

# Ερευνητικό πρωτόκολλο

## Τμήμα 1: Ταυτότητα

<b>1.1 Τίτλος</b>
<b>1.1.1 Τίτλος</b> <i>Να συνάδει με το κύριο ερευνητικό ερώτημα. Αποφυγή συντομογραφιών και περιττών σημείων στίξης. Μέγιστος αριθμός λέξεων: 35</i>
Ο ρόλος των λιποκινών που εκκρίνονται από τον υποδόριο και σπλαχνικό κοιλιακό λιπώδη ιστό παχύσαρκων ατόμων στην καρδιακή λειτουργία και στις καρδιακές μετεγχειρητικές επιπλοκές μετά από ενδοκοιλιακό χειρουργείο
<b>1.1.2 Τίτλος (στα αγγλικά)</b> <i>Να συνάδει με το κύριο ερευνητικό ερώτημα. Αποφυγή συντομογραφιών και περιττών σημείων στίξης. Μέγιστος αριθμός λέξεων: 35</i>
The role of adipokines that are secreted from the subcutaneous and visceral abdominal adipose tissue of obese individuals in the cardiac function and in the cardiac postoperative complications after abdominal surgery

## Τμήμα 2: Περίληψη

### 2.1 Περίληψη

*Τμήματα: Επιστημονική βάση, Σκοπός, Είδος μελέτης, Υλικό, Πρωτόκολλο, Παρέμβαση (εφόσον προβλέπεται), Αποτελέσματα έκβασης, Μέγεθος δείγματος.  
Μέγιστος αριθμός λέξεων: 500*

**Επιστημονική βάση:** Έχει βρεθεί ότι τα παχύσαρκα άτομα έχουν αυξημένη πιθανότητα να υποστούν καρδιακές μετεγχειρητικές επιπλοκές μετά από μη καρδιακό χειρουργείο. Εκτός αυτού, η συγκέντρωση λιποκινών στον ορό έχει συσχετιστεί με καρδιακή δυσλειτουργία.

**Σκοπός:** Διερεύνηση του ρόλου των λιποκινών που εκκρίνονται από τον υποδόριο και σπλαχνικό κοιλιακό λιπώδη ιστό παχύσαρκων ατόμων στην καρδιακή λειτουργία και στις καρδιακές μετεγχειρητικές επιπλοκές μετά από ενδοκοιλιακό χειρουργείο

**Είδος μελέτης:** Προοπτική μελέτη

**Υλικό:** Παχύσαρκα άτομα που υποβάλλονται σε ενδοκοιλιακό χειρουργείο

**Πρωτόκολλο:** Διενέργεια ηλεκτροκαρδιογραφήματος και διαθωρακικού υπερηχοκαρδιογραφήματος εντός της προηγούμενης εβδομάδας πριν την εγχείρηση. Λήψη δειγμάτων ορού αίματος την προηγούμενη ημέρα πριν το χειρουργείο. Λήψη δειγμάτων υποδόριου και σπλαχνικού κοιλιακού λιπώδους ιστού κατά τη διάρκεια του χειρουργείου. Λήψη δειγμάτων ορού αίματος την πρώτη μετεγχειρητική ημέρα για δείκτες καρδιακής βλάβης-καρδιακής ανεπάρκειας. Διενέργεια ηλεκτροκαρδιογραφήματος την ημέρα του εξιτηρίου. Παρακολούθηση των ασθενών για χρονικό διάστημα 30 ημερών μετά το χειρουργείο όσον αφορά την εμφάνιση καρδιακών συμπτωμάτων.

**Αποτελέσματα έκβασης:** Συγκρίσεις των λιποκινών αντιγονεκτίνη, ομεντίνη-1, λεπτίνη, ρεισιστίνη και retinol binding protein 4 (RBP4) (συγκέντρωση στον ορό, έκφραση σε υποδόριο και σπλαχνικό κοιλιακό λιπώδη ιστό, επίπεδα πρωτεϊνών σε υποδόριο και σπλαχνικό κοιλιακό λιπώδη ιστό) μεταξύ των ατόμων που είχαν μετεγχειρητικά καρδιακά συμβάματα και αυτών που δεν είχαν μετεγχειρητικά καρδιακά συμβάματα. Επίσης, συσχετίσεις των λιποκινών (συγκέντρωση στον ορό, έκφραση σε υποδόριο και σπλαχνικό κοιλιακό λιπώδη ιστό, επίπεδα πρωτεϊνών σε υποδόριο και σπλαχνικό κοιλιακό λιπώδη ιστό) με τον αριθμό των μετεγχειρητικών καρδιακών συμβαμάτων και με τους δείκτες συστολικής και διαστολικής λειτουργίας της αριστερής και δεξιάς κοιλιάς.

**Μέγεθος δείγματος:** 200

### 2.2 Περίληψη (στα αγγλικά)

*Τμήματα: Background, Aim, Study type, Materials, Protocol, Intervention (if applicable), Outcomes, Sample size.  
Μέγιστος αριθμός λέξεων: 500*

**Background:** Obese individuals have been found to be more likely to experience cardiac postoperative complications after non-cardiac surgery. Moreover, serum levels of adipokines have been correlated with cardiac dysfunction.

**Aim:** Investigation of the role of adipokines that are secreted from subcutaneous and visceral abdominal adipose tissue of obese individuals in the cardiac postoperative complications after abdominal surgery.

**Study type:** Prospective study

**Materials:** Obese individuals subjected to abdominal surgery

**Protocol:** Electrocardiogram and echocardiogram with the previous week before the surgery. Tissue sampling of subcutaneous and visceral abdominal adipose tissue during surgery. Blood sampling for markers of cardiac injury/heart failure the first day after surgery. Electrocardiogram the day of hospital discharge. Follow up of the patients for 30 days after surgery for the development of cardiac symptoms.

**Outcomes:** Comparisons of the adipokines: adiponectin, omentin-1, leptin, resistin and retinol binding protein 4 (RBP4) (serum levels, expression in subcutaneous and visceral abdominal adipose tissue, protein production of adipokines in subcutaneous and visceral abdominal adipose tissue) between the individuals with cardiac postoperative complications and those without cardiac postoperative complications. Furthermore, correlations of adipokines (serum levels, expression in subcutaneous and visceral abdominal adipose tissue, protein production of adipokines in subcutaneous and visceral abdominal adipose tissue) with the number of cardiac postoperative events and with markers of systolic and diastolic dysfunction of left and right ventricle.

**Sample size:** 200

## Τμήμα 3: Ερευνητική υπόθεση και επιστημονική βάση

### 3.1 Υπόθεση (-εις) που πρόκειται να ελεγχθεί (-ουν)

Σαφής διατύπωση της ερευνητικής υπόθεσης, που η διατριβή καλείται να απαντήσει [κατά προτίμηση με την μορφή μηδενικής ( $H_0$ ) και εναλλακτικής ( $H_1$ ) υπόθεσης]. Αρίθμηση των πρωτευόντων και δευτερευόντων ερευνητικών υποθέσεων. Η διατύπωση θα πρέπει να είναι τέτοια ώστε, τελικά η υπόθεση να μπορεί να απαντηθεί ότι «γίνεται αποδεκτή» ή «απορρίπτεται».

- 1) Υποθέτουμε ότι υφίσταται συσχέτιση των λιποκινών (συγκέντρωση στον ορό, έκφραση σε υποδόριο και σπλαχνικό κοιλιακό λιπώδη ιστό, επίπεδα πρωτεϊνών σε υποδόριο και σπλαχνικό κοιλιακό λιπώδη ιστό) με τους δείκτες συστολικής και διαστολικής λειτουργίας της αριστερής και δεξιάς κοιλίας.
- 2) Υποθέτουμε ότι υπάρχει διαφορά των λιποκινών (συγκέντρωση στον ορό, έκφραση σε υποδόριο και σπλαχνικό κοιλιακό λιπώδη ιστό, επίπεδα πρωτεϊνών σε υποδόριο και σπλαχνικό κοιλιακό λιπώδη ιστό) μεταξύ των ατόμων που θα έχουν μετεγχειρητικά καρδιακά συμβάματα και αυτών που δεν είχαν μετεγχειρητικά καρδιακά συμβάματα.

Υποθέτουμε ότι υφίσταται συσχέτιση των λιποκινών (συγκέντρωση στον ορό, έκφραση σε υποδόριο και σπλαχνικό κοιλιακό λιπώδη ιστό, επίπεδα πρωτεϊνών σε υποδόριο και σπλαχνικό κοιλιακό λιπώδη ιστό) με τον αριθμό των μετεγχειρητικών καρδιακών συμβαμάτων.

### 3.2 Επιστημονική βάση της προτεινόμενης διατριβής

#### 3.2.1 Ανάλυση εννοιών που αφορούν στην υπόθεση που πρόκειται να ελεγχθεί

Η περιγραφή πρέπει να γίνεται σε τόση έκταση, ώστε να είναι κατανοητή από επιστήμονες και ερευνητές που γνωρίζουν το επιστημονικό πεδίο, αλλά δεν θεωρείται απαραίτητο ότι έχουν εμβαθύνει στο ιδιαίτερο αντικείμενο του προτεινόμενου ερευνητικού έργου.

Να αναφέρεται το τι είναι ήδη γνωστό («state of the art» γνώση με την αντίστοιχη βιβλιογραφική τεκμηρίωση);  
Εύρος αριθμού λέξεων: **500 – 1000**

Έχει βρεθεί ότι τα παχύσαρκα άτομα έχουν αυξημένη πιθανότητα να υποστούν καρδιακές μετεγχειρητικές επιπλοκές μετά από μη καρδιακό χειρουργείο [1]. Επίσης, τα επίπεδα λιποκινών στον ορό παχύσαρκων ατόμων έχουν συσχετιστεί με διαστολική δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας και με την ύπαρξη καρδιακής ανεπάρκειας με διατηρημένο κλάσμα εξώθησης [2]. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα αντιγονεκτίνης, ομεντίνης-1, ρεζιστίνης, λεπτίνης και retinol binding protein 4 (RBP4) στον ορό παχύσαρκων ατόμων έχουν συσχετιστεί με διαστολική δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας και με την ύπαρξη καρδιακής ανεπάρκειας [3-6].

#### 3.2.2 Αναγκαιότητα εκπόνησης - Πρωτοτυπία

Γιατί είναι απαραίτητη η εκπόνηση του πρωτοκόλου; Ποια είναι η πρωτοτυπία του; Ποιο κενό γνώσης επιχειρεί να καλύψει; Είναι η πρώτη μελέτη που γίνεται σε αυτό το θέμα; Αν όχι, πώς σχεδιάζουν οι ερευνητές να διαφοροποιήσουν το σχεδιασμό ή/και τη μεθοδολογία της από αυτών των προϋπαρχουσών μελετών;

Εύρος αριθμού λέξεων: **100 – 250**

Δεν έχει μελετηθεί μέχρι τώρα αν η έκφραση και η παραγωγή των λιποκινών στον σπλαχνικό κοιλιακό λιπώδη ιστό σχετίζονται με την καρδιακή δυσλειτουργία των παχύσαρκων ατόμων. Επίσης, δεν έχει μελετηθεί αν τα μετεγχειρητικά καρδιακά συμβάματα σχετίζονται με τη συγκέντρωση λιποκινών στον ορό, όπως επίσης με την έκφραση των λιποκινών και τα επίπεδα πρωτεϊνών των λιποκινών στον υποδόριο και σπλαχνικό κοιλιακό λιπώδη ιστό.

#### 3.2.3 Σπουδαιότητα

Ποια είναι η σημασία της απόρριψης ή της αποδοχής της ερευνητικής υπόθεσης (βιβλιογραφική τεκμηρίωση, εάν απαιτείται); Πώς η αποκτούμενη γνώση από την ολοκλήρωση της διατριβής προωθεί την υπάρχουσα γνώση, αλλά και τη μελλοντική έρευνα στο συγκεκριμένο χώρο;

Εύρος αριθμού λέξεων: **100 - 250**

Η σημασία της απάντησης των συγκεκριμένων ερευνητικών ερωτημάτων έγκειται αφενός στην αποκάλυψη των συγκεκριμένων λιποκινών που πιθανώς είναι υπεύθυνες για τον αυξημένο μετεγχειρητικό καρδιακό κίνδυνο των παχύσαρκων ατόμων, αφετέρου στη διερεύνηση ποιες

λιποκίνες που εκκρίνονται από τον κοιλιακό λιπώδη ιστό έχουν ευεργετική επιδράσεις ή αρνητικές επιπτώσεις στην καρδιακή λειτουργία κατά τη διάρκεια μιας κατάστασης καρδιακού στρες όπου δοκιμάζονται τα όρια της καρδιακής λειτουργίας, δηλαδή εν προκειμένω του μετεγχειρητικού καρδιακού στρες. Έτσι, θα διευκρινισθεί για ποιες λιποκίνες των οποίων η συγκέντρωση στον ορό έχει συσχετισθεί μέχρι σήμερα με την καρδιακή δυσλειτουργία, η έκφραση και παραγωγή τους από τον κοιλιακό λιπώδη ιστό σχετίζονται αφενός με την καρδιακή δυσλειτουργία της παχυσαρκίας, αφετέρου με τα καρδιακά συμβάματα. Επιπλέον, η απάντηση των ανωτέρω ερευνητικών ερωτημάτων θα επιτρέψει την μελλοντική εξαγωγή μεθόδων για την προεγχειρητική ανίχνευση παχύσαρκων ατόμων με αυξημένη πιθανότητα μετεγχειρητικών επιπλοκών και εκτός αυτού τη μελλοντική δημιουργία φαρμάκων που θα επάγουν τη δράση λιποκινών με θετική καρδιακή επίδραση ή θα αναστέλλουν τη δράση λιποκινών με αρνητική καρδιακή επίδραση.

## Τμήμα 4: Μεθοδολογία

<p><b>4.1 Είδος μελέτης</b> (π.χ. παρατήρησης, παρέμβασης, ασθενών-μαρτύρων). Βλέπε: <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2689572/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2689572/</a>. Μπορεί να απαιτείται διαφορετικό είδος μελέτης για κάθε ερευνητικό ερώτημα. Εφόσον απαιτείται, να γίνεται αντιστοίχιση των ερευνητικών υποθέσεων με τα είδη μελετών που θα εφαρμοσθούν ώστε να τις διερευνήσουν.</p>
<p>Πρόκειται για προοπτική μελέτη</p>
<p><b>4.2 Κριτήρια επιλογής του προς μελέτη πληθυσμού</b> Ορισμός των ομάδων μελέτης (π.χ. ασθενών, ελέγχου). Αναλυτικά και ακριβή κριτήρια εισαγωγής και αποκλεισμού για κάθε μία από τις ομάδες μελέτης. Αντίστοιχη παράθεση των κριτηρίων εισαγωγής, εάν πρόκειται για μελέτες πειραματοζώων, κυτταρικών σειρών ή μετα-έρευνας.</p> <p>Θα μελετηθούν 200 παχύσαρκα άτομα (δείκτης μάζας σώματος <math>\geq 30 \text{ kg/m}^2</math>), τα οποία θα υποβληθούν σε ενδοκοιλιακό χειρουργείο. Κριτήρια αποκλεισμού είναι:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ηλικία &lt; 18 έτη</li> <li>• GFR &lt; 60 mL/min/1.73 m<sup>2</sup></li> <li>• Ηπατική νόσος</li> <li>• Ενεργός νεοπλασία</li> <li>• Μη θεραπευμένος υποθυρεοειδισμός ή υπερθυρεοειδισμός</li> <li>• Συστηματικά αυτοάνοσα νοσήματα</li> <li>• Λοίμωξη</li> <li>• Μεταβολή του σωματικού βάρους άνω του 5% του αρχικού βάρους τους τελευταίους 3 μήνες</li> <li>• Οξεία αφυδάτωση</li> <li>• Λήψη των ακόλουθων φαρμάκων τις 3 προηγούμενες εβδομάδες: ορμόνες, φάρμακα για απώλεια βάρους</li> <li>• Ενδοκοιλιακή φλεγμονή</li> <li>• Οξεία κοιλία</li> </ul>
<p><b>4.3 Ερευνητικό πρωτόκολλο (διάγραμμα ροής)</b> Συνοπτική περιγραφή των σταδίων διεξαγωγής του ερευνητικού σκέλους της μελέτης. Πέραν της περιγραφής, είναι επιθυμητή η συνοπτική παρουσίαση του ερευνητικού πρωτοκόλλου με ένα διάγραμμα.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>1-7 ημέρες πριν την εγχείρηση:</b> Διενέργεια ηλεκτροκαρδιογραφήματος και διαθωρακικού υπερηχοκαρδιογραφήματος.</li> <li>• <b>Προηγούμενη ημέρα της εγχείρησης:</b> Λήψη δειγμάτων ορού αίματος για λιποκίνες και αποθήκευσή τους.</li> <li>• <b>Ημέρα της εγχείρησης:</b> Λήψη δειγμάτων υποδόριου και σπλαχνικού κοιλιακού λιπώδους ιστού και αποθήκευσή τους.</li> <li>• <b>Πρώτη μετεγχειρητική ημέρα:</b> Λήψη δειγμάτων ορού αίματος για δείκτες καρδιακής βλάβης-νέκρωσης.</li> <li>• <b>Ημέρα του εξιτηρίου:</b> Διενέργεια ηλεκτροκαρδιογραφήματος.</li> </ul> <p><b>1-30 ημέρες μετά την εγχείρηση:</b> Παρακολούθηση των ασθενών για την εμφάνιση καρδιακών συμπτωμάτων.</p>
<p><b>4.4 Περιγραφή της παρέμβασης</b> (Εφαρμόζεται μόνο σε μελέτες παρέμβασης). Σαφής περιγραφή της φύσης της παρέμβασης και των χαρακτηριστικών της [π.χ. τυφλοποίηση, τυχαιοποίηση, intention-to-treat ή/και per protocol ανάλυση, ομάδες ελέγχου (control)].</p>

#### 4.5 Περιγραφή των μετρούμενων μεταβλητών

Παράθεση των μεταβλητών που θα καταγραφούν σύμφωνα με το ερευνητικό πρωτόκολλο. Είναι επιθυμητή η επισύναψη της φόρμας καταγραφής δεδομένων (data entry form).

##### Εξετάσεις σε δείγματα αίματος

Την προηγούμενη ημέρα της εγχείρησης θα ληφθούν από φλεβικό αίμα μετά από 12ωρη νηστεία: πλήρης αιματολογικός και βιοχημικός έλεγχος και δείγματα ορού και πλάσματος. Ο βιοχημικός έλεγχος θα περιλαμβάνει τις ακόλουθες παραμέτρους: γλυκόζη, γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη (HbA1c), ουρία, κρεατινίνη, ουρικό οξύ, ολική χοληστερόλη ορού, τριγλυκερίδια ορού, υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη ορού, νάτριο, κάλιο, ασβέστιο, μαγνήσιο, γλουταμινική πυροσταφυλική τρανσαμινάση ορού (SGPT), γλουταμινική οξαλοξική τρανσαμινάση ορού (SGOT), αλκαλική φωσφατάση (ALP), γ-γλουταμυλ-τρανσπεπτιδάση (γ-GT), ολική χολερυθρίνη, άμεση χολερυθρίνη, ολικές πρωτεΐνες ορού, αλβουμίνη ορού, κινάση της κρεατίνης (CPK), γαλακτική δεϋδρογονάση (LDH), θυρεοειδοτρόπος ορμόνη (TSH), απολιποπρωτεΐνες B100 (ApoB100), A-I (ApoA-I), E (ApoE) και λιποπρωτεΐνη (a) [Lp(a)]. Τα δείγματα ορού θα αποθηκευθούν στους -80 °C. Τα δείγματα αυτά θα χρησιμοποιηθούν για τη μελλοντική μέτρηση με ανοσοενζυμική μέθοδο [enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)] των εξής λιποκινών: αντιπονεκτίνη, λεπτίνης, ρεσιστίνης, RBP4. Εκτός αυτού, θα πραγματοποιηθεί ηλεκτροφόρηση λιποπρωτεϊνών με Liporprint για τη μέτρηση των υποκλασμάτων της LDL.

Την πρώτη μετεγχειρητική ημέρα θα ληφθούν δείγματα φλεβικού αίματος για μέτρηση της συγκέντρωσης στον ορό της τροπονίνης και NT-proBNP.

##### Υπερηχοκαρδιογραφική μελέτη

Μέσα στην εβδομάδα που προηγείται του χειρουργείου θα διενεργηθεί διαθωρακικό υπερηχογράφημα προκειμένου να μετρηθούν τα εξής:

- Πάχος τοιχωμάτων αριστερής και δεξιάς κοιλίας [κανονικοποίηση ως προς επιφάνεια σώματος (BSA)]
- Τελοδιαστολικές διαστάσεις και όγκοι αριστερής και δεξιάς κοιλίας (κανονικοποίηση ως προς BSA)
- Τελοσυστολικές διαστάσεις και όγκοι αριστερού και δεξιού κόλπου (κανονικοποίηση ως προς BSA)
- Πάχος επικαρδιακού λιπώδους ιστού
- Κλάσμα εξώθησης αριστερής κοιλίας (μέθοδος Simpson)
- Χρόνος επιτάχυνσης στο φάκελο της ταχύτητας της πνευμονικής αρτηρίας (PVAcT)
- Μέτρηση ταχυτήτων E και A με παλμικό Doppler στη μιτροειδή και τριγλώχινα βαλβίδα. Μέτρηση χρόνου από τη σύγκλειση μέχρι τη διάνοιξη της κολποκοιλιακής βαλβίδας (COT) με παλμικό Doppler και του χρόνου εξώθησης της αντίστοιχης μηνοειδούς βαλβίδας (ET) με συνεχές Doppler για τον υπολογισμό του myocardial performance index = COT/ET.
- Μέτρηση ταχυτήτων Ea, Aa και Sa με ιστικό Doppler στο διαφραγματικό τμήμα και στο πλάγιο τοίχωμα του μιτροειδικού και τριγλωχινικού δακτυλίου και υπολογισμό του μέσου όρου αυτών.
- Υπολογισμός του myocardial performance index = COT/ET με μετρήσεις ιστικού Doppler από το διαφραγματικό τμήμα του μιτροειδικού και τριγλωχινικού δακτυλίου.
- Μέτρηση μέγιστης αορτικής ταχύτητας με συνεχές Doppler

- Υπολογισμός όγκου παλμού (κανονικοποιημένου ως προς BSA) από το ολοκλήρωμα χρόνου-ταχύτητας με παλμικό Doppler στο χώρο εξόδου της αριστερής κοιλίας και τη διάμετρο του χώρου εξόδου της αριστερής κοιλίας
- Υπολογισμός της συστολικής πίεσης της πνευμονικής αρτηρίας από το σήμα παλινδρόμησης της τριγλώχινας με το συνεχές Doppler και τη διάμετρο και εισπνευστική μεταβλητότητα της κάτω κοίλης φλέβας

#### Μετρήσεις σε λιπώδη ιστό

Ανθρώπινος λιπώδης ιστός (0,2-0,5 g υγρό βάρος) θα απομονωθεί από τον υποδόριο και το σπλαχνικό κοιλιακό λιπώδη ιστό που θα ληφθούν κατά τη διάρκεια εγχείρησης κοιλίας, περίπου 1 ώρα μετά την αναισθησία.. Τα δείγματα θα μεταφερθούν σε 5 ml ορού με την ακόλουθη σύσταση: 0,5 mM EDTA, 5 mM KCl, 10 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM γλυκόζη, 110 mM NaCl, 0,16 mM CaCl<sub>2</sub>, pH = 7,4 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). Μετά από φυγοκέντρηση στα 300 g για 15 min, οι μάζες του λιπώδους ιστού θα ξηραθούν με χειρουργικές γάζες και στη συνέχεια θα αποθηκευθούν στους -80 °C μέχρι τη χρήση τους για τη μέτρηση του mRNA της αντιγονεκτίνης, της ομεντίνης-1, της ρεσιστίνης και της RBP<sub>4</sub> με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), καθώς και της παραγωγής των αντίστοιχων πρωτεϊνών που παράγονται από το λιπώδη ιστό με Western.

#### **4.6 Περιγραφή των μεθόδων μέτρησης που θα χρησιμοποιηθούν**

*Αναφορά μόνο στις εξειδικευμένες τεχνικές / μεθόδους (αυτές που υπερβαίνουν το επίπεδο του μέσου αναγνώστη/κριτή του ερευνητικού πρωτοκόλλου).*

*Εύρος αριθμού λέξεων: 50 - 500*

#### Προσδιορισμός των επιπέδων των λιποκινών στον ορό

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των λιποκινών στον ανθρώπινο ορό θα διενεργηθεί με ELISA χρησιμοποιώντας kits των εξής εταιρειών: ALPCO DIAGNOSTICS για την αντιγονεκτίνη,

USCN Life Science Inc για την ομεντίνη-1, BioVendor Human Leptin ELISA (Clinical Range) για τη λεπτίνη, R&D systems για τη ρεσιστίνη, Immundiagnostik για την RBP4.

#### Προσδιορισμός του mRNA των λιποκινών στο λιπώδη ιστό

Η απομόνωση RNA από τον επικαρδιακό λιπώδη ιστό θα επιτευχθεί με τη χρήση ομογενοποιητή (Heidolph RZRO). Η συγκέντρωση των διαλυμάτων RNA που θα προκύψουν κατά την απομόνωση RNA από το λιπώδη ιστό θα προσδιορισθεί με το φωτόμετρο NanoDrop 2000 (Thermo Scientific. USA). Στη συνέχεια θα πραγματοποιηθεί real time PCR σε συσκευή C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad), μέσα σε ειδικά Multiplate PCR πιάτα (Bio-Rad) 96 θέσεων.

#### Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών των λιποκινών στο λιπώδη ιστό

Η απομόνωση των ολικών κυτταρικών πρωτεϊνών θα πραγματοποιηθεί με τη χρήση του ρυθμιστικού διαλύματος λύσης RIPA (Radio-Immuno-Precipitation-Assay). Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ολικών πρωτεϊνών θα γίνει με το BCA Protein Assay Kit (Pierce, IL, USA). Στη συνέχεια θα πραγματοποιηθεί ανοσοαποτύπωση κατά Western. Τέλος, με τη χρήση φωτογραφικών υλικών αλλά και της συσκευής απεικόνισης ChemiDoc™ XRS+ system (BioRad, USA), θα πραγματοποιηθεί η λήψη των κατάλληλων φωτογραφιών της μεμβράνης.

#### Προσδιορισμός των υποκλασμάτων της LDL

Για την ανάλυση των υποκλασμάτων της LDL, θα χρησιμοποιηθεί το Kit Συστήματος Lipoprint Υποκλασμάτων LDL της Quantimetrix “Kit Lipoprint LDL”.

Η χρωστική δεσμεύεται ανάλογα με τη σχετική ποσότητα χοληστερόλης σε κάθε λιποπρωτεΐνη. Οι προχρωματισμένες λιποπρωτεΐνες υποβάλλονται στη συνέχεια σε ηλεκτροφόρηση. Καθώς τα σωματίδια λιποπρωτεΐνης μετακινούνται μέσω του υλικού του διαχωριστικού πηκτώματος, αναλύονται σε ζώνες λιποπρωτεϊνών σύμφωνα με το μέγεθος των σωματιδίων τους από τα

μεγαλύτερα προς τα μικρότερα, λόγω της διηθητικής δράσης του πηκτώματος: Τα HDL μετακινούνται ταχύτερα, ενώ ακολουθούν τα μικρά-πυκνά LDL [small dense LDL (sdLDL)], τα μεγαλύτερα ελαφρά LDL, οι ενδιάμεσες ζώνες (αποτελούνται κυρίως από IDL) και τα VLDL. Τα χυλομικρά, αν υπάρχουν, εμφανίζονται πάνω από το πήκτωμα συσσώρευσης ή παραμένουν στο πήκτωμα φόρτωσης. Το σχετικό εμβαδό κάθε ζώνης λιποπρωτεϊνών καθορίζεται και πολλαπλασιάζεται με τη συγκέντρωση ολικής χοληστερόλης του δείγματος, ώστε να προκύψει η συγκέντρωση χοληστερόλης σε κάθε ζώνη σε mg/dL

#### **4.7 Αποτελέσματα έκβασης**

*Σαφής παράθεση των μεταβλητών που τίθενται ως πρωτεύοντα και δευτερεύοντα καταληκτικά σημεία. Αντιστοίχισή τους με τις ερευνητικές υποθέσεις. Εάν είναι περισσότερα από ένα, να αριθμηθούν. Γιατί επιλέχθηκαν ως τέτοια;*

- 1) Συγκρίσεις λιποκινών [αντιγονεκτίνη, ομεντίνη-1, λεπτίνη, ρεσιστίνη, retinol binding protein 4 (RBP<sub>4</sub>)] μεταξύ ατόμων που είχαν και αυτών που δεν είχαν μετεγχειρητικά καρδιακά συμβάματα
  - a. Σύγκριση της συγκέντρωσης στον ορό των λιποκινών μεταξύ των ατόμων που είχαν μετεγχειρητικά καρδιακά συμβάματα και αυτών που δεν είχαν μετεγχειρητικά καρδιακά συμβάματα.
  - b. Σύγκριση της έκφρασης στον υποδόριο κοιλιακό λιπώδη ιστό των λιποκινών μεταξύ των ατόμων που είχαν μετεγχειρητικά καρδιακά συμβάματα και αυτών που δεν είχαν μετεγχειρητικά καρδιακά συμβάματα.
  - c. Σύγκριση της έκφρασης στον σπλαχνικό κοιλιακό λιπώδη ιστό των λιποκινών μεταξύ των ατόμων που είχαν μετεγχειρητικά καρδιακά συμβάματα και αυτών που δεν είχαν μετεγχειρητικά καρδιακά συμβάματα.
  - d. Σύγκριση της παραγωγής των πρωτεϊνών των λιποκινών στον υποδόριο κοιλιακό λιπώδη ιστό μεταξύ των ατόμων που είχαν μετεγχειρητικά καρδιακά συμβάματα και αυτών που δεν είχαν μετεγχειρητικά καρδιακά συμβάματα.

- e. Σύγκριση της παραγωγής των πρωτεϊνών των λιποκινών στον σπλαχνικό κοιλιακό λιπώδη ιστό μεταξύ των ατόμων που είχαν μετεγχειρητικά καρδιακά συμβάματα και αυτών που δεν είχαν μετεγχειρητικά καρδιακά συμβάματα.
- 2) Συσχετίσεις των λιποκινών (αντιπονεκτίνη, ομεντίνη-1, λεπτίνη, ρεσιστίνη, RBP4) με τον αριθμό των μετεγχειρητικών καρδιακών συμβαμάτων και με τους προεγχειρητικούς δείκτες συστολικής και διαστολικής λειτουργίας της αριστερής και δεξιάς κοιλίας.
- a. Συσχετίσεις της συγκέντρωσης στον ορό των λιποκινών με τον αριθμό των μετεγχειρητικών καρδιακών συμβαμάτων και με τους προεγχειρητικούς δείκτες συστολικής και διαστολικής λειτουργίας της αριστερής και δεξιάς κοιλίας.
- b. Συσχετίσεις της έκφραση στον υποδόριο κοιλιακό λιπώδη ιστό των λιποκινών με τον αριθμό των μετεγχειρητικών καρδιακών συμβαμάτων και με τους προεγχειρητικούς δείκτες συστολικής και διαστολικής λειτουργίας της αριστερής και δεξιάς κοιλίας.
- c. Συσχετίσεις της έκφραση στον σπλαχνικό κοιλιακό λιπώδη ιστό των λιποκινών με τον αριθμό των μετεγχειρητικών καρδιακών συμβαμάτων και με τους προεγχειρητικούς δείκτες συστολικής και διαστολικής λειτουργίας της αριστερής και δεξιάς κοιλίας.
- d. Συσχετίσεις της παραγωγής των πρωτεϊνών των λιποκινών από υποδόριο κοιλιακό λιπώδη ιστό με τον αριθμό των μετεγχειρητικών καρδιακών συμβαμάτων και με τους προεγχειρητικούς δείκτες συστολικής και διαστολικής λειτουργίας της αριστερής και δεξιάς κοιλίας.
- e. Συσχετίσεις της παραγωγής των πρωτεϊνών των λιποκινών από το σπλαχνικό κοιλιακό λιπώδη ιστό με τον αριθμό των μετεγχειρητικών καρδιακών συμβαμάτων και με τους προεγχειρητικούς δείκτες συστολικής και διαστολικής λειτουργίας της αριστερής και δεξιάς κοιλίας.

#### **4.8 Προγραμματισμένη ανάλυση υποομάδων**

*Έχει από την αρχή της μελέτης αποφασισθεί ότι κάποια από τις ομάδες (π.χ. ομάδα ασθενών) θα διαιρεθεί με βάση κάποιο συγκεκριμένο χαρακτηριστικό (π.χ. ηλικία, φύλο).*

Δεν έχει αποφασισθεί από την αρχή κάποια από τις ομάδες ασθενών να διαιρεθεί με βάση κάποιο συγκεκριμένο χαρακτηριστικό.

#### **4.9 Περιγραφή των στατιστικών μεθόδων που θα εφαρμοσθούν για την εκτίμηση των πρωτεύοντων και δευτερευόντων αποτελεσμάτων έκβασης**

*Αναφορά των βασικών και εκτενέστερη ανάλυση των ειδικών στατιστικών δοκιμασιών (π.χ. βιοπληροφορική, αναλύσεις κόστους-οφέλους, κατασκευή μοντέλων). Αντιστοιχισή τους με τα κύρια αποτελέσματα έκβασης. Σε πρωτόκολλα βασικής έρευνας να περιγραφεί επαρκώς η στατιστική μεθοδολογία που θα εφαρμοσθεί.  
Εύρος αριθμού λέξεων: 250 - 500*

Αρχικά θα πραγματοποιηθεί Kolmogorov–Smirnov test, προκειμένου να ελεγχθεί αν οι εξεταζόμενες μεταβλητές ακολουθούν κανονική κατανομή ή όχι. Όσον αφορά τις πραγματοποιούμενες συγκρίσεις των λιποκινών (συγκέντρωση στον ορό, έκφραση σε υποδόριο και σπλαχνικό κοιλιακό λιπώδη ιστό, επίπεδα πρωτεϊνών σε υποδόριο και σπλαχνικό κοιλιακό λιπώδη ιστό) μεταξύ των ατόμων που είχαν μετεγχειρητικά καρδιακά συμβάματα και αυτών που δεν είχαν μετεγχειρητικά καρδιακά συμβάματα, για τις μεταβλητές που θα επιβεβαιωθεί η κανονικότητα της κατανομής τους, θα εφαρμοσθεί Independent t-test, ενώ για τις παραμέτρους που θα αποκλεισθεί η κανονικότητα της κατανομής τους, θα εφαρμοσθεί Mann–Whitney U test. Επίσης, όσον αφορά τις πραγματοποιούμενες συσχετίσεις των λιποκινών (συγκέντρωση στον ορό, έκφραση σε υποδόριο και σπλαχνικό κοιλιακό λιπώδη ιστό, επίπεδα πρωτεϊνών σε υποδόριο και σπλαχνικό κοιλιακό λιπώδη ιστό) με τον αριθμό των μετεγχειρητικών καρδιακών συμβαμάτων και με τους δείκτες συστολικής και διαστολικής λειτουργίας της αριστερής και δεξιάς κοιλίας, για τις μεταβλητές που θα επιβεβαιωθεί η κανονικότητα της κατανομής τους, θα εφαρμοσθεί Pearson correlation analysis, ενώ για τις παραμέτρους που θα αποκλεισθεί η κανονικότητα της κατανομής τους, θα εφαρμοσθεί Spearman correlation analysis. Επιπλέον, μέσω της χρήσης multivariate linear regression analysis, θα αξιολογηθούν ποιες ανεξάρτητες μεταβλητές παρουσιάζουν ανεξάρτητες συσχετίσεις με τον αριθμό των μετεγχειρητικών καρδιακών συμβαμάτων και με τους δείκτες συστολικής και διαστολικής λειτουργίας της αριστερής και δεξιάς κοιλίας.

#### **4.10 Υπολογισμός μεγέθους δείγματος**

*Γιατί επιλέχθηκε οι ομάδες της μελέτης να έχουν το συγκεκριμένο μέγεθος; Ο υπολογισμός πρέπει να έχει γίνει με βάση την πρωτεύουσα ερευνητική υπόθεση και το(α) αντίστοιχο(α) κύριο(α) αποτέλεσμα(τα) έκβασης. Πώς τεκμηριώνεται η αναμενόμενη διαφορά μεταξύ των ομάδων (βιβλιογραφική αναφορά); Σε περίπτωση μη ύπαρξης δεδομένων, αυτά θα πρέπει να αντληθούν από συγγενή πεδία. Στις ελάχιστες περιπτώσεις όπου υπάρχει παντελής*

έλλειψη δεδομένων, απαιτείται να προηγηθεί η διενέργεια πιλοτικής μελέτης (<https://s4be.cochrane.org/blog/2017/07/31/pilot-studies/>). Ποια μέθοδος και πιο λογισμικό χρησιμοποιήθηκαν; Επιθυμητή η επισύναψη εικόνας (print screen) με τον υπολογισμό μεγέθους δείγματος από το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε. Έχουν ληφθεί υπόψη οι πιθανές αποχωρήσεις από τη μελέτη (drop-outs) και η ανάλυση υποομάδων;

Στις μελέτες που έχουν αποδείξει ότι τα επίπεδα των λιποκινών στον ορό παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις με την καρδιακή δυσλειτουργία ο πληθυσμός των ατόμων ήταν μικρότερος των 200 ατόμων. Συνεπώς, η επιλογή του αριθμού 200 ως αριθμό στόχο για τη στρατολόγηση ατόμων είναι λογική.

#### 4.11 Τόπος διεξαγωγής μελέτης

Είναι ο τόπος διεξαγωγής της μελέτης ο ενδεικνυόμενος (ενδεικτικά: υπάρχων εξοπλισμός, στρατολόγηση ασθενών, ύπαρξη τεχνολογίας); Θα απαιτηθεί τμήμα της μελέτης να διεξαχθεί σε επιπρόσθετους χώρους (κλινικές, εργαστήρια, ιδιωτικοί ή δημόσιοι χώροι); Επιβεβαίωση της λήψης των σχετικών αδειών και της υπογραφής των συμφώνων συνεργασίας.

Ο τόπος διεξαγωγής της μελέτης είναι ο ενδεικνυόμενος, καθώς έχει χρησιμοποιηθεί σε παρόμοιες μελέτες στο παρελθόν και υπάρχει η απαιτούμενη τεχνολογία, όπως τεκμηριώνεται από τη συμμετοχή σε αντίστοιχες προηγούμενες μελέτες. Η μελέτη θα διεξαχθεί σε δύο ερευνητικούς οργανισμούς της ίδιας πόλης, όπως φαίνεται στο τμήμα των βιογραφικών σημειωμάτων.

#### 4.12 Επιπρόσθετοι ερευνητές

Θα απαιτηθεί η συνεργασία επιπρόσθετων ερευνητών, εκτός από τους αναφερόμενους; Να αιτιολογηθεί η συμμετοχή τους.

Ναι. Χειρουργοί που θα συμβάλλουν στη λήψη δειγμάτων ορού και λιπώδους ιστού και στη μεταφορά και αποθήκευση των δειγμάτων

#### 4.13 Ηθική

Για κάθε μελέτη απαιτείται έγκριση από Επιτροπή Βιοηθικής. Απαιτούνται επιπρόσθετες άδειες (ενδεικτικά Επιστημονικό Συμβούλιο Νοσοκομείου, Κτηνιατρική Υπηρεσία, Εθνικός Οργανισμός Φαρμάκων, Εθνική Αρχή Ιατρικώς Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής);

Πώς θα διασφαλισθούν τα προσωπικά δεδομένα των συμμετεχόντων ομάδων (General Data Protection Regulation (EU) 2016/679 (GDPR));

Ποιοι θα έχουν πρόσβαση στη/στις βάση/εις δεδομένων και για πόσο χρονικό διάστημα; Πώς θα εξασφαλισθεί η τήρηση του απορρήτου;

Το «Έντυπο ενημέρωσης και συγκατάθεσης συμμετεχόντων» να κατατεθεί ως συμπληρωματικό έγγραφο του παρόντος «Ερευνητικού Πρωτοκόλου».

Επιτροπή Βιοηθικής του Οργανισμού, όπου θα πραγματοποιηθεί η μελέτη

## Τμήμα 5: Δυνατότητες πραγματοποίησης

<p><b>5.1 Προβλεπόμενος χρόνος ολοκλήρωσης με βάση το διαθέσιμο αριθμό περιστατικών</b>  <i>Χρόνος που θα απαιτηθεί από την έναρξη έως την ολοκλήρωση της στρατολόγησης των υποκειμένων της μελέτης. Τεκμηρίωση με σχετικά δεδομένα.</i></p>
<p>24 μήνες με βάση τον αριθμό των ασθενών που συνήθως υποβάλλονται σε ενδοκοιλιακό χειρουργείο.</p>
<p><b>5.2 Αναλυτικό χρονοδιάγραμμα ολοκλήρωσης</b>  <i>Προτείνεται η δημιουργία διαγράμματος Gantt (<a href="https://www.gantt.com">https://www.gantt.com</a> και <a href="https://support.microsoft.com/el-gr/topic/παρουσίαση-δεδομένων-σε-γράφημα-gantt-στο-excel-f8910ab4-ceda-4521-8207-f0fb34d9e2b6">https://support.microsoft.com/el-gr/topic/παρουσίαση-δεδομένων-σε-γράφημα-gantt-στο-excel-f8910ab4-ceda-4521-8207-f0fb34d9e2b6</a>).</i></p>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Συλλογή δειγμάτων λιπώδους ιστού και αίματος και αποθήκευσή τους: 0 – 20 μήνες.</li> <li>• Εργαστηριακές μετρήσεις στα αποθηκευμένα δείγματα: 20 μήνες – 22 μήνες.</li> </ul>
<p>Συγγραφή ερευνητικών άρθρων: 22 μήνες – 24 μήνες.</p>
<p><b>5.3 Προϋπολογισμός και πηγές χρηματοδότησης</b>  <i>Να κατατεθεί σχέδιο προϋπολογισμού με αναφορά στα έξοδα που απαιτούνται (ενδεικτικά: συσκευές που απαιτείται να αγοραστούν, αναλώσιμα, λογισμικό, έξοδα αποστολής δειγμάτων, έξοδα δημοσιεύσεων) (Παράρτημα 1). Πώς αναμένεται να καλυφθούν τα επιπρόσθετα έξοδα;</i></p>
<p>4 ELISA kit (αντιγονεκίνη, ομεντίνη-1, λεπτίνη, ρεσιστίνη, RBP<sub>4</sub>): 2.000 ευρώ</p>
<p>Αναλώσιμα/αντιδραστήρια/εξοπλισμός για PCR και Western: 6.000 ευρώ</p>
<p>Αναλώσιμα/αντιδραστήρια και Κιτ συστήματος Liporprint για μέτρηση υποκλασμάτων LDL: 2.000 ευρώ</p>

## Τμήμα 6: Στρατηγική δημοσιεύσεων και βιβλιογραφία

### 6.1 Δημοσιεύσεις που θα προκύψουν από το ερευνητικό έργο που θα αναληφθεί

Σε περιοδικά ποιων πεδίων θα υποβληθούν οι δημοσιεύσεις;

Ποια η στρατηγική των δημοσιεύσεων (θα προκύψουν ανασκοπικές δημοσιεύσεις; Θα προκύψουν πρωτογενείς δημοσιεύσεις; Θα υπάρξουν δημοσιεύσεις σχετικά με την ανάπτυξη τεχνικών;).

Ποιες οι προτεραιότητες (πού και πότε θα υποβληθούν οι δημοσιεύσεις που θα προκύψουν από την ερευνητική εργασία);

Δύο πρωτογενείς δημοσιεύσεις και μία ανασκοπική δημοσίευση θα υποβληθούν στα ακόλουθα περιοδικά των αντίστοιχων επιστημονικών πεδίων μετά από 22-24 μήνες.

Ενδοκρινολογία: European Journal of Endocrinology, Hormones.

Καρδιολογία: European Journal of Preventive Cardiology.

### 6.2 Βιβλιογραφία

Μορφοποίηση, όπως προτείνεται από το περιοδικό "New England Journal of Medicine":

(<https://paperpile.com/s/the-new-england-journal-of-medicine-citation-style/>).

Επικέντρωση σε πρόσφατες και σημαντικές δημοσιεύσεις.

Οι βιβλιογραφικές αναφορές θα πρέπει να παραπέμπουν σε συγκεκριμένα σημεία εντός του κειμένου.

Αριθμός βιβλιογραφικών αναφορών: **20 – 40**

1. Bamgbade OA, Rutter TW, Nafiu OO, Dorje P. Postoperative complications in obese and nonobese patients. World J Surg. 2007;31(3):556-60.
2. Packer M. The Adipokine Hypothesis of Heart Failure With a Preserved Ejection Fraction: A Novel Framework to Explain Pathogenesis and Guide Treatment. J Am Coll Cardiol. 2025;86(16):1269-1373.
3. Su Z, Tian S, Liang W, Wu L. Association between omentin-1 and heart failure with preserved ejection fraction in Chinese elderly patients. Clin Cardiol. 2023;47(2):e24181.
4. Toczylowski K, Hirnle T, Harasiuk D, Zabielski P, Lewczuk A, Dmitruk I et al. Plasma concentration and expression of adipokines in epicardial and subcutaneous adipose tissue are associated with impaired left ventricular filling pattern. J Transl Med. 2019;17(1):310.
5. Puchałowicz K, Kłoda K, Dziedziejko V, Rać M, Wojtarowicz A, Chlubek D et al. Association of Adiponectin, Leptin and Resistin Plasma Concentrations with Echocardiographic Parameters in Patients with Coronary Artery Disease. Diagnostics (Basel). 2021;11(10):1774.

Chavarria N, Kato TS, Khan R, Chokshi A, Collado E, Akashi H et al. Increased levels of retinol binding protein 4 in patients with advanced heart failure correct after hemodynamic improvement through ventricular assist device placement. *Circ J.* 2012;76(9):2148-52.

**Παράρτημα 1: Προϋπολογισμός**

<b>α/α</b>	<b>Δαπάνη</b> <i>Αναλώσιμα, αντιμισθίες, μετακινήσεις, δημοσιεύσεις</i>	<b>Ποσό (euros)</b>
<b>1.</b>	Αναλώσιμα	10.000
<b>2.</b>	Αντιμισθίες	0
<b>3.</b>	Μετακινήσεις	0
<b>4.</b>	Δημοσιεύσεις	0
	<b>Σύνολο</b>	10.000