

Wojciech Turkiewicz

Występowanie i aktywność  
wybranych metaloproteinaz  
w ścianie żył odpiszczelowych

Rozprawa doktorska

Promotor: prof. UM dr hab. Zbigniew Krasieński

II Katedra i Klinika Chirurgii Ogólnej i Naczyń  
Wydział Lekarski II  
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego  
w Poznaniu

Poznań 2010 r.

Każde rozszerzenie naczynia wymaga do swego powstania zmienionych własności ścian lub wywołuje je, czyli innymi słowy polega na pierwotnej zmianie czy też ją warunkuje

**Rudolf Ludwig Karl Virchow**

# Spis treści

<b>Lista używanych skrótów</b>	<b>5</b>
<b>1. Wstęp</b>	<b>6</b>
1.1. Definicje żylaków kończyn dolnych	7
1.2. Struktura żył prawidłowych i żylaków kończyn dolnych	8
1.3. Rozciągliwość ściany żyłnej	9
1.4. Epidemiologia żylaków kończyn dolnych	9
1.5. Etiologia żylaków kończyn dolnych	11
1.6. Teorie powstania żylaków	15
1.7. Rola metaloproteinaz w ścianach żył odpiszczelowych	17
<b>2. Cel pracy</b>	<b>20</b>
<b>3. Materiał i metody</b>	<b>21</b>
3.1. Badanie ultrasonograficzne z podwójnym obrazowaniem	21
3.2. Badania immunohistochemiczne	23
3.2.1. Ocena w mikroskopie świetlnym – metoda półilościowa	24
3.2.2. Analiza morfometryczna	24
3.3. Badania stężenia formy aktywnej wybranych metaloproteinaz w ścianie żył	25
3.4. Oznaczenie całkowitego stężenia wybranych metaloproteinaz w osoczu	25
3.4.1. Oznaczanie całkowitego stężenia MMP1 (formy pro- i aktywnej)	25
3.4.2. Oznaczanie całkowitego stężenia MMP3 (formy pro- i aktywnej)	26
3.4.3. Oznaczanie całkowitego stężenia MMP9 (formy pro- i aktywnej)	27
3.5. Analiza statystyczna	28

<b>4. Wyniki</b>	<b>29</b>
4.1. Ocena żyły odpiszczelowej w grupie chorych z żylakami w badaniu USG ZPO	29
4.2. Ocena układu żylnego u chorych bez żylaków w badaniu USG ZPO	29
4.3. Wyniki analizy ilościowej wybranych metaloproteinaz	30
4.4. Wyniki oznaczeń immunohistochemicznych	30
4.5. Wyniki oznaczeń formy aktywnej metaloproteinaz w ścianie naczyń metodą ELISA	34
4.6. Wyniki oznaczenia całkowitego stężenia MMPs (formy pro- i aktywna) w osoczu	36
<b>5. Omówienie</b>	<b>38</b>
<b>6. Wnioski</b>	<b>42</b>
<b>7. Spis rycin</b>	<b>43</b>
<b>8. Spis tabel</b>	<b>44</b>
<b>9. Dokumentacja fotograficzna</b>	<b>45</b>
<b>10. Piśmiennictwo</b>	<b>46</b>
<b>11. Streszczenie</b>	<b>51</b>
<b>12. Summary</b>	<b>53</b>

## Lista używanych skrótów

ABC	kompleks awidyna-biotyna
ECM (ang. extracellular matrix)	macierz zewnątrzkomórkowa
ELISA (ang. enzyme-linked immunosorbent assay)	test immunoenzymatyczny
MMP (ang. matrix metalloproteinase)	metaloproteinaza
MMP1	metaloproteinaza 1., kolagenaza
MMP3	metaloproteinaza 3., stromielizyna 1.
MMP9	metaloproteinaza 9., żelatynaza B
MMPs	metaloproteinazy
SD (ang. standard deviation)	odchylenie standardowe
SMC (ang. smooth muscle cell)	komórki mięśni gładkich
TIMP (ang. tissue inhibitor of metalloproteinases)	tkankowy inhibitor metaloproteinaz
TIMP1	tkankowy inhibitor metaloproteinazy 1.
TIMPs	tkankowe inhibitory metaloproteinaz
USG ZPO	ultrasonografia z podwójnym obrazowaniem
Ż	żyła
ŻKD	żylaki kończyn dolnych
ŻO	żyła odpiszczelowa
ŻOBR	żyła odpiszczelowa bez refluku
ŻOZR	żyła odpiszczelowa z refluksem

## 1. Wstęp

Transport krwi obwodowej do serca żyłami kończyn dolnych w pozycji stojącej odbywa się w kierunku przeciwnym do siły grawitacji, co oznacza, że na stosunkowo cienką ścianę żylną wywierane jest duże ciśnienie hydrostatyczne. Przeciwwagą dla tego zjawiska w warunkach prawidłowych jest trójwarstwowa budowa ściany żyłnej, której wszystkie elementy komórkowe są związane w macierzy zewnątrzkomórkowej (extracellular matrix – ECM) [1]. Zmiany obserwowane w ścianie niewydolnych żył odpiszczelowych, tj. takich w których ultrasonografia z podwójnym obrazowaniem (USG ZPO) wykazuje patologiczny refluks (żyła odpiszczelowa z refluksiem – ŻOZR), mają charakter makro- i mikroskopowy. Te ostatnie dotyczą w głównej mierze warstwy środkowej ściany żyłnej, w której dochodzi do zmniejszenia frakcji mięśniowej, tym samym zmiany stosunku liczby komórek mięśniowych do zrębu [2, 3, 4]. Zjawisko to może nasuwać przypuszczenie istnienia związku z poszerzeniem żyły, ponieważ dotyczy struktur odpowiedzialnych za rozciągliwość i napięcie ściany m. in. komórek mięśniowych gładkich, kolagenu i elastyny [5, 6].

W ostatniej dekadzie zgromadzono dowody zarówno kliniczne jak i doświadczalne w celu wykazania, że pierwotne zmiany warunkujące wystąpienie refluksu w żyłę odpiszczelowej (ŻO) zachodzą w jej ścianie, natomiast zaburzenia funkcjonowania zastawek żylnych są procesem wtórnym [1, 6, 7, 33].

Zmiana zawartości ECM oraz polimorfizm elementów ją tworzących powodują zmiany struktury ściany żyłnej wpływające na jej integralność i mechaniczne właściwości [9,10]. Wiadomo, że znaczącą rolę w osłabieniu ściany ŻO, prowadzącą do rozwoju niewydolności, odgrywa zmiana zawartości elastyny i kolagenu, podczas gdy funkcja metaloproteinaz (matrix metalloproteinases – MMPs) mających wpływ na te białka nie jest do tej pory wyjaśniona [9, 11]. MMPs uczestniczą w fizjologicznych jak i patologicznych przemianach kolagenu, elastyny i innych białek matriks zewnątrzkomórkowego [1, 8, 12, 13].

Warunki hydrostatyczne związane z nadciśnieniem w układzie żylnym obserwowane w niewydolnych żyłach odpiszczelowych (ŻOZR) mogą powodować

zmiany w ekspresji i aktywności metaloproteinaz obecnych w ścianie żył lub powodować różną aktywność MMPs, która warunkuje zmiany w składzie ściany żyłnej doprowadzając do jej poszerzenia i niewydolności [2, 75]. Doniesienia na ten temat są niespójne i wymagają dalszych badań. Na tej podstawie można wnioskować, że zmiany związane ze obniżeniem poziomu, zużyciem lub zahamowaniem aktywnych MMPs mogą być odpowiedzialne za niewystarczającą przebudowę ściany żyłnej związaną z ciśnieniem panującym w naczyniu. W badaniu przedmiotowym u chorych ze zmianami w ścianie żyłnej obserwujemy żylaki.

Żylaki kończyn dolnych (ŻKD) są jedną z najczęstszych chorób w społeczeństwach rozwiniętych i mimo postępu nauki ich patogeneza nie jest do końca wyjaśniona, a badania nad przyczyną ich powstawania wciąż trwają. Powodem zainteresowania naukowców tym problemem jest częste występowanie żylaków, zwłaszcza u ludzi dorosłych; nawroty po leczeniu chirurgicznym oraz istotny wpływ żylaków i ich powikłań na aspekt socjoekonomiczny życia. Dotychczasowe teorie powstawania żylaków pierwotnych, uwzględniające wieloczynnikową patogenezę ich rozwoju, oparte są w znacznym stopniu na danych epidemiologicznych lub analizie zmian morfologicznych.

Wielorakość schorzeń układu żylnego kończyn dolnych doprowadziła do dużych rozbieżności w nazewnictwie. Rozpoznanie ŻKD powinno opierać się na jednolitym mianownictwie i definicji tej choroby.

### **1.1. Definicje żylaków kończyn dolnych**

Definicja podana w książce pod redakcją prof. Noszczyka określa żylaki jako trwałe, organiczne rozszerzenie żył powierzchownych w postaci węzowatych sznurów, spłotów lub kłębków, często z balonowatym wypukleniem [15]. Inne określenie ŻKD podane w publikacji pod redakcją prof. Zapalskiego dodaje do tych cech utrwaloną niewydolność zastawek żylnych [16].

W przeprowadzonych w roku 1978 badaniach bazylejskich uznawanych przez większość ośrodków żylaki sklasyfikowano w następujący sposób:

- żylaki pni żylnych – poszerzenie i wytworzenie zatok w głównym pniu żyły odpiszczelowej lub żyły odstrzałkowej oraz w pniach żylnych najbliższego otoczenia,
- żylaki „siateczkowe” – poszerzone żyły w tkance podskórnej, nie związane z głównymi pniami żylnymi
- żylaki „gałązkowate” – poszerzenia żył śródskórnych o szerokości 1 – 2 mm [17].

Od 1994 roku do klasyfikowania przewlekłych chorób żył używa się klasyfikacji CEAP (Clinical Signs – objawy kliniczne, Etiologic Classification – klasyfikacja etiologiczna, Anatomic Distribution – położenie anatomiczne, Pathophysiologic Dysfunction – zaburzenia patofizjologiczne). Uwzględnia się w niej objawy kliniczne (C) w skali punktowej od 0 do 6, w której teleangiektazje i żyły siateczkowate są 1. stopniem zaawansowania klinicznego, żylaki zaś 2. [16].

W powszechnie przyjętym podziale wyróżnia się żylaki pierwotne (95%), występujące przy prawidłowym stanie żył głębokich, i wtórne (5%), które są następstwem niewydolności żył głębokich, przeszywających bądź przetok tętniczo-żylnych [15, 18]. W niniejszej pracy wszystkie określenia odnoszące się do żylaków o nieustalonej etiologii będą oznaczane skrótem ŻKD.

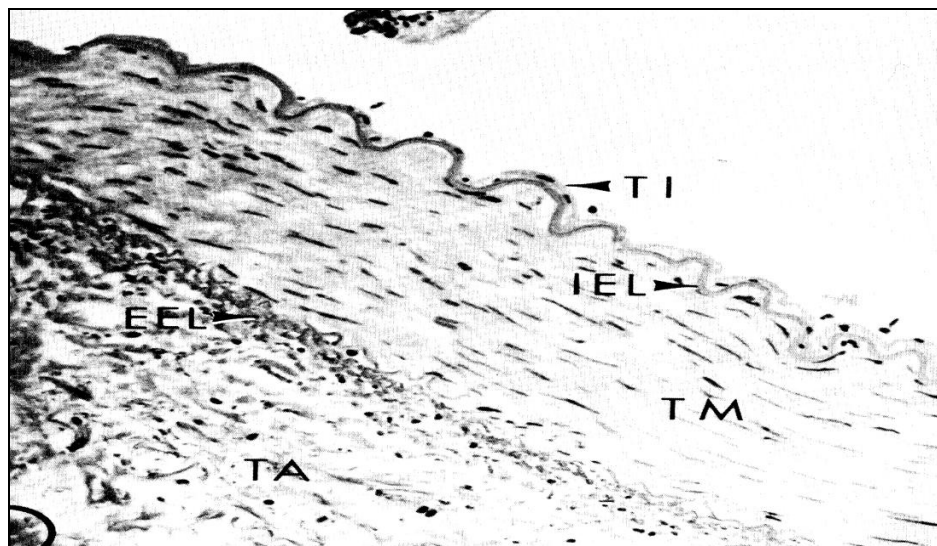
## **1.2. Struktura żył prawidłowych i żylaków kończyn dolnych**

Budowa prawidłowej ściany żylniej w układzie powierzchownym kończyn dolnych przedstawiona jest na rycinie 1. Pierwszą warstwą od światła żyły jest błona wewnętrzna, w skład której wchodzi: jednowarstwowy śródbłonek leżący na błonie podstawnej, warstwa podśródbłonkowa będąca tkanką łączną właściwą i warstwa sprężysta błony wewnętrznej zbudowana z włókien kolagenowych i sprężystych. W żyłach średniego kalibru warstwa łącznotkankowa błony wewnętrznej jest cienka i nie odróżnialna od błony środkowej.

W dużych żyłach warstwa sprężysta błony wewnętrznej jest dobrze widoczna. Warstwę środkową stanowią okrężnie biegnące włókna mięśni gładkich, włókna kolagenowe i sprężyste. Warstwa zewnętrzna zbudowana jest z tkanki łącznej wiotkiej i leżących podłużnie włókien mięśni gładkich. Warstwa ta jest najgrubsza w żyłach dużych i średnich; można w niej znaleźć również naczynia limfatyczne i nerwy.

W ścianie żył zmienionych żylakowato występują zmiany makroskopowe i mikroskopowe. Te ostatnie dotyczą w głównej mierze warstwy środkowej ściany żylniej, w której dochodzi do zmniejszenia frakcji mięśniowej oraz zmniejszenia liczby komórek mięśniowych w stosunku do komórek zrębu [4, 19, 20]. Fakt ten może nasuwać przypuszczenie istnienia związku ze zjawiskiem poszerzeniem żyły, ponieważ opisane zmiany dotyczą struktur odpowiedzialnych za rozciągliwość i napięcie ściany żyły, tj. komórek mięśniowych gładkich (SMC), kolagenu i elastyny. Rycina 1. przedstawia prawidłową budowę ściany żylniej.





Ryc. 1. Przekrój poprzeczny przez żyłę średniego kalibru z zaznaczonymi warstwami: TI – błona wewnętrzna, IEL – warstwa środkowa błony wewnętrznej, TM – błona środkowa, EEL – blaszka elastyczna zewnętrzna, TA – błona zewnętrzna (przydanka). Wg: Matthews J. L., Martin J. H. 1971 [21].

### 1.3. Rozciągliwość ściany żyłnej

Żyły charakteryzują się znacznie większą rozciągliwością niż tętnice, co pozwala na znaczne zmiany objętości gromadzonej krwi w układzie żylnym. Ściana żylna jest poddawana znacznym wahaniom ciśnienia zależnym od pozycji ciała. W pozycji stojącej, kiedy ciśnienie hydrostatyczne krwi jest najwyższe, zdolność zapobiegania nadmiernemu rozszerzeniu żyły jest warunkowana obecnością zastawek, włókien kolagenowych w ścianach żylnych oraz skurczem komórek mięśni gładkich [20].

Ściana żyły jest relatywnie cienka w stosunku do jej średnicy [5, 20]. Dlatego prawidłowa reakcja na zmiany ciśnienia w układzie żylnym zależy od sprawnego działania wszystkich składowych odpowiedzialnych za napięcie ściany.

Czynniki, które mogą zmieniać fizjologiczną rozciągliwość i tonus żył można podzielić na działające długofalowo lub nagle. Do pierwszej grupy należy starzenie się, apoptoza oraz predyspozycje genetyczne, w drugiej zaś można umieścić urazy, ciążę czy stosowanie kuracji hormonalnych [22, 23, 24].

### 1.4. Epidemiologia żylaków kończyn dolnych

Pierwsze duże badanie epidemiologiczne żylaków kończyn dolnych było przeprowadzone przez United States National Health Survey w latach 1935-36. Opierało

się na ankiecie wypełnianej w domach i objęło 2,8 mln osób, wykazując żylaki u 1,75 mln badanych [26, 40]. W Europie podobne badania przeprowadzono w latach 1945 i 1956 wśród mieszkańców Wielkiej Brytanii i Danii, jednak zawierały błędy metodologiczne i statystyczne [49]. Dopiero badania bazylejskie ogłoszone przez Widmera w roku 1978 i ustalone przez niego kryteria rozpoznania i klasyfikacji żylaków kończyn dolnych stały się podstawą dla późniejszych opracowań epidemiologicznych chorób żył [17, 26]. Analizy epidemiologiczne, które ukazały się po 1978 roku dzięki badaniom bazylejskim są do dziś uznawane za miarodajne i umożliwiające wyciąganie wniosków statystycznych dotyczących żylaków pierwotnych.

Należy jednak zauważyć, że przeprowadzane programy badawcze nie zawsze uwzględniają nowe techniki diagnostyczne, takie jak duplex-doppler czy pletyzmografię, umożliwiające wykrywanie bezobjawowych zmian w obrębie układu żył. Można z tego wyciągnąć wniosek, że dane dotyczące częstości występowania chorób żył są raczej zaniżone.

Badania niemieckie Bohum I-III dotyczące blisko pięciuset dzieci wykazały, że wraz z wiekiem rośnie częstość występowania żylaków kończyn dolnych. W tabeli 1. przedstawiano wyniki tych badań po ośmioletniej obserwacji – liczby przedstawiają odsetki rozwoju żylaków i teleangiektazji u około pięciuset dzieci [27, 28]. U dzieci wyraźne zmiany żylakowate należą jednak do rzadkości i są najczęściej wywołane wadami wrodzonymi [29].

Częstość występowania ŻKD wzrasta z wiekiem i w grupie chorych sześćdziesięcio-, siedemdziesięcioletnich obejmuje od 30% do 60% badanych [26, 30].

Tab. 1. Zmiany w układzie żył powierzchownych w trakcie ośmioletniej obserwacji w badaniu Bohum I-III [27,28]

rodzaj zmian w układzie żył powierzchownych	wiek		
	10-12	14-16	18-20
teleangiektazje	0 %	3,7 %	12,9 %
żyły siatkowate	10,2 %	30,3 %	35,3 %
niewydolne żyły przeszywające	0 %	4,1 %	5,2 %
żylaki dopływów	0 %	0,8 %	5,0 %
żylaki pni żylnych	0 %	1,7 %	3,3 %
niewydolność ujścia ż. odpiszczelowej	0 %	12,3 %	19,8 %

W Polsce, wg różnych źródeł, ŻKD obejmują podobnie jak w Europie i USA od 3,5 do 58,9 % populacji. Różne objawy związane z żylakami stwierdza się u około 50-55% dorosłych kobiet i 40-50% mężczyzn [26, 31, 32]. W najnowszym badaniu Jawień i wsp. podają, że zarówno kobiety jak i mężczyźni mają żylaki w podobnym odsetku, tj. około 34%. W badaniu tym stwierdzono aktywne lub zagojone owrzodzenie goleni u 1,53% chorych zgłaszających się do lekarza pierwszego kontaktu z jakiegokolwiek powodu [33].

W tabeli 2. przedstawiono wyniki wybranych badań epidemiologicznych, wykonanych w różnych ośrodkach, które wskazują na częstość występowania żylaków w różnych grupach wiekowych na świecie.

Tab. 2. Wyniki wybranych badań epidemiologicznych występowania żylaków

autor badania	rok	liczba badanych	zachorowalność (%)			wiek badanych (w latach)	państwo
			mężczyźni	kobiety	suma		
Arnoldi [49]	1958	1981	18	38	28	>25	Dania
Berge [62]	1963	1354	50	-	-	50	Szwecja
Recoules-Arche [91]	1965	5424	-	-	14	16-54	Francja
Bobek [92]	1966	15060	6,6	14,1	11	>15	Czechy
Richardson [93]	1977	1259	4,8	4,1	4,5	-	Tanzania
Widmer [17]	1978	4529	56	55	55	25-74	Szwajcaria
Abramson [37]	1981	4802	10,4	29,5	-	>15	Izrael
Maffei [41]	1986	1755	37,9	50,9	47,6	>15	Brazylia
Rudofsky [94]	1988	14000	-	-	15	>15	Niemcy
Wright [50]	1989	1338	-	-	25	20-75	Anglia
Leipnitz [95]	1989	2821	14,5	29	20,2	45-65	Niemcy
Sisto [96]	1995	8000	7	25	-	>30	Finlandia
Canonico [45]	1998	1319	17,0	35,2	27,4	66-96	Włochy

### 1.5. Etiologia żylaków kończyn dolnych

Pierwsze spostrzeżenia dotyczące ŻKD znajdujemy w pismach Hipokratesa (460 – 377 p.n.e.), który pierwszy próbował określić przyczynę powstawania żylaków kończyn dolnych i zauważył, że występują częściej u chorych długo jeżdżących konno, co łączył z długotrwałym opuszczeniem stóp. Hipokrates spostrzegał też związek ŻKD z przebytą ciążą [34, 35].

W 1628 roku William Harvey pierwszy opisał zmiany chorobowe w zastawkach żylnych, a niecałe pół wieku po nim Richad Wieseman przedstawił swoje spostrzeżenia na temat niewydolności zastawek wywołanej poszerzeniem żył [34].

W końcu XIX wieku Rudolf Virchow stwierdził: „Każde rozszerzenie naczynia wymaga do swego powstania zmienionych własności ścian lub wywołuje je, czyli innymi słowy polega na pierwotnej zmianie czy też ją warunkuje” [15].

W 1891 roku inny uczony niemiecki Friedrich Trendelenburg stwierdził, że niewydolność zastawek żylnych jest podstawową przyczyną powstania ŻKD [15].

W poznawaniu przyczyn patologii żyłnej duże zasługi ma dr Zdzisław Sławiński. W 1901 roku pisał: „Jeżeli skutkiem rozszerzenia żyły zastawki stają się niedostateczne aż przez to ściana żyły ulega nienormalnie silnemu ciśnieniu wysokiego słupa krwi, wtedy część żyły pod zastawkami rozciąga się najłatwiej i w tym miejscu rozwinię ograniczony żylak” [36]. Istotne było też drugie stwierdzenie Sławińskiego, dotyczące czynników wpływających na powstanie żylaków, o których pisał „(...) sam przez się żaden z nich nie wystarcza do wywołania rozszerzeń żylnych i sprowadza je dopiero współczesna obecność czynników owych” [36]. Jego wkładem w badaniach nad patofizjologią żył było wykrycie włókien sprężystych w ich ścianie, ocena topografii zastawek i ich roli w powstawaniu żylaków oraz podkreślenie znaczenia czynnika dynamicznego w rozwoju ŻKD [15].

Dzięki badaniom klinicznym i epidemiologicznym uznaje się szereg czynników ryzyka rozwoju pierwotnych żylaków kończyn dolnych, do których należą m.in. płeć, strona ciała, ciąża, predyspozycje genetyczne, przewlekłe stanie lub siedzenie, zaparcia [22, 23, 24].

## **Płeć**

Już od czasów Hipokratesa częstsze występowanie ŻKD wiązano z płcią żeńską. Z przytoczonych danych epidemiologicznych można wyliczyć wskaźnik występowania ŻKD kobiety:mężczyźni, który waha się od 1,5 : 1 do 3,5 : 1. Wykazano jednak, że wskaźnik ten zależy od wieku badanych. W badaniach przeprowadzonych w Izraelu w grupie chorych między 20. a 34. rokiem życia wskaźnik kobiety:mężczyźni wynosił 6 : 1, zaś w grupie 65 – 74 lat odpowiednio 1,5 : 1 [37].

Jednak nie we wszystkich populacjach żylaki pojawiają się częściej u kobiet; i tak np. na Nowej Gwinei i wyspach południowego Pacyfiku ŻKD występują częściej u mężczyzn [38, 39].

## **Wiek**

Im starsza jest badana populacja, tym częściej występują ŻKD. Na przykład w USA żylaki u ludzi w wieku 20 – 29 lat spotyka się poniżej 1%, a u ludzi powyżej 70. roku życia u ponad 50%.

## **Strona ciała**

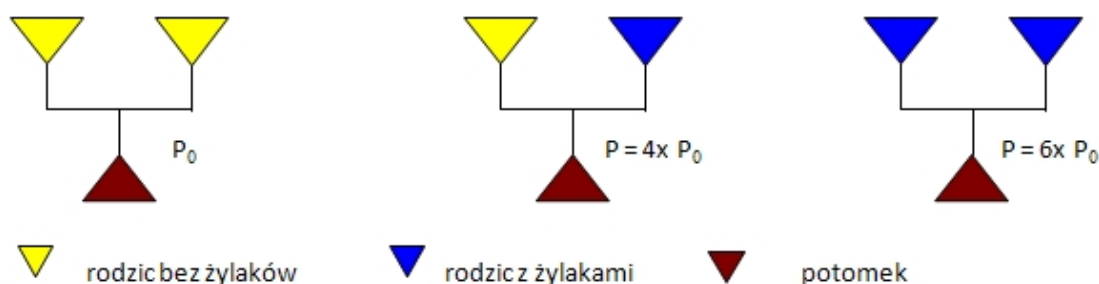
Dawnej uważano, że żylaki i zakrzepica żył głębokich na lewej kończynie dolnej pojawiają się częściej, ponieważ prawa tętnica biodrowa wspólna krzyżując się z lewą żyłą biodrową wspólną może ją uciskać. W przeprowadzonych analizach nie wykazano jednak znamiennej statystycznie różnicy występowania ŻKD pomiędzy lewą i prawą kończyną dolną [17, 34, 41].

## **Ciąża**

Wiele kobiet łączy pojawienie się żylaków z okresem ciąży. Te spostrzeżenia potwierdzane są również w opracowaniach naukowych. Wykazano, że u 8 do 20% kobiet z żylakami ciąża był czynnikiem rozpoczynającym ich rozwój [42, 43, 44]. W badaniach włoskich z 1998 roku wskaźnik ten wyniósł nawet 40,5% [45]. Potwierdzono także częstsze występowanie ŻKD u kobiet rodzących niż bezdzietnych [46, 47]. Częstość występowania ŻKD rośnie także z liczbą porodów niezależnie od wieku rodzącej [41]. Znaczenie dla powstania ŻKD odgrywa nie tylko liczba porodów, lecz także odstęp czasowy między nimi. Ryzyko wystąpienia żylaków wzrasta, gdy okresy między porodami są krótkie [48].

## **Predyspozycje genetyczne**

Wskazuje się również na wpływ czynników genetycznych na występowanie ŻKD. Ryzyko związane z dodatnim wywiadem rodzinnym było przedmiotem wielu badań [17, 49]. W badaniu bazylejskim określono stosunek chorych na ŻKD z dodatnim wywiadem rodzinnym do chorych bez obciążonego wywiadu. Dla mężczyzn wynosił on od 67% do 54%, dla kobiet zaś od 63% do 52% [50]. Na rycinie 2. przedstawiono prawdopodobieństwo wystąpienia żylaków kończyn dolnych w zależności od pozytywnego wywiadu rodzinnego.



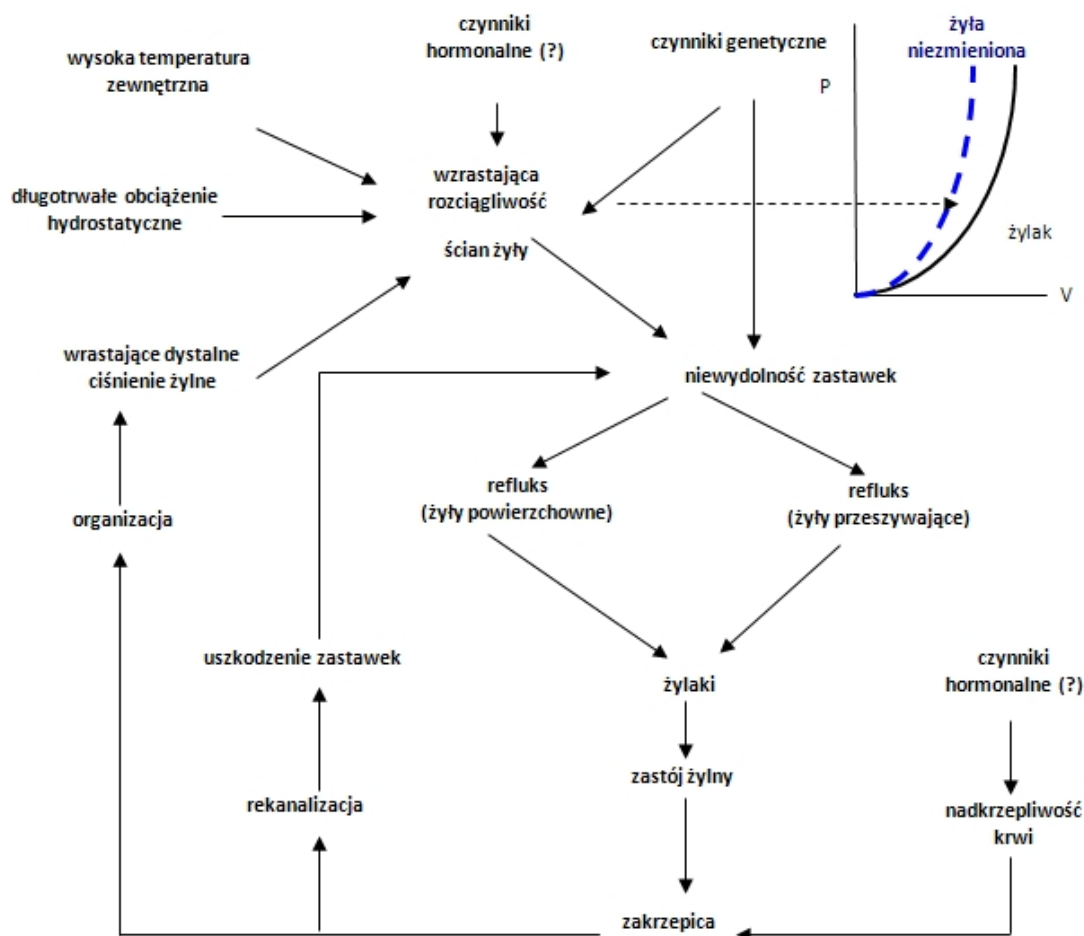
Ryc. 2. Względne prawdopodobieństwo ( $P$ ) wystąpienia żylaków u potomka w zależności od występowania żylaków w rodzinie.  $P_0$  oznacza prawdopodobieństwo wystąpienia ŻKD u osoby, której rodzice nie mieli ŻKD [51]

Na znaczenie czynnika genetycznego wskazuje również fakt, że u osób z predyspozycjami rodzinnymi, żylaki pojawiają się już w wieku 18 – 20 lat [26]. Potwierdzeniem tego stwierdzenia są także badania z użyciem ultrasonografii dopplerowskiej w grupie młodych ludzi z dodatnim wywiadem rodzinnym w kierunku ŻKD. Wykazano u nich niewydolność ujścia piszczelowo-udowego, choć nie obserwowano jeszcze objawów choroby [52].

### Inne czynniki ryzyka

W badaniach przeprowadzonych w Izraelu i Anglii wykazano wzrost ryzyka wystąpienia żylaków o 60% u robotników pracujących w pozycji stojącej, niezależnie od płci [37, 53]. Również długotrwałe siedzenie sprzyja powstawaniu żylaków kończyn dolnych. W badaniu Framingham potwierdzono po dwuletnich obserwacjach częstsze występowanie ŻKD u kobiet przewlekłe stojących lub przewlekłe siedzących [54]. Zaparcia i otyłość również często mają związek z siedzącym trybem życia, występują w starszym wieku i są wymieniane jako czynnik mogący mieć wpływ na rozwój pierwotnych żylaków kończyn dolnych [17, 26].

Podsumowaniem wpływu różnych czynników na powstanie ŻKD jest schemat przedstawiony na rycinie 3.



Ryc. 3. Schemat wpływu różnych czynników na powstanie ŻKD; P – ciśnienie hydrostatyczne, V – objętość żyły (wg Vanhoutte P.M.i wsp. 1997, zmodyfikowane) [5].

## 1.6. Teorie powstania żylaków

Na podstawie analizy czynników ryzyka i danych epidemiologicznych powstało w ostatnim półwieczu wiele teorii tłumaczących przyczyny powstawania pierwotnych żylaków, jednakże zarówno ich mnogość jak i krytyczna ocena powodują, że nadal w patogenezie ŻKD jest wiele niewiadomych [16, 55, 56, 57]. Obecnie istnieją dwie podstawowe teorie powstawania pierwotnych żylaków kończyn dolnych: hemodynamiczna i niewydolności ściany żyłnej [16].

### Hemodynamiczna teoria powstawania pierwotnych żylaków kończyn dolnych

Zgodnie z tą teorią czynnikiem powodującym powstawanie pierwotnych ŻKD uważa się nadmierne ciśnienie hydrostatyczne panujące w układzie żylnym, które po przekroczeniu zdolności wyrównawczych ścian naczyń prowadzi do ich poszerzenia [26].

Ma to związek między innymi z pionową postawą ciała, wzmożonym działaniem tłoczni brzusznej (noszenie ciężarów, zaparcia, przewlekły kaszel), wzrostem zastojów w układzie żylnym wskutek ucisku żył przez np. ciężarną macicę, guz [58]. Podwyższone ciśnienie działa wybiórczo na zastawki żył powierzchownych na poziomie ich ujścia do układu głębokiego. Prowadzi to do niewydolności tych zastawek, zwrotnego przepływu krwi (refluku), co z kolei stopniowo poszerza pnie żył powierzchownych. Proces ten jest mechanizmem sprzężenia dodatniego, ponieważ wzmożone ciśnienie hydrostatyczne rozszerzając żyły powoduje niewydolność kolejnych zastawek. Potwierdzeniem tej hipotezy były spostrzeżenia, że u 30% chorych z niewydolnością żyły odpiszczelowej nie stwierdzano żadnej dogłównie wydolnej zastawki od jej ujścia do układu głębokiego [16].

Modyfikacją tej teorii jest hipoteza obecności połączeń tętniczo-żylnych [55] oraz teoria niewydolności zastawek perforatorów [59]. Ta ostatnia tłumaczy powstanie żylaków pierwotnych refluksem jedynie na poziomie niewydolnych perforatorów. Wówczas ciśnienie żylnie z układu głębokiego przenosi się do powierzchownego przez niewydolne żyły przeszywające [60].

### **Teoria osłabienia ściany żyły jako przyczyna ŻKD**

Teoria ta zakłada, że pierwotnie pojawiają się zmiany chorobowe ściany żylniej prowadzące do rozszerzenia naczyń, a wtórnie występuje niewydolność zastawek, refluks i kolejne objawy żylaków kończyn dolnych [56, 61, 62]. Autorzy tej teorii uważają, że powstawanie żylaków jest powodowane genetycznie uwarunkowaną niewydolnością ściany żylniej. Powstające wrzecionowate wypuklenia i poszerzenia prowadzą do niewydolności zastawek i w końcu do refluku. Zwolennicy tej teorii tłumaczą chorobę zwyrodnieniem włókien kolagenowych, postępującym zanikiem komórek mięśniowych gładkich błony środkowej i zewnętrznej. Zmiany tego typu wykazano w badaniach histochemicznych oraz ultrastrukturalnych [20, 63, 64].

Obie teorie patogenezy żylaków w znacznym stopniu nie wykluczają się, brak jednak jednoznacznej odpowiedzi na pytanie, co jest bezpośrednim czynnikiem wyzwalającym proces, który doprowadza do nadciśnienia żylnego i zmian w ścianach żył.

Problem ten ukierunkowuje cel niniejszych badań na określenie roli, jaką odgrywają czynniki powodujące przebudowę ściany żył w patogenezie żylaków kończyn dolnych, w tym metaloproteinazy.



### 1.7. Rola metaloproteinaz w ścianach żył odpiszczelowych

Patomechanizm zmian w ścianie ŻO prowadzących do poszerzenia jej światła i w konsekwencji do niewydolności jest nie do końca poznany. Zmiany dotyczą w głównej mierze warstwy środkowej ściany żyłnej, w której dochodzi do zmniejszenia frakcji mięśniowej oraz zmiany stosunku komórek mięśniowych do komórek zrębu [2, 3, 4]. Analizy biochemiczne wykazały znaczne obniżenie ilości kolagenu w ścianie żył odpiszczelowych z refluksem (ŻOZR) wraz ze wzrostem aktywności enzymów odpowiedzialnych za degradację tego białka. Z kolei zawartość elastyny była porównywalna zarówno w ŻOBR i ŻOZR [65, 66]. Istnieją również dane literaturowe sugerujące zmiany odwrotne. Zauważono wyraźny wzrost zawartości kolagenu przy jednoczesnym zmniejszeniu elastyny w żyłach odpiszczelowych, w których panowało związane z refluksem nadciśnienie, w porównaniu z żyłami zdrowymi [67].

W ostatniej dekadzie w licznych programach badawczych zgromadzono dowody zarówno kliniczne jak i doświadczalne wskazujące, że przyczyny powstawania refluku w ŻO są związane ze zmianami zachodzącym w jej ścianie [6]. Poszerzenia żył odpiszczelowych kończyn dolnych mogą pojawić się nawet wtedy, gdy nie dochodzi do niewydolności zastawek [7]. U 10% pacjentów operowanych z powodu żylaków nie wykazano refluku w ujściu żyły odpiszczelowej, a ponadto u 20% wykazano niewydolność ŻO po stronie przeciwnej, gdzie nie stwierdzano żylaków. Zmieniająca się zdrowa część żyły i rozciągnięte segmenty zaobserwowane w ŻOZR nie są powiązane z lokalizacją, a nie muszą wiązać się z funkcją zastawek. Makroskopowo rozciągnięte odcinki znajdują się często poniżej zastawek, które w USG ZPO okazują się być wydolne [7].

Integralność i mechaniczne właściwości ściany żyłnej warunkowane są przez składowe ECM. Zmiana składu, a także polimorfizm składowych ECM powodują zmiany struktury ściany żyłnej [9, 10]. Istotną rolę w osłabieniu ściany żyły odpiszczelowej prowadzącą do rozwoju niewydolności odgrywa zmniejszenie zawartości elastyny, podczas gdy znaczenie zmian ilości kolagenu nie zostało do tej pory wyjaśnione [9, 11]. Kolagen jest degradowany przez specyficzne metaloproteinazy macierzy międzykomórkowej (matrix metalloproteinases – MMPs): kolagenazy, żelatynazy i stomielizyny. Wzrost zawartości kolagenazy 1 (MMP1) wykazano w żyłach odpiszczelowych zmienionych pozakrzepowo i ŻOZR w stosunku do żył prawidłowych [10]. Ocena zmian ilości stomielizyny 1 (MMP3) nie została dokładnie zbadana.

W jednym z doniesień nie wykazano jej obecności w żyłach prawidłowych [10], zaś wyniki innych badań prowadziły do odmiennych wniosków [68]. W badaniach przeprowadzonych przez Kowalewskiego i wsp. wykazano obecność MMP3 zarówno w żyłach prawidłowych jak i chorobowo zmienionych, a ponadto w niewydolnych i pozakrzepowo zmienionych ŻO stężenie ich było wyższe w porównaniu do żył zdrowych. Z kolei zawartość żelatynazy B (MMP9) w ścianie żyłnej była największa w ŻO zmienionych pozakrzepowo [69].

Podwyższone stężenie i wzrost aktywności metaloproteinaz ECM, może prowadzić do przebudowy macierzy pozakomórkowej, wpływając na właściwości mechaniczne ściany żyłnej, a tym samym na progresję zmian chorobowych [69]. Na aktywację MMPs składa się wiele czynników. Metaloproteinazy mogą aktywować siebie nawzajem i np. w przypadku MMP3 jej aktywność może być warunkowana aktywnością MMP1 [4].

Rozciągnięcie ściany żyły wydaje się być powiązane z obniżoną syntezą lub zwiększoną degradacją elastyny, co prowadzi do zmiany proporcji kolagen: elastyna w ścianie [10]. Badania wpływu metaloproteinaz na zmiany prowadzące do poszerzeń żył wskazują zmniejszone stężenie żelatynazy B (MMP2) i zwiększone inhibitora metaloproteinaz 1 (TIMP1) w ŻOZR w porównaniu do ŻOBR [71]. Wykazano, że MMP1 i kolagenaza 3 (MMP3) były obecne zarówno w ŻOBR jak i w ŻOZR, ale zawartość MMP1 była znacznie podwyższona w ŻOZR w porównaniu do ŻOBR. Badania ŻOZR dla określenia zmian miejscowych zawartości proteaz pokazały, że ekspresja MMP1 i MMP3 była zmniejszona w odcinku dystalnym w porównaniu do odcinka proksymalnego [10].

Wyniki badań innych autorów wskazują, że zmiany w ECM ścian żył odpiszczelowych z refluksem mogą być powiązane ze zmianami w aktywności metaloproteinaz [72]. Zaobserwowano wyraźny spadek aktywności MMP2 w żyłę odpiszczelowej u pacjentów z niewydolnością żylną w porównaniu do grupy kontrolnej; jednak nie wykazano znaczących różnic w aktywności MMP3 i MMP9 [71].

Z cytowanych badań wynika, że warunki hydrostatyczne związane z nadciśnieniem w układzie żylnym mogą powodować zmiany ekspresji i aktywności metaloproteinaz obecnych w ścianie żył lub, że różna aktywność MMPs powoduje zmiany w składzie ściany żyłnej doprowadzając do ich poszerzenia i niewydolności. Zagadnienie to nie zostało dotychczas wystarczająco zbadane. Brakuje zwłaszcza danych na temat występowania MMPs w ścianie żył [10, 68, 69, 72, 73].

W wynikach dotychczas przeprowadzonych analiz nie ma zgodności w kwestii występowania i aktywności metaloproteinaz powodujących zmiany zawartości elementów

odpowiedzialnych za napięcie ściany żyły, co w konsekwencji może skutkować niewydolnością żylną.

W badaniach przedstawionych w niniejszej pracy wybrano przedstawicieli trzech głównych grup MMPs, których udział sugeruje się w patologii żylniej tj. MMP1 (kolagenaza), MMP3 (stromielizyna 1), MMP9 (żelatynaza B) [1, 74, 75, 76, 77]. Oznaczenie stężenia wybranych metaloproteinaz w krwi obwodowej mogłyby potencjalnie służyć jako nowy czynnik predykcyjny zagrożenia wystąpienia żylaków kończyn.

## 2. Cel pracy

Celem pracy była ocena występowania i stężenia trzech metaloproteinaz: MMP1 (kolagenazy), MMP3 (stromielizyny 1) oraz MMP9 (żelatynazy B) w materiale żylnym i krwi obwodowej z uwzględnieniem podziału na dwie grupy: żyły zdrowe (brak żylaków i brak refluksu w ŻO w badaniu USG ZPO) i żylakowato zmienione (żylaki i refluks w ŻO w badaniu USG ZPO).

Cel był realizowany w następujących etapach:

1. Badanie ultrasonograficzne z podwójnym obrazowaniem w grupie z żylakami i bez żylaków z oceną stopnia refluksu i średnicy żyły odpiszczelowej.
2. Immunohistochemiczna ocena ekspresji badanych metaloproteinaz w żyłach odpiszczelowych wydolnych i niewydolnych.
3. Ocena stężenia aktywnej formy wybranych MMPs w ścianie żył odpiszczelowych.
4. Analiza stężenia aktywnej formy metaloproteinaz w krwi obwodowej.

### **3. Materiał i metody**

Badania przeprowadzono w latach 2008 – 2010 w Klinice Chirurgii Ogólnej i Naczyń Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego oraz na Oddziale Chirurgii Centrum Medycznego HCP w Poznaniu. Do badania włączono grupę sześćdziesięciu chorych z podziałem na dwie grupy w zależności od rodzaju wymaganego zabiegu tj. z żylakami kończyn dolnych do operacji żylaków oraz chorych bez żylaków do operacji pomostowania tętnic.

Od każdego z chorych zebrano wywiad, przeprowadzono badanie podmiotowe oraz wykonano badanie ultrasonograficzne. Na podstawie wywiadu określono przed zabiegiem operacyjnym czynniki ryzyka występowania żylaków kończyn dolnych w grupie chorych z żylakami i chorych wymagających operacji pomostowania tętnic celem wykluczenia żylaków wtórnych.

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, nr uchwały 305/06.

#### **3.1. Badanie ultrasonograficzne z podwójnym obrazowaniem**

W badaniu ultrasonograficznym z podwójnym obrazowaniem (USG ZPO) przed zabiegiem oceniono układ głęboki żył celem potwierdzenia jego drożności oraz układ powierzchowny dla potwierdzenia refluksu w grupie chorych z żylakami oraz jego wykluczenia w grupie bez żylaków. Do badania ultrasonograficznego układu żylnego kończyn dolnych używano głowic liniowych o częstotliwości od 5 do 13 MHz.

Badanie USG ZPO układu powierzchownego wykonywano w pozycji stojącej. Po ocenie drożności pni żylnych oceniano wydolność układu zastawkowego. W tym celu posłużono się prezentacją B połączoną z pomiarem dopplerowskim. Niekiedy do oceny zastawki wystarczy prezentacja B, która przy dobrej jakości obrazu uwidocznia jej płatkę. Wykonanie próby Valsalvy powoduje widoczne zamknięcie „zdrowej” zastawki, a żyła zlokalizowana dogłównie zwiększa swoją średnicę. Używając podczas tej próby pomiaru

dopplerowskiego obwodowo w stosunku do zastawki rejestrowano w przypadku jej niewydolności patologiczny przepływ wsteczny trwający powyżej 0,5 s, czyli refluks.

Refluks oceniano w skali czterostopniowej, tj. I<sup>0</sup> do poziomu połowy uda, II<sup>0</sup> do poziomu stawu kolanowego, III<sup>0</sup> do połowy goleni, IV<sup>0</sup> do poziomu kostki przyśrodkowej. Dodatkowo dokonano pomiarów średnicy pnia w odległości 30 mm poniżej poziomu zastawki ostialnej żyły odpiszczelowej. W trakcie zabiegu pobierano odcinki żyły odpiszczelowej od każdego pacjenta. Grupę ŻOZR – żył odpiszczelowych z patologicznym refluksem (> 0,5 sekundy) w USG ZPO stanowiło 30 fragmentów żył pobranych w trakcie operacji żylaków kończyn dolnych. Drugą grupę stanowiło 30 pacjentów, od których pobrano odcinki żył odpiszczelowych bez refluksu – ŻOBR. Żyły te stanowiły niewykorzystany materiał w trakcie operacji pomostowania tętnic. ŻOBR musiały spełniać określone warunki, tj. ich średnica musiała być większa od 3 mm, w badaniu USG ZPO bez patologicznego refluksu oraz makroskopowo nie wykazywać cech uszkodzenia. W obu badanych grupach oceniane fragmenty ŻO pobierane były z odcinka między 4 do 8 cm od ujścia do żyły udowej.

Wiek i płeć oraz czynniki ryzyka wystąpienia żylaków kończyn dolnych były porównywalne w obu grupach. Dane pacjentów objętych badaniem przedstawiono w tabeli 3.

Tab. 3. Charakterystyka pacjentów (ŻOBR – żyły odpiszczelowe bez refluksu; ŻOZR – żyły odpiszczelowe z refluksem)

	ŻOBR	ŻOZR
liczba chorych	30	30
wiek (lata)	62,1 +/- 8,5	58,4 +/- 14,3
płeć (kobiety/mężczyźni)	14/16	19/11
wywiad rodziny w kierunku ŻKD (% w grupie)	20 (66,6)	15 (50)
praca stojąca (% w grupie)	12 (40)	10 (33,3)
praca siedząca (% w grupie)	13 (43,3)	15 (50)
palenie papierosów aktualnie i/lub w przeszłości (% w grupie)	14 (46,6)	15 (50)

### **3.2. Badania immunohistochemiczne**

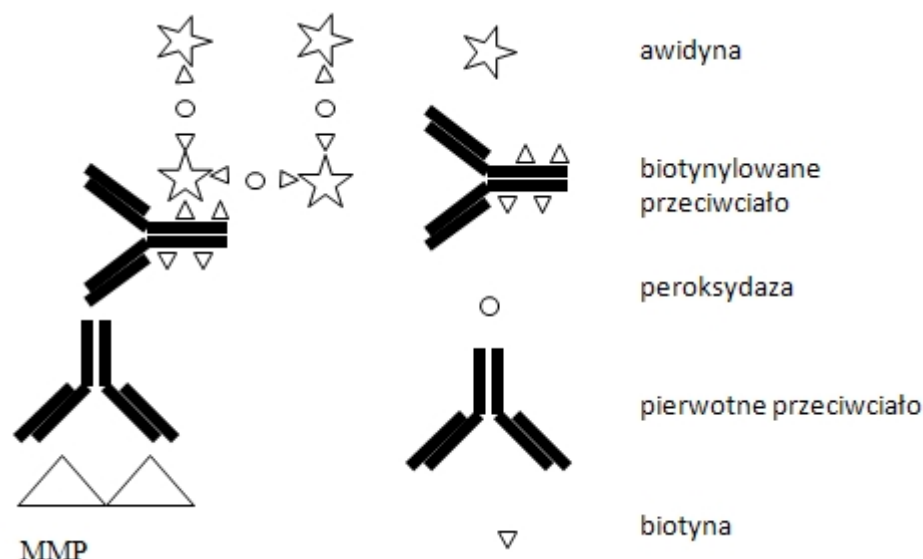
W obu badanych grupach pacjentów przeprowadzono analizę immunohistochemiczną celem wykazania obecności badanych metaloproteinaz. Materiał do badań immunohistochemicznych był utrwalany przez 48 godzin w 10% roztworze buforowanej formaliny. Następnie z materiału operacyjnego pobierano wycinki i wykonywano preparaty histologiczne, stosując rutynową metodę parafinową.

W celu przeprowadzenia oznaczeń immunohistochemicznych wybrane reprezentatywne wycinki krojono na skrawki o grubości 4  $\mu\text{m}$  i osadzono na silanowanych szkiełkach (3-aminopropyltriethoxysilane, Sigma). Skrawki były następnie odparafinowane i uwadniane. Do przeprowadzenia oznaczeń immunohistochemicznych posłużono się metodą ABC (Avidyne-Biotin Complex) z wykorzystaniem zestawów LSAB PLUS Plus Kit/HRP (DakoCytomation). Celem uwidocznienia antygenów stosowano godzinną inkubację preparatów w buforze cytrynianowym (pH 6,0) w łaźni wodnej w temperaturze 98°C. Aktywność endogennej peroksydazy blokowano 3% nadtlenu wodoru. W dalszym etapie preparaty inkubowano przez noc w temperaturze 4°C z odpowiednimi przeciwciałami pierwszorzędowymi:

- monoklonalne mysie przeciwciało anti-MMP1 (klon 3666.111) firmy R&D Systems w stężeniu 1:50,
- monoklonalne mysie przeciwciało anti-MMP3 (klon SPM293) firmy Novus Biologicals w stężeniu 1:20,
- monoklonalne mysie przeciwciało anti-MMP9 (klon 4H3) firmy Novus Biologicals w stężeniu 1:20.

Kontrolę pozytywną stanowiły odpowiednie dla danego przeciwciała preparaty zalecane przez producenta. Kontrolą negatywną stanowił w każdym przypadku skrawek, na który nie podawano przeciwciała pierwszorzędowego. Po inkubacji preparatów z pierwszym przeciwciałem nakrapiano na każde szkiełko przeciwciała drugorzędowe znakowane biotyną i inkubowano 15 minut. W kolejnym etapie na szkiełka nakładano kompleks streptawidyna-peroksydaza chrzanowa i skrawki inkubowano kolejne 15 minut. W trakcie między poszczególnymi inkubacjami preparaty płukano w buforze TBS pH 7,6. Peroksydazę lokalizowano w reakcji barwnej, stosując jako chromogen DAB (3,3-diaminobenzydynę, Sigma). Preparaty kontrastowano za pomocą hematoksyliny Mayera, odwadniano i zatapiano w balsamie kanadyjskim.

Zasadę metody przedstawiono na rycinie 4.



Ryc. 4. Metoda oznaczeń immunohistochemicznych ABC (awidyna – biotyna – peroksydaza)

### 3.2.1. Ocena w mikroskopie świetlnym – metoda półilościowa

Ekspresję badanych antygenów oceniano pod mikroskopem świetlnym na podstawie stopnia nasilenia reakcji immunohistochemicznej wg czterostopniowej skali: 0 – brak reakcji, + odpowiadało niskiemu natężeniu reakcji, ++ oznaczało średnie natężenie reakcji, +++ – wysokie natężenie reakcji.

### 3.2.2. Analiza morfometryczna

Obrazy preparatów naczyń rejestrowano przy pomocy mikroskopu świetlnego Motic (Micro Optic Industrial Group Co.) z wbudowaną kamerą cyfrową i sterowanego programem Motic Images 2000 wersja 1.2 (MS Windows). Analiza morfometryczna ekspresji markerów została wykonana metodą opartą na wizualizacji przestrzennej tych markerów na obrazach mikroskopowych, co spowodowało zmianę płaskiego obrazu na trójwymiarowy z wykorzystaniem jego jasności jako trzeciej współrzędnej (współrzędnej przestrzennej). W programie A4D obliczono ekspresję badanych markerów na przekrojach poprzecznych naczyń i na tej podstawie oceniano ich procentowy udział w tkankach badanych populacji.



### **3.3. Badania stężenia formy aktywnej wybranych metaloproteinaz w ścianie żył**

Materiał do badania stężenia aktywnej formy metaloproteinaz w ścianie żył natychmiast po ich pobraniu i przepłukaniu wodą demineralizowaną umieszczany był w suchej próbkówce, a następnie w termosie z suchym lodem i w ciągu 30 minut umieszczany w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$ . Przed oznaczeniem stężenia metaloproteinaz fragmenty żył umieszczano w ciekłym azocie i rozdrabniano. Do uzyskanych prób dodawano bufor TRIS o pH 7,4 zawierający 1 mM monotioglicerolu i sonifikowano o mocy 750 W. Po odwirowaniu homogenatów oznaczono aktywne formy metaloproteinaz w supernatancie przy pomocy zestawów testowych (dla MMP1 nr kodu RPN 2629, dla MMP3 nr RPN 2639 oraz dla MMP9 kod nr RPN 2634) firmy Amersham Bioscience. Ocena ilościowa aktywnych form każdej z badanych metaloproteinaz została wykonana z użyciem specyficznych substratów białkowych. Stężenie aktywnej formy enzymu oznaczono na podstawie krzywej wzorcowej. Krzywe wzorcowe dla badanych metaloproteinaz mieściły się odpowiednio: dla MMP1 w zakresie stężeń od 0,1 do 1,56 ng/ml z czułością 100 pg/ml, dla MMP3 w zakresie od 0,25 do 8 ng/ml z czułością 0,1 ng/ml, dla MMP9 w zakresie 0,125 do 4 ng/ml z czułością 0,1 ng/ml. Stężenie białka całkowitego w homogenatach poszczególnych prób żył oznaczono metodą Lowry'ego. Stężenie aktywnej formy metaloproteinaz wyrażano w przeliczeniu na stężenie białka obecnego w próbce.

### **3.4. Oznaczenie całkowitego stężenia wybranych metaloproteinaz w osoczu**

Krew do oznaczeń stężeń metaloproteinaz była pobierana bezpośrednio przed zabiegiem od chorych z żylakami z nakłucia bezpośredniego żyłaków (po znieczuleniu), zaś w grupie z wydolnymi żyłami odpiszczelowymi z żył powierzchownych kończyn górnych.

#### **3.4.1. Oznaczanie całkowitego stężenia MMP1 (formy pro- i aktywnej)**

Oznaczenie wykonano za pomocą testu firmy GE Healthcare, Amersham Matrix Metalloproteinase-1 (MMP1), Biotrak Activity Assay System. Metoda pozwala na specyficzny i dokładny pomiar całkowitego stężenia MMP1, czyli formy proaktywnej i aktywnej tego enzymu, w homogenatach tkanek, kulturach tkankowych, osoczu i surowicy.

Próby osocza uzyskane po odwirowaniu krwi pobranej do probówek z heparyną, stanowiły materiał do badań. Przed oznaczeniem osocze rozcieńczano pięciokrotnie buforem dostarczonym wraz z testem. Na bazie roboczego roztworu wzorcowego zawierającego liofilizowaną ludzką pro-MMP1 przygotowano serię wzorców w zakresie niższych (0,1 – 1,56 ng/ml) i wyższych (3,13 – 50 ng/ml) stężeń MMP1. Na mikropłytkę pokrytą anty-MMP1 nanoszono odpowiednio po 100 µl roztworu buforowego (próba zerowa), każdego z roztworów wzorcowych i prób badanych. Płytkę inkubowano przez noc w temperaturze 2 – 8°C, po czym przemywano czterokrotnie buforem do płukania. W celu aktywacji pro-MMP1 w kolejnym etapie nanoszono po 50 µl roztworu APMA (octan p-aminofenylortęciowy) do każdego dołka zawierającego próby badane i roztwory wzorcowe, a następnie 50 µl odczynnika do detekcji zawierającego substrat (liofilizowany peptyd S-2444<sup>TM</sup> w 50 mM buforze Tris-HCl, pH 7,6) oraz enzym do detekcji. Płytkę wytrząsano 20 sekund i odczytywano wartości absorbancji przy fali długości 405 nm ( $A_{t_0}$ ). Płytkę przykrywano i inkubowano 4 godziny w temperaturze 37°C, po czym wytrząsano przez kolejne 20 sekund i powtórnie odczytywano wartość absorbancji ( $A_{t_4}$ ). Różnica absorbancji dla każdego z roztworów wzorcowych i badanych prób pozwoliła obliczyć szybkość jej zmiany zgodnie z poniższym wzorem:

$$\frac{(A_{t_4} - A_{t_0}) \times 1000}{h^2}$$

Na podstawie otrzymanych wartości dla wzorców sporządzono krzywe wzorcowe dla dwóch zakresów stężeń MMP1, co pozwoliło obliczyć całkowite stężenie MMP1 (ng/ml) w badanych próbach. Uzyskane wyniki pomnożono pięciokrotnie w celu uwzględnienia rozcieńczenia. Czulość metody w zakresie niższych stężeń MMP1 wynosi 100 pg/ml i dla wyższych stężeń 2,2 ng/ml.

### **3.4.2. Oznaczanie całkowitego stężenia MMP3 (formy pro- i aktywnej)**

Oznaczenie wykonano za pomocą testu firmy GE Healthcare, Amersham Matrix Metalloproteinase-3 (MMP3), Human, Biotrak ELISA System (Code: RPN2613). Metoda pozwala na specyficzny i dokładny pomiar całkowitej aktywnej MMP3 w zakresie stężeń 3,75 – 120 ng/ml z czulością 2,35 ng/ml. Oznaczenie oparte jest na metodzie sandwiczowej ELISA.

Materiał do badań stanowiły próby osocza uzyskane po odwirowaniu krwi pobranej do probówek z heparyną. Przed oznaczeniem osocze rozcieńczano ośmiokrotnie buforem dostarczonym wraz z testem. Do dołków na mikropłytkce pokrytych przeciwciałem anti-MMP3 наносzono odpowiednio po 100 µl roztworu buforowego (próba zerowa), każdego z roztworów wzorcowych i prób badanych. Płytkę inkubowano godzinę w temperaturze 2 – 8°C, po czym przemywano czterokrotnie buforem do płukania. Do każdego z dołków dodano następnie po 100 µl konjugatu anti-MMP3 i peroksydazy chrzanowej. Płytkę inkubowano powtórnie 2 godziny w temperaturze 2 – 8°C i przemywano czterokrotnie buforem. Kolejno naniesiono do każdego dołka 100 µl substratu TMB (3,3',5,5'-tetrametylobenzydina-nadtlenek wodoru). Płytkę pozostawiono w temperaturze pokojowej (20 – 27°C), a następnie dodano po 100 µl 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i zmierzono absorbancję A<sub>450</sub> przy długości fali 450 nm. Stężenie MMP3 (ng/ml) w próbach badanych uzyskano z krzywej wzorcowej A<sub>450</sub> vs MMP3 (ng/ml) w zakresie stężeń 0 – 120 ng/ml. Uzyskane wyniki pomnożono ośmiokrotnie w celu uwzględnienia rozcieńczenia.

$$\frac{(A_{t_2} - A_{t_0}) \times 1000}{h^2}$$

### 3.4.3. Oznaczanie całkowitego stężenia MMP9 (formy pro- i aktywnej)

Oznaczenie wykonano za pomocą testu firmy GE Healthcare, Amersham Matrix Metalloproteinase-9 (MMP9) Biotrak Activity Assay System. Metoda pozwala na specyficzny i dokładny pomiar całkowitej aktywności MMP9 w homogenatach tkanek, kulturach tkankowych, osoczu i surowicy.

Materiał do badań stanowiły próby osocza uzyskane po odwirowaniu krwi pobranej do probówek z heparyną. Przed oznaczeniem osocze rozcieńczano trzydziestodwukrotnie buforem dostarczonym wraz z testem. Na bazie roboczego roztworu wzorcowego zawierający liofilizowaną ludzką pro-MMP9 przygotowano serię wzorców w zakresie stężeń 0 – 16 ng/ml. Do dołków na mikropłytkce pokrytych przeciwciałem anti-MMP9 наносzono odpowiednio po 100 µl roztworu buforowego (próba zerowa), każdego z roztworów wzorcowych i prób badanych. Płytkę inkubowano przez noc w temperaturze 2 – 8°C, po czym przemywano czterokrotnie buforem do płukania. W celu aktywacji pro-MMP9 w kolejnym etapie наносzono po 50 µl roztworu APMA (octan p-aminofenylortęciowy) do każdego dołka zawierającego próby badane i roztwory wzorcowe. Płytkę wytrząsano 20 sekund, po czym inkubowano 1,5 godziny

w temperaturze 37°C, a następnie dodano po 50 µl odczynnika do detekcji zawierającego substrat (лиофилизованы peptyd S-2444<sup>TM</sup> w 50 mM buforze Tris-HCl, pH 7,6) i enzym do detekcji. Płytkę wytrząsano 20 sekund i odczytywano wartości absorbancji przy długości fali 405 nm ( $A_{t_0}$ ). Płytkę przykrywano, inkubowano 2 godziny w temperaturze 37°C, po czym wytrząsano 20 sekund i powtórnie odczytywano wartość absorbancji ( $A_{t_2}$ ). Różnica absorbancji dla każdego z roztworów wzorcowych i badanych prób pozwoliła obliczyć szybkość jej zmiany zgodnie z poniższym wzorem:

$$\frac{(A_{t_2} - A_{t_0}) \times 1000}{h^2}$$

Na podstawie wartości otrzymanych dla wzorców sporządzono krzywą wzorcową, co pozwoliło odczytać całkowite stężenie MMP9 (ng/ml) w badanych próbach. Uzyskane wyniki pomnożono trzydziestodwukrotnie w celu uwzględnienia rozcieńczenia.

### **3.5. Analiza statystyczna**

W pierwszym etapie analizy statystycznej weryfikowano zgodność wszystkich uzyskanych wyników z rozkładem Gaussa przy pomocy testu Shapiro-Wilka. Wyniki badań wyrażono w postaci: średniej arytmetycznej, odchylenia standardowego, mediany oraz wartości minimalnej i maksymalnej. Wyniki analizy morfometrycznej, testów ELISA dla metaloproteinaz porównywano między grupami testem Kruskalla-Wallisa wraz z testem wielokrotnych porównań dla wszystkich badanych podgrup. Badano również korelację między poszczególnymi parametrami morfometrycznymi i wynikami uzyskanymi testem ELISA przy pomocy współczynnika korelacji Spearmana. Wyniki przyjęto jako istotne statystycznie dla  $p < 0,05$ . Analizę statystyczną przeprowadzono przy pomocy programu Statistica PL wersja 7.1 (Statsoft, Inc).

## 4. Wyniki

### 4.1. Ocena morfometryczna żył odpiszczelowych w grupie chorych z żylakami w badaniu USG ZPO

Średni wymiar wewnętrzny ŻO po stronie lewej wynosił 6,0 mm +/- 2,1 mm, po stronie prawej 5,6 mm +/- 1,2 mm. Wyniki pomiarów przedstawiono w tabeli 4.

Tab. 4. Ocena średnicy i stopnia refluku w żyłach odpiszczelowych w grupie chorych z żylakami

	kończyna prawa	kończyna lewa
średnica	liczba żył	liczba żył
≤3 mm	6	8
>3 do 5 mm	9	10
>5 mm	15	12
stopień refluku		
0	2	4
1	5	5
2	6	6
3	12	13
4	5	2

Najczęściej po obu stronach stwierdza się refluks III<sup>0</sup> (40%). Wykazano dodatnią i istotną statystycznie korelację między średnicą wewnętrzną badanych żył, a stopniem refluku ( $r = 0,39$ ;  $p < 0,001$ ).

### 4.2. Ocena układu żylnego u chorych bez żylaków w badaniu USG ZPO

Analizie poddano grupę trzydziestu chorych. Średni wymiar wewnętrzny ŻO po stronie lewej wynosił 4,8 mm +/- 1,9 mm, po stronie prawej 4,5 mm +/- 1,3 mm. Wyniki zestawiono w tabeli 5.

Tab. 5. Ocena średnicy i stopnia refluksu w żyłach odpiszczelowych bez żyłaków.

	kończyna prawa	kończyna lewa
średnica	liczba żył	liczba żył
$\leq 3$ mm	5	8
>3 do 5 mm	18	16
>5 mm	7	6

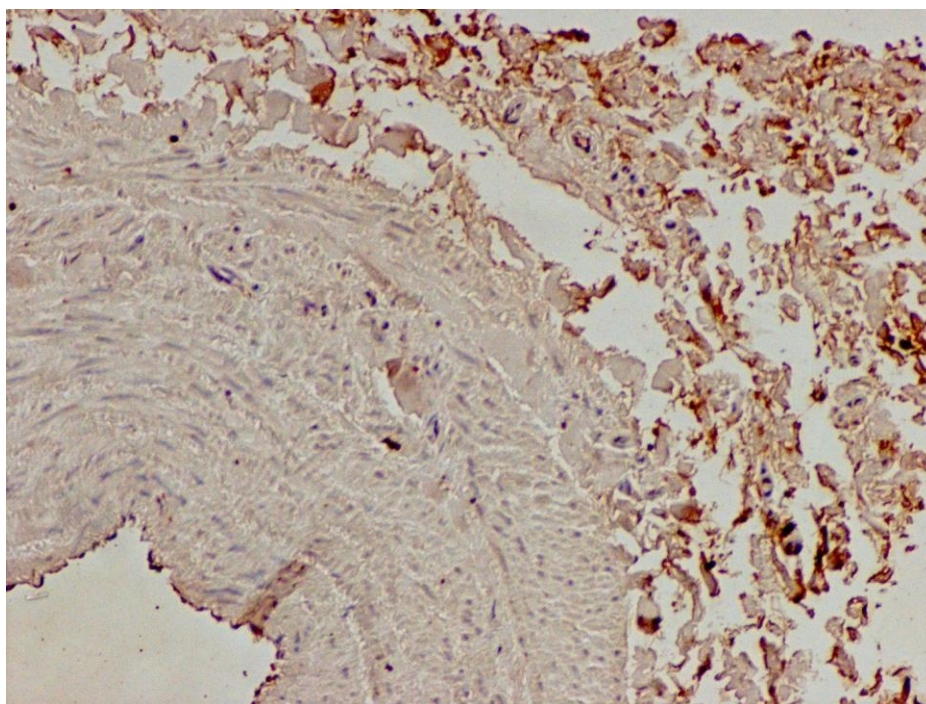
#### 4.3 Wyniki analizy półilościowej wybranych metaloproteinaz

W ocenie półilościowej nie wykazano istotnych różnic w ekspresji MMP1. W przypadku MMP3 zaobserwowano istotne różnice w błonie wewnętrznej, odpowiednio – brak reakcji ŻOZR – 19,8%, a w ŻOBR – 66,6% ( $p < 0,05$ ). Natomiast w błonie środkowej wysokie natężenie ekspresji było również istotne i wynosiło dla ŻOBR – 63,3% i ŻOZR – 20% ( $p < 0,05$ ). Dla MMP9 w ocenie półilościowej pozytywną reakcję immunohistochemiczną stwierdzono w błonie środkowej, dla ŻOBR wynosił on 85,6%, zaś dla ŻOZR 71,2% ( $p < 0,05$ ).

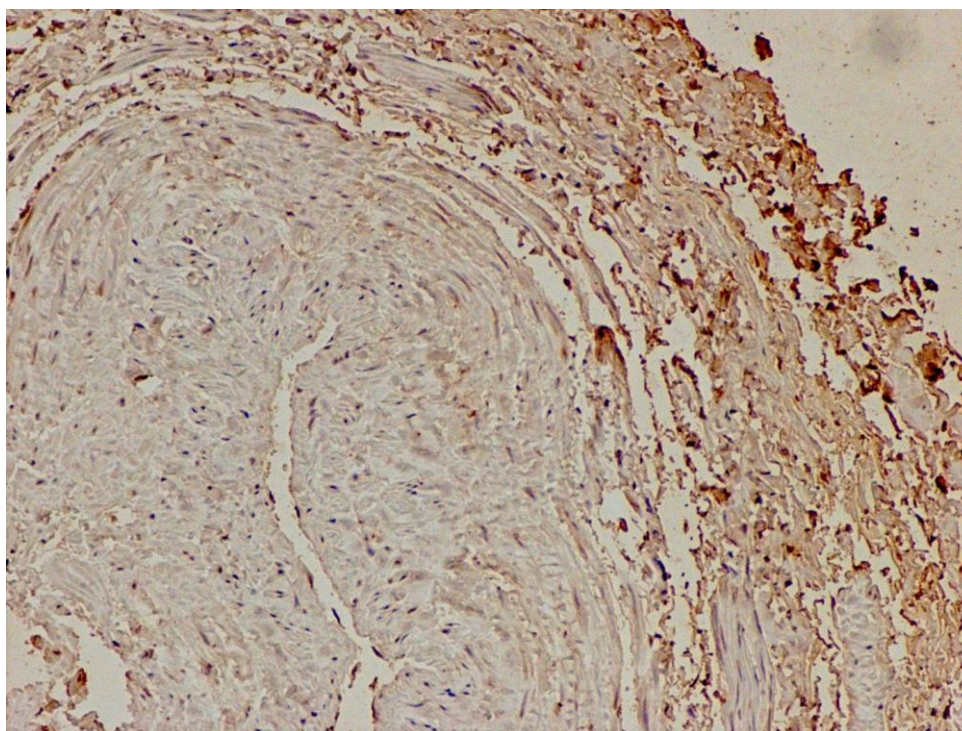
#### 4.4. Wyniki oznaczeń immunohistochemicznych

We wszystkich badanych fragmentach żył wykazano obecność badanych metaloproteinaz. Wyniki reakcji immunohistochemicznych przedstawiono na fotografiach od 1 do 6.

Fot.1. Przekrój poprzeczny żyły odpiszczelowej bez refluksu. Dodatnia reakcja immunohistochemiczna wykazała obecność MMP1 w śródbłonku (+), błonie środkowej (+) i przydanie (+++). Powiększenie oryginalne x 250

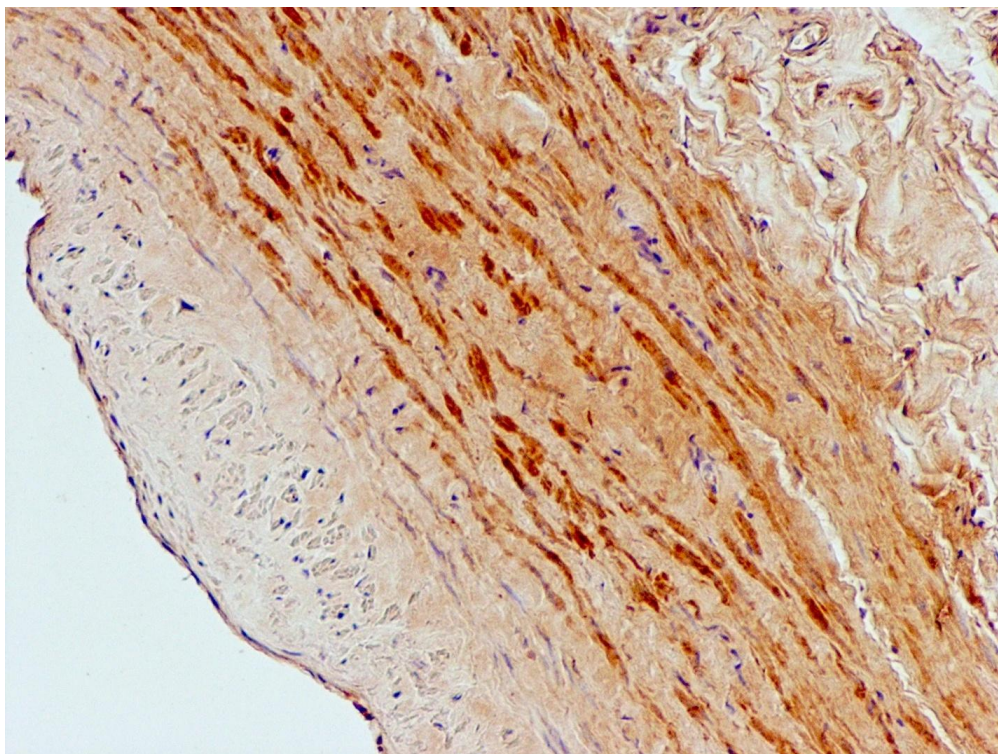


Fot. 2. Przekrój poprzeczny żyły odpiszczelowej z refluksem. Dodatnia reakcja immunohistochemiczna wykazała obecność MMP1 w śródbłonku (+) i przydanie (++). Powiększenie oryginalne x 250

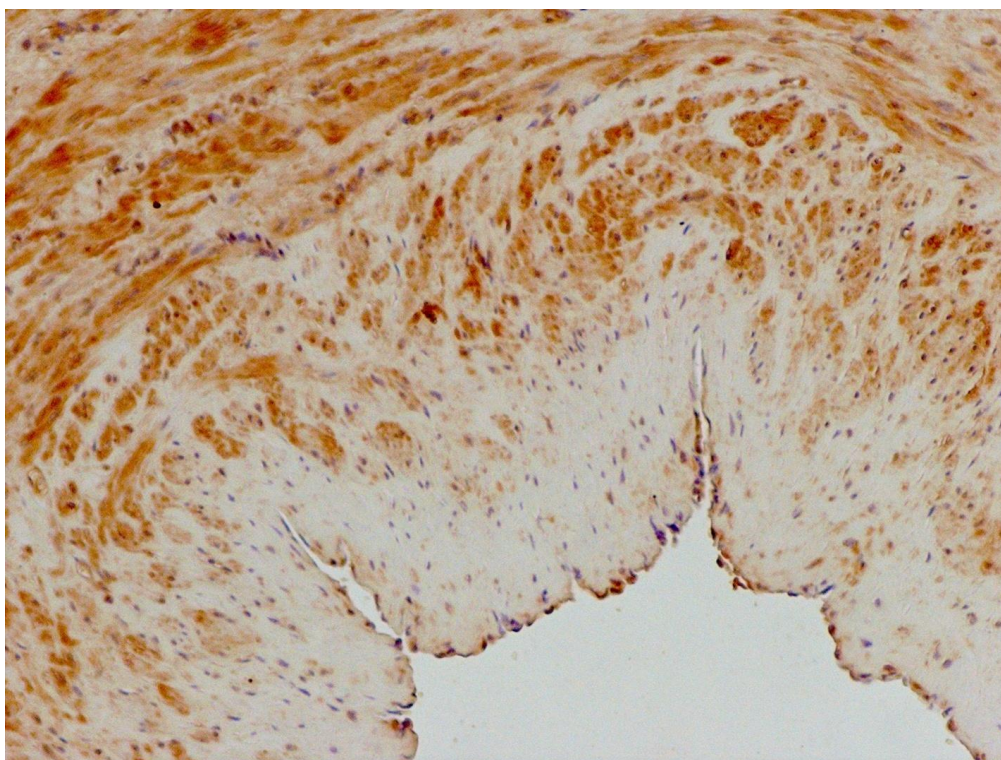




Fot. 3. Przekrój poprzeczny żyły odpiszczelowej bez refluksu. Dodatnia reakcja immunohistochemiczna wykazała obecność MMP3 w śródbłonku (+++), tkance łącznej intymy (+), błonie środkowej (+++) i przydancie (+++). Powiększenie oryginalne x 250

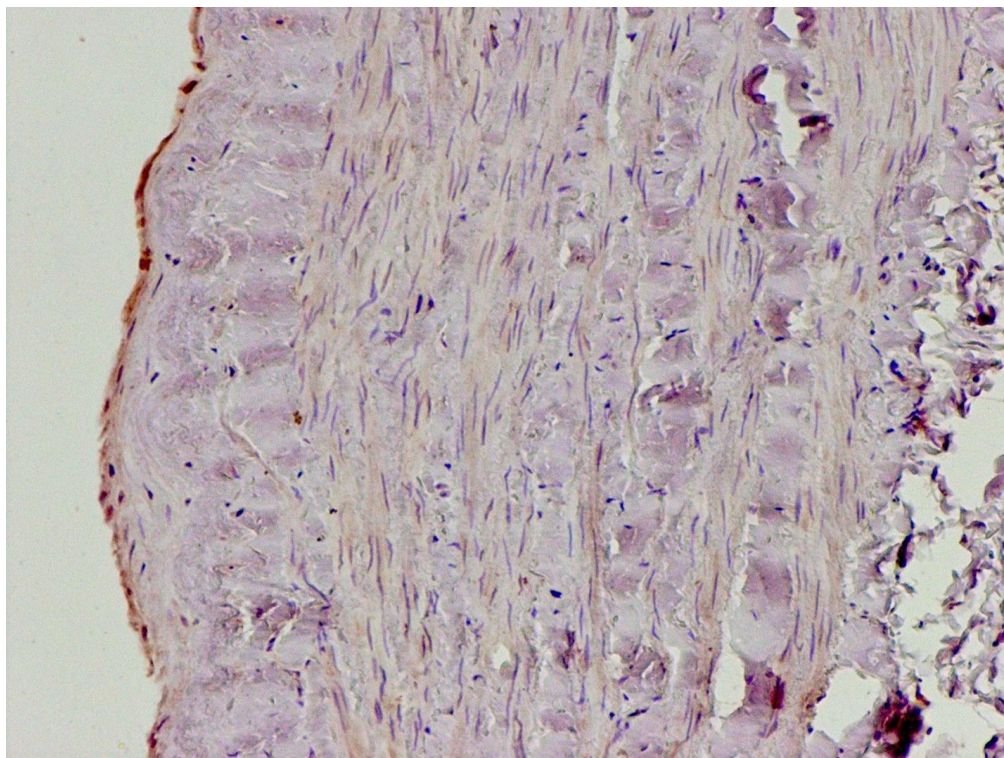


Fot. 4. Przekrój poprzeczny żyły odpiszczelowej z refluksem. Dodatnia reakcja immunohistochemiczna wykazała obecność MMP3 w śródbłonku (+), błonie środkowej (+++) i przydancie (++). Powiększenie oryginalne x 250

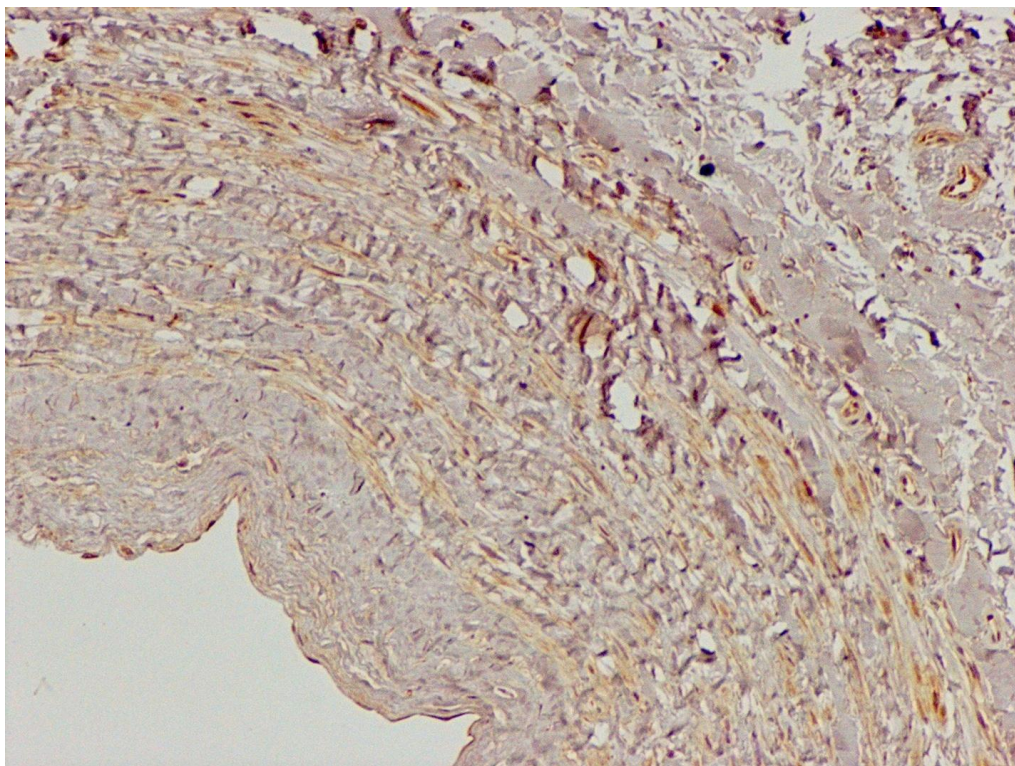




Fot. 5. Przekrój poprzeczny żyły odpiszczelowej bez refluksu. Dodatnia reakcja immunohistochemiczna wykazała obecność MMP9 w błonie środkowej (+). Powiększenie oryginalne x 250

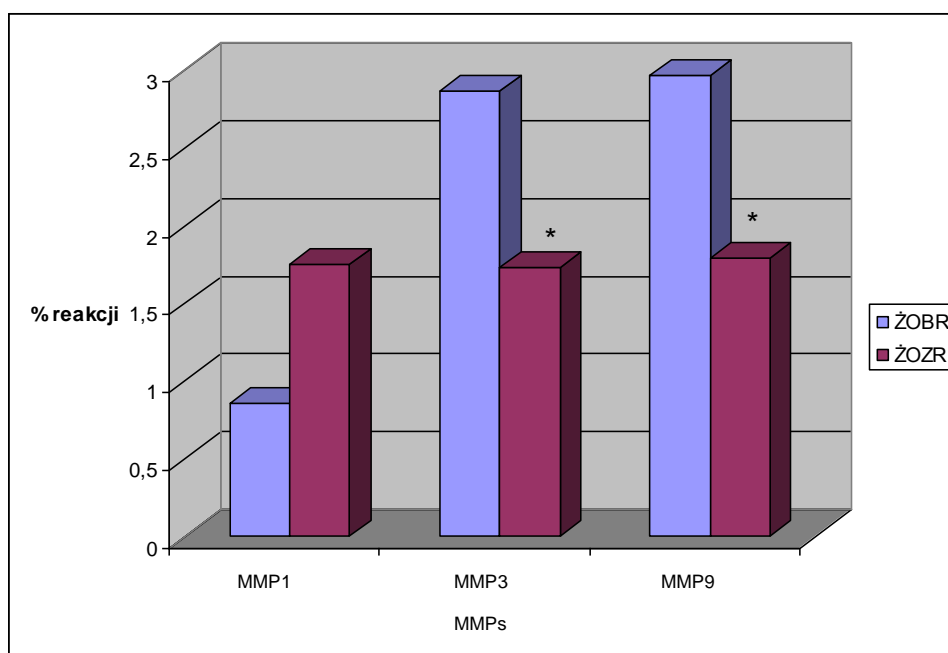


Fot. 6. Przekrój poprzeczny żyły odpiszczelowej z refluksiem. Dodatnia reakcja immunohistochemiczna wykazała obecność MMP9 w śródbłonku (+++) i błonie środkowej (+++). Powiększenie oryginalne x 250



W ocenie morfometrycznej wyższe wartości procentowego udziału pola powierzchni ekspresji MMP3 i MMP9 odnotowano dla ŻOBR, w porównaniu z ŻOZR, jednak różnica ta nie była istotna statystycznie. W przypadku MMP1 różnica między grupami była wyższa, ale również nieznaczna statystycznie (rycina 5.).

Ryc. 5. Procentowy udział pola powierzchni ekspresji metaloproteinaz 1, 3 i 9 w żyłach odpiszczelowych bez refluksu i z refluksem \*  $p \leq 0,05$

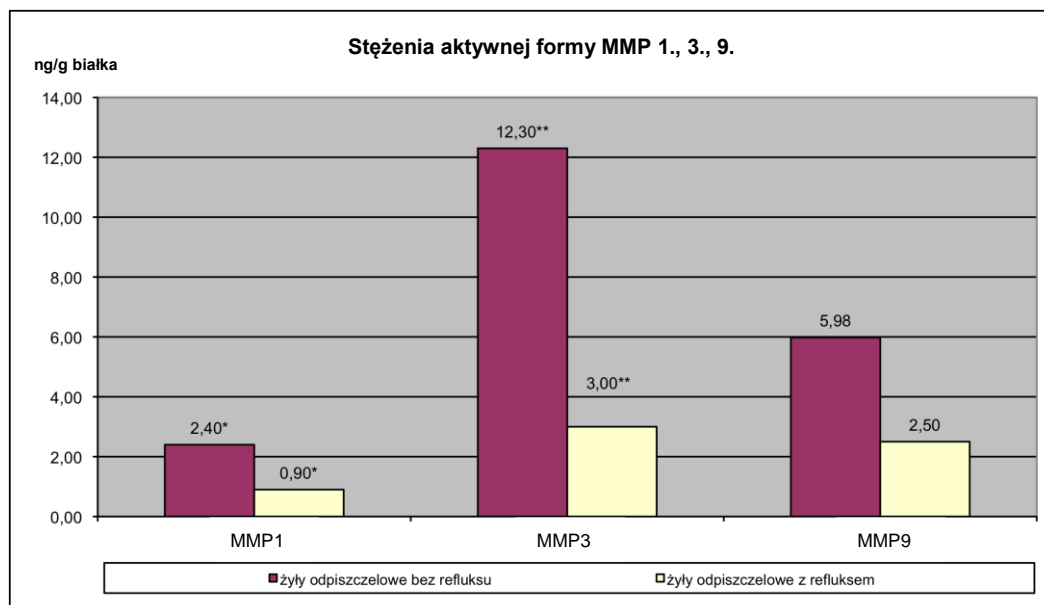


#### 4.5. Wyniki oznaczeń formy aktywnej metaloproteinaz w ścianie naczyń metodą ELISA

Badania stężenia aktywnej formy metaloproteinaz w ścianie naczyń metodą ELISA wykazały, że w części badanych przypadków stężenie badanych MMPs nie było możliwe do oznaczenia. Stężenie aktywnej formy MMP1 poniżej poziomu detekcji stwierdzono w jednym przypadku (stanowiącym 3,3% przypadków badanej grupy) dla ŽOBR i w dwa dla ŽOZR (6,6%). Średnie stężenie aktywnej formy MMP1 różniło się istotnie między badanymi grupami ( $p < 0,01$ ) i wynosiło 2,4 ng/g dla ŽOBR i dla 0,9 ng/g ŽOZR. Formy aktywnej MMP3 nie można było oznaczyć w dwóch fragmentach ŽOBR (6,6%) i 4 w ŽOZR (13,2%). Średnie stężenie aktywnej formy MMP3 było wyższe dla ŽOBR i wynosiło 12,30 ng/g, a dla ŽOZR 3,00 ng/g i osiągnęło znamienność statystyczną ( $p < 0,001$ ). Stężenie aktywnej formy MMP9 było poniżej poziomu detekcji w pięciu próbach ŽOBR (16,5%) i w ośmiu dla ŽOZR (26,4%). Średnie stężenie aktywnej formy

MMP9 nie różniło się istotnie między grupami i wynosiło 5,98 ng/g dla ŻOBR oraz 2,5 ng/g dla ŻOZR. Wyniki te przedstawiono na rycinie 6.

Ryc. 6. Porównanie średnich stężeń aktywnych form metaloproteinaz 1., 3. i 9. w ścianie żyl w badanych grupach \* $p \leq 0,01$  \*\*  $p \leq 0,001$



Istotne dodatnie korelacje między wynikami pomiarów morfometrycznych i stężeniem aktywnych form metaloproteinaz w obu badaniach potwierdzono w ścianach żył dla MMP1 ( $r = 0,710$ ) w ŻOBR i w ŻOZR ( $r = 0,945$ ). Nie wykazano korelacji w badaniach obejmujących MMP3. Ujemną i istotną korelację wykazano między stężeniem aktywnej formy MMP9 a MMP1 w ŻOZR ( $r = -0,736$ ) oraz korelację dodatnią z ekspresją tej metaloproteinazy ( $r = 0,873$ ). Zestawienie otrzymanych wyników przedstawiono w tabeli 6.

Tab. 6. Korelacje między stężeniem aktywnych form metaloproteinaz a ich obecnością w ścianach żył

ŻOBR	MMP1 ELISA	MMP3 ELISA	MMP9 ELISA	MMP1	MMP3	MMP9
MMP1 ELISA		-0,028	0,047	<b>0,710</b>	-0,291	-0,219
MMP3 ELISA	-0,028		0,389	-0,370	0,479	0,158
MMP9 ELISA	0,047	0,389		-0,006	-0,239	-0,075
MMP1	<b>0,710</b>	-0,370	-0,006		0,300	0,300
MMP3	-0,291	0,479	-0,239	0,300		0,800
MMP9	-0,219	0,158	-0,075	0,300	0,800	

ŻOZR	MMP1 ELISA	MMP3 ELISA	MMP9 ELISA	MMP1	MMP3	MMP9
MMP1 ELISA		0,426	-0,862	<b>0,945</b>	0,464	-0,285
MMP3 ELISA	0,426		-0,531	0,297	0,179	-0,333
MMP9 ELISA	-0,862	-0,531		<b>-0,736</b>	-0,185	<b>0,873</b>
MMP1	<b>0,945</b>	0,297	<b>-0,736</b>		0,269	0,257
MMP3	0,464	0,179	-0,185	0,269		-0,543
MMP9	-0,486	0,143	<b>0,873</b>	-0,486	-0,543	

#### 4.6. Wyniki oznaczenia całkowitego stężenia metaloproteinaz (formy pro- i aktywna) w osoczu

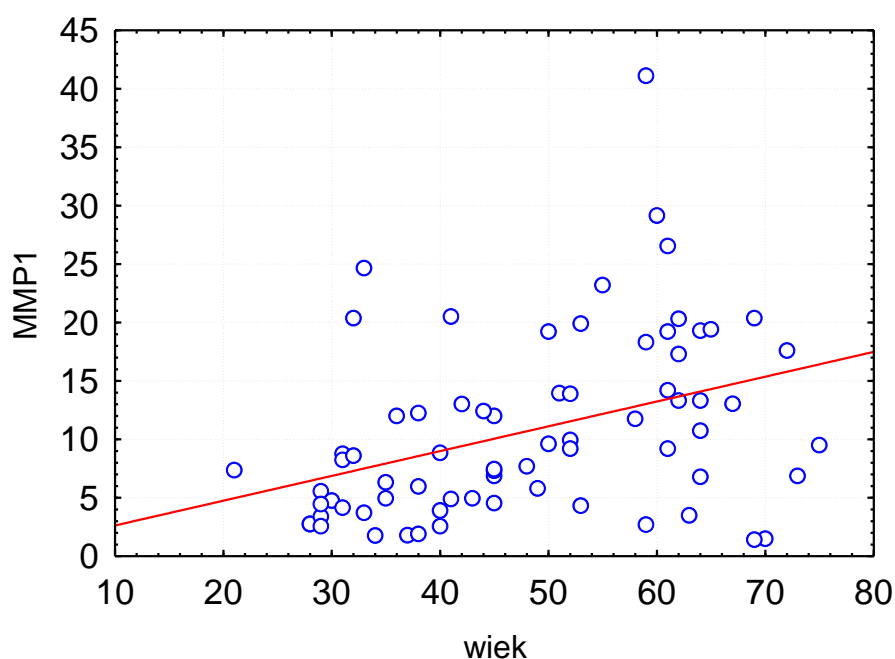
W osoczu krwi pacjentów w grupie żył odpiszczelowych z refluksem jak i żył odpiszczelowych bez refluksu nie udało się wykazać istotnych statystycznie różnic między zawartością metaloproteinaz 1., 3. i 9.

Tab. 7. Wyniki stężeń całkowitych metaloproteinaz dla badanych grup w osoczu (ng/ml)

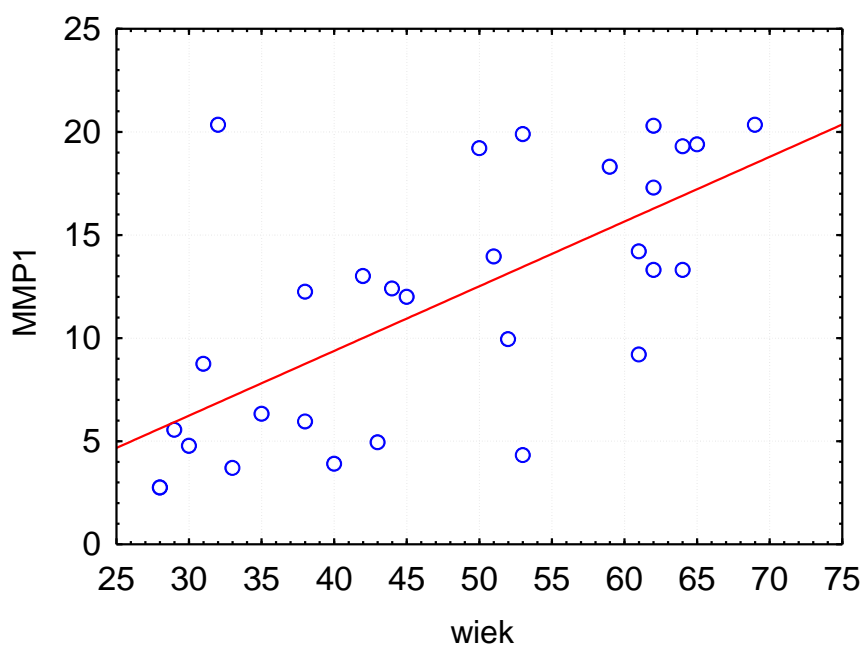
	MMP1	MMP3	MMP9	wiek
średnia	9,90	20,27	148,97	47,6
mediana	7,57	18,69	101,92	45
odchylenie standardowe	8,20	11,98	127,72	14,21
liczba przypadków	60	60	60	60
minimum przypadków	1,5	7,25	24	21
maksimum przypadków	41,1	83,24	512	75
25% przyp.	4,72	13,44	62,4	36,5
75% przyp.	12	24,09	202,56	60,5

W ocenie korelacji nieparametrycznej Spearmana wykazano statystycznie istotną korelację pomiędzy stężeniem MMP1 w osoczu a wiekiem w grupach ŻOBR oraz ŻOZR  $r = 0,36$  (rycina 7.). Z kolei korelacja stężenia aktywnej formy metaloproteinazy 1 wynosiła  $r = 0,68$  dla grupy żył odpiszczelowych z refluksem (rycina 8.).

Ryc. 7. Wykres rozrzutu MMP1[ng/g] względem wieku dla obu badanych grup



Ryc. 8. Wykres rozrzutu MMP1 [ng/g] względem wieku dla żył odpiszczelowych z refluksem





## 5. Omówienie

ECM stanowi nie tylko mechaniczną podporę dla zawartych w niej komórek, ale uczestniczy także w regulacji ich metabolizmu, między innymi przez wpływ na proliferację, wzrost, dojrzewanie i obumieranie [74]. Zmiana składu, a także polimorfizm składowych ECM powodują zmiany struktury ściany żyłnej, co skutkuje zmianami jej właściwości biomechanicznych. Metaloproteinazy są jednym z czynników uczestniczących w przebudowie ściany żył [9, 10]. Proces ten może być odpowiedzią na wiele różnych czynników takich jak panujące w naczyniu ciśnienie, starzenie czy płeć [75, 78, 80, 81].

Powyższe spostrzeżenia mogą sugerować, że enzymy, dla których substratami są kolagen i elastyna biorą aktywny udział w przebudowie ściany. Wyniki badań biochemicznych przeprowadzonych przez innych badaczy wykazały, że zmiany dotyczące elementów sprężystych ściany żyłnej mogą się wiązać z różnicami stężeń lub aktywności enzymów odpowiedzialnych za degradację kolagenu i elastyny w ŻO [65-67].

Metaloproteinazy mają zdolność trawienia wszystkich składników macierzy pozakomórkowej, m.in. kolagenu, elastyny, fibronektyny, innych glikoprotein i proteoglikanów [74, 82]. Enzymy te są syntetyzowane w fibroblastach i innych typach komórek tkanki łącznej: monocytach i makrofagach, wielojądrzastych leukocytach obojętnochłonnych i komórkach śródbłonna. Niezbędnym warunkiem pobudzania komórek do produkcji metaloproteinaz jest obecność kolagenu [83, 84]. W badaniach przeprowadzonych w niniejszej pracy potwierdzono obecność MMP1, MMP3 i MMP9 we wszystkich badanych naczyniach. W badaniach immunohistochemicznych nie stwierdzono różnic w zawartości MMPs między badanymi grupami żył. Podobne wyniki dotyczące MMP1 uzyskali inni autorzy: Woodside [84], Sansilvestri-Morel [86], Kowalewski [69]. Uzyskane wyniki dotyczące MMP9 potwierdzone zostały również przez: Sansilvestriego-Morela [86], Kowalewskiego [69], Ishikawę [75] i Parra [71]. W niniejszych badaniach zaobserwowano, że stężenie MMP1 było wyższe w ŻOZR i bliskie znamienności statystycznej w stosunku do ŻOBR. W badaniach przeprowadzonych przez Gilesie i wsp.

wykazano wzrost stężenia MMP1 w żyłach niewydolnych [10]. Autor ten stosował inną technikę badawczą, a chorzy w grupie z żylakami byli młodsi w stosunku do grupy pacjentów stanowiących przedmiot rozprawy, co może sugerować wpływ wieku na ekspresję MMPs w ścianie ŻO.

Dane w piśmiennictwie dotyczące obecności MMP3 w ścianach żył nie są już tak jednoznaczne. Zespołowi Gilesiego nie udało się wykazać obecności mRNA MMP3 w ścianach ŻOBR jak i ŻOZR, podczas gdy w innych badaniach wykazano obecność tej metaloproteinazy zarówno w zdrowych żyłach odpiszczelowych jak i zmienionych żylakowato [10, 68].

Badania Kowalewskiego i wsp. w ocenie makroskopowej nie wykazały różnic stężeń MMP1 i MMP9 w żylakowato zmienionych odcinkach ŻO w stosunku do odcinków prawidłowych. Wyniki te są zbieżne z uzyskanymi w obecnej pracy, mimo stosowania odmiennych metod badawczych, co może dowodzić, że rolę w procesie prowadzącym do powstania niewydolności żył odpiszczelowych może odgrywać odpowiednie stężenie metaloproteinaz 1 i 3 [69].

W badaniach własnych stężenie aktywnych form MMP1, MMP3 i MMP9 w ścianie żyłnej było wyższe w ŻOBR, w stosunku do ŻOZR, ale różnice te wykazywały istotność statystyczną jedynie dla MMP1 i MMP3. Metaloproteinazy mogą aktywować siebie nawzajem, jak ma to miejsce w przypadku MMP3, której aktywność może być warunkowana aktywnością MMP1, co wydają się potwierdzać wykazane w niniejszych badaniach zależności stężenia formy aktywnej tych MMPs w przypadku ŻOBR [70]. W badaniach Woodside'a i wsp. wykazano, istotnie wyższą aktywność MMP9 w żyłach bez refluku [84]. Porównując te wnioski do wyników otrzymanych w niniejszej pracy należy przypuszczać, że różnica ta, wynika z faktu badania przez Woodside'a zarówno żylaków pierwotnych jak i wtórnych. W dwóch innych badaniach uzyskano także zbieżne z przedstawionymi w tej rozprawie wynikami ekspresji i stężenia MMP9 [75, 84]. Również wartości stężenia aktywnej MMP9 w publikacji zespołu Badier-Commandera były zbliżone do wyników uzyskanych w badaniach własnych: wykazano obecność pro-MMP9 [85]. Pozwala to sugerować, że MMP9 może być zależna od procesów zapalnych w ścianie żyły [13, 69, 80, 87]. Brak różnic w ekspresji i aktywnym stężeniu MMP9 między ŻOBR i ŻOZR można tłumaczyć wykluczeniem w niniejszych analizach żył zmienionych zapalnie.

W przeciwieństwie do wyników uzyskanych przez Kowalewskiego i wsp. w niniejszej pracy udało się wykazać istotnie wyższe stężenie formy aktywnej MMP1

w ŻOBR w stosunku do ŻOZR [69]. Powodem tej rozbieżności może być fakt, że Kowalewski przeprowadzał badania na materiale pochodzącym z tych samych żył, których odcinki były kwalifikowane makroskopowo jako zdrowe, zmienione żylakowo, lub pozakrzepowo. Ponadto w badaniach tego Autora stężenie aktywnej formy odnoszono do masy świeżej tkanki, co w istotny sposób utrudnia porównanie wyników między cytowanymi badaniami i własnymi. Ponadto w niniejszych badaniach stężenie formy aktywnej MMPs za każdym razem odnoszono do stężenia białka oznaczonego w badanych żyłach i wyrażano w ng na g białka.

Wyniki badań własnych różnią się od opublikowanych danych dotyczących MMPs w ścianie żył odpiszczelowych, przede wszystkim wykazaniem wyższego stężenia formy aktywnej w ŻOBR w stosunku do żył z refluksem, tzn. tych, w których panuje nadciśnienie. Potwierdzono także, iż różny poziom ekspresji i stężenia aktywnego MMPs związany jest z przebudową ściany żyłnej [1]. Nie bez znaczenia dla uzyskanych wyników może być także stosunkowo wysoka liczba analizowanych prób, w większości znacznie różniąca się od cytowanych badań.

Potwierdzeniem obserwacji poczynionych w tej pracy są doniesienia mówiące, że stężenie MMPs może obniżać się w trakcie powstawania żylaków kończyn dolnych [1, 71, 85]. Podczas analizy obecności aktywnych form MMP3 i MMP9 nie stwierdzono różnic dotyczących tych metaloproteinaz między ŻOBR a ŻOZR. Ponadto stwierdzono istotnie wyższe stężenie tkankowego inhibitora MMP1 (TIMP1). Sugeruje się, że przyczyną zmian prowadzących do powstawania żylaków może być właśnie brak równowagi pomiędzy ekspresją MMPs a endogennymi tkankowymi inhibitorami metaloproteinaz (TIMPs) [71]. Dotychczas zidentyfikowano zostały cztery TIMPs. Charakteryzują się one niewielkim powinowactwem wobec MMPs, gdyż każda z TIMPs może hamować wiele MMP [1, 89]. Kilku badaczy potwierdza wzrost stężenia TIMP1 i spadek aktywności MMPs [71, 85], natomiast inne doniesienia przedstawiają przeciwstawne informacje [86]. Z kolei w pozostałych publikacjach nie wykazano różnic w poziomie TIMP1 między ŻOBR i ŻOZR [2, 75, 84, 86]. Rozbieżność wyników przytoczonych programów badawczych prawdopodobnie spowodowana była niejednorodnym podejściem metodycznym przeprowadzanych analiz.

W niniejszych badaniach nie oceniano obecności TIMP, choć literatura nie daje jednoznacznej odpowiedzi na temat funkcji tego czynnika w patogenezie żylaków kończyn dolnych. Zaobserwowane niższe stężenie formy aktywnej badanych MMPs w ŻOZR sugeruje, że obniżenie stężenia aktywnego można uznać za jedną z przyczyn zmian



prowadzących do powstania żylaków. Mechanizm ten może być związany z blokowaniem metaoproteinaz przez TIMPs lub wyczerpaniem ich form aktywnych przy jednoczesnym wstrzymaniu ich syntezy. Potwierdza to brak istotnych różnic między ŻOBR a ŻOZR w ekspresji badanych MMPs i znamieny spadek stężenia ich formy aktywnej [1]. Można zatem przypuszczać, że w przypadku podwyższonego ciśnienia do adaptacji żył niezbędna jest obecność MMPs, a ich wyczerpanie prowadzi do nieodwracalnych zmian w ścianie żylniej. Spadek aktywności proteolitycznej może być związany z nagromadzeniem ECM stwierdzanym we wcześniejszych badaniach Krasińskiego [8] i innych autorów [1]. Potwierdzeniem tego są badania *ex vivo*, w których w ŻO poddanej perfuzji z ciśnieniem równym żylnemu obserwowano wzrost ekspresji MMP9. Po trzydniowym podniesieniu ciśnienia do wartości ciśnienia tętniczego, wykazano 50% spadek ekspresji obu żelatynaz, co wskazuje na związek między aktywnością MMPs a przebudową ściany ŻO związanej z nadciśnieniem [1]. W modelach doświadczalnych zaobserwowano, że nagły wzrost ciśnienia w układzie żylnym powoduje wzrost aktywności MMPs [9, 10], czego przykładem są ŻO sportowców. Trening sportowy oddziałuje na zasadzie planowanego powtarzanego obciążenia, co prowadzi, szczególnie u sportowców wyczynowych, do rozszerzenia światła naczyń w wyniku wzrostu ciśnienia w układzie żylnym. Obserwuje się wówczas zmiany morfologiczne w postaci rozwoju mięśniówki (głównie warstwy środkowej) oraz utrzymującego się w spoczynku, widocznego i wyczuwalnego zgrubienia żyły. U zdrowych osób uprawiających sport wyczynowy zjawisko to występuje równomiernie na przebiegu całej żyły odpiszczelowej, bez zniekształceń spowodowanych rozstrzenią i całkowicie zanika w ciągu dwóch lat po zakończeniu aktywności sportowej, choć wydaje się być czynnikiem predysponującym do wystąpienia żylaków kończyn dolnych [8, 90]. W niniejszych badaniach nie wykazano sugerowanego wcześniej przez innych autorów wzrostu stężenia metaloproteinaz w surowicy [1, 4, 6, 14]. Wykazana zależność między wiekiem, a stężeniem MMP1 dla wszystkich badanych grup jest pierwszym takim doniesieniem i może nakreślać kierunek kolejnych badań.

Uzyskane wyniki oraz dane literaturowe wskazują na konieczność prowadzenia dalszych badań nad znaczeniem metaloproteinaz w patologii przewlekłej niewydolności żylniej.

## **6. Wnioski**

1. W ścianie żyłnej jak i krwi obwodowej stwierdza się obecność metaloproteinaz 1., 3. i 9.
2. Obecność aktywnej formy metaloproteinaz (MMP1, MMP3) prawdopodobnie odgrywa rolę w procesie prowadzącym do powstania niewydolności żył odpiszczelowych.
3. Niższe stężenie formy aktywnej MMP1 i MMP3 w ścianie żył odpiszczelowych niewydolnych przy porównywalnym poziomie ekspresji tych metaloproteinaz w żyłach wydolnych może wskazywać na dynamiczne zmiany prowadzące do przebudowy w żyłach odpiszczelowych z refluksem.
4. Obserwowane różnice w stężeniu aktywnych form metaloproteinaz w ścianie żył nie mają odzwierciedlenia w ich stężeniu we krwi obwodowej, co sugeruje ograniczoną przydatność tego oznaczenia dla wykazania procesów patomorfologicznych zachodzących w obrębie naczynia.

## 7. Spis rycin

Ryc. 1. Przekrój poprzeczny przez żyłę średniego kalibru z zaznaczonymi warstwami	9
Ryc. 2. Prawdopodobieństwo względne (P) wystąpienia żylaków u potomka w zależności od występowania żylaków w rodzinie	14
Ryc. 3. Schemat wpływu różnych czynników na powstanie ŻKD	15
Ryc. 4. Metoda oznaczeń immunohistochemicznych ABC (awidyna – biotyna – peroksydaza)	24
Ryc. 5. Procentowy udział pola powierzchni ekspresji metaloproteinazy 1., 3. i 9. w badanych grupach	34
Ryc. 6. Porównanie średnich stężeń aktywnych form metaloproteinaz 1., 3., 9. w ścianie żył w badanych grupach	35
Ryc. 7. Wykres rozrzutu MMP1 względem wieku dla wszystkich badanych grup	37
Ryc. 8. Wykres rozrzutu MMP1 względem wieku dla grup badanych z refluksem	37

## 8. Spis tabel

Tab. 1. Zmiany w układzie żył powierzchownych w trakcie 8 letniej obserwacji w badaniu Bohum	10
Tab. 2. Wyniki wybranych badań epidemiologicznych występowania żylaków	11
Tab. 3. Charakterystyka pacjentów (ŻOBR – żyły odpiszczelowe bez refluksu; ŻOZR – żyły odpiszczelowe z refluksem)	22
Tab. 4. Ocena średnicy i stopnia refluksu w żyłach odpiszczelowych w grupie chorych z żylakami	29
Tab. 5. Ocena średnicy i stopnia refluksu w żyłach odpiszczelowych bez żylaków	30
Tab. 6. Korelacje między stężeniem aktywnych form badanych MMP (metoda ELISA) i ich obecnością w ścianach żył ocenianą w badaniach morfometrycznych	36
Tab. 7. Wyniki stężeń całkowitych MMP dla badanych grup w osoczu (ng/ml)	36

## 9. Dokumentacja fotograficzna

Fot.1. Żyła odpiszczelowa bez refluksu, (przekrój poprzeczny). Dodatnia reakcja immunohistochemiczna na obecność MMP1 w śródbłonku (+), błonie środkowej (+) i przydance (+++). Powiększenie oryginalne x 250	31
Fot. 2. Żyła odpiszczelowa z refluksem. Przekrój poprzeczny. Dodatnia reakcja immunohistochemiczna na obecność MMP1 w śródbłonku (+) i przydance (++). Powiększenie oryginalne x 250	31
Fot. 3. Żyła odpiszczelowa bez refluksu. Przekrój poprzeczny. Dodatnia reakcja immunohistochemiczna na obecność MMP3 w śródbłonku (+++), tkance łącznej intymy (+), błonie środkowej (+++) i przydance (+++). Powiększenie oryginalne x 250	32
Fot. 4. Żyła odpiszczelowa z refluksem. Przekrój poprzeczny. Dodatnia reakcja immunohistochemiczna na obecność MMP3 w śródbłonku (+), błonie środkowej (+++) i przydance (++). Powiększenie oryginalne x 250	32
Fot. 5. Żyła odpiszczelowa bez refluksu. Przekrój poprzeczny. Dodatnia reakcja immunohistochemiczna na obecność MMP9 w błonie środkowej (+). Powiększenie oryginalne x 250	33
Fot. 6. Żyła odpiszczelowa z refluksem. Dodatnia reakcja immunohistochemiczna na obecność MMP9 w śródbłonku (+++) i błonie środkowej (+++). Powiększenie oryginalne x 250	33

## 10. Piśmiennictwo

1. Raffetto J.D., Khalil R.A.: Matrix metalloproteinases in venous tissue remodeling and varicose vein formation. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 2008, 6, 158-172.
2. Lim C.S., Davies A.H.: Pathogenesis of primary varicose veins. *Br. J. Surg.* 2009; 96: 1231-1242.
3. Davies A.H., Magee T.R., Horrocks M.: Vein graft factors in the outcome of femorodistal bypass. *Eur. J. Vasc. Surg.* 1994; 8: 249-256.
4. Renaudin J.M., Fissel C., Mercier F., Denost F., Turpault I., Falson O.B., Finet M.: Smooth muscle differentiation in human vein wall at valvular level: comparison with nonvalvular wall and correlation with venous function. *Angiology* 1999; 50, 1:21-30.
5. Vanhoutte P.M., Corcaud S., Montrion C.: Venous disease: from pathophysiology to quality of life. *Angiology* 1997; 48; 7:559-563.
6. Wali M.A., Eid R.A.: Smooth muscle changes in varicose veins: an ultrastructural study. *J. Smooth Muscle Res.* 2001; 37:123-35.
7. Rose S.S., Ahmed A.: Some thoughts on the aetiology of varicose veins. *J. Cardiovasc. Surg.* 1986; 27:534-543.
8. Krasieński Z.: Badania struktury i właściwości mechanicznych żył kończyn dolnych używanych jako materiał do rekonstrukcji tętnic. Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego, Poznań 2007.
9. Venturi M., Bonavina L., Annoni F., Colombo L., Butera C., Peracchia A., Mussini E.: Biochemical assay of collagen and elastin in the normal and varicose vein wall. *J. Surg. Res.* 1996; 60:245-248.
10. Gillespie D.L., Patel A., Fileta B., Chang A., Barnes S., Flagg A., Kidwell M., Villavicencio J.L., Rich N.M.: Varicose veins possess greater quantities of MMP1 than normal veins and demonstrate regional variation in MMP1 and MMP1. *J. Surg. Res.* 2002; 106:233-238
11. Kockx M.M., Knaapen M.W., Bortier H.E., Cromheeke K.M., Bouterin-Falson O., Finet M.: Vascular remodeling in varicose veins. *Angiology.* 1998; 49:871-877.
12. Moore W.S.: *Vascular Surgery: A Comprehensive Review*, 6th edition Saunders 2001. ISBN-10 072169313X
13. Ehrenfeld W.K., Wilbur B.G., Olcott C.N., Stoney R.J.: Autogenous tissue reconstruction in the management of infected prosthetic grafts. *Surgery.* 1979; 85:82-92.
14. Majewski W., Zapalski S., Biczysko W., Bręborowicz D., Turski M.: Morphological changes in femoropopliteal venous grafts. *Acta. Chir. Belg.* 1986; 86:340-344.
15. Noszczyk W.: *Chirurgia tętnic i żył obwodowych*. PZWL, Warszawa 1998
16. Zapalski S.: *Niewydolność układu żylnego kończyn dolnych*. Via Medica, Gdańsk 1999.
17. Widmer L.K.: *Peripheral venous disorders: prevalence and socio-medical importance. Observations in 4529 apparently healthy persons. Basel Study III*. Hans Huber Publisher, Bern 1978.
18. Ziaja K.: *Poradnik leczenia chorób żył*. Śląska Akademia Medyczna, Katowice 1996.
19. Krasieński Z., Kotwicka M., Oszkiniś., Dzieciuchowicz Ł., Borkiewicz P., Waśko R.: Badania nad patogenezą żylaków pierwotnych kończyn dolnych. *Wiad. Lek.* 1997; 50:10-12.

20. Travers J.P., Brookes C.E., Evans J., Baker D.M., Kent C., Makin G.S., Mayhew T.M.: Assesment of wall structure and composition of varicose veins with reference to collagen, elastin and smooth muscle content. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 1996; 11:230-237
21. Matthews J.L., Martin J.H.: *Atlas of human histology and ultrastructure.* Lea and Febiger. Philadelphia 1971.
  1. Krasiński Z., Kotwicka M., Dzieciuchowicz Ł.: Żyłaki kończyn dolnych u kobiet-rola hormonów płciowych. *Przeg. Ginekol. Pol.* 2005; 5:145-151.
  2. Stermer R.: Postępowanie lecznicze w przewlekłej niewydolności żyłnej kończyn dolnych. *Choroby żył. Servier.* 6, 1998.
  3. Bergqvist A., Bergqvist D., Ferno M.: Estrogen and progesterone receptors in vessel walls. *Act. Obstet. Gynecol. Scand.* 72;1993:10-15
  4. Perrot-Appianat M., Cohen-Solal K., Milgrom E., Finet M.: Progesterone receptor expression in human saphenous veins. *Circ.* 1995; 92:2975-2983.
  5. Callam M.J.: Epidemiology of varicose veins. *Brit. J. Surg.* 1994; 81:167-173
  6. Schultz-Ehrenburg U., Weindorf N., Matthes U., Hirche H.: New epidemiological findings with regard to initial stages of varicose veins (Bochum study I-III). *Phlebologie.* 1992; 92:234-236.
  7. Schultz-Ehrenburg U., Weindorf N., von Uslar D., Hirche H.: Prospective epidemiological investigations on early an preclinical stages of varicosis.W: Davy A., Stemmer R., Eds. *Phlebology* 1989. 163-165.
  8. Strejcek J.: The first experience with using digital photoplethysmography in epidemiological study of children (Bohemian study I). *Praktica Phlebol.* 1992; 2:5-9.
  9. Goldman M.P., Weiss R.A., Bergan J.J.: Diagnosis and treatment of varicose veins: a review. *J. Am. Acad. Derm.* 1994; 31: 394-413.
  10. Ruckley C.V.: Treatment of venous ulceration. Compresion terapy. *Phlebology.* 1992; 7:22-26.
  11. Rynkowski H.: *Choroby naczyń.* PZWL, Warszawa 1990.
  12. Jawien A., Grzela T., Ochwat A.: Prevalence of chronic venous insufficiency in men and women in Poland: multicentre cross-sectional study in 40,095 patients. *Phlebology.* 2003; 18:110-122.
  13. Anning S.T.: The historical aspects. W: *The pathology and surgery of the veins of the lower limb* (red. Dodd H., Cockett F.B.) Churchill Livingstone, Edingburgh 1976; 3.
  14. Bishop W.J.: *The early history of surgery.* Robert Hale Ltd., London 1960, 48.
  15. Sławiński Z.: *Anatomia patologiczna i patogenezza żylaków.* Pam. Tow. Lek. Warszawa 1901, XLVII, 25, 253, 437.
  16. Abramson J.H.: The epidemiology of varicose veins. A survey in Western Jerusalem. *J. Epidemiol. Community Health* 1981; 35: 213-217.
  17. Beaglehole R., Prior I.A.M., Salmond C.E., Davidson F.: Varicose veins in South Pacific. *Int. J. Epidemiol* 1975; 4:295.
  18. Stanhope JM.: Varicose veins in a population of lowland New Guinea. *Int. J. Epidemiol.* 1975; 4:221.
  19. Beebe-Dimmer J., Pfeifer J., Engle J.: The epidemiology of chronic venous insufficiency and varicose veins. *Ann. Epidemiol.* 2005; 15:175-184
  20. Maffei F.H.A., Magaldi C., Pinho S.Z., Lastoria S., Pinho W., Yoshida W.B., Rollo H.A.: Varicose veins and chronic venous insufficiency in Brasil: prevelance among 1755 inhabitants of a country town. *Int. J. Epidemiol.* 1986; 15:210-217.
  21. Dodd H., Wright H.P.: Vulval varicosities in pregnancy. *B.M.J.* 1959; 5:831-832.
  22. Kilbourne N.J.: Varicose veins in pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1933; 25:104-106.
  23. Nataboff R.A.: Varicose veins of pregnancy. *J.A.M.A.* 1960; 174:1712-1714.

24. Canonico S., Gallo C., Paolisso G., Pacifico F., Signoriello G., Ferrara N., Piegari V., Varricchio M., Rengo F.: Prevalence of Varicose Veins in an Italian Elderly Population. *Angiology*. 1998; 49,2:129-135.
25. Novo S., Avellone G., Pinto A.: Prevalence of primitive varicose veins in a randomised population sample of western Sicily. *Int. Angiol.* 1988; 7:176-181.
26. Stvrtinova V., Kolesar J., Wimmer G.: Prevalence of varicose veins of the lower limbs in the women working at a department store. *Int. Angiol.* 1991; 10:2-5.
27. Allegra C.: *Przewlekła niewydolność żylna*. Servier 1998.
28. Arnoldi C.C.: The heredity of venous insufficiency. *Dan. Med. Bull.* 1958; 5:169-175.
29. Wright D.D.I., Franks P.J., Moffat C.: The prevalence of venous disease in a West London population. *Phlebology*. 1989.
30. *Choroby żył* Nr 3 Servier
31. Balcerop G.V.: Sapheno-femoral incompetence in young asymptomatic subjects with family history of varices of the lower limbs. *Phlebology*. 1985.
32. Mekky S., Schilling R.S.F., Walford J.: Varicose veins in women cotton workers. An epidemiological study in England and Egypt. *B. M. J.* 1969; 11:591-595.
33. Brand F.N., Dannenberg A.L., Abbott R.D., Kannel W.B.: The epidemiology of varicose veins: The Framingham study. *Am. J. Prev. Med.* 1988; 4:96-101.
34. Baron H.C., Cassaro S.: The role of arteriovenous shunts in the pathogenesis of varicose veins. *J. Vasc. Surg.* 1986; 4:124-128.
35. Evans C.J., Fowkes F.G.R., Hajivassiliou C.A., Harper D.R., Ruckley C.V.: Epidemiology of varicose veins. *Intern. Angiol.* 1994; 13, 3:263-270.
36. Ono T., Bergan J.J., Schmidt-Schoenbein G.W.: Monocyte infiltration into venous valves. *J. Vasc. Surg.* 1998; 27: 158-166.
37. Fibak J.: *Chirurgia*. PZWL, Warszawa 1996.
38. Erikson H., Gustafson J.A.: Steroid hormone receptors: structure and function. Nobel Symposium 57. Amsterdam, Netherlands: Elsevier Sciences Publishing Co;1983.
39. Thulesius O.: Discussion of the pathophysiology: significance of incompetent venae perforantes. In: May R., Parts J., Staubesand J. editor. *Perforating veins*. Baltimore: Urban & Schwarzenberg; 1981; 131.
40. Clarke G.H., Vasdekis S., Hobbs J.T., Nicholaides A.N.: Venous wall function in the pathogenesis of varicose veins. *Surgery*. 1992; 111:402-408.
41. Berge T.H., Feldhusen U.: Varicer hos kvinner. *Nord Med.* 1963; 69:744-9.
42. Thulesius O.: Vein wall characteristics and valvular function in chronic venous insufficiency. *Phlebology*. 8, 1993: 94-98.
43. Bujan J., Gimeno M., Jimenez J.: Expression of elastic components in healthy and varicose veins. *W. J. Surg.* 2003; 27, 901-905.
44. Niebes P.: Structure biochimique de la paroi veineuse chez les porteurs de varices. *Phlebologie* 36 : 55, 1983.
45. Prerovsky I.: Biochemistry of varicose veins. *Phlebologie*. 1981; 234:489.
46. Gandhi R.H., Irizarry E., Nackman G.B., Halpern V.J., Mulcare R.J., Tilson M.D.: Analysis of the connective tissue matrix and proteolytic activity of primary varicose veins. *J. Vasc. Surg.* 1993; 18:814-820.
47. Johnson J.L., van Eys G.J., Angelini G.D., George S.J.: Injury induces dedifferentiation of smooth muscle cells and increased matrix-degrading metalloproteinase activity in human saphenous vein. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2001; 21:1146-1151
48. Kowalewski R., Sobolewski K., Wolanska M., Gacko M.: Matrix metalloproteinases in the vein wall. *Int. Angiol.* 2004; 23:164-169.



49. Murphy G., Cockett M.I., Stephens P.E., Smith B.J., Docherty A.J.: Stromelysin is an activator of procollagenase. A study with natural and recombinant enzymes. *Biochem. J.* 1987; 15; 248:265-268.
50. Parra J.R., Cambria R.A., Hower C.D., Dassow M.S., Freischlag J.A., Seabrook G.R., Towne J.B.: Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is increased in the saphenofemoral junction of patients with varices in the leg. *J. Vasc. Surg.* 1998; 28:669-675.
51. Saarialho-Kere U.K., Kovacs S.O., Pentland A.P., Olerud J.E., Welgus H.G., Parks W.C.: Cell-matrix interactions modulate interstitial collagenase expression by human keratinocytes actively involved in wound healing. *J. Clin. Invest.* 1993; 92:2858-2866
52. Vaalamo M., Leivo T., Saarialho-Kere U.: Differential expression of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1, -2, -3, and -4) in normal and aberrant wound healing. *Hum. Pathol.* 1999; 30:795-802.
53. Kotulska-Wolwender K., Larysz-Brysz M., Fus Z., Korczynska I., Gorka D., Lewin-Kowalik J.: Extracellular matrix metalloproteinases - perspectives of their use in medicine. *Wiad. Lek.* 2002; 55:463-471.
54. Ishikawa Y., Asuwa N., Ishii T., Ito K., Akasaka Y., Masuda T., Zhang L., Kiguchi H.: Collagen alteration in vascular remodeling by hemodynamic factors. *Virchows Arch.* 2000; 437; 138-148.
55. Bergan J.J., Schmid-Schonbein G.W., Smith P.D., Nicolaides A.N., Boisseau M.R., Eklof B.: Chronic venous disease. *N. Engl. J. Med.* 2006; 3; 355:488-498.
56. Kucharzewski M.: Metalloproteinazy macierzy a żylne owrzodzenie podudzi. *Przeg. Flebol.* 2005; 13:269-274.
57. Krasiński Z., Oszkinis G., Kotwicka M., Krasińska B., Majewski W.Ł. Ocena komórek mięśniowych gładkich z receptorami dla hormonów płciowych w żyłach prawidłowych i żylakach. *Przeg. Flebol.* 2005; 13;2:61-66
58. Thiene G., Miazzi P., Valsecchi M., Valente M., Bortolotti U., Casarotto D., Gallucci V.: Histological survey of the saphenous vein before its use as autologous aortocoronary bypass graft. *Thorax.* 1980; 35:519-522.
59. Dollery C.M., McEwan J.R., Henney A.M.: Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. *Circ. Res.* 1995; 77:863-875.
60. Kosugi I., Urayama H., Kasashima F., Ohtake H., Watanabe Y.: Matrix metalloproteinase-9 and urokinase-type plasminogen activator in varicose veins. *Ann. Vasc. Surg.* 2003; 17:234-238.
61. Kamiya A., Togawa T.: Adaptive regulation of wall shear stress to flow change in the canine carotid artery. *Am. J. Pathol.*, 1980; 239:14-21.
62. Zhang W.D., Bai H.Z., Sawa Y., Yamakawa T., Kadoba K., Taniguchi K., Masuda J., Ogata J., Shirakura R., Matsuda H.: Association of smooth muscle cell phenotypic modulation with extracellular matrix alterations during neointima formation in rabbit vein grafts. *J. Vasc. Surg.* 1999; 30:169-183.
63. Woodside K.J., Hu M., Burke A., Murakami M., Pounds L.L., Killewich L.A., Daller J.A., Hunter G.C.: Morphologic characteristics of varicose veins: possible role of metalloproteinases. *J. Vasc. Surg.* 2003; 38:162-169.
64. Badier-Commander C., Verbeuren T., Lebard C., Michel J.B., Jacob M.P.: Increased TIMP/MMP ratio in varicose veins - A possible explanation for extracellular matrix accumulation. *J. Pathol.* 2000; 192:105-112.
65. Sansilvestri-Morel P., Rupin A., Badier-Commander C., Kern P., Fabiani J.N., Verbeuren T.J., Vanhoutte P.M.: Imbalance in the synthesis of collagen type I and collagen type III in smooth muscle cells derived from human varicose veins. *J. Vasc. Res.* 2001; 38:560-568.
66. Ruckley C.V.: Treatment of venous ulceration. Compression therapy. *Phlebology.* 1992; 7:22-26.
67. Labropoulos N., Leon L., Engelhorn C.A., Amaral S.I., Rodriguez H., Kang S.S., Mansour A.M., Littooy F.N.: Sapheno-femoral junction reflux in patients with a normal saphenous trunk. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Sur.* 2004; 28:595-599.
68. Gusic R.J., Petko M., Myung R., William Gaynor J., Gooch K.J.: Mechanical properties of native and ex vivo remodeled porcine saphenous veins. *J. Biomech.* 2005; 38:1770-1779.

69. Griton P., Cloarec M.: Przewlekła niewydolność żylna: obserwacje kliniczne oraz wyniki badań czynnościowych układu żylnego. *Choroby żył*, Servier 6, 1998
70. Recoules-Arche J.: Importance du sandertarisme debout dans l'évolution et les complications des varices. *Angiol.* 1965; 17:17-20.
71. Bobek K., Cajzl L., Cepelak V., Slaisova V., Opatzny K., Bbarcal R.: Etude de la fréquence des maladies phlebologiques et de l'influence de quelques facteurs étiologiques. *Phlebologie.* 1966; 19:217-30.
72. Richardson J.B., Dixon M.: Varicose veins in tropical Africa. *Lancet.* 1977; 8:791-792.
73. Rudofsky G.: Epidemiology and pathophysiology of primary varicose veins. *Landebecks. Arch. Chir.* 1988; 2:139-144.
74. Leipnitz G., Kiesewetter P., Waldhausen P., Jung F., Witt R., Wenzel E.: Prevalence of venous disease in the population: first results from a prospective study carried out in greater Aachen. *Phlebology.* 1989; 7:453-476
75. Sisto T., Reunanen A., Laurikka J., Impivaara O., Heliövaara M., Knekt P., Aromaa A.: Prevalence and risk factors of varicose veins in lower extremities. Mini-Finland Health Survey. *Eur. J. Surg.* 1995; 161:404-414.

## 11. Streszczenie

Integralność i mechaniczne właściwości ściany żyłnej warunkowane są przez składowe macierzy zewnątrzkomórkowej (extracellular matrix – ECM). Zmiana składu, a także polimorfizm składowych ECM powodują zmiany struktury ściany żyłnej. W przemianach tych odgrywają rolę specyficzne metaloproteinazy macierzy międzykomórkowej (matrix metalloproteinases – MMPs): kolagenazy, żelatynazy i stromielizyny. Celem pracy była ocena występowania i stężenia aktywnych form metaloproteinaz: MMP1, MMP3 i MMP9 w materiale żylnym i krwi obwodowej w dwóch grupach: zdrowych żył (brak żylaków i brak refluku w żyłę odpiszczelowej – ŻO w badaniu USG ZPO) i żył żylakowato zmienionych (żylaki i refluks w ŻO w badaniu USG ZPO). Badania prowadzono stosując ultrasonografię z podwójnym obrazowaniem – USG ZPO w grupie z żylakami i bez żylaków z oceną stopnia refluku i średnicy ŻO; immunohistochemiczną ocenę ekspresji badanych markerów w żyłach odpiszczelowych wydolnych i niewydolnych; oznaczenie stężenia formy aktywnej MMPs w ścianie żył odpiszczelowych; oraz stężenia całkowitego metaloproteinaz w osoczu.

Badaniami objęto 60 pacjentów z podziałem na dwie grupy: z żylakami kończyn dolnych oraz chorych bez żylaków. Materiał poddano badaniom immunohistochemicznym na obecność MMP1, 3 i 9 oraz analizie morfometrycznej. Zbadano stężenie aktywnych form MMP1, 3, 9 w ścianie żył oraz całkowite stężenie w surowicy.

We wszystkich badanych immunohistochemicznie fragmentach żył wykazano obecność badanych metaloproteinaz. W ocenie morfometrycznej większe wartości procentowego pola powierzchni ekspresji MMP3 i MMP9 odnotowano dla ŻOBR w porównaniu z ŻOZR, jednakże różnic istotnych nie stwierdzono. W przypadku MMP1 różnica między grupami była na granicy istotności statystycznej.

Badania stężenia aktywnej formy metaloproteinaz w ścianie naczyń metodą ELISA wykazały, że średnie stężenie formy aktywnej formy MMP1 różniło się istotnie między badanymi grupami i wyniosło 2,4 ng/g dla ŻOBR i 0,9 ng/g dla ŻOZR. Średnie stężenie formy aktywnej MMP3 było wyższe dla ŻOBR i wyniosło 12,3 ng/g, a dla ŻOZR 3,0 ng/g osiągając znamienność statystyczną.

Wyniki oznaczenia całkowitego stężenia metaloproteinaz (form pro- i aktywnej) nie wykazały istotnych statystycznie różnic. W badaniu korelacji nieparametrycznej Spearmana pomiędzy MMP1, 3, 9 a wiekiem dla badanych grup istotna korelacja dla wieku i MMP1 wynosi 0,36 dla wszystkich badanych oraz 0,68 dla żył odpiszczelowych z refluksem. Wnioski: w ścianie żyłnej jak i krwi obwodowej stwierdza się obecność metaloproteinaz 1., 3. i 9. Obecność aktywnej formy metaloproteinaz (MMP1, MMP3) może odgrywać rolę w procesie prowadzącym do powstania niewydolności żył odpiszczelowych. Niższe stężenie formy aktywnej MMP1 i MMP3 w ścianie żył odpiszczelowych niewydolnych przy porównywalnym poziomie ekspresji tych metaloproteinaz w żyłach wydolnych może wskazywać na dynamiczne zmiany prowadzące do przebudowy obserwowanej w żyłach odpiszczelowych z refluksem. Obserwowane różnice w stężeniu aktywnych form metaloproteinaz w ścianie żył nie mają odzwierciedlenia w ich stężeniu we krwi obwodowej, co sugeruje ograniczoną przydatność tego oznaczenia dla wykazania procesów patomorfologicznych zachodzących w obrębie naczynia.

## 12. Summary

The integrity and mechanical properties of the vein wall are conditioned by the components of the extracellular matrix (ECM). The change of the composition as well as the polymorphism of the ECM components result in structural changes of the vein wall. A major role in these transformations is played by specific matrix metalloproteinases – MMPs: collagenase, gelatinase and stromelysin. The aim of this presentation is the evaluation of occurrence and activity of particular MMPs (MMP1, MMP3, MMP9) in the vein sections and the peripheral blood with consideration of the division into two groups: healthy veins (neither varices nor reflux in the great saphenous vein in the ultrasound examination duplex scan) and veins with varicose formations (both varices and reflux in the great saphenous vein in the ultrasound examination duplex scan). The examinations have been performed on the basis of: ultrasonography with duplex scan in the group with and without varices along with the assessment of the reflux grade and of the diameter of the great saphenous vein, immunohistochemical expression of the examined markers in the great saphenous veins, both sufficient and insufficient ones, determination of the concentration of the active form of the MMPs in the wall of great saphenous veins and the total concentration of metalloproteinases in the plasma.

The examinations included a group of sixty patients divided into two groups: patients with lower limbs varices and patients with no varices. The material was examined immunohistochemically with the aim to detect MMP1, MMP3 and MMP9 and analyzed morphometrically. Examined were both, the concentration of the MMP1, 3, 9 active form in the vein wall as well as the total concentration in the serum.

The occurrence of the metalloproteinases in question has been shown in all immunohistochemically examined vein sections. In the morphometric evaluation greater values of the percentage surface field of the MMP3 and MMP9 expression have been recorded for the great saphenous vein without reflux in comparison with that with reflux, however no significant differences have been stated. In case of MMP1 the difference between the groups was on the border of statistical significance.

The examinations of the concentration of the metalloproteinase active form in the vessel wall with the ELISA method have shown that the average concentration of the MMP1

active form differentiated significantly between the examined groups and amounted to 2.4 ng/g for the great saphenous vein without reflux and 0.9 ng/g for the great saphenous vein with reflux. The average concentration of the MMP3 active form was greater for the great saphenous vein without reflux and amounted to 12.30 ng/g whereas for the great saphenous vein with reflux equalled 3.00 ng/g thus achieving the statistical significance.

The determination results of the total MMP's concentration (pro and active form) have shown no statistically significant differences. In Spearman's rank correlation (non-parametric) between MMP1, 3, 9 and the age of the groups in question the significant correlation for the age and MMP1 equals 0.36 for all examined patients and 0.68 for great saphenous vein with reflux.

The occurrence and differences in the expression of the metalloproteinases – 1, 3, 9 have been confirmed in both, the vein wall and peripheral blood.

According to the performed examinations it has been stated that a particular concentration of the metalloproteinases 1 and 3 may play a role in the process inducing the formation of great saphenous veins' insufficiency. At this stage however it is impossible to clarify whether the decrease of the MMP-s activity in the wall of veins is a consequence or rather cause of their insufficiency.

Decreased concentration of the active form MMP1 and MMP3 in the wall of insufficient great saphenous veins in comparison with sufficient veins suggests a dynamism of the process leading to the remodelling observed in great saphenous veins with reflux.

The changes occurring in the vein wall connected with the activity of metalloproteinases find no reflection in their concentration in the peripheral blood.