

**Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu**

**Lek. Magdalena Snoch**

**Stężenie jonów magnezu i wybranych wykładników  
stresu oksydacyjnego w przebiegu ostrego  
niedokrwienia kończyn dolnych.**

**Rozprawa doktorska**

**Promotor: Prof. dr hab. med. Wacław Majewski**

**Poznań 2012**

## 1. Spis treści.

1. Spis treści.....	1
2. Wykaz skrótów i symboli.....	4
3. Wstęp.....	6
3.1. Ostre niedokrwienie kończyn dolnych (ONK).....	6
3.1.1 Wprowadzenie.....	6
3.1.2. Etiologia i epidemiologia ONK.....	6
3.1.3. Objawy ONK.....	8
3.1.4. Klasyfikacja ONK.....	8
3.1.5. Badania dodatkowe.....	10
3.1.5.1. Badania obrazowe inwazyjne .....	10
3.1.5.1.1. Arteriografia.....	10
3.1.5.1.2. Badania obrazowe nieinwazyjne.....	11
3.1.6. Leczenie ONK.....	11
3.1.6.1. Techniki inwazyjne leczenia ONK.....	12
3.1.7. Zespół niedokrwienia i zespół reperfuzji.....	16
3.2. Rola pierwiastków w ostrym niedokrwieniu kończyn dolnych.....	18
3.2.1. Magnez (Mg).....	18
3.2.2. Wapń (Ca).....	19
3.3. Stres oksydacyjny w ONK.....	20
3.3.1. Reaktywne formy tlenu (RFT).....	20
3.3.1.1. Anionorodnik ponadtlenkowy ( $O_2^{\bullet-}$ ).....	21
3.3.1.2. Rodnik hydroksylowy ( $\bullet OH$ ).....	21
3.3.1.3. Nadtlenek wodoru ( $H_2O_2$ ).....	22
3.3.1.4. Reaktywne formy azotu.....	22
3.3.2. Układ antyoksydacyjny.....	23
3.3.2.1. Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD).....	23
3.3.2.2. Peroksydaza glutationowa (GPx).....	24
3.3.2.3. Całkowity status antyoksydacyjny (TAS) i całkowita zdolność antyoksydacyjna na podstawie redukcji jonów żelaza (III) (FRAP).....	24
4. Cel pracy.....	25
5. Materiał i metody.....	26
5.1. Charakterystyka ogólna grupy badanej.....	26

5.2. Metody oznaczeń laboratoryjnych.....	28
5.2.1. Oznaczanie stężenia całkowitego magnezu ( $Mg_{ca\dot{a}lk}$ ) i wapnia ( $Ca_{ca\dot{a}lk}$ ) w osoczu krwi...	30
5.2.2. Oznaczanie stężenia formy zjonizowanej magnezu ( $Mg_i$ ) i wapnia ( $Ca_i$ ) w osoczu krwi.....	31
5.2.3. Oznaczanie całkowitego statusu antyoksydacyjnego osocza (TAS).....	32
5.2.4. Oznaczanie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej w erytrocytach (SOD).....	33
5.2.5. Oznaczanie aktywności peroksydazy glutationowej w pełnej krwi (GPx).....	34
5.2.6. Oznaczanie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej na podstawie redukcji jonów żelaza (III) (FRAP).....	35
5.3. Analiza statystyczna wyników.....	36
6. Wyniki.....	37
6.1. Analiza uzyskanych wyników w zależności od stopnia niedokrwienia: IIB i III w trakcie leczenia ostrego niedokrwienia kończyn dolnych.....	42
6.1.1. Stężenie wybranych pierwiastków: $Mg_{ca\dot{a}lk}$ i $Mg_i$ , $Ca_{ca\dot{a}lk}$ i $Ca_i$ , Na i K w trakcie leczenia ostrego niedokrwienia kończyn.....	42
6.1.1.1. Stężenie $Mg_{ca\dot{a}lk}$ i $Mg_i$ .....	42
6.1.1.2. Stężenie $Ca_{ca\dot{a}lk}$ i $Ca_i$ .....	44
6.1.1.3. Stężenie Na i K.....	46
6.1.2. Aktywność SOD i GPx, wartości TAS i FRAP oraz stężenie CRP w trakcie leczenia ostrego niedokrwienia kończyn.....	48
6.1.2.1. Aktywność SOD .....	48
6.1.2.2. Aktywność GPx .....	49
6.1.2.3. Wartość TAS .....	51
6.1.2.4. Wartość FRAP.....	51
6.1.2.5. Stężenie CRP.....	53
6.2. Analiza uzyskanych wyników w zależności od czasu trwania ostrego niedokrwienia ( $t < 12$ h i $t \geq 12$ h).....	55
6.2.1. Stężenie wybranych pierwiastków: $Mg_{ca\dot{a}lk}$ i $Mg_i$ , $Ca_{ca\dot{a}lk}$ i $Ca_i$ , Na i K w trakcie leczenia ostrego niedokrwienia kończyn.....	55
6.2.1.1. Stężenie $Mg_{ca\dot{a}lk}$ i $Mg_i$ .....	55
6.2.1.2. Stężenie $Ca_{ca\dot{a}lk}$ i $Ca_i$ .....	59
6.2.1.3. Stężenie Na i K.....	59
6.2.2. Aktywność SOD i GPx, wartości TAS i FRAP oraz stężenie CRP w trakcie leczenia ostrego niedokrwienia kończyn .....	62

6.2.2.1. Aktywność SOD.....	62
6.2.2.2. Aktywność GPx.....	63
6.2.2.3. Wartość TAS.....	64
6.2.2.4. Wartość FRAP.....	65
6.2.2.5. Stężenie CRP.....	66
6.3. Analiza uzyskanych wyników w zależności od rodzaju zabiegu (embolektomia vs inne) w trakcie leczenia ostrego niedokrwienia kończyn dolnych.....	68
6.3.1. Stężenie wybranych pierwiastków: $Mg_{ca\dot{a}k}$ i $Mg_i$ , $Ca_{ca\dot{a}k}$ i $Ca_i$ , Na i K w trakcie leczenia ostrego niedokrwienia kończyn.....	68
6.3.2. Aktywność SOD i GPx, wartości TAS i FRAP oraz stężenie CRP w trakcie leczenia ostrego niedokrwienia kończyn .....	75
7. Omówienie.....	80
8. Wnioski.....	88
9. Piśmiennictwo.....	89
10. Streszczenie.....	96
11. Spis tabel.....	101
12. Spis rycin.....	102

## 2. Wykaz skrótów i symboli.

ALI- ang. Acute limb ischemia, ostre niedokrwienie kończyn

Angio-TK- Angiografia tomografii komputerowej

ARDS- zespół ostrej niewydolności oddechowej

ATP- adenozyntrifosforan

Ca<sub>całk</sub>- stężenie całkowite jonów wapnia Ca<sup>2+</sup>

Ca<sub>i</sub>- stężenie wapnia zjonizowanego

CAT- katalaza

CDT- ang. catheter-directed thrombolysis, celowana fibrynoliza dotętnicza

CRP- białko C-reaktywne

DSA- ang.: digital subtraction angiography, cyfrowa angiografia subtrakcyjna

FRAP- ang. Ferric Reducing Ability of Plasma, całkowita zdolność antyoksydacyjna na podstawie redukcji jonów żelaza (III)

GPx- peroksydaza glutationowa

h- godzina (60 minut)

HO<sub>2</sub><sup>•</sup> - rodnik wodoronatlenkowy,

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- nadtlenek wodoru

K- jony potasu K<sup>+</sup>

LPS- lipopolisacharydy

Mg<sub>całk</sub>- stężenie całkowite jonów magnezu Mg<sup>2+</sup>, ang. total magnesium (t-Mg)

Mg<sub>i</sub>- stężenie magnezu zjonizowanego, ang. ionised magnesium (i-Mg)

MODS- zespół niewydolności wielonarządowej

MRA- angiografia rezonansu magnetycznego

Na- jony sodu Na<sup>+</sup>

NADPH- fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego

NF-κB- jądrowy czynnik transkrypcyjny kappa-B

NO- tlenek azotu (III)

NO<sub>2</sub>- dwutlenek azotu (IV)

NOS- syntaza tlenku azotu

<sup>1</sup>O<sub>2</sub> – tlen singletowy

O<sub>2</sub><sup>•-</sup> - anionorodnik ponadtlenkowy

<sup>•</sup>OH- rodnik hydroksylowy

ONK- ostre niedokrwienie kończyn

ONOOH- kwas nadtlenoazotawy

ONN- ostra niewydolność nerek

PAT- ang. percutaneous aspiration thrombectomy, przezskórna trombektomia aspiracyjna

RFT- reaktywne formy tlenu

PMT- ang. percutaneous mechanical thrombectomy , przezskórna trombektomia mechaniczna

PNKD- przewlekłe niedokrwienie kończyn dolnych

RO<sup>•</sup>- rodnik alkoksylowy

ROO<sup>•</sup>- rodnik nadtlenkowy

PTA- przezskórna angioplastyka wewnątrznacyniową

SIRS- ogólnoustrojowa reakcja zapalna

SOD- dysmutaza ponadtlenkowa

SVS/ISCVS- ang. Society for Vascular Surgery/International Society for Cardiovascular Surgery

TAS- ang. total antioxidant status, całkowity status antyoksydacyjny

TASC- ang. TransAtlantic Inter-Society Consensus

TNF  $\alpha$  - czynnik martwicy guza  $\alpha$

WR- wolne rodniki

### **3. Wstęp.**

#### **3.1. Ostre niedokrwienie kończyn dolnych (ONK).**

##### **3.1.1 Wprowadzenie.**

Według wytycznych TransAtlantic Inter-Society Consensus (TASC) ostre niedokrwienie kończyny (ONK) jest zespołem objawów klinicznych powstałych w następstwie nagłego, całkowitego przerwania dopływu krwi do kończyny lub tak znacznego zmniejszenia jej ukrwienia, że nie wystarczy ono do utrzymania spoczynkowej przemiany materii i grożące jej utratą [1, 97]. Pacjentom z ONK grozi nie tylko utrata kończyny, ale mają również wysokie ryzyko śmiertelności. Czas hipoperfuzji kończyn wywołuje ogólnoustrojowe zaburzenia gospodarki kwasowo-zasadowej i wodno-elektrolitowej, co upośledza funkcję układu krążenia i nerek. Z kolei skuteczna reperfuzja może spowodować uwolnienie wysoce toksycznych wolnych rodników, przez co dochodzi do pogłębienia zaburzeń powstałych w okresie niedokrwienia.

##### **3.1.2. Etiologia i epidemiologia ONK.**

ONK wynika z nagłego utrudnienia w przepływie krwi tętniczej do kończyn wywołanego zatorami lub zakrzepicą lub obie te przyczyny jednocześnie. Z reguły zatory powodują silniej wyrażone objawy niedokrwienia niż zakrzepica, ponieważ dochodzi do okluzji naczynia bez istniejącego wcześniej krążenia obocznego. W przypadku zakrzepicy mamy najczęściej do czynienia z wcześniej zmienionymi miażdżycowo naczyniami, co pobudziło wytworzenie krążenia obocznego, którego obecność zmniejsza nasilenie objawów i szybkość rozwoju objawów [37, 111]. Przyczynami ONK u pacjentów z przewlekłym niedokrwieniem kończyn dolnych (PNKD) są zakrzepica tętnicy zwężonej przez zmiany miażdżycowe, zakrzepica zespolenia omijającego oraz zator materiałem pochodzącym z serca, tętniaka, blaszki miażdżycowej lub z krytycznie zwężonej tętnicy, leżącej proksymalnie (łącznie z zatorami cholesterolowymi lub fragmentami blaszek miażdżycowych i skrzeplinami w wyniku zabiegów śródnaczyniowych), jak i zakrzepica tętniaka, zwłaszcza tętnicy podkolanowej. Do przyczyn niemiażdżycowych ONK zalicza się: jatrogenne urazy tętnicy, rozwarstwienie aorty lub tętnicy dystalnej, zapalenie tętnic przebiegające z zakrzepicą, samoistna zakrzepica w stanach nadkrzepliwości, torbiel podkolanowa z zakrzepicą, zespół usidlenia tętnicy podkolanowej z zakrzepicą oraz skurcz naczyniowy z zakrzepicą [78, 79, 97]. Przyczyną

ONK mogą być również sytuacje kliniczne, kiedy dochodzi do zaburzenia dopływu, jak i odpływu krwi, np.: w urazach i zespole wzmożonego ciśnienia (ZWC). Do niedokrwienia prowadzą również nagłe zatrzymanie krążenia, reanimacja, wstrząs, które zmniejszają perfuzję tkankową. Masywne zaburzenie odpływu krwi żyłnej, obserwowane w phlegmasia cerulea dolens, może również skutkować objawami ONK [78, 79, 97]. Ryc. 1.

Ryc. 1. Etiologia ostrego niedokrwienia kończyn dolnych. [8, 97]



Kliniczne odróżnienie zatoru od zakrzepicy może być trudne, dlatego etiologię zatorową ONK należy podejrzewać u pacjentów, gdy: pacjent zgłasza nagły początek objawów, podaje w wywiadzie wcześniejszy incydent zatorowy, źródło zatorów jest znane, np.: zaburzenia rytmu serca, nie zgłasza chromania przestankowego oraz gdy tętno w badaniu palpacyjnym i Dopplerowskim jest prawidłowe w drugiej kończynie. Oprócz krążenia obocznego, miejsce zamknięcia naczynia wpływa na nasilenie niedokrwienia kończyn [38, 39, 76]. Ze względu na spadek częstości występowania choroby reumatycznej serca, postępy w kardiochirurgii i powszechne stosowanie antykoagulacji u pacjentów zaburzeniami rytmu serca, zatory są przyczyną ostrego niedokrwienia kończyn dolnych w około 38%, a zakrzepica w przebiegu przewlekłego niedokrwienia kończyn dolnych (PNKD) jest obecnie dominującą przyczyną i występuje w 41% przypadków ostrego niedokrwienia kończyn dolnych. Około 20% pacjentów z PNKD jest narażonych na ostre niedokrwienie kończyn dolnych [6, 30]. Co więcej 20-37% pacjentów traci kończynę, a 10-26% umiera z powodu



powikłań narządowych w trakcie leczenia ostrego niedokrwienia kończyn dolnych [10, 11, 12, 30].

### **3.1.3. Objawy ONK.**

Podstawą rozpoznania ostrego niedokrwienia kończyn dolnych są objawy kliniczne, takie jak: silny ból, brak tętna, bladość, zaburzenia czucia i porażenie ruchów oraz ochłodzenie kończyny. Ból spoczynkowy, utrata czucia, osłabienie mięśni. Przy czym stężenie mięśni, plamy opadowe, ból przy ruchach biernych są objawami późnymi, które świadczą o martwicy tkanek. W wywiadzie należy się skupić na ocenie nasilenia (stopnia ) niedokrwienia kończyny w chwili badania oraz ustaleniu, czy u pacjenta występowało chromanie przestankowe i czy był poddany zabiegom rekonstrukcyjnym tętnic kończyn dolnych bądź zabiegom wewnątrznaczyniowym. Należy również uzyskać dane umożliwiające ustalenie etiologii, przeprowadzenie diagnostyki różnicowej i identyfikację chorób towarzyszących.

Według wytycznych TASC badanie palpacyjne tętna nie jest badaniem obiektywnym dlatego zalecana jest weryfikacja przepływu krwi w tętnicach kończyn dolnych w badaniu USG Doppler Duplex [97].

### **3.1.4. Klasyfikacja ONK.**

Do oceny stopnia niedokrwienia służy klasyfikacja kliniczna ostrego niedokrwienia Society for Vascular Surgery/International Society for Cardiovascular Surgery (SVS/ISCVS) opartej na klasyfikacji Rutherforda z 1997 roku [1, 78, 79, 97]. Klasyfikacja SVS/ISCVS zawiera kryteria kliniczne i diagnostyczne rozpoznania ostrego niedokrwienia kończyn, dzięki czemu stratyfikuje pacjentów, co do stopnia zaawansowania i rokowania oraz podkreśla wagę zastosowania szybkiego leczenia przyczynowego. Pacjenci, u których nie ma bezpośredniego zagrożenia utraty kończyny, należą do pierwszej kategorii klinicznej (I). W drugiej kategorii klinicznej (II) istnieje zagrożenie utraty kończyny, jeśli szybko nie zastosuje się odpowiedniego leczenia (IIa) lub jeśli natychmiast nie przystąpi się do rewaskularyzacji (IIb). U pacjentów z objawami nieodwracalnego niedokrwienia w trzeciej kategorii (III) występuje trwałe uszkodzenie nerwów bądź mięśni, jeśli dojdzie do istotnego opóźnienia interwencji leczniczej lub niezbędna jest nieuchronna wysoka amputacja. Tabela 1. Ostre rozgraniczenie między stopniem IIB i III niekiedy jest bardzo trudne, a nawet niemożliwe, gdyż nasilenie zmian zmienia się w sposób ciągły, a nie skokowy. Z tego powodu u

niektórych chorych zaliczonych do kategorii III z pozornie nieodwracalnymi zmianami niedokrwiennymi jest możliwość uratowania kończyny, o ile natychmiast wdroży się leczenie przyczynowe.

Tabela 1. Kategorie kliniczne ostrego niedokrwienia kończyn dolnych (zmodyfikowana klasyfikacja SVS/ISCVS\*) [97].

Kategoria	Opis/rokowanie	Objawy kliniczne		Sygnał dopplerowski	
		Zaburzenia czucia	Oslabienie mięśni	Tętniczny	Żyłny
I. przeżycie kończyny niezagrożone	Nie ma bezpośredniego zagrożenia	nie ma	nie ma	Słyszalny	Słyszalny
II. przeżycie kończyny zagrożone					
a) granicznie	do uratowania, jeśli szybko zastosuje się leczenie	Minimalne (palce) lub nie ma	nie ma	(często) niesłyszalny	Słyszalny
b) bezpośrednio	Do uratowania, jeśli natychmiast przystąpi się do rewaskularyzacji	Nie tylko palce, towarzyszy ból spoczynkowy	Niewielkie lub umiarkowane	(zazwyczaj) niesłyszalny	Słyszalny
III. niedokrwienie nieodwracalne jeśli dokonane niedokrwienie*	Nieuchronna wysoka amputacja lub trwałe uszkodzenie nerwów	duże, całkowity brak czucia	duże, porażenie (stężenie)	Niesłyszalny	Niesłyszalny

\*SVS/ISCVS - Society for Vascular Surgery/International Society for Cardiovascular Surgery. We wczesnym etapie rozróżnienie między kategorią IIB i III może sprawiać trudności.

### **3.1.5. Badania dodatkowe.**

Nawet u pacjenta z ONK, kiedy dochodzi do bezpośredniego zagrożenia kończyny, należy wykonać podstawowe badania krwi: układ krzepnięcia (PT, APTT)- zwłaszcza przed podaniem heparyny, morfologię krwi obwodowej, grupę krwi, elektrolity w surowicy krwi oraz gazometrię. U każdego chorego należy wykonać elektrokardiogram, rentgenogram klatki piersiowej, echo serca. Jednakże standardowe badanie echokardiograficzne wystarcza tylko u części chorych i wówczas niezbędne jest wykonanie badania przezprzełykowego [27]. Diagnostykę kontynuuje się, jeśli kończyna nie jest zagrożona lub przestaje być zagrożona w wyniku leczenia. W przypadkach podejrzenia mikrozatorowości z prawidłowym tętnem na obwodzie wskazane bywa wykonanie badań mikrokążenia oraz identyfikacji źródła zatorów. U pacjentów z nadkrzepliwością należy rozważyć badania: na obecność przeciwciał antykardiolipidowych, przeciwciał przeciwko heparynowemu czynnikowi płytkowemu 4 w klasie IgG, stężenia homocysteiny [78, 79].

#### **3.1.5.1. Badania obrazowe inwazyjne.**

##### **3.1.5.1.1. Arteriografia.**

Arteriografia (DSA, ang.: „digital subtraction angiography”, cyfrowa angiografia subtrakcyjna) jest najbardziej polecanym badaniem obrazowym w ONK. DSA lokalizuje miejsce zamknięcia tętnicy oraz obrazuje naczynia dystalne do miejsc zamknięcia. Umożliwia także rozróżnić zakrzepicę od materiału zatorowego, który daje obraz ostrego odcięcie światła naczynia lub wypukłego menisku lub czy też kontur zatoru jest obrysowany przez środek kontrastowy. Pomaga również w selekcji pacjentów, którzy będą korzystać z rewaskularyzacji wewnątrznaczyniowej i miejscowego leczenia fibrynolitycznego lub operacji otwartych [38, 39, 97]. Należy jednak pamiętać, że arteriografia zwiększa ryzyko wystąpienia ostrej niewydolności nerek, co może się kumulować z niekorzystnym wpływem czasu niedokrwienia i reperfuzji na funkcję nerek. Ponad to arteriografia nie powinna znacząco opóźniać momentu rewaskularyzacji. Coraz częściej wykorzystuje się możliwość arteriografii śródoperacyjnej [10].

### **3.1.5.1.2. Badania obrazowe nieinwazyjne.**

#### **Badanie ultrasonografii Doppler Duplex.**

Badanie USG Doppler Duplex jest niezbędnym badaniem do prawidłowej oceny stopnia klinicznego zaawansowania ONK (SVS/ISCVS). Ultrasonografia Doppler Duplex jest badaniem szybkim, nieinwazyjnym, dostępnym, które pozwala rozpoznać i zlokalizować zamknięcie tętnicy i powinno być wykonane w sytuacji, kiedy DSA nie jest dostępne lub znacząco opóźniłoby rewaskularyzację niedokrwionych kończyn [97].

#### **Angiografia tomografii komputerowej i rezonansu magnetycznego.**

Angiografia tomografii komputerowej (Angio-TK) lub rezonansu magnetycznego (MRA) jest badaniem obrazowym z wyboru w diagnostyce ONK. Badanie MRA ze względu na czas trwania może być uciążliwe dla pacjenta z ONK oraz czasochłonne, co może opóźnić leczenie. Poza tym dostępność MRA w warunkach ostrego dyżuru jest niewielka. W przeciwieństwie do MRA, Angio-TK jest bardziej dostępne oraz szybsze. Wadą angio-TK jest jej zależność od jodowych środków kontrastowych. U pacjentów z ONK, którzy mogą również wymagać procedury wewnątrznacyniowe. Kumulacja dawek środków kontrastowych zwiększa neurotoksyczności. [49, 67, 82, 97]

### **3.1.6. Leczenie ONK.**

ONK wymaga natychmiastowego wdrożenia leczenia przyczynowego, ponieważ czas ostrego niedokrwienia jest wprost proporcjonalny do ryzyka utraty kończyny. Jeśli czas niedokrwienia jest krótszy od 12 godzin, ryzyko utraty kończyny wynosi 6%, 12-24 godzin-12%, a powyżej 24 godzin wynosi odpowiednio 20% [10]. O ile odsetek amputacji wśród pacjentów z ONK znacznie się zmniejszył, co ma zapewne związek z postępem technik operacyjnych i wewnątrznacyniowych, o tyle śmiertelność w przebiegu ONK pozostaje na stałym poziomie od wielu lat [38, 63]. Dlatego istotą leczenia ONK jest jak najszybsze podjęcie przygotowań do odpowiedniej procedury leczniczej i unikanie zbędnych, czasochłonnych czynności i badań diagnostycznych, narażających pacjenta na rozwój zagrażających życiu ogólnoustrojowych powikłań.

W 1978 roku Blaisdell et al. [10] po raz pierwszy wprowadził pojęcie wczesnej heparynizacji, aby zapobiec proksymalnej i dystalnej propagacji zakrzepu i do dzisiaj powyższe postępowanie pozostaje jednym z filarów w leczeniu ONK. Bezpośrednio po rozpoznaniu ONK powinno się podać dożylnie heparynę niefrakcjonowaną lub podskórną heparynę drobnocząsteczkową w pełnej dawce leczniczej. Należy sprawdzić przeciwwskazania do leczenia heparyną i wziąć pod uwagę rodzaj planowanego znieczulenia zewnątrzoponowego lub podpajęczynówkowego [ 78, 79, 97].

Równocześnie z leczeniem rewaskularyzacyjnym należy rozpocząć podawanie leków przeciwbólowych, wyrównywanie gospodarki kwasowo-zasadowej i wodno-elektrolitowej, leczenie nadkomorowych i komorowych zaburzeń rytmu serca i zastoinowej niewydolności serca. Wszystkie powyższe działania powinny mieć na celu złagodzenie okresu niedokrwienia a następnie reperfuzji oraz zapobieganie potencjalnym powikłaniom ogólnoustrojowym.

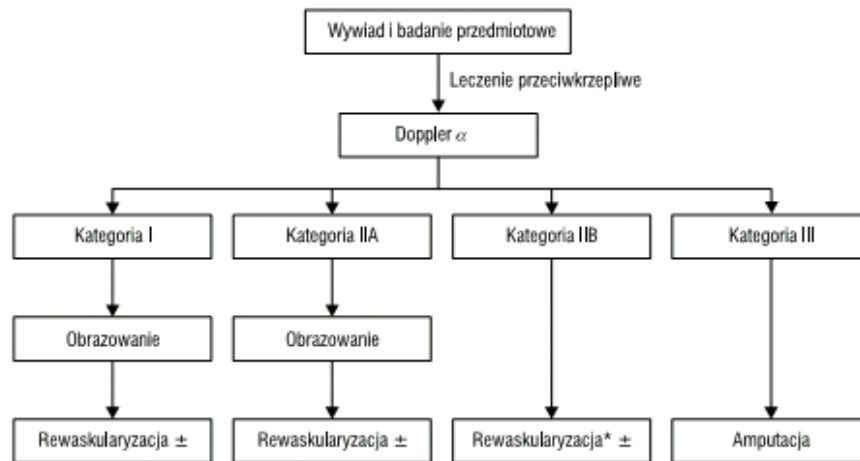
### **3.1.6.1. Techniki inwazyjne leczenia ostrego niedokrwienia kończyn (ONK).**

Wybór metody leczenia ONK zależy od następujących czynników: czasu trwania niedokrwienia i przyczyny (zator, zakrzepica), lokalizacji i anatomii zmiany zamykającej tętnicę, ryzyka operacyjnego wynikającego z chorób towarzyszących i obecności przeciwwskazań do leczenia fibrynolitycznego. Obowiązujący algorytm postępowania w ONK został przedstawiony na rycinie 1.

Do otwartych zabiegów rewaskularyzacyjnych zaliczamy: embolektomię lub trombektomię balonową cewnikiem Fogartheo, zabiegi rekonstrukcyjne tętnic kończyn dolnych z wytworzeniem pomostów z naczyń własnych lub protezy naczyniowej, endarterektomię z lub bez wszycia łąty naczyniowej oraz śródoperacyjną trombolizę celowaną [25, 33, 72]. Powyższe techniki są stosowane u pacjentów z ciężkim niedokrwieniem kończyn dolnych, czyli IIB i wczesne stadium III wg klasyfikacji SVS/ISCVS [97]. W razie dokonanego ostrego niedokrwienia metodą leczenia z wyboru jest pierwotna amputacja [93, 97]. Po usunięciu zatoru lub zakrzepicy ze światła tętnicy za pomocą cewnika Fogartego, należy sprawdzić czy klinicznie krążenie w kończynie zostało przywrócone wystarczająco. Jeśli nie stwierdza się dostatecznie wypełnionego tętna, reaktywnego przekrwienia lub brak sygnału przepływu dopplerowskiego nad dystalnymi tętnicami, należy rozważyć wykonanie angiografii śródoperacyjnej, aby zlokalizować pozostałe w świetle skrzepliny lub zwężenia i niedrożności miażdżycowe. Angiografia wykonana śródoperacyjnie pomaga w podjęciu decyzji, czy należy wykonać ponowną trombektomię, pomost omijający, przezskórną

angioplastykę wewnątrznacyniową (PTA), czy też dotętniczą trombolizę celowaną [10, 39, 97].

Rycina 2. Algorytm postępowania w ostrym niedokrwieniu kończyn dolnych. [97]



Legenda:

I, IIA, IIB, III- stopnie klinicznego zaawansowania ONK według klasyfikacji SVS/ICSVS.

α- potwierdzenie brak lub silnie osłabionych sygnałów ciśnienia kostkowego.

\*- w niektórych ośrodkach wykonanoby badania obrazowe

Drugą grupę zabiegów stanowią procedury wewnątrznacyniowe, które są leczeniem z wyboru u pacjentów z ostrym niedokrwieniem w stopniu zaawansowania I i IIA (SVS/ICSVS) [97].

Celowana fibrynoliza dotętnicza (ang. catheter-directed thrombolysis, CDT ), polegająca na bezpośrednim wlewie leku fibrynolitycznego do skrzepliny, jest mniej inwazyjna lub może ograniczyć zakres wymaganego później zabiegu operacyjnego. Do skrzepliny podaje się urokinazę, rt-PA, streptokinazę i reteplaza. O ile stosuje się ściśle do wskazań i przeciwwskazań do leczenia fibrynolitycznego, uważa się, że powyższa technika powoduje mniejszy uraz śródbłonna, a niskociśnieniowa stopniowa reperfuzja jest korzystniejsza od wysokociśnieniowej nagłej reperfuzji, jaka ma miejsce w czasie zabiegu operacyjnego.

CDT jest metodą leczenia z wyboru w przypadku zakrzepicy pomostu naczyniowego oraz zakrzepicy tętniaka tętnicy podkolanowej [6, 15, 16, 97]. Przeciwwskazania do leczenia fibrynolitycznego zostały przedstawione w tabeli 2.

Tabela 2. Przeciwwskazania do leczenia fibrynolitycznego [1, 97]

Przeciwwskazania bezwzględne	Przeciwwskazania względne	Przeciwwskazania o mniejszym znaczeniu
1. rozpoznany incydent naczyniowomózgowy (w tym przemijający napad niedokrwieny w ciągu ostatnich 2 miesięcy) 2. czynna skaza krwotoczna 3. krwawienie z przewodu pokarmowego (w ciągu ostatnich 10 dni) 4. operacja neurochirurgiczna (wewnątrzczaszkowa, rdzeniowa) w ciągu ostatnich 3 miesięcy 5. uraz wewnątrzczaszkowy w ciągu ostatnich 3 miesięcy	1. resuscytacja krążeniowo-oddechowa w ciągu ostatnich 10 dni 2. rozległa operacja nienaczyniowa lub uraz w ciągu ostatnich 10 dni 3. niekontrolowane nadciśnienie tętnicze (skurczowe >180 mm Hg lub rozkurczowe >110 mm Hg) 4. nakłucie naczynia, którego nie można ucisnąć 5. guz wewnątrzczaszkowy 6. operacja oka w ostatnim czasie	1. niewydolność wątroby, zwłaszcza z zaburzeniami krzepnięcia 2. bakteryjne zapalenie wsierdza 3. ciąża 4. krwotoczna retinopatia cukrzycowa

Inne metody endowaskularne stosowane do usuwania skrzeplin i zatorów są: przezskórna trombektomia aspiracyjna (percutaneous aspiration thrombectomy - PAT) i przezskórna trombektomia mechaniczna (percutaneous mechanical thrombectomy- PMT), które służą do usuwania skrzeplin z tętnic obwodowych [31, 33, 39, 74, 87, 91, 95, 101, 104].

Łączenie technik operacyjnych i endowaskularnych pozwala osiągnąć lepszy efekt rewaskularyzacyjny [12, 61, 66]. Porównanie trzech dużych badań porównujących techniki otwarte i wewnątrzczaszkowe przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 3. Porównanie celowanej trombolizy dotętniczej (CDT) i chirurgicznych technik rewaskularyzacyjnych [97].

		Celowana tromboliza dotętnicza (CDT)			Chirurgiczna rewaskularyzacja		
	Czas obserwacji	Liczba pacjentów	Odsetek uratowanych kończyn	Śmiertelność	Liczba pacjentów	Odsetek uratowanych kończyn	Śmiertelność
Rochester Study [63]	12 miesięcy	57	82%	16%	57	82%	42%
STILE [99]	6 miesięcy	246	88,2%	6,5%	141	89,4%	8,5%
TOPAS [64]	12 miesięcy	144	82,7%	13,3%	54	81,1%	15,7%

Wszystkie powyższe badania prospektywne, tzn.: Rochester Study, STILLE i TOPAS Study, wskazują, że CDT zmniejsza śmiertelność pacjentów z ONK. Jednakże w grupie pacjentów poddanym CDT zwiększa się ryzyko krwawień i niepowodzeń pod postacią nawrotowego niedokrwienia lub niewystarczającej poprawy ukrwienia kończyny wymagającej interwencji chirurgicznej, w związku z czym pacjent poddany czasochłonnemu leczeniu jest bardziej narażony na utratę kończyny. Dodatkową zaletą jest niskociśnieniowa długofalowa reperfuzja, która zmniejsza ryzyko zespołu reperfuzji w porównaniu z zabiegami operacyjnymi. Warto jednak podkreślić, że CTD jest korzystnym rodzajem leczenia dla pacjentów z ONK w stopniu zaawansowania ONK I i IIA, natomiast w IIB i III- techniki chirurgiczne [64, 97, 99].



### 3.1.7. Zespół niedokrwienia i zespół reperfuzji.

Zespół niedokrwienia tkanek i zespół reperfuzji wywołują powikłania miejscowe i groźne dla życia ogólnoustrojowe. W czasie niedokrwienia tkanek brak podaży utlenowanej krwi prowadzi do zahamowania wytwarzania i wyczerpania zapasów energii zmagazynowanej w postaci adenozyotrójfosforanu (ATP) powstającego w cyklu Krebsa odbywającego się w mitochondriach, które są odpowiedzialne za 90% metabolizmu komórki. Dlatego też uaktywniają się szlaki przemiany beztlenowej, w czasie których powstaje kwas mlekowy odpowiedzialny za powstawanie kwasicy oraz między innymi fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (NADPH) i hipoksantyna. W tym momencie zaczynają powstawać wolne rodniki za sprawą oksydazy cytochromalnej c oraz mediatory pozapalne, które są wynikiem aktywacji jądrowego czynnika transkrypcyjnego kappa-B (NF- $\kappa$ B) [41].

Brak ATP w komórce powoduje także zatrzymanie jonowych pomp błonowych i zaburzenia gradientu jonów. Jony potasu przemieszczają się do przestrzeni pozakomórkowej powodując hiperkaliemię. Uszkodzone mitochondria uwalniają do cytoplazmy komórki wolne rodniki, jony wapnia, kaspazy 3 i 9, kapaliny, proteazy, endonukleazy i fosfolipazy niszczące kwas doeksyrybonukleinowy (DNA), cytoszkielet i błonę komórkową. W dalszym etapie martwe komórki uwalniają niebezpieczne związki do przestrzeni międzykomórkowej i do światła naczyń, w których te szkodliwe metabolity gromadzą i prowadzą do destrukcji otaczających tkanek [29, 59].

Przywrócenie krążenia po okresie niedokrwienia wyzwała zespół reperfuzji, który nadal niszczy tkanki poprzez nasilenie stresu oksydacyjnego i reakcji zapalnej [108]. Podstawową przyczyną zespołu reperfuzji jest uszkodzenie śródbłonna wszystkich naczyń, a przede wszystkim żyłki zakapilarnej. Mediatory prozapalne, takie jak czynnik martwicy guza  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) oraz interleukiny 1,6,9 (IL-1, 6,9) prowadzą do zwiększonej ekspresji selektywnej, integryny, ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1 oraz fosfatydyloseryny na powierzchni śródbłonna. Powyższe białka i lipidy błony śródbłonna aktywują i powodują adhezję leukocytów, a głównie neutrofilów, które migrują i ulegają degranulacji do otaczających tkanek [29]. Dodatkowo dochodzi do agregacji płytek krwi, co zamyka światło żył zakapilarnych i nasila hypoperfuzję tkanek. Dlatego też zespół reperfuzji jest przykładem hipoksji cytoplazmatycznej [22]. Przywrócenie ukrwienia i wzrost podaży tlenu nie poprawia funkcji wcześniej niedokrwionych tkanek ponieważ nadal toczą się w niej patologiczne procesy nasilające destrukcję komórek. Co więcej zwiększenie przepuszczalności naczyń, które rozpoczyna się w okresie niedokrwienia toczy się nadal w czasie reperfuzji. Po pierwsze

dochodzi do rozluźnienia połączeń pomiędzy komórkami zniszczonego śródbłonka. Następnie mediatory zapalenia z kwasem arachidonowym na czele i trombina powodują zmianę kształtu śródbłonka z płaskiego na bardziej okrągły poprzez uszkodzenie cytoszkieletu. Zmiana kształtu komórek śródbłonka sprawia, że komórki te nie przylegają ściśle do siebie. Uszkodzenie bariery naczyniowej jest prostą drogą do powstania obrzęku tkanek na skutek przenikania osocza do hiperosmolarnych komórek [29, 110].

Kolejnym destrukcyjnym mechanizmem obserwowanym w zespole reperfuzji jest tendencja do zakrzepicy naczyniowej. Do nadkrzepliwości prowadzą już wcześniej opisane patomechanizmy. Uszkodzony i nieprzylegający ściśle do siebie śródbłonek naczyń odsłania błonę podstawną naczyń, której kolagen w kontakcie z krwią aktywuje wewnątrzpochodną ścieżkę układu krzepnięcia poprzez czynnik XII. Jednocześnie czynnik tkankowy aktywuje zewnątrzpochodną ścieżkę układu krzepnięcia. Ponadto wolny przepływ krwi, agregacja płytek krwi i adhezja leukocytów sprzyjają zaczopowaniu naczyń mikrokrążenia. Dodatkowo wzrost stężenia kwasu arachidonowego i trombiny sprzyjają stanom nadkrzepliwości. Wszystkie powyższe procesy powodują wykrzepianie naczyń makro- i mikrokrążenia, co w skrajnej sytuacji doprowadzi do zespołu no-reflow polegającym na całkowitym braku krążenia w niedokrwionych tkankach [2, 59].

Najczęstsze powikłania ONK są związane ze zjawiskiem reperfuzji, ponieważ nagłe przywrócenie ukrwienia tkanek wyzwała kaskadę mechanizmów prowadzących do powiększenia stopnia i zakresu niedokrwionej tkanki. W takiej sytuacji może rozwinąć się zespół ciasnoty przedziałów mięśniowych, który nieleczone prowadzi do martwicy mięśni. Taka sytuacja wymaga wykonania fascjotomii, czyli nacięcia powięzi, by odbarczyć uciśnięte mięśnie. Wiele badań eksperymentalnych próbuje znaleźć skuteczne leczenie farmakologiczne mające na celu zapobieganie uszkodzeniom reperfuzyjnym, ale jak dotąd badania nadal trwają. Do odległych powikłań ONK należą zaburzenia czucia i zaburzenie funkcji motorycznych.

Poza opisanymi powyżej powikłaniami miejscowymi zespołu niedokrwienia i zespołu reperfuzji dochodzi często do powikłań ogólnoustrojowych. Kwasicca metaboliczna, hiperkaliemia, liczne metabolity i mediatory stanu zapalnego wywołują ogólnoustrojową reakcję zapalną (SIRS), która może doprowadzić do uszkodzenia funkcji pojedynczych narządów, a nawet do zespołu niewydolności wielonarządowej (MODS) [32].

Kolejnym poważnym powikłaniem jest uszkodzenie bariery jelitowej w zespole reperfuzji. Przerwanie bariery jelitowej na skutek uszkodzenia komórek śluzówki jelit powoduje

translokacje drobnoustrojów ze światła przewodu pokarmowego do krwiobiegu, co może doprowadzić nie tylko do bakteriemii, ale i sepsy, wstrząsu septycznego, śmierci.

Do niewydolności serca w zespole niedokrwienia i zespole reperfuzji dochodzi w kilku mechanizmach. Kwasica zmniejsza kurczliwość serca. Hiperkalcemia i hiperkaliemia zaburzają funkcję układu bodźcoprzewodzącego serca. Natomiast cytokin pozapalne działają wazodylatacyjne na łożysko naczyniowe przez co prowadzą do spadku ciśnienia oraz oporu naczyniowego. Jeżeli dojdzie do uszkodzenia mikrokążenia płuc, wyzwała się zespół ostrej niewydolności oddechowej (ARDS). [32]

Zdecydowanie najczęstszym powikłaniem dotyczącym narządów odległych jest ostra niewydolność nerek (ONN) wywołana toksycznymi metabolitami przemiany beztlenowej, mediatorami stanu zapalnego oraz złogami fosforanów i mioglobiny, uwalnianymi w procesie rbdomyolizy, czopującymi kanaliki dystalne nefronów [109, 110].

### **3.2. Rola pierwiastków w ostrym niedokrwieniu kończyn dolnych.**

#### **3.2.1. Magnez.**

Magnez (Mg) to drugi co do stężenia jon wewnątrzkomórkowy, istotny kofaktor 300 reakcji biochemicznych, zwłaszcza tych, w których uczestniczy ATP. Mg jest czynnikiem wpływającym na pracę wielu układów, w tym: nerwowego, mięśniowego, hormonalnego, sercowo-naczyniowego, immunologicznego. Ciało człowieka o masie 70 kg zawiera średnio 20-30 g Mg, przy czym 60% w kościach, 39%- wewnątrzkomórkowo, w tym 20% w mięśniach oraz 1% zewnątrzkomórkowo. Fizjologiczne stężenie magnezu całkowitego ( $Mg_{całk}$ ) w osoczu wynosi 0,7-1,25 mmol/l, z czego 70% znajduje się w formie zjonizowanej ( $Mg_i$ ), a reszta jest związana z białkami (głównie albuminami) [43]. Zalecana podaż magnezu to 20-40 mmol/l na dobę, wówczas 20% tej ilości wchłania się do krwi, a reszta pod postacią soli magnezowych kwasów tłuszczowych jest wydalana z kałem. W nerkach przesączane jest około 70 mmol/l Mg na dobę, z czego 10% jest wydalana z moczem, a reszta ulega resorpcji zwrotnej w grubym odcinku ramienia wstępującego pętli Henlego. Hiperkalcemia, a przede wszystkim hiperkalcemia oraz hipokaliemia, hiperaldosteronizm, hormony tarczycy, diuretyki pętlowe i etanol hamują resorpcję jonów  $Mg^{2+}$  [43, 70, 90, 106].

Niedobór magnezu w organizmie indukuje stres oksydacyjny i zwiększone wytwarzanie reaktywnych form tlenu, prowadzi do aktywacji układu immunologicznego i wzrostu stężenia

mediatorów stanu zapalnego w krążeniu, oddziałuje na wewnątrz- i zewnątrzkomórkowe stężenia innych jonów zwłaszcza: sodu, potasu, wapnia [68, 70]. W piśmiennictwie nie ma doniesień na temat stężenia magnezu w ostrym niedokrwieniu kończyn dolnych, natomiast w chorobach kardiologicznych rola magnezu jest od wielu lat znana i potwierdzona licznymi badaniami. Dożylny wlew siarczanu magnezu jest obecnie rutynowym postępowaniem w leczeniu zatrucia digoksyną z komorowymi zaburzeniami rytmu i torsades de pointes oraz w zawale serca [57, 100]. Wiele prac wskazuje na związek między hypomagnezemią a patogenezą miażdżycy, nadciśnienia tętniczego i cukrzycy [47]. Hypomagnezemią, jak udowodniono, może mieć związek z patogenezą choroby niedokrwiennej serca oraz zwiększonym ryzykiem wystąpienia zawału serca, udaru niedokrwiennej mózgu, tendencją do zakrzepicy, zwiększonym oporem naczyń obwodowych, nasileniem odkładania depozytów cholesterolu w blaszkach miażdżycowych [3, 7, 50, 86]. Dożylne podanie magnezu w przebiegu zawału serca inicjuje korzystne reakcje i mechanizmy, prowadzące między innymi do poszerzenia tętnic wieńcowych, zapobiegające przeładowaniu mięśnia sercowego wapniem, hamujące agregację płytek, ograniczające obszar zawału i zapobiegające spazmowi naczyń wieńcowych. Co więcej siarczan magnezu podany dożylnie przed, a nie w czasie lub po rewaskularyzacji, zmniejsza ryzyko ostrej zakrzepicy w stencie po angioplastyce tętnic wieńcowych wykonywanej z powodu ostrego incydentu niedokrwiennej. [14, 18, 57, 77]

### **3.2.2. Wapń.**

Fizjologiczne stężenie wapnia we krwi zależy od jego podaży w diecie, wchłaniania z przewodu pokarmowego, wydalania z moczem, odkładania lub mobilizacji z kości. Całkowite stężenie wapnia w osoczu wynosi 2,25-2,75 mmol/l i zależy od stężenia albumin. Wapń zjonizowany stanowi 40-50% puli w surowicy, gdzie jego stężenie w surowicy wynosi 1,0-1,3 mmol/l i ma również największą przydatność diagnostyczną [43]. Niedokrwienie i powstająca w czasie jego trwania kwasica zwiększają stężenia wapnia zjonizowanego [5].

### 3.3. Stres oksydacyjny w ONK.

Stres oksydacyjny jest definiowany jako zaburzenie równowagi między natężeniem procesów oksydacyjnych, odpowiedzialnych za produkcję reaktywnych form tlenu (RFT), a procesami obronnymi - antyoksydacyjnymi. Wolne rodniki *in vivo* są produkowane także pod wpływem działania czynników zewnętrznych, tj.: promieniowania UV i jonizującego oraz podczas reakcji obronnych układu immunologicznego organizmu. Wolne rodniki powstają również w przebiegu fizjologicznych procesów komórkowych, ale ich produkcja znajduje się pod ścisłą kontrolą organizmu dzięki nieenzymatycznym i enzymatycznym mechanizmom obronnym [5, 59]. W warunkach fizjologicznych wzrost, proliferacja i apoptoza komórek oraz tworzenie wysokoenergetycznych związków fosforanowych odbywają się z udziałem wolnych rodników [5]. Dowiedziono, że stres oksydacyjny jest związany z patogenezą cukrzycy, zawałem serca, udarem mózgu, procesami starzenia się, chorobami zapalnymi, chorobami tkanki łącznej, chorobą Alzheimera, chorobą Cohna, a przede wszystkim w reperfuzji. Niedokrwienie tkanek, a zwłaszcza przywrócenie ukrwienia, czyli reperfuzja, indukują kaskadę reakcji prowadzących do wzrostu stężenia wolnych rodników w organizmie, co prowadzi do nasilenia uszkodzenia niedokrwionych komórek [28, 48, 51]. W skład enzymatycznego układu antyoksydacyjnego wchodzi między innymi: dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), peroksydaza glutationowa (GPx), peroksydaza cytochromu, katalaza (CAT). Natomiast na nieenzymatyczną obronę antyoksydacyjną składa się wiele związków biologicznie czynnych, tj.: glutation, kwas moczowy, ceruloplazmina, cysteina, karnozyna, ubichinon, beta-karoten, witamina A, witamina E, pterydyna, tiomocznik, bilirubina.

#### 3.3.1. Reaktywne formy tlenu.

Reaktywne formy tlenu (RFT) występują w postaci wolnorodnikowej i nierodnikowych form tlenu [5, 59]:

1. wolne rodniki: anionorodnik ponadtlenkowy ( $O_2^{\bullet-}$ ), rodnik hydroksylowy ( $\bullet OH$ ), rodnik wodoronadtlenkowy ( $HO_2^{\bullet}$ ), rodnik nadtlenkowy ( $ROO^{\bullet}$ ), rodnik alkoksylowy ( $RO^{\bullet}$ ).
2. Nadtlenki: nadtlenek wodoru ( $H_2O_2$ ), tlen singletowy ( $^1O_2$ ), nadtlenki organiczne.
3. Reaktywne formy azotu: tlenek azotu (III) (NO), dwutlenek azotu (IV) ( $NO_2$ ), kwas nadtlenoazotawy (ONOOH), nadtlenoazotyn, kwas azotowy (III), chlorek nitrylu.

#### 4. Reaktywne związki pokrewne: kwas chlorowy (I), kwas bromowy (I).

Spośród powyższych RFT najbardziej reaktywne są anionorodnik ponadtlenkowy i rodnik hydroksylowy [5, 69].

##### 3.3.1.1. Anionorodnik ponadtlenkowy.

Anionorodnik ponadtlenkowy ( $O_2^{\bullet-}$ ) powstaje w mitochondrium w czasie redukcji cząsteczki tlenu w łańcuchu oddechowym oraz w reakcji utleniania ksantyny do kwasu moczowego przy obecności oksydazy ksantynowej, reduktazy NADPH i cytochromu P-450. Źródłem  $O_2^{\bullet-}$  może być synteza tlenku azotu, a także aktywność cyklooksigenazy. Ponadto  $O_2^{\bullet-}$  powstaje w reakcji autooksydacji hemoglobiny do methemoglobiny erytrocytach oraz produkowany jest przez błonową oksydazę NADPH na powierzchni aktywowanych fagocytów [5, 69]. W reakcji dysmutacji dwóch cząsteczek anionorodnika ponadtlenkowego, katalizowanej przez dysmutazę podnadtlenkową (SOD), powstaje mniej toksyczny nadtlenek wodoru i tlen cząsteczkowy:

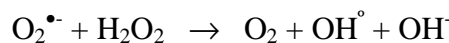


##### 3.3.1.2. Rodnik hydroksylowy.

Rodnik hydroksylowy ( $\bullet OH$ ), jako najbardziej aktywny utleniacz, wchodzi w reakcje z wszystkimi biologicznie ważnymi związkami. Powstaje między innymi w reakcji Fentona (między nadtlenkiem wodoru i jonem żelaza (II) lub miedzi (II)):



oraz w reakcji Habera-Weissa (między anionorodnikiem ponadtlenkowym i nadtlenkiem wodoru katalizowanej jonami żelaza(III)):



Rodnik hydroksylowy odpowiada między innymi za oksydacyjne uszkodzenia DNA komórek, a wraz z zasadami azotowymi- za mutację DNA [5].

### 3.3.1.3. Nadtlenek wodoru.

Nadtlenek wodoru ( $H_2O_2$ ) jest produktem dwuelektronowej redukcji tlenu cząsteczkowego. Powstaje również w wyniku dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego lub podczas dwuelektronowej redukcji tlenu cząsteczkowego pod wpływem enzymów, np. oksydazy ksantynowej lub oksydazy moczanowej. W obecności jonów metali przejściowych ulega rozpadowi do rodnika wodorotlenowego i anionu wodorotlenowego (reakcja Fentona). Nadtlenek wodoru z łatwością dyfunduje przez błony komórkowe i dlatego może przemieszczać się do komórek daleko od miejsca swojego powstania. Niewykorzystany przez komórkę jest w niej rozkładany przez enzymy antyoksydacyjne: katalazę oraz peroksydazę glutationową (GPx) [5, 59]. Silne właściwości utleniające sprawiają, że nadtlenek wodoru jest niezwykle toksycznym związkiem, ponieważ uszkadza lipidy, cukry, DNA, a przede wszystkim białka [5, 69].

### 3.3.1.4. Reaktywne formy azotu.

Do reaktywnych form azotu należy tlenek azotu (II)(NO) oraz powstające z niego w wyniku przemian metabolicznych: kation nitrozoniowy ( $NO^+$ ), anion nitroksylowy ( $NO^-$ ) i nadtlenoazotyn ( $ONOO^-$ ) [4, 1, 23, 33, 41]. Synteza tlenku azotu jest katalizowana przez rodzinę syntaz tlenku azotu (NOS) zależnych od NADPH. Wyróżnia się trzy podstawowe typy syntaz tlenku azotu:

1. e-NOS lub NOS typu 3, występująca konstytutywnie w komórkach śródbłonka i syntetyzująca tlenek azotu potrzebny do regulacji ciśnienia krwi,
2. n-NOS lub NOS typu 1, występująca w neuronach i zależna od jonów wapnia i kalmoduliny,
3. i-NOS lub NOS typu 2 – indukowalna, silnie wiążąca kalmodulinę i niezależna od jonów wapnia, obecna w makrofagach, monocytach, neutrofilach, hepatocytach, komórkach nabłonka oddechowego [102]. Inhibitorami syntazy NO są między innymi glikokortykosteroidy, L-glutamina, cytokiny ( $TGF-\alpha$ , IL-4, IL-10, IL-13). Konstytutywny izoenzym NOS pod wpływem działania aktywatorów takich jak acetylocholina, bradykinina i  $H_2O_2$  wytwarza NO w śródbłonku naczyń krwionośnych oraz glutaminianu w komórkach mózgu. Natomiast iNOS pojawia się po indukcji IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-2, IL-6, TNF  $\alpha$ , czynnikiem hamującym migrację makrofagów, jak również mikroorganizmami lub ich produktami, np. LPS [4, 23, 28, 39]. Indukcja iNOS w komórkach śródbłonka uszkadza je, a w makrofagach i

komórkach mięśni gładkich naczyń prowadzi do zahamowania oddychania komórkowego. Tlenek azotu działa nieswoiście i jest związkiem silnie toksycznym. Charakteryzuje się powinowactwem do metaloprotein i powoduje aktywację czynników transkrypcyjnych, co w rezultacie prowadzi do nieodwraclanego uszkodzenia DNA i białek. Dokładne poznanie mechanizmów działania tlenu azotu w komórkach jest trudne ze względu na dużą jego reaktywność. Tlenek azotu, za pośrednictwem cGMP, obniża stężenie wewnątrzkomórkowego wapnia, co prowadzi do relaksacji naczyń i mięśni gładkich, zahamowania agregacji i adhezji płytek krwi, chemotaksji neutrofilii [19, 49].

### **3.3.2. Układ antyoksydacyjny.**

Antyoksydanty, które przeciwdziałają toksyczności RFT, ze względu na pełnioną funkcję dzielone są na następujące podgrupy [5, 59, 69]:

1. zapobiegające powstawaniu RFT: enzymy rozkładające RFT (katalaza-CAT, peroksydaza glutationowa-GPx); białka chelatujące metale (transferyna, ceruloplazmina, albuminy, laktoferyna, mioglobina, haptoglobina, hemopeksyna, metalotioneiny); antyoksydanty sekwestrujące RFT (dysmutaza ponadtlenkowa-SOD, karotenoidy, tokoferol).
2. usuwające powstałe RFT (kwas L-askorbinowy, kwas moczowy, glutation, bilirubina, albumina, tokoferol, ubichinon, karotenoidy, flawonoidy).
3. naprawiające negatywne skutki reakcji RFT z błonami komórkowymi i białkami (lipaza, proteinaza, transferaza, enzymy naprawcze DNA).

Do biologicznie najważniejszych enzymów antyoksydacyjnych należą: dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), peroksydaza glutationowa (GPx) oraz katalaza (CAT) [5, 59, 69].

#### **3.3.2.1. Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD).**

Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) odpowiada za usuwanie anionorodnika ponadtlenkowego poprzez katalizę jego dysmutacji do nadtlenu wodoru i tlenu. Enzym występuje w trzech izoformach [4]:

1. cytoplazmatycznej (Cu,Zn-SOD, SOD-1).
2. mitochondrialnej (Mn-SOD, SOD-2).
3. zewnątrzkomórkowej (Ec-Cu,Zn-SOD, SOD-3).



### 3.3.2.2. Peroksydaza glutationowa.

Aktywność peroksydazy glutationowej (GPx), obok reduktazy glutationowej (GR) i katalazy (CAT) oraz reduktazy methemoglobiny, jest najważniejszym mechanizmem obronnym erytrocytów przed RFT. GPx jest białkiem tetramerycznym o masie cząsteczkowej 84 kD, a każda podjednostka zawiera atom selenu w postaci selenocysteiny w miejscu aktywnym. GPx katalizuje redukcję nadtlenu wodoru i nadtlenków organicznych i występuje w pięciu izoformach:

1. cytozolowa peroksydaza (cGPx, GPx-1 ) bierze udział w redukcji nadtlenu wodoru i organicznych wodoronadtlenków przez zredukowany glutation.
2. peroksydaza glutationowa (ph-GPx) występująca w cytozolu i częściowo związana z błonami komórkowymi, redukuje wodoronadtlenki fosfolipidowe.
3. pozakomórkowa (plazmatyczna) peroksydaza glutationowa (pGPx) w osoczu.
4. peroksydaza glutationowa żołądkowo-jelitowa (GI-GPx).
5. jądrowa peroksydaza glutationowa (spGPx)

### 3.3.2.3. Całkowity status antyoksydacyjny (TAS) i całkowita zdolność antyoksydacyjna na podstawie redukcji jonów żelaza (III) (FRAP).

Badanie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej podaje ilościową sumę aktywności antyoksydantów w badanym materiale. Jest kilka metod oznaczania całkowitej zdolności antyoksydacyjnej. Wszystkie opierają się na podobnej zasadzie: obecność antyoksydantów w próbce spowalnia barwną reakcję utleniania, a parametr charakteryzujący to spowolnienie jest miarą zawartości antyoksydantów w badanej próbce. Jednym z najpowszechniej wykonywanych oznaczeń jest badanie TAS, w którym peroksydaza katalizuje reakcję jednoelektrodowego utleniania ABTS przez nadtlenek wodoru. W wyniku tej reakcji powstaje zielony kationorodnik  $ABTS^{\circ+}$ . Zahamowanie tworzenia zielonej barwy w próbie jest miarą zawartości antyoksydantów w badanej tkance. Ogromną zaletą tej metody jest możliwość zakupu gotowego zestawu, dzięki czemu wyniki mogą być ze sobą bezpośrednio porównywalne. Inny sposób oznaczenia całkowitej zdolności antyoksydacyjnej wykorzystuje właściwość biologicznych antyoksydantów do redukcji jonów żelaza (III) (FRAP).[5, 59, 69]

#### 4. Cel pracy.

Czas ostrego niedokrwienia kończyn dolnych spowodowany zamknięciem światła naczynia i następujący po nim zespół reperfuzji wywołują burzliwe zaburzenia gospodarki elektrolitowej i kwasowo-zasadowej. Uruchamiają przede wszystkim reakcję uogólnionej odpowiedzi zapalnej i produkcję reaktywnych form tlenu, co zaburza funkcjonowanie lub prowadzi do nieodwracalnego uszkodzenia śródbłonka. Uszkodzenie śródbłonka naczyń powoduje wzrost jego przepuszczalności, co z kolei przyczynia się do uszkodzenia narządów odległych w czasie trwania reperfuzji.

Celem podjętej pracy była ocena stężenia  $Mg_{całk}$  i  $Mg_i$  w osoczu; stanu antyoksydacyjnego organizmu, wyrażonego w postaci TAS i FRAP w osoczu, oraz aktywności antyoksydacyjnej SOD w erytrocytach i GPx we krwi pełnej oraz stężenia CRP w surowicy:

1. przed i po rewaskularyzacji kończyn dolnych z powodu ostrego niedokrwienia kończyn oraz
2. określenie czy istnieje związek między powyżej wymienionymi parametrami a stopniem i czasem trwania ostrego niedokrwienia.

## **5. Materiał i metody.**

### **5.1. Charakterystyka ogólna grupy badanej.**

Badaną grupę stanowiło 52 pacjentów przyjętych w trybie nagłym do Kliniki Chirurgii Ogólnej i Naczyń (KChOiN) Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu z powodu ostrego niedokrwienia kończyn dolnych. Średnia wieku w grupie badanej wynosiła  $67 \pm 12$  lat, minimalnie 59 lat, maksymalnie 89 lat. Wśród pacjentów z ostrym niedokrwieniem kończyn dolnych znalazły się 24 kobiety i 28 mężczyzn. Rozpoznanie ostrego niedokrwienia kończyn dolnych było stawiane na podstawie badania przedmiotowego i podmiotowego oraz badań obrazowych: ultrasonografii fali ciągłej, ultrasonografii Duplex Doppler tętnic kończyn dolnych, arteriografii lub tomografii komputerowej z wtórnym opracowaniem naczyń. Badania obrazowe były wykonywane wówczas, gdy znacząco nie opóźniały leczenia przyczynowego, przez co nie miały wpływu na pogorszenie rokowania pacjenta. Po przyjęciu do Kliniki Chirurgii Ogólnej i Naczyń każdy pacjent miał pobieraną krew na oznaczenia laboratoryjne wyszczególnione w podpunkcie 4.2 oraz miał założony kontakt dożylny, EKG, echo serca, konsultację kardiologiczną.

Do oceny stopnia niedokrwienia zastosowano klasyfikację kliniczną ostrego niedokrwienia SVS/ISCVS, która wyróżnia trzy kategorie ONK. Pacjenci, u których nie ma bezpośredniego zagrożenia utraty kończyny, należą do pierwszej kategorii klinicznej (I). W drugiej kategorii klinicznej (II) istnieje zagrożenie utraty kończyny, jeśli szybko nie zastosuje się odpowiedniego leczenia (IIA) lub jeśli natychmiast nie przystąpi się do rewaskularyzacji (IIB). U pacjentów z objawami nieodwracalnego niedokrwienia w trzeciej kategorii (III) występuje trwałe uszkodzenie nerwów bądź mięśni, jeśli dojdzie do istotnego opóźnienia interwencji leczniczej lub niezbędna jest nieuchronna wysoka amputacja [97].

W oparciu o powyższą klasyfikację chorzy z ostrym niedokrwieniem kończyn zostali podzieleni na dwie grupy. Do grupy ze stopniem niedokrwienia IIB zaliczono chorych z ciągłym bólem niedokrwinnym i osłabieniem mięśni oraz zaburzeniami czucia od niewielkich lub umiarkowanych zaburzeń czucia obejmujących palce i przodostopie do całkowitej utraty czucia palców i przodostopia, niedowładu albo porażenia. W grupie IIB nie stwierdzano dobrze słyszalnego sygnału przepływu w tętnicach stopy. Natomiast do grupy III włączono chorych z dużymi zaburzeniami czucia i porażeniem mięśni sięgającymi powyżej stopy, brakiem wypełnienia naczyń włosowatych na obwodzie lub objawami bardziej zaawansowanego niedokrwienia: stężeniem mięśni lub marmurkowatym zabarwieniem skóry. Nie rejestruje się sygnału przepływu ani w żyłach ani tętnicach stopy.

W grupie badanej znalazło się 18 pacjentów w trzeciej kategorii (III) ostrego niedokrwienia według klasyfikacji SVS/ISCVS, natomiast 34 pacjentów- w drugiej kategorii (IIB).

Choroby współistniejące w grupie badanej zostały przedstawione w tabeli 4.

Tabela 4. Choroby współistniejące w grupie badanej w zależności od stopnia niedokrwienia kończyn dolnych.

	Grupa badana n=52	IIB n=34	III n=18
Miażdżyca tętnic kończyn dolnych	24 (46%)	9 (26%)	15 (83%)
Nadciśnienie tętnicze	52 (100%)	34 (100%)	18 (100%)
Dusznicza bolesna	38 (73%)	20 (58%)	18 (100%)
Zawał serca w wywiadach	24 (46%)	16 (47%)	8 (44%)
Hyperlipidemia	38 (73%)	20 (58%)	18 (100%)
Udar niedokrwienno mózgu w wywiadach	17 (32%)	13 (38%)	4 (22%)
Artymia	33 (64%)	24 (70%)	9 (50%)
Aktywna choroba nowotworowa (rak trzustki)	5 (9,6%)	1 (2,9%)	4 (22%)

Pacjenci hospitalizowani z powodu ostrego niedokrwienia kończyn dolnych poddawani byli leczeniu operacyjnemu w trybie pilnym. Czas między początkiem objawów ostrego niedokrwienia a zabiegiem operacyjnym wynosił średnio 20 godzin i 57 minut, minimalnie 2 godziny i 47 minut, maksymalnie 84 godziny. Natomiast czas pomiędzy przyjęciem do Kliniki Chirurgii Ogólnej i Naczyń a rozpoczęciem zabiegu operacyjnego wynosił średnio 4 godziny i 15 minut, minimalnie 1 godzina 35 minut, maksymalnie 7 godzin 12 minut.

W zależności od przyczyny ostrego niedokrwienia oraz współistnienia przewlekłego niedokrwienia kończyn dolnych wykonywano następujące operacje rewaskularyzacyjne: embolektomię lub trombektomię z jednoczasowym udrożnieniem albo operacją rekonstrukcyjną tętnic kończyn dolnych. Wśród 30 pacjentów, u których przyczyną ostrego niedokrwienia kończyn był zator, wykonano 14 embolektomii tętnicy udowej wspólnej, 10 embolektomii tętnicy podkolanowej, 3 embolektomie tętnicy biodrowej zewnętrznej oraz u 3 pacjentów wykonano embolektomię końcowego odcinka aorty brzusznej i obu tętnic biodrowych wspólnych z powodu zatoru rozwidlenia aorty typu jeździec. U pozostałych 22 pacjentów wykonano trombektomię z jednoczasowym udrożnieniem tętnicy lub zabiegiem rekonstrukcyjnym tętnic. 3 pacjentów poddano przezskórnej wewnątrznaczyniowej

angioplastyce tętnic kończyn dolnych z implantacją stentu: w tym 1 pacjent miał wykonaną angioplastykę tętnicy biodrowej zewnętrznej, natomiast 2- angioplastykę tętnicy udowej powierzchownej. Jeżeli chodzi o zabiegi rekonstrukcyjne tętnic kończyn dolnych, to wykonano 3 udrożnienia tętnicy biodrowej wspólnej i zewnętrznej, u 6 pacjentów implantowano protezę naczyniową biodrowo-udową. W odcinku udowo-podkolanowym wykonano 2 przeszczepy żyłne odwrócone oraz implantowano 5 protez naczyniowych udowo-podkolanowych. Ponadto u 3 pacjentów z grupy III z obwodową zakrzepicą po trombektomii tętnic kończyn dolnych rozwinęła się w tych tętnicach wczesna zakrzepica po 24-48 godzinach od pierwszego zabiegu. U powyższych pacjentów podjęto próbę trombektomii tętnic kończyn dolnych, jednakże ze względu na zaawansowane zmiany niedokrwienne i brak możliwości rekonstrukcji wykonano amputację podudzia (1 pacjent) oraz uda (2 pacjentów). U 10 pacjentów z III stopniem ostrego niedokrwienia kończyn dolnych wykonano fascjotomię czterech przedziałów powięziowych łydek.

Po zabiegu operacyjnym każdy pacjent był monitorowany pod względem parametrów wymienionych w podpunkcie 4.2, przeprowadzono dobową zbiórkę moczu, regularny pomiar ciśnienia tętniczego krwi, temperatury ciała oraz EKG.

Z grupy badanej wykluczono pacjentów z cukrzycą, przewlekłą niewydolnością nerek i przyjmujących preparaty doustne magnezu [96].

Badania przeprowadzono na materiale klinicznym, uzyskanym w trakcie badań objętych zgodą Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu (uchwała nr 403/07 z dnia 12.04.2007).

## **5.2. Metody oznaczeń laboratoryjnych.**

Materiał do badań stanowiła krew żylna pobierana od pacjentów z ostrym niedokrwieniem kończyn dolnych w określonych sekwencjach czasowych: po przyjęciu do szpitala a przed zabiegiem operacyjnym (1), po 30-40 minutach od operacji (2), a następnie po upływie 12 (3), 24 (4) i 48 (5) godzin od operacji.

Próby krwi pobierano od chorych w obu grupach do probówek z heparyną S-Monovette (Li-Hep, 9 ml). W uzyskanym materiale oznaczono następujące parametry:

1. stężenie całkowite jonów magnezu ( $Mg_{całk}$ ) i formy zjonizowanej ( $Mg_i$ ) w osoczu, stężenie całkowite jonów wapnia ( $Ca_c$ ) i formy zjonizowanej ( $Ca_i$ ) w osoczu krwi oraz stężenie jonów: potasu (K), sodu (Na) w określonych sekwencjach czasowych (1-5),

2. całkowity status antyoksydacyjny (TAS) i całkowitą zdolność antyoksydacyjną na zasadzie redukcji jonów żelaza (III) (FRAP) osocza, aktywność peroksydazy glutationowej GPx w pełnej krwi i aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (Cu,Zn-SOD) w erytrocytach w określonych sekwencjach czasowych (1-5),
4. stężenie białka C-reaktywnego wysoko czułego (hs-CRP) w określonych sekwencjach czasowych (1-5),
5. aktywność kinazy fosfokreatynowej (CPK), dehydrogenazy mleczanowej (LDH), aminotransferazy asparaginianowej (AspAT) przed i po zabiegu operacyjnym,
6. oceny morfologii: krwinek czerwonych (RBC), hematokrytu (Hct), wskaźnika średniej objętości krwinki czerwonej (MCV), krwinek białych (WBC), płytek krwi (PLT), hemoglobiny (Hgb) przed i po zabiegu operacyjnym,
7. gospodarki lipidowej: cholesterol całkowity (TC, total cholesterol), triglicerydy (TG, triglycerides), cholesterol frakcji HDL (HDL-C, HDL-cholesterol), cholesterol frakcji LDL (LDL-C, LDL-cholesterol) przed zabiegiem operacyjnym,
8. gazometrii: pH, ciśnienie parcjalne tlenu ( $pO_2$ ), ciśnienie parcjalne dwutlenku węgla ( $pCO_2$ ), stężenie molowe jonów wodorowęglanowych ( $HCO_3^-$ ), niedobór zasad (BE), saturację ( $SpO_2$ ) przed i po zabiegu operacyjnym oraz w określonych sytuacjach klinicznych w trakcie leczenia ostrego niedokrwienia kończyn.

W każdej z prób pełnej krwi pobranej przed operacją (1) oznaczono gazometrię i morfologię oraz profil lipidowy w uzyskanym osoczu w laboratorium Szpitala Klinicznego Przemienienia Pańskiego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Gazometrię oznaczono za pomocą analizatora gazometrycznego krwi (Analizator Roche OMNI C). Morfologię oznaczono na analizatorze hematologicznym Advia 120 (Bayer). Stężenie TC i TG, LDL-C, HDL-C, CPK, LDH, AspAT oznaczono metodą enzymatyczną za pomocą testów firmy bio-Merieux, cholesterol frakcji LDL obliczono ze wzoru Friedewalda. Badania biochemiczne (mocznik, kreatynina, glukoza, kwas moczowy, białko całkowite) wykonano z użyciem analizatora Olympus AU 400. Stężenie jonów sodu, potasu i chlorków w surowicy krwi oznaczono metodą atomowej spektrofotometrii absorpcyjnej przy użyciu aparatu Zeiss AAS-3. Stężenie CRP w surowicy oznaczano w próbach 1-5 nefelometryczną metodą immunoenzymatyczną o wysokiej czułości (od 0,15 mg/l) przy wykorzystaniu aparatu Behring Nephelometer BN II, firmy Dade Behring (Niemcy).

Z prób pełnej krwi pobieranych przed i po operacji (1-5) pozostawiano 100  $\mu$ l do oznaczenia aktywności GPx i stężenia hemoglobiny, a z pozostałej objętości pozyskiwano frakcję erytrocytarną i osocze. Erytrocyty izolowano poprzez czterokrotne przepłukanie 0,5 ml krwi za pomocą 0,9% roztworu NaCl i odwirowując każdorazowo 10 minut przy prędkości 3000 obrotów/min. Do wypłukanych erytrocytów dodawano zimnej wody redestylowanej do uzyskania objętości 2 ml i pozostawiano w temperaturze 4°C przez 15 minut. Lizat rozcieńczono przy użyciu buforu fosforanowego 0,01 mol/l o pH 7,0. W uzyskanych lizatach oznaczano aktywność Cu,Zn-SOD. Próby osocza, które po rozdzieleniu na mniejsze porcje przechowywano w temperaturze -20°C, stanowiły materiał do oznaczenia TAS i FRAP oraz badanych pierwiastków.

Aktywność SOD i GPx oraz poziomy FRAP i TAS mierzono w Katedrze Chemii i Biochemii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu. Stężenia całkowite Mg i Ca w osoczu oznaczono w Pracowni Spektroskopowej Analizy Pierwiastków na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Stężenie Mg i Ca zjonizowanego oznaczono w Zakładzie Chemii Nieorganicznej i Analitycznej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego.

### **5.2.1. Oznaczanie stężenia całkowitego magnezu ( $Mg_{\text{całk}}$ ) i wapnia ( $Ca_{\text{całk}}$ ) w osoczu krwi**

Stężenie  $Mg_{\text{całk}}$  i  $Ca_{\text{całk}}$  w osoczu oznaczono metodą płomieniową atomowej spektrometrii absorpcyjnej z atomizacją w płomieniu (ang.: *Flame Atomic Absorption Spectrometry*, FAAS). W metodzie FAAS przejście od roztworu ciekłego do stanu gazu atomowego odbywa się w dwóch etapach, nebulizacji i atomizacji. Wolne atomy powstające w płomieniu absorbują promieniowanie o długości fali odpowiadającej promieniowaniu emitowanemu przez wzbudzone atomy danego pierwiastka. Źródłem promieniowania absorbowanego przez wolne atomy są lampy emitujące linie rezonansowe oznaczanego pierwiastka. Absorpcja promieniowania zależy od liczby swobodnych atomów w środowisku absorbującym, a więc od całkowitego stężenia analizowanego pierwiastka w próbce.

Próby osocza przed analizą zostały rozcieńczone dziesięciokrotnie ( $Mg_{\text{całk}}$ ) i 30-krotnie ( $Ca_{\text{całk}}$ ) wodą redestylowaną (system oczyszczania wody Smart2PUR firmy TKA, Niemcy). Próby wzorcowe i certyfikowany materiał odniesienia zostały również przygotowane z wykorzystaniem wody destylowanej. Zastosowano certyfikowany materiał referencyjny (Trace Elements in Serum, level 1) firmy LGC Promochem dla standaryzacji metody. Rozcieńczone roztwory badane wprowadzane były do atomizera płomieniowego. Oznaczenia

wykonano na spektrometrze absorpcji atomowej AAnalyst 200 firmy Perkin Elmer (Kanada). Do atomizacji wykorzystano płomień palnika, do którego doprowadzono mieszaninę powietrze/acetylen. Dla oznaczania Mg zastosowano linię rezonansową o długości 202,6 nm, a dla Ca linię o długości 422,7 nm. Oznaczenia  $Mg_{całk}$  i  $Ca_{całk}$  w osoczu oparto na metodzie krzywej wzorcowej, stężenia wyrażono w mmol/l.

### **5.2.1. Oznaczanie stężenia formy zjonizowanej magnezu ( $Mg_i$ ) i wapnia ( $Ca_i$ ) w osoczu krwi.**

Stężenie  $Mg_i$  i  $Ca_i$  w osoczu oznaczono metodą potencjometryczną stosując automatyczny analizator kliniczny Microlyte 6 (Kone Instruments, Espoo, Finlandia), współdziałający online z komputerem.

Metoda wykorzystuje zależność między stężeniem oznaczanego jonu i potencjałem elektrycznym odpowiedniej elektrody wskaźnikowej. Polega na pomiarze siły elektromotorycznej (SEM) ogniwa złożonego z elektrody wskaźnikowej i elektrody porównawczej o stałej wartości potencjału. Elektroda wskaźnikową jest elektroda jonoselektywna, której potencjał zależy linowo od stężenia badanego jonu. Czynną częścią elektrody jest membrana jonowymienna, czuła i selektywna w stosunku do badanego jonu. Analizator jest jonometrem współdziałającym z odpowiednią do oznaczanego pierwiastka elektrodą jonoselektywną (Kone Instruments). Elektroda dla oznaczeń  $Mg_i$  zawierała jonofor ETH 5220 w membranie czulej na jony  $Mg^{2+}$ , a elektroda do oznaczeń  $Ca_i$  zawierała jonofor ETH 5234.

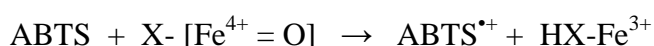
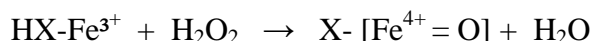
Wszystkie pomiary wykonano w temperaturze 37°C. Uzyskane wyniki pomiarów potencjometrycznych korygowane były zależnie od siły jonowej roztworów i potencjału mostków jonowych przy zastosowaniu równania Debye-Hueckel'a i Hendersona.

Elektroda jonoselektywna dla badanego kationu umieszczana była w kuwecie przepływowej jonometru. Objętość pobieranej do kuwety próby wynosiła 150  $\mu$ l, czas pojedynczego pomiaru wynosił 120 sekund. Jonometr zapewniał trójpunktową kalibrację, a stężenie oznaczanych jonów wyrażano w mmol/l.



### 5.2.3. Oznaczanie całkowitego statusu antyoksydacyjnego TAS.

Test całkowitego statusu antyoksydacyjnego (Total Antioxidant Status, TAS) firmy RANDOX Laboratories, jest analizą dwuodczynnikową stosowaną dla oznaczeń w surowicy lub heparynizowanym osoczu. Podczas inkubacji ABTS (2,2'-Azyno-di-[sulfonian 3-etylbentiazoliny]) z peroksydazą (metmioglobina) i nadtlenkiem wodoru wytwarza się rodnikowy kation ABTS<sup>•+</sup>:



Powstały rodnik ma kolor niebiesko-zielony i jest wykrywany przy długości fali 600 nm. Przeciwtleniacze obecne w próbkach surowicy lub osocza powstrzymują reakcję jego powstawania i pojawiania się niebiesko-zielonego zabarwienia. Stopień tego hamowania jest proporcjonalny do stężenia przeciwutleniaczy w badanej próbce.

W trzech kuwetach umieszczono odpowiednio 20 µl próby, wzorca (kwas 6-hydroksy-2,5,7,8-tetrametylchroman-2-karboksyłowy) i wody podwójnie destylowanej, po czym do każdej z nich dodano po 1 ml chromogenu (metmioglobina i ABTS) i po wymieszaniu 200 µl substratu (nadtlenek wodoru). Po wymieszaniu całości odczytywano wartość absorbancji początkowej ( $A_1$ ) i po trzech minutach ( $A_2$ ) dla próby ślepej, badanej i wzorca przy długości fali 600 nm w temperaturze 37°C względem powietrza. Następnie obliczano zmianę absorbancji:  $A_2 - A_1 = \Delta A$  próby badanej/wzorca/ślepej. Z poniższego wzoru wyznaczono współczynnik:

$$\text{Współczynnik} = \frac{\text{Stężenie wzorca}}{(\Delta A_{\text{śl}} - \Delta A_{\text{w}})}$$

Wartość TAS wyrażano w mmol/l korzystając ze wzoru:

$$\text{TAS (mmol/l)} = \text{współczynnik} \times (\Delta A_{\text{śl}} - \Delta A_{\text{badana}})$$

Aktywność TAS wyrażono w mmol/l.

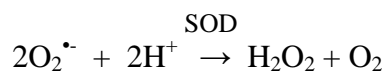
#### 5.2.4. Oznaczanie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD)

Reakcja pomiędzy ksantyną i oksydazą ksantynową (XOD) używana jest do generacji anionorodników ponadtlenkowych ( $O_2^{\bullet-}$ ) i została wykorzystana w zestawie RANSOD firmy RANDOX Laboratories Ltd do oznaczania aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) metodą spektrofotometryczną.

Metoda wykorzystuje ksantynę i oksydazę ksantynową do generowania anionorodnika ponadtlenkowego, który reaguje z 2-(4-jodofenyl)-3-(4-nitrofenol)-5-chlorkiem fenyltetrazoliny (INT) dając czerwony barwnik – formazan:



Obecna w próbie badanej SOD konkuruje z INT katalizując dysmutację anionorodników ponadtlenkowych i osłabiając w ten sposób tworzenie się barwnika formazanowego:



Intensywność zabarwienia badanej próby ulega znacznemu osłabieniu, które zależy od aktywności SOD.

Uzyskany lizat erytrocytów rozcieńczono buforem fosforanowym osiągając ostatecznie współczynnik rozcieńczenia równy 100. W trzech kuwetach umieszczono odpowiednio 50  $\mu$ l próby, wzorca i rozcieńczalnika i dodano do każdej z nich po 1,7 ml substratu (ksantyna i INT), wymieszano i dodano 0,25 ml roztworu oksydazy ksantynowej. Po wymieszaniu całości odczytywano wartość absorbancji początkowej ( $A_1$ ) i po trzech minutach ( $A_2$ ) dla każdej z prób przy długości fali 505 nm względem powietrza w temperaturze 37°C. Korzystając z poniższego wzoru obliczano zmianę absorbancji próbki badanej, wzorca i rozcieńczalnika ( $\Delta A_{p/w/r}$ ) w ciągu minuty:

$$\Delta A_{p/w/r}/\text{min} = (A_2 - A_1)/3$$

W analizowanych próbach wyznaczono stopień hamowania (I) reakcji wyrażony w procentach według wzoru:

$$I = 100\% - [(\Delta A_{p/w}/\text{min}) / (\Delta A_r/\text{min})] \times 100\%$$

Aktywność SOD odczytywano z logarytmicznej krzywej wzorcowej, gdzie x oznacza aktywność enzymu wyrażoną w U/ml lizatu erytrocytów:

$$I \% = f(\log x)$$

Aktywność SOD w pełnej krwi obliczano z iloczynu wartości aktywności zmierzonej w lizacie i współczynnika rozcieńczenia równego 100 i wyrażano w U/ml pełnej krwi:

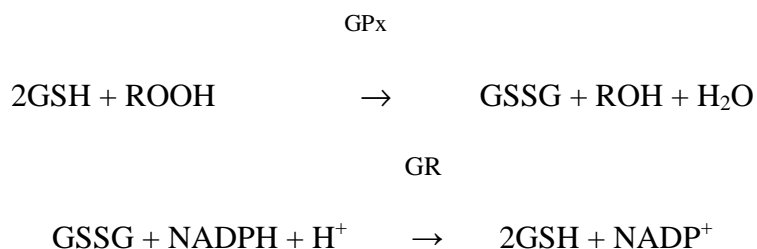
$$\text{U/ml pełnej krwi} = \text{U/ml lizat} \times 100$$

i następnie przeliczano na jednostki aktywności SOD wyrażone na gram hemoglobiny (U/gHb).

Aktywność SOD wyrażono w U/gHb.

### 5.2.5. Oznaczanie aktywności peroksydazy glutationowej (GPx).

Do oznaczenia aktywności GPx wykorzystano zestaw RANSEL firmy RANDOX Laboratories Ltd. opartej na metodzie Paglia i Valentine. Metoda ta opiera się na zdolności GPx do reakcji utleniania glutationu (GSH) do disulfidu glutationu (GSSG) przez wodorotlenek kumenu:



gdzie ROOH – wodoronadtlenek kumenu, GR- reduktaza glutationowa.

Stężenie GPx wyznaczane jest ze spadku absorbancji przy długości fali 340 nm wynikającego z utlenienia NADPH do NADP<sup>+</sup>.

Oznaczenia wykonywano w pełnej krwi. Do prób badanych oraz wzorcowej o objętości 50 µl dodawano 1 ml rozcieńczalnika i po upływie 5 min 1 ml odczynnika hemoglobinianowego. W trzech kuwetach umieszczono odpowiednio 20 µl próby, wzorca i wody destylowanej, następnie dodano do każdej z nich po 1,0 ml odczynnika zawierającego GSH, GR, NADPH<sup>+</sup> w buforze fosforanowym o pH 7,2. Do każdej z kuwet dodano 40µl ROOH. Po wymieszaniu całości odczytywano wartość absorbancji początkowej (A<sub>1</sub>) i po dwóch minutach (A<sub>2</sub>) dla każdej z prób przy długości fali 340 nm względem powietrza w temperaturze 37°C. Korzystając z poniższego wzoru obliczano zmianę absorbancji próbki badanej, wzorca i próby odczynnikowej (ΔA<sub>p/w/o</sub>) w ciągu minuty:

$$\Delta A_{p/w/o}/\text{min} = (A_2 - A_1)/2$$

Zmianę absorbancji próby badanej (ΔA<sub>p</sub>) pomniejszono o wartość uzyskaną dla próby odczynnikowej (ΔA<sub>o</sub>). Aktywność GPx w U/l pełnej krwi obliczono uwzględniając rozcieńczenie (41) próby ze wzoru:

$$\text{GPx (U/l)} = 8412 \times 41 \times \Delta A_{p/w}/\text{min}$$

Aktywność GPx wyrażono w U/l.

#### **5.2.6. Oznaczanie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej na podstawie redukcji jonów żelaza (III) (ang.: *Ferric Reducing Ability of Plasma, FRAP*)**

Test FRAP jest jedną z metod oceny zdolności antyoksydacyjnej nieenzymatycznego systemu obrony płynów biologicznych przed działaniem czynników utleniających, wprowadzonych do badanego układu. Wykorzystuje reakcję, w której antyoksydanty osocza redukują dodane do niego jony Fe<sup>3+</sup> do Fe<sup>2+</sup>, które następnie tworzą barwny kompleks z obecną w roztworze 2,4,6-tripirydylo-S-triazyną (TPTZ). Obserwowany przyrost absorbancji kompleksu TPTZ-Fe<sup>2+</sup> jest proporcjonalny do stężenia antyoksydantów obecnych w próbce.

Roztwór roboczy stosowany do przygotowania krzywej wzorcowej i prowadzenia oznaczeń w badanych próbach osocza zawiera bufor octanowy (0,3 mol/l, pH 3,6), roztwór TPTZ (10 mmol/l w 40 mmol/l HCl) i roztwór FeCl<sub>6</sub>·6H<sub>2</sub>O (20 mmol/l) w proporcji 10:1:1 (v/v/v). Substancją wzorcową jest Troloks, syntetyczny analog tokoferolu (6-hydroksy-2,5,7,8-tetrametylochroman-2-karboksylowy kwas).

Do serii kuwet zawierających 580 µl roztworu roboczego dodaje się odpowiednio 20 µl wody destylowanej (próbna odnośnikowa), do kolejnych po 20 µl roztworu wzorca (1 mmol/l Troloksu w etanolu) o rosnącym stężeniu i do kolejnych po 20 µl prób badanych osocza. Po wymieszaniu całości i 20 minutach inkubacji odczytywano wartość absorbancji (A) każdej z prób przy długości fali 593 nm względem powietrza. Następnie obliczano zmianę absorbancji ( $\Delta A$ ) poszczególnych prób w stosunku do absorbancji próby odnośnikowej. Po wyznaczeniu krzywej wzorcowej zależności  $\Delta A$  od stężenia Troloksu, obliczano jego stężenie ( $c_x$ )

odpowiadające  $\Delta A$  dla badanej próby osocza. Całkowitą zdolność antyoksydacyjną (CZA) obliczano z zależności:

$$CZA = 2 \cdot c_x \cdot 30 \text{ mmol/l}$$

i wyrażano w równoważnikach Troloksu (30 – rozcieńczenie próby osocza).

### 5.3. Analiza statystyczna wyników

Wyniki oznaczeń stężenia  $Mg_{\text{całk}}$  i  $Ca_{\text{całk}}$ ,  $Mg_i$  i  $Ca_i$ , TAS, SOD, GPx, CRP przedstawiono w postaci średniej arytmetycznej i odchylenia standardowego ( $x \pm SD$ ). Korzystając z oprogramowania OpenOffice.org 3.2.1000320m18 utworzono komputerową bazę danych, do której wpisano wartości parametrów źródłowych. Program ten służył także do oceny poprawności zgromadzonych danych. W analizie statystycznej posłużono się pakietem StatSoft Inc. (2011) STATISCTICA (data analysis software system), version 10.0, [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com). Przed wykonaniem analiz statystycznych zweryfikowano hipotezę normalności rozkładu ocenianych zmiennych ilościowych za pomocą testu Shapiro-Wilka i Kołomogorowa-Smirnowa. W prezentacji danych jako miarę skupienia wybrano średnią arytmetyczną, jako miarę rozproszenia- odchylenie standardowe.

Uzyskane wyniki testowano z wykorzystaniem analizy wariancji dla pomiarów powtarzanych lub jej nieparametrycznego odpowiednika- testu Friedmana dla zmiennych powiązanych, testu Kruskala-Wallisa dla zmiennych niepowiązanych. W ocenie przyporządkowania do grupy badanej (stopień niedokrwienia: IIB, III; czas niedokrwienia:  $t \geq 12$  h,  $t < 12$  h; rodzaju zabiegu) wykorzystano test U Manna-Whitneya. W analizie cech jakościowych stosowano test  $\chi^2$  z poprawką na ciągłość oraz test dokładny Fishera. Jako kryterium istotności statystycznej przyjęto wartość  $p < 0,05$ . Jako miarę powiązania cech ilościowych zastosowano współczynnik korelacji prostoliniowej r-Pearsona lub rangowej Spearmana.

Poddane analizie statystycznej wyniki przedstawiono w postaci rycin, w których użyto średnią arytmetyczną oraz 95% przedziały ufności.

## 6. Wyniki.

Wśród pacjentów leczonych w Klinice Chirurgii Ogólnej i Naczyń z powodu ostrego niedokrwienia kończyn dolnych 3 pacjentów w momencie przyjęcia nie miało wyczuwalnego tętna na obu tętnicach udowych wspólnych, 27 pacjentów- jednostronnie na tętnicy udowej wspólnej i 22 pacjentów- jednostronnie na tętnicy podkolanowej.

Wszyscy pacjenci w obu grupach mieli ból spoczynkowy. Zaburzenia czucia o umiarkowanym stopniu nasilenia występowały u wszystkich pacjentów w stopniu zaawansowania IIB (n=34, 100%), natomiast zniesienie czucia powierzchownego zanotowano u wszystkich pacjentów z III stopniem zaawansowania (n=18, 100%). Osłabienie mięśni zaobserwowano u wszystkich pacjentów ze stopniem zaawansowania IIB (n=34, 100%) oraz u 4 pacjentów (22,22%) z III stopniem zaawansowania, a u pozostałych 14 pacjentów (77,78%) zanotowano duże osłabienie mięśni lub stężenie. Żaden pacjent z grupy II B nie miał objawów martwicy tkanek, natomiast 4 pacjentów (22,22%) z grupy III miało plamy opadowe.

Częstość występowania zaburzeń gospodarki kwasowo-zasadowej w zależności od stopnia i czasu ostrego niedokrwienia badanych po przyjęciu do Kliniki Chirurgii Ogólnej i Naczyń przedstawia tabela 5.

U wszystkich pacjentów w grupie badanej stwierdzono wykładniki kwasicy metabolicznej w gazometrii krwi włośniczkowej. Średnie stężenie pH przed zabiegiem wynosiło  $7,30 \pm 0,376$ ,  $\text{HCO}_3^-$   $18 \pm 3,79$  mmol/l, a  $\text{pCO}_2$   $27 \pm 4,13$  mmHg. Analiza gazometrii w trakcie leczenia ostrego niedokrwienia kończyn nie wykazała znamiennych statystycznie różnic w powyższych parametrów, co może mieć związek z intubacją i mechaniczną wentylacją pacjentów w czasie znieczulenia oraz intensywnym wyrównywaniem zaburzeń równowagi kwasowo-zasadowej w okresie pooperacyjnym. Wykładniki kwasicy metabolicznej niewyrównanej występowały częściej wśród pacjentów z III stopniem niedokrwienia (100%), natomiast w stopniu niedokrwienia II B 58,82% pacjentów miało całkowicie wyrównaną kwasotę metaboliczną, a reszta częściowo wyrównaną. Zaobserwowano także wpływ czasu niedokrwienia na ciężkość zaburzeń gospodarki kwasowo zasadowej. U 21 pacjentów (95,50%), dla których czas między wystąpieniem objawów a zabiegiem operacyjnym wynosił powyżej 12 godzin ( $t > 12$  h) stwierdzono niewyrównaną kwasotę metaboliczną. Po zabiegu operacyjnym powyższe wartości utrzymywały się w granicach normy, co było wynikiem zastosowanego leczenia i wyrównywania zaburzeń gospodarki kwasowo-zasadowej.

Tabela 5. Częstość występowania zaburzeń gospodarki kwasowo-zasadowej w zależności od stopnia i czasu ostrego niedokrwienia badanych po przyjęciu do Kliniki Chirurgii Ogólnej i Naczyń.

		IIB (n=34)	III (n=18)	t<12 h	t>12 h
IIB (n=34)		-----	-----	24 (70,59%)	10 (29,41%)
III (n=18)		-----	-----	6 (33,33%)	12 (66,67%)
pH	N	20 (58,82%)*	0	8 (26,67%)	1 (4,50%)
	pH<7,35	14 (41,18%)	18 (100%)*	22 (73,33%) *	21 (95,50%) *
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mmol/l)	N	0	5 (27,78%)	0	0
	↓	34 (100%)*	13 (72,22%) *	30 (100%)*	22 (100%)*
pCO <sub>2</sub> (mmHg)	N	0	18 (100%)*	22 (73,33%)*	21 (95,50%)*
	↓	34 (100%)*	0	8 (26,67%)	1 (4,50%)

Legenda:

N- wartości referencyjne

pH: N 7,35-7,45

HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (mmol/l): N 21-27

pCO<sub>2</sub> (mmHg): N 32-45

\*- istotność statystyczna p<0,05

Średnie stężenia wybranych parametrów laboratoryjnych przed zabiegiem operacyjnym przedstawia tabela 6.

Średnie stężenie kreatyniny w grupie badanej przed zabiegiem operacyjnym było powyżej wartości referencyjnych i wynosiło  $138,00 \pm 37,000 \mu\text{mol/l}$ , natomiast w stopniu niedokrwienia IIB  $101,54 \pm 29,000 \mu\text{mol/l}$ , a III  $159,14 \pm 33,000$ . Po zabiegu operacyjnym w stopniu niedokrwienia III stężenie kreatyniny było wyższe niż w stopniu IIB, ale nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic. W stopniu niedokrwienia III w czasie kolejnych oznaczeń (2-5) badanych po zabiegu operacyjnym średnie stężenie kreatyniny było najwyższe po 12 godzinach i wynosiło  $164,45 \pm 47,575 \mu\text{mol/l}$ , następnie stężenie kreatyniny normalizowało się i po 48 godzinach wynosiło średnio  $119,18 \pm 14,523 \mu\text{mol/l}$ .

U pacjentów w stopniu II B niedokrwienia po zabiegu operacyjnym średnie stężenie kreatyniny w kolejnych oznaczeniach było z zakresie normy.

W obu grupach obserwowano w trakcie leczenia ostrego niedokrwienia leukocytozę, która była wyższa w stopniu III, jednakże nie była znamienna statystycznie.

Średnie stężenia hemoglobiny przed zabiegiem operacyjnym w stopniu IIB wynosił  $9,32 \pm 2,043 \text{ mmol/l}$ , a w III wynosiło  $8,40 \pm 1,817 \text{ mmol/l}$ . W czasie zabiegu operacyjnego ani w okresie pooperacyjnym nie zaobserwowano istotnego statystycznie spadku stężenia hemoglobiny w obu stopniach niedokrwienia ani różnicy pomiędzy tymi grupami. Żaden pacjent po zabiegu operacyjnym nie miał laboratoryjnych ani klinicznych wskazań do przetoczenia preparatów krwiopochodnych.

Średnie aktywności dehydrogenazy mleczanowej (LDH), kinazy fosfokreatynowej (CPK), aminotransferazy asparaginianowej (AST), aminotransferazy alaninowej (ALT) oraz średnie stężenia cholesterolu całkowitego (T-Chol), cholesterolu we frakcji LDL (LDL-Chol), kwasu moczowego i kwasu mlekowego przed zabiegiem operacyjnym zostały również przedstawione w tabeli 6. Po zabiegu operacyjnym monitorowano aktywność CPK, LDH, AST, ALT oraz stężenie kwasu mlekowego i obserwowano w obu grupach klinicznego zaawansowania ich powolny spadek, który nie był statystycznie istotny.



Tabela 6. Średnie stężenia lub średnia aktywność wybranych parametrów laboratoryjnych przed zabiegiem operacyjnym w zależności od stopnia niedokrwienia.

	IIB n=34 (średnia ± odchylenie standardowe )	III n=18 (średnia ± odchylenie standardowe )	Grupa badana n=52 (średnia ± odchylenie standardowe )	Wartości referencyjne
Kreatynina (μmol/l)	101,54 ± 29,000	159,14 ± 33,000	138,00 ± 37,000	53-115
Kwas moczowy (mg/dl)	6,90 ± 2,980	7,80 ± 1,990	6,45 ± 3,140	3-7
Kwas mlekowy (mmol/l)	2,20 ± 0,346	2,52 ± 0,327	2,40 ± 0,278	0,5-1,5
LDH (IU/l)	510 ± 203,430	607, 00 ± 198,000	550,00 ± 178,000	< 480
CPK (IU/l)	182 ± 23,130	202 ± 37,420	198 ± 31,760	u mężczyzn 24-195 u kobiet 24-170
AST (IU/l)	72 ± 14,000	101 ± 15,500	89 ± 23,200	< 40
ALT (IU/l)	48 ± 13,500	52 ± 9,000	49 ± 10,500	< 40
T-Chol (mmol/l)	5,10 ± 0,990	5,76 ± 1,128	5,80 ± 1,700	3,0-5,2
LDL-chol (mmol/l)	2,48 ± 0,410	2,66 ± 0,326	2,50 ± 0,456	<2,6
INR	1,80 ± 0,451	1,59 ± 0,387	1,70 ± 0,342	0,85-1,15
PT (s)	28,00 ± 7,328	23,00 ± 6,195	20,00 ± 5,000	12-16
WBC (/μl)	9013,00 ± 3514,000	13200,00 ± 4400,000	9800,00 ± 3769,000	4000-10000
HGB (mmol/l)	9,32 ± 2,043	8,40 ± 1,817	8,50 ± 2,140	8,7-11,2

U 49 pacjentów leczonych operacyjnie uzyskano ustąpienie objawów ostrego niedokrwienia i przywrócenie ukrwienia kończyny: w tym u 39 pacjentów osiągnięto całkowitą poprawę przepływu, a u 10 pacjentów, czyli 19%, uzyskano częściową poprawę przepływu, co było związane ze współistniejącymi zmianami miażdżycowymi w odcinku obwodowym tętnic kończyn dolnych. U trzech pacjentów, u których podjęto próbę trombektomii oraz wykonano jednoczasową rekonstrukcję tętnic kończyn dolnych, po 24-48 godzinach od pierwotnego zabiegu ze względu na zaawansowane zmiany niedokrwienne i brak możliwości dalszej rekonstrukcji z powodu miażdżycy obwodowej lub zakrzepicy, wykonano amputację podudzia (1 pacjent) oraz uda (2 pacjentów).

Trzech pacjentów, którzy byli przyjęci do KChOiN z objawami ostrego niedokrwienia obu kończyn dolnych z powodu zatoru rozwidlenia aorty, zmarło w pierwszej dobie po zabiegu operacyjnym w Klinice Intensywnej Terapii w obrazie niewydolności wielonarządowej w przebiegu zespołu reperfuzji.

Wybrane parametry kliniczne i biochemiczne zostały zanalizowane i porównane w grupach klinicznego zaawansowania (IIB i III), w zależności od czasu trwania ostrego niedokrwienia ( $t < 12$  h i  $t \geq 12$  h) oraz rodzaju zabiegu (pacjenci podani embolektomii tętnic kończyn dolnych i pacjenci poddani trombektomii z jednoczasowym udrożnieniem lub operacją rekonstrukcyjną tętnic kończyn dolnych).

## **6.1. Analiza wyników w zależności od stopnia niedokrwienia: IIB i III w trakcie leczenia ostrego niedokrwienia kończyn.**

### **6.1.1. Stężenie wybranych pierwiastków: $Mg_{całk}$ i $Mg_i$ , $Ca_{całk}$ i $Ca_i$ , Na i K w trakcie leczenia ostrego niedokrwienia kończyn.**

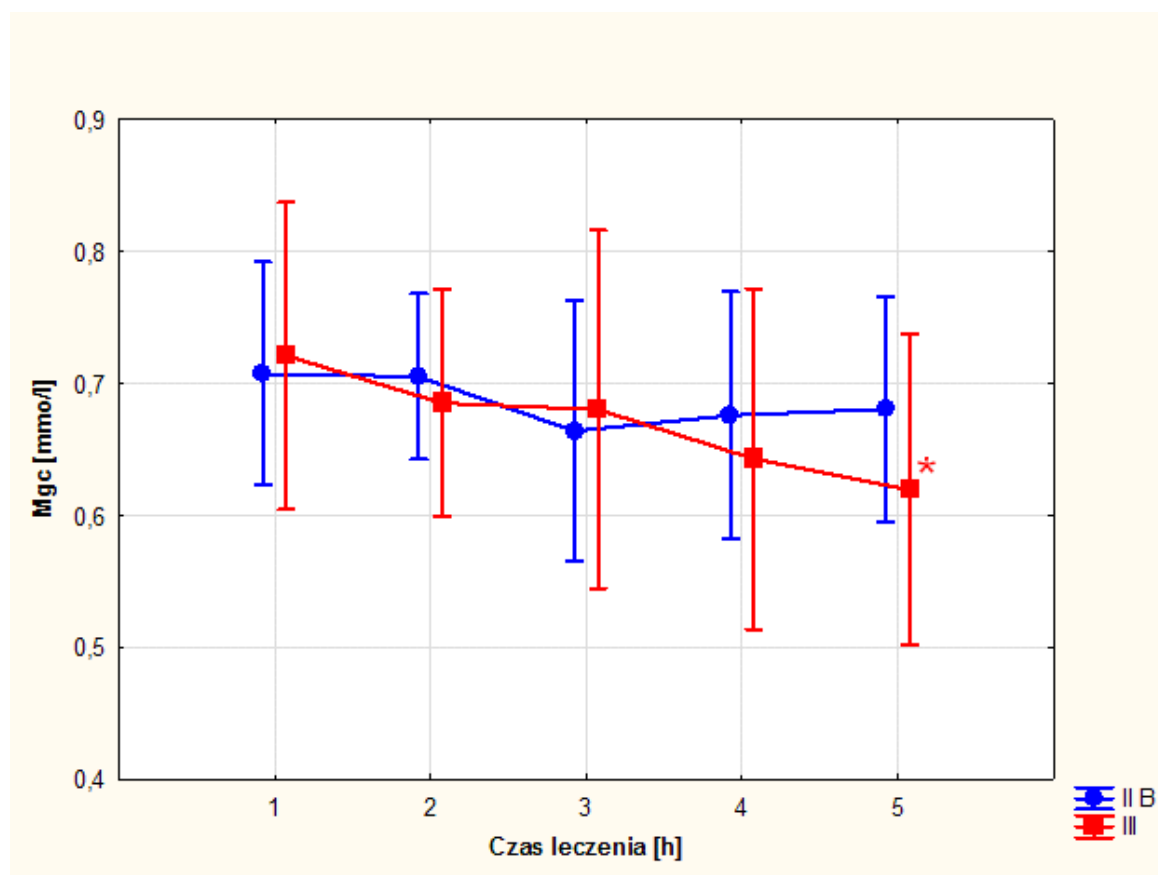
#### **6.1.1.1. Stężenie $Mg_{całk}$ i $Mg_i$ .**

Średnie stężenia  $Mg_{całk}$  i  $Mg_i$  w trakcie leczenia ostrego niedokrwienia kończyn dolnych w zależności od stopnia niedokrwienia zostały przedstawione na rycinie 3 i rycinie 4.

W stopniu niedokrwienia IIB średnie stężenie  $Mg_{całk}$  przed zabiegiem operacyjnym wynosiło  $0,70 \text{ mmol/l} \pm 0,16$ , natomiast w stopniu III  $0,73 \text{ mmol/l} \pm 0,16$ . W czasie leczenia w stopniu niedokrwienia IIB stężenie  $Mg_{całk}$  utrzymywało się na niskim poziomie i nie wykazano istotnych zmian stężenia tego pierwiastka. Natomiast w III stopniu niedokrwienia zanotowano istotny statystycznie spadek między stężeniem  $Mg_{całk}$  przed zabiegiem operacyjnym a po 48 godzinach od zabiegu operacyjnego ( $p=0,040$ ).

W stopniu IIB zanotowano istotny statystycznie wzrost stężenia  $Mg_i$  po 24 h od zabiegu operacyjnego w stosunku do pierwszego pobrania ( $p=0,030$ ). Ponadto po 24 h od zabiegu operacyjnego różnica między stężeniami  $Mg_i$  w grupach IIB i III była istotna statystycznie ( $p=0,019$ ).

Rycina 3. Stężenie  $Mg_{całk}$  przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia (IIB i III).



Legenda:

Czas obserwacji (objaśnienie dotyczy wszystkich rycin w rozdziale Wyniki):

1 - po przyjęciu do szpitala a przed zabiegiem operacyjnym, 2 - po 30-40 minutach od rewaskularyzacji, 3 - po 12 godzinach od rewaskularyzacji, 4 - po 24 godzinach od rewaskularyzacji, 5 - po 48 godzinach od rewaskularyzacji.

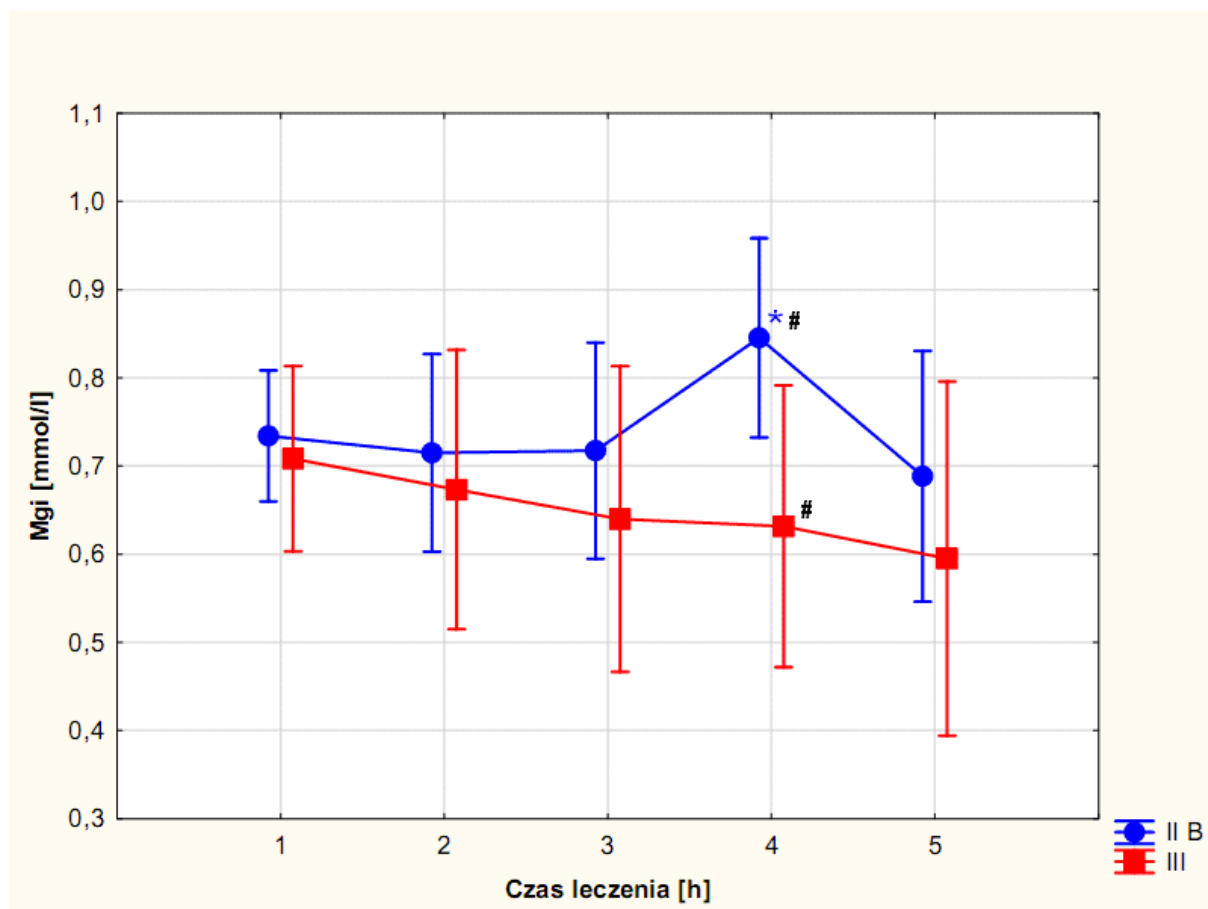
Grupa badana:

IIB - pacjenci ze stopniem klinicznego zaawansowania ostrego niedokrwienia kończyn dolnych IIA.

III - pacjenci ze stopniem klinicznego zaawansowania ostrego niedokrwienia kończyn dolnych III.

\* - istotność statystyczna między 5 a 1 pomiarem w grupie III (test Friedmana i wielokrotnych porównań,  $p < 0,05$ )

Rycina 4. Stężenie  $Mg_i$  przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia (IIB i III).



Legenda:

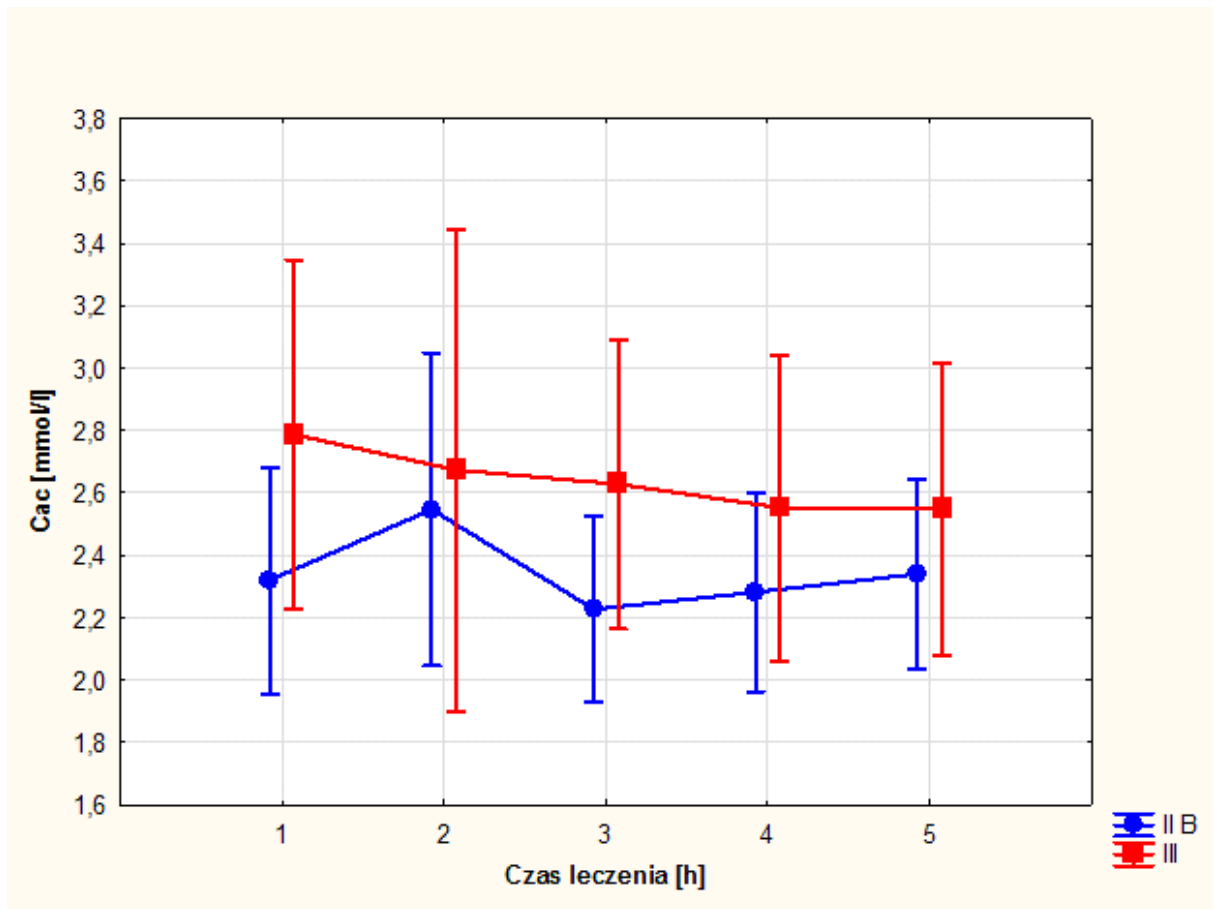
\* - istotność statystyczna między 4 a 1 pomiarem w grupie IIB (test Friedmana i wielokrotnych porównań,  $p < 0,05$ ).

# - istotność statystyczna między stężeniami  $Mg_i$  w obu grupach: IIB i III w pomiarze 4 (Test U Manna-Whitneya,  $p < 0,05$ ).

### 6.1.1.2. Stężenie $Ca_{całk}$ i $Ca_i$ .

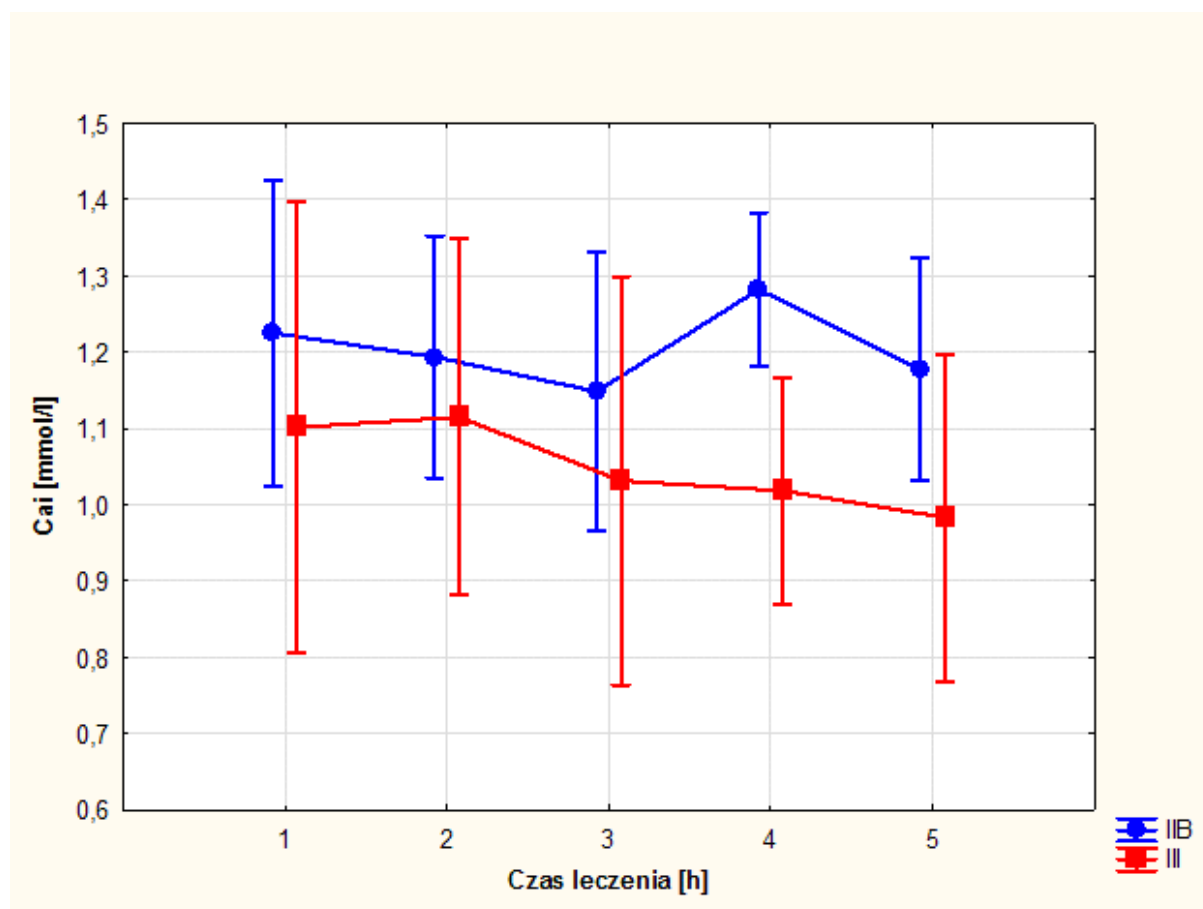
Zmiany stężenia  $Ca_{całk}$  i  $Ca_i$  w trakcie leczenia ostrego niedokrwienia kończyn dolnych w zależności od stopnia niedokrwienia zostały przedstawione na rycinie 5 i 6.

Rycina 5. Stężenie  $Ca_c$  przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia (IIB i III).



Średnie stężenie  $Ca_{całk}$  przed zabiegiem wyniosło  $2,31 \pm 0,57$  mmol/l w stopniu niedokrwienia II B, a  $2,79 \pm 0,86$  mmol/l w stopniu III. Nie odnotowano istotnych statystycznie zmian stężenia  $Ca_{całk}$  w obu grupach w kolejnych pięciu pobraniach, ani pomiędzy grupami. Średnie stężenie  $Ca_i$  przed zabiegiem wyniosło  $1,21 \pm 0,32$  mmol/l w stopniu niedokrwienia II B, a  $1,15 \pm 0,27$  mmol/l w stopniu III. Nie odnotowano istotnych statystycznie zmian stężenia  $Ca_i$  w obu grupach w kolejnych pięciu pobraniach, ani pomiędzy grupami.

Rycina 6. Stężenie  $Ca_i$  przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia (IIB i III).



### 6.1.1.3. Stężenia Na i K.

Zmiany stężenia Na i K w trakcie leczenia ostrego niedokrwienia kończyn dolnych w zależności od stopnia niedokrwienia zostały przedstawione na rycinie 7 i 8.

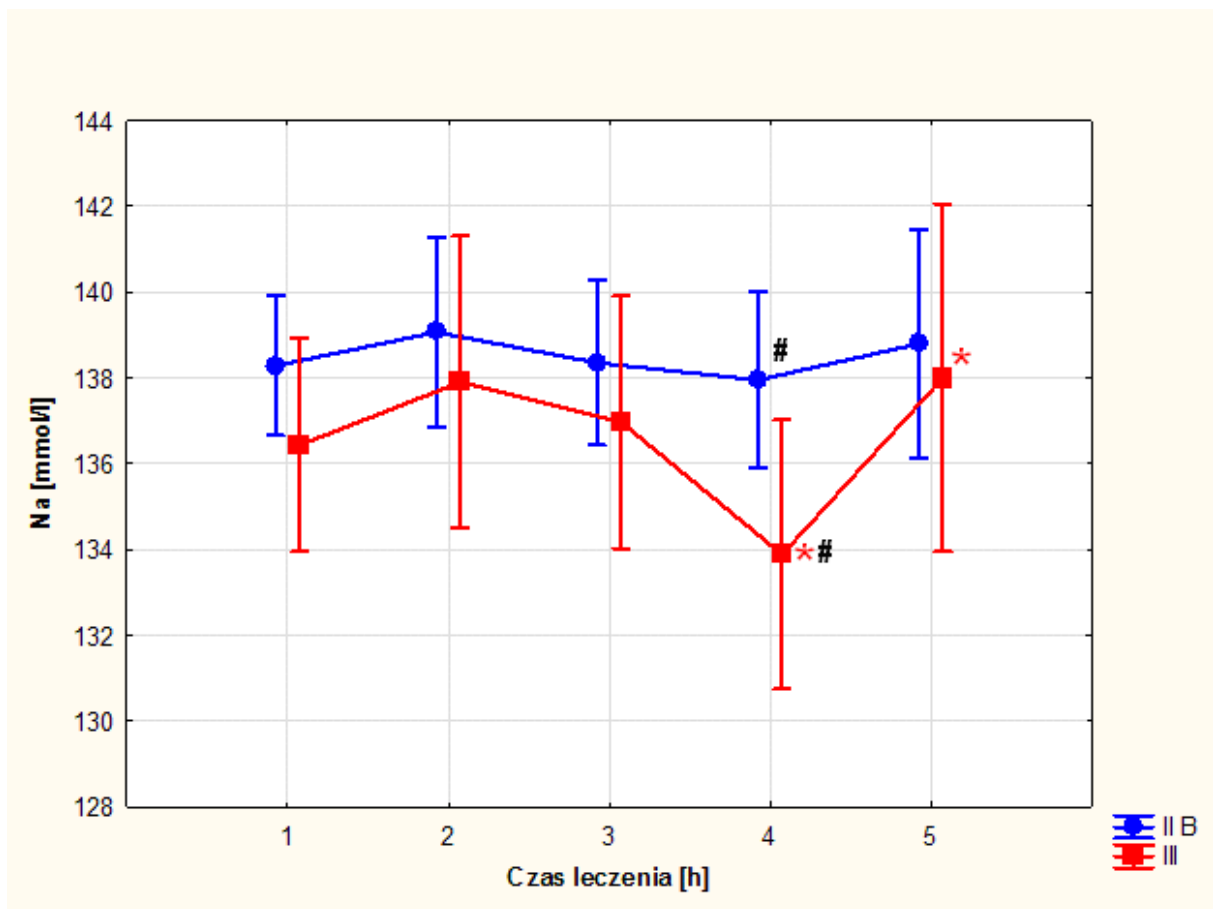
Ocena zmian stężenia jonów sodu i potasu jest trudna do interpretacji, ponieważ w trakcie leczenia ostrego niedokrwienia kończyn dolnych powyższe pierwiastki są monitorowane i wyrównywane.

Średnie stężenia Na w stopniu niedokrwienia IIB znajdowały się w zakresie referencyjnym i nie zanotowano istotnych statystycznie zmian jego stężenia w trakcie leczenia ostrego niedokrwienia kończyn dolnych.

W III stopniu niedokrwienia zanotowano statystycznie znamienne spadki stężenia Na po 24 h w porównaniu ze stężeniem Na po zabiegu operacyjnym, a następnie wzrost po 48 h od zabiegu operacyjnego (odpowiednio  $p=0,017$  i  $p=0,015$ ), chociaż stale utrzymywało się w zakresie wartości referencyjnych. Dodatkowo różnica stężeń jonów Na pomiędzy obiema grupami po 24 h było istotne statystycznie ( $p=0,032$ ).

W stopniu niedokrwienia IIB średnie stężenie K w surowicy wyniosło  $4,57 \pm 0,74$  mmol/l przed zabiegiem operacyjnym. W III stopniu średnie stężenie jonów K wyniosło  $4,86 \pm 0,72$  mmol/l przed zabiegiem operacyjnym. W kolejnych oznaczeniach zauważono nieistotny statystycznie spadek stężenia jonów K, który po 48 h wyniósł w stopniu niedokrwienia IIB średnio  $4,26 \pm 0,96$  mmol/l, a w stopniu III wyniósł średnio  $4,26 \pm 0,55$  mmol/l.

Rycina 7. Stężenie Na przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia (IIB i III).



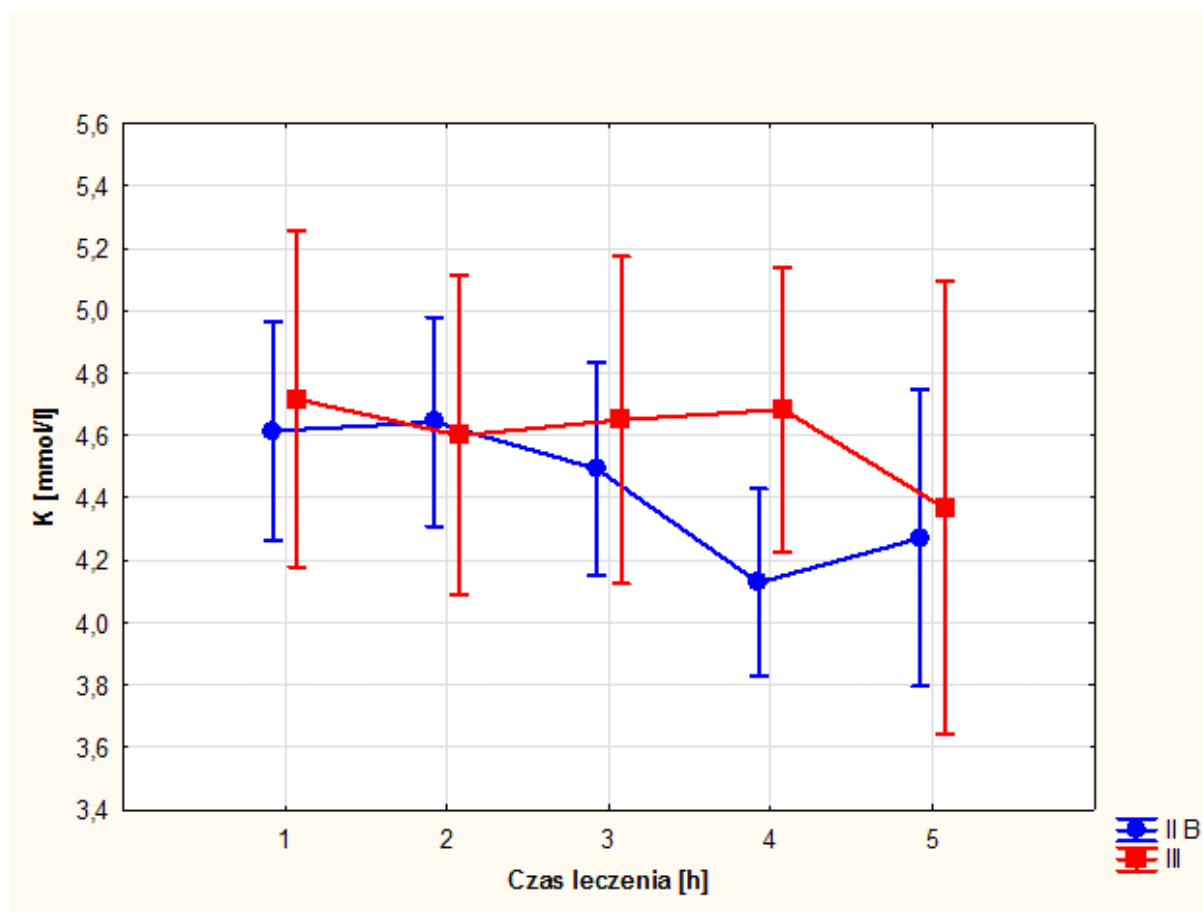
Legenda:

\* - istotność statystyczna między 4 a 2 oraz 5 i 4 pomiarem w grupie III (test Friedmana i wielokrotnych porównań,  $p < 0,05$ ).

# - istotność statystyczna między stężeniami Na w obu grupach: IIB i III w pomiarze 4 (Test U Manna-Whitneya,  $p < 0,05$ ).



Rycina 8. Stężenie K przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia (IIB i III).



### 6.1.2. Aktywność SOD i GPx, wartości TAS i FRAP oraz stężenie CRP w trakcie leczenia ostrego niedokrwienia kończyn.

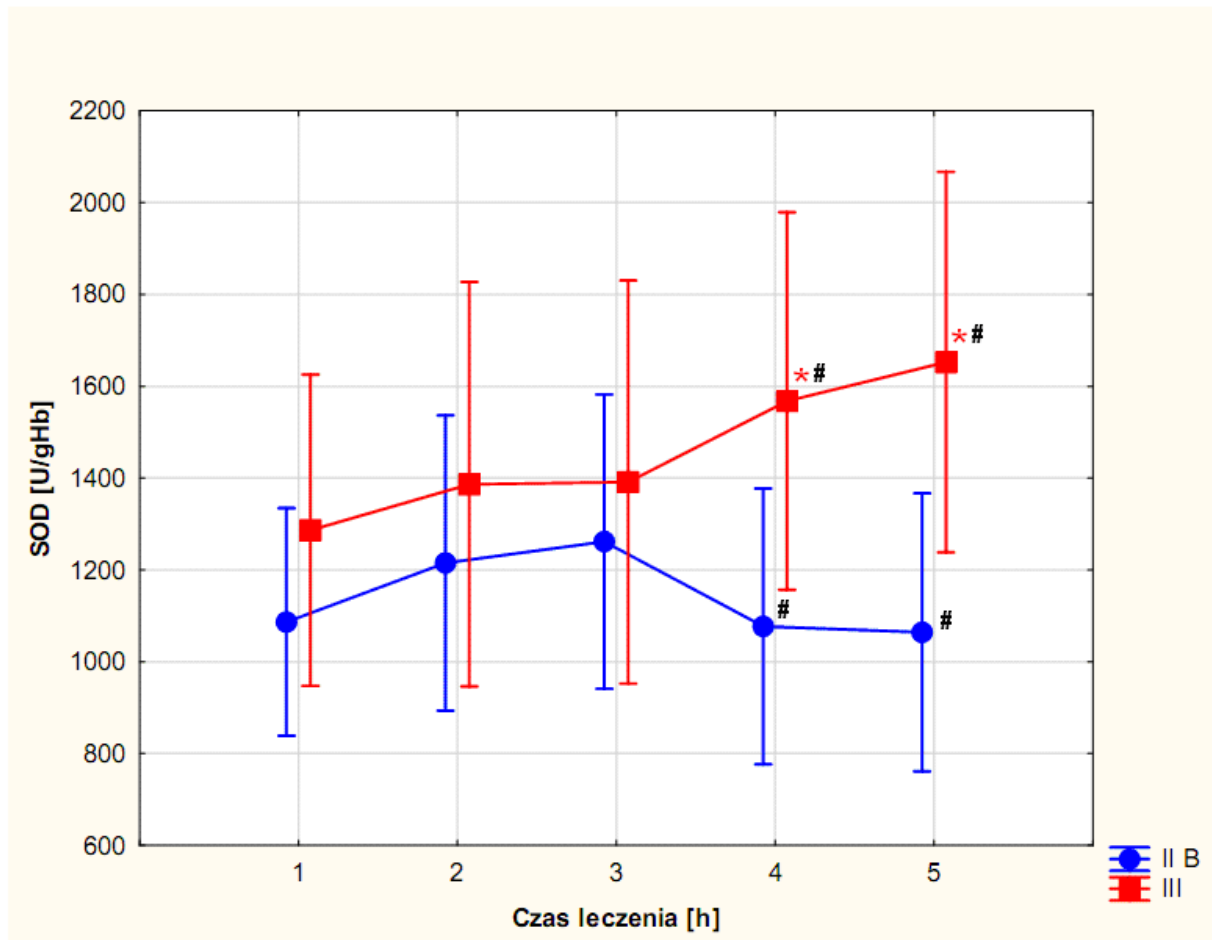
#### 6.1.2.1. Aktywność SOD.

Aktywność SOD w trakcie leczenia ostrego niedokrwienia kończyn dolnych w zależności od stopnia niedokrwienia zostały przedstawione na rycinie 9.

W stopniu niedokrwienia II B aktywność SOD utrzymywała się na dolnej granicy wartości referencyjnych, a zmiany aktywności SOD w trakcie leczenia ostrego niedokrwienia kończyn dolnych nie różniły się statystycznie.

Natomiast w III stopniu zanotowano istotny statystycznie wzrost aktywności SOD po 24 i 48 godzinach (odpowiednio  $p=0,049$  i  $p=0,010$ ). Ponadto wykazano znamienne statystycznie różnicę w aktywności SOD po 24 i 48 h od leczenia operacyjnego pomiędzy stopniami niedokrwienia: IIB i III ( $p=0,010$ ).

Rycina 9. Aktywność SOD przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia (IIB i III).



Legenda:

\* - istotność statystyczna między 4 a 1, 5 a 1 pomiarem w grupie III (test Friedmana i wielokrotnych porównań,  $p < 0,05$ ).

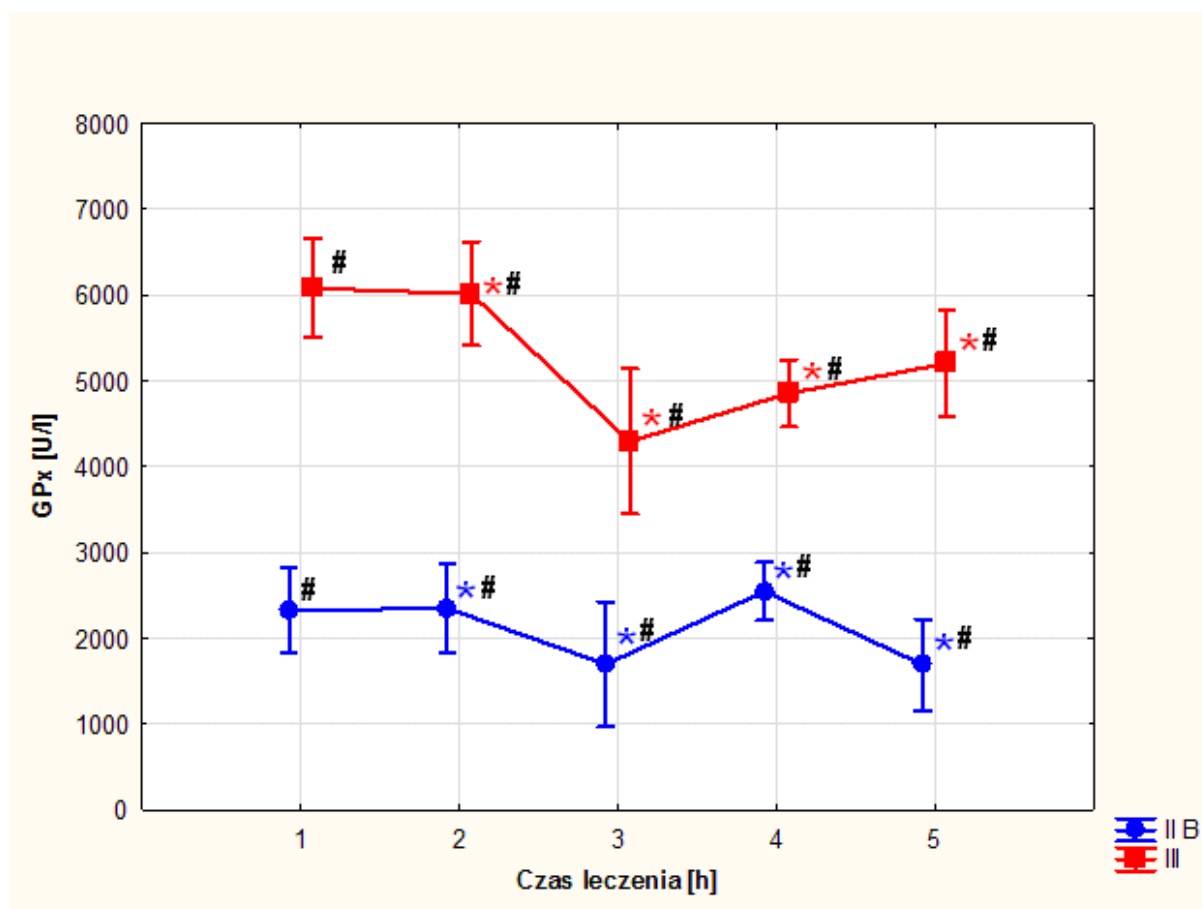
# - istotność statystyczna między stężeniami SOD w obu grupach: IIB i III w pomiarze 4 i 5 (Test U Manna-Whitneya,  $p < 0,05$ ).

### 6.1.2.2. Aktywność GPx.

Aktywność GPx w trakcie leczenia ostrego niedokrwienia kończyn dolnych w zależności od stopnia niedokrwienia zostały przedstawione na rycinie 10.

Analiza aktywności GPx w trakcie leczenia ostrego niedokrwienia przedstawiona graficznie na rycinie 9 wykazała znamienne statystycznie różnice w jej aktywności w każdym kolejnym pobraniu. W przeciwieństwie do III stopnia niedokrwienia zmiany stężenia GPx w stopniu niedokrwienia IIB utrzymywały się poniżej wartości referencyjnych.

Rycina 10. Aktywność GPx przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia (IIB i III).



Legenda:

\* - istotność statystyczna między 1 a 3, 4, 5; 2 a 3, 4, 5; 3 a 1, 2, 4; 4 a 1, 2, 3, 5; 5 a 1, 2, 4 pomiarem w grupie IIB (test Friedmana i wielokrotnych porównań,  $p < 0,05$ ).

\* - istotność statystyczna między 1 a 3; 2 a 3; 4 a 1, 5 a 1 pomiarem w grupie III (test Friedmana i wielokrotnych porównań,  $p < 0,05$ ).

# - istotność statystyczna między stężeniami GPx w obu grupach: IIB i III w pomiarach: 1 ( $p=0,0000$ ), 2 ( $p=0,0000$ ), 3 ( $p=0,0003$ ), 4 ( $p=0,0000$ ) i 5 ( $p=0,0000$ ). Test U Manna-Whitneya,  $p < 0,05$ .

### **6.1.2.3. Wartości TAS.**

Wartości TAS w trakcie leczenia ostrego niedokrwienia kończyn dolnych w zależności od stopnia niedokrwienia zostały przedstawione na rycinie 11.

Wartość TAS w stopniu niedokrwienia IIB spadała poniżej wartości referencyjnych. Średnia wartość TAS w stopniu IIB przed zabiegiem operacyjnym wynosiła  $1,50 \pm 0,43$  mmol/l. Istotny statystycznie spadek wartości TAS zaobserwowano w każdym następnym pobraniu: po 30-40 minutach oraz 12, 24, 48 h od zabiegu operacyjnego i wynosił on średnio odpowiednio:  $1,38 \pm 0,34$  mmol/l ( $p=0,001$ ),  $1,27 \pm 0,270$  mmol/l ( $p=0,001$ ),  $1,27 \pm 0,33$  mmol/l ( $p=0,001$ ) i  $1,24 \pm 0,25$  mmol/l ( $p=0,001$ ).

Średnia wartość TAS w III stopniu niedokrwienia przed zabiegiem operacyjnym wynosiła  $1,63 \pm 0,35$  mmol/l. W stopniu III znamienne statystycznie spadki wartości TAS zanotowano 30-40 minut i 12 h po zabiegu operacyjnym i wynosiły one średnio  $1,48 \pm 0,35$  ( $p=0,012$ ) i  $1,49 \pm 0,27$  ( $p=0,011$ ). Następnie wartość TAS po 24 h wzrosła istotnie statystycznie do  $1,77 \pm 0,39$  mmol/l ( $p=0,0010$ ), a po 48 h pojawił się istotny statystycznie spadek wartości TAS:  $1,60 \pm 0,31$  mmol/l ( $p=0,0014$ ).

Dodatkowo wykazano istotne między stopniami niedokrwienia IIB i III a zmianami wartości TAS po 24 i 48 h od zabiegu operacyjnego (odpowiednio  $p=0,0005$   $p=0,0007$ ).

Zaobserwowano dodatnią korelację pomiędzy wartością TAS a stopniem klinicznego zawansowania ONK ( $r = 0,3256$ ,  $p = 0,0037$ ) przed zabiegiem operacyjnym. Po 24 godzinach od rewaskularyzacji współczynnik korelacji wynosił  $r=0,2865$ ,  $p=0,005$  oraz po 48 godzinach-  $r=0,3113$ ,  $p=0,004$ .

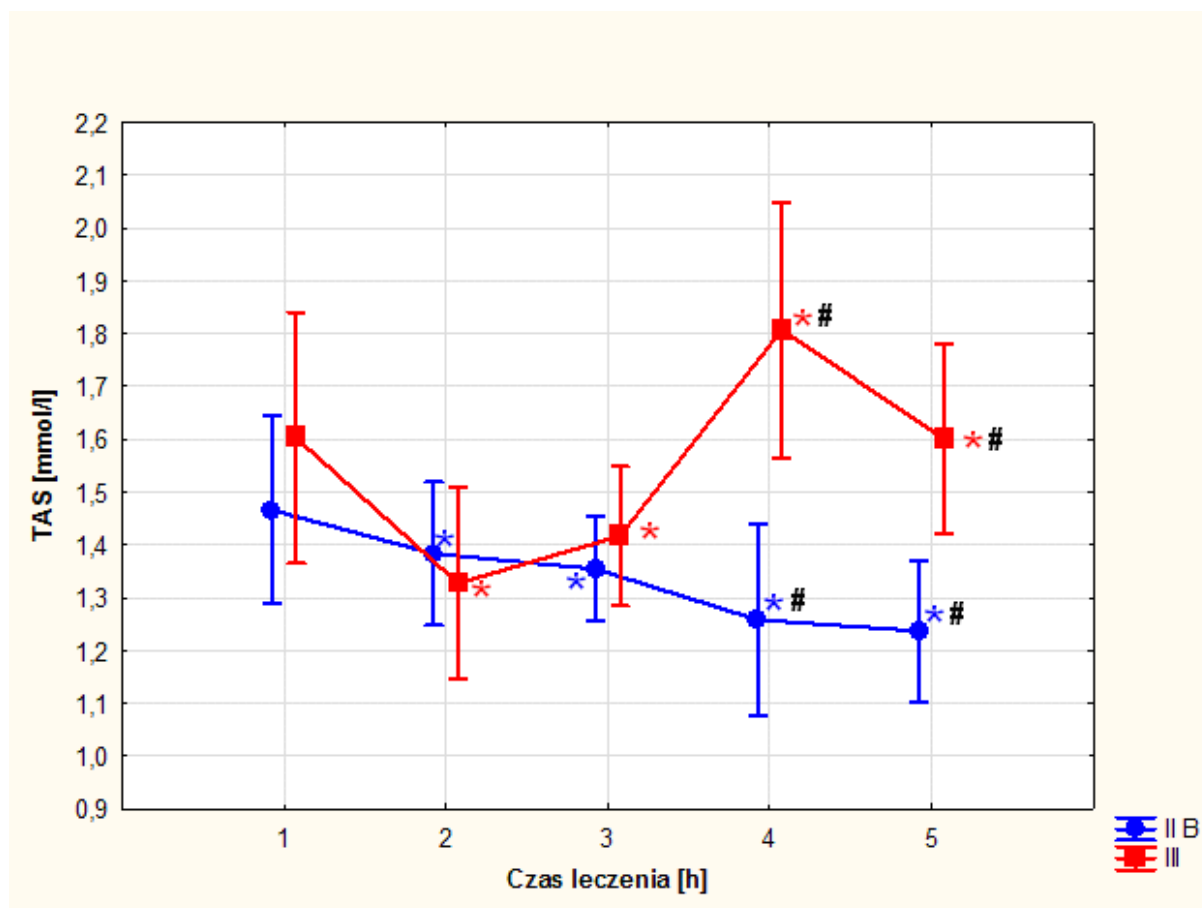
### **6.1.2.4. Wartość FRAP.**

Wartość FRAP w trakcie leczenia ostrego niedokrwienia kończyn dolnych w zależności od stopnia niedokrwienia zostały przedstawione na rycinie 12.

W stopniu niedokrwienia IIB obserwowano stały spadek wartości FRAP, przy czym po 24 i 48 h od zabiegu operacyjnego był on istotny. Przed zabiegiem operacyjnym wartość FRAP wynosiła średnio  $47,14 \pm 14,40$  mmol/l. Po 24 h i 48 h zanotowano znamienne statystycznie spadki wartości FRAP do średniej wartości odpowiednio  $44,61 \pm 9,36$  mmol/l ( $p=0,029$ ) oraz  $44,08 \pm 12,21$  mmol/l ( $p=0,047$ ) w porównaniu z wyjściową wartością. W III stopniu niedokrwienia wartość FRAP rosła, ale powyższa tendencja nie była znamienna statystycznie. Jednocześnie po 24 i 48 godzinach od zabiegu operacyjnego zaobserwowano istotne

statystycznie różnice wartości FRAP pomiędzy obiema grupami (odpowiednio  $p=0,027$  i  $p=0,046$ ).

Rycina 11. Wartość TAS przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia (IIB i III).



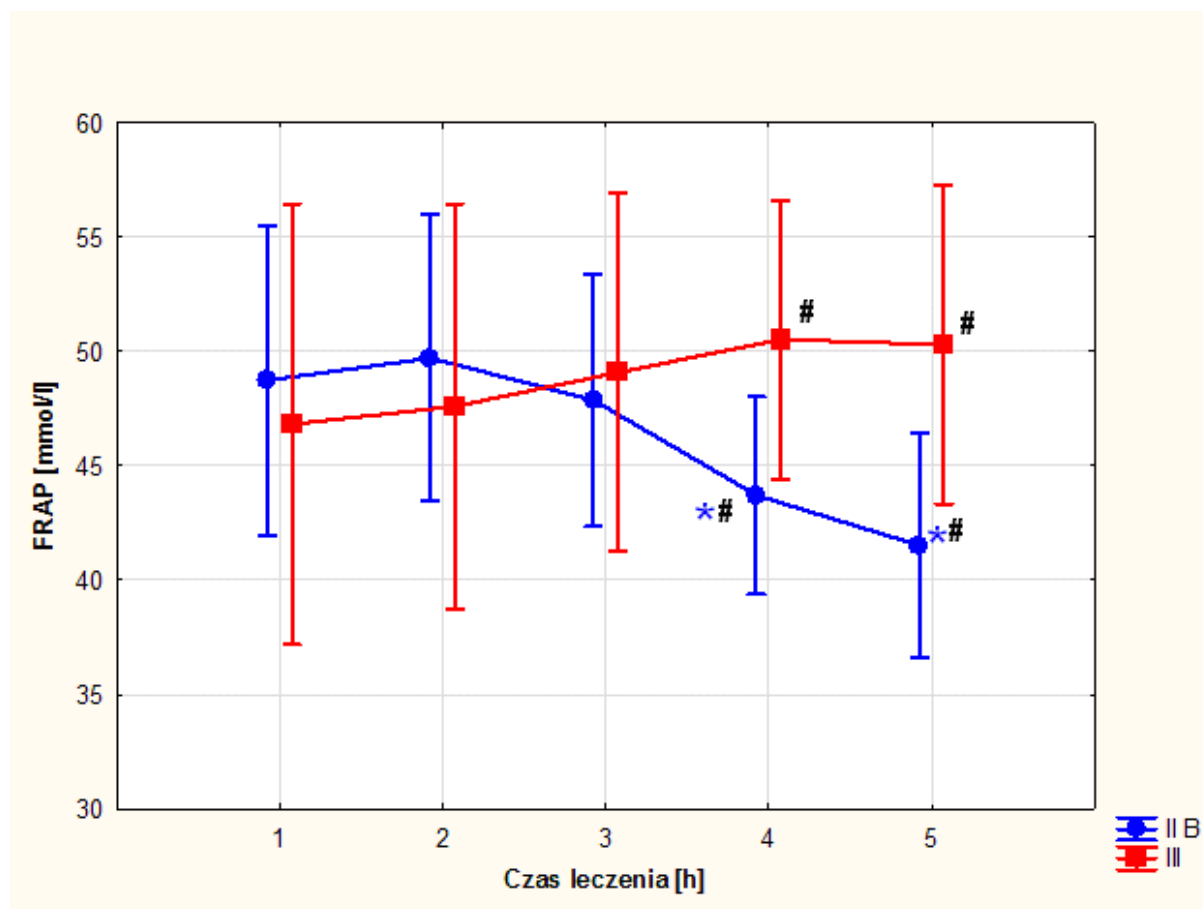
Legenda:

\* - istotność statystyczna między 2 a 1, 3 a 1, 4 a 1 oraz 5 a 1 pomiarem w grupie IIB (test Friedmana i wielokrotnych porównań,  $p<0,05$ ).

\* - istotność statystyczna między 2 a 1, 3 a 1, 4 a 2 i 3, 5 a 2, 3, 4 pomiarem w grupie III (test Friedmana i wielokrotnych porównań,  $p<0,05$ ).

# - istotność statystyczna między stężeniami TAS w obu grupach: IIB i III w pomiarze 4 i 5 (Test U Manna-Whitneya,  $p<0,05$ ).

Rycina 12. Wartość FRAP przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia (IIB i III).



Legenda:

\* - istotność statystyczna między 4 a 1; 5 a 1 pomiarem w grupie IIB (test Friedmana i wielokrotnych porównań,  $p < 0,05$ ).

# - istotność statystyczna między stężeniami FRAP w obu grupach: IIB i III w pomiarach 4 i 5 (Test U Manna-Whitneya,  $p < 0,05$ ).

#### 6.1.2.5. Stężenie CRP.

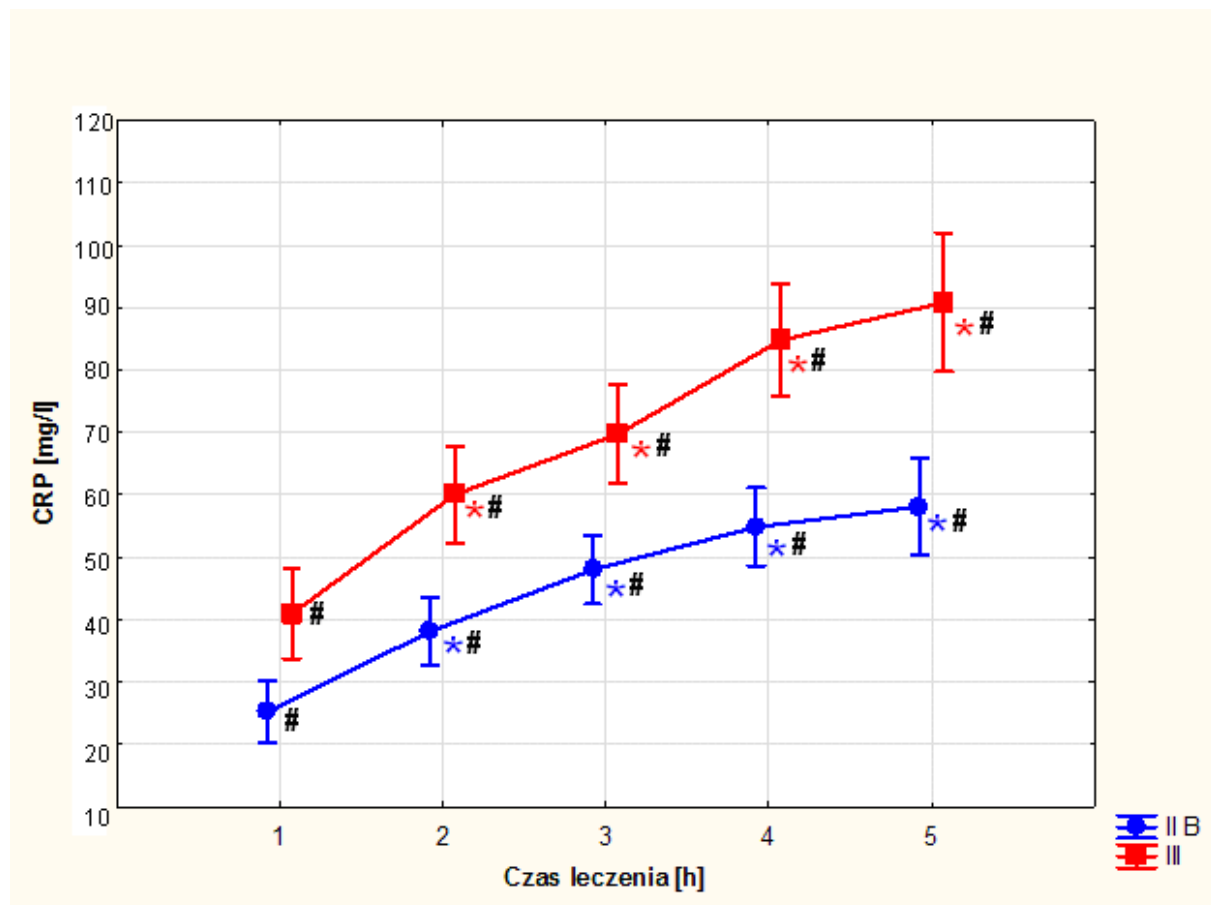
Stężenie CRP w trakcie leczenia ostrego niedokrwienia kończyn dolnych w zależności od stopnia niedokrwienia zostały przedstawione na rycinie 13.

Analiza zmian stężenia CRP w trakcie leczenia ostrego niedokrwienia wykazała znamienne statystycznie różnice w stężeniu w każdym kolejnym pobraniu w obrębie grup oraz pomiędzy grupami. W obu grupach stężenie CRP od pierwszego pobrania było powyżej wartości referencyjnych i stale rosło w następnych oznaczeniach. Przed zabiegiem operacyjnym średnie stężenie CRP w stopniu niedokrwienia IIB wyniosło  $25,23 \pm 12,41$  mg/l, a w III stopniu średnie stężenie wynosiło  $46,72 \pm 30,81$  i różniło się znamienne statystycznie ( $p=0,000118$ ). Podobne znamienne różnice między obu grupami stwierdzono w

poszczególnych pobraniach (1-5) po rewaskularyzacji (odpowiednio  $p < 0,001$  w każdym z nich).

Zanotowano wysoką dodatnią korelację pomiędzy stężeniem CRP a stopniem klinicznego zawansowania ONK ( $r = 0,7211$ ,  $p = 0,0011$ ) przed zabiegiem operacyjnym. Po 30-40 minutach od rewaskularyzacji współczynnik korelacji wynosił  $r = 0,7318$ ,  $p = 0,0012$ , po 12 godzinach-  $r = 0,7433$ ,  $p = 0,0010$ , po 24 godzinach-  $r = 0,7470$ ,  $p = 0,0009$  oraz po 48 godzinach-  $r = 0,7549$ ,  $p = 0,0008$ .

Rycina 13. Stężenie CRP przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia (IIB i III).



Legenda:

\* - istotność statystyczna między 2 a 1, 3, 4, 5; 3 a 1, 2, 4, 5; 4 a 1, 2, 3; 5 a 1, 2, 3 pomiarem w grupie IIB (test Friedmana i wielokrotnych porównań,  $p < 0,05$ ).

\* - istotność statystyczna między 2 a 1, 3, 4, 5; 3 a 1, 2, 4, 5; 4 a 1, 2, 3; 5 a 1, 2, 3 pomiarem w grupie III (test Friedmana i wielokrotnych porównań,  $p < 0,05$ ).

# - istotność statystyczna między stężeniami CRP w obu grupach: IIB i III w pomiarach: 1 ( $p = 0,000052$ ), 2 ( $p = 0,000004$ ), 3 ( $p = 0,000006$ ), 4 ( $p = 0,000001$ ) i 5 ( $p = 0,000007$ ). Test U Manna-Whitneya,  $p < 0,05$ .

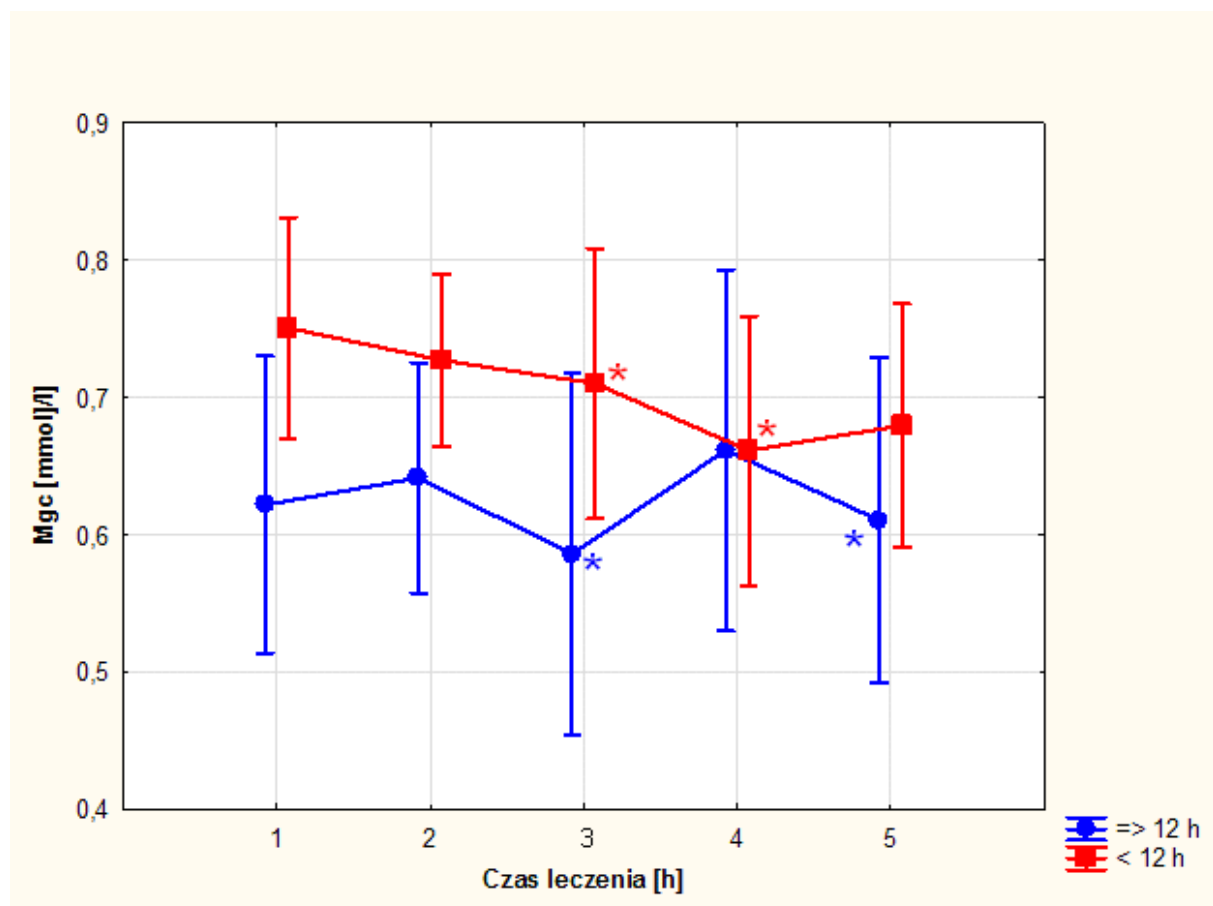
## 6.2. Analiza uzyskanych wyników w zależności od czasu trwania ostrego niedokrwienia ( $t < 12$ h i $t \geq 12$ h).

### 6.2.1. Stężenie wybranych pierwiastków: $Mg_{całk}$ i $Mg_i$ , $Ca_{całk}$ i $Ca_i$ , Na i K w trakcie leczenia ostrego niedokrwienia kończyn.

#### 6.2.1.1. Stężenie $Mg_{całk}$ i $Mg_i$ .

Stężenie  $Mg_{całk}$  w trakcie leczenia ostrego niedokrwienia kończyn dolnych w zależności od czasu niedokrwienia zostało przedstawione na rycinie 14.

Rycina 14. Stężenie  $Mg_{całk}$  przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia ( $t < 12$ h,  $t \geq 12$ h).



Legenda:

\* - istotność statystyczna między 3 a 1; 5 a 1 pomiarem w grupie  $t \geq 12$  h (test Friedmana i wielokrotnych porównań,  $p < 0,05$ ).

\* - istotność statystyczna między 3 a 1; 4 a 1 pomiarem w grupie  $t < 12$  h (test Friedmana i wielokrotnych porównań,  $p < 0,05$ ).

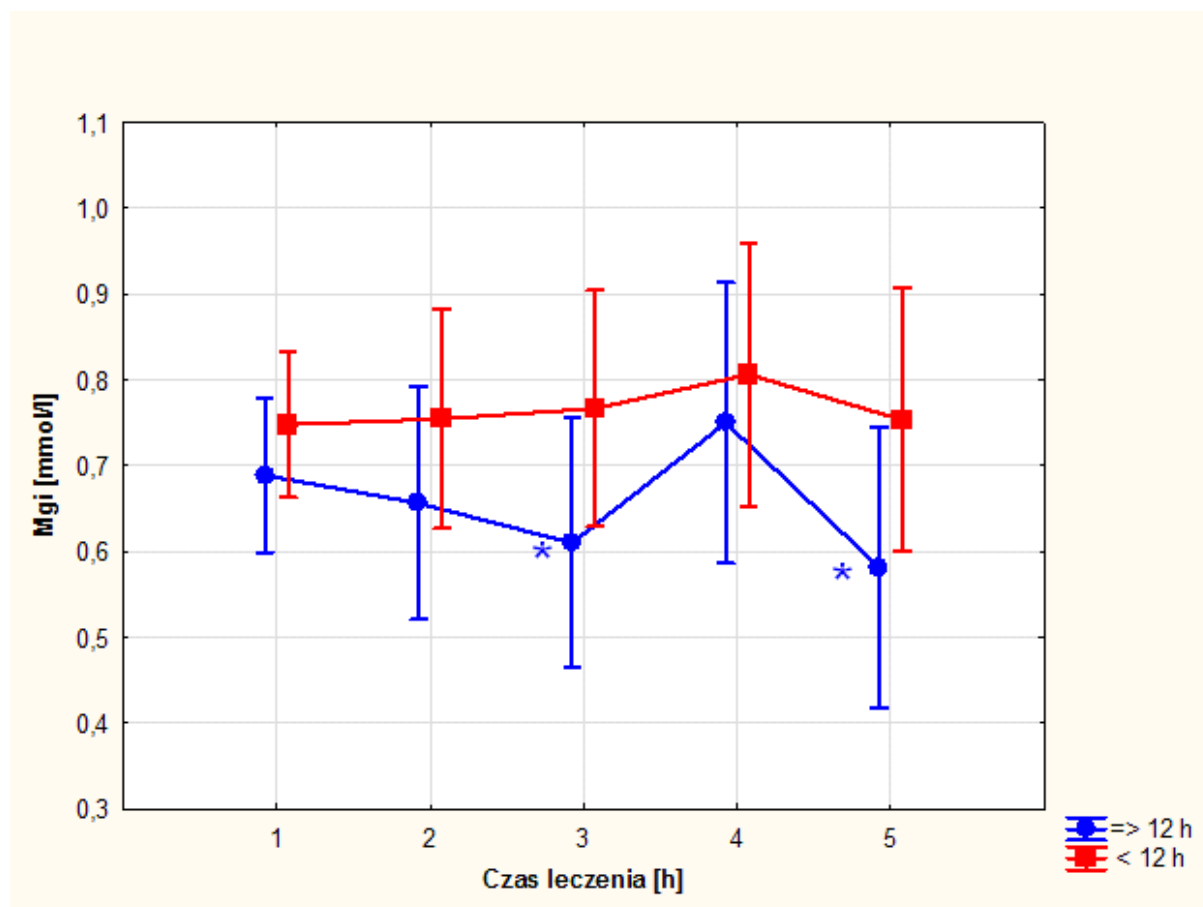


U pacjentów z czasem niedokrwienia  $t \geq 12$  h średnie stężenie  $Mg_{całk}$  przed zabiegiem operacyjnym wynosiło  $0,63 \pm 0,18$  mmol/l, natomiast z czasem niedokrwienia  $t < 12$  h wynosiło  $0,73 \pm 0,16$  mmol/l. W czasie niedokrwienia  $t \geq 12$ h stężenie  $Mg_{całk}$  utrzymywało się na niskim poziomie i wykazano istotny statystycznie spadek stężenia  $Mg_{całk}$  do  $0,60 \pm 0,23$  mmol/l po 12 h od zabiegu operacyjnego oraz do  $0,57 \pm 0,17$  mmol/l po 48 h od zabiegu operacyjnego (odpowiednio  $p=0,018$  i  $p=0,010$ ). Natomiast u pacjentów z czasem niedokrwienia  $t < 12$  h stężenie  $Mg_{całk}$  w czasie leczenia utrzymywało się poniżej wartości referencyjnych i zanotowano istotny statystycznie spadek stężeniem  $Mg_{całk}$  po 12 i 24 godzinach od zabiegu operacyjnego (odpowiednio  $p=0,014$  i  $p=0,046$ ).

Zmiany stężenia  $Mg_i$  w trakcie leczenia ostrego niedokrwienia kończyn dolnych w zależności od czasu niedokrwienia zostało przedstawione na rycinie 15.

Zaobserwowano tendencję do spadku stężenia  $Mg_i$  wśród pacjentów z czasem niedokrwienia  $t \geq 12$ h, a po 12 i 48 h godzinach od zabiegu operacyjnego zanotowano istotny statystycznie spadek stężenia  $Mg_i$  (odpowiednio  $p=0,049$  i  $p=0,046$ ). Wśród pacjentów z czasem niedokrwienia  $t < 12$  h nie zanotowano istotnych statystycznie zmian stężenia  $Mg_i$  w trakcie leczenia ostrego niedokrwienia kończyn dolnych.

Rycina 15. Stężenie  $Mg_i$  przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia ( $t < 12h$ ,  $t \geq 12h$ ).



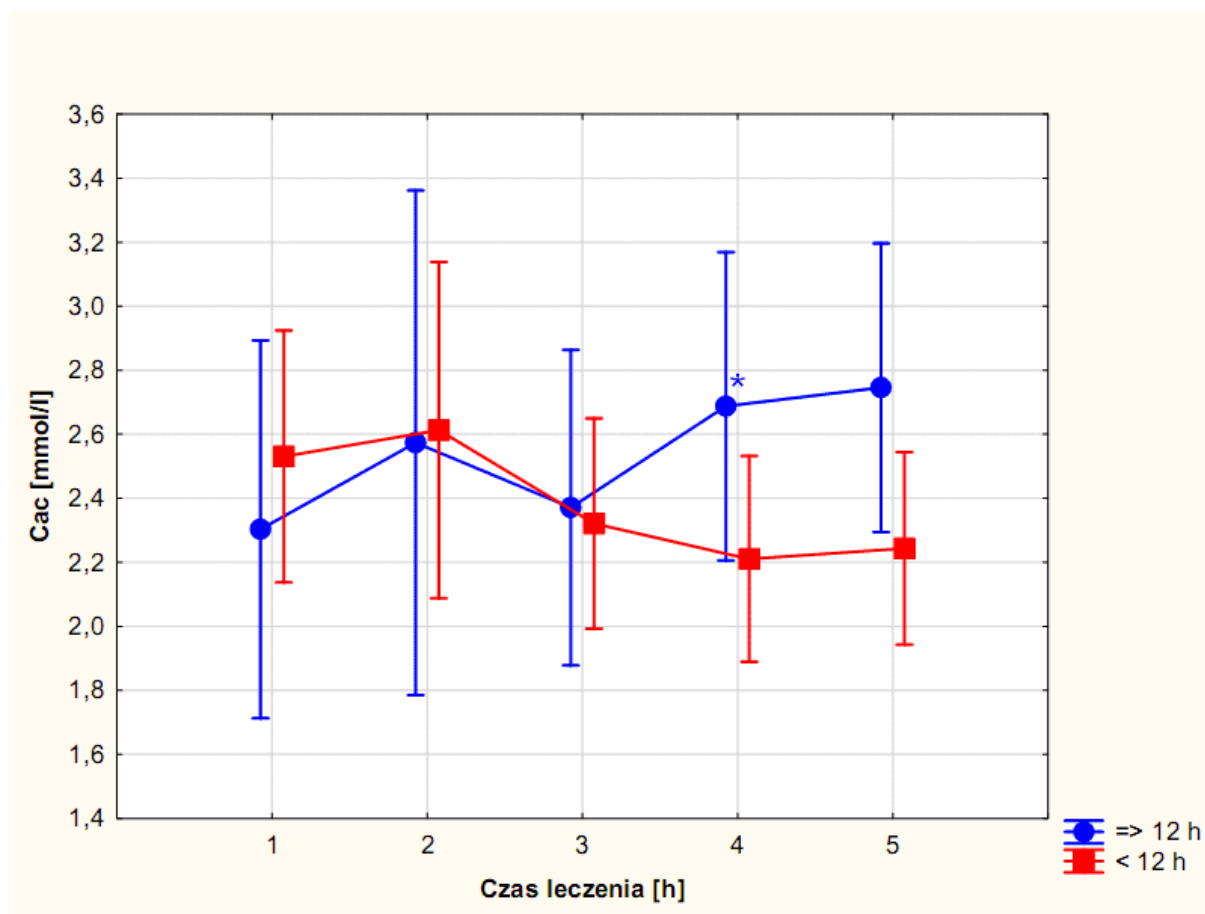
Legenda:

\* - istotność statystyczna między 3 a 1; 5 a 1 pomiarem w grupie  $t \geq 12h$  (test Friedmana i wielokrotnych porównań,  $p < 0,05$ ).

### 6.2.1.2. Stężenie $Ca_{całk}$ i $Ca_i$ .

Stężenia  $Ca_{całk}$  i  $Ca_i$  w trakcie leczenia ostrego niedokrwienia kończyn dolnych w zależności od stopnia niedokrwienia zostały przedstawione na rycinie 16 i 17.

Rycina 16. Stężenie  $Ca_{całk}$  przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia ( $t < 12h$ ,  $t \geq 12h$ ).



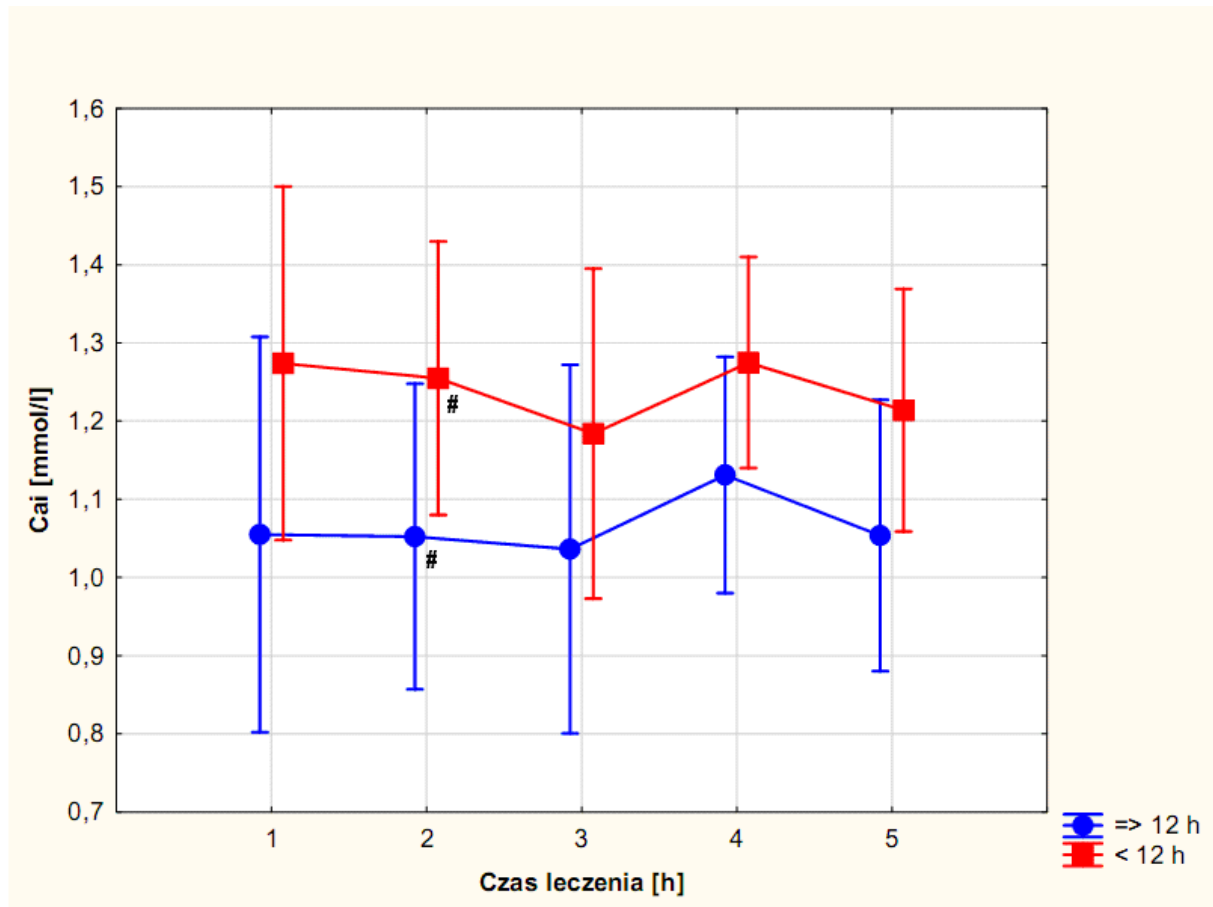
Legenda:

\* - istotność statystyczna między 3 a 1 pomiarem w grupie  $t \geq 12h$  (test Friedmana i wielokrotnych porównań,  $p < 0,05$ ).

Średnie stężenie  $Ca_{całk}$  przed zabiegiem wśród pacjentów z czasem niedokrwienia  $t < 12h$  wynosiło  $2,47 \pm 0,86$  mmol/l, a  $2,28 \pm 0,32$  mmol/l wśród pacjentów z czasem niedokrwienia  $t \geq 12h$ . Odnotowano istotny statystycznie wzrost stężenia  $Ca_{całk}$  w grupie  $t > 12h$  po 24 h od zabiegu operacyjnego ( $p = 0,034$ ).

Średnie stężenie  $Ca_i$  przed zabiegiem wyniosło  $1,13 \pm 0,29$  mmol/l w grupie pacjentów z czasem niedokrwienia  $t \geq 12h$ , a  $1,21 \pm 0,32$  mmol/l w grupie z czasem niedokrwienia  $t < 12h$ . Zaobserwowano statystycznie zmienną różnicę stężenia  $Ca_i$  pomiędzy grupami ( $p = 0,028$ ) po 30-40 minutach po rewaskularyzacji.

Rycina 17. Stężenie  $Ca_i$  przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia ( $t < 12h$ ,  $t \geq 12h$ ).



Legenda:

# - istotność statystyczna między stężeniami  $Ca_i$  w obu grupach:  $t < 12 h$  i  $t \geq 12 h$  w pomiarze 2 (Test U Manna-Whitneya,  $p < 0,05$ ).

### 6.2.1.3. Stężenie Na i K.

Zmiany stężenia Na i K w trakcie leczenia ostrego niedokrwienia kończyn dolnych w zależności od czasu niedokrwienia zostały przedstawione na rycinie 18 i 19.

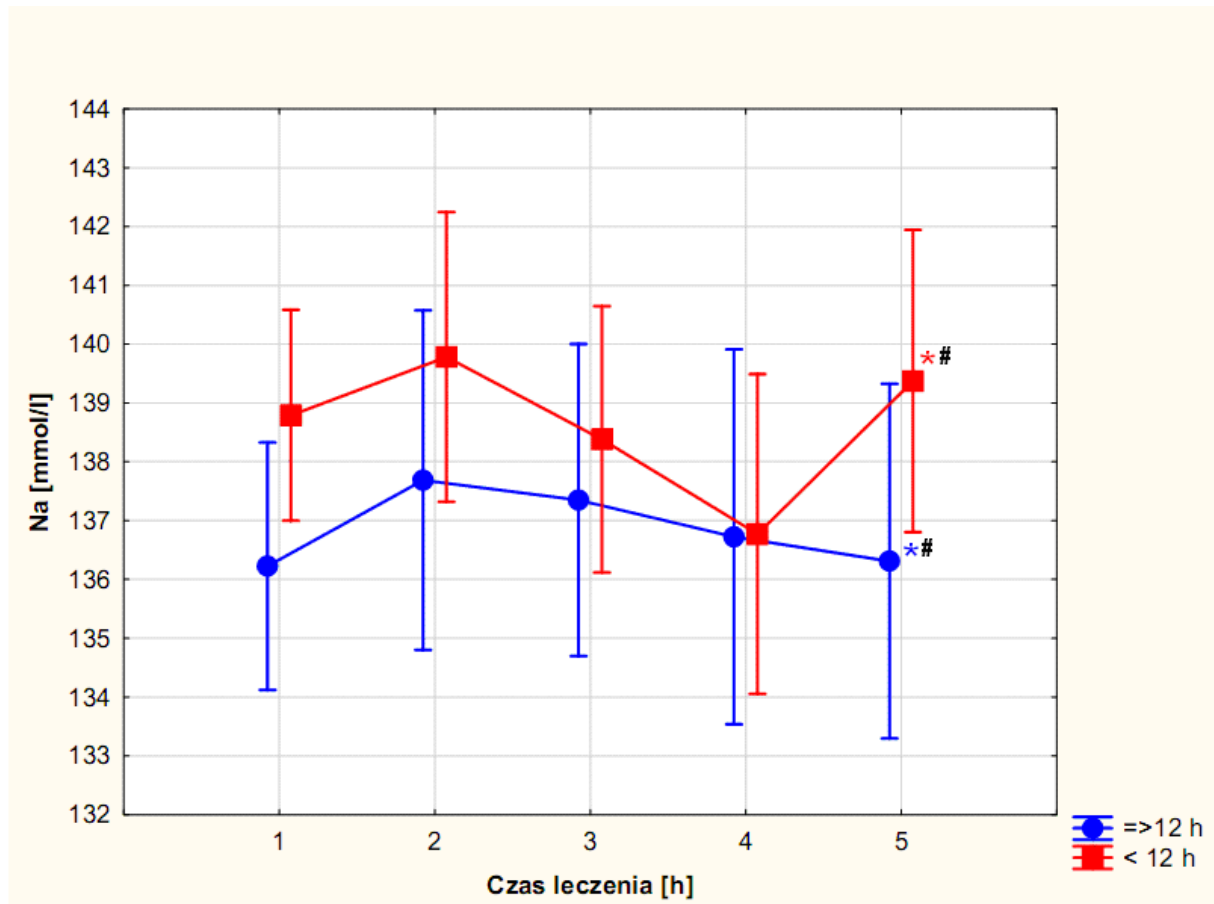
Średnie stężenia Na w grupie pacjentów z czasem niedokrwienia  $t < 12 h$  i  $t > 12 h$  znajdowały się w zakresie referencyjnym. W obu grupach zanotowano istotną statystycznie zmianę stężenia Na po 48 godzinach po zabiegu operacyjnym (odpowiednio  $p = 0,039$  i  $p = 0,039$ ).

Dodatkowo zmiana stężenia Na w obu grupach po 48 h była istotna statystycznie ( $p = 0,035$ ) w porównaniu ze stanem przed operacją.

Średnie stężenie jonów K w surowicy przed zabiegiem w grupie  $t < 12 h$  wynosiło  $4,51 \pm 0,56$  mmol/l. Średnie stężenie jonów K w surowicy przed zabiegiem w grupie  $t \geq 12h$  wynosiło  $5,05 \pm 0,95$  mmol/l. W czasie leczenia ostrego niedokrwienia obserwowano istotny statystycznie

spadek stężenia jonów K po 24 i 48 h w grupie  $t < 12$  h (odpowiednio  $p = 0,046$  i  $p = 0,042$ ) oraz w grupie  $t \geq 12$  h po 30-40 minutach i 48 h po zabiegu operacyjnym (odpowiednio  $p = 0,048$  i  $p = 0,042$ ).

Rycina 18. Stężenie Na przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia ( $t < 12$  h,  $t \geq 12$  h).



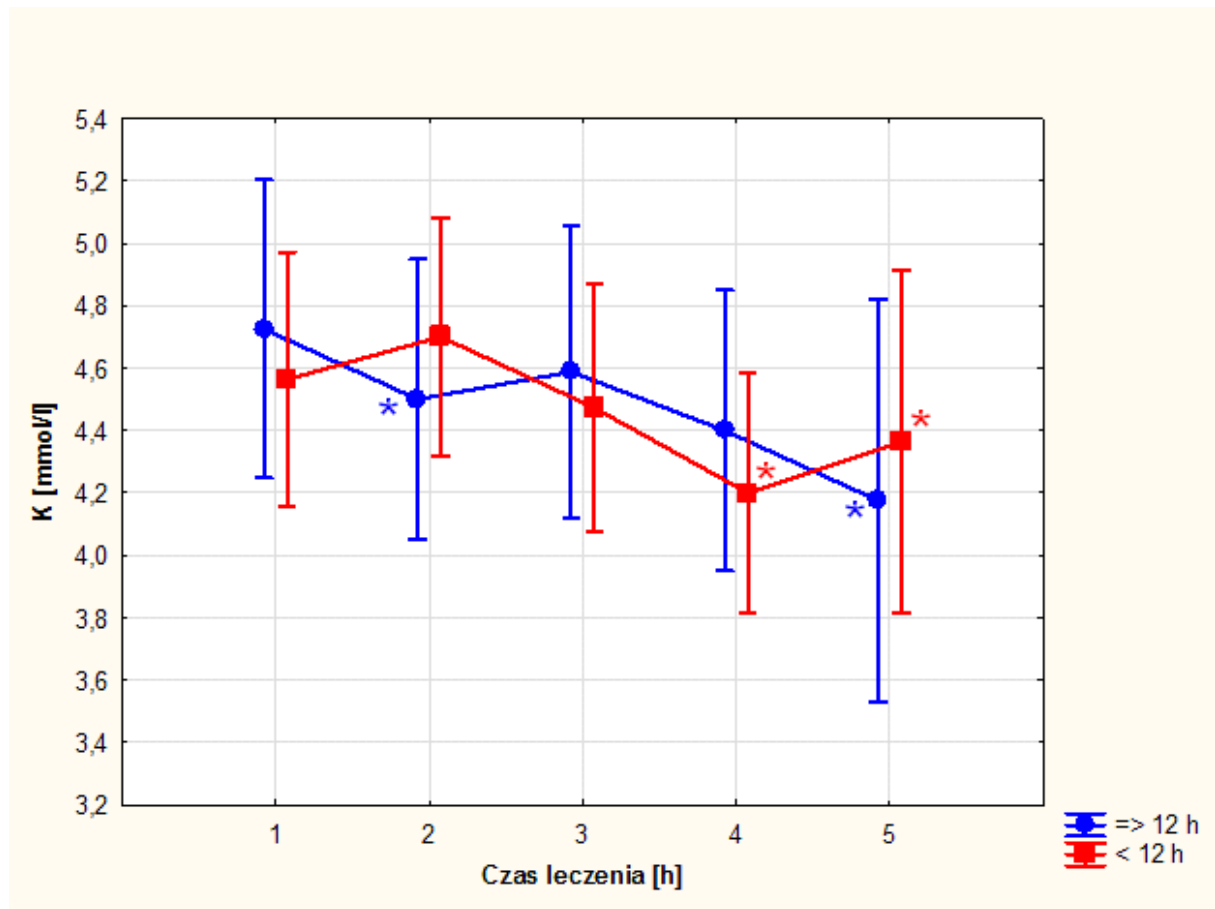
Legenda:

\* - istotność statystyczna między 5 a 4 pomiarem w grupie  $t < 12$  h (test Friedmana i wielokrotnych porównań,  $p < 0,05$ ).

\* - istotność statystyczna między 5 a 2 pomiarem w grupie  $t \geq 12$  h (test Friedmana i wielokrotnych porównań,  $p < 0,05$ ).

# - istotność statystyczna między stężeniami Na w obu grupach:  $t < 12$  h i  $t \geq 12$  h w pomiarze 5 (Test U Manna-Whitneya,  $p < 0,05$ ).

Rycina 19. Stężenie K przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia ( $t < 12h$ ,  $t \geq 12h$ ).



Legenda:

\* - istotność statystyczna między 4 a 1; 5 a 1 pomiarem w grupie  $t < 12h$  (test Friedmana i wielokrotnych porównań,  $p < 0,05$ ).

\* - istotność statystyczna między 2 a 1; 5 a 1 pomiarem w grupie  $t \geq 12h$  (test Friedmana i wielokrotnych porównań,  $p < 0,05$ ).

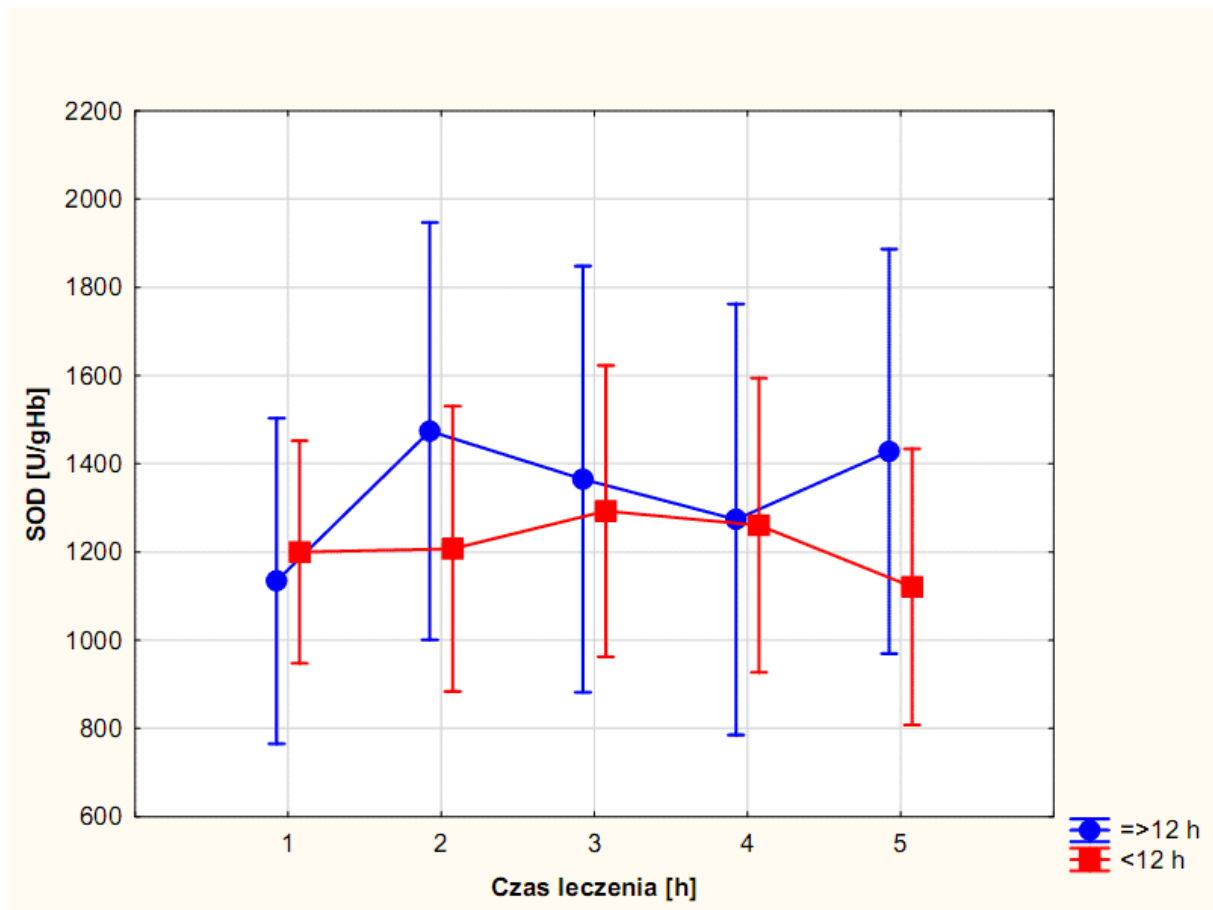
## 6.2.2. Aktywność SOD i GPx, wartości TAS i FRAP oraz stężenie CRP w trakcie leczenia ostrego niedokrwienia kończyn.

### 6.2.2.1. Aktywność SOD.

Aktywność SOD w trakcie leczenia ostrego niedokrwienia kończyn dolnych w zależności od czasu niedokrwienia zostały przedstawione na rycinie 20.

Aktywność SOD w trakcie leczenia ostrego niedokrwienia kończyn dolnych w obu grupach ( $t < 12$  h i  $t \geq 12$  h) nie różniły się statystycznie.

Rycina 20. Aktywność SOD przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia ( $t < 12$ h,  $t \geq 12$ h).



### 6.2.2.2. Aktywność GPx.

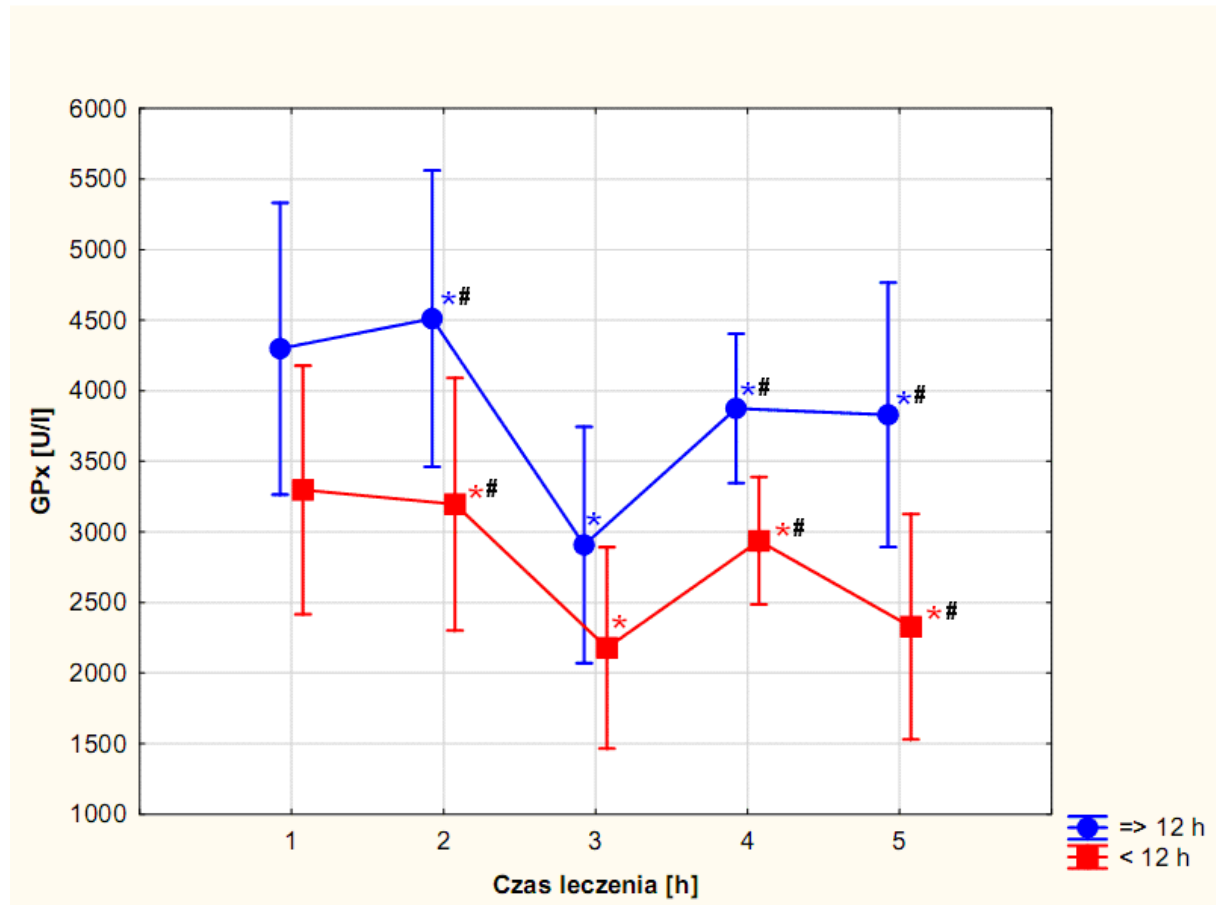
Aktywność GPx w trakcie leczenia ostrego niedokrwienia kończyn dolnych w zależności od czasu niedokrwienia zostały przedstawione na rycinie 21.

Wśród pacjentów z czasem niedokrwienia  $t < 12$  h aktywność GPx utrzymywała się poniżej wartości referencyjnych. Znamienne statystycznie zmiany aktywności GPx w tej grupie odnotowano 30-40 minut po zabiegu operacyjnym ( $p=0,012$ ), 24 ( $p=0,003$ ) i 48 h ( $p=0,015$ ) po zabiegu operacyjnym.

W grupie  $t \geq 12$  h znamienne statystycznie różnice w aktywności GPx zauważono również 30-40 minut ( $p=0,012$ ), 24 ( $p=0,003$ ) i 48 h ( $p=0,015$ ) po zabiegu operacyjnym.

Dodatkowo 30-40 minut po zabiegu operacyjnym oraz po 24 i 48 h po zabiegu aktywności GPx różniły się statystycznie pomiędzy obiema grupami (odpowiednio  $p=0,011$ ,  $p=0,002$  i  $p=0,013$ ).

Rycina 21. Aktywność GPx przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia ( $t < 12$ h,  $t \geq 12$ h).





Legenda:

\* - istotność statystyczna między 2 a 3; 3 a 1, 2, 4; 4 a 3, 5; 5 a 1,4 pomiarem w grupie  $t < 12$  h (test Friedmana i wielokrotnych porównań,  $p < 0,05$ ).

\* - istotność statystyczna między 2 a 3, 5; 3 a 1, 2, 4; 4 a 3, 5; 5 a 1, 2, 4 pomiarem w grupie  $t \geq 12$  h (test Friedmana i wielokrotnych porównań,  $p < 0,05$ ).

# - istotność statystyczna między stężeniami GPx w obu grupach:  $t < 12$  h i  $t \geq 12$  h w pomiarze 2, 4 i 5 (Test U Manna-Whitneya,  $p < 0,05$ ).

### 6.2.2.3. Wartość TAS.

Wartość TAS w trakcie leczenia ostrego niedokrwienia kończyn dolnych w zależności od czasu niedokrwienia zostały przedstawione na rycinie 22.

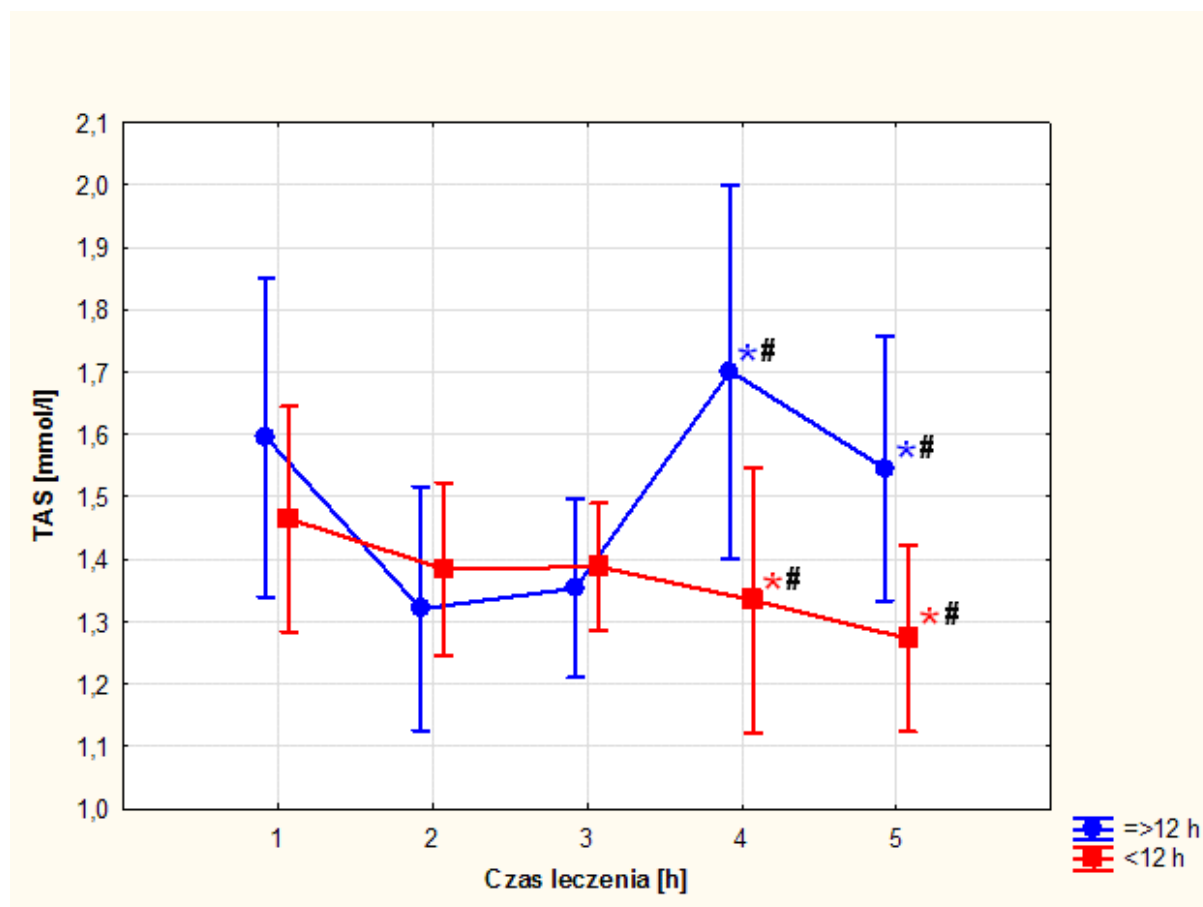
Wartość TAS w stopniu niedokrwienia IIB spadała poniżej wartości referencyjnych. Średnia wartość TAS w grupie  $t < 12$  h przed zabiegiem operacyjnym wynosiła  $1,51 \pm 0,44$  mmol/l. Istotny statystycznie zmiany wartości TAS zaobserwowano po 24 i 48 h od zabiegu operacyjnego i wynosiły one średnio odpowiednio:  $1,35 \pm 0,44$  mmol/l ( $p=0,047$ ) i  $1,27 \pm 0,29$  mmol/l ( $p=0,046$ ).

Średnia wartość TAS w grupie  $t \geq 12$ h przed zabiegiem operacyjnym wynosiła  $1,63 \pm 0,36$  mmol/l. W tej grupie znamienne statystycznie wzrost wartości TAS zanotowano po 24 i 48 h po zabiegu operacyjnym i wyniósł on średnio  $1,67 \pm 0,36$  ( $p=0,047$ ) i  $1,54 \pm 0,33$  mmol/l ( $p=0,046$ ).

Dodatkowo wykazano istotne statystycznie różnice między powyższymi grupami zmiany aktywności TAS po 24 i 48 h od zabiegu operacyjnego (odpowiednio  $p=0,047$  i  $p=0,045$ ).

Zaobserwowano dodatnią korelację pomiędzy wartością TAS a czasem trwania ostrego niedokrwienia kończyn dolnych przed zabiegiem operacyjnym  $r=0,3291$ ,  $p=0,0043$  oraz po 24 godzinach-  $r=0,6126$ ,  $p=0,014$  i 48 godzinach-  $r=0,6921$ ,  $p=0,013$  od rewaskularyzacji.

Rycina 22. Wartość TAS przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia ( $t < 12\text{h}$ ,  $t \geq 12\text{h}$ ).



Legenda:

\* - istotność statystyczna między 4 a 1; 5 a 1 pomiarem w grupie  $t < 12\text{h}$  (test Friedmana i wielokrotnych porównań,  $p < 0,05$ ).

\* - istotność statystyczna między 4 a 2; 5 a 2 pomiarem w grupie  $t \geq 12\text{h}$  (test Friedmana i wielokrotnych porównań,  $p < 0,05$ ).

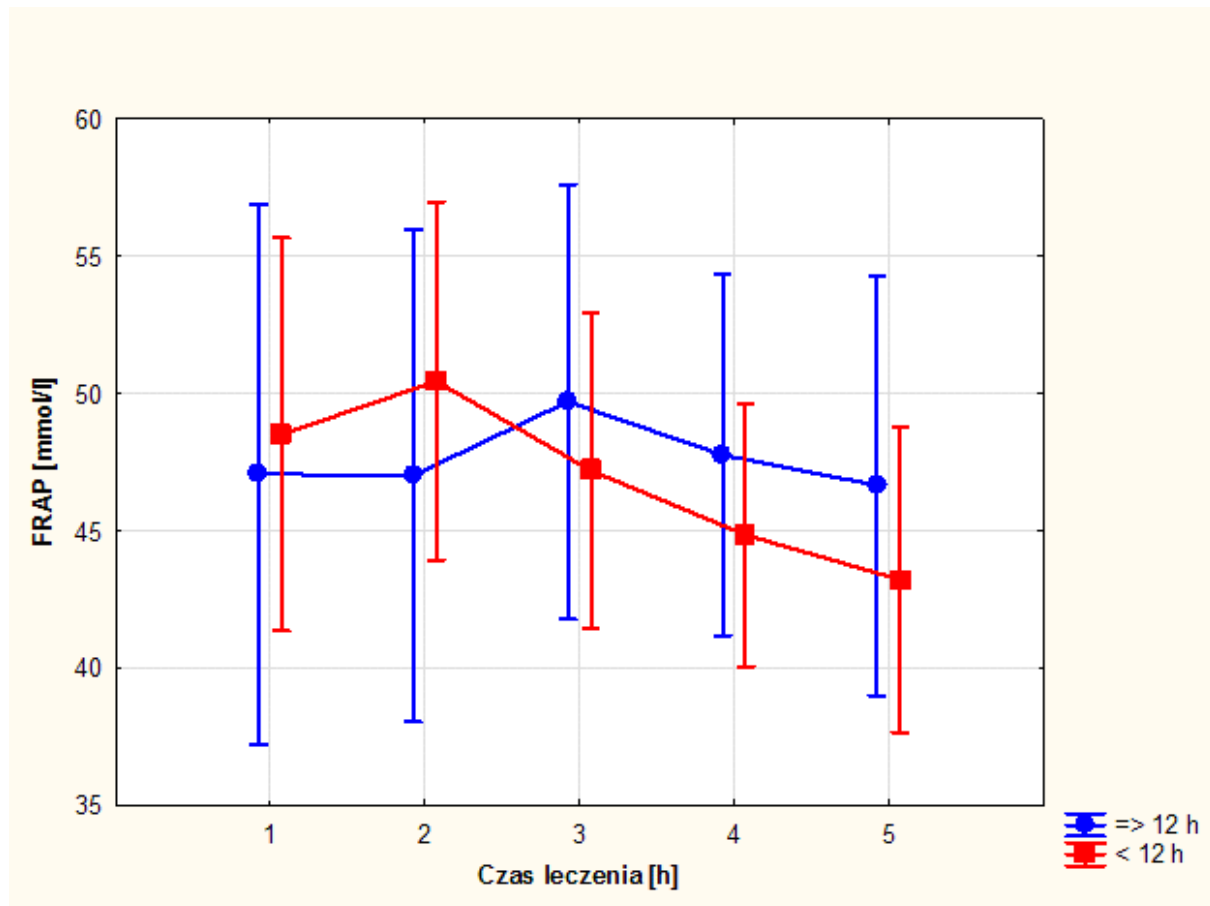
# - istotność statystyczna między stężeniami TAS w obu grupach:  $t < 12\text{h}$  i  $t \geq 12\text{h}$  w pomiarze 4 i 5 (Test U Manna-Whitneya,  $p < 0,05$ ).

#### 6.2.2.4. Wartość FRAP.

Zmiany wartości FRAP w trakcie leczenia ostrego niedokrwienia kończyn dolnych w zależności od czasu niedokrwienia zostały przedstawione na rycinie 23.

W obu grupach:  $t < 12\text{h}$  i  $t \geq 12\text{h}$  zmiany wartości FRAP nie były istotne statystycznie i nie różniły się między grupami.

Rycina 23. Wartość FRAP przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia ( $t < 12$ h,  $t \geq 12$ h).



#### 6.2.2.5. Stężenie CRP.

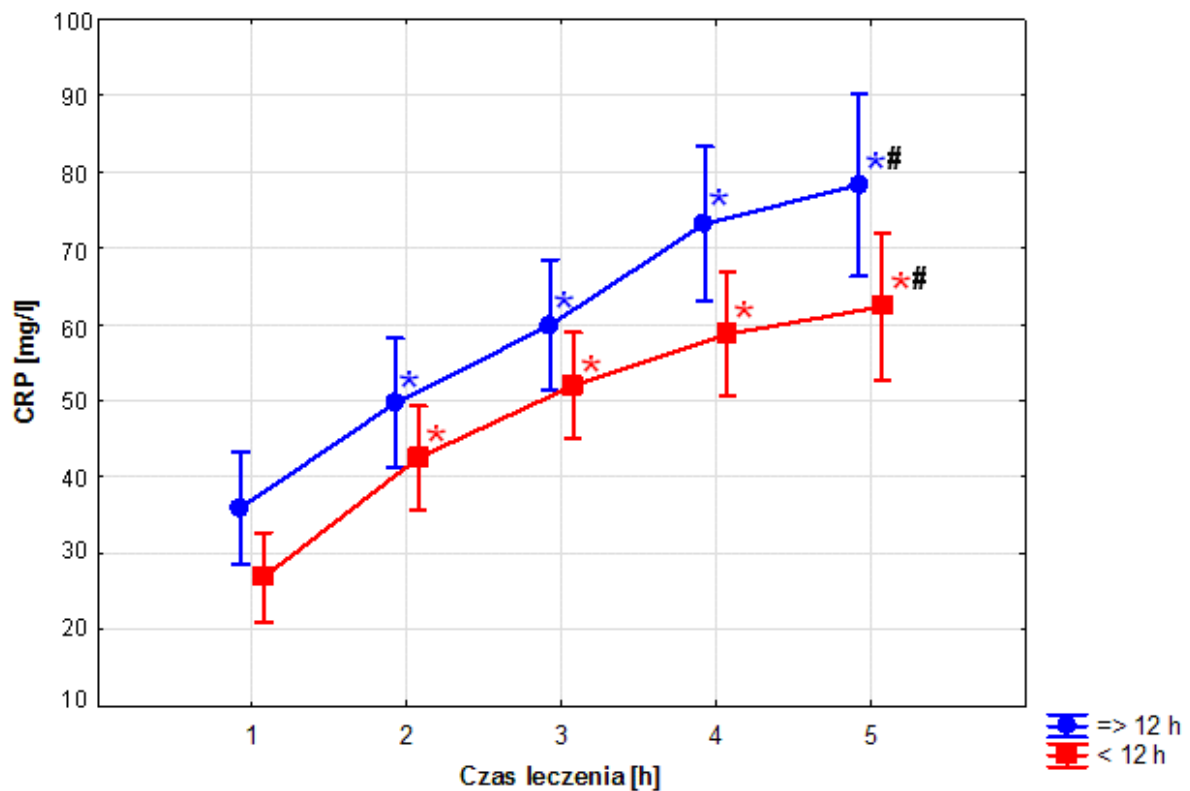
Stężenie CRP w trakcie leczenia ostrego niedokrwienia kończyn dolnych w zależności od czasu niedokrwienia zostały przedstawione na rycinie 24.

W obu grupach stężenie CRP od pierwszego pobrania było powyżej wartości referencyjnych i stale rosło w następnych oznaczeniach. Przed zabiegiem operacyjnym średnie stężenie CRP w grupie  $t < 12$  h wyniosło  $26,87 \pm 12,80$ , a w grupie  $t \geq 12$  h średnie stężenie wynosiło  $35,95 \pm 20,56$ . Analiza stężenia CRP w trakcie leczenia ostrego niedokrwienia wykazała znamienne statystycznie różnice po 30-40 minutach oraz 12, 24 i 48 h po zabiegu operacyjnym (odpowiednio dla  $t < 12$  h  $p=0,046$  i  $p=0,045$  oraz  $p=0,046$  i  $p=0,045$ ). W grupie  $t \geq 12$  h podobnie zanotowano istotny statystycznie wzrost stężenia CRP w każdym kolejnym pobraniu po rewaskularyzacji (2-5), dla którego  $p$  wynosiło kolejno  $p=0,001$ ,  $p=0,018$ ,

p=0,008, p=0,002). Po 48 godzinach po zabiegu operacyjnym różnica stężenia CRP w obu grupach była istotna statystycznie (p=0,044).

Zanotowano wysoką dodatnią korelację pomiędzy stężeniem CRP a czasem trwania ostrego niedokrwienia kończyn dolnych przed zabiegiem operacyjnym (r=0,5491, p=0,0031). Po 30-40 minutach od rewaskularyzacji wynosił r=0,6891, p=0,0049; po 12 godzinach- r=0,6942, p=0,0046; po 24 godzinach- r=0,6997, p=0,0038 oraz po 48 godzinach- r=0,7334, p=0,0027.

Rycina 24. Stężenie CRP przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia ( $t < 12h$ ,  $t \geq 12h$ ).



Legenda:

\* - istotność statystyczna między 2 a 1, 3, 4, 5; 3 a 1, 2, 4, 5; 4 a 1, 2, 3; 5 a 1, 2, 3 pomiarem w grupie  $t < 12h$  (test Friedmana i wielokrotnych porównań,  $p < 0,05$ ).

\* - istotność statystyczna między 2 a 1, 3, 4, 5; 3 a 1, 2, 4, 5; 4 a 1, 2, 3, 5; 5 a 1, 2, 3, 4 pomiarem w grupie  $t \geq 12h$  (test Friedmana i wielokrotnych porównań,  $p < 0,05$ ).

# - istotność statystyczna między stężeniami CRP w obu grupach:  $t < 12h$  i  $t \geq 12h$  w pomiarze 5 (Test U Manna-Whitneya,  $p < 0,05$ ).

### **6.3. Analiza uzyskanych wyników w zależności od rodzaju zabiegu (embolektomia vs inne) w trakcie leczenia ostrego niedokrwienia kończyn dolnych.**

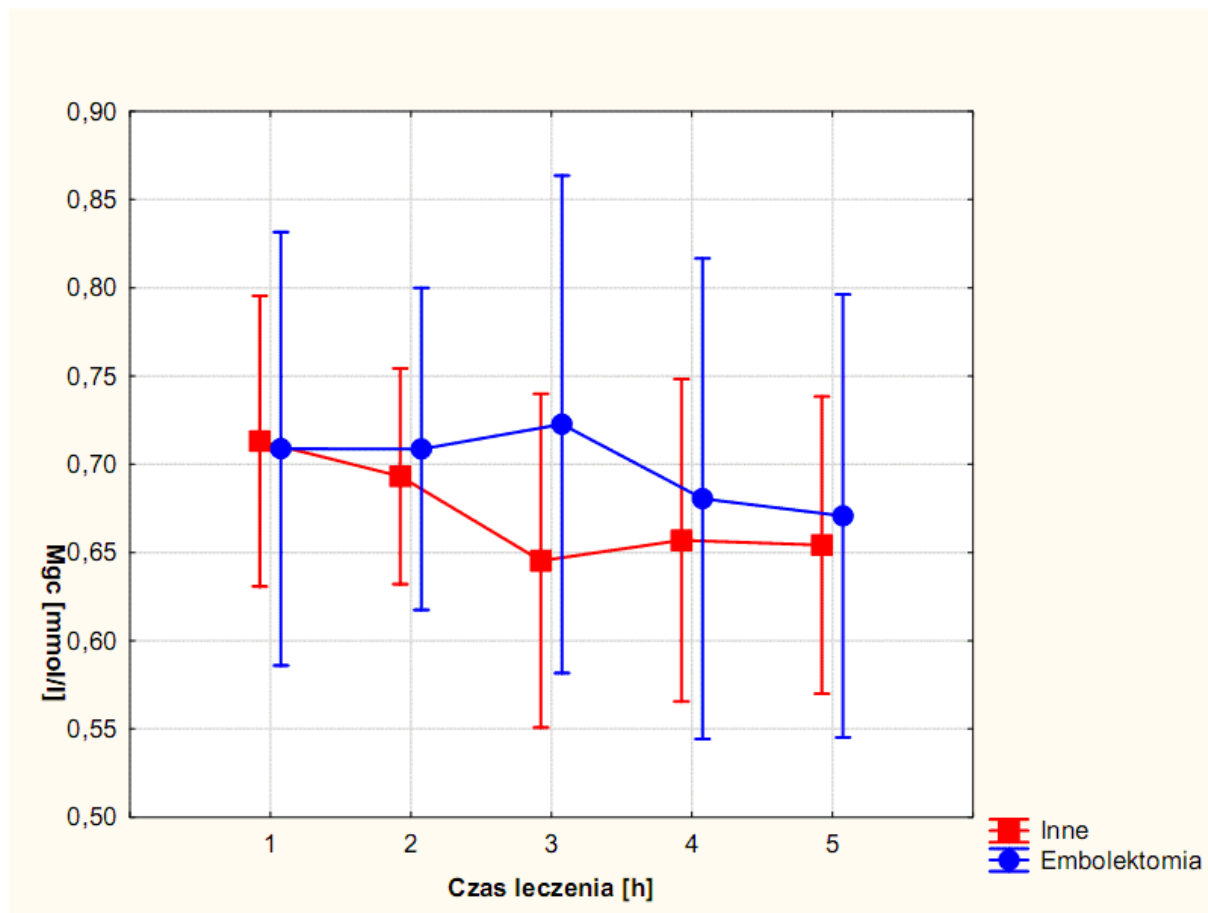
Przedstawiono poniżej analizę zmian stężenia wybranych pierwiastków oraz zmianę aktywności wybranych parametrów stresu oksydacyjnego w trakcie leczenia ostrego niedokrwienia kończyn dolnych w zależności od rodzaju wykonanego zabiegu: embolektomia i inne zabiegi rewaskularyzacyjne tętnic kończyn dolnych.

#### **6.3.1. Stężenie wybranych pierwiastków: $Mg_{całk}$ i $Mg_i$ , $Ca_{całk}$ i $Ca_i$ , Na i K w trakcie leczenia ostrego niedokrwienia kończyn.**

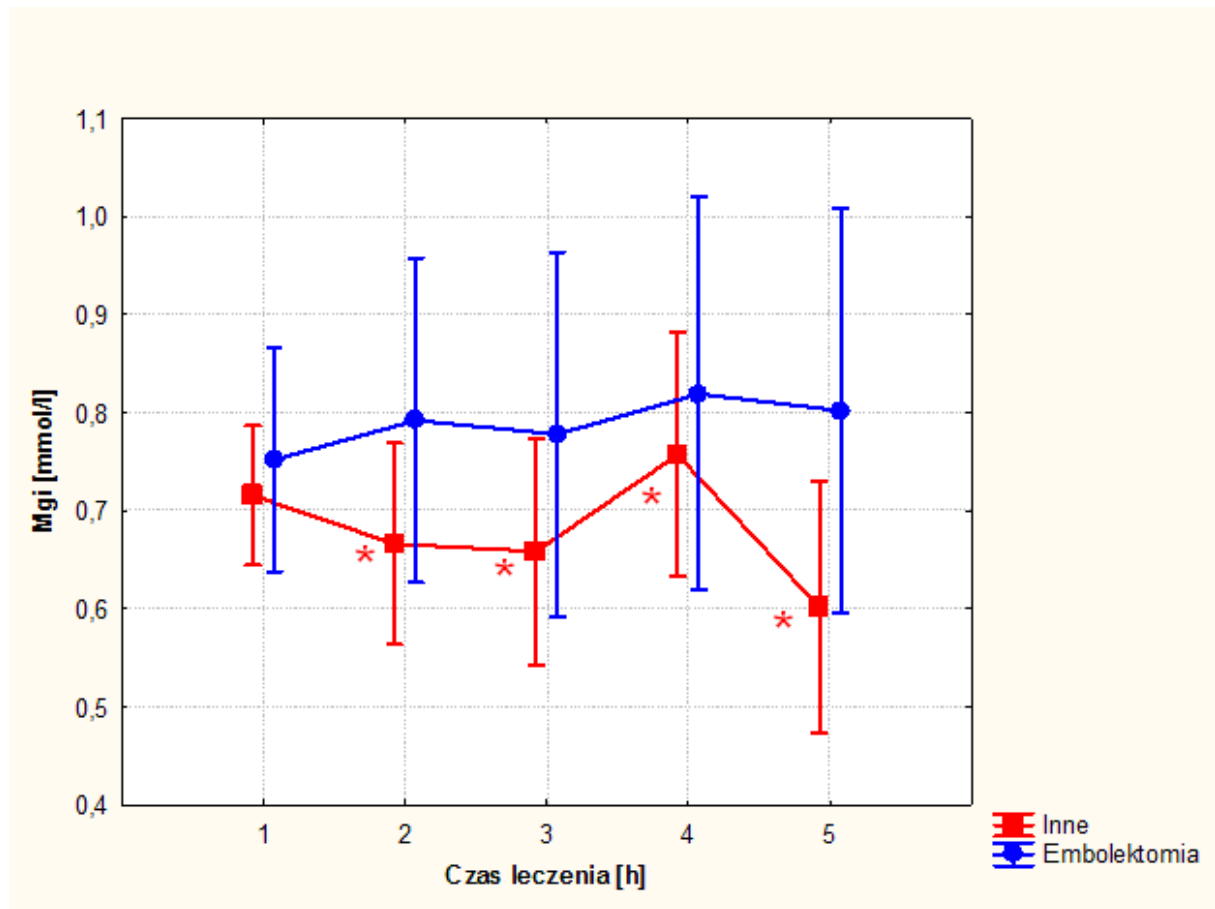
Stężenia  $Mg_{całk}$ ,  $Mg_i$ ,  $Ca_{całk}$ ,  $Ca_i$ , Na i K zostały przedstawione na rycinach 25, 26, 27, 28, 29 i 30.

Analiza statystyczna stężenia  $Mg_{całk}$  w zależności od rodzaju zabiegu nie wykazała istotnych zmian w badanych grupach i pomiędzy nimi w trakcie leczenia ostrego niedokrwienia kończyn dolnych. Natomiast w grupie pacjentów poddanych innym zabiegom niż embolektomia zauważono istotny statycznie spadek stężenia  $Mg_i$  w drugim i trzecim pobraniu, a następnie wzrost stężenia w czwartym pobraniu i ponowny spadek stężenia w ostatnim pobraniu ( $p < 0,05$ ).

Rycina 25. Stężenie  $Mg_{całk}$  przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia (embolektomia, inne zabiegi rewaskularyzacyjne tętnic kończy dolnych).



Rycina 26. Stężenie  $Mg_i$  przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia (embolektomia, inne zabiegi rewerskularyzacyjne tętnic kończy dolnych).

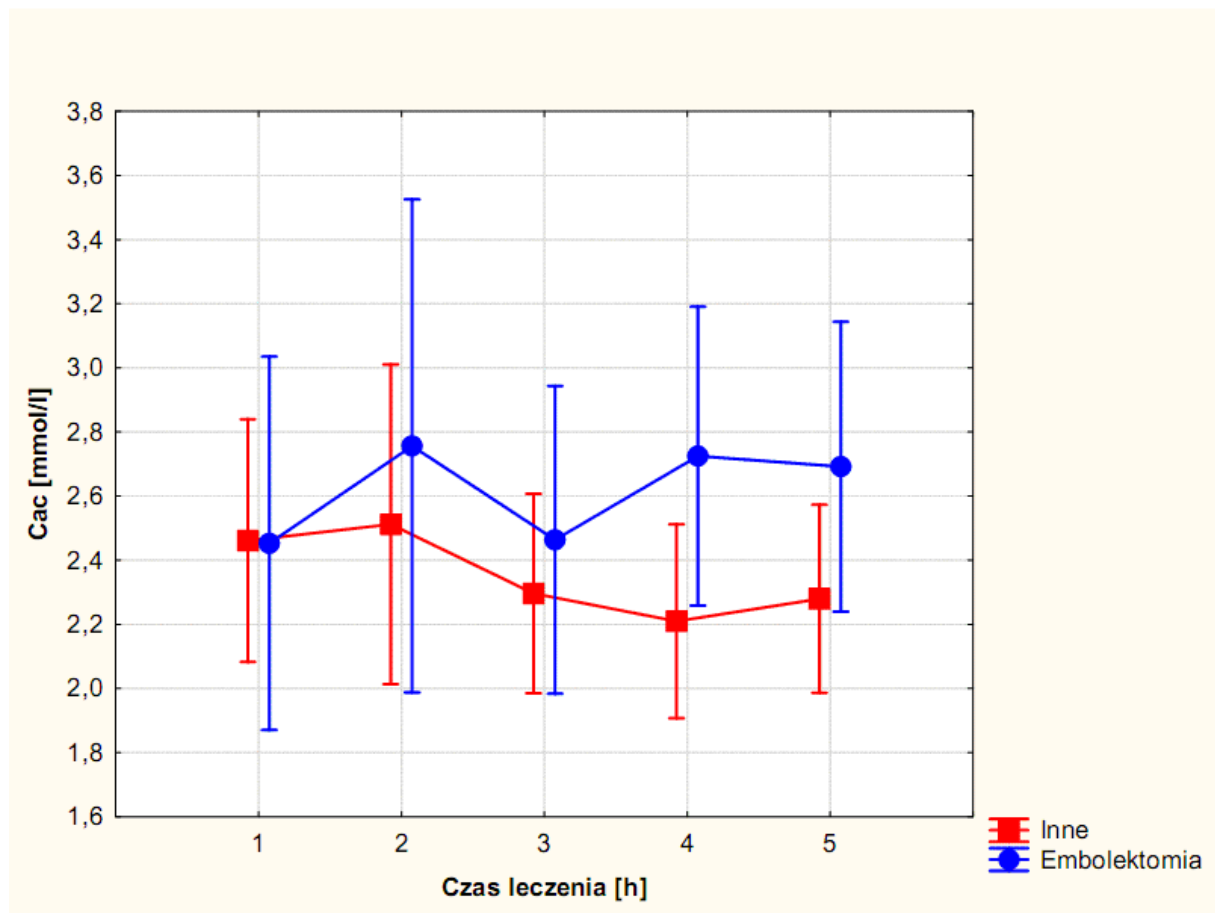


Legenda:

\* - istotność statystyczna między 2 a 1, 4, 5; 3 a 1, 4, 5; 4 a 2, 3, 5; 5 a 1, 2, 3, 4 pomiarem w grupie  $t < 12$  h (test Friedmana i wielokrotnych porównań,  $p < 0,05$ ).

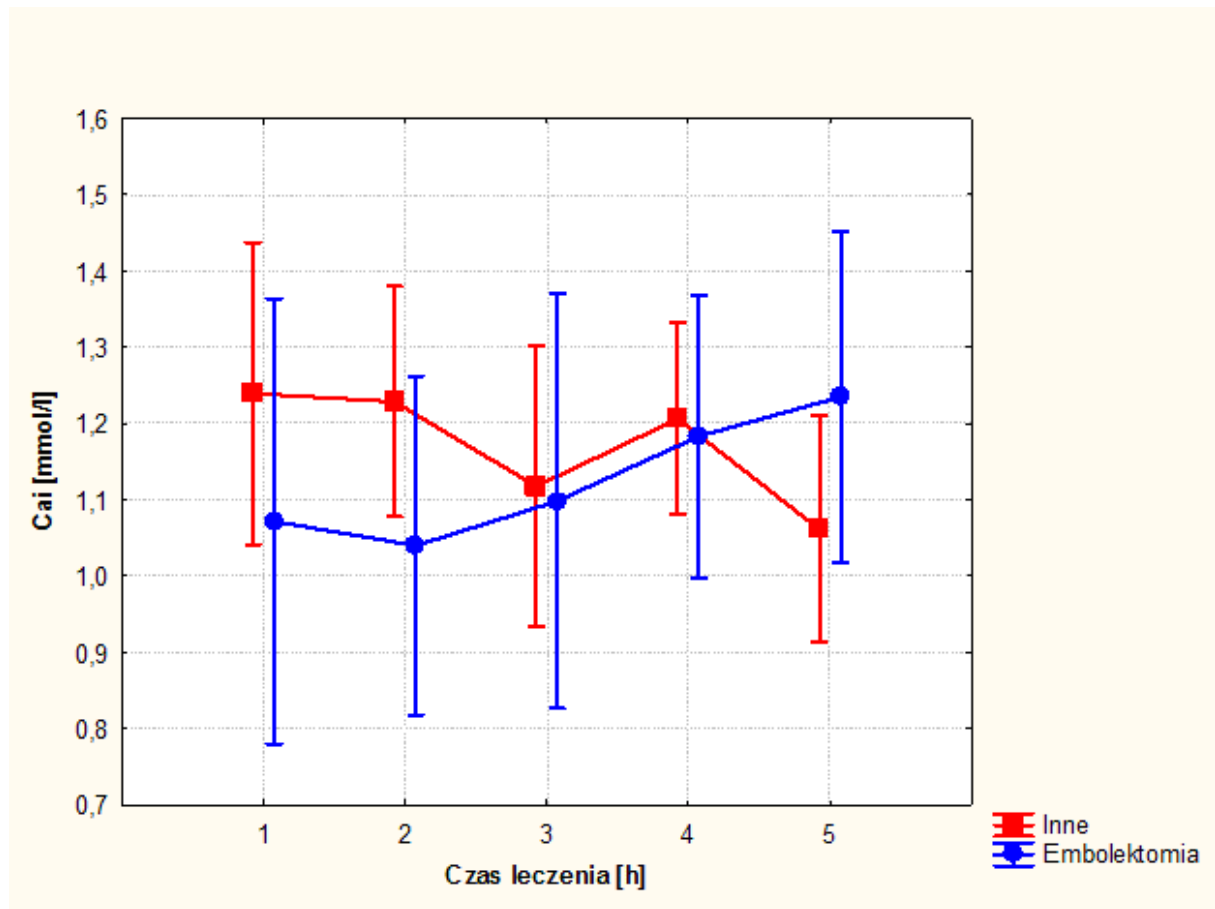
Stężenie  $Ca_{całk}$ , jak i  $Ca_i$ , nie zmieniało się statystycznie istotnie w grupie poddanej embolektomii i innym zabiegom rekonstrukcyjnym tętnic kończyn dolnych oraz nie zanotowano znamiennych statystycznie różnic pomiędzy powyższymi grupami.

Rycina 27. Stężenie  $Ca_{\text{całk}}$  przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia (embolektomia, inne zabiegi rewaskularyzacyjne tętnic kończy dolnych).





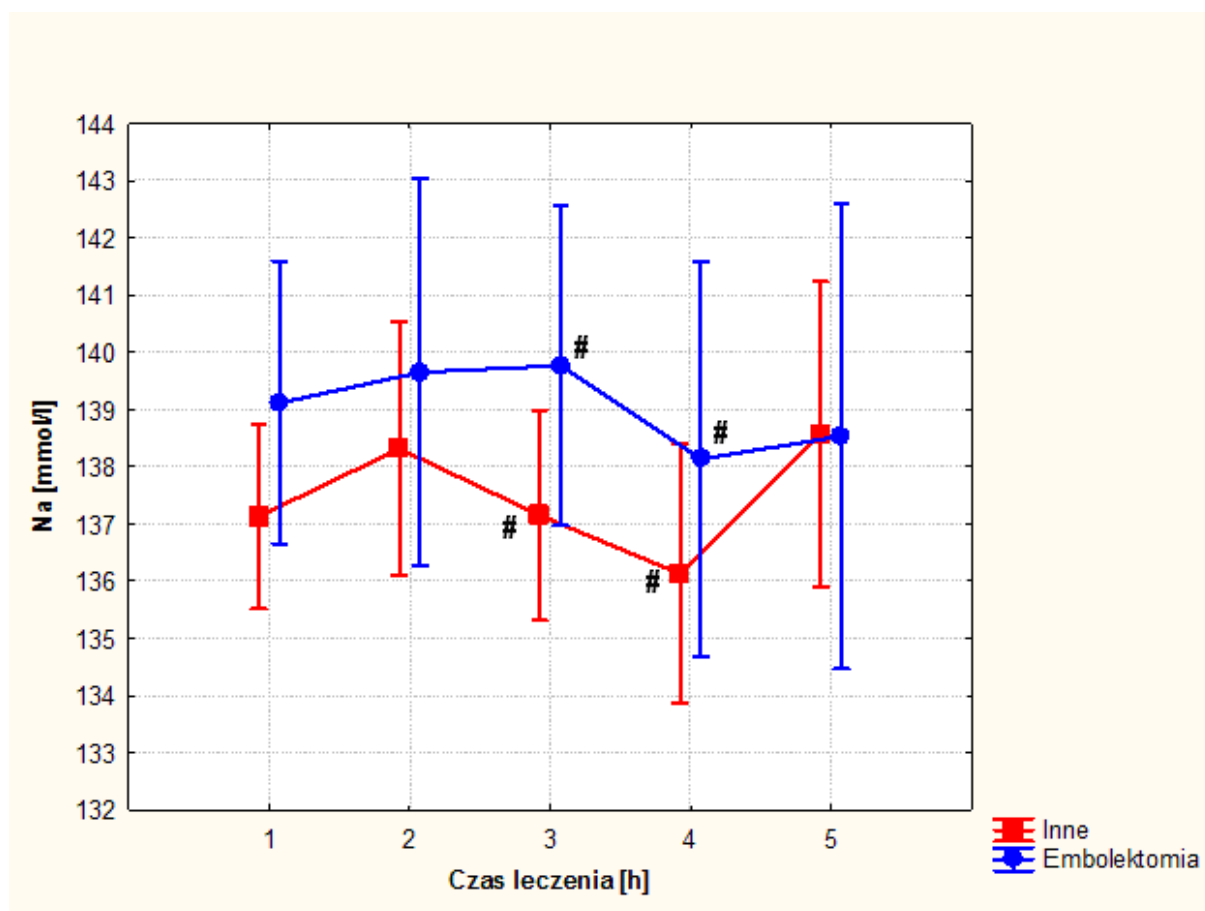
Rycina 28. Stężenie  $Ca_i$  przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia (embolektomia, inne zabiegi rewerskularyzacyjne tętnic kończy dolnych).



Wykazano statystycznie istotne różnice stężeń  $Na$  pomiędzy obiema grupami po 12 i 24 godzinach leczenia ostrego niedokrwienia (odpowiednio  $p=0,001$  i  $p=0,002$ ).

Zanotowano istotny statystycznie spadek stężenia  $K$  po 24 i 48 godzinach od zabiegu operacyjnego ( $p<0,05$ ) w grupie pacjentów poddanych zabiegom innym niż embolektomia, oraz zanotowano istotną statystycznie różnicę stężenia  $K$  pomiędzy obiema grupami po 12 godzinach od zabiegu operacyjnego ( $p=0,01$ ).

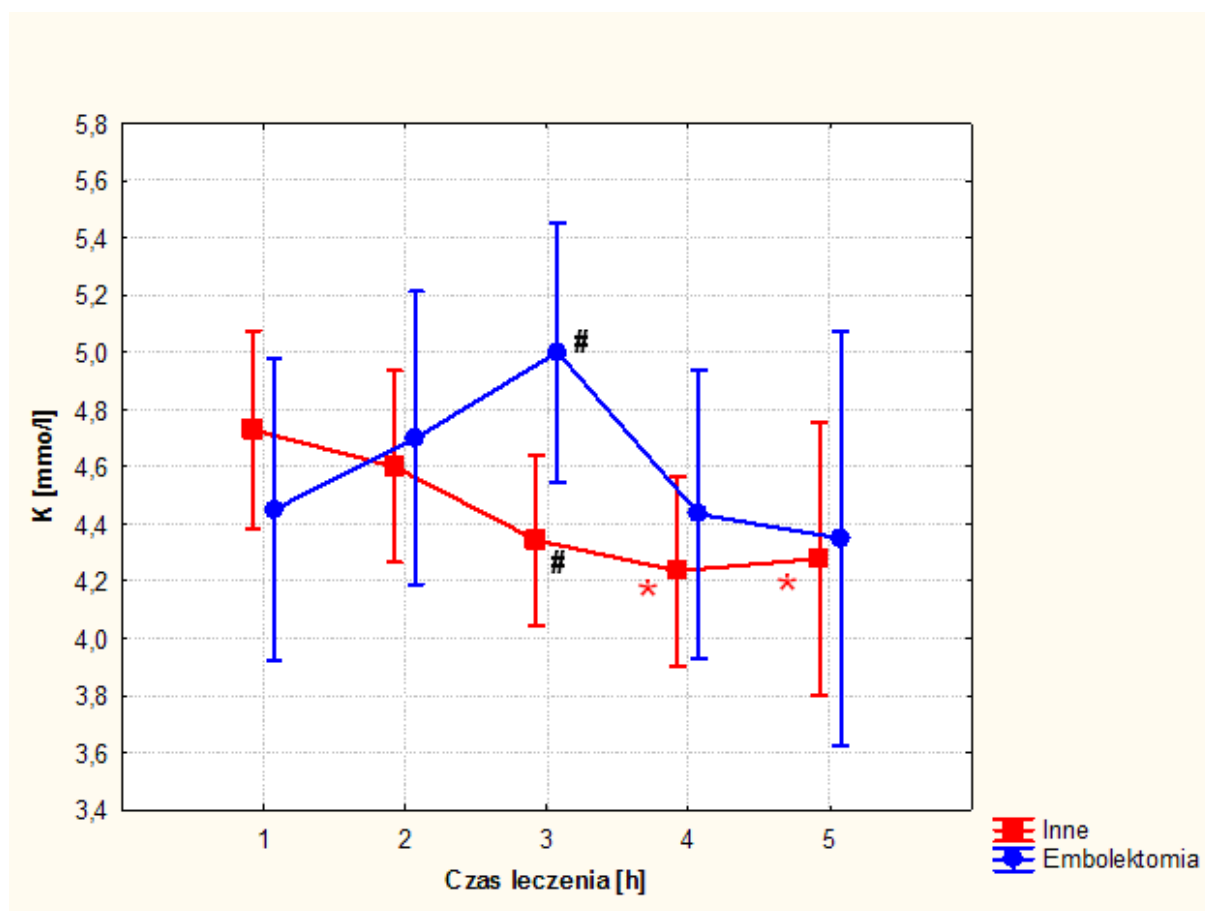
Rycina 29. Stężenie Na przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia (embolektomia, inne zabiegi rewaskularyzacyjne tętnic kończy dolnych).



Legenda:

# - istotność statystyczna między stężeniami Na w obu grupach: embolektomia i inne zabiegi rewaskularyzacyjne w pomiarze 3 i 4 (Test U Manna-Whitneya,  $p < 0,05$ ).

Rycina 30. Stężenie K przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia (embolektomia, inne zabiegi rewaskularyzacyjne tętnic kończy dolnych).



Legenda:

\* - istotność statystyczna między 4 a 1; 5 a 1 pomiarem w grupie  $t < 12$  h (test Friedmana i wielokrotnych porównań,  $p < 0,05$ ).

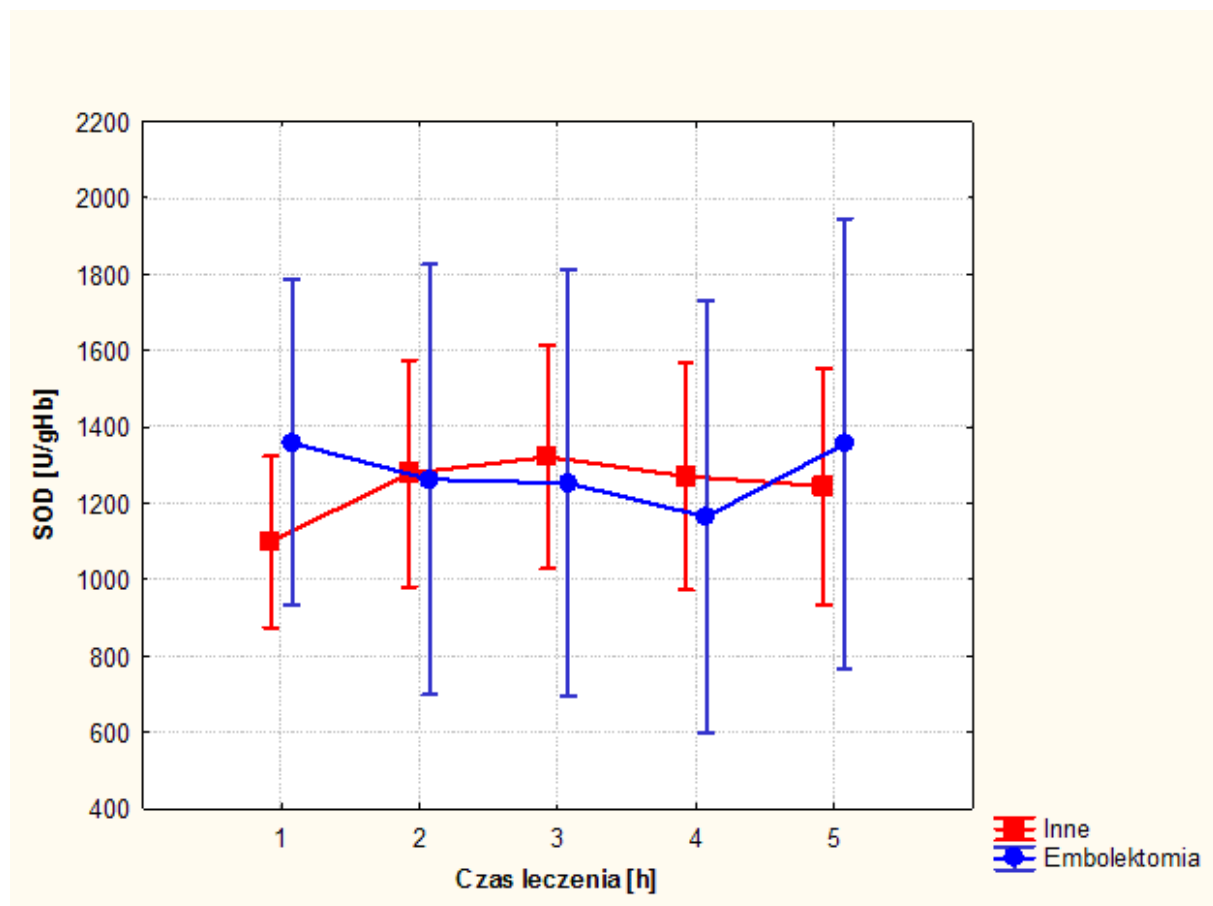
# - istotność statystyczna między stężeniami K w obu grupach: embolektomia i inne zabiegi rewaskularyzacyjne w pomiarze 3 (Test U Manna-Whitneya,  $p < 0,05$ ).

### 6.3.2. Aktywność SOD i GPx, wartości TAS i FRAP oraz stężenie CRP w trakcie leczenia ostrego niedokrwienia kończyn.

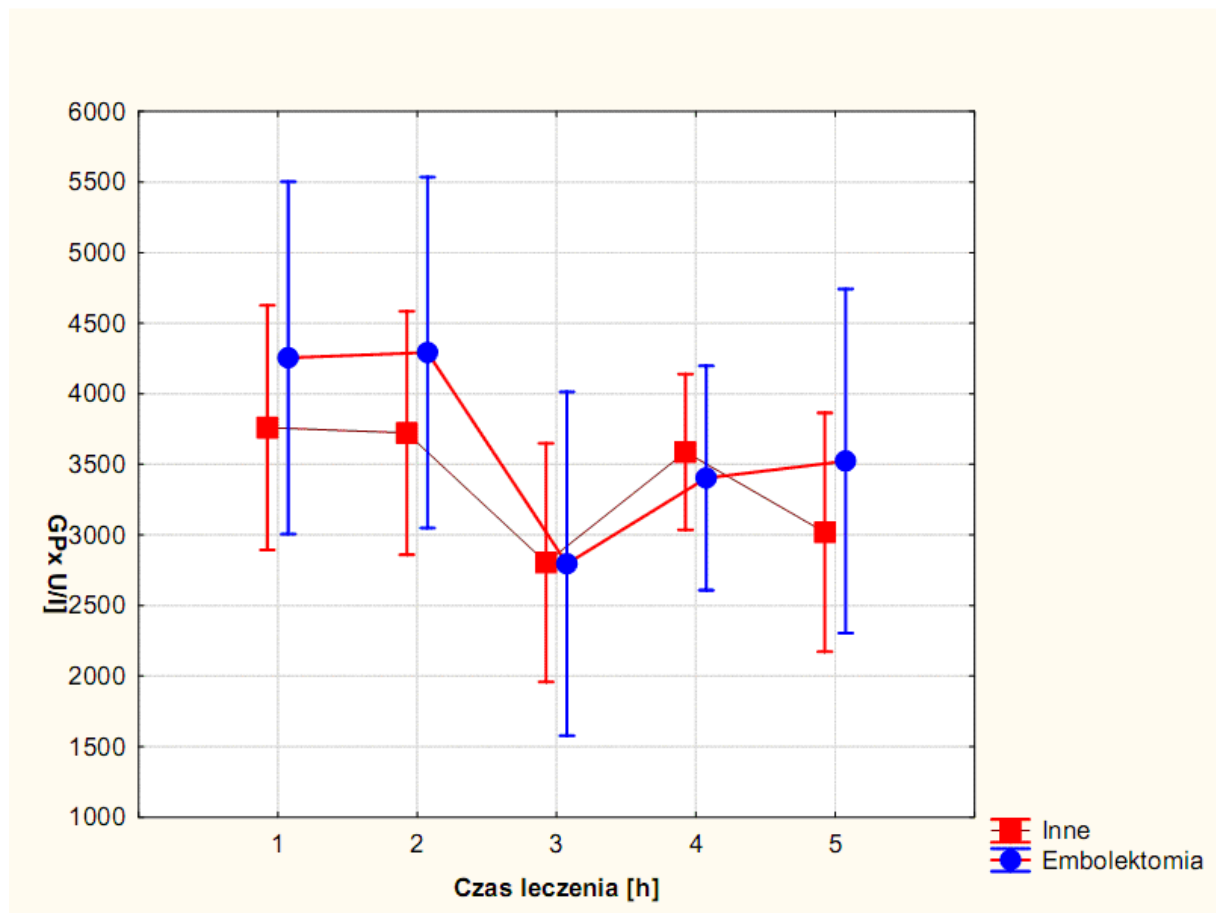
Aktywność SOD i GPx, wartości TAS i FRAP oraz stężenie CRP w trakcie leczenia ostrego niedokrwienia kończyn zostały przedstawione na rycinach 31, 32, 33, 34 i 35 .

Nie zanotowano istotnych statystycznie zmian aktywności TAS, SOD, GPx i FRAP w trakcie leczenia ostrego niedokrwienia kończyn dolnych w zależności od rodzaju zabiegu ani pomiędzy nimi. Zanotowano istotne statystycznie zmiany stężenia CRP w trakcie leczenia ostrego niedokrwienia kończyn dolnych w obu ocenianych grupach.

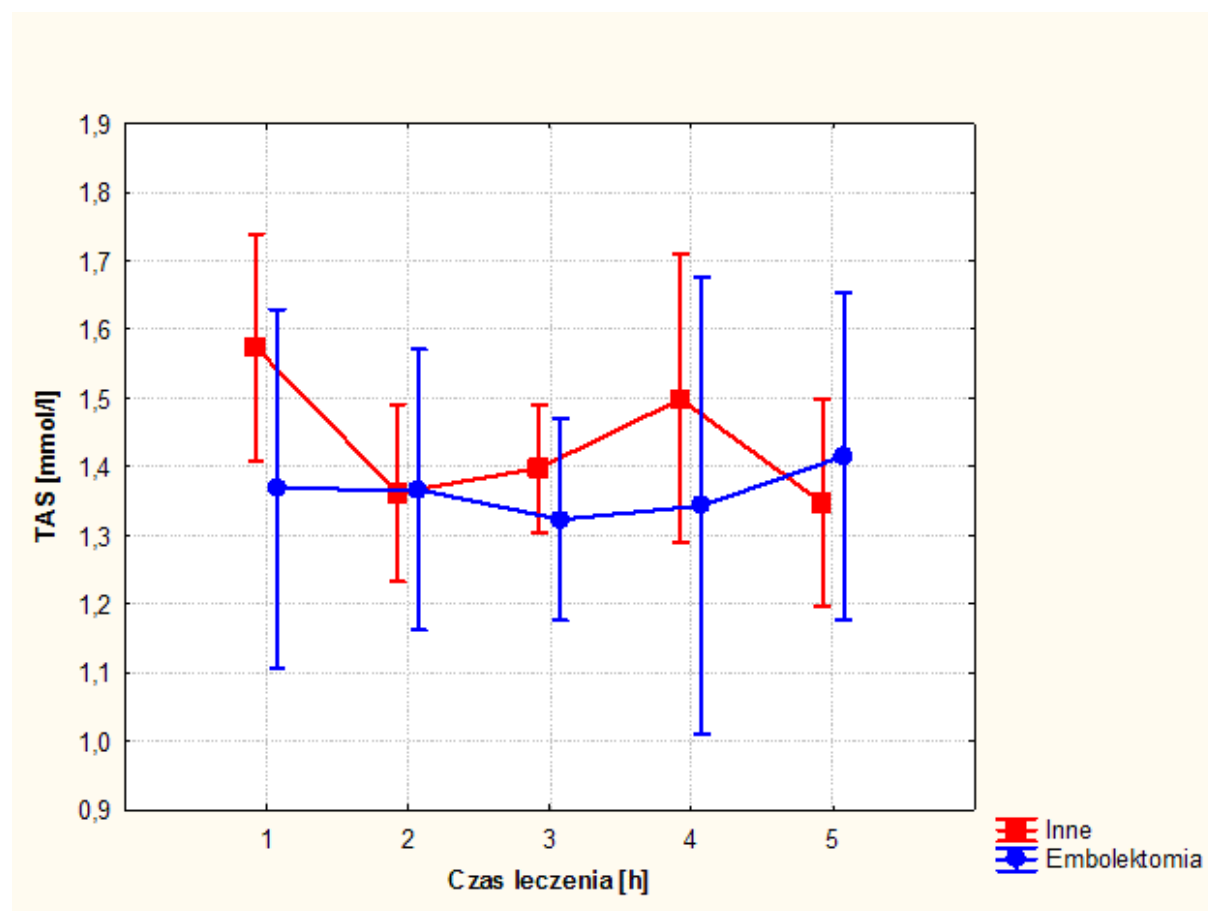
Rycina 31. Aktywność SOD przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia (embolektomia, inne zabiegi rewaskularyzacyjne tętnic kończy dolnych).



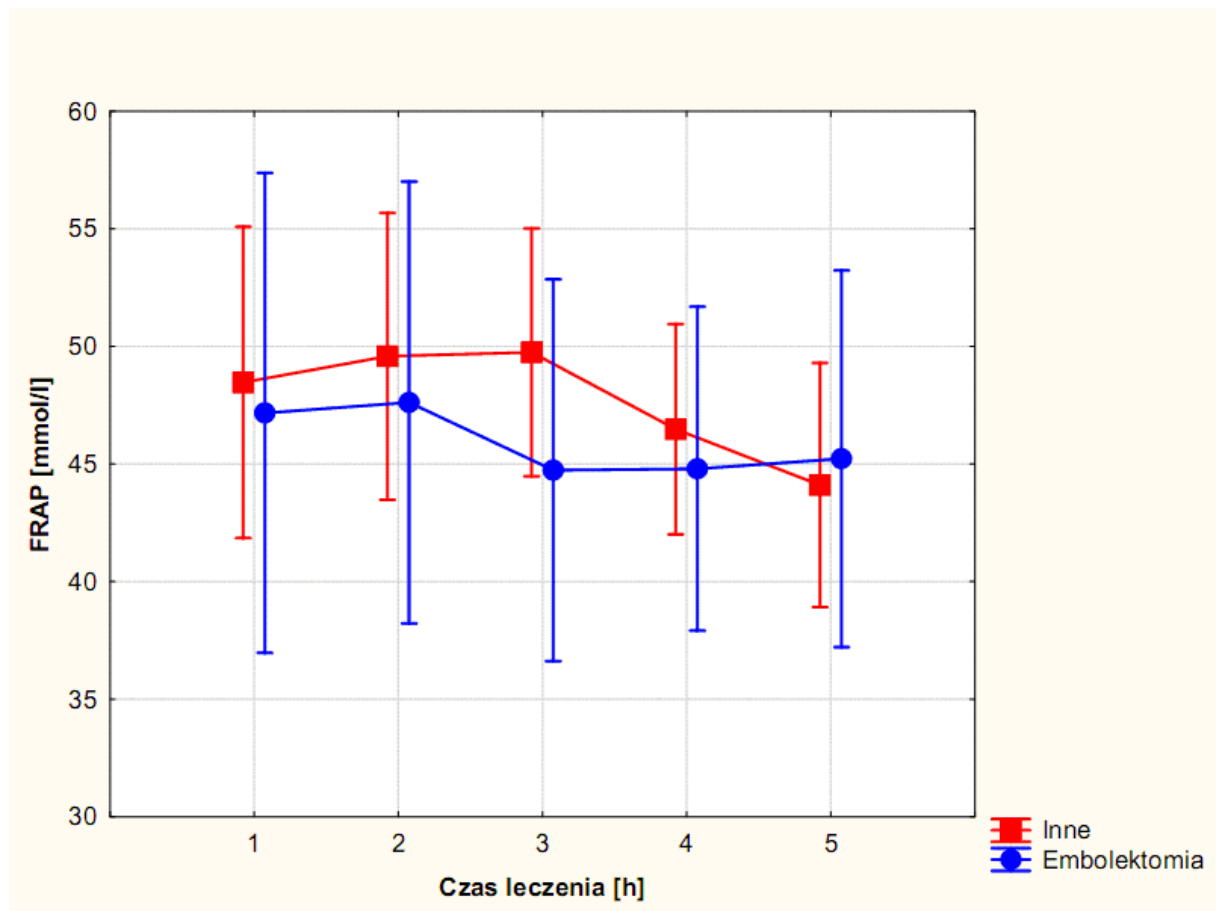
Rycina 32. Aktywność GPx przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia (embolektomia, inne zabiegi rewerskularyzacyjne tętnic kończy dolnych).



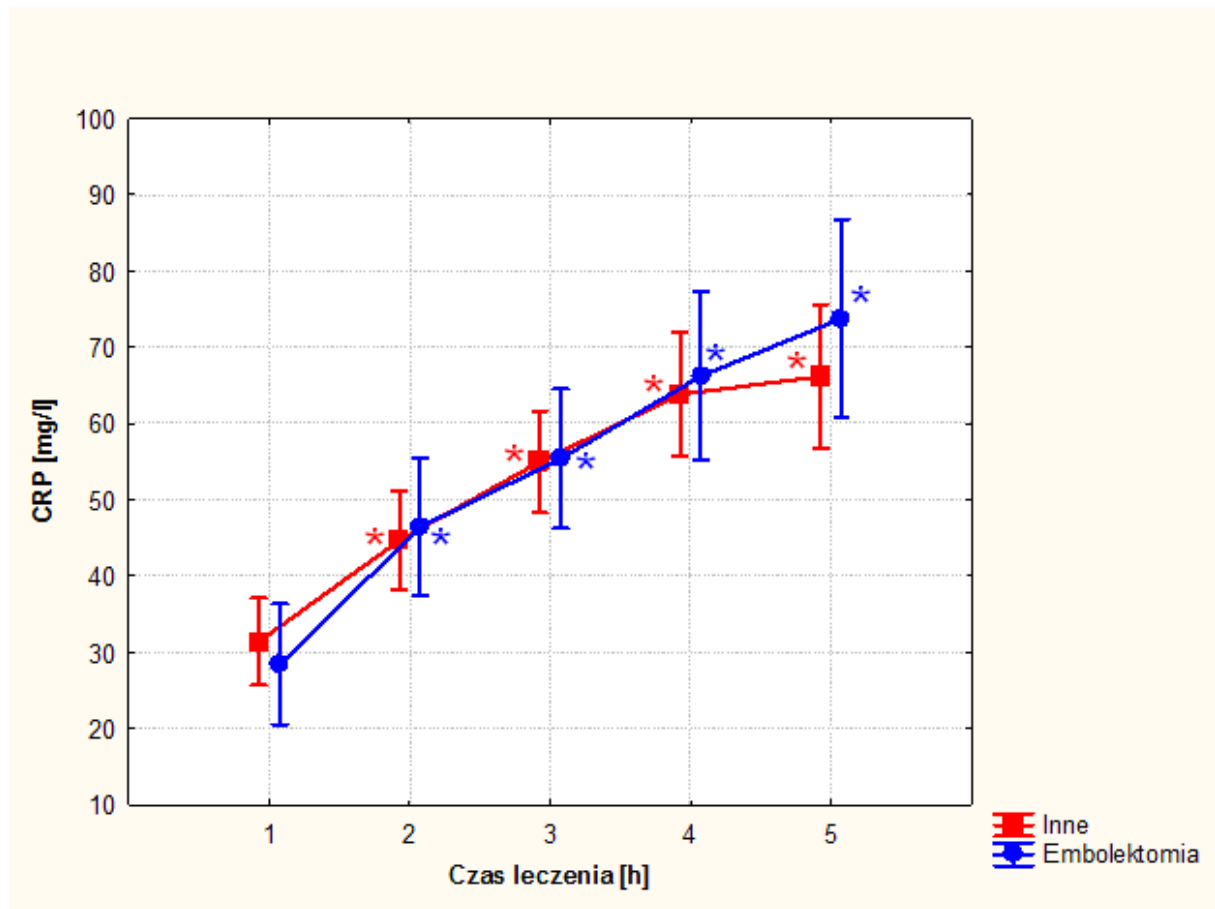
Rycina 33. Wartość TAS przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia (embolektomia, inne zabiegi rewaskularyzacyjne tętnic kończy dolnych).



Rycina 34. Wartość FRAP przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia (embolektomia, inne zabiegi rewaskularyzacyjne tętnic kończy dolnych).



Rycina 35. Stężenie CRP przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia (embolektomia, inne zabiegi rewerskularyzacyjne tętnic kończy dolnych).



Legenda:

\* - istotność statystyczna między 2 a 1, 3, 4, 5; 3 a 1, 2, 4, 5; 4 a 1, 2, 3; 5 a 1, 2, 3 pomiarem w grupie  $t < 12$  h (test Friedmana i wielokrotnych porównań,  $p < 0,05$ ).

\* - istotność statystyczna między 2 a 1, 3, 4, 5; 3 a 1, 2, 4, 5; 4 a 1, 2, 3, 5; 5 a 1, 2, 3, 4 pomiarem w grupie  $t \geq 12$  h (test Friedmana i wielokrotnych porównań,  $p < 0,05$ ).

Analizowano również stężenie  $Mg_{całk}$ ,  $Mg_i$ ,  $Ca_{całk}$ ,  $Ca_i$ , Na i K, wartość TAS i FRAP, aktywność SOD i GPx oraz stężenie CRP w zależności od przyczyny ostrego niedokrwienia. Nie wykazano istotnych statystycznie różnic pomiędzy wyżej wymienionymi parametrami w czasie leczenia ONK, ani pomiędzy grupami.



## 7. Omówienie.

Ostre niedokrwienie kończyn (ONK) jest jednostką chorobową, która generuje duże koszty leczenia, a następnie rehabilitacji i opieki z powodu zaistniałego kalectwa [30, 98]. Nie chodzi tutaj jedynie o utratę kończyny, ale również o powikłania ogólnoustrojowe, takie jak: ostra niewydolność nerek, ostra niewydolność oddechowa, a nawet niewydolność wielonarządowa. Tylko szybka rewaskularyzacja chroni pacjenta przed rozwojem powikłań związanych z zespołem reperfuzji i martwicą niedokrwionych tkanek. Liczba incydentów ONK nie maleje jednak mimo postępów w profilaktyce i leczeniu ONK [78, 79].

Odpowiednia klasyfikacja objawów ostrego niedokrwienia kończyn ułatwia postępowanie oraz leczenie pacjentów z ONK. Do oceny klinicznego zaawansowania ONK powszechnie zalecana jest klasyfikacja SVS/ISCVS [97]. Jednakże ostre rozgraniczenie między kategorią IIB a III jest w praktyce bardzo trudne, ponieważ nasilenie zmian niedokrwiennych zmienia się w sposób ciągły, a nie skokowy. Co więcej w kategorii III nie ma adekwatnego sposobu oceny żywotności tkanek, dlatego nie można przewidzieć, nawet mając spore doświadczenie kliniczne, czy niedokrwienie jest odwracalne i czy można uratować stopę lub całą kończynę, jeśli wdroży się szybko skuteczne leczenie rewaskularyzacyjne. W mojej obserwacji wdrożenie leczenia operacyjnego wśród pacjentów zakwalifikowanych do III kategorii pozwoliło na uratowanie 83% (15) kończyn. Podobne spostrzeżenia mieli Blaisdell [10], Braithwaite [11] i Campbell [12].

Leczenie przyczynowe polega na przywróceniu drożności naczynia i przepływu krwi. Obecnie dysponujemy wieloma technikami prowadzącymi do rewaskularyzacji niedokrwionej kończyny, zaczynając od klasycznych zabiegów operacyjnych (embolektomia i trombektomia), poprzez operacje rekonstrukcyjne tętnic kończyn dolnych (m.in. przeszczepy omijające z żył własnych i protez naczyniowych), a kończąc na gamie zabiegów wewnątrznacyniowych (CDT, PAT, PMT). W zależności od sytuacji klinicznej korzystne jest łączenie chirurgicznej rewaskularyzacji i zabiegów wewnątrznacyniowych. [12 ,61 ,66]. Leczenie przyczynowe jest skuteczne pod warunkiem, że czas niedokrwienia nie doprowadził w tkankach do nieodwracalnych zmian [78, 79, 109, 109]. Czas od momentu ustania przepływu krwi do wyczerpania zapasów energii w mięśniu poprzecznie prążkowanym wynosi kilka godzin, około 4-6 godzin [45, 78, 79, 109, 110], po czym rozpoczyna się destrukcja komórek. Im krótszy czas ostrego niedokrwienia, tym mniejsze ryzyko rozwoju pełnoobjawowego zespołu reperfuzji. Dlatego też ważne jest szybkie rozpoznanie i potwierdzenie ONK oraz prawidłowa ocena stopnia ONK. Czas pomiędzy przyjęciem do

Kliniki Chirurgii Ogólnej i Naczyń a rozpoczęciem zabiegu operacyjnego wynosił średnio 4 godziny i 15 minut. Czas między początkiem objawów ostrego niedokrwienia a zabiegiem operacyjnym wynosił średnio 20 godzin i 57 minut, a miało to związek z faktem, że pacjenci z ONK i współistniejącym PNKD i krążeniem obocznym mogą mieć mniej wyrażone objawy ostrego niedokrwienia, przez co do zgłaszają się do szpitala później.

Wśród 52 chorych z ONK przywrócono przepływ krwi z ustąpieniem objawów niedokrwienia w 49 kończynach uzyskując podobne rezultaty jak inni autorzy [61, 62, 66], chociaż na przykład Campbell w swojej pracy z 1999 roku podał, że w Wielkiej Brytanii i Irlandii odsetek amputacji z powodu ONK wyniósł 37% [12]. Podaje się, że śmiertelność w przebiegu ONK waha się od 10% do 26% [12, 30, 78], tymczasem w moich obserwacjach w czasie leczenia ONK zmarło 3 pacjentów, czyli 5,7%.

Pacjenci, którzy w przebiegu ostrego niedokrwienia kończyn dolnych stracili kończyny (3 pacjentów) oraz zmarli w obrazie niewydolności wielonarządowej (3 pacjentów), przy przyjęciu do szpitala prezentowali III stopień niedokrwienia i czas między początkiem objawów a zabiegiem rewaskularyzacyjnym wynosił  $\geq 12$  godzin. Warto podkreślić, że dzięki szybkiej interwencji u 61% pacjentów z III stopniem niedokrwienia skutecznie przywrócono ukrwienie w zagrożonej kończynie.

W przebiegu ONK ważne jest szybkie włączenie leczenia przeciwkrzepliowego oraz monitorowanie i leczenie zaburzeń gospodarki kwasowo-zasadowej i wodnoelektrolitowej oraz parametrów funkcji nerek [38, 46]. Wszyscy pacjenci w grupie badanej mieli wykładniki kwasicy metabolicznej w gazometrii krwi włosniczkowej, przy czym wszyscy pacjenci z III stopniem mieli wykładniki kwasicy metabolicznej niewyrównanej, w stopniu niedokrwienia IIB kwasica metaboliczna była mniej nasiloną. Analiza gazometrii w trakcie leczenia ostrego niedokrwienia kończyn nie wykazała znamienych statystycznie różnic w powyższych parametrach, co może mieć związek z intubacją i mechaniczną wentylacją pacjentów w czasie znieczulenia oraz intensywnym wyrównywaniem zaburzeń równowagi kwasowo-zasadowej w okresie pooperacyjnym. Eliason [22] podkreśla wpływ stężenia kwasu mlekowego powstającego w czasie niedokrwienia w wyniku glikolizy beztlenowej na pogłębianie kwasicy metabolicznej oraz wskazuje, że podwyższenie jego stężenia jest niekorzystnym czynnikiem prognostycznym. Średnie stężenie kwasu mlekowego przed zabiegiem operacyjnym u pacjentów z ONK było powyżej wartości referencyjnych i było wyższe w stopniu niedokrwienia III niż w stopniu IIB. Natomiast po zabiegu operacyjnym monitorowano stężenie kwasu mlekowego i obserwowano w obu grupach jego powolny spadek, co może świadczyć o skuteczności zastosowanego leczenia. Średnie stężenie

kreatyniny w grupie badanej przed zabiegiem operacyjnym było powyżej wartości referencyjnych. Po zabiegu operacyjnym stężenie kreatyniny było wyższe w stopniu niedokrwienia III niż IIB oraz obserwowano normalizację stężenia kreatyniny w obu grupach po 48 godzinach. 98% pacjentów z ONK otrzymało w trakcie diagnostyki środek kontrastowy, przez co trudno stwierdzić, czy na przedoperacyjny wzrost stężenia kreatyniny był wynikiem ostrego niedokrwienia, czy też obu powyższych czynników jednocześnie[108]. W przeprowadzonej pracy parametry stresu oksydacyjnego badane u pacjentów z ONK potwierdziły, że produkcja wolnych rodników rozpoczyna się jeszcze w okresie niedokrwienia, natomiast apogeum produkcji ma miejsce w okresie reperfuzji [4, 20, 59], co zobrazował w przeprowadzonych badaniach istotny statystycznie spadek aktywności antyoksydacyjnej osocza, wyrażonej za pomocą wartości TAS i FRAP, w okresie pooperacyjnym. Spadek wartości TAS i FRAP miał związek ze stopniem niedokrwienia oraz czasem niedokrwienia. O wzmożonej produkcji wolnych rodników świadczy także wzrost aktywności mechanizmów antyoksydacyjnych, w tym aktywności GPx i SOD. Aktywność SOD wzrastała w stosunku do wartości obserwowanych przed zabiegiem operacyjnym, podobnie zachowywała się GPx . Aktywność SOD i GPx miała związek ze stopniem niedokrwienia i czasem ONK. Podobne zmiany aktywności antyoksydacyjnej zostały potwierdzone w przebiegu ostrego niedokrwienia mięśni, mózgu, jelit w modelach eksperymentalnych in vivo [4, 22, 32, 41, 45].

Monitorowanie stężenia CRP (białko ostrej fazy będące wyrazem odpowiedzi zapalnej), wykazało jego podwyższone i narastające wartości, które korelowały z stopniem i czasem ONK, co zostało udowodnione w wielu wcześniejszych badaniach [52, 53, 65].

Rola szybkiej rewaskularyzacji w ONK jest niepodważalna, natomiast wyzwaniem w leczeniu ONK a zwłaszcza zapobieganiu zespołowi niedokrwienie-reperfuzja, są poszukiwania farmakoterapii, która działałaby ochronnie na niedokrwione tkanki. Z wielu badań wynika, że nie ma jednego związku, który zahamowałaby rozwój zespołu reperfuzji. Dlatego stosuje i prowadzi się badania nad wieloma związkami, które mają zmniejszać stres oksydacyjny, działać przeciwzapalnie, przeciwkrzepliwie i immunomodulująco. Substancje o potencjalnie korzystnym wpływie na przebieg zespołu niedokrwienie-reperfuzja to: statyny, steroidy, iloprost, cyklosporyna A, azatiopryna, enlimobab, L-arginina, mannitol, witamina C, diannexyna [17, 45, 97].

Statyny są uznaną grupą leków o ugruntowanej efektywności i bezpieczeństwie, stosowane w profilaktyce wtórnej wielu chorób sercowo-naczyniowych [1, 97]. Statyny mają korzystny efekt na gospodarkę lipidową oraz zdolność zwiększania aktywności e-NOS w endotelium,

przez co hamuje produkcję cytokin, molekuł adhezyjnych i nadtlenków. Statyny wpływają również na ciężkość zespołu reperfuzji poprzez inhibicję produkcji MMP-9 przez śródbłonek naczyń i makrofagi. Podanie simvastatyny w modelu niedokrwienia kończyny szczura zmniejszyło nasilenie zespołu niedokrwienie-reperfuzja na podstawie zmniejszenia infiltracji neutrofilów w niedokrwionym mięśniu i narządach odległych, jak płuca, nerki, jelita [17]. Wszyscy pacjenci z ONK w moim badaniu otrzymywali preparat simvastatyny w trakcie leczenia.

Inny czynnik mogący mieć korzystny wpływ na przebieg leczenia ONK to L-arginina. Ten aminokwas jest prekursorem w syntezie tlenu azotu. Wykazano, że suplementacja L-argininy przed i po niedokrwieniu wywołanym okresowym zamknięciem przepływu przez duże naczynia kończyny tylnej szczura stabilizuje strukturę cNOS, obniża produkcję anionorodnika ponadtlenu azotu i zwiększa produkcję tlenu azotu. Skuteczność L-argininy nie została potwierdzona w badaniach klinicznych [45].

W ONK u pacjentów z zachowaną diurezą można stosować mannitol wykorzystując jego działanie nefroprotekcjne. Mannitol, jako środek osmotycznie czynny, zwiększa filtrację kłębkową na drodze diurezy osmotycznej. Nasilenie diurezy w trakcie leczenia ONK przyspiesza wydalanie czynników nefrotoksycznych. Nefroprotekcjne działanie mannitolu obserwuje się w ciągu pierwszych 48 godzin leczenia, ponieważ długotrwałe podawanie zwiększa objętość wewnątrznacyniową, zwiększa rzut i kurczliwość serca, co w rezultacie może nasilić objawy niewydolności serca. Podawanie mannitolu ma pozytywny wpływ na zmniejszenie obrzęku niedokrwionych tkanek, poprzez zmniejszenie ciśnienia śródtkankowego. Ze względu na brak wystarczających dowodów naukowych na skuteczność mannitolu, nie zaleca się go stosować rutynowo [26, 92]. W moim badaniu mannitol stosowano u pacjentów z ONK i skąpomoczem. Kiris i współ. stwierdzili, że analog prostaglandyny ( $PGI_2$ ), iloprost, działa nefroprotekcjnie w zespole reperfuzji wywołanej zakłewaniem aorty w czasie operacji tętniaka aorty brzusznej [42]. Inne działanie nefroprotekcjne polega na alkalizacji moczu, ponieważ w pH zasadowym zwiększa się rozpuszczalność mioglobiny i jej wydalanie z moczem. Poza tym zasadowe pH utrzymuje mioglobinę w stabilnej formie, mniej wrażliwej na stres oksydacyjny [46]. U moich pacjentów z ONK podawano 8,4-procentowy wodorowęglan sodu pod kontrolą pH moczu między od 6,5 do 7,6. Jeśli w przebiegu leczenia dojdzie do ostrej niewydolności nerek (kryteria mocznik  $>60$  mmol/l, pH  $<7,1$ ,  $K^+$   $> 6,5$  mmol/l) kluczowym staje się podjęcie leczenia nerkozastępczego. [46]

Duże nadzieje pokładano w związkach immunomodulujących, które miałyby hamować interakcję między leukocytami a śródbłonkiem. Okazało się, że próby stosowania sterydoterapii i leków immunosupresyjnych, tj.: azatiopryna i cykloporyna A, zawiodły ze względu na poważne działania uboczne. Dzisiaj powyższe leki nie znajdują zastosowania w leczeniu zespołu niedokrwienie-reperfuzja [4, 37]. Natomiast trwają badania nad przeciwciałami przeciwko receptorom i ich ligandom lub inhibitorom odpowiedzialnym za aktywację i adhezję leukocytów do śródbłonka naczyń. Przykładem przeciwciała receptora ICAM-1 jest enlimobab [4, 23].

Innym związkiem, który zmniejsza interakcję między śródbłonkiem naczyń a leukocytami, ale nie ma właściwości immunogennych, jest diannexyna. Jej korzystny wpływ na leczenie ostrego niedokrwienia potęgują właściwości przeciwkrzepliwe diannexyny. Jednakże jej skuteczność nie została potwierdzona klinicznie [58].

W zespole reperfuzji szeroko stosuje się tzw. wymiatacze wolnych rodników. Najczęściej stosuje się witaminę C, choć jej skuteczność w zapobieganiu rozwojowi i powikłaniom zespołu reperfuzji nie zostało potwierdzone w badaniach klinicznych. Obecnie uważa się, że witamina C ma działanie adjuwantowe. [4, 5, 46]

Fizjologicznie u ludzi zdrowych hypomagnezemia występuje niezwykle rzadko [44]. Dowiedziono w wielu pracach, że hypomagnezemia jest ściśle powiązana z chorobami naczyń, a zwłaszcza wszelkimi manifestacjami uogólnionej miażdżycy: dusznicą bolesną, nadciśnieniem tętniczym, PNKD, a także zaburzeniami rytmu serca i zwiększonym ryzykiem incydentów naczyniowych. Iskra i wsp. badali stężenie pierwiastków śladowych, w tym Mg, oraz wykładniki odpowiedzi zapalnej u pacjentów PNKD przed i po zabiegu operacyjnym i wykazali, że u pacjentów z krytycznym niedokrwieniem kończyny mieli niższy średnie stężenie  $Mg_{\text{całk}}$  ( $0,78 \pm 0,24$  mmol/l) w surowicy krwi niż pacjenci z umiarkowaną miażdżycą tętnic kończyn dolnych oraz osób z grupy porównawczej. U pacjentów z krytycznym niedokrwieniem kończyn przed i w czwartej dobie po zabiegu średnie stężenie  $Mg_{\text{całk}}$  rosło i odpowiednio wynosiło:  $0,80 \pm 0,20$  mmol/l i  $0,83 \pm 0,25$  mmol/l [35].

O ile wpływ stężenia jonów magnezu na patogenezę i przebieg przewlekłych chorób naczyniowych jest udowodniony wieloma badaniami, o tyle nie ma doniesień dotyczących stężenia jonów magnezu w trakcie ONK. Istnieje wiele przesłanek, że prawidłowe stężenie magnezu może działać ochronnie w przebiegu ONK [71, 75]. Przykładowo udowodniono modulujący wpływ jonów Mg na komórki mięśnia sercowego w czasie reperfuzji obserwowanej u pacjentów z zawałem serca, u których suplementowano dożylnie siarczan magnezu [18, 34, 57, 77, 87, 88].

W przedstawionej pracy u pacjentów z ONK w stopniu niedokrwienia IIB średnie stężenie  $Mg_{całk}$  przed zabiegiem operacyjnym było na dolnej granicy wartości referencyjnych, zwłaszcza u pacjentów z bardziej zaawansowanymi objawami ostrego niedokrwienia (III). Po rewaskularyzacji w obu grupach: IIB i III obserwowano hypomagnezemię i ponad to zanotowano istotny statystycznie spadek stężenia  $Mg_{całk}$  w grupie pacjentów z III stopniem ostrego niedokrwienia po 48 godzinach od operacji. Jeżeli czas niedokrwienia trwał dłużej niż 12 godzin stężenie  $Mg_{całk}$  utrzymywało się poniżej wartości referencyjnych. U pacjentów poddanych zabiegom innym niż embolektomia stężenie  $Mg_{całk}$  spadało poniżej wartości referencyjnych po zabiegu operacyjnym, co mogło mieć związek z czasem trwania zabiegu (zwykle dłuższe niż embolektomia) oraz współistniejącymi zmianami miażdżycowymi. W przypadku stężenia  $Mg_i$  w stopniu IIB zanotowano wzrost stężenia  $Mg_i$  po 24 h od zabiegu operacyjnego w stosunku do wartości wyjściowej. Ponadto po 24 h od zabiegu operacyjnego różnica między stężeniami  $Mg_i$  w grupach IIB i III była istotna statystycznie. Zaobserwowano także spadek stężenia  $Mg_i$  wśród pacjentów z czasem niedokrwienia  $t \geq 12h$ , zwłaszcza po 12 i 48 h godzinach od zabiegu operacyjnego. U pacjentów z III stopniem niedokrwienia zanotowano spadek stężenia  $Mg_i$  w okresie pooperacyjnym, który nie był jednak istotny statystycznie. W grupie pacjentów poddanych innym zabiegom niż embolektomia zauważono spadek stężenia  $Mg_i$  po zabiegu operacyjnym, a następnie jego wzrost stężenia po 24 i 48 godzinach od zabiegu operacyjnego.

Ocena gospodarki magnezowej jest bardzo trudna, ponieważ tylko 1% tego pierwiastka jest obecny we krwi, a reszta w kościach i tkankach miękkich. W praktyce klinicznej oceniając gospodarkę magnezową używa się stężenia  $Mg_{całk}$  i  $Mg_i$  w surowicy oraz stężenia Mg w krwinkach czerwonych [35, 36]. Najbardziej adekwatny jest pomiar stężenia magnezu wewnątrzkomórkowego. Odnotowano próby badania stężenia Mg wewnątrzkomórkowego za pomocą stabilnego izotopu magnezu, który pozwala na jednoczesny pomiar napływu i wypływu Mg przez ścianę erytrocytów [24]. Oznaczanie stężenia  $Mg_i$  w codziennej praktyce jest jednak problematyczne ze względu na brak wystandaryzowanej metody oznaczenia stężenia  $Mg_i$  za pomocą elektrod selektywnych [20]. Dlatego warto przytoczyć pracę Witkowskiego i wsp., w której autorzy oceniali czułość poszczególnych biomarkerów gospodarki magnezowej w populacji i stwierdzili, że w obliczu braku wystandaryzowanej metody oznaczania stężenia  $Mg_i$ , badanie stężenia  $Mg_{całk}$  w surowicy i osoczu jest przydatną metodą odzwierciedlającą stan gospodarki magnezowej organizmu [107].

Z naszego badania wykluczaliśmy pacjentów ze współtowarzyszącą cukrzycą, niewydolnością nerek, przyjmujących preparaty magnezu magnezu. U pacjentów z cukrzycą

typu II stężenie  $Mg_i$  jest obniżone, co ma związek ze zjawiskiem insulinooporności oraz hamowaniem funkcji kinazy tyrozynowej i receptorów dla insuliny [96]. U pacjentów z PNN obserwuje się łagodną hipermagnezemię ze względu na głównie nerkową drogę usuwania pierwiastka. Natomiast u chorych dializowanych stężenia  $Mg_{całk}$  i  $Mg_i$  są obniżone. Stężenie Mg w surowicy krwi u chorych dializowanych reguluje się dobierając odpowiednie stężenie Mg w płynie dializacyjnym. Przez błony dializacyjne przechodzi tylko magnez zjonizowany i sole magnezowe. [56, 105]

Bardzo istotny jest wzajemny stosunek stężenia i metabolizmu jonów Mg i Ca. Można powiedzieć, gdyż te dwa pierwiastki zachowują się antagonistycznie w stosunku do siebie. Jony magnezu wpływają na biodostępność jonów Ca i odwrotnie [81, 83]. Przykładowo stężenie  $Ca_c$  w niedokrwieniu dłuższym niż 12 godzin wzrastało znamienne po 24 godzinach od reperfuzji, podczas gdy stężenie  $Mg_c$  utrzymywało się poniżej wartości referencyjnych.

Jony Mg mają istotny wpływ na wychwytywanie jonów Ca, ich dystrybucję i zawartość w komórkach mięśni gładkich naczyń, działając jako słaby bloker kanałów wapniowych poprzez modulację ich aktywności. Komórki mięśniówki gładkiej ściany naczyń i endotelium produkują m.in. prostaglandyny, które są wasodylatorami oraz hamują funkcje płytek. Produkcja prostaglandyn jest stymulowana przez wzrost stężenia wapnia w cytozolu. Z kolei jony Mg modulują napływ wapnia do przestrzeni wewnątrzkomórkowej oraz uwalniają jego wewnątrzkomórkowe zasoby. Utrzymanie fizjologicznego stężenia magnezu we krwi jest więc ważne w regulacji napięcia naczyniowego [84]. Jony Mg mogą również hamować przemiany kolagenu poprzez współzawodniczenie z wapniem o wapniowo zależną fosfatazę [100]. Innym przykładem współzależności między jonami Mg i Ca jest białko TRPM7 (ang. transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 7), które jest kanałem jonowym, ale ma również właściwości kinazy serynowo-treoninowej. Aktywacja kanału jonowego zachodzi pod wpływem wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca i pomaga regulować gospodarkę magnezową (transport  $Mg_i$  i Mg-ATP) [80]. W przeprowadzonych badaniach stężenie  $Ca_{całk}$  u pacjentów z czasem niedokrwienia powyżej 12godzin znamienne rośnie po 24 godzinach od reperfuzji.

Magnez to także ważny kofaktor metabolizmu lipidów, jego niskie stężenie inaktywuje poprzez fosforylację reduktazę HMG-CoA, LCAT i lipazę lipoproteinową [70].

Magnez pełni ważną rolę w utrzymaniu integralności śródbłonna naczyń i przylegania komórek śródbłonna do siebie, co potwierdził in vitro Dong i współpracownicy, którzy dowiedli, że hodowla komórek śródbłonna obmywana przez system przepływu imitujący prąd krwi, ale pozbawiony magnezu, ulegała destrukcji. Co więcej w udowodnili,

że hypomagnezemia zwiększa uwalnianie czynnika von Willebranda z uszkodzonego endotelium oraz wyzwolonej hypomagnezemią odpowiedzią zapalną. Dodatkowo hypomagnezemią zwiększa agregację płytek i ich przyleganie do odsłoniętej błony podstawnej [20, 60].

Opisane powyżej zjawiska świadczą o tym, że jony magnezu mogą mieć potencjalny wpływ na przebieg zespołu niedokrwienie i reperfuzji [81, 83, 85, 108].

Zespół niedokrwienie-reperfuzja stanowi poważny problem w przebiegu niedokrwienia kończyn. Prawdopodobieństwo jego rozwoju wzrasta wprost proporcjonalnie do stopnia i czasu niedokrwienia oraz masy niedokrwionych tkanek. Wystąpienie zespołu niedokrwienie-reperfuzja indukuje kaskadę niekorzystnych reakcji, mogących doprowadzić do niewydolności narządów odległych, jak płuca, nerki, a nawet niewydolności wielonarządowej i śmierci. Biorąc pod uwagę wielokierunkowe działanie jonów magnezu, wydaje się, że ich suplementacja w trakcie leczenia ONK, może być uzasadniona.



## 8. Wnioski.

1. U wszystkich chorych z ostrym niedokrwieniem kończyn stężenie magnezu całkowitego w osoczu było poniżej wartości referencyjnych przed zabiegiem operacyjnym. Nasilenie stopnia niedokrwienia i dłuższy czas trwania niedokrwienia miał wpływ na dalsze obniżenie stężenia magnezu całkowitego po rewaskularyzacji tętnic kończyn dolnych. U chorych z dłuższym czasem trwania niedokrwienia obserwowano także obniżenie stężenia magnezu zjonizowanego po zabiegu przywracającym ukrwienie kończyn.
2. W ostrym niedokrwieniu kończyn obniżenie wartości TAS i FRAP oraz aktywności GPx po rewaskularyzacji wskazuje na związek potencjału antyoksydacyjnego organizmu ze stopniem i czasem trwania ostrego niedokrwienia.
3. Zespół niedokrwienie-reperfuzja indukował uogólnioną odpowiedź zapalną, czego wyrazem był wzrost stężenia białka C-reaktywnego obserwowany przed i po rewaskularyzacji, który korelował ze stopniem i czasem trwania ostrego niedokrwienia kończyn.

## 9. Piśmiennictwo.

1. ACC/AHA guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease (lower extremity, renal, mesenteric, and abdominal aortic). *Journal of the American College of Cardiology*, 2006; 47: 1239-1312.
2. Ames A. et al. Cerebral ischemia. The no-reflow phenomenon. *Am J Pathol.* 1968; 52:437-53.
3. Amighi J., Sabeti S., Schlager O., Mlekusch W., Exner M., Lalouschek W., Ahmadi R., Minar E., Schillinger M. Low magnesium predicts neurological events in patients with advanced atherosclerosis, *Stroke*, 2004, 22-27.
4. Askar I., Bozkut M. Protective effects of immunosuppressants and steroids against ischemia-reperfusion injury in cremaster muscle flap at microcirculatory level. *Microsurgery.* 2002;22(8):361-6.
5. Bartosz G., *Druga twarz tlenu*, PWN 2004.
6. Belch J.J. et al., Critical issues in peripheral arterial disease detection and management: a call to action. *Arch Intern Med.* 2003 Apr 28;163(8):884-92.
7. Bernardini D., Mazur A., Maier J. Molecular mechanisms of magnesium in atherosclerosis, *Journal of Elementology*, 2004, vol. 10, 4, Suppl. 1.
8. Berridge D.C., Kessel D., Robertson I. Surgery versus thrombolysis for acute limb ischaemia: initial management. *Cochrane Database Syst Rev* 2002; Issue 3:
9. Beyersdorf F., Schlensak Ch. Controller reperfusion after acute and persistent limb ischemia, *Seminars in Vascular Surgery*, 2009, Elsevier.
10. Blaisdell F.W., Steele M., Allen R.E. Management of acute lower extremity arterial ischemia due to embolism and thrombosis. *Surgery.* 1978;84:822-834.
11. Braithwaite B.D., Davies B., Birch P.A., et al. Management of acute leg ischemia in the elderly. *Brit J Surg.* 1998;85:217-220.
12. Campbell W.B., Rider B.M.F., Szymanska T.H. Current management of acute leg ischemia: results of audit by the Vascular Surgical Society of Great Britain and Ireland. *Brit J Surg.* 1999;85:1498-1503.
13. Castañeda F., Smouse H.B., Swischuk J.L., et al. Pharmacological thrombolysis with use of the brush catheter in canine thrombosed femoropopliteal arterial PTFE bypass grafts. *J Vasc Interv Radiol.* 2000;11:503-508.
14. Christensen C.W., Rieder M., Silverstein E.L., Gencheff N.E. Magnesium sulphate reduces myocardial infarct size when administered before but not after coronary reperfusion in a canine model. *Circulation.* 1995; 92: 2617-2621.
15. Comerota A.J., Gravett M.H. Do randomized trials of thrombolysis versus open revascularization still apply to current management: what has changed?, *Seminars in Vascular Surgery*, 2009, Elsevier.
16. Comerota A.J., Sidhu R. Can intraoperative thrombolytic therapy assist with the management of acute limb ischemia, *Seminars in Vascular Surgery*, 2009, Elsevier.
17. Cowled P.A., Khanna A., Laws P.E., Field J.B.F., Varelias A., Fitridge A.A., Statins inhibit neutrophil infiltration in skeletal muscle reperfusion injury. *J Surg res* 2006; 141: 267-276.
18. Cybulski J., Budaj A., Danielewicz H., Macierewicz J., Ceremużyński L., Wystąpienie migotania przedsionków. Jak częste są niedobory potasu i magnezu?

Efekty potasu i magenzu we wlewie glukozy z insulina w przywracaniu rytmu zatokowego. *Kardiologia Polska* 2004; 60: 580-581.

19. Dashwood M.R., Volley A., Shi-Wen X., Abraham D.J., Souza D.S.R., Does preadventitial fat-derived nitric oxide play a role in improved saphenous vein graft patency in patients undergoing coronary artery bypass surgery?, *J Vasc Res* 2007; 44: 175-181.
20. Dewitte K et al. Reference intervals for serum total and ionized magnesium: Facts and fiction. *Advances in Magnesium Research: Nutrition and Health*, 2001: 241-4.
21. Dong J., Cruz M.A., Aboufatova K., Martin C., Choi H., Bergeron A.L., Martini S.R., Kroll M.H., Kent T.A., Magnesium maintains endothelial integrity, upregulates proteolysis of ultralarge von Willebrand factor, and reduces platelet aggregation under flow conditions. *Thromb Haemost* 2008; 99:586-593.
22. Eliason J.L., Wakefield Th.W., Metabolic consequences of acute limb ischemia and their clinical implications, *Seminars in Vascular Surgery*, 2009, Elsevier.
23. Enlimobab Acute Stroke Investigators. Use of anti-ICAM-1 therapy in ischemic stroke. *Neurology* 2001; 5: 1428-1424.
24. Feillet-Coudray C., Nasulewicz A., Jaffrelo L., Thien S., Coudray C., Rambeau M, Gueux E., Rayssiguier Y., Opolski A., Wolff F.I., Mazur A., Erythrocyte magnesium influx and efflux in solid tumor bearing mice, *Magnesium Research* 2005, 18 (2):103-108.
25. Fogarty T.J., Cranley J.J., Krause R.J. et al. A method for extraction of arterial emboli and thrombi. *Surg Gynecol Obstet*. 1963;116:241-244.
26. Gelman S., Does Mannitol save the kidney? *Anesth Analg* 1996;82:899-901.
27. Gossage J.A., Ali T., Chambers J., Burnand K.G. Peripheral arterial embolism: prevalence, outcome, and the role of echocardiography in management. *Vasc and Endovasc Surgery* 2006; 40: 280-286.
28. Hamilton C.A. et al. Strategies to reduce oxidative stress in vascular diseases. *Clinical Science* (2004) 106, 219–234.
29. Harlan J.M. et al. Mechanism and consequences of leukocyte-endothelial interaction. *The Western Journal of Medicine*. 1991; 155:35-369.
30. Henke P.K., Contemporary management of acute limb ischemia: factors associated with amputation and in-hospital mortality, *Seminars in Vascular Surgery*, 2009, Elsevier.
31. Henry M., Amor M., Henry I., et al. The Hydrolyser thrombectomy catheter: a single-center experience. *J Endovasc Surg*. 1998;5(1):24-31.
32. Hoffmann H. et al. Microcirculatory alterations in ischemia-reperfusion injury and sepsis . *Critical care* 2005; 9:33-37.
33. Hopfner W, Vicol C, Bohndorf K, et al. Shredding embolectomy thrombectomy catheter for treatment of acute lower-limb ischemia. *Ann Vasc Surg*. 1999;13:426-435.
34. ISIS-4: a randomized factorial trial assessing early oral captopril, mononitrate, and intravenous magnesium sulfate in 58,050 patients with suspected myocardial infarction. *Lancet*. . 1995; 345: 669–685.

35. Iskra M., Barańkiewicz D., Majewski W., Pioruńska-Stolzmann M. Serum magnesium, copper, zinc concentration changes in lower limb ischemia and postoperative treatment, *Magnesium Research* 2005; 18 (4): 261-267.
36. Iskra M., Patelski J., Mielcarz G., Majewski W., Lewandowski K. Steżenie cholesterolu oraz wapnia, magnezu, cynku, miedzi w surowicy krwi w przebiegu lipidemii pokarmowej u chorych z miażdżycą tętnic. *B Mag* 1997; 2:81-87.
37. Kannerup A.S., Gronbaek H., Funch-Jensen P., Tonnesen E., Jorgensen R.L., Mortensen F.V. Cytokine changes during warm ischemia and reperfusion of the pig liver without preconditioning. *Eur Surg Res* 2009; 42:216-222.
38. Kasirajan K., Ouriel K. Management of acute lower extremity ischemia; treatment strategies and outcomes. *Curr Interv Cardiol Rep.* 2000;2:119-129.
39. Kasirajan K., Marek J.M., Longsfeld M. Mechanical thrombectomy as a first-line treatment for arterial occlusion. *Semin Vasc Surg.* 2001;14(2):123-131.
40. Keeling A.N. et al. Technical considerations for lower limb multidetector computed tomographic angiography *Vasc MED.* April 1, 2011 16:131-143
41. Kerrigan C.L., Scotland M.A. Ischemia reperfusion injury. *Microsurgery*; 1993;14, 165-175.
42. Kiris I., Tekin I., Yilmaz N., Sutcu R., Karahan N., Ocal A. Illoporst downregulates expression of adhesion molecules and reduces renal injury induced by abdominal aortic ischemia-reperfusion, *Ann Vasc Surg* 2009; 23:212-223.
43. Kokot F., Franek E. Zaburzenia gospodarki magnezowej. *Choroby przytarczyc. Choroby wewnętrzne. Medycyna Praktyczna* 2005; 2183-2185, 1183-1095.
44. Kotchen T.A., McCarron D.A. Dietary electrolytes and blood pressure: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association Nutrition Committee. *Circulation* 1998; 98: 613-7.
45. Krauss H., Jablecka A., Sosnowski P., Bogdanski P. Influence of L-arginine on the nitric oxide concentration and level of oxidative stress during ischemia-reperfusion injury in a rat model. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2009 Aug;47(8):533-8.
46. Kuźlan M. Intensywna terapia pod redakcją Kusza K. 2006:401-408.
47. Laurant P., Berthelot A. Influence of Magnesium on Vascular Function and Blood Pressure in Rats, *Advances in Magnesium Research* 2001, 327-332.
48. Lipinski B. Pathophysiology of oxidative stress in diabetes mellitus. *Journal of Diabetes and Its Complications.* 2001; 15 (4): 201-210.
49. Loffredo L., Pignatelli P., Cangemi R., Andreozzi P., Panico M.A., Meloni V., Violi F. Imbalance between nitric oxide generation and oxidative stress in patients with peripheral arterial disease: effect of an oxidant treatment, *J Vasc Surg*, 44 (3), 2006.
50. Maciejewski P., Bednarz B., Chamiec T., Górecki A., Łukaszewicz R., Ceremużyński L. Ostry zespół wieńcowy. Potas i magnez w surowicy a zaburzenia rytmu serca. *Kardiologia Pol* 2003; 59: 405-406.
51. Madamanchi NR et al. Oxidative stress and vascular diseases. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2005; 25: 29-38

52. Majewski W., Iskra M., Staniszewski R., Łaciak M., Mackiewicz A., Staniszewski R., The importance of ceruloplasmin oxidase activity in patients with chronic lower limb atherosclerotic ischemia. *International Angiology* 26 (4), 2007.
53. Majewski W., Łaciak M., Staniszewski R., Górny A., Mackiewicz A. C-reactive Protein and  $\alpha$ -1-acid Glycoprotein in monitoring of Patients with Acute Arterial Occlusion, *Eur J Vasa Surg* 5, 641-645, 1991.
54. Majewski W., Łaciak M., Staniszewski R., Górny A., Mackiewicz A. C-reactive Protein and  $\alpha$ -1-acid Glycoprotein in monitoring of Patients with Chronic Arterial Occlusion o lower limbs. *Eur J Vasa Surg* 7, 628-632, 1993.
55. Management of peripheral arterial disease (PAD). TransAtlantic Inter-Society Consensus (TASC). Section C: acute limb ischaemia, *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 2005; 19: S115-S143.
56. Massey L. Magnesium therapy for nephrolithiasis. *Magnesium research* 2005, 18 (2), 123-126.
57. Miller T. The role of magnesium in the prevention of coronary disease and other disorders. *The Magnesium* 1997, 594-621.
58. Molski M., Groth A., Wong A., Johan R., Siemionow M. Dianxyna – nowa opcja leczenia zespołu reperfuzji”. *Nowiny Lekarskie* 2007;76 supl.1 s.152
59. Nowak P., Olas B., Wachowicz B. Stres oksydacyjny w przebiegu hemostazy. *Postępy w biochemii* 56 (3), 239-248, 2010.
60. Nyby M.D., Abedi K., Smutko V., Eslami P., Tuck, M.L. Vascular angiotensin type 1 receptor expression is associated with vascular dysfunction, oxidative stres and inflammation in fructose-fed rats. *Hypertens Res* Vol. 30, No. 5 (2007).
61. Nypaver T.J., Whyte B.R., Endean E.D. et al. Nontraumatic lower-extremity acute arterial ischemia. *Am J Surg.* 1998;176:147-152.
62. O’Connell J.B., Quinones-Baldrich W.J. Proper evaluation of management of acute embolic versus thrombotic limb ischemia. *Seminars in Vascular Surgery* 2009, Elsevier.
63. Ouriel K., Shortell C.K., DeWeese J.A. et al. A comparison of thrombolytic therapy with operative revascularization in the initial treatment of acute peripheral arterial ischemia. *J Vasc Surg.* 1994;19:1021-1030.
64. Ouriel K., Veith F.J., Sasahara A.A. Thrombolysis or Peripheral Arterial Surgery (TOPAS) investigators. A comparison of recombinant urokinase with vascular surgery as initial treatment for acute arterial occlusion of the legs. *N Engl J Med.* 1998;338(16):1105-1111.
65. Owens Ch.D., Ridker P.M., Belkin M., Hamdan A.D, Pmposelli F., Logerfo F., Creager M.A., Conte M.S. Elevated C-reactive protein levels are associated with postoperative events in patients undergoing lower extremity vein bypass burglary. *J Vasc Surg* 45 (1): 2-9.
66. Pemberton M., Varty K., Nydahl S., et al. The surgical management of acute limb ischemia due to native vessel occlusion. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 1999;17:72-76.
67. Puppala S., Patel J. Acute limb ischaemia. *Imaging* (2009) 21, 109-121.
68. :Purvis J.R., Movahed A. Magnesium disorders and cardiovascular diseases. *Clin cardiolog* 5, 556-568, 1992.

69. Puzanowska-Tarasiewicz H., Kuźmicka L., Tarasiewicz M. Obrona organizmu przed reaktywnymi formami tlenu. *W lek*, 2009, 57,4; 248-256.
70. Randel E.W., Mathews M., Gadag V., Zhang H., Sun G. Relationship between serum magnesium values, lipids and anthropometric risk factors. *Atherosclerosis* 2008; 196:413-419.
71. Ravn HB, Moeldrup U, Brookes CIO, Ilkjaer LB, White P, Chew M, Jensen L, Johnsen S, Birk-Soerensen L, Hjortdal VE. Intravenous magnesium reduces infarct size after ischemia/reperfusion injury combined with a thrombogenic lesion in the left anterior descending artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999; 19: 569–574.
72. Reekers J.A., Kromhout J.G., Spithoven H.G. et al. Arterial thrombosis below the inguinal ligament: percutaneous treatment with a thrombosuction catheter. *Radiology*. 1996;198:49-53.
73. Results of a prospective randomized trial evaluating surgery versus thrombolysis for ischemia of the lower extremity. The STILE trial. *Ann Surg* 1994;220:251-266.
74. Rilinger N., Görlich J., Scharrer-Palmer R., et al. Short-term results with use of the Amplatz thrombectomy device in the treatment of acute lower limb occlusion. *J Vasc Interv Radiol*. 1997;8(3):343-348.
75. Ritto D., Lindeasay C., Grocott E., Hickey N., Downing R. Prognostic significance of raised cardiac troponin T in patients presenting with acute limb ischemia. *Eur J Vasc Surg* 32, 500-503, 2006.
76. Rowe V.L., Lee W., Weaver F.A. Acute arterial occlusion. *Seminars in Vascular Surgery*, 2009, Elsevier.
77. Rukshin V., Prediman K., Shah A., Cercek B., Finkelstein A., Tsang V., Kaul S. Comparative Antithrombotic Effects of Magnesium Sulfate and the Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Inhibitors Tirofiban and Eptifibatid in a Canine Model of Stent Thrombosis Circulation. 2002;105:1970-1975.
78. Rutherford R.B. Clinical staging of Acute Limb Ischemia as the Basis of Choice of Revascularization Method. *Seminars in Vascular Surgery*, 2009, Elsevier.
79. Rutherford R.B., Baker D.J., Ernst C., et al. Recommended standards for reports dealing with lower extremity ischemia: revised version. *J Vasc Surg*. 1997;26:517-538.
80. Ryuichi Takezawa R., Schmitz C., Demeuse P., Scharenberg A.M., Penner R., Fleig A. Receptor-mediated regulation of the TRPM7 channel through its endogenous protein kinase domain. 2004 by The National Academy of Sciences of the US.
81. Sacks F., Brown L.E., Appel L., et al. Combination of potassium, calcium and magnesium supplements in hypertension. *Hypertension* 1995; 26: 950-6.
82. Sam A.D. et al. Safety of gadolinium contrast angiography in patients with chronic renal insufficiency. *Journal of Vascular Surgery*. 2003: 38 (2):, 313-318.
83. Saris N.L., Mervaala E., Karppanen H., Khawaja J. A., Lewenstam A. Magnesium. An update on physiological, clinical and analytical aspects. *Clinica Chimica Acta* 294 (2000), 1-26.
84. Satake K., Lee J.-D., Shimizu H., Uzui H., Mitsuke Y., Yue H., Ueda T. Effects of magnesium on prostacyclin synthesis and intracellular free calcium concentration in vascular cells. *Magnesium Research* 2004; 17, 1, 20-27.
85. Schiffrin E.L., Touyz R.M. Calcium, magnesium and oxidative stress in hypoadosteronism, *Circulation* 2005, 111:830-831.

86. Seelig M. S. Cardiovascular consequences of magnesium deficiency and loss: pathogenesis, prevalence and manifestations. Magnesium and chloride loss in refractory potassium repletion. *American Journal of Cardiology* 63: 4G-21G, 1989.
87. Sharafuddin M.J., Hicks M.E., Jennson M.L. et al. Rheolytic thrombectomy with the Angiojet-F105 catheter: preclinical evaluation of safety. *J Vasc Interv Radiol.* 1996;7:445-449.
88. Shechter M., Hod H., Marks N., Behar S., Kaplinsky E., Rabinowitz B. Beneficial effect of magnesium sulfate in acute myocardial infarction. [Am J Cardiol](#) 1990 Aug 1;66(3):271–274.
89. Shechter M., Sharir M., Labrador M.J. et al. Oral magnesium therapy improves endothelial function in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2000, 102, 2353-8.
90. Shills M.E. Magnesium in health disease. *Ann Rev Nur*, 1989.
91. Silva J.A., Ramee S.R., Collins T.J. et al. Rheolytic thrombectomy in the treatment of acute limb-threatening ischemia: immediate results and six-month follow-up of the multicenter Angiojet registry. *Cathet Cardiovasc Diagn.* 1998;45:386-393.
92. Solomon R., Werner C., Mann D., D'Elia J., Silva P. Effects of Saline, Mannitol, and Furosemide on Acute Decreases in Renal Function Induced by Radiocontrast Agents. *N Engl J Med* 1994; 331:1416-1420.
93. Sottirai V., White J.V. Extensive revascularization or primary amputation: Which patients with critical limb ischemia should not be revascularized? *Seminars in Vascular Surgery*, 2009, Elsevier.
94. Sullivan P.J., Sweeney K.J., Hirpara K.M., Malone C.B., Curtin W., Kerin M.J. Cyclical ischemic preconditioning modulates the adaptive immune response in human limb ischemia-reperfusion injury. *Brit J Surg* 2009;96: 3811-390.
95. Tadavarthy S.M., Murray P.D., Inampudi S. et al. Mechanical thrombectomy with the Amplatz device: human experience. *J Vasc Interv Radiol.* 1994;5(5):715-724.
96. Takaya J., Higashino H., Kobayashi Y. Intracellular magnesium and insulin resistance, *Magnesium research* 2004, 17, 2 126-136.
97. Inter-Society Consensus for the Management of PAD (TASC II). *E J Vasa and Endovasc Surg*, 2007: 19: S115-S143.
98. Taylor S.M., Kalabaugh C.A., Blackurst D.W. Determinants of functional outcome after revascularization for critical limb ischaemia: an analysis of 1000 consecutive vascular interventions. *Journal of Vascular Surgery* , 2006, 10, 747-756.
99. The STILE Trial: results of a prospective randomized trial evaluating Surgery versus Thrombolysis for Ischemia of the Lower Extremity. *Ann Surg.* 1994;220:251-266.
100. Tiryakioglu O., Demitras S., Ari H., Tiryakioglu S.K., Huysal K., Selimoglu O. Ozyazicioglu, Magnesium sulphate and amiodarone prophylaxis for prevention of postoperative arrhythmia in coronary by-pass operations. *J Cardiothoracic Surg* 2009; 4: 8.
101. Trerotola S.O., Davidson D.D., Filo R., et al. Preclinical in vivo testing of a rotational mechanical thrombectomy device. *J Vasc Interv Radiol.* 1996;7:717-723.
102. Tsui J.C., Baker D.M., Shaw S.G., Dashwood M.R. Nitric oxide synthase in critically ischaemic muscle and alterations in isoform expression during revascularization surgery. *B J Surg* 2008; 95:72-79.

103. Vosseler M., Abegunewardene N., Hoffmann N., Petersen S.E., Becker D., Cleppien D., Kunz P., kreitner K.F., Lauterbach M., Bierbach B., Duber C., Gori T., Munzel T., Schreiber L.M., Horstick G. Area at risk and viability after myocardial ischemia and reperfusion can be determined by contrast-enhanced cardiac magnetic resonance imaging. *Eur surg Res* 2009; 43, 12-23.
104. Wagner H.-J., Müller-Hülsbeck S., Pitton M.B. et al. Rapid thrombectomy with a hydrodynamic catheter: results from a prospective, multicenter trial. *Radiology*. 1997;205:675-681
105. Walasek L., Rzeszotarski J., Marszałek A. Wpływ hemodializy na gospodarkę magnezową u chorych z przewlekłą niewydolnością nerek.
106. Witczak W. Rola niedoboru magnezu w procesach miażdżycowych, *Nowiny Lekarskie*, 1994, 39-42.
107. Witkowski M., Hubert J., Mazur M. Methods of assesment of magnesium status in humans: a systemic review. *Magnesium Research* 2011; 24 (4): 163-80.
108. Woods K.L., Fletcher S., Roffe C., Haider Y. Intravenous magnesium sulphate in suspected acute myocardial infarction: Results of the second Leicester Intravenous Magnesium Intervention Trial (LIMIT-2). *Lancet*. 1992; 339: 1553–1558.
109. Zapalski S., Chęciński P. *Kliniczne aspekty niedokrwienia i reperfuzji*. Alfa-media press, 1998.
110. Zapalski S., Gawroński M., Majewski W., Gustowska L. Zmiany histologiczne i histochemiczne w mięśniach w przebiegu ostrego doświadczalnego niedokrwienia kończyn. *Polski Przegląd Chirurgiczny* 1977, 49, 9, 821-825.
111. Ziaja K., Simka M. Ostre i krytyczne niedokrwienie kończyn dolnych, *Wiadomości Lekarskie* 1998, LI, nr 3-4.



## 10. Streszczenie.

### **Stężenie jonów magnezu i wybranych wykładników stresu oksydacyjnego w przebiegu ostrego niedokrwienia kończyn dolnych.**

**Wstęp:** Według wytycznych TransAtlantic Inter-Society Consensus (TASC II) ostre niedokrwienie kończyny (ONK) jest zespołem objawów klinicznych powstałych w następstwie nagłego, całkowitego przerwania dopływu krwi do kończyny lub tak znacznego zmniejszenia jej ukrwienia, że nie wystarczy ono do utrzymania spoczynkowej przemiany materii i grożące jej utratą. Pacjentom z ONK grozi nie tylko utrata kończyny, ale mają również wysokie ryzyko śmiertelności. Czas hipoperfuzji kończyn wywołuje ogólnoustrojowe zaburzenia gospodarki kwasowo-zasadowej i wodno-elektrolitowej, co upośledza funkcję układu krążenia i nerek. Z kolei skuteczna reperfuzja może spowodować uwolnienie wysoce toksycznych wolnych rodników, przez co dochodzi do pogłębienia zaburzeń powstałych w okresie niedokrwienia.

**Cel:** Celem podjętej pracy była ocena stężenia  $Mg_{całk}$  i  $Mg_i$  w osoczu, stanu antyoksydacyjnego organizmu (wyrażonego w postaci TAS i FRAP w osoczu, oraz aktywności antyoksydacyjnej SOD w erytrocytach i GPx we krwi pełnej oraz stężenia CRP w surowicy przed i po rewaskularyzacji kończyn dolnych z powodu ostrego niedokrwienia kończyn. Następnym etapem było zbadanie, czy istnieje związek pomiędzy wyżej wymienionymi parametrami a stopniem i czasem trwania niedokrwienia.

**Materiał i metody:** Badaną grupę stanowiło 52 pacjentów przyjętych w trybie nagłym do Kliniki Chirurgii Ogólnej i Naczyń (KChOiN) Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu z powodu ostrego niedokrwienia kończyn dolnych. Rozpoznanie ostrego niedokrwienia kończyn dolnych było stawiane na podstawie badania przedmiotowego i podmiotowego oraz badań obrazowych. Następnie pacjenci zgodnie z klasyfikacją ostrego niedokrwienia SVS/ISCVS zostali podzieleni na dwie grupy: IIB i III. U wszystkich pacjentów z ONK zastosowano leczenie rewaskularyzacyjne w trybie pilnym zgodnie z obowiązującym algorytmem TASC II. W czasie leczenia ONK w określonych sekwencjach czasowych badano: stężenia  $Mg_{całk}$  i  $Mg_i$  w osoczu, stanu antyoksydacyjnego organizmu (wyrażonego w postaci TAS i FRAP w osoczu, oraz aktywności antyoksydacyjnej SOD we krwi pełnej i GPx w erytrocytach oraz stężenia CRP w surowicy. Materiał do badań stanowiła krew żylna pobierana od pacjentów w następujących sekwencjach czasowych: po przyjęciu do szpitala a

przed zabiegiem operacyjnym, po 30-40 minutach od operacji, a następnie po upływie 12, 24 i 48 godzin od operacji. Uzyskane wyniki zostały poddane analizie statystycznej z użyciem pakietu StatSoft Inc. (2011) STATISCTICA.

**Wyniki:** W naszym badaniu u pacjentów z ONK w stopniu niedokrwienia IIB średnie stężenie  $Mg_{całk}$  przed zabiegiem operacyjnym wynosiło  $0,690 \text{ mmol/l} \pm 0,164$ , natomiast w stopniu III  $0,729 \text{ mmol/l} \pm 0,156$ . W czasie leczenia w stopniu niedokrwienia IIB stężenie  $Mg_{całk}$  utrzymywało się poniżej normy ( $<0,7 \text{ mmol/l}$ ). Natomiast w III stopniu niedokrwienia stężenie  $Mg_{całk}$  utrzymywało się również poniżej normy i zanotowano istotny statystycznie spadek między stężeniem  $Mg_{całk}$  przed zabiegiem operacyjnym a po 48 godzinach od zabiegu operacyjnego. Jeżeli czas niedokrwienia trwał dłużej niż 12 godzin stężenie  $Mg_{całk}$  utrzymywało się także poniżej wartości referencyjnych. U pacjentów poddanych zabiegom innym niż embolektomia stężenie  $Mg_{całk}$  spadało poniżej wartości referencyjnych po zabiegu operacyjnym, co mogło mieć związek z czasem trwania zabiegu (zwykle dłuższe niż embolektomia) oraz współistniejącymi zmianami miażdżycowymi. W przypadku stężenia  $Mg_i$  w stopniu IIB zanotowano istotny statystycznie wzrost stężenia  $Mg_i$  po 24 h od zabiegu operacyjnego w stosunku do wartości wyjściowej. Ponadto po 24 h od zabiegu operacyjnego różnica między stężeniami  $Mg_i$  w grupach IIB i III była istotna statystycznie. Zaobserwowano tendencję do spadku stężenia  $Mg_i$  wśród pacjentów z czasem niedokrwienia  $\geq 12h$ , zwłaszcza po 12 i 48 h godzinach od zabiegu operacyjnego zanotowano istotny statystycznie spadek stężenia  $Mg_i$ . W grupie pacjentów poddanych innym zabiegom niż embolektomia zauważono istotny statycznie spadek stężenia  $Mg_i$  po zabiegu operacyjnym, a następnie wzrost stężenia po 24 i 48 godzinach od zabiegu operacyjnego.

Zaobserwowano istotny statystycznie spadek wartości TAS i FRAP w osoczu w okresie pooperacyjnym. Spadek wartości TAS i FRAP korelowało również, ze stopniem niedokrwienia oraz czasem niedokrwienia. Jednocześnie zanotowano wzrost wartości mechanizmów antyoksydacyjnych, tj.: GPx i SOD. Aktywność SOD wzrastała w stosunku do wartości obserwowanych przed zabiegiem operacyjnym, podobnie zachowywała się GPx . Aktywność SOD i GPx korelowała ze stopniem niedokrwienia i czasem ONK.

Monitorowanie stężenia CRP wykazało jego podwyższone i narastające wartości, które korelowały z stopniem i czasem ONK.

#### **Wnioski:**

4. U wszystkich chorych z ostrym niedokrwieniem kończyn stężenie magnezu całkowitego w osoczu było poniżej wartości referencyjnych przed zabiegiem operacyjnym. Nasilenie stopnia niedokrwienia i dłuższy czas trwania niedokrwienia

miał wpływ na dalsze obniżenie stężenia magnezu całkowitego po rewaskularyzacji tętnic kończyn dolnych. U chorych z dłuższym czasem trwania niedokrwienia obserwowano także obniżenie stężenia magnezu zjonizowanego po zabiegu przywracającym ukrwienie kończyn.

5. W ostrym niedokrwieniu kończyn obniżenie wartości TAS i FRAP oraz aktywności GPx po rewaskularyzacji wskazuje na związek potencjału antyoksydacyjnego organizmu ze stopniem i czasem trwania ostrego niedokrwienia.
6. Zespół niedokrwienie-reperfuzja indukował uogólnioną odpowiedź zapalną, czego wyrazem był wzrost stężenia białka C-reaktywnego obserwowany przed i po rewaskularyzacji, który korelował ze stopniem i czasem trwania ostrego niedokrwienia kończyn.

## Abstract

### **The concentration of magnesium and levels of selected parameters of oxidative stress in acute limb ischemia.**

**Introduction:** According to the guidelines of TransAtlantic Inter-Society Consensus (TASC II), acute limb ischemia (ALI) is the clinical manifestation of a sudden decrease in blood flow to a limb, which results in a potential threat to the viability of the limb. Owing to the complex systemic changes that occur not only is the limb at risk, but so is the patient's life. The time of hypoperfusion induces systemic disturbances of acid-base balance and water and electrolyte balance, what impairs the function of the cardiovascular system and kidneys. The effective reperfusion results in the release of highly toxic free radicals exacerbating dangerous mechanisms, which arised during the ischemia.

**Aim:** The aim of this study was to assess the concentrations of total and ionised magnesium (t-Mg and i-Mg) in plasma and plasma antioxidant status (TAS and FRAP activity), antioxidant activity of SOD in erythrocytes and GPx in whole blood and serum CRP levels before and after revascularization of the lower limbs due to ALI. The next step was to investigate whether there is a relationship between mentioned above parameters and the degree, time of ischemia.

**Material and Methods:** The study group consisted of 52 patients admitted to the Department of General and Vascular Surgery at the University of Medical Sciences in Poznan because of symptoms of ALI. The diagnosis of acute limb ischemia was based on patients' subjective symptoms, objective tests and imaging studies. Then, according to the classification SVS/ISCVS of acute ischemia they were divided into two groups: IIB and III. All patients with established ALI underwent urgent revascularization therapy based on the current TASC II algorithm. We tested following parameters: t-Mg and i-Mg plasma concentrations, plasma antioxidant status (TAS and FRAP activity), antioxidant activity of SOD in erythrocytes and GPx in whole blood and serum CRP levels .Venous blood collected from ALI patients was assessed in following sequences: after admission and before the surgery, 30-40 minutes after revascularization, and then 12, 24 and 48 hours after revascularization. The results were statistically analyzed using the package, StatSoft Inc. (2011) STATISCTICA.

**Results:** In our study the mean t-Mg concentration in patients with a IIB ALI was 0.690 mmol/l  $\pm$  0.164, whereas III ALI- 0.729 mmol/l  $\pm$  0.156. The t—Mg concentration was below the normal ranges (<0.7 mmol / l) both in IIB and III group, however there was a statistically

significant decrease in concentration of t-Mg 48 hours after revascularization. In patients with ischemia longer than 12 hours and in patients who did not undergo an embolectomy t-Mg was also below the normal ranges, what could be related to the duration of surgery (usually longer than embolectomy itself ) and underlying atherosclerosis. There was statistically significant increase of i-Mg concentration 24 hours after the operation in patients with IIB ALI. Additionally we observed statistically significant difference between the IIB and III groups 24 hours after the revascularization. In patients who suffered ALI lasting longer than 12 hours and in patients who did not undergo embolectomy there was the decrease of i-Mg concentration 12 and 48 hours after the revascularization.

There was a statistically significant decrease in plasma TAS and FRAP activity in the postoperative period. Moreover the decrease in TAS and FRAP activity correlated with the degree and time of acute ischemia. The activity of antioxidant mechanisms, erythrocyte SOD activity and whole blood GPx activity, increased significantly after revascularization. The SOD and GPx activities increased in comparison to the values observed before surgery. There was a correlation between the SOD and GPx activity and the degree and time of ALI. The monitoring of CRP level revealed constantly rising values, what correlated with the degree and time of ALI.

#### **Conclusions:**

1. The mean t-Mg concentration was below the normal ranges in all patients with ALI before the invasive treatment. The more advanced degree and longer time of ALI induced further decrease of t-Mg in reperfusion period. The time of ALI longer than 12 hours influenced further decrease of i-Mg.
2. The relationship between the antioxidative activity of organism and the degree and duration of acute ischemia was connected with the decrease in TAS and FRAP activity and GPx activity after revascularization.
3. The ischemia-reperfusion syndrome induces systemic inflammatory response, leading to a statistically significant increase of CRP levels observed before and after revascularization. The increase in CRP levels correlated with the degree and duration of acute limb ischemia.

## 11. Spis tabel.

Tabela 1. Kategorie kliniczne ostrego niedokrwienia kończyn dolnych (zmodyfikowana klasyfikacja SVS/ISCVS*).....	9
Tabela 2. Przeciwwskazania do leczenia fibrynolitycznego.....	14
Tabela 3. Porównanie celowanej trombolizy dotętniczej (CDT) i chirurgicznych technik rewaskularyzacyjnych.....	15
Tabela 4. Choroby współistniejące w grupie badanej oraz w zależności od stopnia niedokrwienia kończyn dolnych.....	27
Tabela 5. Częstość występowania zaburzeń gospodarki kwasowo-zasadowej w zależności od stopnia i czasu ostrego niedokrwienia badanych po przyjęciu do Kliniki Chirurgii Ogólnej i Naczyń.....	38
Tabela 6. Średnie stężenia lub średnia aktywność wybranych parametrów laboratoryjnych przed zabiegiem operacyjnym w zależności od stopnia niedokrwienia.....	40

## 12. Spis rycin.

Rycina 1. Etiologia ostrego niedokrwienia kończyn dolnych.....	7
Rycina 2. Algorytm postępowania w ostrym niedokrwieniu kończyn dolnych.....	13
Rycina 3. Stężenie $Mg_{całk}$ (mmol/l) przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia (IIA i III).....	43
Rycina 4. Stężenie $Mg_i$ (mmol/l) przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia IIB i III).....	44
Rycina 5. Stężenie $Ca_{całk}$ (mmol/l) przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia (IIB i III).....	45
Rycina 6. Stężenie $Ca_i$ (mmol/l) przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia (IIB i III).....	46
Rycina 7. Stężenie Na (mmol/l) przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia (IIB i III).....	47
Rycina 8. Stężenie K (mmol/l) przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia (IIB i III).....	48
Rycina 9. Aktywność SOD (U/gHb) przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia (IIB i III).....	49
Rycina 10. Aktywność GPx (U/l) przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia (IIB i III).....	50
Rycina 11. Aktywność TAS (mmol/l) przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia (IIB i III).....	52
Rycina 12. Aktywność FRAP przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia (IIB i III).....	53
Rycina 13. Stężenie CRP przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia (IIB i III).....	54
Rycina 14. Stężenie $Mg_{całk}$ przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia ( $t < 12h$ , $t \geq 12h$ ).....	55
Rycina 15. Stężenie $Mg_i$ przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia ( $t < 12h$ , $t \geq 12h$ ).....	57
Rycina 16. Stężenie $Ca_{całk}$ przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia ( $t < 12h$ , $t \geq 12h$ ).....	58
Rycina 17. Stężenie $Ca_i$ przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia ( $t < 12h$ , $t \geq 12h$ ).....	59

Rycina 18. Stężenie Na przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia ( $t < 12h$ , $t \geq 12h$ ).....	60
Rycina 19. Stężenie K przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia ( $t < 12h$ , $t \geq 12h$ ).....	61
Rycina 20. Aktywność SOD (U/gHb) przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia ( $t < 12h$ , $t \geq 12h$ ).....	62
Rycina 21. Aktywność GPx (U/l) przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia ( $t < 12h$ , $t \geq 12h$ ).....	63
Rycina 22. Rycina 22. Aktywność TAS (mmol/l) przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia ( $t < 12h$ , $t \geq 12h$ ).....	65
Rycina 23. Aktywność FRAP przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia ( $t < 12h$ , $t \geq 12h$ ).....	66
Rycina 24. Stężenie CRP przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia ( $t < 12h$ , $t \geq 12h$ ).....	67
Rycina 25. Stężenie $Mg_{ca\dot{t}k}$ (mmol/l) przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia (embolektomia, inne zabiegi rewerskularyzacyjne tętnic kończy dolnych).....	69
Rycina 26. Stężenie $Mg_i$ (mmol/l) przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia (embolektomia, inne zabiegi rewerskularyzacyjne tętnic kończy dolnych).....	70
Rycina 27. Stężenie $Ca_{ca\dot{t}k}$ (mmol/l) przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia (embolektomia, inne zabiegi rewerskularyzacyjne tętnic kończy dolnych).....	71
Rycina 28. Stężenie $Ca_i$ (mmol/l) przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia (embolektomia, inne zabiegi rewerskularyzacyjne tętnic kończy dolnych).....	72
Rycina 29. Stężenie Na (mmol/l) przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia (embolektomia, inne zabiegi rewerskularyzacyjne tętnic kończy dolnych).....	73
Rycina 30. Stężenie K (mmol/l) przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia (embolektomia, inne zabiegi rewerskularyzacyjne tętnic kończy dolnych).....	74
Rycina 31. Aktywność SOD (U/gHb) przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia (embolektomia, inne zabiegi rewerskularyzacyjne tętnic kończy dolnych).....	75
Rycina 32. Aktywność GPx (U/l) przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia (embolektomia, inne zabiegi rewerskularyzacyjne tętnic kończy dolnych).....	76
Rycina 33. Aktywność TAS (mmol/l) przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia (embolektomia, inne zabiegi rewerskularyzacyjne tętnic kończy dolnych).....	77
Rycina 34. Aktywność FRAP (mmol/l) przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia (embolektomia, inne zabiegi rewerskularyzacyjne tętnic kończy dolnych).....	78



Rycina 35. Stężenie CRP (mg/l) przed i po chirurgicznym leczeniu ostrego niedokrwienia (embolektomia, inne zabiegi rewerskularyzacyjne tętnic kończy dolnych).....79