



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

ȘCOALA DOCTORALĂ

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Evaluarea factorilor prognostici și de risc în ischemia critică a membrelor inferioare

Doctorand: **Răzvan – Alexandru Ciocan**

Conducător de doctorat: **Prof. Dr. Habil. Sorana D. Bolboacă**

Cluj - Napoca 2018

CUPRINSUL TEZEI DE DOCTORAT

INTRODUCERE	1
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	3
1. Ischemia critică a membrelor inferioare	5
1.1. Definiție	5
1.2. Epidemiologia ischemiei critice a membrelor inferioare	5
1.3. Etiologia ischemiei critice	8
1.4. Patogeneza	9
1.5. Factori de risc și prognostic	9
1.6. Investigații clinice și paraclinice	10
1.7. Tehnici chirurgicale de tratament	11
1.8. Terapiile medicamentoase	14
2. Biomarkeri plasmatici	15
2.2. Chitotriozidaza	15
2.2. Cotinina	16
3. Calitatea vieții pacienților cu ischemie critică a membrelor inferioare	19
3.1. Chestionarul SF-36 și derivațiile	20
3.2. Chestionarul EQ-5D	21
3.3. Chestionarul VasculQoL	22
3.4. Calitatea vieții la pacienții cu ischemie critică a membrelor inferioare	22
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	25
4. Management-ul clinic la pacienții cu ischemie critică a membrelor inferioare	25
4.1. Introducere	25
4.2. Obiective	26
4.3. Material și metodă	26
4.4. Rezultate	27
4.5. Discuții	33
4.6. Concluzii	38
5. Evaluarea chitotriozidazei ca marker al statusului inflamator în ischemia critică a membrelor inferioare	39
5.1. Introducere	39
5.2. Obiective	40
5.3. Material și metodă	40
5.4. Rezultate	41
5.5. Discuții	46
5.6. Concluzii	47
6. Nivelul cotininei serice ca factor predictor al necrozei sau gangrenei la pacienții cu ischemie critică a membrelor inferioare	49
6.1. Introducere	49
6.2. Obiective	50
6.3. Material și metodă	50
6.4. Rezultate	51
6.5. Discuții	53
6.6. Concluzii.	55
7. Calitatea vieții la pacienții cu ischemie critică a membrelor inferioare și relația cu chitotriozidaza și cotinina serică	57
7.1. Introducere	57
7.2. Obiective	59

7.3. Material și metodă	59
7.4. Rezultate	61
7.5. Discuții	74
7.6. Concluzii	75
8. Concluzii generale	77
9. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	79
REFERINȚE	81

Cuvinte cheie: ischemia critică a membrelor inferioare (CLI), chitotriozidaza, cotinina, calitatea vieții

INTRODUCERE

Ischemia critică a membrelor inferioare este cel mai sever stadiu al bolii arteriale periferice. Ischemia critică a membrelor inferioare are ca simptom principal durerea la nivelul membrelor inferioare și poate evolua către pierderea membrului afectat. Această patologie este asociată cu un risc crescut de producere a infarctului miocardic, accident vascular cerebral și chiar deces datorită afectării cardiace. Scopul managementului ischemiei critice a membrelor inferioare cuprinde atenuarea durerii, tratarea și vindecarea ulcerelor arteriale ale membrelor afectate, prevenirea amputației, îmbunătățirea funcționalității membrului, îmbunătățirea calității vieții și a ratei de supraviețuire.

Studiile prezentei cercetări au avut ca scop evaluarea factorilor care influențează evoluția acestei patologii și a identificării unor markeri capabili să semnaleze sau să cuantifice afectarea arterială provocată de ischemia critică. În această privință, au fost studiate caracteristicilor subiectului predispus la această patologie. Un prin studiu a avut ca scop analiza factorilor de risc pentru ischemia critică a membrelor inferioare (ex. vârsta, genul, fumat, diabet zaharat, obezitate, hipertensiunea arterială, etc.) și s-a analizat prezența relației dintre acești factori de risc și gradul de severitate al patologiei. A doua abordare, a avut ca scop analiza capacității de discriminare a doi biomarkeri relativ la stadiului de severitate al bolii. Astfel s-a analizat valoarea serică a cotininei și a chitotriozidazei cu rezultate semnificative în cadrul analizei chitotriozidazei ca marker al inflamației în ischemia critică a membrelor inferioare. Rămâne de studiat dacă valoarea crescută a chitotriozidazei din ser marchează instalarea ischemiei critice sau dacă această valoare crescută este de fapt prezentă și la pacienții cu stadii incipiente ale bolii arteriale periferice. Nivelul crescut de cotinină serică a fost asociată cu apariția tulburărilor trofice și a dezarticulațiilor de degete de la nivelul membrelor inferioare. Pentru a obține rezultate mai valoroase asupra influenței cotininei asupra patologiei este necesară mărirea lotului de studiu și controlarea tuturor factorilor de confuzie (ex. timpul de la ultima țigară fumată până la recoltarea probelor biologice, numărul de țigări fumate în ziua recoltării, ziua precedentă recoltării, etc.).

Având rezultate referitoare la aspectele demografice ale subiecților, ale factorilor de risc, ale comorbidităților, a nivelurilor de cotinină serică și de chitotriozidază serică, a treia abordare a avut ca scop evaluarea calității vieții pacienți cu ischemie critică a membrelor inferioare. Au fost astfel aplicate trei chestionare de calitate a vieții acestor pacienți și datele au fost corelate cu datele demografice, clinice și paraclinice. Rezultatele au fost comparate cu un lot martor și au fost semnificative statistic, rezultând faptul că pacienții cu ischemie critică a membrelor inferioare au o calitate a vieții mai scăzută față de cei din grupul martor.

Rezultatele obținute în cadrul studiilor întreprinse au fost publicate în reviste de specialitate din străinătate, unele dintre rezultate fiind, de asemenea, trimise spre publicare.

Studiul este unic în România prin înglobarea tuturor aspectelor ce țin de pacienții cu ischemie critică și prin încercarea de a decela factorii de risc și de prognostic ce produc această afecțiune. De asemenea este primul studiu la nivel mondial ce studiază chitotriozidaza ca marker al inflamației în cadrul ischemiei critice având rezultate promițătoare.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Partea de contribuții personale cuprinde patru studii.

Studiul a fost realizat în conformitate cu principiile Declarației de la Helsinki și a fost aprobat de către Comisia de Etică al Universității de Medicină și Farmacie Iuliu Hațieganu Cluj-Napoca (nr. 475/22.10.2015).

Din contribuțiile personale au fost publicate patru articole: un articol ISI în *Annals of Clinical & Laboratory Science* și trei articole BDI în *Proceedings of the 49th Annual Scientific Meeting of the European Society for Clinical Investigation 2015*, *Folia Medica* și respectiv *Acta Medica Transilvanica*.

Studiul I. Managementul clinic al pacienților cu ischemie critică a membrelor inferioare

Scop: Analiza managementul clinic al pacienților spitalizați cu ischemia critică a membrelor (CLI) la Clinica Chirurgie II din cadrul Spitalului Clinic Județean de Urgență Cluj-Napoca și de a identifica factorii de risc pentru amputație.

Material și metodă. Obiectivul 1: fișele medicale ale pacienților cu ischemia critică a membrelor inferioare ca diagnostic principal au fost analizate. CLI a fost definită în conformitate cu Consensul Inter-Societății Transatlantice (TASC) II. Informațiile care aparțin subiecților cu CLI ca diagnostic principal la externare și durere ischemică la repaus și gangrenă sau ulcerații ischemice care nu se vindecă, la internare (stadiile Fontaine 3 și 4) au fost colectate și stocate într-o bază de date. Au fost excluși din eșantion subiecții cu informații incomplete. Informațiile cu privire la aspectele demografice (sexul, vârsta, mediul și fumatul), co-morbidități (diabetul zaharat tip 2, hipertensiunea arterială, boli cardiace ischemice și tulburări de ritm cardiac), simptomele la internare (tipul de durere), opțiunile de tratament și stadiul la externare au fost colectate.

Obiectivul 2 a fost realizat tot prin colectarea datelor din fișele pacienților. Toți subiecții cu diagnosticul la externare de CLI sau PAOD (Peripheral Artery Occlusive Disease) au fost eligibili pentru studiu. Pacienții cu gradul II categoria 4 – durere ischemică de repaus (conform clasificării Rutherford a Bolii Arteriale Periferice) au fost incluși în grupul CLI. Pacienții cu gradul I categoria 3 – claudicația severă (în conformitate cu clasificarea Rutherford a Bolii Arteriale Periferice) au fost incluși în grupul PAOD. PAOD apare ca urmare a aterosclerozei și trombozei, caracterizată prin îngustarea arterelor care reduce circulația sângelui la nivelul membre afectate. Subiecții cu informații incomplete au fost excluși din studiu. Următoarele date au fost colectate din fișele medicale: date cu caracter demografic (genul, vârsta, mediul, fumat), co-morbidități (hipertensiunea arterială, boala cardiacă ischemică și tulburări de ritm cardiac), simptomele la internare (tipul de durere – durere continuă, durerea care remite în urma tratamentului), opțiunile de tratament (medical sau chirurgical) și statusul la externare. Pacienții cu ischemie acută, disfuncții vasculare periferice sau de origine inflamatorie sau imunologică, ulcere venoase, ulcere neuropate, sau boala Buerger au fost excluși.

Rezultate. Obiectivul 1. Vârsta pacienților a variat între 32 și 94, cu o medie de 66,22±10,40 ani. Raportul M:F (unde M = bărbați și F = femeile) a fost egal cu 4,25, cu o proporție semnificativ mai ridicată de bărbați în comparație cu femeile (81% bărbați, $P < 0,0001$). Majoritatea subiecților au prezentat durere continuă (59,18%), durerea fiind mai frecvent raportată de femei (64,29%) în comparație cu bărbații (57,98%). Complicațiile au fost observate la 9,75% din cazuri. Fumatul a fost identificat ca factor de risc semnificativ, puterea de clasificare a modelului de regresie identificat fiind de 83,9%.

Obiectivul 2. Eșantionul investigat a cuprins un procentaj semnificativ mai ridicat de pacienți cu PAOD în comparație cu CLI (67,63%, IC95% [64,01–71,12] vs. 32,37%, IC95% [28,88–35,99]; $P < 0,0001$). Procentul bărbați a fost semnificativ mai ridicat în comparație cu procentajul de femei (M(bărbați):F(femei) = 79,25%:20,75%, $P < 0,0001$). Majoritatea pacienților din ambele grupuri erau fumători (PAOD : CLI = 68,88% : 71,30%), fără o diferență semnificativă între grupuri ($P = 0,566$). Au existat 2,76% (IC95% [1,60–4,21]) pacienți care au decedat în eșantionul investigat, fără diferențe semnificative între grupuri CLI vs. PAOD ($P = 0,5685$). Analiza regresiei unidimensionale a identificat doar vârsta ca fiind un factor de risc semnificativ pentru amputație (OR = 1,03; IC95% [1,01– 0,05], $P = 0,0012$). Vârsta subiecților cu amputație a fost semnificativ mai mare comparativ cu vârsta subiecților fără amputație (fără vs. cu amputație: 66 ani (59-74) vs. 68 ani (61-79), testul Mann-Whitney: $P = 0,0041$).

Concluzii. Rezultatele raportate sugerează faptul că severitatea clinică a ischemiei critice a membrelor printre pacienții cu stadiul Fontaine 3 și 4 nu diferă între genuri, în contextul în care boala este semnificativ

mai frecventă printre bărbați. Fumatul a fost un factor de risc semnificativ pentru ischemia critică a membrelor și influențează pronosticul bolii.

Vârsta pacienților s-a dovedit a fi un factor de risc semnificativ pentru amputație și acest rezultat ar putea fi explicat atât de durata bolii cât și de perioada mai lungă ca fumător.

Studiul II. Evaluarea chitotriozidazei ca marker al statusului inflamator în ischemia critică a membrelor inferioare.

Scop: Evaluarea chitotriozidazei ca și marker al ischemiei critice a membrelor inferioare.

Material și metodă. S-a realizat un studiu observațional pe subiecți cu CLI investigați între noiembrie 2015 și decembrie 2016 în Spitalul Clinic Județean de Urgență din Cluj-Napoca, România și un număr egal de subiecți CLI indemni. Pentru grupul caz (CLI), principalul criteriul de includere a fost diagnosticul CLI, iar criteriile de excludere au fost alte boli, cum ar fi ischemia acută, tulburări vasculare periferice de origine imună sau inflamatorie, ulcere venoase și neuropatice sau boala Buerger.

Teste de mers (urcatul și coborâtul scărilor și covorul rulant) și IGB (indicele gleznă-braț) au fost utilizate pentru clasificarea pacienților conform claselor Rutherford. Au fost incluși în studiu pacienți cu gradul II conform calcificării Rutherford (durere de repaus cu presiunea gleznei <40 mm Hg, presiunea piciorului <30 mmHg), IIIa (durere de odihnă cu presiunea gleznei <60 mmHg, presiunea picioarelor <40 mmHg) și IIIb presiune <60 mmHg, presiune la picioare <40 mmHg) cu durere de repaus ischemică și o pierdere de țesut minoră sau majoră. Au fost notate semnele și simptomele CLI (durere, tegumente reci, absența pilozității, tulburări trofice) și manoperele chirurgicale (disarticulație, amputație, necrectomie).

Pentru ambele grupuri au fost colectate date demografice (vârstă, gen, mediu de proveniență, educație) și prezența factorilor de risc (greutate, înălțime, statusul de fumător). Pentru analiza activității chitotriozidazei, probele de sânge au fost centrifugate în mai puțin de o oră de la colectare și stocate la -20°C până la analiza ulterioară. Activitatea chitotriozidazei plasmice a fost măsurată la toți subiecții folosind un substrat artificial fluorescent.

Rezultate. Majoritatea pacienților cu CLI au prezentat următoarele manifestări clinice: durere continuă (durere continuă vs. claudicație intermitentă = 79,07% față de 20,93%, $P < 0,0001$) față de 11,63%, $P < 0,0001$), pilozitate (absență vs. prezență = 88,37% vs. 11,63%, $P < 0,0001$), tulburări trofice (da vs. nu = 95,35% față de 4,65%, $Z\text{-stat} = -28,24$, $P < 0,0001$). Valorile activității chitotriozidazei au variat între 110-1530 nmol/ml/oră în grupul CLI și între 30-440 nmol/ml/oră în grupul martor. Valoarea medianei și IQR (IQR=(Q1-Q3) unde Q=cvartila) au fost de 460 (260-810) nmol/ml/oră în grupul CLI și 130 (80-180) nmol/ml/oră în grupul martor, cu valori semnificativ mai mari la pacienții CLI (testul Mann-Whitney: $P < 0,0001$). Activitatea chitotriozidazei a prezentat un nivel semnificativ mai mare la fumători comparativ cu nefumători atât în grupul caz cât și în grupul martor. Valorile medianei au fost aproximativ duble față de cele observate la subiecții care nu fumează, fie CLI, fie martori. Capacitatea de discriminare a chitotriozidazei ca biomarker inflamator în CLI a fost evaluată prin analiza ROC (Receiver Operating Characteristic Curve). Pe baza valorii maxime a indexului Youden J, sensibilitatea a fost de 0,714 (0,554-0,843) iar specificitatea de 0,951 (0,835-0,994), corespunzând unui nivel prag de 325 nmol/ml/oră. Rolul fumatului ca variabilă de confuzie poate fi redus prin utilizarea valorilor prag: 325 nmol/ml/h pentru nefumători și 450 nmol/ml/h pentru fumători. Conform rezultatelor raportate, valorile peste aceste praguri pot fi considerate ca un semn de avertizare, indicând activarea unui răspuns inflamator la pacienții cu CLI.

Concluzii. Acest studiu prezintă prima evaluare a chitotriozidazei ca biomarker al inflamației la pacienții cu CLI. O dată ce alte condiții inflamatorii au fost excluse, interpretarea valorilor sale ridicate trebuie să țină cont de răspunsul inflamator indus de expunerea la tutun.

Studiul III. Nivelul cotininei serice ca factor predictor al necrozei sau gangrenei la pacienții cu ischemie critică a membrelor inferioare.

Scop. Cuantificarea măsurii în care fumatul (evaluarea cotininei serice) este relaționat cu evoluția ischemiei critice a membrelor inferioare.

Material și metodă. Acest studiu a fost un studiu transversal observațional realizat între noiembrie 2015 și decembrie 2016 la pacienții admiși la Clinica de Chirurgie II a Spitalului Clinic Județean de Urgență

Cluj-Napoca, România. Eșantionul studiat în cazul chitotriozidazei (vezi studiul 2) a fost același cu acest eșantion, metodele de colectare a datelor fiind aceleași. În timpul procesului de diagnosticare, a fost colectată o probă de sânge pentru măsurarea cantitativă a concentrației de cotinină. Probele de ser au fost păstrate la -20°C înainte de analiză. Cuantificarea nivelurilor de cotinină serică a fost efectuată printr-un test immunosorbent legat de enzimă (ELISA), utilizând un kit disponibil comercial (Novus Biologicals), conform instrucțiunilor fabricantului. Concentrațiile au fost calculate utilizând o ecuație de regresie liniară și s-au exprimat în ng/ml.

Rezultate. Eșantionul investigat a fost de patruzeci și trei de pacienți, cu vârsta cuprinsă între 34 și 77 de ani, cu o vârstă medie de $60,74 \pm 10,46$ ani și un procent semnificativ mai mare de bărbați (M:F = 83,72%:16,28%, $P < 0,0001$). Nu s-au identificat diferențe semnificative statistic între grupuri în ceea ce privește simptomele, semnele sau comorbiditățile, când pacienții cu cotinină serică sub 15 ng/ml au fost comparați cu cei cu valori peste 15 ng/ml. Cu toate acestea, necrectomia a fost efectuată mai frecvent la pacienții cu cotinină serică > 15 ng/ml ($P < 0,05$ ng/ml). Analiza ROC a arătat că nivelul de cotinină serică poate fi considerat un biomarker fie pentru necrectomie, fie pentru disarticulație. Pe baza nivelului prag egal cu 9,765 ng/ml, un risc de necrectomie de 53,33% a fost înregistrat la pacienții cu niveluri de cotinină mai mari sau egale cu acest prag, în timp ce un risc de 14,29% a fost detectat la cei cu niveluri de cotinină sub prag; riscul relativ fiind de 3,733 (IC95%: 1,208 până la 12,659, testul Fischer exact, $P = 0,012$). Pentru disarticulația de deget (membru inferior), utilizând valoarea prag de 23,045 ng/ml, riscul calculat la pacienții cu valori mai mari ale cotininei a fost de 38,46%, comparativ cu doar 6,67% la cei cu niveluri mai scăzute. Riscul relativ calculat a fost de 5,679 (IC 95%: 1,118 până la 41,018, probabilitatea de test Fischer Exact, $P = 0,019$). S-a constatat un rezultat semnificativ statistic pentru asocierea fumătorilor cu CLI și necrectomie pentru o valoare prag de 9,765 ng/ml. Pentru dezarticulația de deget, nivelul prag al cotininei a fost de 23,045 ng/ml.

Concluzii Pacienții cu concentrație de cotinină serică mai mare de 9,765 ng/ml au avut un risc relativ de 3,733 pentru leziuni trofice care necesită necrectomie, în timp ce la pacienții cu concentrație de cotinină serică mai mare de 23,045 ng/ml, riscul relativ de dezarticulația degetelor de la nivelul membrelor inferioare a fost de 5,679. Deși cotinina nu este un predictor direct al severității bolii, prezentul studiu a arătat că valorile sale crescute pot sugera un risc mai mare de leziuni trofice și prognostic nefavorabil.

Studiul IV: Calitatea vieții la pacienții cu ischemie critică a membrelor inferioare și relația cu chitotriozidaza și cotinina serică

Scop. Scopul acestui studiu a fost de a evalua calitatea vieții la pacienții cu ischemie critică a membrului inferior comparativ cu pacienții cu patologie venoasă a membrului inferior de a identifica relația dintre prezența complicațiilor și calitatea vieții și relația dintre valorile biomarkerilor serici (chitotriozidaza și cotinina) și calitatea vieții.

Material și metodă. Acest studiu a fost un studiu observațional, patologia de interes fiind ischemia critică a membrelor inferioare, iar grupul de control fiind reprezentat de subiecți cu patologie venoasă de membre inferioare. Studiul a fost realizat în perioada Noiembrie 2015 – Mai 2017 pe pacienții spitalizați în Clinica Chirurgie II din cadrul Spitalului Clinic Județean de Urgență din Cluj-Napoca. Pacienții eligibili în studiu au fost cei diagnosticați cu ischemie critică a membrelor inferioare (grad Rutherford II, IIIa și IIIb) pentru grupul caz, respectiv cu insuficiență venoasă cronică pentru grupul martor. Pacienții excluși din studiu au fost cei necooperanți, cei care au refuzat participarea la studiu și cei care nu îndeplineau criteriile de includere.

După completarea unui consimțământ informat, pacienții care și-au dat acordul de participare au fost evaluați clinic și rugați să răspundă la întrebările celor trei chestionare de evaluare a calității vieții (SF-36, EuroQol 5D și VasuQol, varianta în limba Română). Chestionarul SF-36 include opt concepte ale stării de sănătate: limitări ale activităților fizice, limitări ale activităților sociale, limitări ale activităților obișnuite, durere, starea sănătății mintale, probleme emoționale ce pot cauza limitări ale activităților obișnuite, starea de energie și percepția generală a stării de sănătate. Chestionarul EuroQol 5D conține cinci concepte majore care sunt investigate: mobilitate, auto-întreținere, activități obișnuite, durere/discomfort și anxietate/depresie. Chestionarul VasuQol cuprinde 25 de itemi care vizează furnizarea de informații privind afecțiunile patologice, semnele și simptomele pacienților cu ischemie critică a membrelor inferioare. Pentru a se asigura că toate interviurile cu pacienții au fost efectuate la aceleași standarde și cu aceleași proceduri s-a

folosit un singur investigator care a notat răspunsurile pacienților, interviul fiind realizat prin metoda “față-în-față”. Durata totală a interviului a fost de 45 minute. Toate răspunsurile pacienților au fost transcrise de aceeași persoană într-o bază de date și au fost corelate cu date anamnestice, paraclinice și de tratament ale pacienților.

Rezultate. Au fost incluși în studiu 160 subiecți, 100 pacienți cu icemie critică a membrelor inferioare (IC) și 60 cu afecțiune venoasă (AV). Subiecții au avut vârsta cuprinsă între 31 și 88 ani, jumătate dintre ei fiind cu vârsta mai mică sau egală cu 64 ani. Majoritatea pacienților din grupul IC au prezentat durere continuă (durere continuă vs. claudicație intermitentă: 79%, IC95% [70,01–86,99] vs. 21%, IC95% [13,01–29,99]). Prezentarea cu durere continuă a fost semnificativ mai frecventă comparativ cu durerea intermitentă ($P < 0,0001$). Toți pacienții din grupul AV au prezentat alt tip de durere decât continuă sau intermitentă. În grupul pacienților cu ischemie critică a membrelor inferioare, s-a evidențiat o relație semnificativă statistic între prezența pilozității și tegumente calde vs. reci (testul Fisher exact: $P = 0,0001$). O asociere semnificativă statistic a fost identificată între prezența tulburărilor trofice pe de o parte și tegumentele, respectiv pilozitatea de la nivelul membrelor inferioare pe de altă parte (testul Fisher exact: $P < 0,0001$). Un număr semnificativ statistic mai mare din pacienții cu ischemie critică au avut pulsurile distale absente la internare (76%, statistica $Z = 12,18$; $P < 0,0001$). Jumătate din pacienții cu ischemie critică au fost internați 8,5 zile (interval cvartilic (7–14)) comparativ cu 6 zile (interval cvartilic (4–7)) de internare înregistrate la pacienții cu insuficiența venoasă, diferența fiind semnificativă statistic (testul Mann-Whitney: $P < 0,0001$). Fără nici o excepție, calitatea vieții pacienților cu ischemie critică a membrelor inferioare a fost semnificativ mai scăzută comparativ cu pacienții cu afecțiune venoasă a membrelor inferioare ($P < 0,0001$). Diferențe semnificative statistic au fost identificate între femei și bărbați, cu afectarea mai mare a femeilor la nivelul componentei emoționale și sociale a chestionarului VasculQol. Gangrena, necroza, dezarticulația a cel puțin un deget de la nivelul membrelor inferioare, amputația sau prezența ulcerului la nivelul membrului inferior au fost considerate complicații. Distribuția acestora este în conformitate cu patologia fiecărui grup în parte, doar ulcerul fiind prezent la ambele grupuri dar cu frecvență semnificativ mai mare la pacienții cu afecțiune venoasă a membrelor inferioare. Nu au existat diferențe semnificative statistic în ceea ce privește rezultatele obținute la aplicarea chestionarelor de calitate a vieții în grupul pacienților cu ischemie critică a membrelor inferioare cu diferite localizări ale amputației (Friedman Anova: $P > 0,37$). Valorile chitotriozidazei au fost semnificativ mai mari la pacienții cu ischemie critică a membrelor inferioare (mediana = 460 nmol/ml/h (275–805)) comparativ cu pacienții cu varice (mediana = 180 nmol/ml/h (110–515)) (testul Mann-Whitney: statistica = 2,09; $P = 0,0367$). Nu același fenomen a fost identificat la compararea cotininei (ischemie critică membre inferioare vs. varice: 0,02 nmol/ml/h (0,00–82,07) vs. 0,30 nmol/ml/h (0,00–23,25); testul Mann-Whitney: $P = 0,7723$). Analiza ROC a identificat pentru chestionarul EQ5D o valoare prag de 7,50 capabilă să discrimineze pacienții cu ischemie critică de membre inferioare față de cei cu varice. Aria de sub curbă a avut valoarea de 0,9965 (IC 95% [0,9880–1,0000]), eroarea standard 0,0043. Au fost identificate corelații slabe între diferite componente ale chestionarelor aplicate și unele caracteristici ale pacienților cu ischemie critică a membrelor inferioare. (exemplu: în cadrul chestionarului SF36 între Oboseală și DZ tip II, între statusul general al pacientului și fumat).

Concluzii. Au fost identificate diferențe semnificative între cele două sexe, cu afectarea preponderentă a sexului feminin în cadrul chestionarului VasculQol la nivelul componentelor emoționale și sociale, la pacienții caz, cu CLI. Cel mai frecvent tip de amputație, fiind cel de coapsă (78%), calitatea vieții cu IC este profund afectată, cu efecte negative atât asupra statusului funcțional, cât și asupra relațiilor sociale și stării psihologice. Calitatea vieții pacienților cu ischemie critică a fost diferită semnificativ față de pacienții cu insuficiență venoasă cronică, iar referitor la nivelul seric al chitotriozidazei, s-au înregistrat valori mai mari la pacienții cu ischemie critică.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Studiul de față este primul din literatură, care a evaluat factorii prognostici ai ischemiei critice a membrelor inferioare relaționați cu doi biomarkeri, chitotriozidaza și respectiv cotinina. Chitotriozidaza s-a dovedit a fi un marker al inflamației în ischemia critică a membrelor inferioare. Este necesar efectuarea unor studii suplimentare, care să releve dacă chitotriozidaza poate fi utilizată ca marker și în boala arterială periferică în ansamblu. De asemenea, acest studiu a avut ca scop identificarea unui marker al fumatului, având în vedere faptul că se cunoaște fumatul, ca fiind unul dintre cei mai importanți factori de risc implic în

apariția bolii arteriale periferice, care să ajute clinicienii în a identifica persoanele la risc, cele cu afectare subclinică. Astfel am dozat cotinina serică în vederea evidențierii unei relații între aceasta și ICMI. S-a evidențiat relația acesteia cu tulburările trofice și dezarticulațiile de degete la pacienții cu ICMI. Este necesar efectuarea unui studiu pe un lot mai mare de subiecți și de a se găsi un mod mai exact de cuantificare a fumatului pentru a vedea dacă cotinina serică poate fi un factor predictiv al acestei patologii. În literatura de specialitate s-au mai fost efectuate studii în care s-a dozat cotinina urinară la pacienții cu boală arterială periferică, dar nu a mai fost efectuat niciun studiu în care să se dozeze cotinina serică la pacienții cu ischemie critică a membrelor inferioare. O fază a studiului a constat în aplicarea de chestionare de calitate a vieții. Rezultatele studiului au fost semnificative statistic, starea subiecților fiind profund influențată de patologia arterială și povara adusă de aceasta prin complicații.

Dacă în privința chitotriozidazei este primul studiu de acest gen, cotinina serică alături de cea urinară au mai fost studiate, în cadrul bolii arteriale periferice. Studiile au evidențiat cotinina urinară ca fiind un biomarker specific al bolii arteriale periferice, dar numai la pacienții fumători cronici. Pacienții foști fumători au niveluri de cotinină urinară nule datorită excreției acesteia prin tractul urinar. Cotinina serică poate fi considerată mai sensibilă față de cea urinară datorită faptului că este prezentă mai mult timp în corp, însă și dozarea acesteia este influențată de momentul când subiectul a fumat ultima țigară.

Rezultatele studiului au subliniat faptul ca ischemia critică a membrelor inferioare este o patologie cu un impact marcat asupra calității vieții. Calitatea vieții acestor pacienți este mult scăzută față de cea a altor grupuri în deosebi prin complicațiile care survin în urma acestei patologii. Axându-ne pe evaluarea calității vieții pacienților cu ischemie critică putem încerca strategii terapeutice, care să prevină alterarea statusului lor funcțional și social.

Acțiunea de a corobora rezultatele obținute din evaluarea factorilor de risc, a co-morbidităților și a calității vieții ne poate ajuta în identificarea factorilor prognostici care să permită evaluarea cât mai exactă a acestei patologii într-o etapă precoce în încercarea de a preveni apariția ei și de a conferii pacienților o calitate a vieții cât mai bună.



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

DOCTORAL SCHOOL

PHD THESIS SUMMARY

Evaluation of prognostic and risk factors in critical lower limb ischemia

PhD student: **Răzvan – Alexandru Ciocan**

PhD supervisor: **Prof. Dr. Habil. Sorana D. Bolboacă**

Cluj - Napoca 2018

CONTENT

INTRODUCTION	1
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	3
1. Critical lower limb ischemia	5
1.1. Definition	5
1.2. Epidemiology of critical limb ischemia	5
1.3. The etiology of critical limb ischemia	8
1.4. Pathogenesis	9
1.5. Risk factors and prognosis	9
1.6. Clinical and paraclinical investigations	10
1.7. Surgical treatment techniques	11
1.8. Drug therapies	14
2. Plasma biomarkers	15
2.2. Chitotriosidase	15
2.2. Cotinine	16
3. Quality of life of patients with critical limb ischemia	19
3.1. SF-36 questionnaire and derivations	20
3.2. The EQ-5D questionnaire	21
3.3. The VascuQoL questionnaire	22
3.4. Quality of life of patients with critical lower limb ischemia	22
PERSONAL CONTRIBUTION	25
4. Clinical management in patients with critical limb ischemia	25
4.1. Introduction	25
4.2. Objectives	26
4.3. Material and method	26
4.4. Results	27
4.5. Discussions	33
4.6. Conclusions	38
5. Evaluation of chitotriosidase as a marker of inflammatory status in critical limb ischemia	39
5.1. Introduction	39
5.2. Objectives	40
5.3. Material and method	40
5.4. Results	41
5.5. Discussions	46
5.6. Conclusions	47
6. Serum cotinin level as predictor of necrosis or gangrene in patients with critical limb ischemia	49
6.1. Introduction	49
6.2. Objectives	50
6.3. Material and method	50
6.4. Results	51
6.5. Discussions	53
6.6. Conclusions.	55
7. Quality of life in patients with critical limb ischemia and relationship to chitotriosidase and serum cotinin	57
7.1. Introduction	57
7.2. Objectives	59
7.3. Material and method	59

7.4. Results	61
7.5. Discussions	74
7.6. Conclusions	75
8. General conclusions	77
9. Originality and innovative contributions of the thesis	79
REFERENCES	

Keywords: critical limb ischemia (CLI), chitotriosidase, cotinine, quality of life

INTRODUCTION

Critical lower limb ischemia is considered the most severe stage of peripheral arterial disease. Critical lower limb ischemia has the main symptom of pain in the lower limbs and may result in loss of the affected limb. This pathology is also associated with an increased risk of myocardial infarction, stroke and even death due to heart disease. The purpose of managing this pathology includes alleviating pain, treating and curing arterial ulcers of the affected limbs, preventing amputation, improving the functioning of the limb, improving the quality of life and survival rate.

The studies of the present study aimed at assessing the factors that influence the evolution of this pathology and highlighting markers able to signal or quantify the arterial damage caused by critical ischaemia. In this regard, the study attempted to identify the characteristics of the subject predisposed to this pathology. A study aimed at analyzing the risk factors for critical limb ischemia (eg age, gender, smoking, diabetes, obesity, hypertension, etc.) and analyzed the presence of a relationship between these risk factors and the degree of the severity of the pathology. The second approach was to analyze the ability to discriminate two biomarkers, to discriminate the respective pathology of the severity state. Thus the serum value of cotinine and chitotriosidase was analyzed with significant results in the analysis of chitotriosidase as a marker of inflammation in critical limb ischemia. It remains to be studied whether the elevated serum chitotriosidase score is critical for ischemia, or whether this increased value is actually present in patients with early stages of peripheral arterial disease. The elevated level of serum cotinin was associated with the occurrence of trophic disturbances and lower fingers' finger disarticulations. In order to achieve more valuable results on the influence of cotinin on the pathology, it is necessary to increase the study lot and to control all factors of confusion (eg the time from the last cigarette smoked to the collection of biological samples, the number of cigarettes smoked on the day of harvest, the day before harvest, etc.).

Having results on subjects' demographics, risk factors, co-morbidity, serum cotinin levels and serum chitotriosidase, the third approach was aimed at assessing the quality of life of patients with critical limb ischemia. Three questionnaires on the quality of life of these patients were applied and the data were correlated with demographic, clinical and paraclinical data. The results were compared with a control group and were statistically significant, resulting in patients with critical limb ischemia having a lower quality of life than those in the control group.

The results obtained in this study were published in specialized journals from abroad, some of which are also being published.

The study is unique in Romania by incorporating all aspects of patients with critical ischemia and by trying to identify the risk and prognostic factors that cause this condition. It is also the first global study that studies chitotriosidase as a marker of inflammation in critical ischemia with promising results.

PERSONAL CONTRIBUTION

The personal contributions part consists of four studies.

The study was conducted in accordance with the principles of the Helsinki Declaration and was approved by the Ethics Committee of the University of Medicine and Pharmacy Iuliu Hațieganu Cluj-Napoca (No. 475 / 22.10.2015).

Four articles were published from the personal contributions: an ISI article in *Annals of Clinical & Laboratory Science* and three BDI articles in *Proceedings of the 49th Annual Scientific Meeting of the European Society for Clinical Investigation 2015*, *Folia Medica* and *Acta Medica Transilvanica* respectively.

Study I. Clinical management of patients with critical limb ischemia

Purpose: To analyze the clinical management of patients hospitalized with limb of critical limb ischemia (CLI) at the Surgery Clinic II of the Cluj-Napoca County Emergency Clinical Hospital and to identify the risk factors for amputation.

Material and method. Objective 1: The medical records of patients with critical lower limb ischemia as the primary diagnosis were analyzed. CLI was defined in accordance with the Consensus of the Trans-Atlantic Inter-Society (TASC) II. Information for subjects with CLI as primary diagnosis at discharge and ischemic pain at rest and gangrene or non-healing ischemic ulceration at admission (Fontaine stages 3 and 4) were collected and stored in a database. Subjects with incomplete information were excluded from the sample. Information on demographics (sex, age, environment and smoking), co-morbidities (type 2 diabetes, hypertension, ischemic heart disease and heart rhythm disorders), admission symptoms (type of pain) and discharge status were collected.

Objective 2 was also achieved by collecting patient data. All subjects diagnosed with discharge of CLI or PAOD (Peripheral Artery Ocular Disease) were eligible for the study. Patients with Grade II grade 4 - resting ischemic pain (according to the Rutherford classification of Peripheral Arterial Disease) were included in the CLI group. Patients with grade I grade 3 - severe claudication (according to the Rutherford classification of Peripheral Arterial Disease) were included in the PAOD group. PAOD occurs as a result of atherosclerosis and thrombosis, characterized by narrowing the arteries that reduce blood circulation in the affected limb. Subjects with incomplete information were excluded from the study. The following data was collected from medical records: demographic data (gender, age, environment, smoking), co-morbidities (high blood pressure, ischemic heart disease and heart rhythm disorders), admission symptoms (type of pain- , pain that returns after treatment), treatment options (medical or surgical) and discharge status. Patients with acute ischaemia, peripheral vascular dysfunction or inflammatory or immunological origin, venous ulcers, neuropathic ulcers, or Buerger disease were excluded.

Results. Objective 1. The age of patients varied between 32 and 94, with an average of 66.22 ± 10.40 years. The M: F ratio (where M = men and F = women) was 4.25, with a significantly higher proportion of males compared to women (81% men, $P < 0.0001$). Most subjects experienced continuous pain (59.18%), the pain being more frequently reported by women (64.29%) compared to men (57.98%). Complications were observed in 9.75% of cases. Smoking was identified as a significant risk factor, with the regression model being classified as 83.9%.

Objective 2. The investigated sample contained a significantly higher percentage of patients with PAOD compared to CLI (67.63%, IC95% [64.01-71.12] vs. 32.37%, IC95% [28.88 -35.99]; $P < 0.0001$). The percentage of men was significantly higher compared to the percentage of women (M (men): F (women) = 79.25%: 20.75%, $P < 0.0001$). Most patients in both groups were smokers (PAOD: CLI = 68.88%: 71.30%), with no significant difference between groups ($P = 0.566$). There were 2.76% (IC95% [1.60-4.21]) patients who died in the investigated sample, with no significant difference between CLI vs. PAOD ($P = 0.5685$). One-dimensional regression analysis only identified age as a significant risk factor for amputation (OR = 1.03, IC95% [1.01-0.05], $P = 0.0012$). The age of the subjects with amputation was significantly higher compared to the age of subjects without amputation (vs. vs. amputation: 66 years (59-74) vs. 68 years (61-79), Mann-Whitney test: $P = 0.0041$).

Conclusions. The reported results suggest that the clinical severity of critical limb ischemia among patients with Fontaine 3 and 4 status does not differ between genres, in the context in which the disease is

significantly more common among males. Smoking was a significant risk factor for critical limb ischemia and influenced disease prognosis.

The age of patients has been shown to be a significant risk factor for amputation, and this result could be explained by both the duration of the illness and the longer period as a smoker.

Study II. Evaluation of chitotriosidase as a marker of inflammatory status in critical limb ischemia.

Purpose: Evaluation of chitotriosidase as a marker of critical limb ischemia.

Material and method. A follow-up study was conducted on CLI subjects investigated between November 2015 and December 2016 in the County Emergency Clinical Hospital in Cluj-Napoca, Romania, and an equal number of CLI subjects urged. For CLI, the main inclusion criterion was CLI diagnosis, and the exclusion criteria were other diseases such as acute ischemia, peripheral vascular disorders of immune or inflammatory origin, venous and neuropathic ulcers, or Buerger's disease.

Walk tests (climbing and descending stairs and rolling mat) and IGB (ankle-arm index) were used to classify patients according to the Rutherford class. Patients with Grade II according to Rutherford trial (resting pain with ankle pressure <40 mm Hg, foot pressure <30 mmHg), IIIa (resting pain with ankle pressure <60 mmHg, foot pressure <40 mmHg) and IIIb pressure <60 mmHg, foot pressure <40 mmHg) with ischemic resting pain and a minor or major tissue loss. The signs and symptoms of CLI (pain, cold skin, lack of hairiness, trophic disorders) and surgical maneuvers (disarticulation, amputation, necrectomy) have been noted.

Both demographic data (age, gender, background, education) and the presence of risk factors (weight, height, smoker status) were collected for both groups. For analysis of chitotriosidase activity, blood samples were centrifuged within less than one hour of collection and stored at -20 ° C until further analysis. The activity of plasma chitotriosidase was measured in all subjects using a fluorescent artificial substrate.

Results. The majority of patients with CLI experienced the following clinical manifestations: continuous pain (continuous pain vs. intermittent claudication = 79.07% versus 20.93%, $P < 0.0001$) versus 11.63%, $P < 0.0001$), hair loss (absent versus presence = 88.37% vs. 11.63%, $P < 0.0001$), trophic disorders (yes vs. no = 95.35% versus 4.65%, $Z\text{-stat} = 28.24$, $P \leq 0.0001$). The chitotriosidase activity ranged from 110-1530 nmol / ml / hr in the CLI group and between 30-440 nmol / ml / hr in the control group. Median and IQR values (IQR = (Q1-Q3) where Q = quartet) were 460 (260-810) nmol / ml / hr in the CLI group and 130 (80-180) nmol / with significantly higher values in CLI patients (Mann-Whitney test: $P < 0.0001$). The activity of chitotriosidase was significantly higher in smokers compared to non-smokers both in the case group and in the control group. Median values were approximately double that seen in non-smokers, either CLI or controls. The ability to discriminate chitotriosidase as an inflammatory biomarker in CLI was assessed by ROC (Receiver Operating Characteristic Curve) analysis. On the basis of the maximum value of the Youden J Index, the sensitivity was 0.714 (0.554-0.843) and the specificity was 0.951 (0.835-0.994), corresponding to a threshold level of 325 nmol / ml / hr. The role of smoking as a variable of confusion can be reduced by using threshold values: 325 nmol / ml / h for non-smokers and 450 nmol / ml / h for smokers. According to reported results, values above these thresholds can be considered as a warning sign indicating the activation of an inflammatory response in patients with CLI.

Conclusions. This study presents the first evaluation of chitotriosidase as a biomarker of inflammation in patients with CLI. Once other inflammatory conditions have been excluded, interpretation of its high values should take into account the inflammatory response induced by tobacco exposure.

Study III. Serum cotinin level as a predictor of necrosis or gangrene in patients with critical limb ischaemia.

Purpose: Quantification of the extent to which smoking (assessment of serum cotinin) is related to the development of critical limb ischemia.

Material and method. This study was a transversal observational study conducted between November 2015 and December 2016 in patients admitted to the Clinic of Surgery II of the County Emergency Clinical Hospital Cluj-Napoca, Romania. The sample studied for chitotriosidase (see study 2) was the same with this sample, the methods of data collection being the same. During the diagnostic process, a blood

sample was collected for quantification of cotinine concentration. The serum samples were stored at -20°C before analysis. Quantification of serum cotinin levels was performed by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using a commercially available kit (Novus Biologicals) according to the manufacturer's instructions. Concentrations were calculated using a linear regression equation and expressed in ng / ml.

Results. The investigated sample was for forty-three patients, aged 34 to 77 years, with an average age of 60.74 ± 10.46 years and a significantly higher percentage of males (M: F = 83.72 %: 16.28%, $P < 0.0001$). There were no statistically significant differences between groups with regard to symptoms, signs or comorbidities when patients with serum cotinine below 15 ng / ml were compared with those with values above 15 ng / ml. However, necrectomy was performed more frequently in patients with serum cotinine > 15 ng / ml ($P < 0.05$ ng / ml). ROC analysis has shown that serum cotinin levels can be considered a biomarker for either noncreetomy or disarticulation. Based on a threshold level of 9,765 ng / ml, a 53.33% risk of necrectomy was seen in patients with levels of cotinine greater than or equal to this threshold, while a 14.29% risk was detected those with levels of cotinine below the threshold; the relative risk being 3.733 (IC95%: 1.208 to 12.659, exact Fischer test, $P = 0.012$). For finger disarticulation (lower member) using the threshold value of 23,045 ng / ml, the risk calculated for patients with higher cotinin values was 38,46%, compared to only 6,67% for those with lower levels. Relatively calculated risk was 5,679 (IC 95%: 1,118 to 41,018, Fischer Exact probability test, $P = 0,019$). A statistically significant result was found for the association of smokers with CLI and necrectomy for a threshold value of 9,765 ng / ml. For finger disarticulation, the threshold level of cotinine was 23,045 ng / ml.

Conclusions. Patients with serum cotinin concentrations greater than 9,765 ng / ml had a relative risk of 3,733 for trophic lesions requiring non-occlusion, while in patients with serum cotinine greater than 23,045 ng / ml, the relative risk of disarticulation fingers in the lower limbs was 5,679. Although cotinine is not a direct predictor of the severity of the disease, the present study has shown that its elevated values may suggest a higher risk of trophic injury and adverse prognosis.

Study IV: Quality of life in patients with critical limb ischemia and relationship with chitotriosidase and serum cotinine

Purpose: The purpose of this study was to evaluate the life expectancy in patients with lower limb critical ischemia compared to patients with inferior vein pathology to identify the relationship between the presence of complications and the quality of life and the relationship between serum biomarker values (chitotriosidase and cotinine) and quality life.

Material and method. This study was an observational study, the pathology of interest being critical limb ischemia, and the control group being subjects with inferior vein pathology. The study was conducted between November 2015 and May 2017 on patients hospitalized at the Surgery Clinic II of the County Emergency Clinical Hospital in Cluj-Napoca. Eligible patients in the study were those diagnosed with critical limb ischaemia (Rutherford II, IIIa and IIIb grade) for the case group, respectively with chronic venous insufficiency for the control group. The excluded patients from the study were those who did not cooperate, those who refused to participate in the study and those who did not meet the inclusion criteria.

After completing an informed consent, patients who have given their consent have been clinically evaluated and asked to answer the questions of the three quality of life questionnaires (SF-36, EuroQol 5D and VascuQol, Romanian version). The SF-36 questionnaire includes eight health concepts: physical limitations, limitations of social activities, limitations of normal activities, pain, mental health status, emotional issues that may cause limitations to normal activities, energy status, and general perception health. The EuroQol 5D questionnaire contains five major concepts that are investigated: mobility, self-maintenance, common activities, pain / discomfort and anxiety / depression. VascuQol chestress contains 25 items to provide information on pathological conditions, signs and symptoms of patients with critical limb ischemia. To ensure that all interviews with patients were conducted at the same standards and using the same procedures, a single investigator who noted patient responses was used, the interview being done face-to-face. The total length of the interview was 45 minutes. All patient responses were transcribed by the same perosan in a database and correlated with patients' anamnestic, paraclinical and treatment data.

Results. 160 subjects, 100 patients with critical limb ic (IC) and 60 with venous disorder (AV) were enrolled in the study. Subjects were aged between 31 and 88 years, half of whom were less than or equal to 64 years of age. Most patients in the IC group experienced continuous pain (continuous pain vs intermittent

claudication: 79%, IC95% [70,01-86,99] vs. 21%, IC95% [13,01-29,99]). The presentation with continuous pain was significantly more frequent than intermittent pain ($P < 0.0001$). All patients in the AV group experienced a pain other than continuous or intermittent pain. In the group of patients with critical lower limb ischemia, a statistically significant relationship was observed between the presence of pallidity and warm tegument vs. (Fisher Exact: $P = 0.0001$) A statistically significant association was identified between the presence of trophic disturbances on the one hand and the skin, respectively lower limb stiffness on the other hand (Fisher test: $P < 0$, A significant statistically greater number of patients with critical ischemia had distal pulses absent at admission (76%, $Z = 12.18$, $P < 0.0001$) Half of patients with critical ischemia were hospitalized 8, 5 days (quartile interval (7-14)) versus 6 days (quarantine interval (4-7)) in patients with venous insufficiency, the difference being statistically significant (Mann-Whitney test: $P < 0.0001$). With no exception, the quality of life of patients with critical limb ischemia was significantly lower compared to patients with inferior limb vein ($P < 0.0001$). identified between women and men, with the greater impact of women on the emotional and social component of the VascuQol questionnaire. Gangrene, necrosis, disarticulation of at least one lower limb, amputation or presence of ulcer in the lower limb have been considered complications. Their distribution is consistent with the pathology of each group, with only the ulcer being present in both groups but significantly higher in patients with inferior vena cava. There were no statistically significant differences in the results obtained in the application of quality of life questionnaires in the group of patients with critical lower limb ischemia with different amputation locations (Friedman Anova: $P > 0.37$). Chitotriosidase values were significantly higher in patients with medial lower limb ischemia (median = 460 nmol / ml / h (275-805)) compared to varicella patients (median = 180 nmol / ml / h (110-515)) (Mann-Whitney test: statistic = 2.09, $P = 0.0367$). Not the same phenomenon was identified when comparing cotinine (lower limb versus varicella critical ischemia: 0.02 nmol / ml / h (0.00-82.07) vs. 0.30 nmol / ml / h (0.00- 23.25), Mann-Whitney test: $P = 0.7723$). The ROC analysis identified for the EQ5D chestress a threshold value of 7.50 capable of discriminating patients with lower limb critical ischaemia than those with varicose veins. The area under the curve was 0.9965 (95% IC [0.9880-1.0000]), standard error 0.0043. Weak correlations between the different components of the questionnaires and some features of patients with critical limb ischemia have been identified. (example: within the SF36 questionnaire between Fatigue and Type II DZ, between general patient status and smoking).

Conclusions. Significant differences were found between the two sexes, with predominantly affecting female gender in the VascuQol questionnaire at the level of emotional and social components, in case patients with CLI. The most common type of amputation, the thigh (78%), the quality of life with IC is deeply affected, with negative effects on both functional status and social relationships and psychological state. The quality of life of patients with critical ischaemia was significantly different from patients with chronic venous insufficiency, and higher serum chitotriosidase levels were seen in patients with critical ischaemia.

Originality and innovative contributions of the thesis

This study is the first in the literature to evaluate the prognostic factors of critical limb ischemia related to two biomarkers, chitotriosidase and cotinine, respectively. Chitotriosidase has been shown to be a marker of inflammation in critical limb ischemia. Additional studies are needed to investigate whether chitotriosidase can be used as a marker and in peripheral arterial disease as a whole. This study also aimed at identifying a smoking marker, given that smoking is known to be one of the most important risk factors involved in the development of peripheral arterial disease, to help clinicians identify individuals at risk, those with subclinical impairment. This is how we dose serum cotinin in order to highlight a relationship between it and ICMI. Its relationship to trophic disturbances and finger disarticulations has been highlighted in patients with ICMI. It is necessary to perform a study on a larger group of subjects and to find a more accurate way to quantify smoking to see if serum cotinine can be a predictive factor of this pathology. In the literature, studies have also been performed in which urinary cotinine was dosed in patients with peripheral arterial disease, but no study was conducted to dose serum cotinine in patients with critical limb ischemia. One phase of the study consisted in the application of quality of life questionnaires. The results of the study were statistically significant, the condition of the subjects being profoundly influenced by the arterial pathology and the burden caused by complications.

If chitotriosidase is the first study of this kind, serum cotinin along with urine has been studied in peripheral arterial disease. Studies have shown urinary cotinine as a specific biomarker of peripheral arterial

disease, but only in chronic smokers. Ex-smoker patients have null urinary cotinine levels due to their excretion via the urinary tract. Serum cotinin can be considered more sensitive to urine because it is present in the body for a longer time, but its dosage is also influenced by when the subject smoked the last cigarette.

The results of the study highlighted the fact that critical limb ischemia is a pathology with a marked impact on quality of life. The quality of life of these patients is much lower than that of other groups, especially by the complications that arise from this pathology. Focusing on assessing the quality of life of patients with critical ischaemia we can try therapeutic strategies to prevent their functional and social status alteration.

Action to corroborate the results obtained from the assessment of risk factors, co-morbidity and quality of life can help us identify prognostic factors that allow for the most accurate assessment of this pathology at an early stage in an attempt to prevent it from occurring and to give patients a better quality of life.