

Changes in oxidative stress parameters in patients with peripheral vascular disease in response to conservative and surgical treatment

Zmiany w parametrach stresu oksydacyjnego i mechanizmów antyoksydacyjnych u chorych z miażdżycą naczyń obwodowych poddanych leczeniu chirurgicznemu i zachowawczemu

Łukasz Partyka, Jadwiga Hartwich, Włodzimierz Drożdż¹, Anna Gruca, Renata Jopek, Danuta Karcz¹, Aldona Dembińska-Kieć

Department of Clinical Biochemistry, and II Department of Surgery¹, Jagiellonian University School of Medicine, Kraków, Poland (Zakład Biochemii Klinicznej, II Klinika Chirurgii¹, Collegium Medicum UJ, Kraków)

Abstract

Introduction. Reperfusion of ischemic tissue is associated with oxidative burst. Systemic response e.g. neutrophil and platelet activation, metabolic changes, free radical and cytokine production resulting in endothelial injury are the typical features of ischemia/reperfusion.

Materials and methods. Twenty four patients (group C) with chronic leg ischemia (Fontaine grade II) undergoing conservative (12 weeks of controlled treadmill training and pentoxifylline administration (400 mg p.o; t.i.d.) and 14 patients (group O) (Fontaine grade III), who underwent surgical revascularization were included in the present study. Revascularization included aorto-femoral or femoro-popliteal bypass implantation. Blood samples for evaluation of oxidative stress: plasma lipid peroxide level (TBARS) and the ex vivo LDL susceptibility for oxidation, as well as for measurement of the plasma antioxidant status (total plasma antioxidant power — FRAP), and total plasma thiol/albumin ratio were collected before and after the treadmill exercise workload at the entry, after 6 and after 12 weeks from initiation of the treatment. The changes in clinical status were expressed by the treadmill pain-free walking distance and ankle/arm index values.

Results. The surgical revascularization resulted in the significant improvement of clinical parameters demonstrated by reduction of patient complaints as well as by increased ankle/arm index values, smaller ischemic field and prolongation of pain-free and maximal walking time. An increase of the pain-free walking distance and the decrease of ischaemic field, but any improvement of the ankle/arm index was observed in the conservative therapy group. However, surgical revascularisation did not protect patients from increased oxidative stress expressed by the TBARS concentration and LDL susceptibility to oxidation ex vivo. On the contrary, the conservative therapy resulted in the increased plasma antioxidant status measured by the FRAP assay and the increased plasma thiol/albumin ratio.

Conclusion. The surgical revascularization did not protect patients with advanced peripheral arterial disease from ischemia/reperfusion oxidative stress what argue for the complementary supplementation of antioxidants during therapy.

Key words: peripheral vascular disease, surgical revascularization, oxidative stress, antioxidant status

Address for correspondence (Adres do korespondencji):

Prof. dr hab. Aldona Dembińska-Kieć, Zakład Biochemii Klinicznej CMUJ, ul. Kopernika 15 a, 31-501 Kraków, Poland
faks: + 48 (0 12) 421 40 73, e-mail: mbkiec@cyfronet.krakow.pl

Streszczenie

Wstęp. Typowym zjawiskiem w niedokrwieniu i reperfuzji tkanek jest „wybuch tlenowy” związany z aktywacją płytek krwi i neutrofilów, produkcją wolnych rodników i wywołane nimi uszkodzenie komórek śródbłonna naczyń oraz dalsze upośledzenie tkanek.

Cel pracy. Badanie przeprowadzono w celu porównania wpływu dwóch rodzajów terapii: chirurgicznej rewaskularyzacji i terapii zachowawczej (zaprogramowany trening i pentoksyfilina p.o.) na wybrane parametry powysiłkowego stresu oksydacyjnego u pacjentów z miażdżycą naczyń obwodowych.

Material i metody. Do badań zakwalifikowano pacjentów z przewlekłym niedokrwieniem kończyn dolnych leczonych zachowawczo ($n = 24$, II stopień wg klasyfikacji Fontaine'a, grupa C) lub leczonych chirurgicznie ($n = 14$, III stopień wg klasyfikacji Fontaine'a, grupa O). Pacjentów leczonych zachowawczo poddawano przez 12 tygodni regularnym treningom na bieżni ruchomej i podawano im pentoksyfilinę p.o. w dawce 3×400 mg/d. Leczenie chirurgiczne polegało na wszczepianiu zespołów omijających aortalno-udowych bądź udowo-podkolanowych. Próbkę krwi do badań biochemicznych pobierano przed rozpoczęciem terapii, po 6 i 12 tygodniu od rozpoczęcia leczenia, przed testem wysiłkowym i po jego wykonywaniu. Oznaczano parametry stresu oksydacyjnego (osoczowe stężenia nadtenków lipidowych wyrażone stężeniem TBARS i podatność LDL na oksydację *ex vivo*) oraz parametry charakterystyczne dla mechanizmów antyoksydacyjnych osocza (całkowita osoczowa zdolność redukcyjna: FRAP oraz stosunek stężeń grup tiolowych do albuminy: SH/A).

Wyniki. Leczenie chirurgiczne spowodowało znaczną poprawę parametrów klinicznych wyrażoną zmniejszeniem dolegliwości subiektywnych oraz statystycznie znamionym wzrostem indeksu kostka/ramię (ABI, ankle-brachial index), zmniejszeniem pola niedokrwienia i wydłużeniem dystansu chromania. U chorych leczonych zachowawczo również nastąpiła poprawa wyrażona wydłużeniem dystansu chromania i zmniejszeniem pola niedokrwienia, ale bez istotnej poprawy ABI. Leczenie chirurgiczne nie chroniło jednak chorych przed wzmocnionym stresem oksydacyjnym wyrażonym wzrostem TBARS i wzmocnioną podatnością LDL na oksydację. Natomiast u chorych leczonych zachowawczo obserwowano istotny wzrost wartości FRAP i SH/A, co świadczy o poprawie potencjału antyoksydacyjnego.

Wnioski. W przeciwieństwie do leczenia zachowawczego leczenie chirurgiczne u pacjentów z zaawansowaną miażdżycą nie chroni naczyń obwodowych przed stresem oksydacyjnym. Wyniki badań wskazują na korzystny wpływ wykonywania regularnych ćwiczeń i stosowania farmakoterapii (antyoksydanty) u chorych z miażdżycą naczyń obwodowych po zabiegach rewaskularyzacyjnych.

Słowa kluczowe: miażdżycza naczyń obwodowych, leczenie chirurgiczne, stres oksydacyjny, potencjał antyoksydacyjny

Introduction

Intermittent claudication, the symptom of disease affecting the peripheral arteries is a strong predictor of subsequent mortality. The majority of these patients die from associated cardiovascular events such as stroke or myocardial infarction due to generalized nature of atherosclerosis [1]. General advice to patients with intermittent claudication includes regular exercise, and the recommended twelve-weeks training program have been reported to double walking distance in claudicants due to the improvement of the skeletal muscle oxidative metabolism [2]. However, there is lack of the conclusive statement as to whether repeated ischaemia-reperfusion injury which produces deleterious biochemical sequelae may be of benefit for the patients.

Wstęp

Chromanie przestankowe jako objaw choroby naczyń obwodowych jest związane ze zwiększeniem śmiertelności. Większość osób z chromaniem przestankowym umiera z powodu schorzeń sercowo-naczyniowych, takich jak zawał serca czy udar mózgu [1]. Zwykle chorym tym zaleca się regularne uprawianie ćwiczeń fizycznych. Stwierdzono, że 12-tygodniowy program ćwiczeń wydłuża 2-krotnie dystans chromania u chorych na miażdżycę naczyń obwodowych (PAD, *peripheral artery disease*) w związku z przestawieniem się metabolizmu tlenowego mięśni szkieletowych [2]. Jednoznacznie natomiast nie potwierdzono ewentualnego niekorzystnego wpływu powtarzających się podczas treningu epizodów niedokrwienia/reperfuzji i ich konsekwencji biochemicznych.

Ischemia followed by reperfusion is the major cause of tissue damage mediated by oxygen derived free radicals [3]. Systemic response i.e. neutrophil and platelet activation, free radical production and endothelial injury are typical features of ischemia/reperfusion events [4].

The apparent systemic injury seen in claudicants led some authors to conclude that exercise may exacerbate this injury and that early surgical intervention may ameliorate this effect [5].

The body defense mechanisms against free radical generated during ischemia/reperfusion injury include natural plasma proteins, lipoprotein antioxidants (vitamins) as well as enzymes (paraoxonase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase and others) released by endothelium, liver and other tissues [6]. Clinical evidence suggests that plasma antioxidant status implicates result of treatment and recovery of patients [7].

Aim of study

The aim of the study was to compare the changes in the antioxidant status blood parameters in response to conservative treatment versus surgical revascularization in patients with peripheral vascular disease (Fontaine grade II and grade III, respectively).

Material and methods

Patient selection

The age, habits, cardiovascular illness matched male patients (Table I) of the Department of Surgery; Jagiellonian University School of Medicine, Kraków, with chronic leg ischemia were included into the present study after giving the written consent. They underwent conservative treatment (group C, Fontaine grade II, n = 24) or surgical revascularization (group O, Fontaine grade III, n = 14). Conservative treatment consisted of 12 weeks of controlled treadmill exercise (3 × week, 30 min at the horizontal treadmill with the speed 1.8 km/h) and pentoxifylline administration (400 mg p.o., t.i.d.). The surgical revascularization included aorto-femoral or femoro-popliteal bypass grafting. These patients did not receive drugs on the long-term basis. The other medication was minimized only to the accidental needs.

At the entry, after 6 and 12 weeks of the observation period all patients of both groups underwent the standard exercise workload on treadmill. The following parameters were assessed: ischemic field, ankle/arm (i.e. ankle-brachial) index (ABI), pain-free walking distance and the maximal walking distance. Ischemic field was assessed as the area under the curve of sequential measurements of systolic blood pressures on the foot ar-

Stwierdzono, że w zjawisku niedokrwienia z następującą reperfuzyją główną przyczyną uszkodzenia tkanek są uwalniane wolne rodniki tlenowe [3], pojawiające się w wyniku aktywacji płytek i neutrofilów, co prowadzi do uszkodzenia komórek śródbłonna naczyń, zwiększenia ich przepuszczalności i pogłębienia się zmian w tkankach [4].

Układowe objawy uszkodzenia tkanek u chorych z chromaniem przestankowym skłoniły niektórych autorów do stwierdzenia, że dodatkowy wysiłek fizyczny może nasilać patologiczne zmiany, a szybka interwencja chirurgiczna może zmniejszyć niekorzystny wynik działania ischemii/reperfuzyji [5]. Naturalnym mechanizmem obronnym organizmu przed atakiem wolnych rodników jest osoczowy układ białek, antyoksydantów zawartych w lipoproteinach (głównie witamin) i enzymów (np. paroksonazy, dysmutazy nadtlenkowej, peroksydazy glutationu, katalazy i inne) uwalnianych przez śródbłonek, wątrobę i różne tkanki [6]. Z badań klinicznych wynika, że rezultaty leczenia i rekonwalescencja chorych zależą od aktywności osoczowego układu antyoksydantów [7].

Cel badań

Celem badań było porównanie zmian zachodzących w wybranych parametrach potencjału antyoksydacyjnego i stresu oksydacyjnego w trakcie leczenia zachowawczego i chirurgicznego chorych z miażdżycą naczyń obwodowych odpowiednio w II i w III stopniu zaawansowania choroby według klasyfikacji Fontaine'a.

Materiał i metody

Dobór chorych

Do badania włączono pacjentów Kliniki Chirurgicznej *Collegium Medicum* Uniwersytetu Jagiellońskiego z przewlekłym niedokrwieniem kończyn dolnych, dobranych pod względem wieku, stylu życia i współistniejących schorzeń układu sercowo-naczyniowego. Od każdej osoby uzyskano pisemną zgodę na udział w programie. Pacjentów leczono zachowawczo (n = 24, stopień II wg klasyfikacji Fontaine'a, grupa C) lub chirurgicznie (n = 14, stopień III wg klasyfikacji Fontaine'a, grupa O). Leczenie zachowawcze polegało na regularnym treningu, tj. marszu na bieżni ruchomej (3 × 30 min/tydz. przy szybkości 1,8 km/h) przez 12 tygodni. Pacjenci otrzymywali również pentoksyfilinę w dawce 3 × 400 mg/d. Chorym leczonym zabiegowo wszczepiano zespolenia omijające aortalno-udowe lub udowo-podkolanowe i nie stosowano u nich leczenia farmakologicznego. Podawanie leków zredukowano do niezbędnych, pojedynczych interwencji.

Table I. Demographic data for patients from conservative and surgical treatment groups**Tabela I.** Dane chorych leczonych zachowawczo i operacyjnie

Group Grupa	Conservative Leczenie zachowawcze		Surgical Leczenie operacyjne	
	Female/Kobiety n = 5	Male/Mężczyźni n = 23	Female/Kobiety n = 1	Male/Mężczyźni n = 13
Mean age (years) Średni wiek (lata)	58 (35–74)		61 (45–73)	
Mean time from disease onset (years) Średni czas od rozpoznania choroby (lata)	2.1		3.9	
Hypertension (%) Nadciśnienie	61		64	
Non-independent diabetes mellitus (%) Cukrzyca insulinoniezależna	14		15	
Ischaemic heart disease (%) Choroba niedokrwienna serca	62		70	
Smoking (%) Osoby palące	85		92	

teries. The pressures were measured before exercise workload, on the peak exercise and subsequently every 2 min till coming-back to basal values. The commercially available computer program for integration of ischemic area (MCAT) was used.

Blood sampling and biochemical evaluation

Blood samples for evaluation of the plasma parameters related to oxidative stress: plasma lipid peroxide level expressed by thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) [8] and LDL susceptibility for *ex vivo* oxidation as well as plasma antioxidant status: the total plasma antioxidative power (FRAP, ferric reducing ability of plasma) [9], and total plasma thiol/albumin ratio were collected. Sampling time-points were set for all patients simultaneously with the standardized exercise test at the entry, after 6 and 12 week of the study before and after treadmill exercise workload.

Total plasma thiols

The total plasma thiol groups (SH) [nmol/mL] were measured spectrophotometrically at 412 nm (Hitachi U-2000 spectrophotometer) according to Ellman's method [10] and calculated using $13.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ as the molar extinction coefficient. Molar ratio of thiol group to plasma albumin was calculated.

Plasma thiobarbituric acid reactive substances

Plasma TBARS as a marker of lipid peroxidation were measured spectrophotometrically at 532 nm (Hitachi U-2000) according to Wallin et al. [8].

The susceptibility of LDL to oxidative modification *ex vivo*

The LDL fractions ($d = 1.019\text{--}1.063 \text{ g/mL}$) were isolated from fresh EDTA plasma by sequential ultra-

Przed włączeniem do badania oraz po 6 i 12 tygodniu obserwacji u chorych wykonywano test marszowy na bieżni poziomej przy szybkości 1,8 km/h. Oceniano pole niedokrwienia, indeks kostka-ramię (ABI, *ankle/brachial index*), dystans chromania bezbólowego i dystans maksymalny. Pole niedokrwienia wyznaczano na podstawie kolejnych pomiarów skurczowych ciśnień tętniczych na tętnicach stóp: przed testem marszowym, w momencie maksymalnego wysiłku i co 2 min do powrotu wartości ciśnienia do poziomu wyjściowego. Do całkowania powierzchni pod krzywą używano programu komputerowego MCAT.

Pobieranie krwi i badania biochemiczne

Krew do badań pobierano przed testem marszowym i po jego wykonaniu. Test wykonywano trzykrotnie: na początku terapii oraz po 6 i 12 tygodniu obserwacji. Do oceny stresu oksydacyjnego oznaczano w osoczu stężenie nadtlenków lipidowych mierzone przy użyciu kwasu tiobarbiturowego (TBARS, *thiobarbituric acid reactive substances*) [8]. Oznaczano podatność LDL na oksydację *ex vivo* [8], jak również potencjał antyoksydacyjny osocza za pomocą tzw. testu całkowitego potencjału redukcyjnego (FRAP, *ferric reducing ability of plasma*) [9] oraz osoczonego stosunku wolnych grup tiolowych do albuminy.

Całkowite stężenie grup tiolowych

Stężenie to oznaczano spektrofotometryczną metodą Ellmana [10]. Stężenia grup tiolowych (SH) wyrażone w nmol/ml osocza badano, mierząc ekstynkcję przy długości fali 412 nm (spektrofotometr Hitachi U-2000) i obliczając stężenie przy użyciu molowego współczynnika ekstynkcji $13,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Obli-

centrifugation at 5°C, according to Havel et al. [11] using Beckman L8-55 ultracentrifuge with rotor Ti 70.

After overnight dialysis (5°C against PBS pH 7.4) LDL adjusted for protein concentration 0.1 mg/mL were oxidized with 5 μ M Cu²⁺ at 37°C for 4 hours. The kinetics of LDL oxidation was assayed by monitoring of thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) content. The spectrophotometrical (Hitachi U-200) analysis was performed at 532 and 600 nm in selected time points. Samples were quenched with 4 mM EDTA according to Wallin et al. [8]. The susceptibility of LDL to oxidative modification is expressed as the total TBARS production (*sum TBARS*) corresponded to the area under kinetic oxidation curve [8].

The ferric reducing ability of plasma

The ferric reducing ability of plasma (FRAP) expressing the plasma antioxidant potential, was assayed according to Benzie [9]. Ferric to ferrous ion reduction at low pH causes a colored ferroustripyridyltriazine complex to form. FRAP values are obtained by comparing the absorbance change at 593 nm in test reaction mixtures with standard curve constructed from solution of ferrous ions in known concentration. Absorbance changes are linear over a wide concentration range with antioxidant mixtures, including plasma.

Statistic analysis

The mean with standard deviation values were compared by paired *t*-test. The statistical significance was considered at *p* < 0.05 value.

Results

Changes of clinical status

Both kinds of therapy resulted in the amelioration of the clinical symptoms expressed by the elongation of the maximum and pain-free walking time as well as by the decrease of ischemic field (Tables II, III) The outcome of the operative revascularisation was superior in comparison to the conservative therapy. Also the ankle/arm index was significantly higher only in patients who underwent the operative revascularisation (Table III).

The changes in biochemical estimations

At the entry patients from group O demonstrated higher values of total cholesterol and triglycerides and lower plasma HDL cholesterol concentration (Tables II, III). Both groups manifested similar entry value of parameters describing oxidative stress and antioxidant potential (Tables IV, V).

Conservative therapy did not influence the plasma TBARS level as well as the susceptibility of LDL to oxidative modification *in vitro*, but the increase of plasma

czono również stosunek molowy liczby grup tiolowych do osoczowej albuminy.

Stężenie substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym

Wykładnikami peroksydacji lipidów były produkty reakcji z kwasem tiobarbiturowym otrzymywane według metody Wallina i wsp. [8] i oznaczane przy użyciu spektrofotometru Hitachi U-2000 przy długości fali 532 nm.

Podatność LDL na oksydację

Cholesterol frakcji LDL (*d* = 1,019–1,063 g/ml) izolowano ze świeżego osocza metodą ultrawierwienia [11] w ultrawierówce Beckman L8-55 z rotorem Ti 70 w temp. 5°C.

Po 24-godzinnej dializie w temp. 5°C, wobec PBS o pH 7,4, stężenie lipoprotein LDL miarkowano do stężenia białka (0,1 mg/ml). Następnie LDL modyfikowano oksydacyjnie za pomocą 5 μ M Cu²⁺ w temp. 37°C przez 4 godziny. Kinetykę oksydacji lipidów obserwowano, mierząc ilość TBARS metodą spektrofotometryczną przy długości fali 532 i 600 nm (spektrofotometr Hitachi U-200) w każdym z wybranych punktów czasowych [8]. Podatność LDL na oksydację jako całkowitą ilość wytworzonych TBARS (*sum TBARS*) mierzono jako pole pod krzywą kinetyczną oksydacji [8].

Zdolność osocza do redukcji jonów żelazowych

Zdolność osocza do redukcji jonów żelazowych (FRAP, *ferric reducing ability of plasma*) wyrażającą potencjał antyoksydacyjny osocza oznaczano metodą Benzie [9]. Redukcja jonów żelazowych do żelazawych w niskim pH powoduje powstanie barwnych kompleksów (Fe²⁺-tripirydyltraizyna). Wartości FRAP wyznaczano pomiarem zmiany absorpcji przy długości fali 593 nm w próbkach badanych i porównywano te próbki z roztworami zawierającymi znane stężenia jonów Fe²⁺. Zaobserwowano liniowe zmiany absorpcji w szerokim zakresie stężeń mieszanin redukcyjnych, włącznie z osoczem.

Analiza statystyczna

Średnie i odchylenia standardowe porównywano sparowanym testem *t*-Studenta. Za istotne statystycznie uznano różnice dla *p* < 0,05.

Wyniki

Badania kliniczne

Chociaż obie metody leczenia wydłużyły maksymalny i bezbólowy dystans chromania oraz zmniejszyły pole niedokrwienia (tab. II, III), to jednak parametry poprawy klinicznej były silniej wyrażone u osób leczonych chirurgicznie. Zabieg rewaskularyzacyjny spowodował dodatkowo znamienne zwiększenie wartości współczynnika ABI u pacjentów z PAD (tab. III).

Table II. Effect of therapy on plasma lipids and clinical parameters in patients from conservative treatment group**Tabela II.** Wpływ terapii na parametry kliniczne i lipidy w grupie leczonej zachowawczo

Conservative treatment group Grupa leczona zachowawczo	Before therapy Przed leczeniem	After 6 weeks Po 6 tygodniach	After 12 weeks Po 12 tygodniach	Significance Istotność statystyczna
N = 28	Mean (SD) Średnia (SD)	Mean (SD) Średnia (SD)	Mean (SD) Średnia (SD)	
Total cholesterol [mmol/L] Stężenie całkowite cholesterolu	4.1 (0.5) ^a	4.21 (0.6)	4.05 (0.7)	p < 0.05
Triglycerides [mmol/L] Triglicerydy	1.97 (0.2) ^a	1.94 (0.4)	1.89 (0.3)	p < 0.05
HDL cholesterol [mmol/L] Stężenie cholesterolu frakcji HDL	1.48 (0.45) ^a		1.56 (0.44)	p < 0.05
Systolic blood pressure [mm Hg] Skurczowe ciśnienie tętnicze	75.0 (17) ^a	80.0 (15)	78.0 (14)	p < 0.05
Ankle/brachial index Wskaźnik kostka/ramię	0.71 (0.04) ^a	0.68 (0.03)	0.72 (0.09)	p < 0.05
Pain free time [min] Dystans bezbólwy chromania	2.9 (0.3) ^a	5.1 (0.4)	7.3 (0.9)*	p < 0.05
Maximum walking time [min] Dystans chromania maksymalny	4.9 (0.4) ^a	9.7 (0.8)	11.8 (1.7)*	p < 0.05
Ischaemic field [mm ²] Pole niedokrwienia	1430.0 (115.0) ^a	985.0 (84.0)	698.0 (66.0)*	p < 0.05

*p < 0.05 vs. entry data/wobec wartości wyjściowych; ^ap < 0.05 vs. entry data of operative group/wobec wartości wyjściowych w grupie leczonej operacyjnie

Table III. Effect of therapy on plasma lipids and clinical parameters in patients from surgical treatment group**Tabela III.** Wpływ terapii na parametry kliniczne i lipidy w grupie leczonej operacyjnie

Surgical treatment group Grupa leczona operacyjnie	Before therapy Przed leczeniem	After 6 weeks Po 6 tygodniach	After 12 weeks Po 12 tygodniach	Significance Istotność statystyczna
N = 14	Mean (SD) Średnia (SD)	Mean (SD) Średnia (SD)	Mean (SD) Średnia (SD)	
Total cholesterol [mmol/L] Stężenie całkowite cholesterolu	5.15 (0.4) ^a	4.96 (0.9)	4.78 (1.1)	p < 0.05
Triglycerides [mmol/L] Triglicerydy	2.47 (0.4) ^a	2.48 (0.6)	2.54 (0.7)	p < 0.05
HDL cholesterol [mmol/L] Stężenie cholesterolu frakcji HDL	1.11 (0.21) ^a		0.87 (0.39)	p < 0.05
Systolic blood pressure [mm Hg] Skurczowe ciśnienie tętnicze	38.0 (1.4)	105.0 (12)	101.0 (27)	
Ankle/brachial index Wskaźnik kostka/ramię	0.48 (0.04)	0.98 (0.09)	0.94 (0.07)*	p < 0.05
Pain-free time [min] Dystans chromania bezbólwy	1.4 (0.5)	> 10	> 10*	p < 0.05
Maximum walking time [min] Dystans chromania maksymalny	3.7 (1.1)	> 15	> 15*	p < 0.05
Ischaemic field [mm ²] Pole niedokrwienia	1973.0 (286)	167.0 (24)	186.0 (18)*	p < 0.05

*p < 0.05 vs. entry data/wobec wartości wyjściowych; ^ap < 0.05 vs. entry data of conservative group/wobec wartości wyjściowych w grupie leczonej zachowawczo

thiol/albumin ratio during the therapy was statistically significant (Table IV). The incremental trend of the total plasma antioxidative power (FRAP) was not statistically significant (Table IV). These results suggest certain in-

Zmiany w parametrach biochemicznych

W chwili włączenia do badania u chorych z grupy O odnotowano wyższe wartości stężeń cholesterolu całkowitego i triglicerydów oraz niższe stężenie choleste-

Table IV. Effect of therapy on plasma oxidative stress and antioxidant status parameters in conservative treatment group**Tabela IV.** Wpływ leczenia na parametry stresu oksydacyjnego i potencjału antyoksydacyjnego w grupie leczonej zachowawczo

	Before therapy Przed leczeniem	After 6 weeks Po 6 tygodniach	After 12 weeks Po 12 tygodniach	Effect of therapy Efekt terapii	Significance Istotność statystyczna
N = 28	Mean (SD) Średnia (SD)	Mean (SD) Średnia (SD)	Mean (SD) Średnia (SD)		
Plasma TBARS [nmol/mL] Osoczone stężenie TBARS					
Before exercise Przed wysiłkiem	5.87 (0.2)	5.09 (0.27)	5.39 (0.26)	No change	
After exercise Po wysiłku	6.05 (0.19)	5.20 (0.29)	5.51 (0.26)		
LDL oxidative susceptibility sum TBARS Podatność LDL na oksydację					
Before exercise Przed wysiłkiem	45.61 (5.52)	43.0 (5.26)	48.7 (4.19)	No change	
After exercise Po wysiłku	47.04 (5.85)	43.25 (5.28)	48.9 (4.08)		
FRAP					
Before exercise Przed wysiłkiem	1.04 (0.04)	1.01 (0.04)	1.07 (0.04)	Increased	
After exercise Po wysiłku	1.07 (0.05)	1.04 (0.04)	1.09 (0.05)		
SH/Albumin					
Before exercise Przed wysiłkiem	7.23 (0.58) ^b	8.22 (0.41)	8.69 (0.44) ^{*b}	Increased	p < 0.05
After exercise Po wysiłku	8.59 (0.46)	7.87 (0.32)	9.25 (0.45)		

*p < 0.05 vs. entry data/wobec danych wyjściowych; ^bp < 0.05 for pre-exercise vs. post exercise data/dla wyników przed wysiłkiem vs. po wysiłku

crease in antioxidative capacity of plasma during the course of conservative therapy.

On the contrary, the plasma lipid peroxides measured by TBARS as well as the susceptibility of LDL to oxidative modification were significantly increased by the operative treatment (Table V). No significant changes in total plasma antioxidant potency (measured by FRAP assay) as well as by the plasma total thiol/albumin ratio were observed at the end of the therapy (Table V).

The above results suggest that in spite of the beneficial clinical outcome the surgical procedure did not protect patients from the oxidative stress indicated by the exhausting of the protective antioxidant mechanisms of plasma.

Discussion

We have demonstrated that the surgical revascularisation as well as the conservative treatment with regular exercise of patients with peripheral arterial disease effectively improve the clinical outcome expressed as the pain free and maximum walking time. However, surgical revascularization in spite of the clinical

rolu frakcji HDL (tab. II, III). Pomimo tego w obu grupach obserwowano zbliżone wartości wyjściowe parametrów opisujących stres oksydacyjny i potencjał antyoksydacyjny (tab. IV, V).

W grupie pacjentów leczonych zachowawczo wartości stężenia TBARS w osoczu, a także podatność LDL na oksydację nie ulegała zmianie w trakcie leczenia. Stwierdzono natomiast statystycznie znamiennej wzrost stosunku grup tiolowych do albuminy i tendencję wzrostową całkowitego potencjału redukcyjnego osocza (FRAP) (tab. IV). Wyniki te sugerują wzrost aktywności antyoksydacyjnej osocza w trakcie leczenia zachowawczego.

Natomiast w grupie chorych leczonych chirurgicznie zaobserwowano istotny wzrost stężenia nadtlenków lipidowych wyrażonych wzrostem stężenia TBARS oraz zwiększenie podatności LDL na oksydację po 12 miesiącach po zabiegu. Nie zaobserwowano natomiast istotnych zmian potencjału antyoksydacyjnego osocza (FRAP) i stosunku całkowitego stężenia grup tiolowych do albuminy (tab. V). Sugeruje to zwiększenie stresu oksydacyjnego u chorych leczonych chirurgicznie.

Table V. Effect of therapy on plasma oxidative stress and antioxidant status parameters in surgical treatment group
Tabela V. Wpływ leczenia na parametry stresu oksydacyjnego i potencjału antyoksydacyjnego w grupie leczonej operacyjnie

	Before therapy Przed leczeniem	After 6 weeks Po 6 tygodniach	After 12 weeks Po 12 tygodniach	Effect of therapy Efekt terapii	Significance Istotność statystyczna
N = 14	Mean (SD) Średnia (SD)	Mean (SD) Średnia (SD)	Mean (SD) Średnia (SD)		
Plasma TBARS [nmol/mL] Osoczone stężenie TBARS					
Before exercise Przed wysiłkiem	5.88 (0.24)	6.20 (0.41)	7.22 (1.09)*	Increased	p < 0.05
After exercise Po wysiłku	5.89 (0.24)	6.02 (0.30)	7.13 (1.02)		
LDL oxidative susceptibility sum TBARS Podatność LDL na oksydację					
Before exercise Przed wysiłkiem	45.05 (7.56)	44.8 (6.13)	52.73 (8.61)*	Increased	p < 0.05
After exercise Po wysiłku	43.45 (7.08)	42.38 (5.6)	54.76 (9.4)		
FRAP					
Before exercise Przed wysiłkiem	1.02 (0.07)	0.96 (0.06)	0.96 (0.06)	No change	
After exercise Po wysiłku	1.00 (0.05)	0.98 (0.06)	0.99 (0.07)		
SH/Albumin					
Before exercise Przed wysiłkiem	7.03 (0.43)	8.29 (1.06)	7.35 (0.53)	No change	
After exercise Po wysiłku	7.48 (0.46)	7.68 (0.68)	7.09 (0.53)		

*p < 0.05 vs. entry data/wobec danych wyjściowych

benefit did not protect from increased oxidative stress, as has been shown by the elevation of lipid peroxidation expressed by TBARS as well as by the increased susceptibility of LDL to oxidative modification. On the contrary, patients demonstrating the similar initial pattern of studied parameters but treated with the regular exercise and pentoxifylline revealed the significantly higher antioxidant capacity of plasma measured by FRAP and the SH to albumin ratio. Such results argue for the lower oxidative stress and lower exhaustion of the protective antioxidant mechanisms in the exercise-treated group.

Coronary and peripheral atherosclerosis demonstrated by symptoms of ischemia such as angina pectoris or intermittent claudication belongs to the major causes of disability and mortality in the middle-aged and elderly [3]. According to the recent understanding the development of atherosclerosis apart from the total plasma cholesterol level is connected with the inflammatory/immune response of vessel wall towards modified forms of LDL and other lipoproteins (including VLDL and HDL) [12, 13]. The oxygen derived species such as superoxi-

Dyskusja

Uzyskane wyniki są zgodne z doniesieniami, według których zarówno rewaskularyzacja dużych naczyń u pacjentów z PAD, jak i terapia zachowawcza z regularnym treningiem mięśni kończyn dolnych redukuje dolegliwości subiektywne u chorych i poprawia wskaźniki oceny klinicznej, jak maksymalny i bezbólowy dystans chromania, chociaż u chorych leczonych chirurgicznie odnotowano lepszą poprawę stanu ocenianą wskaźnikiem ABI. Rewaskularyzacja chirurgiczna przeprowadzona w badanej grupie nie chroniła ich przed stresem oksydacyjnym, co wyrażało się zwiększonym stężeniem TBARS oraz zwiększoną podatnością LDL na modyfikację oksydacyjną *in vitro* u pacjentów po upływie 12 tygodni od wykonania zabiegu w stosunku do wartości zanotowanych przed terapią. Natomiast u chorych leczonych zachowawczo (regularny trening mięśni kończyn dolnych + pentoksyfilina) zaobserwowano korzystne zmiany w parametrach ochrony przed stresem oksydacyjnym wyrażone wzrostem wartości potencjału antyoksydacyjnego osocza. Wyniki te świadczą o mniejszej podatności czy o mniejszym stresie oksydacyjnym,

de, hydroxyl free radicals, hydrogen peroxide derived from the activated white blood cells, platelets and the vessel wall cells including endothelium add its damaging activity to the inflammatory cytokines and growth factors remodeling the vessel wall and impairing the tissue blood flow in developing atherosclerosis [14]. The mechanisms regulating the exercise-related vasodilatation are poorly understood. The increased endothelial production of nitric oxide (NO) by the shear stress forces is supposed to participate in reactive hyperaemia accompanying the muscle work [15]. Chronic exercise, however produces an adaptation of the cardiovascular system characterized by the decrease in blood pressure and heart rate, and an increase in coronary blood flow and the capillary density of the skeletal muscle [16]. This events are also suggested to be in part related to NO generation [17, 18]. Similarly to the others [19] we have observed, that the angiogenic properties of the vascular endothelial growth factor (VEGF) induced in ischemic tissues are related to NO [20]. Thus the training-induced amelioration of clinical symptoms of intermittent claudication observed in our patients and by the others may be partially explained by the activation of VEGF/NO related angiogenesis which increased the work-induced blood redistribution to the skeletal muscle by newly formed capillaries. On the contrary, the surgical revascularisation is connected with the recanalisation of the main arteries restoring continuous blood flow. The improvement of ankle-brachial systolic pressure index ratio observed in operative but not in conservative treatment confirm such suggestion.

The activity of NO synthases (NOS) and NO availability is regulated by free radicals and lipid peroxides of modified lipoproteins, mainly oxidized LDL [21]. Patients with early-onset of peripheral artery disease have increased plasma level of antibodies against oxidized LDL [22]. Such auto-antibodies indirectly reflects LDL oxidation *in vivo* by activating the scavenger receptor mediated phagocytosis [23]. In patients with intermittent claudication even minor ischemic episodes are sufficient to cause tissue damage and LDL oxidation mediated by oxygen derived free radicals [3, 24 – 26]. Harris et al. observed that even slight abnormalities in lipid profile in peripheral artery disease patients are associated with elevated lipid peroxides [27]. We have not observed any heavy dyslipidemia in patients of both groups. Patients from the group O had slightly elevated triglycerides and lower HDL comparing to the C group i.e. demonstrated the more atherogenic lipid profile. Such differences were also observed by others comparing patients with symptomatic peripheral vascular

a także mniejszym „zużyciu” mechanizmów protekcyjnych lub zwiększeniu ich regeneracji u chorych leczonych treningiem.

Miażdżyca naczyń obwodowych należy do jednych z najczęstszych następstw miażdżycy, a chromanie przesłankowe jest jedną z przyczyn niepełnosprawności osób w wieku średnim i starszym [3].

Według aktualnych badań w rozwoju miażdżycy istotną rolę odgrywają procesy zapalno/immunologiczne ściany naczyń w odpowiedzi na zmodyfikowane oksydacyjnie formy lipoprotein LDL, a także innych lipoprotein (włącznie z VLDL i HDL) [12, 13]. Wolne rodniki i pochodne (jon ponadtlenkowy, rodniki hydroksylowe, nadtlenek wodoru) wydzielane przez aktywowane leukocyty, płytki i komórki ściany naczyń włącznie ze śródbłonkiem wzmagają uszkodzające działanie cytokin zapalnych i czynników wzrostu, wywołują skurcz i niekorzystną przebudowę ściany naczyń, upośledzają przepływ krwi i przyczyniają się do dalszego rozwoju miażdżycy oraz niedokrwienia tkanek [14].

Mechanizmy regulacji odpowiedzi naczynioruchowej podczas wysiłku nie są w pełni poznane. Uważa się, że hiperemia towarzysząca pracy mięśnia zależy częściowo od wzmożonej produkcji tlenu azotu (NO) jako reakcja na siły ścinające (*shear stress*) [15]. Natomiast długoterminowy trening wysiłkowy powoduje adaptację układu sercowo-naczyniowego charakteryzującą się obniżonym ciśnieniem tętniczym krwi, wzrostem przepływu wieńcowego i zwiększeniem gęstości kapilar w mięśniu szkieletowym [16]. Zjawiska te również zależą od generacji NO [17, 18]. W badaniach własnych wykazano, że angiogenne właściwości naczyniowego czynnika wzrostu śródbłonka (VEGF, *vascular endothelial growth factor*) zależą od NO [20], co także zaobserwowali inni badacze [19]. Można więc przypuszczać, że poprawa stanu klinicznego w wyniku regularnego treningu obserwowana w niniejszym badaniu może wiązać się z aktywacją angiogenezy zależnej od VEGF i NO. Następstwem tego procesu jest wytwarzanie nowych kapilar, które nie wpływają na parametry przepływu w dużych naczyniach (ABI), lecz poprawiają wysiłkową redystrybucję krwi w pracującym mięśniu. Dzięki temu uzyskuje się lepsze parametry oceny subiektywnej i klinicznej chromania.

Natomiast rewaskularyzacja chirurgiczna wiąże się z rekanalizacją dużych naczyń i przywraca stały przepływ krwi w kończynie wyrażony wzrostem ABI.

Aktywność syntaz NO i jego biodostępność jest regulowana m.in. obecnością unieczynnających NO wolnych rodników i nadtlenków lipidowych zmodyfikowanych lipoprotein, głównie oksydowanych LDL [21].

Pośrednim dowodem reakcji immunologicznej na zmodyfikowane oksydacyjnie LDL *in vivo* jest obec-

disease and controls [28, 29]. In 14–15% patients of both groups the insulin not dependent diabetes was diagnosed therefore the participation of the small, dense particles of LDL pool (pattern B) which are more susceptible to oxidation [30, 31] can not be excluded.

There is general agreement that physical training lessens symptoms of claudication. Multiple mechanisms are suggested to explain this protective effects. Physical training increases insulin sensitivity [32] lowers serum triglycerides, and increases serum HDL concentration, when serum LDL cholesterol concentrations remain unchanged or decrease slightly by physical training [33]. The beneficial effect of training has been also suggested to be partially dependent on a metabolic adaptation leading to increased muscle efficiency [2]. It has been experimentally demonstrated that plasma exposed to oxidative stress *in vitro* underwent the oxidative modification and uric acid, the thiol groups of albumin and ceruloplasmin are preferentially oxidized [34]. The adaptive changes of the blood antioxidant system may be associated with physical training. Ji Li et al. have demonstrated that glutathione may be involved in the restoration of the activity of thiol-dependent enzymes after exercise-induced inactivation [35]. Additionally the increase in the total glutathione and reduced GSH contents in erythrocytes may contribute to the vitamin E recycling [36]. Water soluble plasma antioxidant — uric acid and vitamin C are also known to increase during exercise [37]. The higher erythrocyte vitamin E and lymphocyte vitamins C content were found in regular runners [38]. The rise in vitamin E noted during exercise may be connected with the mobilization of vitamin E from adipose tissue stores in response to exercise [39].

Such mobilization of the antioxidant mechanisms has been confirmed by the decrease of TBARS plasma concentrations found in well-trained individuals [38]. However data concerning the other marker of lipid peroxidation: the malonyl dialdehyde plasma level after physical training are not unambiguous [15, 40]. The discrepancy may be explained by the activation of platelets as the source of MDA excess in patients with peripheral artery disease [41].

Regular physical activity of healthy individuals promoted protection mechanisms against lipid peroxidation [38, 40] and against oxygen stress induced by the single extensive physical activity [42]. LDL from aerobically trained subjects are more resistant to oxidative modification than LDL from sedentary subjects [43]. Above studies demonstrated that training may increase natural anti-oxidant capacity. On the contrary patients with the peripheral artery disease were shown to have de-

ność i stężenie autoprzeciwiał przeciwko tak zmodyfikowanym lipoproteinom [23]. Stwierdzono, że u chorych, u których wcześniej wystąpiła PAD, stężenie przeciwciał przeciwoksydowanym LDL jest istotnie podwyższone [22]. Chorzy z chromaniem przestankowym wykazują dużą podatność na oksydacyjną modyfikację lipoprotein i epizody nawet niewielkiego niedokrwienia mogą wywołać uszkodzenie tkanki i oksydację LDL przez wytwarzane wolne rodniki tlenowe [3, 24–26]. Harris i wsp. stwierdzili, że nawet stosunkowo niewielkie zaburzenia profilu lipidowego u chorych z PAD wiążą się ze wzrostem stężenia nadtlenków lipidowych [27]. U chorych biorących udział w przedstawianych badaniach nie stwierdzono ciężkich dyslipidemii. U pacjentów leczonych operacyjnie w porównaniu z grupą leczonych zachowawczo stwierdzono podwyższone stężenia triglicerydów i obniżone stężenie cholesterolu frakcji HDL podczas całego badania, co świadczy o bardziej niekorzystnym profilu lipidowym. Podobne różnice w stężeniu lipidów obserwowano także w innych badaniach porównujących chorych z PAD z grupą osób zdrowych [28, 29]. U 14–15% pacjentów z obu grup rozpoznawano uprzednio cukrzycę typu 2, co może świadczyć o obecności we krwi pacjentów obu grup małych, gęstych cząstek LDL (wzór B), które są bardziej podatne na oksydację [30, 31].

Uprawianie sportu zmniejsza objawy chromania. Istnieje wiele teorii tłumaczących to zjawisko. Ćwiczenia fizyczne redukują oporność na insulinę [32], obniżają triglicydemię, podnoszą stężenie cholesterolu frakcji HDL, podczas gdy stężenia cholesterolu frakcji LDL pozostają niezmiennione lub obniżają się w niewielkim stopniu [33].

Pozytywny skutek uprawiania ćwiczeń fizycznych może zależeć m.in. od metabolicznej adaptacji mięśnia zwiększającej jego sprawność [2]. Wydaje się, że potencjał antyoksydacyjny osocza wpływa na odpowiedź na trening. W osoczu poddanym stresowi oksydacyjnemu *in vitro* utlenieniu ulegają głównie kwas moczowy i grupy tiolowe albuminy, ceruloplazminy i innych białek [34], czyli podczas treningu następują zmiany adaptacyjne w osoczym układzie antyoksydacyjnym. Uważa się, że glutation wpływa na odtworzenie aktywności enzymów zależnych od grup tiolowych po ich inaktywacji wywołanej wysiłkiem [35]. Dlatego też wzrost zawartości glutationu w erytrocytach wiąże się z antyoksydacyjnymi własnościami zależnymi od przemian witaminy E we krwi [36]. Stężenie kwasu moczowego, spełniającego również rolę osoczewego antyoksydanta, podwyższa się podczas wysiłku [37]. U osób uprawiających regularnie ćwiczenia fizyczne obserwuje się większe zawartości witamin E i C w erytrocytach [38]. Niewielkie wzrosty osoczewych stężeń witaminy E notowano podczas wysiłku fizyczne-

creased antioxidant blood concentration after exercise [44]. Our study and others [38, 40] demonstrated that regular exercise training in patients with the Fountain II grade may increase antioxidant capacity also in patients with PAD. Administration of pentoxifylline, which was shown to inhibit free radical generation in patients suffering from peripheral vascular disease [45], may exert additional positive influence on antioxidant status in these patients.

On the contrary patients after the surgical revascularisation demonstrated the adverse profile of antioxidant status. Some data indicate that reduced total antioxidant capacity predicts ischemia-reperfusion injury after femoro-popliteal bypass grafting [46]. Rabl et al. observed a transient increase of plasma lipid peroxide levels after successful revascularization [47]. Patients from the O group were not trained thus there was no improvement in the antioxidant status observed in the exercised group. The lower level of HDL cholesterol in the surgically treated group in comparison to the conservative therapy group may also contribute to a lower antioxidant state in the O group. Paraoxonase the potent antioxidant enzyme of HDL was found to inhibit lipid peroxidation [48].

The number of current smokers — higher in the group O may be the additional explanation of the differences in antioxidant potency between groups. It has been reported that cigarette smoking increases oxidative modification of LDL and impairs modified LDL removal by liver [49, 50].

Concluding, the presented study may support the statement that patients undergoing the operative revascularisation are not protected against the oxidative stress and the physical training with the antioxidant supplementation therapy seems to be highly recommended in patients with the peripheral artery disease.

References

- O'Riordain DS, O'Donnell JA (1991) Realistic expectations for the patient with intermittent claudication. *Br J Surg* 78: 861–863.
 - Hiatt WR, Regensteiner JG, Hargarten ME, Wolfel EE, Brass EP (1990) Benefit of exercise conditioning for patients with peripheral vascular disease. *Circulation*, 81: 602–609.
 - Shearman CP, Gosling P, Gwynn BR, Simms MH (1988) Systemic effects associated with intermittent claudication. A model to study biochemical aspects of vascular disease? *Eur J Vasc Surg*, 2: 401–404.
 - Welbourn CR, Goldman G, Paterson IS, Valeri CR, Shepero D, Hechtman HB (1991) Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: central role of the neutrophil. *Br J Surg*, 78: 651–655.
 - Hickey NC, Gosling P, Baar S, Shearman CP, Simms MH
- go, co prawdopodobnie wiąże się z uwalnianiem jej z magazynów w tkance tłuszczowej [39]. Taka mobilizacja układu antyoksydacyjnego została potwierdzona pomiarem spoczynkowych stężeń TBARS, które są mniejsze u osób wykonujących ćwiczenia fizyczne [38]. Określanie generacji wolnych rodników za pomocą pomiaru stężenia dialdehydu malonowego (MDA) we krwi nie jest tak jednoznaczne [15, 40]. Może to wynikać z aktywacji płytek i wydzielania z nich MDA jako wykładnika syntezy tromboksanu A₂, a nie wykładnika oksydacji innych lipidów krwi, co obserwowano u chorych z PAD [41].
- Regularne wykonywanie ćwiczeń zwiększa naturalną ochronę przed peroksydacją lipidów [38, 40] i uwalnia enzymy [42]. Cholesterol frakcji LDL u osób uprawiających ćwiczenia aerobowe wykazywał zwiększoną oporność na oksydację w porównaniu z cholesterolem frakcji LDL u osób o siedzącym trybie życia [43].
- Wyniki powyższych badań dowodzą, że regularne wykonywanie ćwiczeń fizycznych może poprawiać naturalne mechanizmy antyoksydacyjne. Khair i wsp. obserwowali natomiast spadek stężenia antyoksydantów u osób z chromaniem przestankowym po jednorazowym intensywnym wysiłku [44]. Wyniki niniejszych oraz innych badań [38, 40] świadczą jednak, że regularny wysiłek fizyczny może na długi czas zwiększać potencjał antyoksydacyjny nie tylko u zdrowych osób, ale i u pacjentów z PAD. Dodatkowym czynnikiem sprzyjającym zwiększeniu potencjału antyoksydacyjnego w tej grupie może być podawanie pentoksyfiliny, która jak wykazano w niektórych badaniach, może hamować generację wolnych rodników u chorych z PAD [45].
- Jednocześnie w badaniach przeprowadzonych przez autorów u chorych leczonych chirurgicznie pomimo poprawy klinicznej odnotowano niekorzystne zmiany w profilu antyoksydacyjnym. Istnieją doniesienia o podwyższonym stężeniu nadtlenków lipidowych nawet po udanych operacjach rewaskularyzacji [47], a także o niekorzystnym związku między wielkością poreperfuzyjnego uszkodzenia tkanki a wyjściowym potencjałem antyoksydacyjnym po wszczępieniu zespołów omijających [46]. Niższe stężenie cholesterolu frakcji HDL w grupie pacjentów poddanych rewaskularyzacji może dodatkowo sprzyjać niekorzystnemu profilowi antyoksydacyjnemu. W literaturze opisano potencjał antyoksydacyjny cholesterolu frakcji HDL i związanych z tą frakcją enzymów (jak paraoksonaza) [48]. Innym źródłem różnic w potencjale antyoksydacyjnym między badanymi grupami może być liczba palaczy tytoniu. Według badań Mahfouza i wsp. nikotynizm sprzyja oksydatywnej modyfikacji lipidów cholesterolu frakcji LDL i zmniejsza ich usuwanie z krążenia drogą receptora wątrobowego *in vitro* [49, 50].

- (1990) Effect of surgery on the systemic inflammatory response to intermittent claudication. *Br J Surg*, 77: 1121–1124.
6. Kaplan M, Aviram M (1999) Oxidized low density lipoprotein: atherogenic and proinflammatory characteristics during macrophage foam cell formation. An inhibitory role for nutritional antioxidants and serum paraoxonase. *Clin Chem Lab Med*, 37: 777–787.
 7. Sinclair AJ, Barnett AH, Lunec J (1990) Free radicals and antioxidant systems in health and disease. *Br J Hosp Med*, 43: 334–344.
 8. Wallin B, Rosengren B, Shertzer HG, Camejo G (1993) Lipoprotein oxidation and measurement of thiobarbituric acid reacting substances formation in a single microtiter plate: its use for the evaluation of antioxidants. *Anal Biochem*, 208: 10–15.
 9. Benzie IFF, Strain JJ (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of the "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem*, 239: 70–76.
 10. Del Boccio G, Lapenna D, Porreca E, Pennelli A, Savini F, Feliciani P, Ricci G, Cuccurullo F (1990) Aortic antioxidant defence mechanisms: time-related changes in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis*, 81: 127–135.
 11. Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH (1955) The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest*, 34–40.
 12. Steinberg D (1997) Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem*, 272: 20963–20966.
 13. Witztum JL, Steinberg D (1991) Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest*, 88: 1785–1792.
 14. Berliner J, Leitinger N, Watson A, Huber J, Fogelman A, Navab M (1997) Oxidized lipids in atherogenesis. Formation, destruction and action. *Thromb Haemostas*, 78: 195–199.
 15. Maxwell SRJ, Jakeman P, Thomason H, Leguen C, Thorpe GHG (1993) Changes in plasma antioxidant status during eccentric exercise and the effect of vitamin supplementation. *Free Rad Res Comms*, 19: 191–202.
 16. Hermansen L, Wachtlor M (1971) Capillary density of skeletal muscle in well trained and untrained men. *J Appl Physiol*, 30: 860–863.
 17. Owlya R, Vollenweider L, Trueb L, Sartori C, Lepori M, Nicod P, Scherrer U (1997) Cardiovascular and sympathetic effects of nitric oxide inhibition at rest and during static exercise in humans. *Circulation*, 96: 3897–3903.
 18. Poveda JJ, Riestra A, Salas E, Cagigas ML, Lopez-Somoza C, Amado JA, Berrazueta JR (1997) Contribution of nitric oxide to exercise induced changes in healthy volunteers: effects of acute exercise and long-term physical training. *Eur J Clin Invest*, 27: 967–971.
 19. Tsurumi Y, Murochara T, Krasinsky K, Chen D, Witzendicher B, Kearney M, Couffinhal T, Isner JM (1997) Reciprocal relation between VEGF and NO in regulation of endothelial integrity. *Nature Med*, 3: 879–886.
 20. Dembinska-Kiec A, Dulak J, Partyka Ł, Huk I, Malinski T (1997) VEGF-nitric oxide reciprocal regulation. *Nature Med*, 3: 1177.
 21. Creager MA, Cooke JP, Mendelsohn ME, Gallagher SJ, Coleman SM, Loscalzo J, Dzau VJ (1990) Impaired vasodilatation of forearm resistance vessel in hypercholesterolemic humans. *J Clin Invest*, 86: 228–234.
- Podsumowując, przedstawione wyniki obserwacji wskazują, że w przeciwieństwie do terapii wysiłkiem fizycznym u pacjentów leczonych operacyjnie nie uważa się poprawy w zakresie mechanizmów ochronnych przed stresem oksydacyjnym. Dlatego stały trening mięśni i podawanie antyoksydantów wydają się wskazaną terapią uzupełniającą po zabiegach rewaskularyzacji u chorych z miażdżycą naczyń.
-
22. Bergmark C, Wu R, de Faire U, Levfart AK, Swedenborg J (1995) Patients with early-onset peripheral disease have increased level of autoantibodies against oxidized LDL. *Arterioscl Thromb Vasc Biol*, 15: 441–444.
 23. Salonen JT, Yla-Herttuala S, Yamamoto R, Butler S, Korhonen H, Salonen R, Nyyssonen K, Palinski W, Witztum JL (1992) Autoantibody against oxidised LDL and progression of carotid atherosclerosis. *Lancet*, 339: 883–887.
 24. Ciuffetti G, Mercuri M, Mannarino E, Ott C, Lombardini R, Pasqualini L, Lupattelli G, Santambrogio L (1991) Free radical production in peripheral vascular disease. A risk for critical ischaemia? *Int Angiol*, 10 (2): 81–87.
 25. Edwards AT, Blann AD, Suarez-Mendez VJ, Lardi AM, McCollum CN (1994) Systemic responses in patients with intermittent claudication after treadmill exercise. *Br J Surg*, 81: 1738–1741.
 26. Gosling P, Shearman CP (1988) Increased levels of urinary proteins: markers of vascular permeability? *Ann Clin Biochem*, 25 Suppl: 150–155.
 27. Harris LM, Armstrong D, Browne R et al. (1998) Premature peripheral vascular disease: clinical profile and abnormal lipid peroxidation. *Cardiovasc Surg*, 6: 188–193.
 28. Cardia G, Grisorio D, Impedovo G, Lillo A, Regina G (1990) Plasma lipids as a risk factor in peripheral vascular disease. *Angiology*, 41 (1): 19–22.
 29. Trayner IM, Mannarino E, Clyne CA, Thompson GR (1980) Serum lipids and high density lipoprotein cholesterol in peripheral vascular disease. *Br J Surg*, 67: 497–499.
 30. Nelson CA, Morris MD (1983) Human low density lipoprotein structure: correlation with serum lipoprotein concentration. *Lipids*, 18: 553–557.
 31. Sevanian A, Hwang J, Hodis H, Cazzolato G, Avogaro P, Bitto-Bon G (1996) Contribution of an in vivo oxidized LDL to LDL oxidation and its association with dense LDL subpopulations. *Arterioscler. Thromb Vasc Biol*, 16 (6): 784–793.
 32. Hardin DS, Azzarelli B, Edwards J, Wigglesworth J, Mavian L, Brechtel G, Johnson A, Barton A, Garvey T (1995) Mechanism of enhanced insulin sensitivity in endurance-trained athletes: effects of blood flow and differential expression of GLUT 4 in skeletal muscle. *J Clin Endocrinol Metab*, 80: 2473–2476.
 33. Brownell KD, Bachorik PS (1982) Changes in plasma lipids and lipoproteins levels in men and women after a program of moderate exercise. *Circulation*, 107: 1198–1205.
 34. Wayner DDM, Burton GW, Ingold KV et al. (1987) The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxyl radical trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Bioch Biophys Acta*, 924: 408–419.

35. Ji LL, Stratman FW, Lardy HA (1988) Enzymatic down regulation with exercise in rat skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys*, 263: 137–149.
36. Costagliola C, Libondi T, Menzione M, et al (1985) Vitamin E and red blood cell glutathione. *Metabolism*, 34: 712–714.
37. Green HJ, Fraser IG (1988) Differential effects of exercise intensity on serum uric acid concentration. *Med Sci in Sport and Exercise*, 20: 55–59.
38. Robertson JD, Maughan RJ, Duthie GG, Morrice PC (1991) Increased blood antioxidant systems of runners in response to training load. *Clin Sci*, 80: 611–618.
39. Duthie GG, Arthur JR, James WPT (1990) Effects of smoking and vitamin E on blood antioxidant status. *Am J Clin Nutr Soc*, 40: 1061S–1063S.
40. Duthie GG, Robertson JD, Maughan RJ, Morrice PC (1990) Blood antioxidant status and erythrocyte lipid peroxidation following distance running. *Arch Biochem Biophys*, 282 (1): 78–83.
41. Gresele P, Catalano M, Glammarresi C, Volpato R, Termini R, Ciabatonni G, Nenci GG, Davi G (1997) Platelet activation markers in patients with peripheral arterial disease. A prospective comparison of different platelet function tests. *Thromb Haemostas*, 78: 1434–1437.
42. Ahlborg B, Brohult J (1967) Immediate and delayed metabolic reactions in well-trained subjects after physical exercise. *Acta Med Scand*, 182: 41–54.
43. Benzie IF, Tomlinson B (1998) Antioxidant power of angiotensin-converting enzyme inhibitors in vitro. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 45 (2): 168–169.
44. Khaira HS, Maxwell SR, Shearman CP (1995) Antioxidant consumption during exercise in intermitted claudication. *Br J Surg*, 82: 1660–1662.
45. Ciuffetti G, Mercuri M, Ott C, Lombardini R, Paltriccia R, Lupattelli G, Santambrogio L, Mannarino E (1991) Use of pentoxifylline as an inhibitor of free radical generation in peripheral vascular disease. Results of a double-blind placebo-controlled study. *Eur J Clin Pharmacol*, 41 (6): 511–515.
46. Spark JI, Chetter IC, Gallavin L, Kester RC, Guillou PJ, Scott DJA (1998) Reduced total antioxidant capacity predicts ischaemia-reperfusion injury after femorodistal bypass. *Br J Surg*, 85: 221–225.
47. Rabl H, Khoschsour G, Colombo T, Tatzber F, Esterbauer H (1992) Human plasma lipid peroxide levels show a strong transient increase after successful revascularization operations. *Free Rad Biol Med*, 13: 281–288.
48. Mackness M, Durrington P (1995) HDL, its enzymes and its potential to influence lipid peroxidation. *Atherosclerosis*, 115: 243–253.
49. Mahfouz MM, Hulea SA, Kummerow FA (1995) Cigarette smoke increases cholesterol oxidation and lipid peroxidation of human low-density lipoprotein and decreases its binding to the hepatic receptor in vitro. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 14: 181–192.
50. Sanderson KJ, van Rij AM, Wade CR, Sutherland WH (1995) Lipid peroxidation of circulating low density lipoproteins with age, smoking in peripheral vascular disease. *Atherosclerosis*, 118: 45–51.
51. Alessio HM, Goldfarb AH (1988) Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: adaptive response to training. *J Appl Physiol*, 64: 1333–1336.
52. Bai C, Jones DP (1996) GSH transport and GSH-dependent detoxication in small intestine of rats exposed in vivo to hypoxia. *Am J Physiol*, 271: G701–G706.
53. Bray TM, Taylor CG (1993) Tissue glutathione, nutrition, and oxidative stress. *Can J Physiol Pharmacol*, 71: 746–751.
54. Bulkley GB (1993) Free radicals and other reactive oxygen metabolites: clinical relevance and the therapeutic efficacy of antioxidant therapy. *Surgery*, 113: 479–483.
55. Davies KJA, Qiuntaniha T, Brooks GA (1982) Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochim. Biophys. Res Comm*, 107: 1198.
56. Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G (1992) The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radical Biol Med*, 13: 341–390.
57. Fishbaine B, Butterfield G (1984) Ascorbic acid status of running and sedentary men. *Int J Vit Nutr Res*, 54: 237.
58. Fuller C, Grundy S, Norkus E, Jialal I (1996) Effect of ascorbate supplementation on low density lipoprotein oxidation in smokers. *Atherosclerosis*, 119: 139–150.
59. Gosling P et al. (1994) Pharmacological reduction of the systemic damaging effects of local ischaemia. *Eur J Vasc Surg*, 8205–8208.
60. Hickman P, McLaren M, Hill H, McCollum PR (1994) Exercise causes endothelial damage in claudicants but not in healthy controls. *Br J Surg*, 81: 607–622.
61. Khaira HS, Maxwell SRJ, Thomason H, Thorpe GHG, Green MA, Sherman CP (1996) Antioxidant depletion during aortic aneurysm repair. *Br J Surg*, 83: 401–403.
62. Konneh M, Rutherford C, Shu-Riu L, Anggard E, Ferns G (1995) Vitamin E inhibits the intimal response to balloon catheter injury in the carotid artery of the cholesterol-fed rat. *Atherosclerosis*, 113: 29–39.
63. Lafont V, Chai Y, Cornhill F, Whitlow P, Howe P, Chisolm G (1995) Effect of alpha-tocopherol on restenosis after angioplasty in model of experimental atherosclerosis. *J Clin Invest*, 95: 1018–1025.
64. Mannarino E, Pasqualini L, Menna M, Maragoni G, Orlandi U (1989) Effects of physical training on peripheral vascular disease: a controlled study. *Angiology*, 40: 5–10.
65. Mansoor MA, Bergmark C, Svardal AM, Lonning PE, Ueland PM (1995) Redox status and protein binding of plasma homocysteine and other amino thiols in patients with early-onset peripheral vascular disease. *Arterioscl Thromb Vasc Biol*, 15: 232–240.
66. Maxwell AJ, Schauble E, Bernstein D, Cooke JP (1998) Limb blood flow during exercise is dependent on nitric oxide. *Circulation*, 369–374.
67. Mougnot N, Lesnik P, Ramirez-Gil F et al. (1997) Effect of the oxidation state of LDL on the modulation of vasomotor response in vitro. *Atheroscl*, 133: 183–192.
68. Pessah-Rasmussen H, Stavenow L, Seidegard J (1988) Low glutathione transferase activity in intermittent claudication. *Acta Chir Scand, Suppl S48*: A59.
69. Sanchez-Quesada JL, Ortega H, Payes-Romero A et al. (1997) LDL from aerobically trained subjects shows higher resistance to oxidative modification than LDL from sedentary subjects. *Atherosclerosis*, 132: 207–213.
70. Sumida S, Tanaka K, Kitao H, Nakamodo F (1989) Exercise-induced lipid peroxidation and leakage of enzymes before and after vitamin E supplementation. *Int J Biochem*, 21: 835.