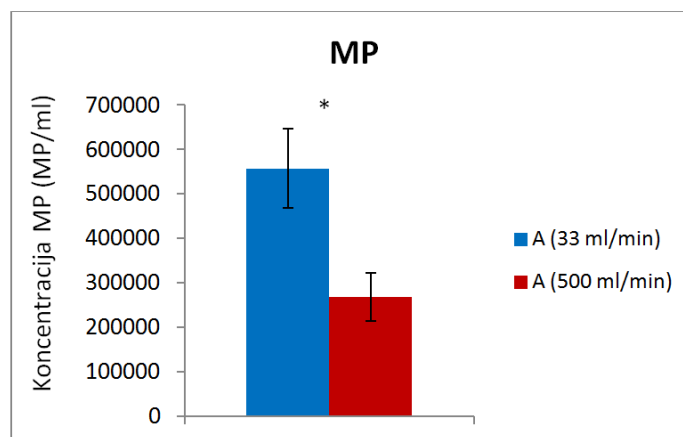
Iz grafa (slika 39) je razvidno, da je bil delež hematokrita pri CVK proizvajalca A, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min, statistično značilno nižji kot pri CVK skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 500 ml/min ($p=0,00000000002$).



Slika 39: Delež hematokrita pri CVK z enim lumnom, proizvajalca A, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min in 500 ml/min

Prikazan je povprečen delež hematokrita (\pm SE) pri CVK proizvajalca A skozi katere je stekel eritrocitni koncentrat pri visokem ($N=18$) in nizkem ($N=20$) pretoku. S Studentovim neuparjenim t testom smo opazili statistično značilno razliko v deležu hematokrita pri nizkem in visokem pretoku ($*** p<0,001$).

Iz grafa (slika 40) je razvidno, da je bila koncentracija MP pri CVK proizvajalca A, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min, višja kot pri CVK skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 500 ml/min ($p=0,011$).



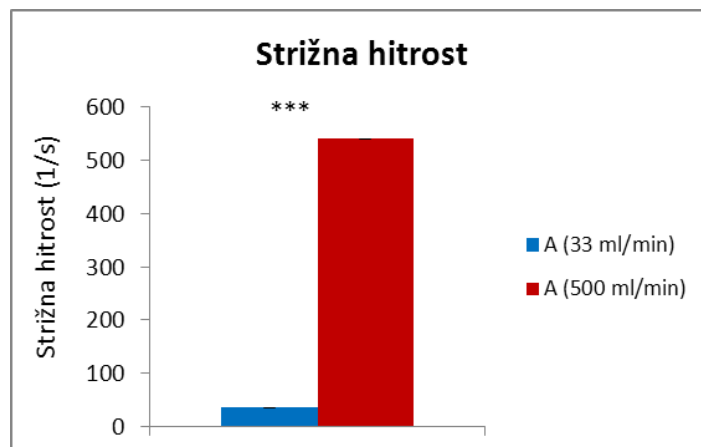
Slika 40: Koncentracija MP pri CVK z enim lumnom, proizvajalca A, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min in 500 ml/min

Prikazana je povprečna koncentracija MP (\pm SE) pri CVK proizvajalca A skozi katere je stekel eritrocitni koncentrat pri visokem ($N=18$) in nizkem ($N=20$) pretoku. S Studentovim neuparjenim t testom smo opazili statistično značilno razliko v koncentraciji MP pri nizkem in visokem pretoku ($* p<0,05$).

Med CVK z enim lumnom, proizvajalca A, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min in 500 ml/min, smo opazili statistično značilne razlike tudi pri

različnih parametrov hemoreologije. In sicer, pri strižni hitrosti (slika 41), strižni napetosti (slika 42) in času izpostavljenosti (slika 43).

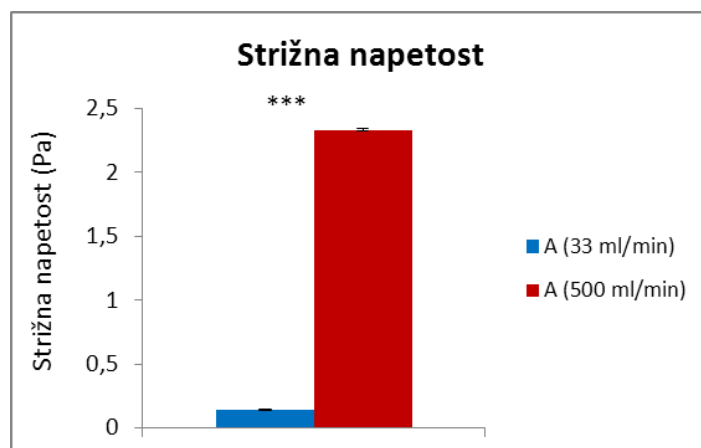
Iz grafa (slika 41) je razvidno, da je bila strižna hitrost eritrocitnega koncentrata pri pretoku 500 ml/min statistično značilno višja kot pri pretoku 33 ml/min ($p < 0,001$).



Slika 41: Strižna hitrost eritrocitnega koncentrata pri CVK z enim lumnom, proizvajalca A, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min in 500 ml/min

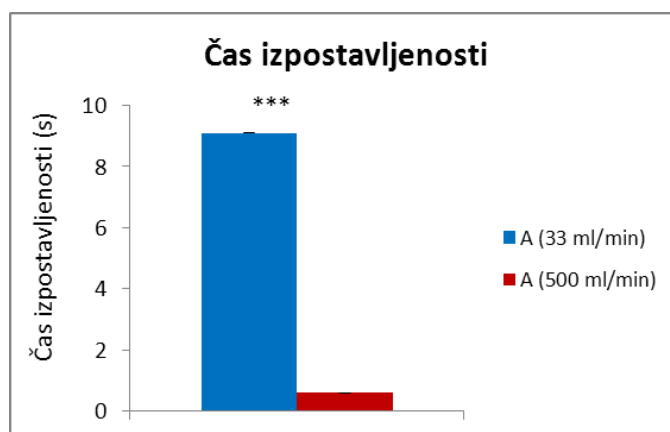
Prikazana je povprečna strižna hitrost eritrocitnega koncentrata (\pm SE) pri CVK proizvajalca A skozi katere je stekel eritrocitni koncentrat pri visokem ($N=18$) in nizkem ($N=20$) pretoku. S Studentovim neparnim t testom smo opazili statistično značilno razliko v strižni hitrosti pri nizkem in visokem pretoku ($*** p < 0,001$).

Iz grafa (slika 42) je razvidno, da je bila strižna napetost pri pretoku 500 ml/min statistično značilno višja kot pri pretoku 33 ml/min ($p < 0,001$).



Slika 42: Strižna napetost pri CVK z enim lumnom, proizvajalca A, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min in 500 ml/min

Prikazana je povprečna strižna napetost (\pm SE) pri CVK proizvajalca A skozi katere je stekel eritrocitni koncentrat pri visokem ($N=18$) in nizkem ($N=20$) pretoku. S Studentovim neparnim t testom smo opazili statistično značilno razliko v strižni napetosti pri nizkem in visokem pretoku ($*** p < 0,001$).



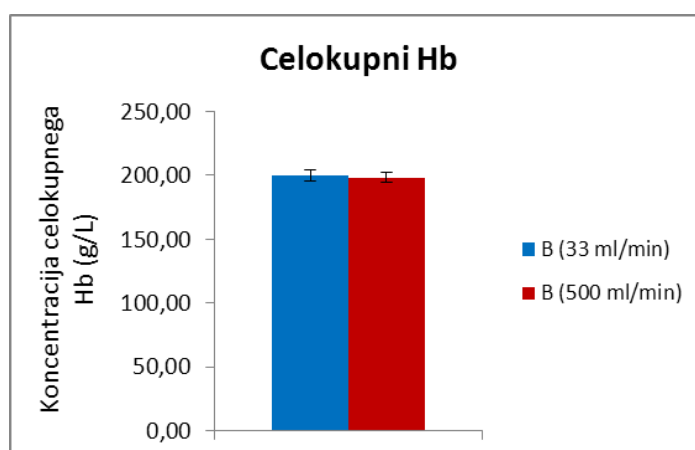
Slika 43: Čas izpostavljenosti eritrocitnega koncentrata pri CVK z enim lumnom, proizvajalca A, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min in 500 ml/min

Prikazan je povprečen čas izpostavljenosti eritrocitnega koncentrata (\pm SE) pri CVK proizvajalca A skozi katere je stekel eritrocitni koncentrat pri visokem (N=18) in nizkem (N=20) pretoku. S Studentovim neparnim t testom smo opazili statistično značilno razliko v času izpostavljenosti pri nizkem in visokem pretoku (***) $p < 0,001$.

4.2.1.2 CVK proizvajalca B

Med CVK z enim lumnom, proizvajalca B, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min in 500 ml/min nismo opazili statistično značilnih razlik.

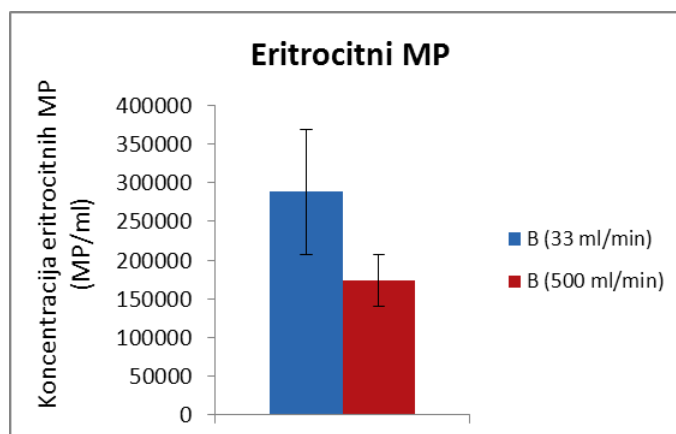
Iz grafa (slika 44) je razvidno, da je bila koncentracija celokupnega Hb pri CVK proizvajalca B, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min, nekoliko višja kot pri CVK skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 500 ml/min. Vendar, razlike niso statistično pomembne ($p=0,79$).



Slika 44: Koncentracija celokupnega hemoglobina pri CVK z enim lumnom, proizvajalca B, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min in 500 ml/min

Prikazana je povprečna koncentracija celokupnega Hb (\pm SE) pri CVK proizvajalca B skozi katere je stekel eritrocitni koncentrat pri visokem (N=20) in nizkem (N=20) pretoku. Statistično značilne razlike v koncentraciji celokupnega Hb pri nizkem in visokem pretoku nismo opazili ($p > 0,05$).

Iz grafa (slika 45) je razvidno, da je bila koncentracija MP pri CVK proizvajalca B, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min, v povprečju nekoliko višja kot pri CVK skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 500 ml/min. Vendar, na podlagi Studentovega neparnege t testa ne moremo trditi, da je koncentracija MP statistično značilna različna med CVK z nižjim in z višjim pretokom pri proizvajalcu B ($p=0,19$).

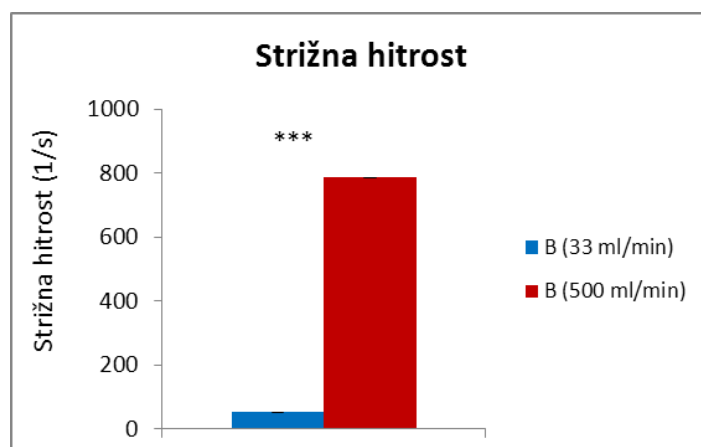


Slika 45: Koncentracija MP pri CVK z enim lumnom, proizvajalca B, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min in 500 ml/min

Prikazana je povprečna koncentracija MP (\pm SE) pri CVK proizvajalca B skozi katere je stekel eritrocitni koncentrat pri visokem ($N=20$) in nizkem ($N=20$) pretoku. Statistično značilne razlike v koncentraciji MP pri nizkem in visokem pretoku nismo opazili ($p>0,05$).

Med CVK z enim lumnom, proizvajalca B, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min in 500 ml/min smo opazili statistično značilne razlike tudi pri različnih hemoreoloških parametri. In sicer, pri strižni hitrosti (slika 46), strižni napetosti (slika 47) in času izpostavljenosti (slika 48).

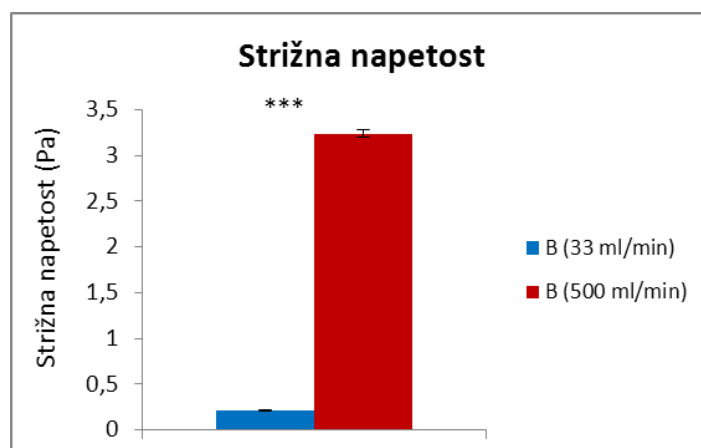
Iz grafa (slika 46) je razvidno, da je bila strižna hitrost eritrocitnega koncentrata pri pretoku 500 ml/min statistično značilno višja kot pri pretoku 33 ml/min ($p<0,001$).



Slika 46: Strižna hitrost eritrocitnega koncentrata pri CVK z enim lumnom, proizvajalca B, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min in 500 ml/min

Prikazana je povprečna strižna hitrost eritrocitnega koncentrata (\pm SE) pri CVK proizvajalca B skozi katere je stekel eritrocitni koncentrat pri visokem ($N=20$) in nizkem ($N=20$) pretoku. S Studentovim neparnim t testom smo opazili statistično značilno razliko v strižni hitrosti pri nizkem in visokem pretoku (***) $p<0,001$.

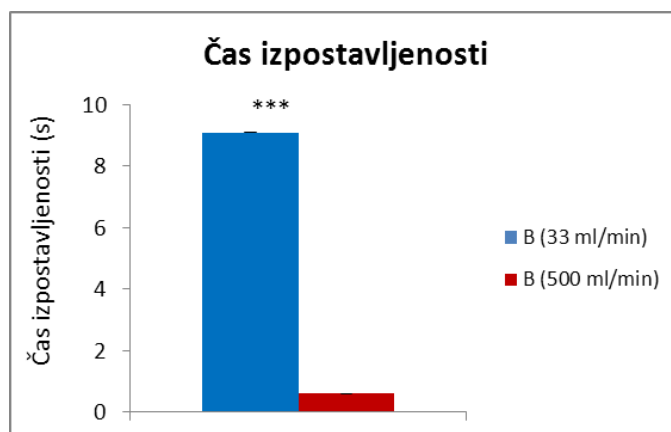
Iz grafa (slika 47) je razvidno, da je bila strižna napetost pri pretoku 500 ml/min statistično značilno višja kot pri pretoku 33 ml/min ($p<0,001$).



Slika 47: Strižna napetost pri CVK z enim lumnom, proizvajalca B, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min in 500 ml/min

Prikazana je povprečna strižna napetost (\pm SE) pri CVK proizvajalca B skozi katere je stekel eritrocitni koncentrat pri visokem ($N=20$) in nizkem ($N=20$) pretoku. S Studentovim neparnim t testom smo opazili statistično značilno razliko v strižni napetosti pri nizkem in visokem pretoku (***) $p<0,001$.

Iz grafa (slika 48) je razvidno, da je bil čas izpostavljenosti eritrocitnega koncentrata pri pretoku 500 ml/min nižji kot pri pretoku 33 ml/min ($p<0,001$).



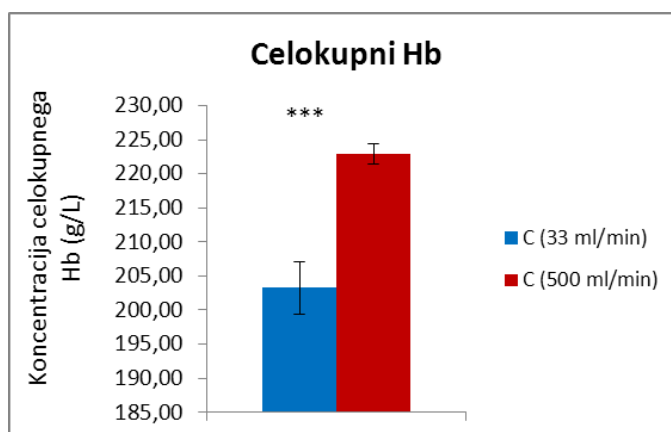
Slika 48: Čas izpostavljenosti eritrocitnega koncentrata pri CVK z enim lumnom, proizvajalca B, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min in 500 ml/min

Prikazan je povprečen čas izpostavljenosti eritrocitnega koncentrata (\pm SE) pri CVK proizvajalca B skozi katere je stekel eritrocitni koncentrat pri visokem ($N=20$) in nizkem ($N=20$) pretoku. S Studentovim neparnim t testom smo opazili statistično značilno razliko v času izpostavljenosti pri nizkem in visokem pretoku (***) $p < 0,001$).

4.2.1.3 CVK proizvajalca C

Med CVK z enim lumnom, proizvajalca C, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min in 500 ml/min smo opazili statistično značilne razlike v koncentraciji celokupnega hemoglobina, deležu hematokrita in koncentraciji MP.

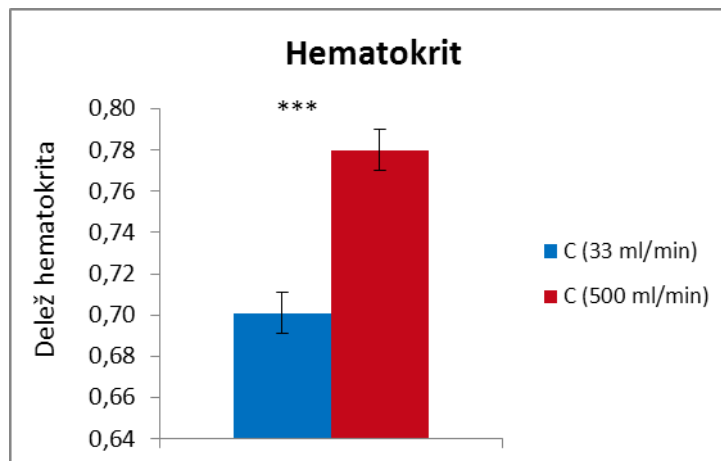
Iz grafa (slika 49) je razvidno, da je bila koncentracija celokupnega Hb pri CVK proizvajalca C, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min, statistično značilno nižja kot pri CVK skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 500 ml/min ($p=0,00002$).



Slika 49: Koncentracija celokupnega hemoglobina pri CVK z enim lumnom, proizvajalca C, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min in 500 ml/min

Prikazana je povprečna koncentracija celokupnega Hb (\pm SE) pri CVK proizvajalca C skozi katere je stekel eritrocitni koncentrat pri visokem (N=21) in nizkem (N=20) pretoku. S Studentovim neparnim t testom smo opazili statistično značilno razliko v koncentraciji celokupnega Hb pri nizkem in visokem pretoku (***) $p < 0,001$).

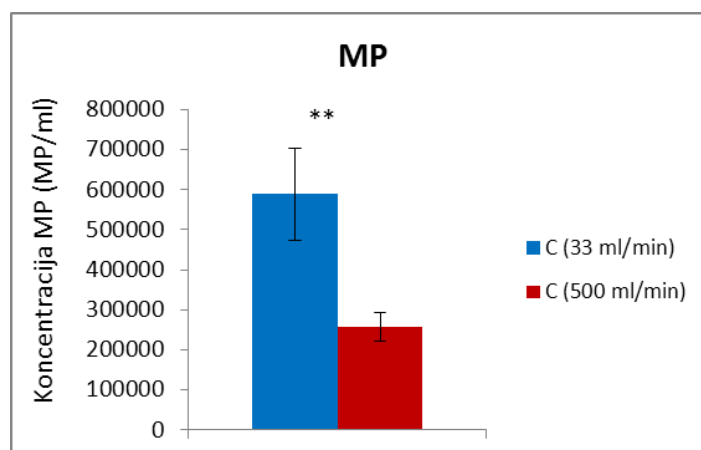
Iz grafa (slika 50) je razvidno, da je bil delež hematokrita pri CVK proizvajalca C, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min, statistično značilno nižji kot pri CVK skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 500 ml/min ($p = 0,0000005$).



Slika 50: Delež hematokrita pri CVK z enim lumnom, proizvajalca C, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min in 500 ml/min

Prikazan je povprečen delež hematokrita (\pm SE) pri CVK proizvajalca C skozi katere je stekel eritrocitni koncentrat pri visokem (N=21) in nizkem (N=20) pretoku. S Studentovim neparnim t testom smo opazili statistično značilno razliko v deležu hematokrita pri nizkem in visokem pretoku (***) $p < 0,001$).

Iz grafa (slika 51) je razvidno, da je bila koncentracija MP pri CVK proizvajalca C, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min, statistično značilno višja kot pri CVK skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 500 ml/min ($p = 0,007$).

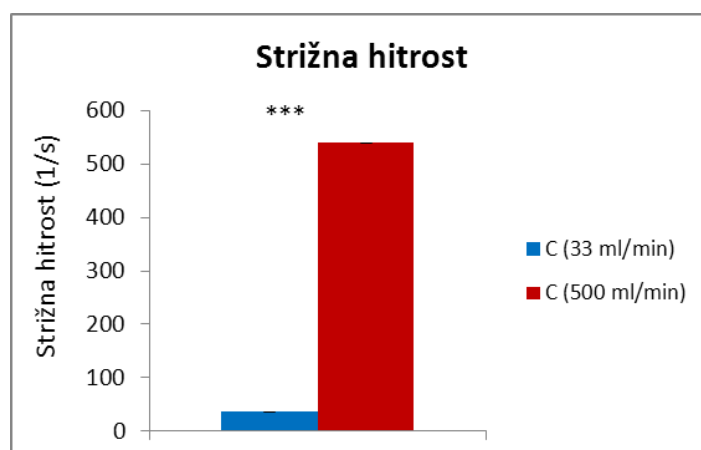


Slika 51: Koncentracija MP pri CVK z enim lumnom, proizvajalca C, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min in 500 ml/min

Prikazana je povprečna koncentracija MP (\pm SE) pri CVK proizvajalca C skozi katere je stekel eritrocitni koncentrat pri visokem (N=21) in nizkem (N=20) pretoku. S Studentovim neparnim t testom smo opazili statistično značilno razliko v koncentraciji MP pri nizkem in visokem pretoku (** $p < 0,01$).

Med CVK z enim lumnom, proizvajalca C, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min in 500 ml/min smo opazili statistično značilne razlike tudi pri različnih parametrih hemoreologije. In sicer, pri strižni hitrosti (slika 52), strižni napetosti (slika 53) in času izpostavljenosti (slika 54).

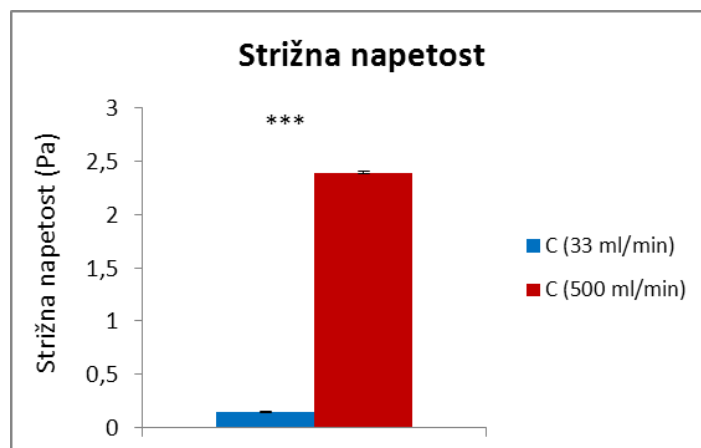
Iz grafa (slika 52) je razvidno, da je bila strižna hitrost eritrocitnega koncentrata pri pretoku 500 ml/min višja kot pri pretoku 33 ml/min ($p < 0,001$).



Slika 52: Strižna hitrost eritrocitnega koncentrata pri CVK z enim lumnom, proizvajalca C, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min in 500 ml/min

Prikazana je povprečna strižna hitrost eritrocitnega koncentrata (\pm SE) pri CVK proizvajalca C skozi katere je stekel eritrocitni koncentrat pri visokem (N=21) in nizkem (N=20) pretoku. S Studentovim neparnim t testom smo opazili statistično značilno razliko v strižni hitrosti pri nizkem in visokem pretoku (***) $p < 0,001$).

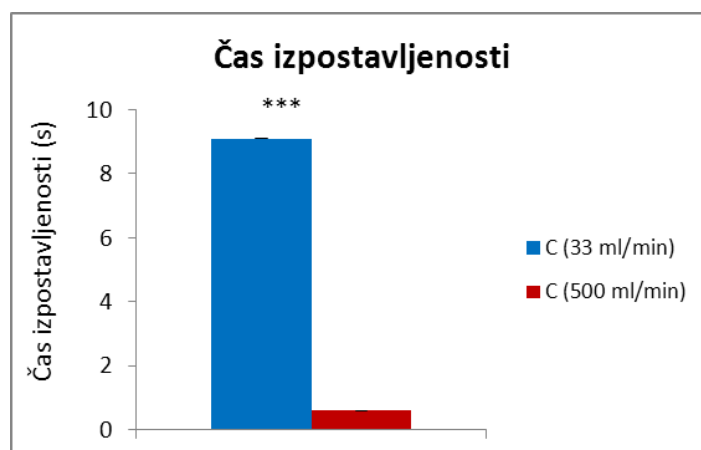
Iz grafa (slika 53) je razvidno, da je bila strižna napetost pri pretoku 500 ml/min višja kot pri pretoku 33 ml/min ($p < 0,001$).



Slika 53: Strižna napetost pri CVK z enim lumnom, proizvajalca C, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min in 500 ml/min

Prikazana je povprečna strižna napetost (\pm SE) pri CVK proizvajalca C skozi katere je stekel eritrocitni koncentrat pri visokem ($N=21$) in nizkem ($N=20$) pretoku. S Studentovim neparnim t testom smo opazili statistično značilno razliko v strižni napetosti pri nizkem in visokem pretoku ($*** p < 0,001$).

Iz grafa (slika 54) je razvidno, da je bil čas izpostavljenosti eritrocitnega koncentrata pri pretoku 500 ml/min nižji kot pri pretoku 33 ml/min ($p < 0,001$).



Slika 54: Čas izpostavljenosti eritrocitnega koncentrata pri CVK z enim lumnom, proizvajalca C, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min in 500 ml/min

Prikazan je povprečen čas izpostavljenosti eritrocitnega koncentrata (\pm SE) pri CVK proizvajalca C skozi katere je stekel eritrocitni koncentrat pri visokem ($N=21$) in nizkem ($N=20$) pretoku. S Studentovim neparnim t testom smo opazili statistično značilno razliko v času izpostavljenosti pri nizkem in visokem pretoku ($*** p < 0,001$).

5 RAZPRAVA

V raziskavi smo testirali CVK z enim in s petimi lumnii, treh različnih proizvajalcev (A, B in C), pri dveh različnih pretokih eritrocitnega koncentrata skozi katetre (33 ml/min in 500 ml/min). CVK, ki smo jih testirali so se med seboj razlikovali glede na prisotnost prevleke, geometrijo tunela, dolžino, premer lumna in število lumnov (preglednici 1 in 2). Glede na material se katetri med seboj niso razlikovali, zato nismo morali oceniti vpliva materiala na razlike v poškodbah eritrocitov.

Z rezultati mikroparticlov in hematološkimi rezultati smo najprej opredelili kateri CVK povzročajo več oziroma manj poškodb eritrocitov. Po tem, ko smo opredelili poškodbe, smo s posameznimi lastnostmi CVK in pretokom eritrocitnega koncentrata skozi CVK poskušali razložiti zakaj pri nekaterih CVK prihaja do več oziroma manj poškodb eritrocitov.

Vpliv pretoka eritrocitnega koncentrata skozi CVK, in tudi vpliv premera, smo ocenili še s hemoreološkimi parametri (strižna hitrost, strižna napetost in čas izpostavljenosti).

5.1 Vpliv prevleke

Vpliv prevleke na poškodbe eritrocitov smo ocenili pri nižjem (33 ml/min) in višjem (500 ml/min) pretoku. Pri obeh pretokih smo analizirali vpliv prevleke pri katetrih z enim lumnii, proizvajalcev A, B in C. Katetri proizvajalca C so imeli prevleko iz poliheksanid metakrilata, katetri proizvajalca A in B pa so bili brez prevleke.

Prevleka katetrov lahko ima pomembno vlogo pri travmatičnosti površine katetra. CVK s prevlekami in brez prevlek so raziskovali tudi Chauhan in sodelavci (2014), ki so dokazali, da CVK s prevlekami zmanjšajo začetno adhezijo celic in tvorbo biofilma ter nezaželenih zapletov, v primerjavi s CVK brez prevlek. Krikava in sodelavci (2011) so dokazali, da CVK s prevleko iz poliheksanida, v primerjavi s standardnimi CVK brez prevlek, zmanjšajo okužbe v krvnem obtoku.

Centralni venski katetri z enim lumnii, proizvajalcev A, B in C, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min, niso imeli statistično značilnega vpliva na poškodbe eritrocitov, saj nismo opazili statistično značilnih razlik v hematoloških parametrih in koncentraciji mikroparticlov, s katerimi smo opredelili poškodbe eritrocitov.

Pri primerjavi CVK z enim lumnii, proizvajalcev A, B in C, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 500 ml/min, smo opazili statistično značilne razlike med vsemi tremi proizvajalci, in sicer, v koncentraciji celokupnega Hb in deležu hematokrita. Najvišja koncentracija celokupnega Hb in delež Ht sta bila pri CVK proizvajalca C, sledi

koncentracija celokupnega Hb in delež Ht pri CVK proizvajalca A, in najnižja koncentracija celokupnega Hb in delež Ht pri CVK proizvajalca B. Statistično značilnih razlik v koncentraciji MP ni bilo.

Hematokrit je razmerje med volumnom eritrocitov in volumnov celotne krvi (Billett, 1990). Večji kot je delež hematokrita, več eritrocitov ostane celih (nepoškodovanih) in večja je tudi koncentracija celokupnega Hb. CVK z enim lumnom, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 500 ml/min, so pri proizvajalcu C, ki so imeli prisotno prevleko, povzročali najmanj poškodb eritrocitov, sledijo CVK proizvajalca A, ki so bili brez prevleke, največ poškodb pa so povzročali CVK proizvajalca B, ki so prav tako bili brez prevleke. Vendar pa, bi za natančnejšo opredelitev poškodb eritrocitov potrebovali še podatke za koncentracijo prostega Hb, da bi lahko izračunali stopnjo hemolize, ki pa je pri višjem pretoku nismo imeli.

V naši raziskavi smo opazili, da pri nižjem pretoku (33 ml/min) prevleka ni imela vpliva na razlike v pošodbah eritrocitov, saj razlik v pošodbah eritrocitov ni bilo. Pri višjem pretoku (500 ml/min) pa je prevleka imela vpliv na razlike v pošodbah eritrocitov. Pri višjem pretoku so katetri z enim lumnom, proizvajalca C, ki so imeli prisotno prevleko iz poliheksanid metakrilata povzročali najmanj poškodb eritrocitov, v primerjavi s katetri proizvajalcev A in B, ki so bili brez prevleke. Vendar pa, bi za natančnejše ovrednotenje vpliva prevleke morali imeti na voljo katetre istega proizvajalca z in brez prevleke, kar pa v naši raziskavi nismo imeli.

5.2 Vpliv dolžine

Vpliv dolžine katetra na poškodbe eritrocitov smo ocenili pri nižjem in višjem pretoku. Pri nižjem pretoku smo analizirali vpliv dolžine pri katetrih z enim lumnom, proizvajalcev A, B in C, ter pri katetrih s petimi lumni, proizvajalcev A in B. Pri višjem pretoku smo analizirali vpliv dolžine pri katetrih z enim lumnom, proizvajalcev A, B in C.

Centralni venski katetri z enim lumnom, proizvajalcev A, B in C, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min, niso imeli statistično značilnega vpliva na poškodbe eritrocitov, saj nismo opazili statistično značilnih razlik v hematoloških parametrih in koncentraciji mikroparticlov. CVK s petimi lumni, proizvajalcev A in B, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min, prav tako niso imeli statistično značilnega vpliva na poškodbe eritrocitov.

Pri primerjavi CVK z enim lumnom, proizvajalcev A, B in C, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 500 ml/min, je bila pri proizvajalcu C statistično značilno najvišja koncentracija celokupnega Hb in delež Ht, sledi koncentracija celokupnega Hb in delež Ht pri CVK proizvajalca A, in najnižja koncentracija celokupnega Hb in delež Ht pri CVK proizvajalca B. Statistično značilnih razlik v koncentraciji MP ni bilo.

CVK z enim lumnom, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 500 ml/min, so pri proizvajalcu C, ki so imeli najdaljše katetre (20 cm) povzročali najmanj poškodb eritrocitov, sledijo CVK proizvajalca A (16 cm), največ poškodb pa so povzročali CVK proizvajalca B, ki so imeli najkrajše katetre (15 cm). Vendar pa, bi za natančnejšo opredelitev poškodb eritrocitov potrebovali še podatke za koncentracijo prostega Hb, da bi lahko izračunali stopnjo hemolize, ki pa je pri višjem pretoku nismo imeli.

V naši raziskavi smo opazili, da pri nižjem pretoku (33 ml/min) dolžina CVK z enim in s petimi lumni ni imela vpliva na razlike v poškodbah eritrocitov, saj statistično značilnih razlik v poškodbah eritrocitov ni bilo. Pri višjem pretoku (500 ml/min) so katetri z enim lumnom, proizvajalca C, ki so bili najdaljši, povzročali najmanj poškodb eritrocitov, največ poškodb pa so povzročali katetri proizvajalca B, ki so bili najkrajši. Glede na dolžino bi pričakovali, da najdaljši katetri povzročajo največ poškodb eritrocitov, saj je pri daljših katetrah površina kateri je izpostavljen eritrocitni koncentrat večja, prav tako je nekoliko daljši tudi čas izpostavljenosti umetnim površinam. Ubaldo Vieira Junior in sodelavci (2012) so ugotovili, da so poškodbe eritrocitov odvisne od časa izpostavljenosti, ter da, lahko pri daljšem času izpostavljenosti pričakujemo višjo stopnjo hemolize in posledično več poškodb eritrocitov. Predvidevamo, da ima na razlike v poškodbah prevleka večji vpliv kot dolžina, saj so CVK proizvajalca C, ki so bili najdaljši, vendar so imeli prevleko, povzročali manj poškodb, kot CVK proizvajalca A in B, ki so bili krajši, vendar brez prevleke. Prav tako predvidevamo, da ima vpliv na razlike v poškodbah tudi sama kemijska sestava katetrov, za katero pa nismo imeli podatkov. CVK proizvajalca A so bili 1 cm daljši od CVK proizvajalca B, vendar so CVK proizvajalca A kljub večji dolžini in nekoliko daljšemu času izpostavljenosti povzročali manj poškodb kot CVK proizvajalca B, kar bi lahko pripisali kemijski sestavi. Vendar pa, bi za natančnejše ovrednotenje vpliva dolžine morali imeti na voljo katetre istega proizvajalca z različnimi dolžinami, kar pa v naši raziskavi nismo imeli.

5.3 Vpliv premera lumna

Vpliv premera lumna na poškodbe eritrocitov smo ocenili pri nižjem in višjem pretoku. Pri nižjem pretoku smo analizirali vpliv premera lumna pri katetrah z enim lumnom, proizvajalcev A, B in C, ter pri katetrah s petimi lumni, proizvajalcev A in B. Pri višjem pretoku smo analizirali vpliv premera lumna pri katetrah z enim lumnom, proizvajalcev A, B in C.

Hemoreologija je veda o fizikalnih lastnostih pretoka krvi v cirkulatornem sistemu, ki vključuje strižno hitrost in strižno napetost. V hemoreoloških izračunih se od posameznih lastnosti CVK upošteva samo premer lumna katetra, ostale lastnosti CVK pa ne. Kameneva in Antaki (2007) sta dokazala, da pri nizki strižni hitrosti lahko pride do agregacije eritrocitov, zato je boljše, da je strižna hitrost večja. Prav tako je boljše, da je večja strižna

napetost, saj so nizke strižne napetosti povezane z turbulentnimi tokovi in kardiovaskularnimi zapleti (Papaioannou in Stefanadis, 2005). Kadar je premer lumna manjši sta strižna hitrost in strižna napetost večji, kar pomeni, da je pri manjšem premeru lumna površina katetra manj travmatična (glej enačbo 7 in 8).

Centralni venski katetri z enim lumnom, proizvajalcev A, B in C, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min, niso imeli statistično značilnega vpliva na poškodbe eritrocitov, saj nismo opazili statistično značilnih razlik v hematoloških parametrih in koncentraciji mikropartiklov, s katerimi smo opredelili poškodbe eritrocitov. CVK s petimi lumni, proizvajalcev A in B, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min, prav tako niso imeli statistično značilnega vpliva na poškodbe eritrocitov. Vendar pa hemoreološki parametri nakazujejo, da je površina CVK z enim in s petimi lumni, proizvajalca B, najmanj travmatična, saj sta bili strižna hitrost in strižna napetost pri proizvajalcu B statistično značilno največji..

Pri primerjavi CVK z enim lumnom, proizvajalcev A, B in C, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 500 ml/min, je bila pri proizvajalcu C statistično značilno najvišja koncentracija celokupnega Hb in delež Ht, sledi koncentracija celokupnega Hb in delež Ht pri CVK proizvajalca A, in najnižja koncentracija celokupnega Hb in delež Ht pri CVK proizvajalca B. Statistično značilnih razlik v koncentraciji MP ni bilo.

CVK z enim lumnom, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 500 ml/min, so pri proizvajalcu C, ki so imeli premer lumna 1,7 mm, povzročali najmanj poškodb eritrocitov, sledijo CVK proizvajalca A, ki so imeli premer lumna prav tako 1,7 mm, največ poškodb pa so povzročali CVK proizvajalca B, ki so imeli premer lumna 1,5 mm. Vendar pa hemoreološki parametri nakazujejo, da je površina CVK proizvajalca B najmanj travmatična, saj sta bili strižna hitrost in strižna napetost pri proizvajalcu B statistično značilno največji.

V naši raziskavi smo opazili, da pri nižjem pretoku (33 ml/min) premer lumna CVK z enim in s petimi lumni ni imel vpliva na razlike v poškodbah eritrocitov, saj statistično značilnih razlik v poškodbah eritrocitov ni bilo. Pri višjem pretoku (500 ml/min) so katetri z enim lumnom, proizvajalca C, ki so imeli premer lumna 1,7 mm, povzročali najmanj poškodb eritrocitov, največ poškodb pa so povzročali katetri proizvajalca B, ki so imeli premer lumna 1,5 mm. Glede na premer lumna bi pričakovali, da katetri z večjim premerom lumna povzročajo več poškodb eritrocitov, saj sta pri večjem premeru lumna strižna hitrost in strižna napetost manjši. V našem primeru je bilo pri večjem premeru, ter posledično nižji strižni hitrosti in strižni napetosti, manj poškodb eritrocitov. Rezultati so bili, pri primerjavi CVK skozi katere je bil pretok 500 ml/min, ravno obratni kot so dokazali Kameneva in Antaki (2007) ter Papaioannou in Stefanadis (2005). Predvidevamo, da ima na razlike v poškodbah prevleka večji vpliv kot premer lumna, saj so CVK proizvajalca C, ki so imeli največji premer lumna, vendar so imeli prevleko, povzročali manj poškodb, kot CVK proizvajalca B, ki so imeli najmanjši premer lumna, vendar so bili brez prevleke.

CVK proizvajalca C so povzročali tudi manj poškodb kot CVK proizvajalca A. V tem primeru so imeli CVK proizvajalca A in C enak premer lumnov (1,7 mm), razlika je bila v tem, da so CVK proizvajalca C imeli prevleko, CVK proizvajalca A pa ne. Prav tako predvidevamo, da ima vpliv na razlike v poškodbah tudi sama kemijska sestava katetrov, za katero pa nismo imeli podatkov. CVK proizvajalca A so imeli večji premer lumna kot CVK proizvajalca B, vendar so CVK proizvajalca A kljub večjemu premeru lumna, manjši strižni hitrosti in strižni napetosti povzročali manj poškodb kot CVK proizvajalca B, kar bi lahko pripisali kemijski sestavi. Vendar pa, bi za natančnejše ovrednotenje vpliva premera lumna morali imeti na voljo katetre istega proizvajalca z različnimi premeri lumnov, kar pa v naši raziskavi nismo imeli.

5.4 Vpliv geometrije tunela

Vpliv geometrije tunela smo ocenili s primerjavo distalnega dela CVK s petimi lumni, proizvajalca A in B, ter s primerjavo CVK z enim in s petimi lumni, proizvajalca A in B.

Pri primerjavi distalnega dela CVK s petimi lumni, proizvajalca A in B, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min, smo opazili manjše razlike v stopnji hemolize, in sicer, so imeli CVK proizvajalca B v povprečju nižjo stopnjo hemolize kot CVK proizvajalca A. Vendar pa, stopnja hemolize med CVK proizvajalca A in proizvajalca B ni bila statistično značilno različna ($p=0,07$).

Hemoliza je patološki proces, ki opredeljuje poškodbe eritrocitov in se kaže v sprostitvi Hb v plazmo (Lippi in sod., 2012). Večja kot je stopnja hemolize, večja je koncentracija prostega Hb v plazmi in več je poškodb eritrocitov. Rezultati nakazujejo, da CVK proizvajalca B povzročajo nekoliko manj poškodb, kot CVK proizvajalca A, vendar te razlike v poškodbah eritrocitov niso statistično značilno različne.

CVK proizvajalca A in B imajo različno geometrijo lumna. Pri B je distalni lumen pravilne oblike (okrogel), medtem ko je pri A nepravilne oblike (preglednica 2). Predvidevamo, da je lahko pri CVK proizvajalca A zaradi geometrije lumna prišlo do turbulence in posledično nekoliko povečane stopnje hemolize. Uporaba kardiovaskularnih naprav pogosto povzroča turbulentne tokove. Pretok krvi v človeškem krvožilnem sistemu pa je večinoma laminaren. Kameneva in sodelavci (2004) so dokazali, da turbulentni tokovi prispevajo k povišani stopnji hemolize. Umetne površine morajo biti gladke, hemokompatibilne in brez ostrih robov, da se zmanjša verjetnost pojavljanja turbulentnih tokov (Vercaemst, 2008). Vendar pa, ne moremo trditi, da je geometrija imela vpliv na razlike v poškodbah eritrocitov, saj razlike niso bile statistično značilno različne.

Pri katetrah, proizvajalca A, z enim lumnom, ki je pravilne oblike (okrogel) je bila koncentracija prostega Hb, stopnja hemolize, koncentracija celokupnih in eritrocitnih mikroparticlov statistično značilno višja kot pri katetrah s petimi lumni, katerih distalni del,

ki smo ga testirali ni pravilne oblike. Katetri proizvajalca A s petimi lumni povzročajo manj poškodb eritrocitov kot katetri z enim lumnom. Glede na geometrijo lumna bi pričakovali, da CVK proizvajalca A s petimi lumni povzročajo več poškodb kot CVK z enim lumnom. Predvidevamo, da ima v tem primeru število lumnov večji vpliv na razlike v poškodbah, kot pa geometrija tunela. CVK z enim lumnom, proizvajalca B, imajo enako geometrijo lumna kot distalni del CVK s petimi lumni, proizvajalca B, zato geometrija tudi v tem primeru ni imela vpliva na razlike v poškodbah eritrocitov.

5.5 Vpliv števila lumnov

Vpliv števila lumnov na poškodbe eritrocitov smo ocenili s primerjavo CVK z enim in s petimi lumni, proizvajalca A in B, pri nižjem pretoku (33 ml/min).

Pri katetrah z enim lumnom, proizvajalca A, sta bili koncentracija prostega Hb in stopnja hemolize statistično značilno višji kot pri katetrah s petimi lumni, proizvajalca A. Prav tako sta bili statistično značilno višji koncentraciji celokupnih in eritrocitnih mikropartiklov pri katerih z enim lumnom, proizvajalca A, kot pri katetrah s petimi lumni, proizvajalca A. Mesri in sodelavci (1999) so dokazali, da se število mikropartiklov podvoji v času različnih vnetnih stanjih. Vnetje je del nespecifičnega imunskega odziva, ki se pojavi kot odziv na katerokoli vrsto telesne poškodbe (Ferrero - Miliani in sod., 2007). Lahko rečemo, da katetri proizvajalca A s petimi lumni povzročajo manj poškodb eritrocitov kot katetri proizvajalca A z enim lumnom.

Pri katetrah z enim lumnom, proizvajalca B, sta bili koncentracija prostega Hb in stopnja hemolize prav tako statistično značilno višji kot pri katetrah s petimi lumni, proizvajalca B. Statistično značilnih razlik v koncentraciji mikropartiklov ni bilo. Lahko rečemo, da katetri proizvajalca B s petimi lumni povzročajo manj poškodb eritrocitov kot katetri z enim lumnom.

Pri obeh proizvajalcih so CVK s petimi lumni, v primerjavi s CVK z enim lumnom, povzročali manj poškodb eritrocitov. Distalni lumen, ki smo ga testirali pri katetrah s petimi lumni, obdaja še proksimalni lumen in trije mediani lumni. Premer katetra s petimi lumni (premer vseh petih lumnov skupaj) je približno 5 krat večji kot pri katetrah z enim lumnom. CVK s petimi lumni so bolj stabilni, saj so debelejši in se težje zvijejo kot katetri z enim lumnom. Zaradi tega je pri katetrah s petimi lumni manj mehanskih okluzij (zapor), ki povzročajo poškodbe eritrocitov. Okluzija oziroma zapora katetra je definirana kot delna ali popolna obstrukcija (zamašitev) katetra. Obstrukcija se pri uporabi CVK lahko pojavi znotraj ali zunaj krvožilnega sistema pri človeku. Notranja obstrukcija je lahko posledica nepravilne vstavitve: npr. kateter se lahko prepogne ali pa se konica katetra nasloni na steno žile, namesto da prosto lebdi v žili. Zunanja obstrukcija vključuje zvijanje katetra (Priročnik Central venous catheter care guidelines, 2011).

Število lumnov je vplivalo na razlike v poškodbah eritrocitov. Pri katetrih s petimi lumni je bilo manj poškodb eritrocitov, kot pri katetrih z enim lumnom.

5.6 Vpliv pretoka

Vpliv pretoka na poškodbe eritrocitov smo ocenili s primerjavo CVK z enim lumnom, proizvajalcev A, B in C, skozi katere je stekel eritrocitni koncentrat pri nižjem pretoku (33 ml/min) in višjem pretoku (500 ml/min).

Centralni venski katetri, proizvajalca A in C, so pri nižjem pretoku (33 ml/min) povzročali več poškodb eritrocitov, kot pri višjem pretoku (500 ml/min), saj sta bili koncentracija celokupnega hemoglobina in delež hematokrita pri nižjem pretoku statistično značilno nižji kot pri višjem pretoku. Koncentracija celokupnih in eritrocitnih MP pa je bila pri nižjem pretoku statistično značilno višja, kot pri višjem pretoku.

Med katetri z enim lumnom, proizvajalca B, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min in 500 ml/min smo opazili manjše razlike v koncentraciji eritrocitnih mikropartiklov. In sicer, so imeli CVK proizvajalca B pri nižjem pretoku v povprečju nekoliko višjo koncentracijo eritrocitnih mikropartiklov, kot CVK proizvajalca B pri višjem pretoku. Vendar pa, koncentracija eritrocitnih mikropartiklov ni bila statistično značilno različna ($p=0,19$). Prav tako nismo opazili statistično značilnih razlik v hematoloških parametrih.

Pri vseh treh proizvajalcih katetrov z enim lumnom je bila pri nižjem pretoku tudi statistično značilna nižja strižna hitrost in strižna napetost, ter daljši čas izpostavljenosti.

Ubaldo Vieira Junior in sodelavci (2012) so ugotovili, da so poškodbe eritrocitov odvisne od časa izpostavljenosti. Pri pretokih z nizkim časom izpostavljenosti je pričakovati nižjo stopnjo hemolize. Pri pretokih z daljšim časom izpostavljenosti pa je pričakovati višjo stopnjo hemolize. Tudi mi smo dokazali, da je bil čas izpostavljenosti katetrom, pri proizvajalcih A, B in C, pri višjem pretoku nižji, ter da je bilo tudi poškodb eritrocitov pri proizvajalcu A in C v tem primeru manj. Pri proizvajalcu B statistično značilnih razlik v poškodbah eritrocitov ni bilo, vendar čas izpostavljenosti nakazuje, da je pri višjem pretoku manj poškodb kot pri nižjem pretoku.

Pri visoki strižni hitrosti se eritrociti usmerijo v smer toka (Weesterhof in sod., 2010), med tem ko pri nizki strižni hitrosti lahko pride do agregacije eritrocitov *in vivo* in *in vitro* (Kameneva in Antaki, 2007), zato je bolje, da je strižna hitrost večja (Ubaldo Vieira Junior in sod. 2012). Prav tako je bolje, da je večja strižna napetost, saj so nizke strižne napetosti povezane z turbulentnimi tokovi (Papaioannou in Stefanadis, 2005), ki prispevajo k povišani stopnji hemolize (Kameneva in sod., 2004). O povezavi nizke strižne napetosti in kardiovaskularnimi zapleti so poročali tudi Jeong in Rosenson (2013), ter Carallo in

sodelavci (2005). V našem primeru sta bili strižna hitrost in strižna napetost, pri katetrih proizvajalcev A, B in C, nižji pri nižjem pretoku, zaradi tega je bilo pri nižjem pretoku, pri CVK proizvajalca A in C, tudi več poškodb eritrocitov. Pri proizvajalcu B statistično značilnih razlik v poškodbah eritrocitov ni bilo, vendar strižna hitrost in napetost nakazujeta, da je pri višjem pretoku manj poškodb kot pri nižjem pretoku.

Dokazali smo, da je pretok vplival na strižno hitrost, strižno napetost in čas izpostavljenosti pri proizvajalcih A, B in C. Posledično je pretok vplival tudi na število nastalih mikropartikov in hematološke parametre pri proizvajalcu A in C, oziroma je vplival na razlike v poškodbah eritrocitov. Pri nižjem pretoku sta bili strižna hitrost in strižna napetost statistično značilno nižji, kot pri višjem pretoku, zato je bilo pri slednjih tudi manj poškodb eritrocitov. Zaradi krajšega časa izpostavljenosti pri višjem pretoku je bilo prav tako manj poškodb eritrocitov. Pri proizvajalcu B statistično značilnih razlik v poškodbah eritrocitov ni bilo, vendar rezultati nakazujejo, da je pri višjem pretoku manj poškodb kot pri nižjem pretoku.

6 SKLEPI

- Prevleka pri nižjem pretoku ni imela vpliva na število nastalih mikropartiklov in hematološke parametre. Pri višjem pretoku je imela vpliv na hematološke parametre, na število nastalih mikropartiklov pa ne.
- Dolžina pri nižjem pretoku ni imela vpliva na število nastalih mikropartiklov in hematološke parametre. Predvidevamo, da pri višjem pretoku dolžina katetra prav tako ni imela vpliva na število nastalih mikropartiklov in hematološke parametre, oziroma sta imeli prevleka in kemijska sestava večji vpliv od dolžine.
- Premer lumna pri nižjem pretoku ni imel vpliva na število nastalih mikropartiklov in hematološke parametre. Predvidevamo, da pri višjem pretoku premer lumna prav tako ni imel vpliva na število nastalih mikropartiklov in hematološke parametre, oziroma sta imeli prevleka in kemijska sestava večji vpliv od premera in lumna.
- Geometrija ni imela vpliva na število nastalih mikropartiklov in hematološke parametre.
- Število lumnov je pri CVK proizvajalca A imelo vpliv na število nastalih mikropartiklov in hematološke parametre. Pri CVK proizvajalca B je število lumnov imelo vpliv na hematološke parametre, na število nastalih mikropartiklov pa ne. Predvidevamo, da ima število lumnov večji vpliv na poškodbe eritrocitov kot geometrija tunela.
- Višji pretok, ki poganja eritrocitni koncentrat skozi CVK ni povzročal več poškodb eritrocitov kot nižji pretok. Višji pretok je pri CVK proizvajalcev A in C povzročal manj poškodb eritrocitov kot nižji pretok, pri proizvajalcu B pretok ni imel vpliva.

7 POVZETEK

Uporaba CVK se v sodobni medicini nenehno povečuje, saj omogočajo izboljšanje zdravja pacientov. CVK so različni po velikosti in imajo enega ali več lumnov. Ločimo netunelirane, tunelirane, periferno vstavljene centralne venske katetre in vsajene venske dostopne naprave. Material iz katerega so katetri je večinoma poliuretan in silikon. Lahko so tudi prevlečeni z antimikrobnimi in antiseptični sredstvi, ki zmanjšujejo okužbe. Slaba stran katetrov je, da lahko povzročajo poškodbe krvnih celic, nastanek krvnih strdkov, lahko povečajo stopnjo hemolize in sprostitve Hb v plazmo.

V magistrskem delu smo raziskovali poliuretanske katetre z enim in s petimi lumni, proizvajalcev A, B in C. CVK proizvajalca C so imeli prevleko iz poliheksanid metakrilata, med tem ko so bili CVK proizvajalcev A in B brez prevleke.

Namen našega dela je bil oceniti kako različen pretok (33 ml/min in 500 ml/min), ki poganja eritrocitni koncentrat skozi CVK in različni parametri CVK (material, geometrija, lumen, dolžina in prisotnost prevleke) vplivajo na poškodbe eritrocitov. Poškodbe eritrocitov smo opredelili z analizo mikropartiklov in s hematološko analizo.

Analizo mikropartiklov smo izvedli s pretočnim citometrom, ki je tudi najpogosteje uporabljena metoda. Mikropartikli so heterogena populacija zaprtih veziklov, ki izvirajo iz različnih vrst celic. Vsebujejo del citoplazme starševske celice, iz katere izhajajo, vključno z encimom esterazo. Mikropartikli, ki se sproščajo iz eritrocitov, so običajno identificirani z uporabo antigenov, ki se vežejo na glikoforin A in fosfatidilserin. Za ugotavljanje celičnega izvora mikropartiklov smo uporabili CD235a in Ann V. Monoklonska protitelesa anti-CD235a se vežejo na glikoforin A, ki je protein na membrani eritrocitov. Ann V se veže na fosfatidilserin, ki se izraža na zunanji strani membrane mikropartiklov. Uporabili smo tudi CFSE, ki omogoča ločevanje zaprtih veziklov (mikropartiklov) od celičnega drobirja. CFSE je ne-fluorescentna molekula, ki lahko pasivno difundira preko membrane. Ko je enkrat znotraj mikropartikla se z znotrajcelično esterazo odstranijo acetatne skupine in tako postane CFSE fluorescentna molekula.

Pri interpretaciji rezultatov mikropartiklov smo se osredotočili na njihovo koncentracijo. Koncentracija mikropartiklov se poveča v času različnih vnetnih stanj. Vnetje je del nespecifičnega imunskega odziva, ki se pojavi kot odziv na katerokoli vrsto telesne poškodbe. Večja kot je koncentracija mikropartiklov, več je tudi poškodb krvnih celic.

Pri interpretaciji hematoloških rezultatov pa smo se osredotočili predvsem na stopnjo hemolize in koncentracijo prostega Hb. Hemoliza je patološki proces, ki je ovrednoten z razpadom eritrocitov in se kaže v sprostitvi Hb in drugih znotrajceličnih komponent v krvno plazmo.

Prevleka pri nižjem pretoku ni imela vpliva na število nastalih mikropartiklov in hematološke parametre, oziroma ni imela vpliva na razlike v poškodbah eritrocitov. Pri višjem pretoku pa je prevleka na hematološke parametre imela vpliv, na število nastalih mikropartiklov pa ne. CVK proizvajalca C, ki so imeli prevleko iz poliheksanid metakrilata, so povzročali statistično značilno manj poškodb eritrocitov kot CVK proizvajalca A in B, ki so bili brez prevleke.

Dolžina katetra pri nižjem pretoku ni imela vpliva na število nastalih mikropartiklov in hematološke parametre, oziroma ni imela vpliva na razlike v poškodbah eritrocitov. Predvidevamo, da pri višjem pretoku dolžina katetra prav tako ni imela vpliva na število nastalih mikropartiklov in hematološke parametre, kljub temu, da smo opazili statistično značilne razlike v hematoloških parametrih. Menimo, da sta imeli prevleka in kemijska sestava katetra večji vpliv na razlike v poškodbah eritrocitov kot dolžina katetra.

Premer lumna pri nižjem pretoku ni imel vpliva na število nastalih mikropartiklov in hematološke parametre, oziroma ni imela vpliva na razlike v poškodbah eritrocitov. Predvidevamo, da pri višjem pretoku premer lumna prav tako ni imel vpliva na število nastalih mikropartiklov in hematološke parametre, kljub temu, da smo opazili statistično značilne razlike v hematoloških parametrih. Menimo, da sta imeli prevleka in kemijska sestava katetra tudi v tem primeru večji vpliv na razlike v poškodbah eritrocitov kot premer lumna katetra.

Geometrija tunela ni imela vpliva na število nastalih mikropartiklov in hematološke parametre, oziroma ni imela vpliva na razlike v poškodbah eritrocitov. Predvidevamo tudi, da ima število lumnov večji vpliv na razlike v poškodbah eritrocitov, kot pa geometrija tunela.

Ugotovili smo, da je število lumnov pri CVK proizvajalca A imelo vpliv na število nastalih mikropartiklov in hematološke parametre. Pri CVK proizvajalca B je število lumnov imelo vpliv na hematološke parametre, na število nastalih mikropartiklov pa ne. CVK proizvajalca A in B, ki so imeli pet lumnov so tako povzročali statistično značilno manj poškodb eritrocitov, kot CVK proizvajalca A in B, ki so imeli en lumen.

Ugotovili smo tudi, da je pretok pri CVK proizvajalca A in C imel vpliv na število nastalih mikropartiklov in hematološke parametre. CVK proizvajalca A in C, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 500 ml/min, so povzročali statistično značilno manj poškodb eritrocitov, kot CVK proizvajalca A in C, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min. Pri CVK proizvajalca B pretok ni imel vpliva na število nastalih mikropartiklov in hematološke parametre, oziroma ni imela vpliva na razlike v poškodbah eritrocitov.

8 VIRI

- Abdel Baieth H. E. 2008. Physical parameters of blood as a non-newtonian fluid. *International Journal of Biomedical Science*, 4, 4: 323-329
- Alaarg A., Schiffellers R. M., Van Solinge W. W., Van Wijk R. 2013. Red blood cell vesiculation in hereditary hemolytic anemia. *Frontiers in Physiology*, 4: 365
- Barteneva N. S., Fasler-Kan E., Bernimoulin M., Stern J. N., Ponomarev E. D., Duckett L., Vorobjev I. A. 2013. Circulating microparticles: square the circle. *BMC Cell Biology*, 14: 23
- Baskurt O. K. 2012. Red blood cell mechanical stability. *Engineering*, 5: 8-10
- Bevers E. M., Comfurius P., Dekkers D. W., Zwaal R. F. 1999. Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1439, 3: 317-330
- Billett H. H. 1990. Hemoglobin and hematocrit. V: Clinical methods: the history, physical and laboratory examinations. 3rd ed. Walker H. K., Hall W. D. Hurste J. W. (ur.) Boston, Butterworths: 720-768
- BioLegend. 2015. FITC anti-human CD235a (Glycophorin A) antibody. <http://www.biolegend.com/fitc-anti-human-cd235a-glycophorin-a-antibody-6701.html> (september 2015)
- Carallo C., Lucca L. F., Ciamei M., Tucci S., Serena de Franceschi M. 2005. Wall shear stress is lower in the carotid artery responsible for a unilateral ischemic stroke. *Atherosclerosis*, 185, 1: 108-113
- Central venous catheter care guidelines; A reference document for the care of central venous access devices and midline catheters in adult patients. 2011. Carol Pollard (ur.). Plymouth, Plymouth hospitals: 58 str.
- Central venous catheters in adult patients self learning module. 2011. 7th ed. Hignel P. (ur.). Surrey, Fraser health: 77 str.
- Chauhan A., Bernardin A., Mussard W., Kriegel I., Esteve M., Ghigo J. M., Beloin C., Semetey V. 2014. Preventing biofilm formation and associated occlusion by biomimetic glycocalyxlike polymer in central venous catheters. *The Journal of Infectious Diseases*, 210, 9: 1347-1356
- Cokelet G. R. 2011. Hemorheology and hemodinamics. Mississippi, Morgan & Claypool life sciences: 142 str.

- Colman R. W., Marder V. J., Clowes A. W., George J. N., Goldhaber S. Z. 2006. Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice. 5th ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins: 1827 str.
- Crnich C. J., Maki DG. 2002. The promise of novel technology for the prevention of intravascular device - related bloodstream infection. I. Pathogenesis and short-term devices. *Clinical Infection Diseases*, 34, 9: 1232-1242
- Culverwell E. 2013. Central venous access services: self directed learning & resource book, registered nurses and midwives. Cantenbury. District health board: 93 str.
- Cure search for children's cancer. 2015. Central lines.
<http://curesearch.org/Central-Lines> (september 2015)
- Danielis M. 2014. Risk of hemolysis in blood sampling from peripheral intravenous catheter: a literature review. *Infermieristiche*, 67, 3: 166-172
- De Boer R. J., Ganusov V. V., Milutinović D., Hodkin P. D., Perelson A. S. 2006. Estimating lymphocyte division and death rates from CFSE data. *Society for Mathematical Biology*, 68: 1011-1031
- Dinkla S., Brock R., Joosten I., Bosman G. 2013. Gateway to understanding microparticles: standardized isolation and identification of plasma membrane-derived vesicles. *Nanomedicine*, 8, 10: 1657-1668
- Estridge B., Reynolds A. P., Walter N. J. 2000. Basic medical laboratory techniques. 4th ed. Alabama, Thomson learning: 620 str.
- Fahy B., Sockrider M. 2007. Central venous catheter. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 176: 3-4
- Ferrero - Miliani L., Nielsen O. H., Andersen P. S., Girardin S. E. 2007. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 β generation. *Clinical and Experimental Immunology*, 147, 2: 227-235
- Fosbery R., Gregory J., Stevens I. 2001. *Revised AS biology*. 1st ed. Oxford, Heinemann educational publishers: 96 str.
- Fourcade O., Simon M. F., Viode C., Rugani N., Leballe F., Ragab A., Fournie B., Sarda L., Chap H. 1995. Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells. *Cell*, 24, 80: 919-927
- Frasca D., Dahyot - Fizele C., Mimos O. 2010. Prevention of central venous catheter - related infection in the intensive care unit. *Critical Care*, 14, 2: 212

- Frieke M. A., Van der Geest R. J., Rutten M. C. M., Reiber J. H. C. 2005. The influence of flow, vessel diameter, and non-Newtonian blood viscosity on the wall shear stress in a carotid bifurcation model for unsteady flow. *Investigative Radiology*, 40: 277-294
- Giarratana M. C., Kobari L., Lapillonne H., Chalmers D., Kiger L., Cynober T., Marden M. C., Wajcman H., Douay L. 2005. Ex vivo generation of fully mature human red blood cells from hematopoietic stem cells. *Nature Biotechnology*, 23, 1: 69-74
- Grisendi G., Finetti E., Manganaro D., Cordova N., Montagnani G., Spano C., Prapa M., Guarneri V., Otsuru S., Horwitz E. M., Mari G., Dominici M. 2015. Detection of microparticles from human red blood cells by multiparametric flow cytometry. *Blood Transfusion*, 13, 2: 274-280
- Grunkemeier J. M., Tsai W. B., McFarland C. D., Horbett T. A. 2000. The effect of adsorbed fibrinogen, fibronectin, von Willebrand factor and vitronectin on the procoagulant state of adherent platelets. *Biomaterials*, 21, 22: 2243-2252
- Gyorgy B., Modos K., Pallinger E., Paloczi K., Pasztoi M., Misjak P., Deli M. A., Sipos A., Szalai A., Voszka I., Polgar A., Toth K., Csete M., Nagy G., Gay S., Falus A., Kittel A., Buzas E. I. 2011. Detection and isolation of cell-derived microparticles are compromised by protein complexes resulting from shared biophysical parameters. *Blood Journal*, 117, 4: 39-48
- Hargett L. A., Bauer N. N. 2013. On the origin of microparticles: From "platelet dust" to mediators of intercellular communication. *Pulmonary Circulation*, 3, 2: 329-340
- Hawkins E. D., Hommel M., Turner M. L., Battye F. L., Markham J. F., Hodgkin P. D. 2007. Measuring lymphocyte proliferation, survival and differentiation using CFSE time - series data. *Nature Protocols*, 2, 9: 2057-2067
- Hingorani R., Deng J., Elia J., McIntyre C., Mittar D. 2011. Detection of apoptosis using the BD Annexin V FITC assay on the BD FACSVerser™ system. *BD Biosciences*, doi: 23-13027-00: 12 str.
- Huber J., Vales A., Mitulovic G., Blumer M., Schmid R., Witztum J. L., Binder B. R., Leitinger N. 2002. Oxidized membrane vesicles and blebs from apoptotic cells contain biologically active oxidized phospholipids that induce monocyte - endothelial interactions. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 22, 1: 101-107
- Hugel B., Martínez M. C., Kunzelmann C., Freyssinet J. M. 2005. Membrane microparticles: Two sides of the coin. *Physiology*, 20, 1: 22-27

- Italiano J. E., Mairuhu A. T. A., Flaumenhaft R. 2010. Clinical relevance of microparticles from platelets and megakaryocytes. *Current Opinion in Hematology*, 17, 6: 578-584
- Jeong S. K., Rosenson R. S. 2013. Shear rate specific blood viscosity and shear stress of carotid artery duplex ultrasonography in patients with lacunar infarction. *BioMed Central*, 13: 36
- Kameneva M. V., Burgreen G. W., Kono K., Repko B., Antaki J. F., Umezo M. 2004. Effects of turbulent stresses upon mechanical hemolysis: Experimental and computational analysis. *ASAIO Journal*, 50: 418-423
- Kameneva M. V., Antaki J. F. 2007. Mechanical trauma to blood. V: *Handbook of hemorheology and hemodynamics*. Baskurt O. K., Hardeman M. R., Rampling M. W., Meiselman H. J. (ur.). Amsterdam, IOS press: 206-227
- Kent M. W., Kelher M. R., West F. B., Silliman C. C. 2014. The pro-inflammatory potential of microparticles in red blood cell units. *Transfusion Medicine*, 24, 3: 176-181
- Kirby D. F., Corrigan M. L. 2013. Principles of nutrition support. Cleveland Clinic. <http://www.clevelandclinicmeded.com/medicalpubs/diseasemanagement/gastroenterology/principles-of-nutrition-support/> (september 2015)
- Kotnik V., Čurin Šerbec V., Hartman Pretnar K., Ihna A., Jeras M., Kopitar A. N., Malovrh T., Simčič S., Stopinšek S., Skvarč M., Vidan Jeras B., Wraber B. 2010. *Imunološki priročnik*. Ljubljana, Itagraf grafično podjetje d.o.o: 194 str.
- Kriebardis A., Antonelou M., Stamoulis K., Papassideri I. 2012. Cell-derived microparticles in stored blood products: innocent-bystanders or effective mediators of post-transfusion reactions? *Blood Transfusion*, 10, 2: 25-38
- Krikava I., Kolar M., Garajova B., Balik T., Sevcikova A., Pahl J., Sevcik P., Trubac R. 2011. Polyhexanide anti-infective coating of central venous catheters in prevention of catheter colonization and bloodstream infection: Study HC-G-H-0507. *Critical Care*, 15, 1: 229
- Kumar S. 2007. Caspase function in programmed cell death. *Cell Death and Differentiation*, 14, 32-43
- Lyons A. B., Blake S. J., Doherty K. V. 2013. Flow cytometric analysis of cell division by dilution of CFSE and related dyes. *Current Protocols in Cytometry*, 9, 9: 11
- Lippi G., Cervellin G., Favaloro E. J., Plebani M. 2012. In vitro and in vivo hemolysis; An unresolved dispute in laboratory medicine. Germany, De Gruyter: 110 str.

- Lippi G., Cervellin G., Mattiuzzi C. 2013. Critical review and meta-analysis of spurious hemolysis in blood samples collected from intravenous catheters. *Biochemia Medica*, 23, 2: 193-200
- Lymphoma association. 2015. About lymphoma: chemotherapy for lymphoma.
<http://www.lymphomas.org.uk/about-lymphoma/treatment/chemotherapy-lymphoma> (september 2015)
- M Health. 2015. Central venous catheters.
<http://www.uofmchildrenshospital.org/healthlibrary/Article/85527> (september 2015)
- Mause S. F., Weber C. 2010. Microparticles: Protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circulation Research*, 107: 1047-1057
- May R. M., Magin C. M., Mann E. E., Drinker M. C., Fraser J. C., Siedlecki C. A., Brennan A. B., Reddy S. T. 2015. An engineered micropattern to reduce bacterial colonization, platelet adhesion and fibrin sheath formation for improved biocompatibility of central venous catheters. *Clinical and Translation Medicine*, 4: 9
- McIlwain D. R., Berger T., Mak T. W. 2015. Caspase function in cell death and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7: 4
- Merriam – Webster. 2016. Medical dictionary.
<http://www.merriam-webster.com/medical/hemorheology> (januar 2016)
- Mesri M., Altieri D. C. 1999. Leukocyte microparticles stimulate endothelial cell cytokine release and tissue factor induction in a JNK1 signaling pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 33: 23111-23118
- Morel O., Toti F., Hugel B., Bakouboula B., Camoin-Jau L., Dignat-George F., Freyssinet J. M. 2006. Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation? *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 26, 12: 2594-604
- Morel O., Jesel L., Freyssinet J. M., Toti F. 2011. Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 31: 15-26
- Nygren H., Tengvall P., Lundström I. 1997. The initial reactions of TiO₂ with blood. *Journal of Biomedical Materials Research*, 34, 4: 487-492

- Nevaril C. G., Hellums J. D., Alfrey C. P., Lynch E. C. 2004. Physical effects in red blood cell trauma. *AICHe Journal*: 15, 5: 707-711
- Orozco A. F., Lewis D. E. 2010. Flow cytometric analysis of circulating micro-particles in plasma. *Cytometry*, 77, 6: 502-514
- Quah B. J. C., Parish C. R. 2010. The use of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) to monitor lymphocyte proliferation. *Department of Immunology*, 12, 44: 2259
- Papaoannou T. G., Stefanadis C. 2005. Vascular wall shear stress: Basic principles and methods. *The Hellenic Journal of Cardiology*, 46: 9-15
- Paul R., Apel J., Klaus S., Schugner F., Schwindke P., Reul H. 2003. Shear stress related blood damage in laminar couette flow. *Artificial Organs*, 27, 6: 517-529
- Preventing central line – associated bloodstream infections: A global challenge, a global perspective. 2012. Meek Schuldt L. (ur.). Washington, The joint Commision: 152 str.
- Ratner B. D., Hoffman A. S., Schoen F. J., Lemons J. E. 1996. *Biomaterial science: An introduction to materials in medicine*. 2nd ed. Oxford, Elsevier: 484 str.
- Rubenstein D. A., Yin W., Frame M. D. 2015. *Biofluid mechanics: an introduction to fluid mechanics, macrocirculation and microcirculation*. 2nd ed. London, Elsevier: 544 str.
- Rubin O., Canellini G., Delobel J., Lion N., Tissot J. D. 2012. Red blood cell microparticles: clinical relevance. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 39, 5: 342-347
- Slee J. B., Christian A. J., Levy R. J., Stachelek S. J. 2014. Addressing the inflammatory response to clinically relevant polymers by manipulating the host response using ITIM domain-containing receptors. *Polymers*, 6, 10: 2526-2551
- Taylor D. D., Gercel-Taylor C. 2013. The origin, function, and diagnostic potential of RNA within extracellular vesicles present in human biological fluids. *Frontiers in Genetics*, 30, 4: 142
- Tengvall P., Lundstrom I., Liedberg B. 1998. Protein adsorption studies on model organic surfaces: an ellipsometric and infrared spectroscopic approach. *Biomaterials*, 19, (4-5): 407-422

- Tran H. S., Puc M. M., Chrzanowski F. A., Hewitt C. W., Soll D. B., Singh B., Kumar N., Marra S., Simonetti V., Celley J., DelRossi A. J. 2010. Surface modification of mechanical heart valves. V: Biomaterials engineering and devicec. Wise D. L., Trantolo D. J., Lewandrowski K., Gresser J. D., Cattaneo M. V., Yaszemski M. J. (ur.). New York, Springer Science: 137-145
- Tsai W. B., Grunkemeier J. M., Horbett T. A. 1999. Human plasma fibrinogen adsorption and platelet adhesion to polystyrene. *Journal of Biomedical Materials Research*, 44, 2: 130-139
- Tsai W. B., Grunkemeier J. M., McFarland C. D., Horbett T. A. 2002. Platelet adhesion to polystyrene-based surfaces preadsorbed with plasmas selectively depleted in fibrinogen, fibronectin, vitronectin, or von Willebrand's factor. *Journal of Biomedical Materials Research*, 60, 3: 348-359
- Ubaldo Vieira Junior F., Antunes N., Vieira R. W., Paulo Alvares L. M., Tavares Costa E. 2012. Hemolysis in extracorporeal circulation: relationship between time and procedures. *Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery*, 27: 4
- Van der Pol E., Boing A., Harrison P., Sturk A., Nieuwlans R. 2012. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacological Reviews*, 64, 3: 676-705
- VanWijk M. J., VanBavel E., Sturk A., Nieuwland R. 2003. Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovascular Research*, 59, 2: 277-287
- Vercaemst L. 2008. Hemolysis in cardiac surgery patients undergoing cardiopulmonary bypass: a review in search of a treatment algorithm. *The Journal of Extra Corporeal Technology*, 40: 257-267
- Vogler E. A., Siedlecki C. A. 2009. Contact activation of blood-plasma coagulation. *Biomaterials*, 30, 10: 1857-1869
- Weerheim A. M., Kolb A. M., Sturk A., Nieuwland R. 2002. Phospholipid composition of cell-derived microparticles determined by one-dimensional high-performance thin-layer chromatography. *Analytical Biochemistry*, 302, 2: 191-198
- Westerhof N., Stergiopoulos N., Noble M. I. M. 2010. Snapshots of hemodynamics: an aid for clinical research and graduate education. 2nd ed. New York, Springer science: 271 str.
- Wilson C. J., Clegg R. E., Leavesley D. I., Percy M. J. 2005. Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: a review. *Tissue Engineering*, 11, (1-2): 1-18

Fideršek T. Vpliv različnih vrst centralnih venskih katetrov na poškodbe krvnih celic.

Mag. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij strukturne in funkcionalne biologije, 2016

Winfield C. C., Kanji T. M. 2008. Restoring patency to central venous access devices. *Clinical Journal of Oncology Nursing*, 12, 6: 925-934

Yayapour N., Nygren H. 1999. Interactions between whole blood and hydrophilic or hydrophobic glass surfaces: kinetics of cell adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 15, 2: 127-138

Youtube. 2015. R4 biomimetic coated Zeus CT PICC.

<https://www.youtube.com/watch?v=84Z4Lu7CfIQ> (september 2015)

ZAHVALA

Zahvaljujem se svojemu mentorju prof. dr. Alojzu Ihanu, ki mi je omogočil opravljanje raziskave na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo.

Zahvaljujem se somentorici doc. dr. Andreji Nataši Kopitar za pomoč in usmerjanje pri opravljanju raziskave, ter številne nasvete pri pisanju magistrskega dela.

Zahvaljujem se tudi recenzentu prof. dr. Roku Kostanjšku za hiter in natančen pregled magistrskega dela ter koristne nasvete.

Posebna zahvala pa gre moji družini za finančno in moralno podporo tekom študija.

PRILOGE

Priloga A 1

Preglednica A 1: P vrednosti statistične analize CVK z enim lumnom, proizvajalcev A, B in C, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min

	A - B	A - C	B - C
	p vrednost	p vrednost	p vrednost
Celokupni Hb	0,38	0,09	0,58
Prosti Hb	0,45	0,45	1,00
Hematokrit	0,41	0,07	0,49
Hemoliza	0,73	0,65	0,87
Mikropartikli	0,98	0,83	0,83
Eritrocitni MP	0,85	0,55	0,76

Priloga A 2

Preglednica A 2: P vrednosti statistične analize CVK s petimi lumni, proizvajalcev A in B, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min

	A - B
	p vrednost
Celokupni Hb	0,35
Prosti Hb	0,27
Hematokrit	0,65
Hemoliza	0,07
Mikropartikli	0,69
Eritrocitni MP	0,91

Priloga A 3

Preglednica A 3: P vrednosti statistične analize CVK z enim lumnom in s petimi lumni, istega proizvajalca, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min

	A1 - A5	B1 - B5
	p vrednost	p vrednost
Celokupni Hb	0,73	1
Prosti Hb	0,00006	0,00036
Hematokrit	0,31	0,75
Hemoliza	0,00007	0,00003
Mikropartikli	0,015	0,22
Eritrocitni MP	0,014	0,18

Priloga A 4

Preglednica A 4: P vrednosti statistične analize CVK z enim lumnom, proizvajalcev A, B in C, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 500 ml/min

	A - B	A - C	B - C
	p vrednost	p vrednost	p vrednost
Celokupni Hb	0,00007	0,0012	0,0000003
Hematokrit	0,00053	0,0002	0,0000006
Mikropartikli	0,11	0,87	0,053
Eritrocitni MP	0,13	0,97	0,11

Priloga A 5

Preglednica A 5: P vrednosti statistične analize CVK z enim lumnom, skozi katere je bil pretok eritrocitnega koncentrata 33 ml/min in 500 ml/min, istega proizvajalca

	A↓ - A↑	B↓ - B↑	C↓ - C↑
	p vrednost	p vrednost	p vrednost
Celokupni Hb	$3,5 \cdot 10^{-11}$	0,79	0,00002
Hematokrit	$2,3 \cdot 10^{-11}$	0,58	0,0000005
Mikropartikli	0,0110	0,42	0,0073
Eritrocitni MP	0,0049	0,19	0,0058