

Lek. Jakub Piotrowski

**Ocena zachowania mikrokrazenia
w trakcie zabiegu pomostowania naczyń
wieńcowych na bijącym sercu**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotor: Dr hab. med. Marcin Hellmann, prof. GUMed

Drugi promotor: Dr hab. med. Lech Anisimowicz, prof. UMK

Wydział Lekarski

Gdański Uniwersytet Medyczny

Gdańsk 2020

*Pragnę złożyć serdeczne podziękowania
Promotorowi, Panu Prof. dr hab. Lechowi Anisimowiczowi
za możliwość prowadzenia badań naukowych,
zaangażowanie i wsparcie w rozwoju naukowym i klinicznym,
Promotorowi, Prof. dr hab. Marcinowi Hellmannowi
za niebywałą pomoc, zaangażowanie, wsparcie naukowe, konstruktywną krytykę, motywację do
pracy i pełen profesjonalizm przy każdym szczególe badania naukowego,
Koleżankom i Kolegom z Kliniki Kardiologii
Szpitala Uniwersyteckiego nr 1 za życzliwą pomoc i gotowość do współpracy,
Rodzicom, za wsparcie i pomoc w dążeniu do celu,
Gosi, że zmieniasz trud codzienności w niezapomniane chwile.*

Spis treści

1. Wykaz stosowanych skrótów.....	3
2. Wykaz prac wchodzących w skład rozpraw	4
3. Wstęp	5
4. Cele pracy	9
5. Materiał i Metody	10
6. Omówienie publikacji wchodzących w skład rozprawy	13
6.1. Publikacja 1	
6.2. Publikacja 2	
6.3. Publikacja 3	
7. Wnioski	16
8. Streszczenie w języku angielskim	17
9. Publikacje wchodzące w skład rozprawy.....	26
10. Piśmiennictwo	42

1. Wykaz stosowanych skrótów

- CABG – pomostowanie naczyń wieńcowych (ang. *coronary artery bypass grafting*)
- CAD – choroba wieńcowa (ang. *coronary artery disease*)
- PCI – przezskórna angioplastyka wieńcowa (ang. *percutaneous coronary intervention*)
- OMT – optymalne leczenie farmakologiczne (ang. *optimal medical treatment*)
- VEGF – naczyniowy śródbłonkowy czynnik wzrostu (ang. *vascular endothelial growth factor*)
- MCP-1 – białko chemotaktyczne dla monocytów (ang. *monocyte chemoattractant protein*)
- TTFM – pomiar przepływu naczyniowego (ang. *transit time flow measurement*)
- PU – jednostki perfuzji (ang. *perfusion units*)
- LDF – laserowy przepływomierz dopplerowski (ang. *laser Doppler flowmetry*)

2. Wykaz prac wchodzących w skład rozprawy

Rozprawa doktorska została opublikowana w recenzowanych czasopismach naukowych w formie trzech spójnych tematycznie prac:

1. Hellmann M.*, **Piotrowski J.***, Anisimowicz L., Cracowski J-L. **A mystery of the myocardial microcirculation during coronary artery bypass grafting.** *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* 2018; 54 (2): 405. * równorzędni pierwsi autorzy

Impact Factor: 3.847; punktacja MNiSW: 30

2. **Piotrowski J.**, Anisimowicz L., Hellmann M. **Laser Doppler flowmetry to assess myocardial microcirculation.** *Cardiology Journal* 2020 (praca zaakceptowana do druku)

Impact Factor: 1.743; punktacja MNiSW: 40

3. Hellmann M.*, **Piotrowski J.***, Kaszubowski M., Dudziak M., Anisimowicz L. **Invasive Assessment of the Myocardial Microcirculation during Beating Heart Coronary Artery Bypass Grafting.** *Journal of Clinical Medicine* 2020; 9 (3): 663. * równorzędni pierwsi autorzy

Impact Factor: 5.688; punktacja MNiSW: 140

Łączna punktacja cyklu publikacji: **Impact Factor: 11.278; punktacja MNiSW: 210**

3. Wstęp

Choroba niedokrwienna serca stanowi główną przyczynę zgonów w krajach Unii Europejskiej. Jest to stan patologiczny spowodowany niedostatecznym zaopatrzeniem miocytów w tlen i substancje odżywcze. Najczęstszą przyczyną choroby jest miażdżycza tętnic wieńcowych. Blaszki miażdżycowe powodują zaburzenia przepływu krwi przez łożysko wieńcowe doprowadzając do upośledzenia ukrwienia komórek mięśnia sercowego. Powoduje to występowanie objawów w postaci dusznicy bolesnej narastającej wraz z progresją choroby. Innym objawem choroby wieńcowej może być pęknięcie niestabilnej blaszki miażdżycowej doprowadzające do ostrego zespołu wieńcowego. Jedną z możliwości leczenia choroby wieńcowej jest, poza optymalną farmakoterapią (OMT, *optimal medical therapy*), rewaskularyzacja mięśnia sercowego: przezskórna lub chirurgiczna¹.

Leczenie pacjenta z chorobą wieńcową zależy od postaci choroby. Postępowanie lecznicze u pacjentów z stabilną chorobą wieńcową lub ostrym zespołem wieńcowym zostało określone w wytycznych dotyczących rewaskularyzacji mięśnia sercowego przez Europejskie Towarzystwo Kardiologiczne². Korzyści stosowania rewaskularyzacji mięśnia sercowego nad OMT zostały udowodnione w licznych badaniach klinicznych oraz metaanalizach^{3,4}. Decyzja dotycząca wyboru metody rewaskularyzacji podejmowana jest przez członków kardiogrupy (Heart Team) na podstawie danych klinicznych oraz m.in. złożoności choroby wieńcowej prezentowanej w postaci Syntax Score⁵.

Angioplastyka wieńcowa jest rutynową małoinwazyjną metodą leczenia choroby wieńcowej. Polega na balonoplastyce oraz implantacji stentów do zwężeń w naczyniach wieńcowych. Z kolei, rewaskularyzacja chirurgiczna polega na wykonaniu operacji pomostowania naczyń wieńcowych (CABG, *coronary artery bypass grafting*). Typowym dostępem chirurgicznym jest sternotomia pośrodkowa. Operację pomostowania naczyń

wieńcowych można przeprowadzić w dwojaki sposób: na bijącym sercu z użyciem stabilizatora miokardium oraz na zatrzymanym sercu z użyciem krążenia pozaustrojowego, którego zadaniem jest utrzymanie perfuzji obwodowej oraz utlenowanie krwi.

Naczynia mikrokrążenia stanowią obszerną część układu krążenia, jednak ze względu na mikroskopijne wymiary, niejednorodną morfologię oraz zróżnicowany przepływ krwi związany ze swoistym narządowo zapotrzebowaniem metabolicznym, jest to obszar, którego badania są skomplikowane, wymagają specjalistycznego sprzętu oraz dużego doświadczenia⁶. Na poziomie mikrokrążenia zachodzi intensywne wymiana gazowa i metaboliczna, a optymalna reaktywność naczyń mikrokrążenia w odpowiedzi na niedokrwienie jest kluczowa, by ograniczyć stopień uszkodzenia tkanek⁷.

Mikrokrążenie i zmiany w nim zachodzące mają również istotny wpływ na patofizjologię choroby wieńcowej. Przyjmuje się, że średnica naczyń krążenia obocznego osób bez choroby wieńcowej to 10-200 μm , natomiast u pacjentów z rozpoznaną chorobą wieńcową to 100-800 μm ⁸. Rozwój krążenia wieńcowego przebiega poprzez dwa procesy fizjologiczne: arteriogenezę i angiogenezę. Arteriogeneza polega na rozwoju istniejącego krążenia obocznego. Już w trakcie życia płodowego oraz noworodkowego dochodzi do powstania naczyń obocznych mogących zaopatrywać zagrożone niedokrwieniem obszary mięśnia sercowego⁹. Siły ścinające są najważniejszym czynnikiem wyzwalającym arteriogenezę. Poprzez wzrost stężenia tlenu azotu, produkcję naczyniowego śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF, *vascular endothelial growth factor*) oraz białka MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) dochodzi do aktywacji monocytów, które indukują proliferację komórek i przygotowują przestrzeń pozakomórkową do migracji komórek. Proces arteriogenezy ustaje w momencie powrotu sił ścinających do pierwotnego poziomu. Angiogeneza, indukowana przede wszystkim przez hipoksemię, polega na powstawaniu całkowicie nowych naczyń. Poprzez czynniki wzrostu takie jak czynnik wywołujący

hipoksemią 1-alfa, VEGF oraz czynniki i komórki zapalnego, dochodzi do proliferacji i migracji komórek śródbłonna i komórek mięśni gładkich¹⁰.

Zabiegi pomostowania naczyń wieńcowych mogą wiązać się z szeregiem powikłań ze strony układu sercowo-naczyniowego, takimi jak przejściowe niedokrwienie, ostry zespół wieńcowy, zaburzenia rytmu czy niestabilność hemodynamiczna. Istnieją przekonujące dowody naukowe, sugerujące, że dobrze rozwinięte krążenie oboczne naczyń wieńcowych może chronić przed skutkami niedokrwienia mięśnia sercowego poprzez utrzymanie odpowiedniej perfuzji tkankowej oraz zapewnia lepsze rokowanie w grupie pacjentów z zaawansowaną chorobą wieńcową. W związku w powyższym wydaje się, iż śródoperacyjna ocena perfuzji mikrokrażenia podczas zabiegów CABG może mieć istotne zastosowanie kliniczne w przewidywaniu niedokrwienia mięśnia sercowego.

Ocena zachowania mikrokrażenia serca u pacjentów z chorobą wieńcową, z uwagi na trudną dostępność badanego obszaru oraz inwazyjność pomiarów, jest niezmiernie trudna. Piśmiennictwo dotyczące tego tematu jest znacznie ograniczone. Kilka badań dotyczących bezpośredniej oceny mikrokrażenia na bijącym sercu wykonywana była na modelach zwierzęcych¹¹. Tylko jedna grupa wykorzystała technikę lasera dopplerowskiego do przeprowadzenia badania mikrokrażenia u pacjentów z chorobą wieńcową podczas operacji pomostowania naczyń wieńcowych z użyciem krążenia pozaustrojowego i zatrzymaniem pracy serca¹². Według dostępnej wiedzy, do tej pory, nikt nie wykonywał ciągłych pomiarów przepływu w mikrokrażeniu na bijącym sercu podczas operacji pomostowania naczyń wieńcowych.

4. Cele pracy

Za główne cele pracy przyjęto:

1. Ustalenie przydatności klinicznej laserowego przepływomierza dopplerowskiego (LDF) w ocenie mikrokrażenia serca u pacjentów z chorobą wieńcową poddawanych operacji pomostowania naczyń wieńcowych na bijącym sercu.
2. Zbadanie zachowania mikrokrażenia serca ocenianego w sposób ciągły podczas operacji pomostowania naczyń wieńcowych na bijącym sercu u pacjentów z chorobą wieńcową.
3. Analizę korelacji pomiędzy zmianami perfuzji mikrokrażenia podczas operacji pomostowania naczyń wieńcowych a biochemicznymi markerami martwicy mięśnia sercowego.
4. Ocenę zależności między perfuzją mikrokrażenia a przepływem przez grafty naczyniowe.

5. Materiał i metody

Grupę badaną stanowiło 26 pacjentów z chorobą wieńcową zakwalifikowanych do operacji pomostowania naczyń wieńcowych. W 25 przypadkach wykonano operację pomostowania naczyń wieńcowych bez użycia krążenia pozaustrojowego, w jednym przypadku wykorzystano krążenie pozaustrojowe w celu stabilizacji układu krążenia. Dziesięciu pacjentów hospitalizowano z powodu zawału mięśnia sercowego, pozostali pacjenci zostali przyjęci do szpitala z rozpoznaniem stabilnej choroby wieńcowej. Jeden pacjent został zoperowany w trybie pilnym, pozostali w trybie planowym. Wszystkie operacje zostały przeprowadzone pomiędzy listopadem 2018 a kwietniem 2019. Łącznie wykonano 54 zespolenia graftów naczyniowych do tętnic wieńcowych, co stanowiło podstawową jednostkę analizy w badaniu.

Badania realizowane w ramach pracy doktorskiej przeprowadzono w Klinice Kardiochirurgii Szpitala Uniwersyteckiego nr 1 im. A. Jurasza w Bydgoszczy. Protokół badawczy uzyskały zgodę niezależnej komisji bioetycznej przy Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu (KB 703/2018). Wszyscy uczestnicy otrzymali pisemną informację o protokole badania oraz wyrazili świadomą i pisemną zgodę na udział w badaniu uzyskując jednocześnie prawo do wycofania się z badania w każdej chwili.

Wszystkie operacje zostały przeprowadzone przez jednego kardiochirurga (doktoranta) według identycznego protokołu znieczulenia. Dostępem chirurgicznym była sternotomia pośrodkowa, natomiast jako materiał do pomostowania wykorzystano tętnice piersiowe wewnętrzne i/lub żyły odpiszczelowe. W celu ustabilizowania miokardium podczas wykonywania zespożeń wykorzystywano stabilizator tkankowy (Octopus Tissue Stabilization System, Medtronic, USA).

Do oceny mikrokrążenia w miokardium podczas zabiegów CABG wykorzystano metodę laserowego przepływomierza Dopplerowskiego (LDF, *laser Doppler flowmetry*). Istota metody laserowo-dopplerowskiej polega na emisji w głąb tkanki monochromatycznego światła lasera o wąskim paśmie, od czerwieni do pobliża podczerwieni. Wiązka promieniowania rozchodzi się w obrębie badanego obszaru. Fotony napotykać na swej drodze poruszające się krwinki, zmieniając częstotliwość swych drgań zgodnie ze zjawiskiem Dopplera. Światło powracające jest następnie analizowane przy użyciu systemu fotodetekcji, a aparat generuje napięcie, które jest wprost proporcjonalne do prędkości i liczby przemieszczających się krwinek w obszarze badania. Urządzenie rejestruje ukrwienie w badanym obszarze tkanki w arbitralnych jednostkach perfuzji (PU, *perfusion units*).

Do przeprowadzenia badania perfuzji mikrokrążenia zostały wykorzystany aparat Periflux 5000 (Perimed, Järfälla, Sweden) z dedykowaną sondą igłową (Stainless Steel Probe 411-311, Perimed, Järfälla, Sweden). Podczas przeprowadzania operacji pomostowania naczyń wieńcowych sonda została wprowadzona do miokardium na głębokość 3 – 5 mm dystalnie od planowanego miejsca wykonania zespolenia naczyniowego. Pomiar wykonywano w sposób ciągły, 3 minuty przed przystąpieniem do wykonywania zespolenia, w trakcie jego wykonywania oraz przez 3 minuty po wykonaniu pomostu naczyniowego. Wszystkie pomiary zostały zapisane cyfrowo i opracowane za pomocą programu Perisoft 2.5.5. (Perimed, Järfälla, Sweden). Łącznie wykonano 54 zespolenia. Pacjenci zostali podzieleni na dwie grupy w zależności od procentowego spadku perfuzji mikrokrążenia po zamknięciu naczynia wieńcowego oraz prezentowanych objawów klinicznych. W celach analitycznych, spadek perfuzji o co najmniej 15% został uznany jako istotny statystycznie.

Dodatkowo, po wykonaniu każdego zespolenia przeprowadzono pomiary przepływu przez grafty naczyniowe stosując metodę TTFM (*Transit Time Flowmetry Measurement*). Badania zostały przeprowadzone dedykowaną sondą po dobraniu odpowiedniego rozmiaru

w zależności od średnicy graftu naczyniowego. Istotą metody TTFM jest ocena przesunięcia dopplerowskiego. Objętość przepływającej krwi jest określona na podstawie różnicy czasu przejścia fali ultradźwiękowej wysyłanej przez sondę. Wartości przepływu zostały wyrażone w ml/min i skorelowane z wartościami perfuzji mikrokrażenia mierzonymi jednocześnie i wyrażonymi w PU.

Od razu, po zabiegu u każdego z operowanych pacjentów pobrano krew celem wykonania oznaczeń biochemicznych wysokoczułej troponiny I (hs-TnI, *high-sensitivity troponin I*), którą pobierano co 12 godzin, aż do osiągnięcia najwyższego poziomu, który został użyty do analizy. Poziom hs-TnI oznaczano przy użyciu komercyjnie dostępnych zestawów laboratoryjnych. Stężenie hs-TnI zostało poddane analizie korelacji z wartościami zmian perfuzji mikrokrażenia tych pacjentów, u których nastąpił spadek perfuzji po zamknięciu naczynia wieńcowego.

6. Omówienie publikacji wchodzących w skład rozprawy

Rozprawa doktorska została przedstawiona w trzech artykułach opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym. Praca otwierająca cykl ma charakter badania pilotażowego i jest pierwszym doniesieniem naukowym prezentującym inwazyjny pomiar mikrokążenia w miokardium podczas zabiegu pomostowania naczyń wieńcowych na bijącym sercu. Druga praca, pogładowa oraz mająca charakter metodyczny, prezentuje technikę Dopplera laserowego i możliwości jej zastosowania w bezpośredniej ocenie mikrokążenia w miokardium. Kolejna, praca oryginalna, prezentuje badania perfuzji mikrokążenia na bijącym sercu w grupie pacjentów z chorobą wieńcową poddawanych zabiegom pomostowania naczyń wieńcowych oraz potwierdza obserwacje poczynione podczas badania pilotażowego.

6.1. Publikacja 1

Wstęp do cyklu stanowi artykuł pt. „*A mystery of the myocardial microcirculation during coronary artery bypass grafting*” opublikowany w czasopiśmie *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* w 2018 roku. Pracy przedstawia pilotażowe inwazyjne badanie mikrokążenia serca podczas operacji pomostowania naczyń wieńcowych. Zaobserwowano, iż zatrzymanie przepływu krwi poprzez założenie zacisku na tętnicę wieńcową nie powoduje spadku perfuzji mikrokążenia. Wysłunięto hipotezę, iż dobrze rozwinięte krążenie oboczne widoczne na koronarografii jest odpowiedzialne za dostarczenie krwi do dystalnych obszarów rewaskularyzowanej tętnicy. Praca ta stała się inspiracją do dalszych badań zachowania mikrokążenia na bijącym sercu podczas zabiegów CABG.

6.2. Publikacja 2

Praca pogładowa pt. „*Laser Doppler flowmetry to assess myocardial microcirculation*” została przyjęta do publikacji w czasopiśmie *Cardiology Journal* w formie *Technology Note*.

W pracy przedstawiono zasadę działania techniki laserowego przepływomierza dopplerowskiego, omówiono przebieg badania oraz sposób analizy i interpretacji wyników. Ponadto, poza aspektami technicznymi i metodologicznymi pomiarów, zwrócono uwagę na możliwość oceny perfuzji mikrokrążenia podczas zabiegu kardiochirurgicznego, co może mieć istotne znaczenie w kontekście monitorowania i przewidywania niedokrwienia mięśnia sercowego.

6.3. Publikacja 3

Z punktu widzenia naukowego, najważniejszą część przedstawionego cyklu publikacji stanowi praca oryginalna pt. „*Invasive Assessment of the Myocardial Microcirculation during Beating Heart Coronary Artery Bypass Grafting*” opublikowana w czasopiśmie *Journal of Clinical Medicine*. Stanowi ona rozwinięcie wcześniej zdobytej wiedzy na temat zasady działania laserowego przepływomierza Dopplerowskiego i ma na celu potwierdzenie hipotez postawionych podczas tworzenia pierwszej publikacji na większej grupie pacjentów.

W pracy w sposób ciągły oceniano perfuzję mikrokrążenia na bijącym sercu podczas wykonywania 54 zespołów graftów naczyniowych do tętnic wieńcowych. Na podstawie przeprowadzonych badań, w większości sytuacji ($n=42$) nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic ($p=0.110$) w średniej wartości perfuzji spoczynkowej w porównaniu do wartości perfuzji po założeniu zacisku na tętnicę wieńcową oraz w stosunku do sygnału mierzonego w trakcie reperfuzji (732.4 ± 148.0 vs. 711.4 ± 144.1 vs. 737.0 ± 141.2). Perfuzja mierzona w sposób ciągły utrzymywała się na stałym poziomie bez względu na etap prowadzonej procedury. Jedynie, w niewielkiej podgrupie pacjentów podczas wykonywania zespołów ($n=12$) stwierdzono istotny statystycznie spadek perfuzji po założeniu zacisku na tętnicę wieńcową ($p<0.001$) i ponowny wzrost perfuzji po przywróceniu przepływu krwi przez naczynie wieńcowe (805.4 ± 200.1 vs. 577.2 ± 212.8 vs. 649.3 ± 220.8). W 6 przypadkach spadek perfuzji wystąpił podczas pomostowania tętnicy piersiowej wewnętrznej do gałęzi

diagonalnej, co można by tłumaczyć mniej rozwiniętym krążeniem obocznym w tym obszarze miokardium. W pozostałych przypadkach objawy w postaci niestabilności hemodynamicznej oraz cechy niedokrwienia mięśnia sercowego były związane z istotnym spadkiem perfuzji mikrokrążenia.

Dodatkowo poddano analizie pacjentów, u których obserwowano spadek perfuzji mikrokrążenia miokardium podczas zamknięcia przepływu przez naczynie wieńcowe. Stwierdzono silną dodatnią korelację ($r=0.854$, $p<0.001$) pomiędzy pooperacyjną wartością wysokoczulej troponiny I (hs-TnI) a spadkiem perfuzji mikrokrążenia. Może to sugerować, iż słabiej wykształcona sieć mikrokrążenia u pacjentów na wcześniejszym etapie rozwoju choroby wieńcowej nie stanowi wystarczającego zabezpieczenia przed niedokrwieniem w trakcie zamknięcia naczynia wieńcowego.

Analizując grupę zespoleń tętnicznych, stwierdzono istotną dodatnią korelację ($r=0.521$, $p=0.002$) pomiędzy wartością perfuzji mikrokrążenia ocenianą po wykonaniu zespolenia z rejestrowaną jednocześnie wartością przepływu przez graft naczyniowy ocenianą techniką TTFM.

Na podkreślenie zasługuje fakt, iż przeprowadzone badanie jest pierwszą na świecie analizą zachowania mikrokrążenia miokardium ludzi na bijącym sercu podczas zamknięcia przepływu przez naczynie wieńcowe. Uzyskane wyniki w dużej mierze są zgodne z wnioskami wpływającymi z publikacji dotyczących zachowania mikrokrążenia w modelach zwierzęcych, m.in. w zakresie korelacji perfuzji mikrokrążenia z przepływem przez naczynie zaopatrujące dany obszar miokardium. Niemniej, co nowatorskie, przedstawiona praca pokazuje skuteczność istniejących mechanizmów protekcji serca przed niedokrwieniem u pacjentów z zaawansowaną chorobą wieńcową.

7. Wnioski

1. Zastosowanie laserowego przepływomierza dopplerowskiego zaopatrzonego w sondę igłową jest bezpieczną i skuteczną metodą oceny mikrokążenia serca podczas zabiegów kardiologicznych.
2. Przepływ przez mikrokążenie serca utrzymuje się na stałym poziomie u zdecydowanej większości pacjentów podczas zamknięcia tętnicy wieńcowej. Sugeruje to obecność dobrze wykształconych mechanizmów protekcyjnych w postaci sieci krążenia obocznego u pacjentów z zaawansowaną chorobą wieńcową. Zaobserwowano, iż wystąpienie objawów niestabilności hemodynamicznej lub cech niedokrwienia mięśnia sercowego wiąże się z spadkiem perfuzji mikrokążenia miokardium.
3. Wykazano silną dodatnią zależność pomiędzy wielkością spadku perfuzji mikrokążenia serca a wartością stężenia troponiny wysokoczułej.
4. Wartości przepływu przez graft naczyniowy zaopatrujący dany obszar miokardium wykazują istotną dodatnią korelację z wartościami przepływu przez mikrokążenie ocenionymi po wykonaniu zespolenia naczyniowego.

8. Streszczenie w języku angielskim

8.1. Introduction

Coronary heart disease is the leading cause of death in the European Union. It is a pathological condition caused by insufficient supply of myocytes with oxygen and nutrients. The most common cause of the disease is coronary atherosclerosis. Atherosclerotic plaques cause impaired blood flow through the coronary bed, leading to impaired blood flow to the heart muscle cells. This causes symptoms in the form of angina that increases as the disease progresses. Another symptom of coronary artery disease may be rupture of unstable atherosclerotic plaque leading to acute coronary syndrome. One of the treatment options for coronary artery disease is, besides optimal medical treatment (OMT), myocardial revascularization: percutaneous or surgical.

Treatment of a patient with coronary artery disease depends on the form of the disease. The management of patients with stable coronary artery disease or acute coronary syndrome has been set out in the guidelines on myocardial revascularization by the European Society of Cardiology. The benefits of using myocardial revascularization over OMT have been proven in numerous clinical studies and meta-analyses. The decision on the choice of revascularization method is made by the members of the Heart Team based on clinical data and, among others, the complexity of coronary artery disease presented in the form of Syntax Score.

Coronary angioplasty is a routine minimally invasive method of treating coronary artery disease. It consists in balloonoplasty and implantation of stents for coronary artery stenosis. In turn, surgical revascularization involves coronary artery bypass surgery (CABG). Typical surgical access is medial sternotomy. Coronary artery bypass surgery can be performed in two ways: on a beating heart with the use of a myocardium stabilizer and on a stopped heart with

the use of extracorporeal circulation, whose task is to maintain peripheral perfusion and blood oxygenation.

The microcirculation vessels constitute a large part of the circulatory system, however, due to the microscopic dimensions, heterogeneous morphology and varied blood flow associated with organ-specific metabolic demand, this is an area whose studies are complicated; they require specialized equipment and extensive experience. At the level of microcirculation, intense gas and metabolic exchange occurs, and the optimal reactivity of microcirculation vessels in response to ischemia is crucial to reduce the degree of tissue damage.

Microcirculation and its changes also have a significant impact on the pathophysiology of coronary artery disease. It is assumed that the diameter of collateral vessels in people without coronary artery disease is 10-200 μm , while in patients with coronary artery disease it is 100-800 μm . The development of coronary circulation goes through two physiological processes: arteriogenesis and angiogenesis. Arteriogenesis is the development of existing collateral circulation. Already during foetal and neonatal life, collateral vessels are formed that can supply ischemic areas at risk of myocardial infarction. Shear forces are the most important trigger for arteriogenesis. By increasing the concentration of nitric oxide, the production of vascular endothelial growth factor (VEGF) and the protein MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), monocytes are activated, which induces cell proliferation and prepare the extracellular space for cell migration. The arteriogenesis process ceases when the shear forces return to their original level. Angiogenesis, induced primarily by hypoxemia, consists in the formation of completely new vessels. Through growth factors such as 1-alpha hypoxemia, VEGF and inflammatory factors and cells, endothelial and smooth muscles' cells proliferate and migrate.

Coronary artery bypass surgery may be associated with a number of cardiovascular complications such as transient ischemia, acute coronary syndrome, arrhythmias and haemodynamic instability. There is compelling scientific evidence suggesting that well-

developed collateral coronary circulation can protect against the effects of myocardial ischemia by maintaining adequate tissue perfusion and provides better prognosis for patients with advanced coronary artery disease. Therefore, it seems that intraoperative assessment of microcirculation perfusion during CABG procedures may have significant clinical application in predicting myocardial ischaemia.

Assessment of cardiac microcirculation behaviour in patients with coronary artery disease, due to the difficult accessibility of the test area and the invasiveness of measurements, is extremely difficult. Literature on this topic is significantly limited. Most studies on the direct assessment of microcirculation on a beating heart were performed on animal models. Only one group used the laser Doppler flowrate to perform microcirculation testing in patients with coronary artery disease during coronary artery bypass surgery using extracorporeal circulation and cardiac arrest. To the best of our knowledge, no one has ever made continuous measurements of microcirculation flow on a beating heart during coronary artery bypass surgery.

8.2. Aim of the study

The main aims of the work are:

1. To determine the clinical usefulness of the laser Doppler flowrate (LDF) in the assessment of cardiac microcirculation in patients with coronary artery disease undergoing coronary bypass surgery on the beating heart.
2. To study the cardiac microcirculation behaviour assessed continuously during coronary bypass surgery on the beating heart in patients with coronary artery disease.
3. To analyse the correlation between changes in microcirculation perfusion during coronary artery bypass surgery and biochemical markers of myocardial infarction.

4. To assess the relationship between microcirculation perfusion and flow through vascular grafts.

8.3. Materials and methods

The study group consisted of 26 patients with coronary artery disease qualified for coronary artery bypass surgery. In 25 cases, coronary bypass surgery was performed without using extracorporeal circulation, in one case extracorporeal circulation was used to stabilize the circulatory system. Ten patients were hospitalized for myocardial infarction, the remaining patients were admitted to the hospital due to stable coronary artery disease. One patient was operated on as a matter of urgency, others were in scheduled mode. All operations were carried out between November 2018 and April 2019. The average age of patients was 64.9 ± 7.2 years, 20 patients were men while 6 were women. A total of 54 anastomoses of vascular grafts to coronary arteries were analysed, which was the basic unit of analysis in the study.

The research carried out as part of the doctoral dissertation was carried out at the Cardiac Surgery Clinic of the No. 1 University Hospital named after A. Jurasz in Bydgoszcz. The research protocol was approved by an independent bioethics commission at the Nicolaus Copernicus University in Toruń (KB 703/2018).

All participants received written information about the study protocol and expressed informed and written consent to participate in the study, while obtaining the right to withdraw from the study at any time.

All operations were carried out by one cardiac surgeon according to an identical anaesthesia protocol. Surgical access was medial sternotomy, while internal pectoral arteries and / or saphenous veins were used as the bridging material. Tissue stabilizer (Octopus Tissue Stabilization System, Medtronic, USA) was used to stabilize myocardium during anastomoses.

The Doppler laser flowmeter (LDF) method was used to assess microcirculation in myocardium during CABG procedures. The essence of the laser-Doppler method is to emit deeply into the tissue a monochromatic laser light with a narrow band, from red to near infrared. The radiation beam floats within the examined area. Photons encounter moving blood cells on their way, changing the frequency of their vibrations according to the Doppler phenomenon. Returning light is then analysed using a photo-detection system, and the device generates a voltage that is directly proportional to the speed and number of moving blood cells in the test area. The device registers blood supply in the examined tissue area in arbitrary perfusion units (PU).

Periflux 5000 apparatus (Perimed, Järfälla, Sweden) with a dedicated needle probe (Stainless Steel Probe 411-311, Perimed, Järfälla, Sweden) was used to perform the microcirculation perfusion test. During coronary bypass surgery, the probe was inserted into the myocardium to a depth of 3 - 5 mm distal to the planned vascular anastomosis area. The measurement was carried out continuously, 3 minutes before commencing the anastomosis, during its execution and for 3 minutes after the bypass. All measurements were digitally saved and developed using Perisoft 2.5.5. (Perimed, Järfälla, Sweden). 54 anastomoses were performed. Patients were divided into two groups depending on the percentage decrease in microcirculation perfusion after coronary vessel occlusion and the clinical symptoms presented. For analytical purposes, a perfusion drop of at least 15% was considered statistically significant.

In addition, after each anastomosis, vascular graft flow measurements were carried out using the TTFM (Transit Time Flowmetry Measurement) method. The tests were conducted with a dedicated probe after choosing the right size depending on the diameter of the vascular graft. The essence of the TTFM method is Doppler shift assessment. The volume of blood flowing is determined by the difference in the time of passage of the ultrasonic wave sent by

the probe. The flow value is expressed in ml/min and correlated with values of microcirculation perfusion, which was measured simultaneously and expressed in PU.

Immediately after the procedure, each of the operated patients received blood for biochemical determinations of high-sensitivity troponin I (hs-TnI, high-sensitivity troponin I), which was taken every 12 hours until reaching the highest level that was used for analysis. The level of hs-TnI was determined using commercially available laboratory tests. The hs-TnI concentration was analysed for correlation with the values of microcirculation perfusion changes in those patients who experienced a decrease in perfusion after coronary occlusion.

8.4. Overview of the publications included in the dissertation

The doctoral dissertation was presented in three articles published in peer-reviewed international journals. The cycle opening work is a pilot study and is the first scientific report presenting an invasive measurement of myocardial microcirculation during coronary artery bypass grafting on the beating heart. The second paper, demonstrative and methodological in nature, presents the laser Doppler flowmetry and the possibilities of its application in the direct assessment of microcirculation in myocardium. Another original work presents the study of microcirculation perfusion on a beating heart in a group of patients with coronary artery disease undergoing coronary artery bypass surgery and confirms the observations made during the pilot study.

8.4.1. Publication 1

The introduction to the cycle is an article entitled "*A mystery of the myocardial microcirculation during coronary artery bypass grafting*" published in the *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* in 2018. The paper presents a pilot invasive study of cardiac microcirculation during coronary artery bypass surgery. It has been observed that stopping blood flow by clamping the coronary artery does not cause a decrease in microcirculation

perfusion. It has been hypothesized that the well-developed collateral circulation seen on coronary angiography is responsible for delivering blood to the distal areas of the revascularized artery. This work became an inspiration for further research on the behaviour of microcirculation on the beating heart during CABG surgeries.

8.4.2. Publication 2

Review paper "*Laser Doppler flowmetry to assess myocardial microcirculation*" was accepted for publication in the *Cardiology Journal* in the form of *Technology Note*. The paper presents the principle of operation of the Doppler laser flowmeter technique, discusses the course of the study and how to analyse and interpret the results. In addition to technical and methodological aspects of measurements, attention was paid to the possibility of assessing microcirculation perfusion during cardiac surgery, which may be important in the context of monitoring and predicting myocardial ischemia.

8.4.3. Publication 3

From a scientific point of view, the most important part of the presented series of publications is the original work entitled "*Invasive Assessment of the Myocardial Microcirculation during Beating Heart Coronary Artery Bypass Grafting*" published in the *Journal of Clinical Medicine*. It is a development of previously acquired knowledge about the principle of operation of a laser Doppler flowmeter and it is aimed at confirming the hypotheses made when creating the first publication on a larger group of patients.

In the work, microcirculation perfusion on the beating heart was continuously assessed during 54 anastomoses of vascular grafts to coronary arteries. Based on the tests performed, in most situations ($n = 42$), no statistically significant differences ($p = 0.110$) were found in the average resting perfusion value compared to the perfusion value after coronary artery clamp and relative to the signal measured during reperfusion (732.4 ± 148.0 vs. 711.4 ± 144.1 vs.

737.0 ± 141.2). Continuously measured perfusion remained constant regardless of the stage of the procedure being carried out. Only in a small subgroup of patients during anastomoses (n = 12) a statistically significant decrease in perfusion after coronary artery clamping (p < 0.001) and a further increase in perfusion after coronary blood flow restoration (805.4 ± 200.1 vs. 577.2 ± 212.8) vs. 649.3 ± 220.8) were observed. In 6 cases, a decrease in perfusion occurred during bypassing the internal thoracic artery to the diagonal branch, which could be explained by less developed collateral circulation in this area of myocardium. In other cases, haemodynamic instability symptoms and myocardial ischemia were associated with a significant decrease in microcirculation perfusion.

In addition, patients who experienced a decrease in myocardial microcirculation perfusion during coronary flow occlusion were analysed. A strong positive correlation (r = 0.854, p < 0.001) was found between the postoperative value of high-sensitive troponin I (hs-TnI) and a decrease in microcirculation perfusion. This may suggest that the less well-developed microcirculation network in patients at an earlier stage of coronary artery disease development is not sufficient protection against ischemia during coronary vessel occlusion.

Analysing the arterial anastomosis group, a significant positive correlation (r = 0.521, p = 0.002) was found between the microcirculation perfusion value evaluated after anastomosis with the simultaneously recorded flow value through the vascular graft assessed using the TTFM.

It should be emphasized that the study is the world's first analysis of the myocardial microcirculation behaviour of people on the beating heart during the closing of the flow through the coronary vessel. The obtained results are largely consistent with the conclusions arising from publications on the behaviour of microcirculation in animal models, including in the scope of correlation of microcirculation perfusion with flow through the vessel supplying a given area of myocardium. Nevertheless, what is innovative, the presented work shows the effectiveness

of existing mechanisms of cardiac protection against ischemia in patients with advanced coronary artery disease.

8.5. Conclusions

1. The use of a laser Doppler flowmeter equipped with a needle probe is a safe and effective method of assessing cardiac microcirculation during cardiac surgery.
2. Flow through the heart's microcirculation remains stable in the vast majority of patients during coronary artery occlusion. This suggests the presence of well-developed protective mechanisms in the form of collateral circulation in patients with advanced coronary artery disease. It has been observed that the appearance of haemodynamic instability symptoms or myocardial ischemia is associated with a decrease in myocardial microcirculation perfusion.
3. A strong positive relationship was demonstrated between the magnitude of the decrease in cardiac microcirculation perfusion and the value of high-sensitive troponin.
4. Values of flow through the vascular graft supplying a given area of myocardium show a significant positive correlation with the values of microcirculation flow assessed after vascular anastomosis.

10. Piśmiennictwo

- ¹Hueb W, Lopes N, Gersh B i wsp. Ten-Year Follow-Up Survival of the Medicine, Angioplasty, or Surgery Study (MASS II). *Circulation* 2010; 122: 949–957.
- ²Neumann FJ, Sousa-Uva M i wsp. 2018 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization. *European Heart Journal*; 2019: 87–165.
- ³Yusuf S, Zucker D, Peduzzi P i wsp. Effect of coronary artery bypass graft surgery on survival: overview of 10-year results from randomised trials by the Coronary Artery Bypass Graft Surgery Trialists Collaboration. *Lancet* 1994; 344: 563–570.
- ⁴Windecker S, Stortecky S, Stefanini GG i wsp. Revascularisation versus medical treatment in patients with stable coronary artery disease: network meta-analysis. *BMJ* 2014; 348: g3859.
- ⁵Kim YH, Park DW, Kim WJ, Lee JY, Yun SC, Kang SJ, Lee SW, Lee CW, Park SW, Park SJ. Validation of SYNTAX (Synergy between PCI with Taxus and Cardiac Surgery) score for prediction of outcomes after unprotected left main coronary revascularization. *JACC Cardiovasc Interv.* 2010 (6):612-23.
- ⁶Hellmann M, Roustit M, Cracowski JC. Skin microvascular endothelial function as a biomarker in cardiovascular diseases? *Pharmacological Reports* 2015: 803–810.
- ⁷Johnson, P.C. Overview of the microcirculation. In *Handbook of Physiology: Microcirculation*; 2nd edition 2008.
- ⁸Fulton W.F. Arterial Anastomoses in the Coronary Circulation. Anatomical Features in Normal and Diseased Hearts Demonstrated by Stereoarteriography. *Scott. Med. J.* 1963: 420–434.
- ⁹Zimarino M, D'Andreamatteo M, Waksman R, Epstein S, De Caterina R. The dynamics of the coronary collateral circulation. *Nature Reviews Cardiology* 2014: 191-197.
- ¹⁰Reto B.M. Seiler C. The Human Coronary Collateral Circulation, Its Extracardiac Anastomoses and Their Therapeutic Promotion. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 3726.
- ¹¹Bierbach B, Scheewe J, Derfuss T, Krug A, Schramm R, Dahm M, Kuroczynski W, Kempfski O, Horstick G. Continuous regional myocardial blood flow measurement: validation of a near-infrared laser Doppler device in a porcine model. *Microcirculation* 2012: 485–493.
- ¹²M. G. D. Karlsson, C. Fors, K. Wardell, H.Casimir-Ahn. Myocardial perfusion monitoring during coronary artery bypass using an electrocardiogram-triggered laser Doppler technique. *Med. Biol. Eng. Comput* 2005: 582-588.