

Szczecin dn. 18.05.2018r.

Recenzja pracy doktorskiej lek. med. Mirosława Wąsiewicza pt.:

**OCENA STĘŻENIA WE KRWI WYBRANYCH CZYNNIKÓW ANGIOGENNYCH  
U CHORYCH Z MIAŻDŻYCOWYM, KRYTYCZNYM NIEDOKRWIENIEM KOŃCZYN  
DOLNYCH PODDANYCH REWASKULARYZACJI SPOSOBEM KLASYCZNYM I  
WEWNĄTRZNACZYNIOWYM**

Miażdżyca należy do grupy chorób cywilizacyjnych. Pojęcie to służy określeniu szerzących się w skali globalnej powszechnie znanych chorób, których rozprzestrzenianie powiązane jest ze stopniem rozwoju cywilizacyjnego społeczeństw. Industrializacja, mechanizacja, urbanizacja, chemizacja rolnictwa, nadmierne zanieczyszczenie środowiska składają się na postęp cywilizacyjny, przyczyniając się do zmiany stylu życia przeciętnego człowieka. Dzieje się tak zwłaszcza w krajach wysoko rozwiniętych: miażdżyca dotyczy 20% mieszkańców Europy i Ameryki Północnej po 50 roku życia, po 75 roku życia liczba chorych wzrasta do 30%.

Powolny postęp miażdżycy jest warunkiem koniecznym do rozwoju krążenia obocznego. Do jego rozwoju przyczyniają się cytokiny angiogenne: czynnik wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF - *vascular endothelial growth factor*) oraz czynnik wzrostu fibroblastów (FGF - *fibroblast growth factor*), których synteza stymulowana jest przez niedokrwienie tkanek. Krańcowo nasilone zaburzenia przepływu, prowadzące do deficytu tlenowego określa się mianem krytycznego niedokrwienia kończyny (CLI - *critical limb ischemia*, KNK). Dochodzi do niego, gdy zmiany zarostowe tak bardzo upośledzają napływ krwi, że mechanizmy kompensacyjne, takie jak krążenie oboczne, stają się niewydolne i nie wystarczają, by pokryć zapotrzebowanie tkanek obwodowych na substancje odżywcze.

Terminu "krytyczne niedokrwienie kończyn" powinno się używać w odniesieniu do wszystkich chorych z przewlekłym spoczynkowym bólem

niedokrwiennym (stadium III wg klasyfikacji Fontaine'a), owrzodzeniami lub martwicą kończyny występującymi w związku z obiektywnie potwierdzonymi zmianami miażdżycowymi tętnic (stadium IV wg klasyfikacji Fontaine'a), przy czym należy obiektywnie wykazać obecność zmian miażdżycowych, zazwyczaj wykonując pomiar wskaźnika kostkowo-ramiennego (ABI – *ankle-brachial index*) lub ciśnienia na paluchu metodą dopplerowską. Zakłada on przewlekły charakter choroby i wymaga odróżnienia od ostrego niedokrwienia kończyn.

Definicja krytycznego niedokrwienia zawiera w sobie określony stan kliniczny i przedmiotowy pacjenta: 1. ból spoczynkowy nieustępujący po standardowych lekach przeciwbólowych trwający powyżej 14 dni; 2. ciśnienie skurczowe mierzone na poziomie kostki poniżej 50 mm Hg, ciśnienie skurczowe mierzone na paluchu poniżej 30 mm Hg, a wskaźnik kostka – ramię (ABI – *ankle-brachial index*) wynosi  $<0,3$ ; 3. przezskórna prężność tlenu (TcPO<sub>2</sub>) mierzona w obszarze niedokrwienia wynosi poniżej 10 mm Hg i nie wzrasta po inhalacji tlenu; 4. brak pulsacyjnego przepływu na paluchu w pomiarze pletyzmograficznym, LDF; w obrazie kapilaroskopowym widoczne są zmiany funkcjonalne i strukturalne naczyń włosowatych.

U większości chorych z KNK zmiany tkankowe dotyczą przede wszystkim mikrokrążenia skóry. We wczesnych stadiach miażdżycy tętnic obwodowych zmniejsza się przede wszystkim przepływ w mięśniach szkieletowych i to zjawisko jest odpowiedzialne za chromanie przestankowe. Natomiast w KNK dochodzi do krytycznego ograniczenia przepływu przede wszystkim w mikrokrążeniu skóry, co powoduje powstanie zmian troficznych i ból spoczynkowy.

Układ regulacyjny mikrokrążenia obejmuje zewnętrzne mechanizmy neurogenne, wewnątrzpochodne mediatory miejscowe oraz oddziaływanie krążących czynników humoralnych i krwiopochodnych. W regulacji przepływu odgrywa też rolę śródbłonek, uwalniający substancje rozszerzające naczynia (prostacyklinę, tlenek azotu) oraz wiele czynników o działaniu naczynioskurczowym (endotelinę). Niewłaściwe pobudzenie procesów hemostazy i zapalenia w KNK prowadzi do zmniejszenia całkowitego przepływu w mikrokrążeniu skóry oraz jego nieprawidłowej dystrybucji.

Szybkie rozpoznanie KNK jest sprawą niezwykle istotną ponieważ wiąże się ono z wysokim ryzykiem amputacji kończynowych: u 25% chorych konieczne będzie wykonanie dużej amputacji w ciągu roku od rozpoznania choroby. Częstość wystąpienia zakończonych zgonem powikłań naczyniowych wynosi

25% chorych z rozpoznaniem KNK. Jedynie połowa z chorych pozostanie przy życiu bez konieczności wykonania dużej amputacji, jednak z utrzymującymi się silnymi dolegliwościami bólowymi kończyn. Jedynie 22% chorych po amputacji uda zaczyna samodzielnie chodzić, a 30% pozostaje na stałe w łóżku.

Preferowaną metodą postępowania w KNKD jest rewaskularyzacja. Polega na stosowaniu: 1. małoinwazyjnych zabiegów wewnątrznacyniowych, 2. tradycyjnych technik operacyjnych (otwartych), 3. technik mieszanych (hybrydowych) łączących techniki klasyczne i małoinwazyjne.

W wielu ośrodkach naczyniowych PTA (angioplastyka) stała się podstawową metodą leczenia KNK, wypierając otwarte techniki operacyjne. Zabiegi wewnątrznacyniowe należą do technik małoinwazyjnych. Opracowano szereg technik zabiegów wewnątrznacyniowych umożliwiających przywrócenie drożności zablokowanej tętnicy do 15 cm, takich jak np. angioplastykę balonową czy angioplastykę balonową ze stentowaniem. Trwałość efektu drożności naczyń jest jednak mniejsza niż tradycyjnych operacji.

Tradycyjna rewaskularyzacja chirurgiczna oznacza w zależności od wskazań przeszczepy anatomiczne, tromboendarterektomię osi biodrowej lub przeszczepy pozaanatomiczne. Wskaźnik pięcioletnich drożności przeszczepów omijających aortalno-udowych wynosi 80-90%, wskaźnik uratowanych kończyn po 5 latach utrzymuje się na poziomie > 90% dla przeszczepów anatomicznych. Pomimo lepszych wyników operacji otwartych, obserwuje się wyraźny wzrost zabiegów wewnątrznacyniowych (>60%) i spadek liczby operacji klasycznych (około 30%).

Operacje hybrydowe to połączenie technik chirurgicznych z technikami wewnątrznacyniowymi. Pozwalają one wykonać pełną rewaskularyzację i jednocześnie skrócić czas operacji oraz zmniejszyć ryzyko operacyjne. Technika hybrydowa jest przeznaczona dla osób w podeszłym wieku, wyniszczonych, z niedostępną autologiczną żyłą.

Angiogeneza, czyli tworzenie nowych naczyń krwionośnych, jest sekwencją procesów o kluczowym znaczeniu fizjologicznym i patologicznym. Proces ten jest regulowany szeregiem czynników proangiogennych i antyangiogennych. W zależności od tego, która grupa czynników dominuje, ma miejsce indukcja lub hamowanie angiogenezy.

Do pierwszej grupy czynników należą m. in. : naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu naczyń (VEGF), czynniki wzrostu fibroblastów (FGF), czynnik

wzrostu nowotworów (TGF), czynnik wzrostu komórek śródbłonkowych pochodzenia płytkowego (PD-ECGF)/fosforylaza tymidyny (PT), interleukina-8 (IL-8). Do inhibitorów neowaskularyzacji zalicza się natomiast: angiostatynę (fragment plazminogenu), endostatynę (fragment kolagenozy 18), trombospondynę (TSP), rodzinę białek zwanych tkankowymi inhibitorami metaloproteaz (TIMP), niektóre interleukiny (IL-1, -6, -10, -12).

VEGF - *czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego* jest jednym z kluczowych regulatorów tworzenia naczyń krwionośnych. Jest syntetyzowany przez wiele typów komórek, a jego produkcja stymulowana w środowisku o niedostatecznej ilości tlenu. Przewlekła hipoksja indukuje komórkową produkcję HIF (*hypoxia inducible factor*), czynnika transkrypcji, który stymuluje produkcję i nasila uwalnianie VEGF. Czynniki te wiążą się do swoistych specyficznych receptorów, obecnych na komórkach śródbłonka. Aktywacja receptora VEGFR indukuje proliferację, wzrost i migrację oraz organizację przestrzenną komórek śródbłonka podczas formowania się naczyń.

bFGF - *zasadowy czynnik fibroblastów* jest jednym z najlepiej scharakteryzowanych modulatorów angiogenezy. Może działać jako czynnik wzrostu i stymulować neowaskulogenezę wpływając na wzrost nowych naczyń krwionośnych podczas gojenia ran. Jest uznawany za silny induktor angiogenezy w przebiegu chorób takich jak niedokrwienie kończyn i choroba niedokrwienna serca.

Mechanizmy działania czynników antyangiogennych są różne. Spośród wielu inhibitorów angiogenezy na uwagę zasługują dwa: angiostatyna - jest jednym z najsilniejszych inhibitorów angiogenezy. Jest produktem proteolizy plazminogenu, wykazującym swoiste działanie w stosunku do komórek śródbłonka naczyń, w odwracalny sposób hamując proliferację oraz endostatyna - która hamuje proliferację komórek śródbłonka i ich migrację stymulowaną przez VEGF.

Komórki śródbłonka odgrywają podstawową rolę w migracji i tworzeniu się sieci naczyń, a czynniki angiogenne zostają aktywowane poprzez ściśle regulowane procesy kontrolujące stan komórki. Badania nad wykorzystaniem powyższych czynników podczas leczenia chorych, mogą wspomóc założenia, że proces angiogenezy, w zależności od zastosowanych czynników może być regulowany na wielu poziomach, jakkolwiek badania prowadzone nad terapiami angiogennymi są nadal w fazach klinicznych lub nawet na poziomie badań podstawowych. Obiecujące wydaje się połączenie klasycznych koncepcji

komórkowego wspomaganie procesu angiogenezy w połączeniu z innowacyjnymi technikami ich podania. Jakkolwiek proces tworzenia nowych naczyń krwionośnych jest poznany w dość dużym zakresie to pełne jego wykorzystanie w klinice wymaga długich i zaawansowanych na szeroką skalę badań.

Wszystkie wymienione powyżej spostrzeżenia dotyczące przewlekłego niedokrwienia kończyn dolnych zostały w sposób niezwykle wyczerpujący opisane w we wstępie do przedłożonej mi do oceny pracy doktorskiej. Ich szczegółowe omówienie już we wstępie stanowi swego rodzaju wprowadzenie do tematyki pracy i wydaje się być konieczne w celu zrozumienia poruszanych w dalszych rozdziałach zagadnień. Bardzo wysoki poziom uszczegółowienia niektórych tematów (np. patofizjologia angiogenezy) czyni ten rozdział dość hermetyczny dla chirurgów a dostępny jedynie dla naukowców z dziedzin podstawowych medycyny. Nie jest to żaden zarzut, raczej uznanie dla szerokich zainteresowań i wiedzy doktoranta doprawione nutką zazdrości.

Mając na uwadze powyższe należy stwierdzić, że przedłożona mi do oceny praca doktorska lekarza medycyny Mirosława Wąsiewicza Kowalskiej pt.: **Ocena stężenia we krwi wybranych czynników angiogennych u chorych z miażdżycowym, krytycznym niedokrwieniem kończyn dolnych poddanych rewaskularyzacji sposobem klasycznym i wewnątrznaczyniowym** jest szczególnie wartościowa.

Zagadnienia badawcze tej pracy dotyczące oceny angiogenezy z pomiarem stężenia czynników angiogennych (VEGF i bFGF) we krwi chorych z krytycznym niedokrwieniem kończyn dolnych w zależności od zastosowanej metody rewaskularyzacji zostały wybrane i sformułowane w sposób wyjątkowo trafny.

Praca Mirosława Wąsiewicza ma typowy układ pracy naukowej. Składa się z 9 rozdziałów uzupełnionych streszczeniem w języku polskim i angielskim zawartych na 107 stronach druku. Praca napisana jest starannie, poprawnym językiem polskim, edytorsko bez zastrzeżeń. Autor nie ustrzegł się nielicznych błędów literowych i interpunkcyjnych, bez znaczenia dla wartości merytorycznej pracy. Sformułowanie celu pracy na stronie 44 powinno zawierać określenie przedmiotu podlegającego udroźnieniu (a nie są to kończyny). Korekty wymaga stwierdzenie (str. 89), że „po zabiegu operacyjnym uzyskiwano zdecydowanie wyższe wartości bFGF...”

Piśmiennictwo liczy 123 pozycje ułożone według kolejności cytowania, a jego dobór z uwzględnieniem doniesień z ostatnich lat, świadczy o dobrej znajomości tematu. Kolejność rozdziałów w sposób przejrzysty przedstawia założenia i cele pracy, materiał, sposób przeprowadzenia badań i ich wyniki.

Część wstępną, będącą dość szczegółowym przeglądem wiedzy z dziedziny chirurgii naczyniowej w przypadkach niedokrwienia kończyn dolnych, pozwoliłem sobie omówić na początku oceny pracy. Zrozumienie poruszanych zagadnień wymaga pewnego przygotowania ze strony czytelnika ale doktorant doskonale sobie z nim poradził. Swoboda z jaką doktorant porusza się wśród omawianych zagadnień świadczy o doskonałym zrozumieniu tematu i świetnie uzasadnia wybór celu pracy badawczej, logicznie wynikających z omawianych przesłanek.

Za cel pracy autor postawił ocenę angiogenezy z pomiarem stężenia czynników angiogennych (VEGF i bFGF) we krwi chorych z krytycznym niedokrwieniem kończyn dolnych w zależności od metody zastosowanego udrażniania kończyn dolnych.

Odpowiedzi na postawione przez doktoranta pytania badawcze wymagały realizacji określonych przedsięwzięć u wszystkich badanych:

1. Przeprowadzenia badania fizykalnego z oceną tętna na tętnicach kończyn dolnych, pomiaru wskaźnika kostka – ramię oraz dopplerowskiego badania USG z oceną przepływu w dystalnych odcinkach tętnic piszczelowych oraz pomiarem prędkości skurczowej w tych odcinkach.
2. Oznaczenia stężeń VEGF i bFGF w osoczu, które wykonywano w 1 dobie i 3 miesiące po operacji udrożnienia tętnic.

Mogę stwierdzić, że zagadnienia badawcze tej pracy zostały dobrze wybrane i sformułowane, a wybór tematu i sposób przeprowadzenia badania uważam za wyjątkowo trafny.

Materiał badawczy stanowiło 84 chorych leczonych w Oddziale Chirurgii Naczyniowej, Ogólnej i Onkologicznej Szpitala im. M. Kopernika w Łodzi w latach 2012 – 2014. Dane demograficzne chorych włączonych do badania przedstawiono w formie czytelnej tabelki z podziałem na poziom niedrożności tętnic i rodzaj wykonanego zabiegu chirurgicznego.

Chorzy kwalifikowano do poszczególnych typów operacji na podstawie konsensusu TASC II (Konsensus dotyczący postępowania w chorobie naczyń obwodowych) z 2007 r., a szczegółowy opis metod operacyjnych i postępowania okołoperacyjnego został w sposób precyzyjny przedstawiony w rozdziale 3. pracy. Równie precyzyjnie przedstawił metody immunoenzymatyczne użyte w celu oznaczenia poziomu stężeń czynników angiogennych (VEGF i bFGF)

Najobszerniejszą część pracy zajmuje rozdział poświęcony wynikom badań przeprowadzonych na podstawie retrospektywnej analizy dokumentacji medycznej leczonych chorych. Wyniki badań doktorantka przedstawiła w sposób zrozumiały i jednoznaczny.

Autor wykazał, że:

1. Zarówno po zabiegach endowaskularnych jak i wykonywanych w sposób klasyczny wartości wskaźnika kostka – ramię były statystycznie istotnie wyższe ( $p < 0,001$ ).
2. Statystycznie istotnie poprawiła się prędkość przepływu w tętnicach piszczelowych przednich i tylnych po leczeniu operacyjnym, niezależnie od rodzaju operacji ( $p < 0,001$ ).
3. W przypadkach chorych z krytycznym niedokrwieniem kończyn dolnych, niezależnie od metody chirurgicznego leczenia obserwowano istotne statystycznie obniżenie wartości stężeń badanych cytokin. Średnia wartość stężenia VEGF przed zabiegiem była istotnie statystycznie wyższa w porównaniu do średniej wartości po operacji ( $p < 0,001$ ). Podobnie średnia wartość stężenia bFGF przed zabiegiem była istotnie statystycznie wyższa w porównaniu do średniej wartości po operacji ( $p < 0,001$ ).

Wyniki swoich badań doktorant przedstawił w sposób jasny, zrozumiały i jednoznaczny. Powyższe doktorant przedstawił w formie trzech końcowych wniosków, które w pełni odpowiadają na przedstawione w założeniach i celu pracy pytania badawcze. Dodatkowo wyniki przeprowadzonych badań dają podstawy do stwierdzenia, że oznaczanie osoczowych stężeń VEGF i bFGF może służyć do monitorowania skuteczności chirurgicznego leczenia chorych z krytycznym niedokrwieniem kończyn dolnych, co doktorant zaznaczył w jednym z wyciągniętych z badań wniosków.

Analiza materiału badawczego została przeprowadzona bardzo dokładnie, a wyniki badań przedstawione w formie 18 tabel i 20 wykresów.

Ogólne wrażenie jakie odniosłem po lekturze pracy jest bardzo dobre.

Odpowiedzi na postawione przez doktoranta pytania badawcze mają cenną wartość praktyczną - mogą służyć do monitorowania skuteczności chirurgicznego leczenia chorych z krytycznym niedokrwieniem kończyn dolnych. Być może, że powyższe informacje są doskonałym przyczynkiem do dalszej dyskusji w gronie specjalistów chirurgii naczyń i być może do wprowadzania pewnych standardów postępowania.

Zauważone niedoskonałości pracy, przede wszystkim redakcyjne, pozwoliłem sobie już wymienić. Te drobne uwagi mają stanowić jedynie dowód na rzetelność recenzji, ale waga ich jest niewielka w stosunku do wysokiego poziomu całości rozprawy, nie umniejszają wartości pracy, która jest wnikliwym, dojrzałym opracowaniem tematu.

Uważam, że przedstawiona mi do oceny praca stanowi oryginalny i samodzielny dorobek naukowy doktoranta i spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim.

Oceniam ją bardzo wysoko i z prawdziwą przyjemnością proszę Wysoką Radę Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie lek. med. Mirosława Wąsiewicza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. Ryszard M. Marek Kamiński  
Specjalista chirurgii ogólnej, onkologicznej  
i transplantologii klinicznej  
4360022