

Effect of vasoactive drugs on antioxidant status and endothelial function in patients with chronic lower limb ischaemia in Fontaine's stage IIb

Wpływ leków wazoaktywnych na potencjał antyoksydacyjny i funkcje śródbłonna u chorych z przewlekłym niedokrwieniem kończyn dolnych w stadium IIb według klasyfikacji Fontaine'a

Hanna Krauss¹, Maciej Micker², Paweł Chęciński², Anna Jabłeczka³, Tomasz Synowiec², Agata Bednarek⁴, Natasza Balcer³

¹The Department of Physiology of K. Marcinkowski Medical University, Poznan, Poland (Katedra i Zakład Fizjologii Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu)

²Department of General and Vascular Surgery and Angiology of K. Marcinkowski Medical University, Poznan, Poland (Klinika Chirurgii Ogólnej i Naczyniowej oraz Angiologii Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu)

³Department of Clinical Pharmacology of K. Marcinkowski Medical University, Poznan, Poland (Zakład Farmakologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu)

⁴Department of Physiotherapy, Rheumatology and Rehabilitation of K. Marcinkowski Medical University, Poznan, Poland (Klinika Fizjoterapii, Reumatologii i Rehabilitacji Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu)

Abstract

Background. Atherosclerotic lower limb ischemia is the most important cause of intermittent claudication. Patients with intermittent claudication are at relatively low risk of limb loss. Therefore the predominant therapeutic approach in this group of patients is conservative treatment. The objective of this study was a comparison of bencyclane versus pentoxifilline effects on the clinical picture (pain free walking distance and maximum walking distance) and selected parameters of oxidative stress including blood level of nitric oxide (NO) and total antioxidant status of the plasma in patients with chronic lower limb ischaemia (Fontaine IIb).

Material and methods. Adult patients (60 subjects) with claudication distance shorter than 200 m (Fontaine II b) were divided into three groups: I. 20 patients administered bencyclane 200 mg i.v. for 7 days followed by 2 × 200 mg orally for 21 days; II. 20 patients administered pentoxifilline 300 mg i.v. for 7 days followed by 2 × 600 mg orally for 21 days; III. 20 patients administered placebo i.v. for 7 days followed by 2 × 1 tablet orally for 21 days. In all patients walking distance until first pain, maximum walking distance and ankle brachial index (ABI) were measured. In all patients blood samples were taken on days 0, 7, 14 and 28 of the treatment and blood levels of nitric oxide (NO) and plasma total antioxidant status (TAS) were measured.

Results. Statistically significant increase in pain-free walking distance i.e. 127 ± 37.95 m in patients administered bencyclane ($p < 0.001$) and 125.29 ± 41.10 m in patients administered pentoxifilline ($p < 0.001$) was observed. Total antioxidant status (TAS) of the plasma and blood levels of nitric oxide also increased in patients treated with bencyclane and pentoxifilline ($p < 0.05$).

Address for correspondence:

Dr med. Maciej Micker
Klinika Chirurgii Ogólnej i Naczyniowej oraz Angiologii AM
ul. Dojazd 34, 60–631 Poznań
Tel: +48 (61) 846 45 31
e-mail: niunio@wp.pl

Conclusions. The administration of bencyclane and pentoxifilline is an effective therapeutic approach for patients with Fontaine II b chronic limb ischaemia. No significant differences were found in efficacy of the two active treatments in the study.

Key words: bencyclane, pentoxifilline, intermittent claudication, nitric oxide, total antioxidant status of the plasma

Streszczenie

Wstęp. Miażdżycowe niedokrwienie kończyn dolnych jest najważniejszą przyczyną wywołującą chromanie przestankowe. Chorzy z chromaniem przestankowym są obciążeni stosunkowo niewielkim ryzykiem utraty kończyny. Z tego powodu dominującym sposobem leczenia tej grupy chorych jest terapia zachowawcza.

Celem pracy było porównanie wpływu bencyklanu i pentoksyfiliny na obraz kliniczny (dystans przejścia bezbólowego i maksymalnego) i na wybrane parametry stresu oksydacyjnego, czyli stężenie tlenu azotu (NO) we krwi i całkowity potencjał antyoksydacyjny osocza pacjentów z przewlekłym niedokrwieniem kończyn dolnych (stadium IIb).

Material i metody. Badaną grupę stanowili dorośli pacjenci (60 osób) z chromaniem przestankowym poniżej 200 m (stadium IIb niedokrwienia wg klasyfikacji Fontaine'a) podzieleni na 3 grupy: grupa I — 20 chorych otrzymujących bencyklan w dawce 200 mg i.v. przez 7 dni i 2 × 200 mg p.o. przez 21 dni; grupa II — 20 chorych, otrzymujących pentoksyfilinę w dawce 300 mg i.v. przez 7 dni i 2 × 600 mg p.o. przez 21 dni; grupa III — 20 chorych otrzymujących placebo i.v. przez 7 dni i 2 × 1 tabl. p.o. przez 21 dni. U wszystkich pacjentów przeprowadzono: badanie dystansu przejścia do pierwszego bólu (PFWD), maksymalnego (MWD) i zmierzono wskaźnik kostka-ramię (ABI). Od badanych pobrano krew w: 0., 7., 14. i 28. dniu podawania leków i oznaczono w surowicy krwi stężenie tlenu azotu (NO) i całkowity potencjał antyoksydacyjny osocza (TAS).

Wyniki. Stwierdzono znamienne statystycznie zwiększenie dystansu przejścia bezbólowego, czyli $127,00 \pm 37,95$ m w grupie chorych przyjmujących bencyklan ($p < 0,001$) i $125,29 \pm 41,10$ m u chorych otrzymujących pentoksyfilinę ($p < 0,001$). W grupie pacjentów stosujących bencyklan i pentoksyfilinę wzrosła wartość całkowitego potencjału antyoksydacyjnego osocza i stężenie tlenu azotu ($p < 0,05$).

Wnioski. Zastosowanie bencyklanu i pentoksyfiliny jest skuteczną formą terapii u chorych z przewlekłym niedokrwieniem kończyn w klasie IIb według klasyfikacji Fontaine'a. Nie stwierdzono istotnych różnic w skuteczności działania obu badanych preparatów.

Słowa kluczowe: bencyklan, pentoksyfilina, chromanie przestankowe, tlenek azotu, całkowity potencjał antyoksydacyjny

Introduction

Lower limb ischemia due to atherosclerosis is the most important underlying cause of intermittent claudication. The occurrence of intermittent claudication in patients, when visiting a physician, usually suggests the initial stages of the disease.

Moreover, there have been numerous reports of patients who, in spite of occlusive lesions in their arteries supplying the muscles of the lower limbs, do not experience any pain in walking. These patients very often have concomitant arthropathy or sedentary lifestyle. Moreover, consideration must be given to many other conditions that might resemble intermittent claudication including chronic venous insufficiency, spondyloarthrosis and diabetic angiopathy.

Assessment of changes in the severity of intermittent claudication can help us to follow the progression of the disease process and evaluate the effectiveness of treatment in atherosclerotic ischaemia. Determination of walking speed, gradient of the walking surface and condition of the patient's other organs can give falsely positive or

Wstęp

Miażdżycowe niedokrwienie kończyn dolnych jest najważniejszą przyczyną wywołującą chromanie przestankowe. Wystąpienie chromania u zgłaszających się do lekarza pacjentów często świadczy o początkowej fazie rozwoju choroby.

Znane są także liczne przypadki chorych, którzy pomimo obecnych zmian zwężających tętnice doprowadzające krew do mięśni kończyn dolnych, nie odczuwają bólu podczas chodzenia. U takich osób często współistnieją zmiany stawowe lub prowadzą oni siedzący tryb życia. Należy również pamiętać o innych licznych schorzeniach mogących przypominać chromanie przestankowe, takich jak przewlekła niewydolność żylna, zmiany zwyrodnieniowe kręgosłupa i angiopatia cukrzycowa.

Ocena zmiany nasilenia objawów chromania przestankowego jest również pomocna w monitorowaniu przebiegu choroby i efektu leczenia miażdżycowego niedokrwienia. Określenie szybkości marszu, stopnia

falsely negative results. Development of standard conditions of measurement of intermittent claudication distance enables the comparison of test results and making decisions about indications for possible medical or surgical treatment. Walking distance without pain in the lower limbs is one criteria of the R. Fontaine scale [1], which shows different stages of chronic limb ischaemia:

- I — little or no symptoms, such as numbness, tingling or cold sensitivity;
- II–IIa — intermittent claudication at distances greater than 200 m;
- IIb — intermittent claudication at distances less than 200 m;
- III — rest pain;
- IV — ulceration, gangrene, necrosis.

Contrary to critical atherosclerotic lower limb ischaemia, which manifests first of all with rest pain and necrotic lesions, patients with intermittent claudication are at relatively low risk of limb loss. Therefore the predominant therapeutic approach in this group of patients is conservative treatment, which, among other benefits, is supposed to reduce the risk of serious cardiovascular complications resultant from atherosclerotic lesions in coronary arteries. During a 10 year follow-up only 18% of patients with intermittent claudication will need surgical treatment, and approximately 10% will require amputation of their critically ischaemic limb [2, 3].

Although reconstructive surgery of the arteries and endovascular methods of artery repair have revolutionized the management of patients with lower limb ischaemia, methods of conservative treatment, including regular walking training, control of atheromatosis risk factors and drug treatment, continue to be treatments of choice in patients with intermittent claudication (Figure 1) [4].

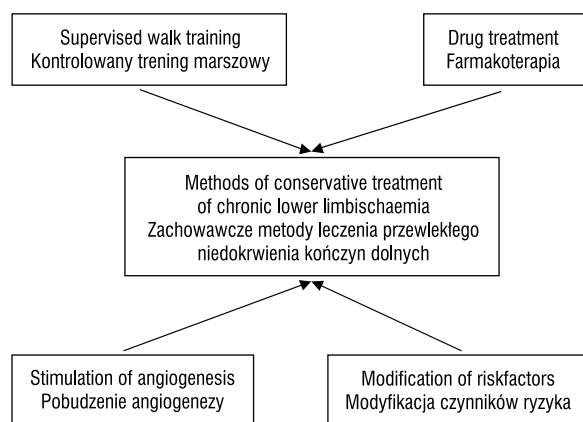


Figure 1. Methods of conservative treatment of chronic lower limb ischaemia according to [4]

Rycina 1. Zachowawcze metody leczenia przewlekłego niedokrwienia kończyn dolnych wg [4]

nachylenia pokonywanej drogi czy też stanu klinicznego innych narządów badanego chorego może dawać fałszywie dodatnie lub ujemne wyniki. Stworzenie jednokowych warunków badania dystansu chromania umożliwiło badającym porównywanie wyników i ustalenie wskazań do ewentualnego leczenia zarówno zachowawczego, jak i operacyjnego. Określenie dystansu przechodzonego bez bólu kończyn dolnych jest między innymi jednym z elementów skali Fontaine'a [1], ukazującej etapy zaawansowania przewlekłego niedokrwienia kończyn:

- I — brak lub nieznaczne objawy kliniczne pod postacią mrowienia, drętwienia i wrażliwości na zimno;
- II–IIa — chromanie przestankowe powyżej 200 m;
- IIb — chromanie przestankowe poniżej 200 m;
- III — ból spoczynkowy;
- IV — owrzodzenie, zgorzel, martwica.

W przeciwieństwie do krytycznego miażdżycowego niedokrwienia kończyn dolnych, objawiającego się przede wszystkim bólem spoczynkowym i obecnością zmian martwiczych, chorzy z chromaniem przestankowym są obarczeni stosunkowo niewielkim ryzykiem utraty kończyny. Z tego powodu dominującym sposobem leczenia tej grupy pacjentów jest terapia zachowawcza, między innymi zmniejszająca ryzyko wystąpienia groźnych powikłań układu krążenia, będących pochodną zmian miażdżycowych w naczyniach wieńcowych. Tylko około 18% chorych z chromaniem przestankowym będzie wymagało interwencji chirurgicznej, a u około 10% dojdzie do konieczności amputacji skrajnie niedokrwionej kończyny w ciągu 10-letniej obserwacji [2, 3].

Mimo że chirurgia rekonstrukcyjna tętnic i metody endowaskularne naprawy układu tętniczego zrewolucjonizowały leczenie chorych z niedokrwieniem kończyn dolnych, to zachowawcze sposoby terapeutyczne, takie jak regularny trening marszowy (chodzenie), zwalczanie miażdżycowych czynników ryzyka i farmakoterapia, są metodami leczenia z wyboru chromania przestankowego (ryc. 1) [4].

Podstawową zasadą leczenia chorych z chromaniem przestankowym jest likwidacja czynników ryzyka wystąpienia miażdżycy, przede wszystkim tych, które zależą od zachowań samego chorego. Zaprzestanie palenia tytoniu czy też zmniejszenie masy ciała powinno być warunkiem koniecznym do rozpoczęcia leczenia. Utrzymywanie prawidłowego ciśnienia tętniczego, glikemii i stężenia cholesterolu, czy też regularne przyjmowanie leków przeciwplatekcyjnych z grupy kwasu acetylosalicylowego to już standardy w terapii chorych z miażdżycą tętnic kończyn dolnych.

The main idea in the management of patients with intermittent claudication is the elimination of atherosclerotic risk factors including, first of all, the factors that can be modified by the patient's behaviour. Quitting smoking and body weight reduction should be a prerequisite for the initiation of medical treatment. Maintaining normal blood pressure, controlling glycaemia and cholesterol level as well as regular administration of antiplatelet drugs from the class of acetylsalicylic acids have already become a standard in the management of patients with occlusive artery disease of the lower limbs.

At the moment the most widely used medicinal product in the treatment of intermittent claudication is pentoxifylline, which improves the rheological properties of blood, inhibits adhesion and aggregation of erythrocytes and has antithrombotic activity. Other drugs with proven beneficial effects on intermittent claudication include naftidrofuryl (unavailable in Poland), buflomedil and bencyclane. However, in currently available literature there is no explicit information about the modes of action of these drugs in the treatment of intermittent claudication.

The aim of this study was a comparison of bencyclane versus pentoxifylline effects on the clinical picture (pain free and maximum walking distances) and selected parameters of oxidative stress including blood levels of nitric oxide (NO) and plasma total antioxidant status in patients with chronic lower limb ischaemia (Fontaine IIb). Moreover, the tolerance of pharmacological treatment was assessed, and incidence of possible drug related adverse events was reported.

Material and methods

The study involved patients with lower limb ischaemia due to atherosclerosis, in stage IIb according to the Fontaine classification, hospitalized in the Department of General and Vascular Surgery and Angiology of K. Marcinkowski Medical School in Poznań. The study groups included adult patients with claudication distance less than 200 m (Fontaine II b). The criteria taken into account in the process of patient recruitment into the study were as follows:

- patient history (pain free walking distance less than 200 m);
- physical examination (including palpating pulses in typical points);
- evaluation of ankle brachial index (< 0.9) and/or angiography (angiography was not necessary to qualify the patient into the study).

The study was designed as a randomized, controlled, single-blind clinical trial. Patients were randomly

Najbardziej rozpowszechnionym lekiem w terapii chromania przestankowego jest obecnie pentoksyfilina, która między innymi poprawia właściwości reologiczne krwi, zmniejsza zdolność erytrocytów do adhezji i agregacji, a także zmniejsza zdolność do tworzenia zakrzepów. Do innych leków o udowodnionym, korzystnym wpływie na chromanie przestankowe należą naftidrofuryl (nieдоступny w Polsce), buflomedil i bencyklan. W dostępnym i aktualnym piśmiennictwie natomiast nie ustalono jednoznacznie mechanizmów działania tych leków w terapii chromania przestankowego.

Celem pracy było porównanie wpływu bency克兰u i pentoksyfiliny na obraz kliniczny (dystans przejścia bezbólowego i maksymalnego), a także na wybrane parametry stresu oksydacyjnego, czyli stężenie tlenu azotu (NO) we krwi i całkowity potencjał antyoksydacyjny osocza pacjentów z przewlekłym niedokrwieniem kończyn dolnych (stadium IIb). Podczas obserwacji chorych oceniono również tolerancję zastosowanej farmakoterapii i zanotowano ewentualne występowanie działań niepożądanych podawanych leków.

Material i metody

Badania przeprowadzono u chorych z miażdżycowym niedokrwieniem kończyn dolnych w IIb stopniu według klasyfikacji Fontaine'a hospitalizowanych w Klinice Chirurgii Ogólnej i Naczyń oraz Angiologii Akademii Medycznej im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu. Grupy chorych stanowili dorośli pacjenci z chromaniem przestankowym poniżej 200 m (stadium IIb niedokrwienia wg klasyfikacji Fontaine'a). Kryteria, jakimi kierowano się podczas kwalifikacji chorych do badania, były następujące:

- wywiad (długość dystansu przechodzonego bez bólu poniżej 200 m);
 - badanie przedmiotowe (m.in. palpacyjne badanie tętna w miejscach typowych);
 - ocena wskaźnika kostka-ramię ($< 0,9$) i/lub angiografia (nie była badaniem koniecznym do kwalifikacji chorego do badania).
- Badanie było randomizowane, kontrolowane, z pojedynczą ślepą próbą. Pacjentów losowo (randomizacja prosta 1:1:1) podzielono na 3 grupy:
- grupa I — pacjenci otrzymujący bencyklan w dawce 200 mg *i.v.* przez 7 dni i 2 × 200 mg *p.o.* przez 21 dni;
 - grupa II — pacjenci otrzymujący pentoksyfilinę w dawce 300 mg *i.v.* przez 7 dni i 2 × 600 mg *p.o.* przez 21 dni;
 - grupa III pacjentów otrzymujących placebo *i.v.* przez 7 dni i 2 × 1 tabl. *p.o.* przez 21 dni.

W badaniu wzięło udział 60 osób. U wszystkich przeprowadzono zaplanowaną 4-tygodniową obserwację.

(simple 1:1:1 randomization) assigned to one of the following three groups:

- group I — patients administered bencyclane 200 mg *i.v.* for 7 days followed by 2 × 200 mg *p.o.* for 21 days;
- group II — patients administered pentoxifylline 300 mg *i.v.* for 7 days and 2 × 600 mg *p.o.* for 21 days;
- group III — patients administered placebo *i.v.* for 7 days followed by 2 × 1 tabl. *p.o.* for 21 days.

In total 60 patients were enrolled into the study. Follow-up period for all the patients was 4 weeks, as intended. There was no need to stop the treatment because of critical ischaemia or side effects.

The inclusion criteria were:

- occlusive artery disease of the lower limbs, Fontaine IIb;
- age greater than 40 years;
- ankle brachial index between 0.5 and 0.9;
- withdrawal of other vasoactive drugs 7 days before the patient's entry into the study;
- no overt anaemia: Hgb > 10 g/dL;
- no indications for reconstructive arterial surgery or lack of patient consent to surgical treatment;
- written informed consent.

The exclusion criteria were:

- acute myocardial infarction within the last 90 days;
- uncontrolled heart failure (NYHA III–IV);
- third degree atrioventricular block;
- severe hepatic dysfunction (ALAT > 2 × the upper limit of normal);
- renal dysfunction (urea > 14 mmol/L; creatinine > 250 μmol/L);
- diabetes;
- head injury with loss of consciousness within the last 12 months;
- stroke within the last 6 months;
- glaucoma;
- active peptic ulcer disease of the stomach or duodenum;
- pregnancy, breast feeding;
- uncooperative patient.

All patients continued on their long-term antiplatelet therapy (aspirin, ticlopidine). All medications administered because of concomitant diseases before the patient entry into the study were continued, but records were made about indications for the therapy, the international name of the drug, its dose and date of initiation. Every change in treatment or its dose was recorded in an adverse event form.

No other vasoactive drugs were used for atherosclerotic lower limb ischaemia (excluding calcium channel antagonists that were allowed in cardiac indications).

Nie zachodziła konieczność przerwania leczenia z powodu krytycznego niedokrwienia ani działań niepożądanych.

Kryteria włączenia do badania

Kryteria włączenia do badania były następujące:

- miażdżycza zarostowa tętnic kończyn dolnych w stopniu IIb według klasyfikacji Fontanie'a;
- wiek powyżej 40 lat;
- wskaźnik kostka-ramię w granicach 0,5–0,9;
- zaprzestanie stosowania innych leków naczyniowych 7 dni przed planowanym badaniem;
- brak cech jawnej niedokrwistości: Hgb > 10 g/dl;
- brak wskazań do operacji odtwórczej na tętnicach bądź brak zgody chorego na leczenie operacyjne;
- pisemna zgoda na udział w badaniu po wyczerpującym wyjaśnieniu choremu jego istoty.

Kryteria wykluczenia z badania

Kryteria wykluczenia z badania były następujące:

- przeżyty zawał serca w okresie ostatnich 90 dni;
- niewyrównana niewydolność serca (III–IV stopień wg NYHA);
- blok przedsionkowo-komorowy III stopnia;
- ciężka niewydolność wątroby (ALAT > 2 × norma);
- niewydolność nerek (mocznik > 14 mmol/l; kreatynina > 250 μmol/l);
- cukrzyca;
- uraz głowy z utratą przytomności w ciągu ostatnich 12 miesięcy;
- udar mózgu przeżyty w ciągu ostatnich 6 miesięcy;
- jaskra;
- czynna choroba wrzodowa żołądka/dwunastnicy;
- ciąża, karmienie piersią;
- brak współpracy ze strony chorego.

U wszystkich chorych kontynuowano leczenie przewlekłe lekami przeciwplateletowymi (kwas acetylosaliicylowy, tiklopidyna). Stosowanie wszystkich leków przyjmowanych z powodu chorób współistniejących przed włączeniem do badania kontynuowano z wpisaniem wskazania, nazwy międzynarodowej leku, dawki, czasu rozpoczęcia podawania. Każdą zmianę leków lub ich dawki odnotowywano w rejestrze działań niepożądanych.

Nie stosowano innych leków wazoaktywnych podawanych z powodu miażdżycowego niedokrwienia kończyn dolnych (z wyjątkiem antagonistów wapnia z powodów kardiologicznych).

U każdego chorego przeprowadzono badanie dystansu przejścia bezbólowego (PFWD) i dystansu maksymalnego (MWD), a także wyznaczano wartość wskaźnika kostka-ramię (ABI).

In all patients pain free and maximum walking distance and ankle brachial index were measured.

Measurement of pain free and maximum walking distance and ankle brachial index

Intermittent claudication distances (PFWD and MWD) were measured on a treadmill (Cambridge 9800). The speed of the belt was 3.5 km/h and the gradient of the treadmill walking surface was 12°. Ankle brachial index was evaluated by measuring systolic blood pressure in brachial artery and in arteries of the foot (the sphygmomanometer cuff was placed close to the ankle). The ABI value was calculated by dividing ankle pressure with brachial pressure.

Laboratory tests

In all patients blood samples were taken in days 0, 7, 14 and 28 of the treatment and serum levels of nitric oxide (NO) and plasma total antioxidant status were measured:

- nitric oxide (NO) concentration was determined using a testing set provided by Oxis using a Hyperion Micro Reader. The test involves a direct method of quantitative determination of nitrites in biological material. In aqueous solutions nitric oxide is oxidized to nitrates and nitrites. Following enzymatic reduction of nitrates to nitrites by nitrate reductase and reduced form of nicotinamide adenine β -dinucleotide, Griess reagent composed of p-aminobenzene sulphamide in 3 N HCl and N-(1-naphtyl)-ethylene diamine is added. As a result of Griess reaction nitrites are converted to nitric oxide, which reacts with sulphanilic acid, whereas the intermediate product reacts with N-(1-naphtyl)-ethylene diamine to generate a pink product with maximum absorption $\lambda = 540$ nm. Change in absorbance of the solution measured spectrophotometrically with a Hyperion micro reader is proportional to the nitric oxide concentration. Concentration values of the tested samples were read from the standard absorption (540 nm) — concentration [μ M] curve;
- total antioxidant status (TAS) of the plasma was measured using a NX 2332 testing set by Randox. The test involves incubation of ABTS[®] (2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline sulphonate)] with metmyoglobin and H₂O₂ to produce ABTS[®] radical. The radical has a stable blue-green colour when measured at 600 nm. Antioxidants in the added sample suppress this colour production in proportion to their concentration. The test contained phosphate buffer (5 mmol/L pH 7.4), metmyoglobin (6.1 μ M), ABTS[®] (610 μ M) and H₂O₂

Badanie dystansu przejścia bezbólowego, maksymalnego i wskaźnika kostka-ramię

Dystans chromania przestankowego (PFWD i MWD) mierzono na poziomej bieżni ruchomej Cambridge 9800 o przesuwie taśmy 3,5 km/h i kącie nachylenia 12°. Wskaźnik kostka-ramię (ABI) określono, mierząc każdorazowo ciśnienie skurczowe w tętnicy ramiennej, a następnie w tętnicach stopy (mankiet sfigomanometru zakładano w pobliżu kostek goleni). Wartość wskaźnika obliczano z ilorazu ciśnienia z obwodu kończyny dolnej i ciśnienia na ramieniu.

Badania laboratoryjne

Od wszystkich pacjentów pobrano krew w 0., 7., 14. i 28. dniu podawania leków i oznaczono w surowicy krwi stężenie tlenu azotu (NO) i całkowity potencjał antyoksydacyjny osocza (TAS):

- tlenek azotu (NO) oznaczono zestawami testowymi firmy Oxis, przy użyciu mikroczytnika (Micro Reader) firmy Hyperion. Test ten opiera się na pośredniej metodzie ilościowego oznaczania azotynów w materiale biologicznym. W roztworach wodnych NO jest utleniany do azotanów i azotynów. Po enzymatycznej redukcji azotanów do azotynów za pomocą reduktazy azotanowej i zredukowanej formy β -dwunukleotydu nikotynamidoadeninowego dodaje się odczynnik Griessa składający się z p-aminobenzosulfonamidu w 3 N HCl i N-(1-naftyl)-etylenodwuaminianu. W reakcji Griessa z azotynów powstaje NO, który reaguje z kwasem sulfanilowym, a powstały pośredni produkt w reakcji z N-(1-naftyl)-etylenodwuaminianem daje różowy produkt z maksimum absorpcji $\lambda = 540$ nm. Spektrofotometrycznie mierzona zmiana ekstynkcji roztworu, przy użyciu mikroczytnika (Micro Reader) firmy Hyperion, jest proporcjonalna do stężenia tlenu azotu. Wartości stężeń badanych prób odczytywano z krzywej wzorcowej absorpcji (540 nm) względem stężenia [μ M];
- całkowity stan antyoksydacyjny (TAS) w osoczu krwi oznaczono za pomocą testu NX 2332 firmy Randox. Zasada testu polega na inkubacji ABTS[®] (siarczany 2,2'-azyno-di-[3-etylobenzotiazoliny]) z metmyoglobiną i H₂O₂ z wytworzeniem rodnika ABTS[®]. Rodnik ten posiada stałą, niebieskozieloną barwę przy długości fali 600 nm. Antyoksydanty znajdujące się w próbce zmniejszają nasilenie tej barwy w stopniu proporcjonalnym do ich stężenia. Test zawierał bufor fosforanowy (5 mmol/l pH 7,4), metmyoglobinę (6,1 μ M), ABTS[®] (610 μ M) oraz H₂O₂ (250 μ M). Odczytywano absorbancję początkową, a następnie po dokładnej 3 minutach absorbancję każdej próbki spektrofotometrem Specord M-40 firmy Carl-Zeiss Jena).

(250 μ M). Absorbance was read at baseline, and then the absorbance of each sample was read after exactly 3 minutes with a spectrophotometer (Specord M-40 by Carl-Zeiss Jena).

Due to the lack of normal distribution for most of the studied parameters, nonparametric tests were used (Kruskal-Wallis test for three independent groups) for all of the study variables.

Results

Each of the study groups included 20 patients. Patients were randomly assigned and inclusion criteria were as above. In the whole group of 60 patients there were 28 females and 32 males. No significant differences in demographic data were found between the study groups in terms of distribution of age, sex, smoking status, statin and antiplatelet therapies, baseline claudication distance and total cholesterol level. Mean age of patients was 65.9 years and baseline claudication distance was 94.8 m. All patients tolerated their treatments very well, and no clinically significant adverse events were observed for any of the study treatments.

Pain free walking distance and maximum walking distance

The first evaluated parameter, particularly important for the patient, was pain free walking distance (PFWD). On day 0 of the study no significant differences between the study groups were seen in pain free and maximum walking distances (MWD) ($p > 0.35$); their values in group I, II and III were 85.00 ± 40.33 m, 95.25 ± 42.16 m and 103.50 ± 43.20 m, respectively. On day 28 statistically significant differences between the study groups were observed. In all study groups, a statistically significant increase in pain free walking distance was found. A statistically significant increase in pain-free walking distance i.e. 127 ± 37.95 m (42 m) in patients administered with bencyclane ($p < 0.001$) and 125.29 ± 41.10 m (32.06 m) in patients administered with pentoxifiline ($p < 0.001$) [and 18.75 in patients administered with placebo ($p < 0.001$)] was observed. Increase in pain free walking distance in placebo patients was statistically significant but the difference was not so large ($p < 0.01$) i.e. 125.00 ± 49.13 m (Table I and Figure 2).

Similar results were obtained for maximum walking distance. On day 0 the values of maximum walking distance were 123.00 ± 54.20 m, 124.75 ± 46.38 m and 129.00 ± 45.18 m in patients administered bencyclane, pentoxifiline and placebo, respectively. No statistically significant differences in this parameter were seen between the treatment groups ($p > 0.8$). On day 28 a sta-

Ze względu na brak rozkładu normalnego większości badanych parametrów stosowano testy nieparametryczne (test Kruskala-Walissa) dla trzech niezależnych grup w stosunku do wszystkich badanych zmiennych.

Wyniki

Badane grupy liczyły po 20 osób. Grupy dobierano losowo według kryteriów przedstawionych powyżej. W łącznej grupie 60 chorych 28 stanowiły kobiety, a 32 mężczyźni. Nie stwierdzono istotnych różnic epidemiologicznych pomiędzy badanymi grupami pod względem rozkładu wieku, płci, liczby palaczy, stosowania statyn i leków przeciwplatek, długości wyjściowego dystansu chromania i stężenia cholesterolu całkowitego. Średnia wieku pacjentów wynosiła 65,9 roku, wyjściowy dystans do wystąpienia bólu — 94,8 m. Wszyscy badani dobrze tolerowali farmakoterapię i nie zanotowano działań niepożądanych związanych z podawaniem któregośkolwiek z preparatów.

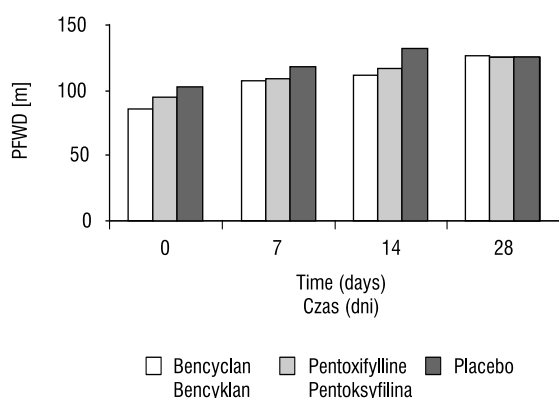
Dystans przejścia bezbólowego i maksymalnego

Pierwszym badanym parametrem, szczególnie istotnym dla pacjenta, był dystans przejścia bezbólowego. W 0. dniu badania pomiędzy grupami nie odnotowano istotnej statystycznie różnicy w dystansie przejścia bezbólowego (PFWD) i maksymalnego (MWD) ($p > 0,35$); wynosił on odpowiednio dla grupy I, II i III: $85,00 \pm 40,33$ m; $95,25 \pm 42,16$ m i $103,50 \pm 43,20$ m. W 28. dniu badania stwierdzono istotne statystycznie różnice pomiędzy grupami chorych. We wszystkich badanych grupach pacjentów odnotowano znamienne statystycznie zwiększenie dystansu przejścia bezbólowego. Wykazano znamienne statystycznie zwiększenie dystansu przejścia bezbólowego, czyli $127,00 \pm 37,95$ m w przypadku grupy chorych przyjmujących bencyklan ($p < 0,001$) i $125,29 \pm 41,10$ m dla chorych otrzymujących pentoksyfilinę ($p < 0,001$). Wydłużenie dystansu przejścia bezbólowego u chorych stosujących placebo było istotne statystycznie, niemniej jednak różnica ta nie była tak wyraźna ($p < 0,01$), czyli $125,00 \pm 49,13$ m (tab. I i ryc. 2).

Podobne wyniki uzyskano w przypadku dystansu przejścia maksymalnego. W 0. dniu badania wartości dystansu przejścia maksymalnego wynosiły $123,00 \pm 54,20$ m w grupie chorych przyjmujących bencyklan, $124,75 \pm 46,38$ m w grupie pacjentów otrzymujących pentoksyfilinę i $129,00 \pm 45,18$ m w grupie osób stosujących placebo. Pomiedzy grupami nie odnotowano w tym przypadku istotnej statystycznie różnicy ($p > 0,8$). W 28. dniu badania stwierdzono istotne statystycznie wydłużenie dystansu przejścia maksymalnego we wszystkich badanych grupach pacjentów przyjmujących

Table I. Pain free walking distance (PFWD) values in patients with Fontaine IIb chronic lower limb ischaemia administered bencyclane, pentoxifilline or placebo (in meters)**Tabela I.** Wartości dystansu przejścia bezbólowego (PFWD) u chorych z przewlekłym niedokrwieniem kończyn dolnych w stadium IIb według klasyfikacji Fontaine'a otrzymujących bencyklan, pentoksyfilinę lub placebo (w metrach)

Day Dzień	Bencyclane Bencyklan	Pentoxifilline Pentoksyfilina	Placebo
0	85.00 ± 40.33	95.25 ± 42.16	103.50 ± 43.20
7	107.50 ± 45.00	108.25 ± 44.46	118.50 ± 46.48
14	112.00 ± 41.15	117.11 ± 39.49	131.11 ± 45.23
28	127.00 ± 37.95	125.29 ± 41.10	125.00 ± 49.13
	p < 0.00	p < 0.001	p < 0.01

**Figure 2.** Comparison of changes in pain free walking distance (PFWD) during 28-day follow-up in patients with Fontaine IIb chronic lower limb ischaemia administered with bencyclane, pentoxifilline or placebo**Rycina 2.** Porównanie zmian dystansu przejścia bezbólowego (PFWD) w 28-dniowej obserwacji u chorych z przewlekłym niedokrwieniem kończyn dolnych w stadium IIb według klasyfikacji Fontaine'a otrzymujących bencyklan, pentoksyfilinę lub placebo

tistically significant increase in maximum walking distance was seen in all treatment groups, i.e. in patients administered with bencyclane, pentoxifilline and placebo. In group I, the maximum walking distance increased to 163.50 ± 42.09 m (p < 0.001), in group II — it increased to 168.53 ± 43.80 m (p < 0.001) and in group III — to 158.13 ± 54.56 m (p < 0.001) (Table II and Figure 3).

Ankle brachial index

The ankle brachial index (ABI) values measured at baseline and in the course of the study were comparable in all treatment groups. In the bencyclane group the ABI values for the right and left side were 0.70 ± 0.13 and 0.75 ± 0.12; 0.68 ± 0.09 and 0.74 ± 0.09; 0.66 ± 0.06 and 0.73 ± 0.07; and 0.66 ± 0.05 and 0.71 ± 0.11 on days 0, 7, 14 and 28 of the treatment,

bencyklan, pentoksyfilinę i placebo. W grupie I dystans przejścia maksymalnego zwiększył się do 163,50 ± 42,09 m (p < 0,001), w grupie II do 168,53 ± 43,80 m (p < 0,001), a w grupie III do 158,13 ± 54,56 m (p < 0,001) (tab. II, ryc. 3).

Wartości wskaźnika kostka-ramię

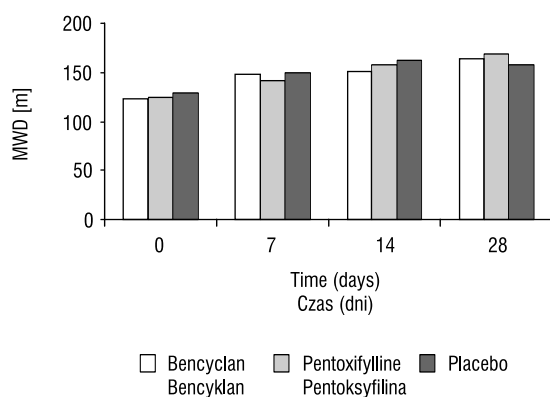
Wartości wskaźnika korelacji (ABI), w pomiarze wstępnym oraz w kolejnych oznaczeniach były porównywalne we wszystkich grupach. W grupie stosującej bencyklan wartości odpowiednio dla strony prawej i lewej wynosiły kolejno 0,70 ± 0,13 i 0,75 ± 0,12 w 0. dniu terapii; 0,68 ± 0,09 i 0,74 ± 0,09 w 7. dniu; 0,66 ± 0,06 i 0,73 ± 0,07 w 14. dniu; 0,66 ± 0,05 i 0,71 ± 0,11 w 28. dniu leczenia (p > 0,35 i p > 0,15). U chorych przyjmujących pentoksyfilinę oznaczono następujące wartości wskaźników: 0,69 ± 0,13 i 0,75 ± 0,12 na początku badania; 0,69 ± 0,10 i 0,74 ± 0,08 w 7. dniu obserwacji, 0,68 ± 0,07 i 0,75 ± 0,08 w 14. dniu badania; 0,65 ± 0,05 i 0,72 ± 0,12 w 28. dniu badania (p > 0,10 i p > 0,30). W grupie stosującej placebo wartości odpowiednio dla strony prawej i lewej wynosiły kolejno: 0,65 ± 0,16 i 0,69 ± 0,15 w 0. dniu terapii; 0,66 ± 0,11 i 0,69 ± 0,11 w 7. dniu; 0,65 ± 0,08 i 0,69 ± 0,10 w 14. dniu; 0,63 ± 0,07 i 0,67 ± 0,11 w 28. dniu terapii (p > 0,70 i p > 0,90) (tab. III, ryc. 4, 5).

Wartości całkowitego potencjału antyoksydacyjnego osocza

W 0. dniu badania wartość całkowitego potencjału antyoksydacyjnego osocza (TAS) różniła się statystycznie pomiędzy grupami, wynosiła 1,34 ± 0,52 w grupie I, 1,40 ± 0,61 w grupie II i 1,01 ± 0,41 w grupie III (co było wynikiem negatywnym w sensie poprawności badania — uwzględniono to jednak w dalszej interpretacji wyników). W 28. dniu terapii wartości TAS 28

Table II. Maximum walking distance (MWD) values in patients with Fontaine IIb chronic lower limb ischaemia administered with bencyclane, pentoxifilline or placebo (in meters)**Tabela II.** Wartości dystansu przejścia maksymalnego (MWD) u chorych z przewlekłym niedokrwieniem kończyn dolnych w stadium IIb według klasyfikacji Fontaine'a otrzymujących bencyklan, pentoksyfilinę lub placebo (w metrach)

Day Dzień	Bencyclane Bencyklan	Pentoxifilline Pentoksyfilina	Placebo
0	123.00 ± 54.20	124.75 ± 46.38	129.0 ± 45.18
7	148.00 ± 61.70	142.75 ± 49.22	149.50 ± 49.79
14	151.00 ± 52.91	157.11 ± 44.51	162.78 ± 45.86
28	163.50 ± 42.09	168.53 ± 43.80	158.13 ± 54.56
	p < 0.001	p < 0.001	p < 0.001

**Figure 3.** Comparison of changes in maximum walking distance (MWD) during 28-day follow-up in patients with Fontaine IIb chronic lower limb ischaemia administered with bencyclane, pentoxifilline or placebo**Rycina 3.** Porównanie zmian dystansu przejścia maksymalnego (MWD) w 28-dniowej obserwacji u chorych z przewlekłym niedokrwieniem kończyn dolnych w stadium IIb według klasyfikacji Fontaine'a otrzymujących bencyklan, pentoksyfilinę lub placebo

respectively ($p > 0.35$ and $p > 0.15$, respectively). In patients administered with pentoxifilline the ABI values on the right and left side were as follows: at baseline 0.69 ± 0.13 and 0.75 ± 0.12 ; on day 7 of the observation 0.69 ± 0.10 and 0.74 ± 0.08 ; on day 14 of the observation 0.68 ± 0.07 and 0.75 ± 0.08 ; on day 28 of the observation 0.65 ± 0.05 and 0.72 ± 0.12 , respectively ($p > 0.10$ and $p > 0.30$, respectively). In the placebo group the values measured on the right and left side were as follows: on day 0 of the treatment 0.65 ± 0.16 and 0.69 ± 0.15 ; on day 7 of the treatment 0.66 ± 0.11 and 0.69 ± 0.11 ; on day 14 0.65 ± 0.08 and 0.69 ± 0.10 ; and on day 28 0.63 ± 0.07 and 0.67 ± 0.11 , respectively ($p > 0.70$ and $p > 0.90$, respectively) (Table III and Figure 4, 5).

różniły się istotnie statystycznie pomiędzy grupami. W wykonanym *post-hoc* teście Duncana w próbie TAS 28 ujawniono, że średnie grup I i II tworzyły pary średnich jednorodnych i różniły się od średniej w grupie otrzymującej placebo, która była istotnie niższa ($p < 0,05$).

Analizując zmianę parametrów pomiędzy punktami TAS 0 i TAS 28 dla każdej grupy osobno, istotne statystycznie różnice stwierdzono jedynie w grupach pacjentów, którzy przyjmowali leki (ryc. 6). W grupie osób otrzymujących bencyklan i pentoksyfilinę wzrastała wartość TAS ($p < 0,05$) odpowiednio do $1,60 \pm 0,51$ i $1,60 \pm 0,67$ w przeciwieństwie do grupy otrzymującej placebo: $1,04 \pm 0,53$ ($p > 0,05$) (tab. IV, ryc. 6).

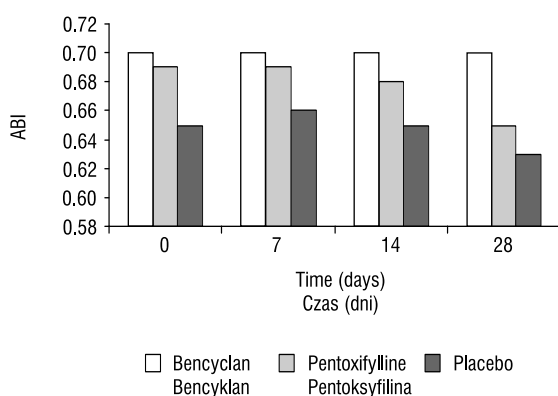
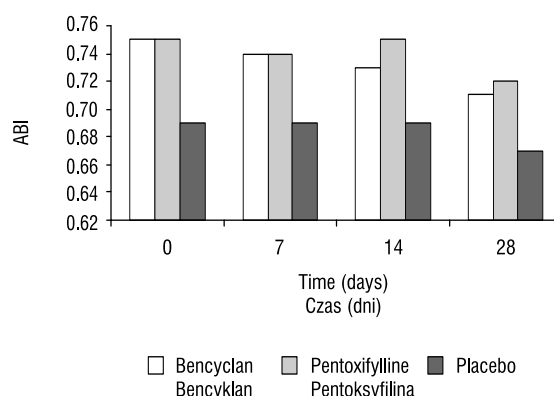
Stężenie tlenu azotu

Stężenie tlenu azotu (NO) w 0. dniu badania różniło się statystycznie pomiędzy grupami (co również było wynikiem negatywnym w sensie poprawności doboru grup — uwzględniono to jednak w dalszej interpretacji wyników) i wynosiło odpowiednio $1,31 \pm 0,68$ w grupie I, $1,60 \pm 0,83$ w grupie II i $1,95 \pm 0,43$ w grupie III.

W ostatnim dniu terapii stężenie NO nie różniło się istotnie statystycznie pomiędzy grupami (może to być wynik istotnych statystycznie różnic w punkcie początkowym badania, gdyż analiza zmian w poszczególnych grupach pomiędzy początkiem a końcem terapii jest istotna statystycznie). Analizując zmianę parametrów pomiędzy punktami NO 0 i NO 28 dla każdej grupy osobno, istotne statystycznie różnice stwierdzono jedynie dla grup chorych, którzy przyjmowali leki, czyli $1,71 \pm 0,76$ w grupie pacjentów otrzymujących bencyklan ($p < 0,001$) i $1,97 \pm 0,9$ w grupie chorych leczonych pentoksyfiliną ($p < 0,001$). W grupie osób stosujących placebo nie zanotowano istotnie statystycznych różnic dotyczących badanego parametru pomiędzy początkiem i końcem badania, czyli $2,02 \pm 0,42$ ($p > 0,15$) (tab. V, ryc. 7).

Table III. Ankle brachial index (ABI) values for the right and left side in patients with Fontaine IIb chronic lower limb ischaemia administered with bencyclane, pentoxifilline or placebo**Tabela III.** Wartości wskaźnika kostka-ramię (ABI) dla strony prawej i lewej u chorych z przewlekłym niedokrwieniem kończyn dolnych w stadium IIb według klasyfikacji Fontaine'a otrzymujących bencyklan, pentoksyfilinę lub placebo

Day Dzień	Bencyclane Bencyklan		Pentoxifilline Pentoksyfilina		Placebo	
	Right Prawa	Left Lewa	Right Prawa	Left Lewa	Right Prawa	Left Lewa
0	0.70 ± 0.13	0.75 ± 0.12	0.69 ± 0.13	0.75 ± 0.12	0.70 ± 0.13	0.75 ± 0.12
7	0.68 ± 0.09	0.74 ± 0.09	0.69 ± 0.10	0.74 ± 0.08	0.68 ± 0.09	0.74 ± 0.09
14	0.66 ± 0.06	0.73 ± 0.07	0.68 ± 0.07	0.75 ± 0.08	0.66 ± 0.06	0.73 ± 0.07
28	0.66 ± 0.05	0.71 ± 0.11	0.65 ± 0.05	0.72 ± 0.12	0.66 ± 0.05	0.71 ± 0.11

**Figure 4.** Comparison of changes in ankle brachial index values on the right side (ABI) during 28-day follow-up in patients with Fontaine IIb chronic lower limb ischaemia administered bencyclane, pentoxifilline or placebo**Rycina 4.** Porównanie zmian wartości wskaźnika kostka-ramię dla strony prawej (ABI) w 28-dniowej obserwacji u chorych z przewlekłym niedokrwieniem kończyn dolnych w stadium IIb według klasyfikacji Fontaine'a otrzymujących bencyklan, pentoksyfilinę lub placebo**Figure 5.** Comparison of changes in ankle brachial index values on the left side (ABI) during 28-day follow-up in patients with Fontaine IIb chronic lower limb ischaemia administered with bencyclane, pentoxifilline or placebo**Rycina 5.** Porównanie zmian wartości wskaźnika kostka-ramię dla strony lewej (ABI) w 28-dniowej obserwacji u chorych z przewlekłym niedokrwieniem kończyn dolnych w stadium IIb według klasyfikacji Fontaine'a otrzymujących bencyklan, pentoksyfilinę lub placebo

Total antioxidant status of the plasma

On day 0 of the study, the differences in the total antioxidant status (TAS) values between treatment groups were statistically significant. The values were as follows: 1.34 ± 0.52 in group I, 1.40 ± 0.61 in group II and 1.01 ± 0.41 in group III (it was unfavourable in terms of correctness of the study, but it was included in further interpretation of the study results). On day 28 of the treatment inter-group differences in TAS values were statistically significant. Post-hoc Duncan test in the TAS 28 sample has shown that the means in groups I and II were pairs of homogenous means and were different from the placebo group; the mean in the placebo group was significantly lower ($p < 0.05$).

Omówienie wyników

Przewlekłe niedokrwienie kończyn dolnych objawiające się chromaniem przestankowym jest jedną z form manifestacji klinicznej miażdżycy uogólnionej, która także może przebiegać pod postacią choroby wieńcowej czy też zmian niedokrwieniowych mózgu związanych z miażdżycą zewnątrz- i wewnątrzczaszkowych odcinków tętnic szyjnych [5]. Ostatnie badania nad patogenezą miażdżycy wskazały na znaczący udział błony wewnętrznej (endotelium) w rozwoju tej patologii. Miażdżycą jest przede wszystkim chorobą tętnic elastycznych i dużych tętnic mięśniowych [6], w której dochodzi do zwiększenia grubości ich błony wewnętrznej, co powoduje upośledzenie prze-

Table IV. Values of total antioxidant status (TAS) of plasma in patients with Fontaine IIb chronic lower limb ischaemia administered with bencyclane, pentoxifilline or placebo**Tabela IV.** Wartości całkowitego potencjału antyoksydacyjnego osocza (TAS) u chorych z przewlekłym niedokrwieniem kończyn dolnych w stadium IIb według klasyfikacji Fontaine'a otrzymujących bencyklan, pentoksyfilinę lub placebo

Day Dzień	Bencyclane Bencyklan	Pentoxifilline Pentoksyfilina	Placebo
0	1.34 ± 0.52	1.40 ± 0.61	1.01 ± 0.41
7	1.47 ± 0.54	1.50 ± 0.62	1.01 ± 0.43
14	1.52 ± 0.49	1.42 ± 0.66	0.95 ± 0.35
28	1.60 ± 0.51	1.60 ± 0.67	1.04 ± 0.53
	p < 0.05	p < 0.05	p > 0.05

When analyzing changes in parameters between TAS 0 and TAS 28 time points for each treatment group separately, statistically significant differences are seen only in groups of active treatments (Figure 6). In the bencyclane and pentoxifilline groups the values of total antioxidant status of the plasma increased ($p < 0.05$) to 1.60 ± 0.51 and 1.60 ± 0.67 , respectively, compared with the placebo group 1.04 ± 0.53 ($p > 0.05$) (Table IV and Figure 6).

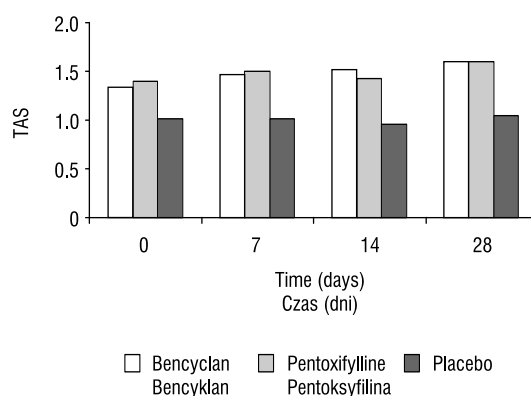
Nitric oxide level

On day 0 nitric oxide (NO) levels were significantly different in different treatment groups (which was unfavourable in terms of the correctness of selection of the patients to the study groups, but it was taken into consideration in further interpretation of the study results). The values were as follows: 1.31 ± 0.68 in group I; 1.60 ± 0.83 in group II; and 1.95 ± 0.43 in group III.

On the last day of the study there was no statistically significant difference in NO levels between the study groups (however, this may have resulted from statistically significant differences seen at baseline, as analysis of intra-group changes from the beginning to the end of the treatment are statistically significant). When analyzing changes in the NO parameter between day 0 and day 28 for each of the treatment groups separately, statistically significant differences were observed only in groups of active treatments, i.e. 1.71 ± 0.76 in the bencyclane group ($p < 0.001$) and 1.97 ± 0.9 in the pentoxifilline group ($p < 0.001$). In the placebo group the difference in this parameter seen between baseline and the end of the study was not statistically significant, i.e. 2.02 ± 0.42 ($p > 0.15$) (Table V and Figure 7)

Discussion

Chronic lower limb ischaemia, with its major symptom intermittent claudication, is a clinical manifestation

**Figure 6.** Comparison of changes in total antioxidant status (TAS) of the plasma during 28-day follow-up in patients with Fontaine IIb chronic lower limb ischaemia administered with bencyclane, pentoxifilline or placebo

Rycina 6. Porównanie zmian wartości całkowitego potencjału antyoksydacyjnego osocza (TAS) w 28-dniowej obserwacji u chorych z przewlekłym niedokrwieniem kończyn dolnych w stadium IIb według klasyfikacji Fontaine'a otrzymujących bencyklan, pentoksyfilinę lub placebo

plywu krwi i wynikające z tego powodu zmiany niedokrwienne zaopatrywanych narządów. Komórki śródbłonna, jako najbardziej wewnętrzna warstwa błony wewnętrznej [7], odgrywają decydującą rolę w aktywnej miejscowej regulacji przepływu krwi. Ponadto mają znaczący wpływ na układ krzepnięcia krwi i strukturę ściany naczynia. Śródbłonek, który wytwarza czynniki aktywnie działające, jest uważany za największy organ wydzielania wewnętrznego u człowieka [7].

Mimo że chirurgia rekonstrukcyjna tętnic i metody endowaskularne naprawy układu tętniczego zrewolucjonizowały leczenie chorych z niedokrwieniem kończyn dolnych, to zachowawcze sposoby terapeu-

Table V. Serum levels of nitric oxide (NO) in patients with Fontaine IIb chronic lower limb ischaemia administered with bencyclane, pentoxifilline or placebo**Tabela V.** Stężenie tlenku azotu (NO) w surowicy chorych z przewlekłym niedokrwieniem kończyn dolnych w stadium IIb według klasyfikacji Fontaine'a otrzymujących bencyklan, pentoksyfilinę lub placebo

Day Dzień	Bencyclane Bencyklan	Pentoxifilline Pentoksyfilina	Placebo Placebo
0	1.31 ± 0.68	1.60 ± 0.83	1.95 ± 0.43
7	1.39 ± 0.72	1.75 ± 0.94	1.96 ± 0.44
14	1.50 ± 0.67	1.74 ± 0.94	2.02 ± 0.41
28	1.71 ± 0.76	1.97 ± 0.90	2.02 ± 0.42

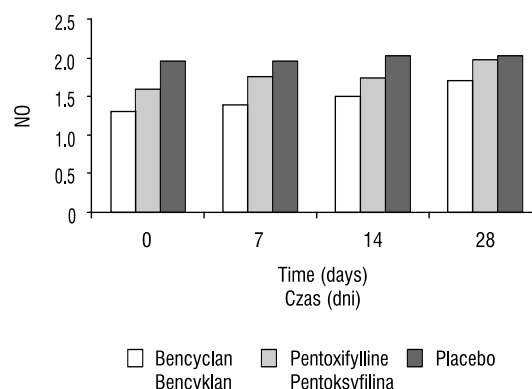
of generalized atherosclerosis, which may also manifest as coronary artery disease or cerebral ischaemia due to atherosclerosis of intra- or extracranial segments of carotid arteries [5]. The most recent research on pathogenesis of atherosclerosis has revealed the considerable role of vascular endothelium in the progression of this pathology. Atherosclerosis affects mainly elastic and large muscular arteries [6] and involves thickening of the tunica interna which results in impaired blood flow and ischaemia of the supplied organs. Endothelial cells, which make the most inner part of the tunica interna [7], play a key role in active local regulation of the blood flow. Moreover, they have a marked influence on blood coagulation and the structure of the vascular wall. Vascular endothelium, producing a number of active factors, is considered to be the biggest endocrine organ in humans [7].

Although reconstructive surgery of the arteries and endovascular methods of artery repair have revolutionized the management of patients with lower limb ischaemia, methods of conservative treatment, including regular walking training, control of atherosclerosis risk factors and drug treatment, continue to be the treatments of choice in patients with intermittent claudication who are not qualified for surgical treatment as adjunct treatments and in patients undergoing surgical vascular procedures [8].

The study conducted in our centre compared the effectiveness of two active treatments, bencyclane and pentoxifilline, in the treatment of chronic lower limb ischaemia due to atherosclerosis.

The measurable and reliable parameters used for the assessment of the progression of the disease and the efficacy of treatment of patients with intermittent claudication are pain free walking distance and maximum walking distance [9–11].

In patients administered with either bencyclane or pentoxifilline, a significant increase in pain free and maximum walking distance was observed compared with placebo treated patients.

**Figure 7.** Comparison of changes in nitric oxide (NO) levels during 28-day follow-up in patients with Fontaine IIb chronic lower limb ischaemia administered with bencyclane, pentoxifilline or placebo**Rycina 7.** Porównanie zmian stężenia tlenku azotu (NO) w 28-dniowej obserwacji u chorych z przewlekłym niedokrwieniem kończyn dolnych w stadium IIb według klasyfikacji Fontaine'a otrzymujących bencyklan, pentoksyfilinę lub placebo

tyczne, takie jak regularny trening marszowy (chodzenie), zwalczanie miażdżycowych czynników ryzyka i farmakoterapia, są metodami leczenia z wyboru chromania przestankowego u chorych niekwalifikujących się jeszcze do leczenia operacyjnego, jak również stanowią uzupełnienie terapii u osób poddanych zabiegom naczyniowym [8].

Badanie przeprowadzone w ośrodku, w którym pracują autorzy niniejszej pracy, dotyczyło porównania skuteczności dwóch leków: bencyklanu i pentoksyfiliny w leczeniu przewlekłego miażdżycowego niedokrwienia kończyn dolnych.

Dystans przejścia bezbólowego i dystans przejścia maksymalnego uznaje się za miarodajne i wiarygodne wskaźniki zaawansowania i monitorowania terapii u chorych z chromaniem przestankowym [9–11].

The increase in pain free and maximum walking distance seen in the placebo patients may result from the fact that the patients from all of the study groups were recommended walking training, which is always an important element in the management of patients with intermittent claudication. Walking training is known to increase pain free walking distance and to alleviate pain associated with walking. However, it has been shown that desirable therapeutic effects can only be achieved in patients who are aware of the need for regular exercise and are appropriately motivated, as well as in patients whose exercise training is carefully supervised [12].

The study has shown considerable improvement in claudication distance in groups of patients administered active treatments with no significant difference between the treatments. Therefore it seems reasonable to conclude that not only walking exercise but also drug treatment has contributed to the increase in pain free and maximum walking distance. Consistent results were observed by other investigators both in bencyclane and pentoxifiline studies [8, 13–15].

According to the widely accepted unified theory of atherogenesis [16] the earliest stage of the disease process involves endothelial dysfunction. Atherosclerosis is believed to be associated with impairment of endothelium-dependent vasodilation. First of all this phenomenon is caused by reduced production of local, endothelium derived vasodilating factors including nitric oxide (NO), also referred to as endothelium-derived relaxing factor (EDRF) or endothelium-derived nitric oxide (EDNO), prostacyclin and endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF). The vascular endothelium produces not only vasodilating substances but also vasoconstricting factors such as endothelins, thromboxane, free radicals and endothelial vasoconstricting factors. The balance between vasoconstrictors and vasodilators determines the appropriate vascular muscle tone.

There is more and more evidence to suggest an NO-dependent mode of action of such therapies. An attempt to explain the role of NO and walking training in the improvement of intermittent claudication was made by Laughlin et al. [17], who confirmed that training induced an expression of endothelial NO synthetase (eNOS) in the arteries supplying skeletal muscles. In our study, the analysis of changes in nitric oxide levels between day 0 and day 28, conducted for each treatment group separately, has shown statistically significant differences only in groups of active treatments (Figure 7). In this population of patients, a statistically significant increase in nitric oxide level was observed compared with placebo patients, in whom no changes were actually seen in this parameter.

W grupach pacjentów przyjmujących bencyklan bądź pentoksyfilinę nastąpiło istotne statystycznie zwiększenie dystansu przejścia bezbólowego i maksymalnego w porównaniu z grupą chorych otrzymujących placebo.

Wydłużenie dystansu przejścia do momentu wywołania bólu i dystansu maksymalnego w grupie chorych otrzymujących placebo może wynikać z faktu, iż pacjentom ze wszystkich grup zalecano trening marszowy, który jest ważnym elementem w leczeniu chromania przestankowego. Wydłuża on bowiem dystans przejścia bezbólowego i zmniejsza natężenie bólu mięśni podczas chodzenia. Udowodniono natomiast, że tylko świadomość konieczności regularnego wykonywania ćwiczeń fizycznych, związana z nią odpowiednia motywacja chorych, a także ścisły nadzór nad wykonywanymi ćwiczeniami mogą przynieść pożądane rezultaty [12].

Znaczne wydłużenie dystansu chromania stwierdzono w grupach chorych przyjmujących leki, przy czym nie ma znaczenia rodzaj zastosowanego preparatu. Wobec powyższego słuszne wydaje się stwierdzenie, że oprócz efektu treningu marszowego zanotowano korzystny wpływ leków na wydłużenie dystansu przejścia maksymalnego i bezbólowego. Podobne wyniki uzyskali inni badacze zarówno w przypadku doświadczeń przeprowadzonych z zastosowaniem bencyklanu, jak i pentoksyfiliny [8, 13–15].

Według powszechnie akceptowalnej zunifikowanej teorii patogenezy miażdżycy [16] to zaburzenie czynności śródbłonka jest pierwszym z etapów rozwoju choroby. Uważa się, że miażdżycza między innymi wpływa na obniżenie zdolności naczyń do rozkurczu zależnego od endotelium. Zjawisko to jest spowodowane przede wszystkim upośledzeniem wydzielania przez śródbłonek miejscowych czynników rozszerzających naczynia, do których należą tlenek azotu, określane także jako śródbłonkowy czynnik rozszerzający naczynia (EDRF) lub śródbłonkowy NO (EDNO), prostacyklina i śródbłonkowy czynnik hiperpolaryzujący (EDHF). Oprócz wydzielania czynników rozszerzających naczynia śródbłonek jest także źródłem substancji wazokonstrykcyjnych, w skład których wchodzi endotelina, tromboksan, wolne rodniki i śródbłonkowy czynnik kurczący. Równowaga pomiędzy wazokonstryktorami i wazodylatorami warunkuje odpowiednie napięcie naczyniowej błony mięśniowej.

Coraz więcej danych sugeruje NO-zależny mechanizm działania tego rodzaju terapii. Próbę wytłumaczenia roli NO i treningu marszowego w łagodzeniu chromania można prześledzić w pracy Laughlina i wsp. [17], w której wykazano, że wysiłek fizyczny zwiększa eks-

In view of the results of our study both bencyclane therapy and pentoxifilline therapy seem to increase the level of nitric oxide. The fact that such an increase was not observed in the placebo group may suggest that the nitric oxide level is increased directly by drug treatment rather than by walking training. This is inconsistent with results seen by Laughlin. However, it must be noted that walking training was not supervised by the authors, which might explain the discrepant results.

Moreover, the increase in nitric oxide level might be associated with the increase in total antioxidant status. In our study, the increase in the TAS value seen after 28 days of treatment was statistically significant both in the pentoxifilline group and the bencyclane group. Such an increase was not observed in the placebo patients. The increase in the TAS value may suggest reduced production of reactive oxygen species after long-term treatment.

Reactive oxygen species (ROS) include both free radicals and oxygen forms that are not free radicals. The latter group includes superoxide anion (O_2^-), nitric oxide, hydrogen peroxide and peroxynitrates. Most probably the initial mechanism that initiates ROS production is endothelial damage. The resultant cascade of events involves the activation of monocytes, which, activated by damaged endothelial cells, release toxic reactive oxygen species, which in turn oxidize lipoproteins. As a result, ox-LDL (oxidized form of low density lipoprotein) is formed. Such LDL modification stimulates a scavenger path of lipid uptake from lipoproteins, a process not very well controlled by the body. It is just this oxidative modification of LDL, or rather its protein component, by lipid peroxidation products of some LDLs, which results in uncontrolled lipid uptake and formation of atheromatous plaque. However, it is protected against peroxidation by antioxidants. Bencyclane and pentoxifilline, which increase antioxidant status, can inhibit vasoconstriction of the arterial tree [18]. The results of our study conform to Transatlantic Inter-Society Consensus (TASC) guidelines on the treatment of chronic lower limb ischaemia. As surgical and medical treatment is equally effective (in at least 5 year follow-up), the guidelines recommend that the conservative approach should be the first-choice of treatment in moderate ischaemia.

Conclusions

Bencyclane and pentoxifilline are effective treatments for patients with Fontaine IIb chronic lower limb ischaemia.

No significant differences were seen in the efficacy of the two study drugs.

presję śródbłonkowej syntazy tlenu azotu (eNOS) w tętnicach zaopatrujących mięśnie szkieletowe. Analizując zmianę stężenia tlenu azotu w prezentowanym badaniu pomiędzy punktami NO 0 i NO 28 dla każdej grupy osobno, istotne statystycznie różnice stwierdza się jedynie dla grup chorych, które przyjmowały leki (ryc. 7). W tej populacji obserwowano istotne statystycznie zwiększenie stężenia tlenu azotu, w przeciwieństwie do grupy pacjentów otrzymujących placebo, w której parametr ten praktycznie nie uległ zmianie.

W świetle uzyskanych przez autorów niniejszej pracy wyników wydaje się, że zarówno terapia bencyklanem, jak i pentoksyfiliną powoduje wzrost stężenia tlenu azotu. Brak tego wzrostu w grupie osób otrzymujących placebo może sugerować, że bezpośrednią przyczyną zwiększenia stężenia NO jest stosowanie leków, a nie trening marszowy. Przeczy to w pewnym stopniu wynikom uzyskanym przez Laughlina i wsp. Trzeba jednak zwrócić uwagę na fakt, że przeprowadzanie treningu marszowego nie było kontrolowane przez autorów, co może być przyczyną niejednoznacznych w tym wypadku wyników.

Ponadto wzrost stężenia NO może się wiązać ze zwiększeniem wartości całkowitego potencjału antyoksydacyjnego. W badanych przez autorów niniejszej pracy grupach chorych wzrost TAS po 28 dniach terapii był statystycznie istotny w grupach osób przyjmujących zarówno pentoksyfilinę, jak i bencyklan. Wzrostu tego nie zanotowano u pacjentów otrzymujących placebo. Zwiększenie wartości TAS może świadczyć o zmniejszeniu wytwarzania reaktywnych pochodnych tlenowych po dłuższym stosowaniu leczenia.

Reaktywne formy tlenu obejmują zarówno wolne rodniki, jak i cząsteczki tlenu, które nie są wolnymi rodnikami. Do tej grupy związków zalicza się między innymi anion nadtlenkowy (O_2^-), tlenek azotu, nadtlenek wodoru (H_2O_2), a także peroksynitraty. Czynnikiem inicjującym powstanie reaktywnych form tlenu jest prawdopodobnie uszkodzenie śródbłonka. Dalsza kaskada zdarzeń obejmuje aktywację monocytów, które uaktywnione przez uszkodzone komórki śródbłonka naczyńniowego wydzielają toksyczne reaktywne formy tlenowe, utleniające lipoproteiny, co powoduje powstanie między innymi oxy-LDL (utleniona forma lipoproteiny o małej gęstości). Taka modyfikacja LDL prowadzi do uruchomienia tak zwanego zmiataczowego szlaku opróżniania lipoprotein z lipidów, procesu słabo kontrolowanego przez ustrój. To właśnie ta oksydacyjna modyfikacja LDL, a właściwie jej części białkowej, przez produkty peroksydacji lipidowej części LDL powoduje niekontrolowane wyłapywanie lipidów i powstawanie blaszki miażdżycowej. Przed peroksydacją chronią ją jednak antyoksydan-

References

1. Zapalski S (1996) Chirurgiczne choroby naczyń. Nadciśnienie wrotne. In: Fibak J et al (eds) Chirurgia dla studentów medycyny. PZWL, Warszawa: 313–319.
2. Cronenwett JL, Warner KG, Zelenock GB et al (1984) Intermittent claudication. Current results of nonoperative management. *Arch Surg*, 119: 430–436.
3. Dormandy JA, Murray GD (1991) The fate of the claudicant — a prospective study of 1969 claudicants. *Eur J Vasc Surg*, 5: 131–33.
4. Jaff MR (2002) Pharmacotherapy for peripheral arterial disease: emerging therapeutic options. *Angiology*, 53: 627–633.
5. Coffman JD (1986) Intermittent claudication: not so benign. *Am Heart J*, 112: 1127–1128.
6. Pasierski T, Gaciong Z (2004) Rozwój i regresja miażdżycy. *Angiologia*. PZWL, Warszawa.
7. Ross MR, Gordon IK, Romrell JL (1995) *Histology: a text and atlas*. Williams & Wilkins, Baltimore.
8. Spitzer S, Bach R, Shieffer H (1992) Walk training and drug treatment in patients with peripheral arterial occlusive disease stage II. A review. *Int Angiol*, 11: 204–210.
9. Manfredini F, Conconi F, Malagoni AM et al (2004) Training guided by pain threshold speed. Effects of a home-based program on claudication. *Int Angiol*, 23: 379–387.
10. Bartelink ML, Stoffers HE, Biesheuvel CJ, Hoes AW (2004) Walking exercise in patients with intermittent claudication. Experience in routine clinical practice. *Br J Gen Pract* 54: 196–200.
11. Cesarone MR, Belcaro G, Nicolaidis AN et al (2002) Treatment of severe intermittent claudication with pentoxifylline: a 40-week, controlled, randomized trial. *Angiology*. 53 (suppl 1): S1–S5.
12. Hiatt WR (2001) Medical treatment of peripheral arterial disease and claudication. *N Engl J Med*, 344: 1608–1621.
13. Battke K, Buchwalsky R, Barmeyer J, Hoffmann G, Reindell H (1978) Therapy of arterial occlusive diseases. The effect of bencyclane in trained patients with peripheral arterial occlusive disease (Double-blind study). *Fortschr Med*, 96: 1381–1386.
- ty. Poprzez wzrost potencjału antyoksydacyjnego bencyklanu i pentoksyfilina mogą hamować wazokonstrykcję układu tętniczego [18]. Wyniki badań przeprowadzonych przez autorów niniejszej pracy potwierdzają zalecenia *TransAtlantic Inter-Society Consensus (TASC)*, dotyczące leczenia przewlekłego niedokrwienia kończyn. Wskazuje się w nich, że ponieważ efekty leczenia operacyjnego i zachowawczego są jednakowo skuteczne (obserwacje co najmniej 5-letnie), leczenie zachowawcze powinno być leczeniem z wyboru w przypadku niedokrwienia o umiarkowanym nasileniu.

Wnioski

Zastosowanie bencyklanu i pentoksyfiliny jest skuteczną formą terapii u chorych z przewlekłym niedokrwieniem kończyn w klasie IIb według klasyfikacji Fontaine'a.

Nie stwierdzono istotnych różnic w skuteczności działania obu badanych preparatów.

-
14. Gavrilenko AV, Omarzhanov OA (2004) An experience with the clinical use of halidor in the treatment of chronic lower limb ischemia. *Angiol Sosud Khir*, 10: 34–36.
 15. Jacoby D, Mohler ER 3rd (2004) Drug treatment of intermittent claudication. *Drugs*, 64: 1657–1670.
 16. Steinberg D, Parthasarathy S, Casew TE et al. (1989) Beyond cholesterol modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med*, 320: 915.
 17. Laughlin MH, Pollock JS, Amann JF, Hollis ML, Woodman CR, Price EM (2001) Training induces nonuniform increase in eNOS content along in the coronary arterial tree. *J Appl Physiol*, 90: 501–510.
 18. Herrmann WM, Scharer E (1991) The long-term tolerability of bencyclane ("Fludilat") in patients with peripheral occlusive disease: a 48-week prospective double-blind controlled study versus placebo. *Curr Med Res Opin*, 12: 356–365.