

mgr inż. biotechnologii Magdalena Budzyń – Napierała

***Ocena stanu równowagi elastaza - alfa-1-antytrypsyna i jej
wpływu na wybrane markery uszkodzenia śródbłonka w
przewlekłej niewydolności żylnej.***

Rozprawa doktorska

Promotor: prof. dr hab. Maria Iskra

**Zakład Chemii Ogólnej, Katedra Chemii i Biochemii Klinicznej
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu**



Praca finansowana w ramach grantu Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu nr 502-14-02228370-09122

Poznań 2012

*Pani Profesor Marii Iskrze
za wszechstronną pomoc, życzliwość i ogromne serce
składam serdeczne podziękowania*

Spis treści

Spis treści.....	3
1. Wprowadzenie	6
2. Wstęp	8
2.1. Przewlekła niewydolność żylna – dane epidemiologiczne.....	8
2.1.1. Czynniki ryzyka.....	8
2.1.2. Klasyfikacja PNŻ	9
2.1.3. Zmiany histopatologiczne w ścianie żylny w przebiegu PNŻ.....	10
2.1.4. Udział hipoksji i mechanizmów zapalnych w uszkodzeniu śródbłonka w PNŻ.....	14
2.2. Śródbłonek naczyniowy.....	15
2.2.1. Budowa i funkcje śródbłonka	16
2.2.2. Wybrane markery uszkodzenia śródbłonka.....	18
2.2.2.1. Rozpuszczalna frakcja trombomoduliny (STM)	19
2.2.2.2. Rozpuszczalna frakcja śródbłonkowej kadheryny (sVE-cadherin)	21
2.3. Rola metabolitów pochodzenia neutrofilowego w uszkodzeniu śródbłonka naczyń	23
2.3.1. Reaktywne form tlenu wytwarzane przez aktywowane neutrofile.....	24
2.3.2. Udział reaktywnych form tlenu w uszkodzeniu śródbłonka.....	26
2.3.3. Wybrane wykładniki stresu oksydacyjnego	29
2.3.3.1. Aldehyd dimalonowy (MDA).....	29
2.3.3.2. Całkowita zdolność antyoksydacyjna (CZA)	29
2.3.3.3. Kwas moczowy	30
2.3.4. Neutrofilowa elastaza – struktura i funkcje	30
2.3.4.1. Alfa-1-antytrypsyna jako inhibitor neutrofilowej elastazy	32
2.3.4.2. Zaburzenia w równowadze elastaza – alfa-1-antytrypsyna	34
2.3.5. Udział elastazy w uszkodzeniu śródbłonka	37
3. Cel pracy	39
4. Materiał.....	40
5. Metodyka badań.....	42
5.1. Odczynniki.....	42
5.1.1. Oznaczanie całkowitego stężenia neutrofilowej elastazy (NE)	42
5.1.2. Pomiar aktywności elastolitycznej.....	42
5.1.3. Pomiar aktywności alfa-1-antytrypsyny (AAT).....	42
5.1.4. Oznaczenie stężenia białka C-reaktywnego wysokiej czułości (hsCRP).....	42
5.1.5. Oznaczanie stężenia dialdehydu malonowego (MDA).....	42
5.1.6. Pomiar całkowitej zdolności antyoksydacyjnej surowicy (CZA).....	42
5.1.7. Oznaczanie stężenia kwasu moczowego	43
5.1.8. Oznaczanie stężenia rozpuszczalnej śródbłonkowej kadheryny (sVE-kadheryny)	43

5.1.9.	Oznaczanie stężenia rozpuszczalnej trombomoduliny (sTM)	43
5.2.	Oznaczanie całkowitego stężenia neutrofilowej elastazy (NE).....	43
5.3.	Pomiar aktywności elastolitycznej surowicy	44
5.4.	Pomiar aktywności alfa-1-antytrypsyny (AAT).....	45
5.5.	Oznaczanie stężenie białka C-reaktywnego wysokiej czułości (hs CRP).....	45
5.6.	Oznaczanie stężenia dialdehydu malonowego (MDA)	45
5.7.	Pomiar całkowitej zdolności antyoksydacyjnej surowicy (CZA).....	46
5.8.	Oznaczanie stężenia kwasu moczowego	47
5.9.	Oznaczanie stężenia rozpuszczalnej śródbłonkowej kadheryny (sVE-kadheryny).....	47
5.10.	Oznaczanie stężenia rozpuszczalnej trombomoduliny (sTM).....	47
5.11.	Analiza statystyczna	48
6.	Wyniki	49
6.1.	Ocena parametrów równowagi NE-AAT oraz stężenia hsCRP	49
6.1.1.	Ocena parametrów równowagi NE-AAT i stężenia hsCRP w całej grupie pacjentów z PNŻ	49
6.1.2.	Ocena parametrów równowagi NE-AAT i stężenia hsCRP w zależności od postaci klinicznej PNŻ	51
6.1.3.	Ocena parametrów równowagi NE-AAT i stężenia hsCRP w zależności od czasu trwania PNŻ	54
6.1.4.	Ocena parametrów równowagi NE-AAT i stężenia hsCRP w zależności od płci pacjentów z PNŻ	56
6.2.	Ocena parametrów równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej.....	59
6.2.1.	Ocena parametrów równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej w całej grupie pacjentów z PNŻ.....	59
6.2.2.	Ocena parametrów równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej w zależności od postaci klinicznej PNŻ	61
6.2.3.	Ocena parametrów równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej w zależności od czasu trwania PNŻ	63
6.2.4.	Ocena parametrów równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej w zależności od płci pacjentów z PNŻ	64
6.3.	Ocena markerów uszkodzenia śródbłonka	67
6.3.1.	Ocena markerów uszkodzenia śródbłonka w całej grupie pacjentów z PNŻ.....	67
6.3.2.	Ocena stężenia markerów uszkodzenia śródbłonka w zależności od postaci klinicznej PNŻ.....	67
6.3.3.	Ocena stężenia markerów uszkodzenia śródbłonka w zależności od czasu trwania PNŻ.....	68
6.3.4.	Ocena stężenie markerów uszkodzenia śródbłonka w zależności od płci pacjentów z PNŻ	69
6.4.	Podsumowanie ocenianych parametrów po podziale pacjentów na odpowiednie kwartyle.....	74
6.4.1.	Porównanie oznaczanych parametrów zależnie od kwartyła stężenia NE	74

6.4.2. Porównanie oznaczanych parametrów zależnie od kwartyła aktywności elastolitycznej surowicy	76
6.4.3. Podsumowanie oznaczanych parametrów zależnie od kwartyła aktywności AAT	78
7. Dyskusja	80
8. Wnioski.....	91
9. Streszczenie.....	92
10. Summary.....	94
11. Wykaz stosowanych skrótów	96
12. Piśmiennictwo	98
13. Wykaz rycin.....	112
14. Wykaz tabel	115

1. Wprowadzenie

Przewlekła niewydolność żylna (PNŻ) jest problemem o charakterze zarówno medycznym, jak i społecznym. Liczne badania i obserwacje kliniczne przekonują, że PNŻ należy do jednych z najbardziej rozpowszechnionych schorzeń układu krążenia. Pomimo wysokiej częstości występowania PNŻ w populacji ludzkiej, czynniki zaangażowane w jej powstawanie i rozwój są nadal mało znane.

Ocena histopatologiczna naczyń żylnych, pobranych od osób z PNŻ wskazuje na zmiany we wszystkich trzech warstwach ściany, szczególnie jednak w obrębie *intimy* [1,2]. Warstwa ta wykazuje silną hipertrofię a ciągłość pokrywającego ją śródbłonna ulega wyraźnemu zaburzeniu. Przerwanie monowarstwy śródbłonna ułatwia penetrację ściany żylniej przez komórki obecne w krążeniu, przez co dochodzi do nadmiernego rozrostu i dezorganizacji głębiej położonych tkanek.

Mimo, że patogeneza rozwoju schorzeń naczyń żylnych jest słabo poznana, podejrzewa się, że zaangażowane w to czynniki są analogiczne z tymi sprzyjającymi rozwojowi miażdżycy. W przebiegu PNŻ, podobnie jak w miażdżycy, kluczową rolę odgrywają procesy zapalne, których ważnym mediatorem są pobudzone neutrofile [3]. W stanie aktywacji wydzielają one do przestrzeni zewnątrzkomórkowej szereg cytokin, stymulujących inne komórki odpowiedzi immunologicznej oraz związków bezpośrednio uszkadzających otaczające tkanki, takich jak reaktywne formy tlenu (RFT) i proteazy [4].

Udział RFT w uszkodzeniu śródbłonna został wielokrotnie potwierdzony w badaniach *in vitro*, prowadzonych na ludzkich kulturach tkankowych [5,6]. Natomiast wśród licznych enzymów proteolitycznych uwalnianych przez neutrofile, wielokierunkowy niekorzystny wpływ na śródbłonek naczyń krwionośnych wykazuje elastaza uwalniana z ziarnistości azurofilnych. Z badań wynika, że w zależności od stężenia, elastaza powoduje cytolizę lub apoptozę komórek śródbłonna [7]. Ponadto w jej obecności dochodzi do odłączania się komórek śródbłonna od błony podstawnej oraz destrukcji śródbłonkowych połączeń międzykomórkowych [8,9]. Do wyżej opisanych niepożądanych efektów działania enzymu na śródbłonek może dochodzić w sytuacji zaburzonej równowagi między elastazą a jej naturalnym inhibitorem alfa-1-antytrypsyną [10,11,12,13].

Z tego powodu, że wyniki badań nad rolą RFT i enzymów proteolitycznych w uszkodzeniu naczyń żylnych są niespójne, celem niniejszej pracy było określenie relacji między elastazą a jej inhibitorem - alfa-1-antytrypsyną oraz ocena wybranych parametrów stresu

oksydacyjnego u pacjentów z PNŻ, z uwzględnieniem stadium klinicznego PNŻ i czasu trwania choroby.

2. Wstęp

2.1. Przewlekła niewydolność żylna – dane epidemiologiczne

Przewlekła niewydolność żylna to utrwalone zaburzenie odpływu krwi żyłnej z kończyn dolnych wskutek wstecznego przepływu żylnego, zwężenia lub niedrożności żył, dotyczące układu żył powierzchownych lub głębokich [14].

W szeregu badań epidemiologicznych szacowano, że częstość występowania tego schorzenia w Europie wynosi od 40 do 60% w populacji kobiet oraz od 15 do 30% w populacji mężczyzn [15,16]. W Polsce sytuacja wygląda podobnie i ocenia się, że na PNŻ cierpi aż 47% kobiet i 38% mężczyzn [17].

Najczęstszym objawem klinicznym PNŻ są żylaki kończyn dolnych, które nie leczone mogą doprowadzić do poważnych komplikacji takich jak owrzodzenia żyłne czy rozwój żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej [17].

2.1.1. Czynniki ryzyka

Jednym z głównych czynników ryzyka PNŻ jest płeć. Z wielu badań wynika, że kobiety są znacznie bardziej narażone na rozwój chorób układu żylnego. Wykazano, że stosunek zachorowalności wśród mężczyzn do zachorowalności kobiet waha się od 1:1.5 do 1:2.5. [18,19]. U 30% kobiet, pierwsze objawy kliniczne PNŻ ujawniają się w czasie ciąży [20]. Prawdopodobnie w tym okresie ich wystąpienie ma związek ze zmianami hormonalnymi, zwłaszcza wzrostem poziomu estrogenów działających rozluźniająco na mięśniówkę naczyń żylnych. Inną przyczyną może być wzrost ciśnienia żylnego, spowodowanym wzrostem całkowitej objętości krwi lub ucisk żyły biodrowej, uniemożliwiający skuteczny odpływ krwi z kończyn dolnych.

Badania epidemiologiczne wskazują, że niezależnie od płci, prawdopodobieństwo wystąpienia PNŻ rośnie wraz z wiekiem. W przypadku żylaków zapadalność na to schorzenie w przedziale wiekowym od 18 do 24 lat wynosi 11,5%, natomiast w wieku od 55 do 64 lat wzrasta do 55,7% [21]. Podobną sytuację obserwuje się w odniesieniu do cięższych postaci klinicznych PNŻ, np. owrzodzeń żylnych, których częstość występowania w populacji ogólnej szacuje się na 1%, natomiast u osób po 80 roku życia ryzyko ich pojawienia się wzrasta do 5% [22]. Podejrzewa się, że za rozwój PNŻ u osób młodych opowiadają głównie czynniki genetyczne. Udowodniono, że elastyczność ścian żył w kończynach dolnych jest obniżona już u dzieci, w których rodzinach występowały żylaki. Sugeruje się, że dziedziczne mogą być

niewłaściwe geny odpowiedzialne za utrzymanie prawidłowej proporcji i właściwości składników ścian naczyń krwionośnych [23].

Innymi czynnikami warunkującymi rozwój PNŻ są otyłość, niska aktywność fizyczna i towarzysząca temu dieta uboga w błonnik [24]. Do powstawania schorzeń układu żylnego predysponuje także wykonywanie zawodu związanego z pozycją stojącą lub długotrwałą pozycją siedzącą oraz przebyta w przeszłości zakrzepica naczyń żylnych [25].

2.1.2. Klasyfikacja PNŻ

Złożoność problemu jakim jest PNŻ oraz wielorakość postaci chorób stała się przyczyną tworzenia różnych klasyfikacji tej grupy schorzeń. Proponowane podziały miały na celu poprawę charakterystyki i systematyki oraz określenie stopnia ciężkości omawianej jednostki chorobowej. W 1994 roku zaproponowana została przez międzynarodowy zespół specjalistów tzw. klasyfikacja CEAP (*Clinical, Etiologic, Anatomic, Pathophysiologic classification*), której założeniem było wprowadzenie jednolitego standardu oceny PNŻ, z uwzględnieniem wszystkich jej objawów [26].

Część kliniczna klasyfikacji CEAP (Tabela 1) obejmuje 6 stopni wskazujących na nasilenie procesu chorobowego, jednocześnie umożliwiając uwzględnienie objawów klinicznych PNŻ. Dodatkowa cecha A (*asymptomatic*) wskazuje na brak objawów klinicznych, natomiast cecha S (*symptomatic*) potwierdza ich występowanie u danego pacjenta.

Tabela 1. Część kliniczna klasyfikacji CEAP [26].

Klasyfikacja kliniczna (C)	
0	Objawy podmiotowe wyłącznie
1	Obecność teleangiektazji lub żylaków siatkowatych
2	Żylaki
3	Obrzęk
4	Zmiany troficzne skóry (przebarwienia, <i>stasis dermatitis</i> , <i>lipodermatosclerosis</i>)
5	Zmiany troficzne skóry z zagojonym owrzodzeniem (widoczna blizna)
6	Zmiany troficzne skóry z czynnym owrzodzeniem
Każdemu stopniowi przydzielana jest cecha A (<i>asymptomatic</i>) lub S (<i>symptomatic</i>)	

Część etiologiczna klasyfikacji uwzględnia wrodzone zespoły, zmiany pierwotne o nieznanym przyczynie oraz zmiany wtórne i nabyte o znanej przyczynie. Część anatomiczna pozwala na dokładne określenie lokalizacji zaburzeń (żyły powierzchowne, głębokie, prze-

szywające). W ocenie patofizjologicznej układu żylnego rozważany jest problem występowania refluksu i/lub niedrożności u danego pacjenta.

2.1.3. Zmiany histopatologiczne w ścianie żyłnej w przebiegu PNŻ

Na przekroju poprzecznym prawidłowej żyły wyróżnia się 3 warstwy. Licząc od światła jest to błona wewnętrzna (*tunica intima*), 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. Błone środkową (*tunica media*) stanowią okrężnie biegnące włókna mięśni gładkich, włókna kolagenowe i sprężyste. Warstwa trzecia, zewnętrzna (*tunica adventitia*), zbudowana jest z tkanki łącznej wiotkiej oraz leżących podłużnie włókien mięśni gładkich (Tabela 2).

Tabela 2. Zmiany w budowie histologicznej żyłki w porównaniu z żyłą prawidłową [23].

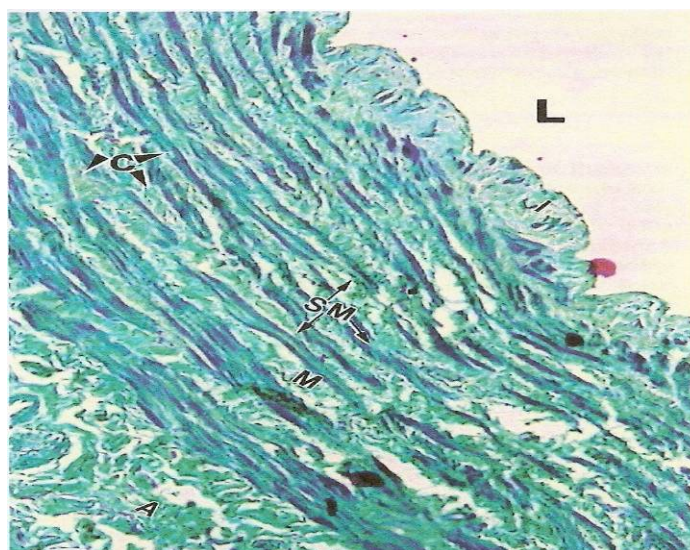
Budowa histopatologiczna żyły (przekrój poprzeczny)	Żyła prawidłowa	Żyłak
Warstwa wewnętrzna (<i>intima</i>)	Monowarstwa komórek śródbłonka (<i>endothelium</i>) bezpośrednio kontaktujących się z krwią płynącą w naczyniu	<ul style="list-style-type: none"> • monowarstwa komórek śródbłonka ulega uszkodzeniu • pod śródbłonkiem pojawiają się depozyty kolagenu
Warstwa środkowa (<i>media</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • trzy warstwy komórek mięśni gładkich (podłużna, okrężna, podłużna) • pomiędzy poszczególnymi warstwami obecność macierzy zewnątrzkomórkowej, w której skład wchodzi: kolagen, elastyna i proteoglikany 	<ul style="list-style-type: none"> • składniki macierzy zewnątrzkomórkowej zaburzają podłużny i okrężny przebieg warstwy mięśni gładkich • komórki oddzielone włóknami kolagenu o nieregularnym przebiegu • komórki mięśni gładkich są powiększone i tracą swój wrzecionowaty kształt.
Warstwa zewnętrzna (<i>adventitia</i>)	Nieregularne, podłużne włókna mięśniowe, obecność kolagenu i fibroblastów.	Wzrasta ilość komórek mięśni gładkich oraz fibroblastów i kolagenu.

Badania histopatologiczne naczyń żylnych pobrane od chorych cierpiących na PNŻ wykazują na poważne zmiany w obrębie wszystkich 3 warstw (Tabela 2). Podejrzewa się, że pierwotnym czynnikiem prowadzącym do obserwowanych nieprawidłowości jest niewy-

dolność zastawek żylnych powodująca zastój żylny i rozwój nadciśnienia żylnego [27,28]. W sprzeczności z tą teorią pozostają jednak doniesienia, z których wynika, że nieprawidłowa przebudowa ściany żyłnej może niekiedy poprzedzać upośledzenie pracy zastawek [29,30]. Nasuwa to przypuszczenie, że za powstawanie PNŻ mogą odpowiadać pierwotne zmiany w strukturze ścian naczyń żylnych, zarówno ich składników komórkowych jak i elementów macierzy zewnątrzkomórkowej.

Mimo, że etiologia obserwowanych nieprawidłowości nie jest dokładnie sprecyzowana, pewne jest jednak, że zmiany w obrębie naczynia żylnego negatywnie rzutują na jego funkcje prowadząc do rozwoju PNŻ. Ze względu na fakt, że błona wewnętrzna jest najbardziej narażona na niekorzystne zmiany właściwości fizycznych i biochemicznych krwi, prawdopodobnie ona jako pierwsza ulega uszkodzeniu, rozpoczynając patologiczną przebudowę kolejnych warstw.

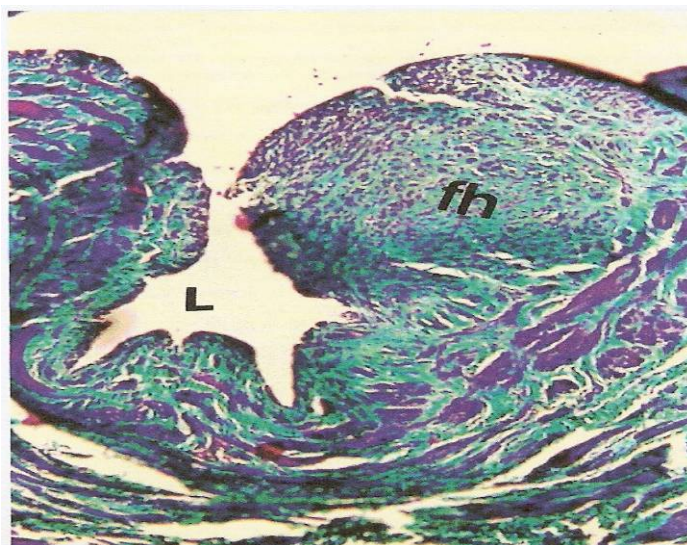
Ocena histopatologiczna żył pacjentów z PNŻ wskazuje, że *intima* u tych chorych ulega znacznemu rozciągnięciu i pofałdowaniu w porównaniu z prawidłowym naczyniem żylnym (Rycina 1, Rycina 2) [1,2,31].



Rycina 1. Obraz histologiczny prawidłowego naczynia żylnego. L (światło naczynia), M (*media*), A (*adventitia*), SM (komórki mięśni gładkich), C (włókna kolagenowe) [1].

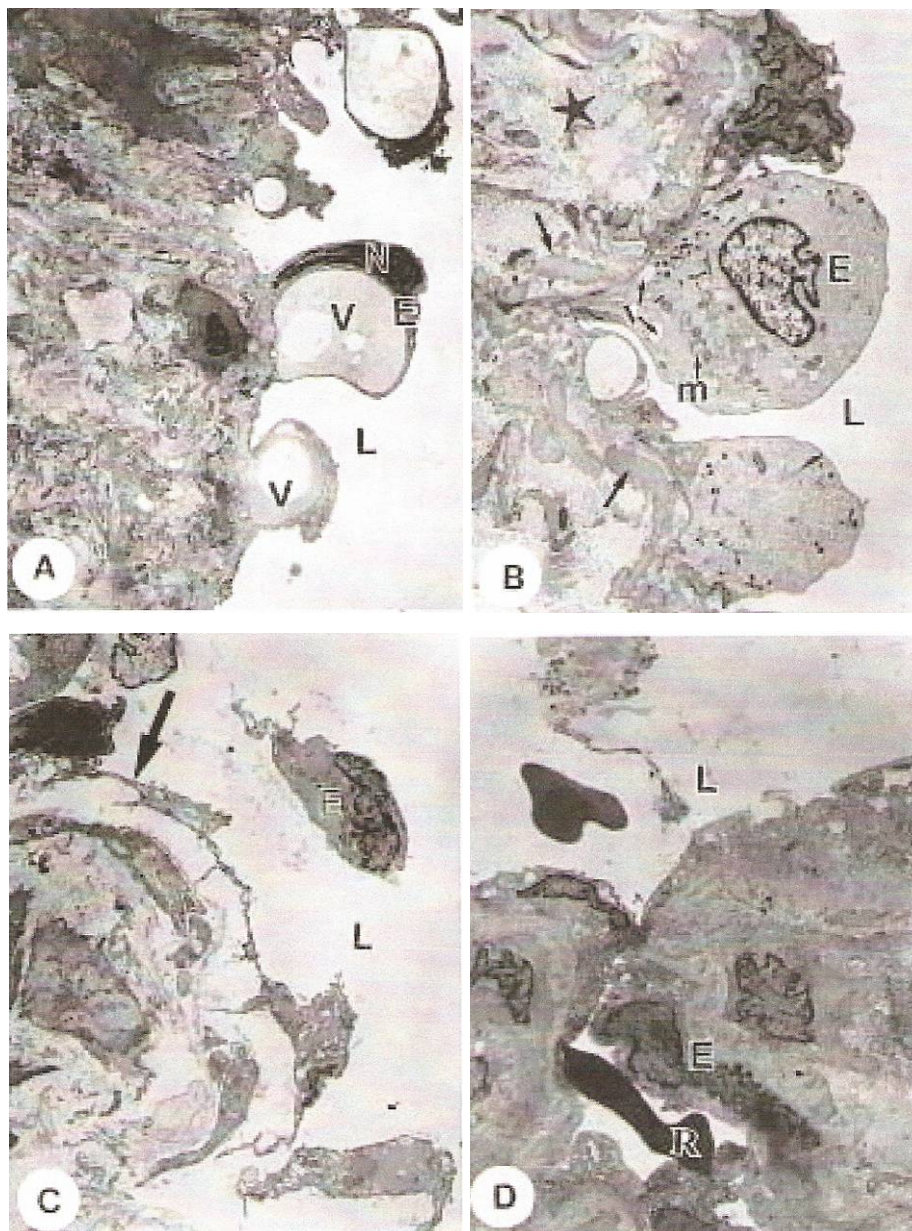
Na skutek wzrostu zawartości włókien kolagenowych i migracji komórek mięśniowych z *medii* do *intimy* ta ostatnia ulega też nieprawidłowemu zgrubieniu (hipertrofii) (Rycina 2). Jednocześnie w obrębie błony wewnętrznej obserwuje się zmniejszenie zawartości włókien elastynowych [31]. Podejrzewa się, że dysproporcja w ilości włókien kolageno-

wych w stosunku do włókien elastynowych może mieć negatywny wpływ na właściwości mechaniczne ściany żyłnej.



Rycina 2. Obraz histologiczny żyły zmienionej żylakowato z pofałdowaną i hipertroficzną warstwą intymy. L (światło naczynia), fh (hipertroficzna błona wewnętrzna) [1].

Poważne zaburzenia obserwuje się także w obrębie śródbłonka [1,2,31], którego komórki tracą swój właściwy kształt, stając się kuliste i obrzęknięte (Rycina 3). Ich cytoplazma ulega silnej wakuolizacji, natomiast w obrębie jądra komórkowego widoczna jest kondensacja i marginalizacja chromatyny. Ponadto na powierzchni komórek śródbłonka od strony światła naczynia widoczne są mikrokosmki, powodujące wzmożony kontakt elementów morfotycznych krwi ze śródbłonkiem. W obrębie niektórych obszarów *intimy*, komórki śródbłonka ulegają cytolizie, a uwolnione w tym procesie elementy komórkowe widoczne są w świetle naczynia. W świetle naczynia obecne są także same komórki śródbłonka, które ulegają odłączeniu od błony podstawnej (Rycina 3). W miejscach przerwania ciągłości monowarstwy śródbłonka, odsłonięciu ulega błona podstawna, do której zaczynają przylegać płytki krwi i erytrocyty, tworząc skrzeplinę przyścienną [2].



Rycina 3. Obraz mikroskopowy patologicznych zmiany w obrębie śródbłónka. A. Rozciągnięte komórki śródbłónka (E) z wyraźną wakuolizacją cytoplazmy (V) oraz pyknotycznym jądrem komórkowym (N) , światło naczynia (L) ($\times 2,444$). B. Balonowate komórki śródbłónka (E) z uszkodzonymi mitochondriami (m). W warstwie podśródbłonkowej widoczne nieregularne włókna kolagenowe (gwiazdka) i elastynowe (strzałki), światło naczynia (L) ($\times 6,759$). C. Całkowita dezorganizacja śródbłónka (strzałka) z obecnością zdegenerowanych komórek (E) w świetle naczynia (L) ($\times 4,250$). D. Pofałdowana warstwa śródbłónka (E) z przylegającymi do niej erytrocytami (R) ($\times 4,500$) [2].

2.1.4. Udział hipoksji i mechanizmów zapalnych w uszkodzeniu śródbłonka w PNŻ

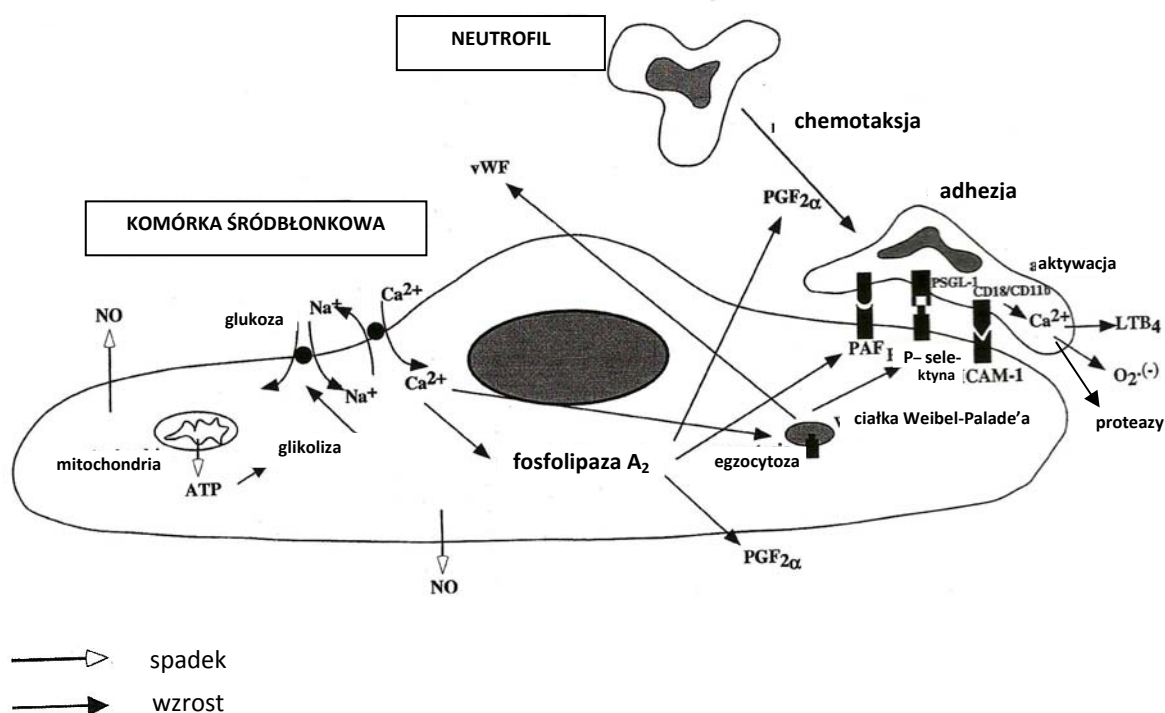
Za obserwowane w badaniach histopatologicznych zmiany w obrębie śródbłonka wysielającego naczynia żyłne może odpowiadać stan hipoksji rozwijający się u pacjentów z PNŻ, na skutek zaburzeń w odpływie krwi żyłnej z kończyn dolnych. Podejrzewa się, że czynnikami odpowiedzialnymi za rozwój zastoju żylnego są niewydolność zastawek żylnych, zmiany w elastyczności ściany żyłnej, upośledzenie funkcji pompy mięśniowo-stawowej oraz zaburzenia w mikrokrażeniu [32]. Stan hipoksji, o którym świadczy obniżone ciśnienie parcjalne tlenu, obserwowane we krwi pobranej z kończyn dolnych pacjentów z PNŻ, może prowadzić do przewlekłego stanu zapalnego, odpowiadającego za niekorzystne zmiany w obrębie naczynia żylnego [33,34].

Hipoksja wyzwalając szereg biochemicznych zmian w obrębie komórek śródbłonka jak i samych neutrofilów, sprzyja ich wzajemnej adhezji [35] (Rycina 4).

W komórkach śródbłonka, w wyniku hipoksji dochodzi do spadku efektywności fosforylacji oksydacyjnej i obniżenia stężenia ATP [36]. Następuje spadek stężenia cyklicznego adenozynomonofosforanu (cAMP), który prawdopodobnie odpowiada za wzrost przepuszczalności śródbłonka [37]. Rośnie wewnątrzkomórkowe stężenie jonów wapnia, powodujące aktywację fosfolipazy A_2 i cyklooksygenazy-2 [38]. Enzymy te biorą udział w syntezie prostaglandyn, które wydzielane przez komórki śródbłonka uczestniczą w chemotaksji neutrofilów. Podobne działanie wykazuje czynnik aktywujący płytki krwi (PAF), wytwarzany przez aktywną formę fosfolipazy A_2 i ulegający ekspozycji na powierzchni śródbłonka. Wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia stymuluje także egzocytozę ciałek Weibel-Palade'a, będących rezerwuarem czynnika von Willebranda oraz P-selektyny. Ta ostatnia, w wyniku egzocytozy ulega ekspresji na powierzchni śródbłonka i poprzez interakcje ze swoimi ligandami, selektyną L i PSGL-1 (glikoproteinowym ligandem 1 P-selektyny), zlokalizowanymi na powierzchni neutrofilów, uczestniczy w ich toczeniu się po *endothelium* (Rycina 4).

Hipoksja wpływa też bezpośrednio na same neutrofile. Na ich powierzchni dochodzi do wzmożonej ekspresji integryn, zwłaszcza CD11b/CD18, która przez interakcję z komplementarną śródbłonkową glikoproteiną ICAM-1, warunkuje silną adhezję neutrofilów do powierzchni śródbłonka [39]. W wyniku bezpośredniego kontaktu neutrofilów z komórkami śródbłonka następuje ich aktywacja i uwolnienie do przestrzeni zewnątrzkomórkowej leukotrienów, zwłaszcza B4 (LTB4), RFT oraz enzymów proteolitycznych [40] (Rycina 4). Niekontrolowane wydzielanie przez neutrofile wymienionych metabolitów może

prowadzić do zaburzeń w funkcji i strukturze śródbłonna, skutkujących niekorzystnymi zmianami w obrębie dalszych warstw naczyń żylnych.



Rycina 4. Metaboliczna i biochemiczna odpowiedź komórek śródbłonna oraz neutrofilów na stan hipoksji. ICAM-1-cząsteczka adhezji międzykomórkowej-1, LTB₄-leukotrien B₄, PAF-czynnik aktywujący płytki krwi, PGF_{2α}-prostoglandyna F_{2α}, PSGL-1-glikoproteinowy ligand 1 P-selektyny, vWF-czynnik von Willebranda (zmodyfikowane według [38]).

2.2. Śródbłonek naczyniowy

Śródbłonek jest postrzegany coraz częściej jako największy gruczoł endokryny w ustroju człowieka. Komórki śródbłonna stanowią naturalną barierę między krwią i mięśniami gładkimi naczyń. Odgrywają one istotną rolę w regulacji wazomotoryki, hemostazy i angiogenezy oraz procesów zapalnych i immunologicznych.

Śródbłonek, na skutek wielu nie do końca jeszcze poznanych mechanizmów, może reagować na zmiany ciśnienia i przepływu krwi oraz prężności gazów. Jest strukturą łatwo pobudliwą i szybko odpowiadającą na bodźce, w wyniku których dochodzi do jego aktywacji. Uszkodzenie mechaniczne śródbłonna czy też utrata integralności funkcjonalnej, zaburza wieloczynnikową równowagę zapewnianą przez te komórki, powodując szereg istotnych zaburzeń patologicznych, takich jak nadciśnienie, zmiany miażdżycowe, powstawanie zakrzepów oraz zaburzenie perfuzji tkanek i narządów.

2.2.1. Budowa i funkcje śródbłonka

Śródbłonek składa się z pojedynczej warstwy płaskich komórek o grubości 0,2-0,3 μm . Komórki śródbłonka łączą się połączeniami międzykomórkowymi z udziałem śródbłonkowej kadheryny (CD144) i MAKAM-1 (CD146) oraz połączeniami ścisłymi. Ściana naczyń w warunkach fizjologicznych jest bardzo szczelną, trudną do pokonania barierą dla komórek krwi. Od strony światła naczyń komórki *endothelium* pokrywa warstwa glikokaliksu zbudowanego z glikozaminoglikanów, z dominacją siarczanu heparanu. Glikokaliks, dzięki obecności grup siarczanowych, nadaje wewnętrznej ścianie naczyń ujemny ładunek elektryczny, zapewniając skuteczne odpychanie cząsteczek elektroujemnych, w tym albumin oraz ujemnie naładowanych struktur błon komórkowych składników morfotycznych krwi.

Część podstawno-boczna komórek śródbłonka jest miejscem występowania konstytutywnych receptorów integrynowych wiążących śródbłonek ze składnikami błony podstawnej i macierzy zewnątrzkomórkowej, przede wszystkim z kolagenami, glikozaminoglikanami, elastyną, fibronektyną czy lamininą. Na powierzchni luminalnej i bocznej komórek śródbłonka znajdują się zarówno konstytutywne jak i indukowane cząsteczki adhezyjne: zawierające fragment lektyny – selektyna E (CD62E) i selektyna P (CD62P) oraz adresyny immunoglobulinopodobne: cząsteczka międzykomórkowej adhezji-1 (ICAM-1, CD54), cząsteczka międzykomórkowej adhezji-2 (ICAM-2, CD102), cząsteczka adhezji komórkowej płytek i śródbłonka-1 (PECAM-1, CD31) oraz cząsteczka adhezji komórkowej naczyń-1 (VCAM-1, CD106). Struktury te są odpowiedzialne między innymi za oddziaływanie międzykomórkowe, toczenie się, aktywację, adhezję i diapedezę neutrofilów w procesach zapalnych. Znamiennej cechą komórek śródbłonka jest obecność znacznej liczby pęcherzyków pinocytarnych oraz białek transportowych, świadczących o wysokiej aktywności metabolicznej. W cytoplazmie komórek znajdują się ciała Weibel-Palade'a zawierające multimery czynnika von Willebranda, stanowiące największe źródło tej glikoproteiny w organizmie.

Jedną z głównych funkcji śródbłonka jest regulacja relaksacji mięśniówki naczyniowej, poprzez wydzielanie zarówno związków o charakterze wazodylatatorów jak i wazokonstryktorów. Do tych pierwszych należy tlenek azotu wytwarzany przez dwie izoformy syntazy tlenu azotu: konstytutywną oraz indukowaną, której produkcję stymuluje działanie sił ścierających oraz wzrost stężenia acetylocholin, bradykininy, niektórych cytokin, insuliny i substancji P.

Innymi czynnikami działającymi rozluźniająco na ścianę naczyń i wydzielanymi przez śródbłonek są prostacyklina I_2 (PGI_2) oraz śródbłonkowy czynnik hiperpolaryzacyjny

(*endothelium derived hiperpolarizing factor* –EDHF). Mechanizm działania wazodylatorów polega na zmniejszeniu wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia w komórkach mięśniowych oraz hamowaniu białek kurczliwych, w konsekwencji czego dochodzi do relaksacji mięśniówki naczyń krwionośnych.

Wydzielaniu wazodylatorów przez komórki śródbłonna przeciwstawiane są synteza i uwalnianie czynników kurczących naczynia: tromboksanu A₂ (TXA₂), endoteliny-1 (ET-1), angiotensyny II (AT II), czynnika aktywującego płytki krwi (PAF) oraz leukotrienów (LT).

Hemostatyczna czynność śródbłonna w normalnych warunkach polega na zapewnieniu niekrzepliwości krwi, nietrombogenności powierzchni naczyń, a po jego uszkodzeniu lub przerwaniu, na ograniczeniu skrzepliny do miejsca trombogenicznego. Działanie antykoagulacyjne, zapewnia wytwarzana przez komórki śródbłonna antytrombina III (AT III), która hamuje i inaktywuje czynniki krzepnięcia krwi, tj. czynnik II, IXa, Xa, XIa, XIIa, plazminę i kalikreninę. Działania AT III wspomagane jest przez występujący na powierzchni śródbłonna TFPI (*tissue factor pathway inhibitor*) hamujący zewnątrzpochodną kaskadę krzepnięcia poprzez inaktywację czynnika X oraz czynnika VII w jego kompleksie z czynnikiem tkankowym (*tissue factor*, TF). Inne białko obecne na powierzchni śródbłonna - trombomodulina, uczestniczy w hamowaniu krzepnięcia, poprzez wiązanie się z trombiną, która w tej formie traci swą aktywność prozakrzepową. Innym mechanizmem zapobiegającym tworzeniu się wewnątrznacyniowych zakrzepów jest synteza przez komórki śródbłonna tkankowego aktywatora plazminogenu (*tissue plasminogen activator* – t-PA) oraz urokinazowego aktywatora plazminogenu (*urokinase plasminogen activator* – u-PA), proteaz serynowych nasilających w obecności fibryny proces przekształcenia plazminogenu w plazminę.

Rola *endothelium* polega także na regulowaniu procesów angiogenezy i waskulogenezy, ważnych w rozwoju zarodkowym, reprodukcji, gojeniu się ran, ale także odgrywających istotną rolę w procesach nowotworzenia. Spośród czynników wytwarzanych przez komórki śródbłonna, które biorą udział w angiogenezie wymienić można: naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (*vascular endothelial growth factor* – VEGF), zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (*basic fibroblast growth factor* – bFGF), czynnik martwicy nowotworów alfa (*tumor necrosis factor-α* - TNF-α) oraz transformujący czynnik wzrostu alfa (*transforming growth factor-α* - TGF-α).

Ważną funkcją śródbłonna jest jego udział w odpowiedzi immunologicznej, polegający na ekspresji molekuł adhezyjnych i syntezie cytokin prozapalnych, uczestniczących w chemotaksji leukocytów, ich przyleganiu do warstwy śródbłonna a następnie transmigracji przez ścianę naczynia do miejsca docelowego, objętego stanem zapalnym [41].

2.2.2. Wybrane markery uszkodzenia śródbłonka

W schorzeniach układu krążenia często obserwuje się zaburzenia w prawidłowym funkcjonowaniu śródbłonka naczyń. Dysfunkcja śródbłonka prowadzi do kompensacyjnej odpowiedzi wyrażającej się swoistymi zmianami metabolizmu, funkcji i struktury komórek śródbłonka, które umożliwiają im właściwą reakcję na działający patofizjologiczny czynnik. Adaptacyjne zmiany w funkcji i strukturze śródbłonka prowadzą do ostrych lub przewlekłych zaburzeń w interakcjach komórek śródbłonka z komórkowymi lub makromolekularnymi składowymi krążącej krwi i ścianą naczynia.

W wyniku dysfunkcji śródbłonka dochodzi do wzrostu jego przepuszczalności dla lipoprotein i białek osocza, wzmożonej adhezji wobec leukocytów oraz zachwiania równowagi w uwalnianiu czynników pro- i antyzakrzepowych, czynników hamujących i stymulujących wzrost, a także substancji działających wazokonstrykcyjnie i relaksująco na ścianę naczynia. Kwestią spekulacji pozostaje jednak problem, czy zmiany w fizjologicznych funkcjach śródbłonka poprzedzone są jego uszkodzeniem, czy też pojawiają się zanim w jego obrębie można stwierdzić zaburzenia w prawidłowej morfologii komórek.

Przypuszcza się jednak, że zarówno uszkodzenie jak i dysfunkcję śródbłonka zapoczątkowuje jego aktywacja, często będąca odpowiedzią na rozwijający się w organizmie stan zapalny lub też spowodowana zaburzeniami w przepływie i właściwościach reologicznych krwi. Aktywacja śródbłonka polega na wydzieleniu przez niego prostacyklin oraz cytokin zapalnych, a także ekspresji na jego powierzchni molekuł adhezyjnych, ważnych we wzajemnych interakcjach między nim a elementami morfotycznymi krwi. W prawidłowych warunkach procesy te umożliwiają dotarcie leukocytów do tkanek objętych stanem zapalnym i wyeliminowanie go, jednak w sytuacji przedłużającego się odczynu zapalnego, długotrwała aktywacja śródbłonka może prowadzić do jego uszkodzenia.

Patologii śródbłonka często towarzyszy nadmierna lub niedostateczna produkcja specyficznych czynników, zwanych popularnie markerami dysfunkcji śródbłonka. W obrębie markerów dysfunkcji śródbłonka odrębną grupę stanowią biomolekuły, których wzrost stężenia we krwi dodatnio koreluje z morfologicznymi zmianami w obrębie śródbłonka i które ze względu na ten fakt klasyfikuje się jako markery jego uszkodzenia. Do tej kategorii należą cząsteczki uwalniane do krążenia przez uszkodzone komórki, prawdopodobnie w wyniku naruszenia integralności ich błon komórkowych, takie jak czynnik von Willebranda czy tromboomodulina.

Ostatnie badania wskazują, że wysoce specyficznym markerem uszkodzenia śródbłonna mogą być nie tylko molekuly uwolnione przez uszkodzony śródbłonek, ale jego komórki pojawiające się w nadmiernej ilości w krążeniu na skutek ich odłączenia od błony podstawnej i określane jako „krążące komórki śródbłonna” [42].

2.2.2.1. Rozpuszczalna frakcja trombomoduliny (sTM)

Popularnym markerem uszkodzenia śródbłonna jest rozpuszczalna frakcja trombomoduliny. Trombomodulina (TM) to integralne białko błonowe o masie około 75 kDa występujące na powierzchni śródbłonna tętnic, żył, naczyń włosowatych i limfatycznych. Niewielkie ilości tego białka wyizolowano także z płytek krwi, neutrofilów, komórek mięśni gładkich i epitelialnych [43,44]. Badania nad strukturą drugorzędową TM, wykazały, że na N-końcu białka znajduje się zależna od jonów wapnia domena laktynopodobna, tuż za nią region zawierający 6 powtórzeń o budowie podobnej do czynnika wzrostu naskórka (*EGF-epidermal growth factor*), będący miejscem wiązania trombiny i aktywacji białka C, dalej fragment bogaty w reszty seryny i treoniny, w którym prawdopodobnie zachodzi proces O-glikozylacji białka. Ostatnie elementy, które można wyróżnić w budowie białka to domena transbłonowa oraz część cytoplazmatyczna [45].

Główną funkcją TM jest utrzymanie płynności krwi i przeciwdziałanie tworzeniu się wewnątrznaczyniowych zakrzepów. Zewnątrzbłonowy fragment białka łączy się z trombiną w stosunku stechiometrycznym 1:1, powodując aktywację białka C i proteolityczną degradację czynników Va i VIIa kaskady krzepnięcia. Powstały kompleks posiada ponadto właściwości profibrynolityczne, polegające na hamowaniu aktywności tkankowego inhibitora plazminogenu (PAI-1). Dodatkowo sama trombina związana z TM traci swoje właściwości prokoagulacyjne, polegające na katalizowaniu reakcji przejścia fibrynogenu w fibrynę.

Powierzchniowa ekspresja TM regulowana jest przez określone czynniki. Cykliczne AMP i jego analogi podwyższają ilość cząsteczek TM eksponowanych na powierzchni śródbłonna, natomiast interleukina 1 (IL-1), TNF- α oraz hipoksja wykazują odwrotny efekt [46].

W 1985 roku Ishii i Majerus zidentyfikowali w osoczu krwi ludzkiej cząsteczki TM o masie molowej 28 – 105 kDa, które okazały się produktami degradacji zewnątrzbłonowej domeny TM. Określone zostały one jako rozpuszczalne lub krążące cząsteczki TM (*soluble thrombomodulin* - sTM, *circulating thrombomodulin* - cTM), jednak przyczyny ich obecności we krwi nie zostały przez autorów dokładnie sprecyzowane [47].

Sawada i in. wykorzystując hodowlę komórek śródbłonka aorty bydłęcej obserwowali wzrost stężenia sTM w medium hodowlanym po ekspozycji komórek na działanie czynników o właściwościach destrukcyjnych, takich jak nadtlenek wodoru czy neutrofilowa elastaza [48]. Wyniki te dowiodły, że wzrost poziomu rozpuszczalnej frakcji sTM może być związany z procesem uszkodzenia śródbłonka. Przypuszczenie te potwierdziły liczne badania kliniczne, wykazujące podwyższone stężenie sTM w tych jednostkach chorobowych, w których patogenezie uszkodzenie śródbłonka odgrywało kluczową rolę.

Schorzenia, którym towarzyszy podwyższony poziom sTM we krwi to choroby układu sercowo – naczyniowego o podłożu miażdżycowym takie jak choroba niedokrwienna serca, nadciśnienie tętnicze czy ostre niedokrwienie mózgu [49,50,51,52]. Wzrost stężenia tego białka obserwuje się również u chorych na cukrzycę, zwłaszcza tych z mikro i makroangiopatią cukrzycową [53,54]. Wysokie stężenie sTM może pojawiać się także w chorobach układu oddechowego, w których koreluje z ryzykiem wystąpienia ostrej niewydolności oddechowej (ARDS – *acute respiratory distress syndrome*), jeżeli w osoczu krwi osiąga wartość co najmniej 100 ng/ml [55]. W zespole ogólnoustrojowej reakcji zapalnej (SIRS - *systemic inflammatory response syndrome*), w którym dochodzi do rozprzestrzeniania się drobnoustrojów chorobotwórczych drogą uszkodzonych naczyń krwionośnych, stwierdza się także wysoki poziom sTM, korelujący pozytywnie ze współczynnikiem śmiertelności pacjentów [56].

sTM jako wskaźnik destrukcji śródbłonka ma znaczną przewagę nad innymi markerami, takimi jak czynnik vWF czy PAI-1, które uwalniane są z pęcherzyków komórek śródbłonkowych pod wpływem różnego rodzaju stymulantów i przez to traktowane są bardziej jako markery dysfunkcji śródbłonka niż jego uszkodzenia. Ponadto TM nie jest białkiem ostrej fazy, dlatego jej stężenie nie rośnie w stanach zapalnych czy infekcjach. Inną zaletą sTM jest fakt, że jej dobowy poziom we krwi jest stosunkowo stabilny, nie zmienia się także wraz z wiekiem, czy też pod wpływem intensywnego wysiłku fizycznego [57].

Wykorzystywanie sTM jako markera destrukcji śródbłonka ma również pewne ograniczenia. Stężenie tego białka może być podwyższone u osób z chorobami wątroby i niewydolnością nerek [58]. Jej wzrost można zaobserwować w chorobach nowotworowych [59] ze względu na zdolność transformowanych komórek do syntezy tego białka [60]. Należy także wziąć pod uwagę, że wzrost stężenie sTM we krwi może być spowodowany wzmożoną syntezą i uwalnianiem białka przez niektóre elementy morfotyczne krwi, takie jak płytki krwi, monocyty, makrofagi czy neutrofile.

2.2.2.2. Rozpuszczalna frakcja śródbłonkowej kadheryny (sVE-cadherin)

Ze względu na stosunkowo niską specyficzność popularnie wykorzystywanych markerów uszkodzenia śródbłonka, cały czas poszukuje się nowych wyznaczników jego destrukcji. Ostatnio dużo uwagi poświęca się śródbłonkowej kadherynie (*vascular endothelial cadherin* – VE-cadherin), która zlokalizowana jest wyłącznie na powierzchni komórek śródbłonka, stąd też podejrzewa się, że może charakteryzować się wyższą specyficznością w porównaniu z innymi wykorzystywanymi wyznacznikami jego uszkodzenia.

Funkcjonalna cząsteczka VE-kadheryny jest zależnym od jonów wapnia dimerem, zakotwiczonym w błonie komórkowej. W obrębie każdej z podjednostek dimeru wyodrębnić można fragment zewnątrzkomórkowy składający się z pięciu, powtarzających się tandemowo segmentów (EC1-EC5), część transbłonową oraz wysoce konserwatywny fragment wewnątrzkomórkowy zwany ogonem cytoplazmatycznym.

Fragment wewnątrzkomórkowy łączy się z cytoszkieletem aktynowym poprzez białka z rodziny katenin tj. białko 120, β kateninę oraz plakoglobinę. Z kolei domeny zewnątrzkomórkowe dwóch sąsiadujących ze sobą cząstek VE-kadheryny asocjują ze sobą tworząc superkompleksy podobne do zamka błyskawicznego (*zipper-like superstructure*) [61]. W ten sposób między sąsiadującymi komórkami śródbłonka tworzą się szczelne połączenia międzykomórkowe, nieprzepuszczalne dla elementów morfotycznych krwi ani innych obecnych w niej makromolekuł.

Pod wpływem różnych czynników wewnątrz- i zewnątrzpochodnych działających na śródbłonek dochodzi do regulacji jego przepuszczalności. Odwracalny wzrost przepuszczalności śródbłonka ma ważne znaczenie w wielu istotnych dla prawidłowego funkcjonowania organizmu procesach, takich jak transport tlenu, substancji odżywczych oraz leków do określonych tkanek a także migracji leukocytów do miejsc objętych stanem zapalnym.

Jednym z mechanizmów, który reguluje przepuszczalność śródbłonka jest fosforylacja określonych reszt tyrozynowych w obrębie VE-kadheryny, katalizowana przez kinazę SRC, CSK oraz PYK2 [61]. Do fosforylacji VE-kadheryny dochodzi w odpowiedzi na wzrost stężenia substancji takich jak histamina, TNF- α , PAF oraz w wyniku adhezji leukocytów zachodzącej za pośrednictwem ICAM-1 [62,63,64]. Skutkiem fosforylacji VE-kadheryny jest zmiana konformacyjna białka powodująca odłączenie się fragmentów zewnątrzkomórkowych, sąsiadujących dimerów VE-kadheryny i pojawienie się międzykomórkowych szczelin. Inną przyczyną wzrostu przepuszczalności śródbłonka może być fosforylacja specyficznej

reszty seryny Ser-665, powodująca internalizację VE-kadheryny i spadek jej komórkowej ekspresji [65].

Wyżej wymienione mechanizmy mają charakter odwracalny, gdyż defosforylacja białka powoduje ponowne odtworzenie połączeń międzykomórkowych. Istnieją jednak okoliczności, kiedy zmiany w obrębie adhezyjnych połączeń międzykomórkowych mają charakter trwały, prowadzący do niekontrolowanego wzrostu przepuszczalności śródbłonka.

Zewnątrzłonowy fragment VE-kadheryny jest podatny na działanie enzymów takich jak metaloproteiny, katepsyna G i elastaza, uwalnianych głównie przez aktywowane stanem zapalnym leukocyty oraz komórki nowotworowe [66, 9]. Wymienione proteazy powodują enzymatyczną degradację domeny zewnątrzłonowej białka, przez co integralność bariery śródbłonkowej ulega zachwianiu. Wyznacznikiem stopnia zaburzenia tej integralności jest wzrost stężenia rozpuszczalnej frakcji VE-kadheryny (*soluble vascular endothelial cadherin* - sVE-cadherin).

Wysokie stężenie rozpuszczalnej frakcji VE-kadheryny (sVE-kadheryny) obserwuje się w jednostkach chorobowych często związanych z nadaktywnością leukocytów. Soeki i in. wykazali wysokie stężenie sVE-kadheryny u pacjentów z symptomami oraz przebytym zawałem serca, u których korelowało ono dodatnio ze stopniem zwężenia światła naczyń [67]. Wysokie stężenie sVE-kadheryny stwierdzono także u pacjentów z sepsą. Zhang i in., próbując wyjaśnić mechanizm pojawiania się wysokich stężeń sVE-kadheryny w krążeniu chorych na sepsę, przeprowadził badania *in vitro*, w których kulturę ludzkich komórek śródbłonka inkubowano z surowicą pacjentów. Zaobserwowano istotny ubytek VE-kadheryny w obrębie połączeń międzykomórkowych, sugerujący, że wysokie stężenie sVE-kadheryny w krążeniu chorych na sepsę jest prawdopodobnie skutkiem proteolitycznej degradacji błonowej formy białka, a nie jego wydzielaniem przez komórki śródbłonka [68]. Inne badania przedstawione przez Navaratna i in., dowodzą, że degradacja VE-kadheryny w obrębie śródbłonka mikronaczyń siatkówki, zachodząca w wyniku nadaktywności metaloproteinaz może sprzyjać rozwojowi retinopatii u chorych na cukrzycę [69].

sVE-kadheryna jako wyznacznik uszkodzenia śródbłonka charakteryzuje się wyższą specyficznością w porównaniu z innymi markerami, ale ma też swoje ograniczenia. Czynnikiem powodującym wzrost jej stężenia we krwi może być proces angiogenezy przebiegający w organizmie w warunkach fizjologicznych i ulegający znacznemu nasileniu w stanach zapalnych i chorobach nowotworowych [70].

2.3. Rola metabolitów pochodzenia neutrofilowego w uszkodzeniu śródbłonna naczyń

Neutrofile stanowią 60-70% krążących leukocytów. Kształt komórek jest kulisty, średnica wynosi 12-15 μm , jądro komórkowe podzielone jest na 2-5 płatów (segmentów). Cytoplazma dojrzałych komórek zawiera ziarnistości o średnicy 0.3 – 0.8 μm , określone jako swoiste i mniej liczne ziarnistości azurofilne, w których znajdują się związki i enzymy kluczowe dla prawidłowego funkcjonowania tych komórek (Tabela 3.)

Tabela 3. Zawartość ziarnistości w ludzkich neutrofilach.

Ziarnistości swoiste	Ziarnistości azurofilne
Fosfataza zasadowa	Fosfataza kwaśna
Kolagenaza	Alfa – mannozydaza
Laktoferyna	Arylsulfataza
Lizozym	Beta – galaktozydaza
Fagocytyna	Beta – glukuronidaza
	Katepsyna
	5' - nukleozydaza
	Elastaza
	Kolagenaza
	Mieloperoksydaza
	Lizozym
	Kationowe białka przeciwbakteryjne

Neutrofile mają zdolność poruszania się i fagocytozy. Uczestniczą w licznych procesach fizjologicznych organizmu, ale najważniejszy jest ich udział w odporności nieswoistej. Stanowią pierwszą linię obrony w stosunku do obcych dla organizmu czynników, zwłaszcza bakterii. W stanie spoczynku są mało aktywne metabolicznie, a ich enzymy lizosomalne biorą udział głównie w degradacji zużytych białek cytozolowych w fagolizosomach. W odpowiedzi na bodziec stymulujący, neutrofile zmieniają swoje właściwości reologiczne, przystosowują się do ukierunkowanego ruchu oraz interakcji z innymi komórkami.

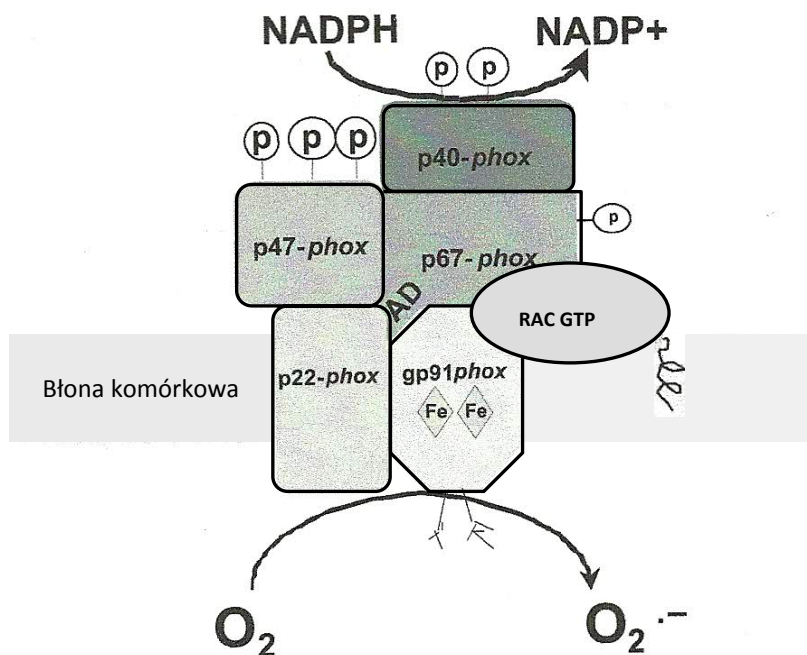
Nadmierna aktywacja neutrofilów może mieć działanie niepożądane, powodujące rozległe uszkodzenia tkankowe, których powodem jest uwolnienie przez te komórki wolnych rodników i proteaz.

2.3.1. Reaktywne form tlenu wytwarzane przez aktywowane neutrofile

W wyniku aktywacji neutrofilów dochodzi do ich degranulacji i uwolnienia proteaz z ziarnistości cytoplazmatycznych oraz znacznych ilości RFT. Wydzielone związki pełnią funkcje modulatorów reakcji zapalnej a ponadto umożliwiają przechodzenie neutrofilów przez ścianę naczynia krwionośnego i skuteczną eliminację czynnika infekcyjnego lub innego kompleksu antygen-przeciwciała. Mimo, że proteazy oraz RFT są niezbędnymi narzędziami w usuwaniu stanu zapalnego i jego czynników sprawczych, ich niekontrolowane uwalnianie może prowadzić do uszkodzenia białek, lipidów i kwasów nukleinowych, w rezultacie powodując niekorzystne zmiany w obrębie komórek, a nawet całych tkanek i narządów gospodarza.

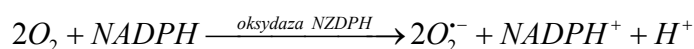
RFT wytwarzane są przez neutrofile w procesie zwanym „wybuchem tlenowym”, który charakteryzuje się zwiększoną konsumpcją tlenu i glukozy przez komórki [71]. Wśród RFT, uwalnianych przez neutrofile, dominuje anionorodnik nadadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$) wytwarzany przez oksydazę NADPH, która w stanie spoczynku występuje w formie nieaktywnych podjednostek zlokalizowanych zarówno w cytoplazmie jak i błonie komórkowej.

W obrębie błony komórkowej znajduje się cytochrom b558 składający się z dwóch podjednostek gp91-phox (*phox-phagocyte oxydase*) i p22-phox, natomiast w cytozolu obecne są p47-phox, p67-phox, p40-phox oraz białko rac2 o aktywności GTPazy (Rycina 5) [72]. Pobudzenie komórki powoduje przemieszczenie się podjednostek cytozolowych do błony komórkowej, gdzie następuje ich połączenie w wieloskładnikowy kompleks wykazujący aktywność oksydazy. Pełna aktywacja oksydazy NADPH następuje w wyniku fosforylacji jednostek p47-phox, p67-phox, p40-phox oraz p22-phox [73].



Rycina 5. Struktura i udział oksydazy NADPH w generowaniu $O_2^{\bullet -}$ [72].

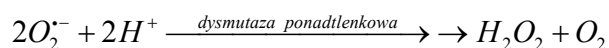
Kompleks uzyskuje zdolność wytwarzania $O_2^{\bullet -}$ w reakcji jednoelektronowej redukcji tlenu, w której NADPH jest donorem elektronu (Rycina 6).



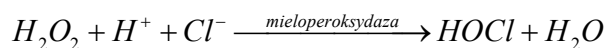
Rycina 6

Anionorodnik ponadtlenkowy wydzielany jest do wnętrza fagolizosomu lub do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, gdzie ulega przemianom do bardziej reaktywnych metabolitów.

Na skutek dysmutacji $O_2^{\bullet -}$ przekształca się do nadtlenu wodoru (H_2O_2) (Rycina 7), który pod wpływem mieloperoksydazy znajdującej się w ziarnistościach azurofilnych i w obecności jonów halogenkowych (np. Cl^-) ulega przemianie do kwasu podchlorawego ($HOCl$) (Rycina 8).



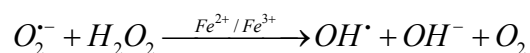
Rycina 7



Rycina 8

Kwas podchloraowy należy do najsilniejszych fizjologicznych, nierodnikowych oksydantów, odpowiedzialnych za utlenianie grup tiolowych, tioestrowych, tryptofanowych i ε – aminowych białek. Reaguje również z resztami nienasyconych kwasów tłuszczowych fosfolipidów i z cholesterolem [74].

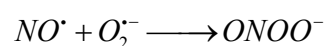
W reakcji Habera-Weissa, katalizowanej przez jony metali przejściowych np. jony żelaza, $O_2^{\cdot-}$ i H_2O_2 mogą tworzyć silnie reaktywny rodnik hydroksylowy ($\cdot OH$) (Rycina 9).



Rycina 9

Rodnik hydroksylowy, zależnie jedynie od szybkości swojej dyfuzji, utlenia niemal wszystkie ważne biologicznie związki występujące w organizmie.

Ponadto $O_2^{\cdot-}$ w reakcje z tlenkiem azotu, wytwarzanym przez syntazę tlenku azotu komórek śródbłonna jak i samych neutrofilów, odpowiada za powstawanie nadtlenoazotynów (Rycina 10).



Rycina 10

Nadtlenoazotyny należą do reaktywnych form azotu (RFN) i odpowiadają przede wszystkim za proces nitrozytacji i nitrowania białek oraz peroksydację lipidów [74,75].

2.3.2. Udział reaktywnych form tlenu w uszkodzeniu śródbłonna

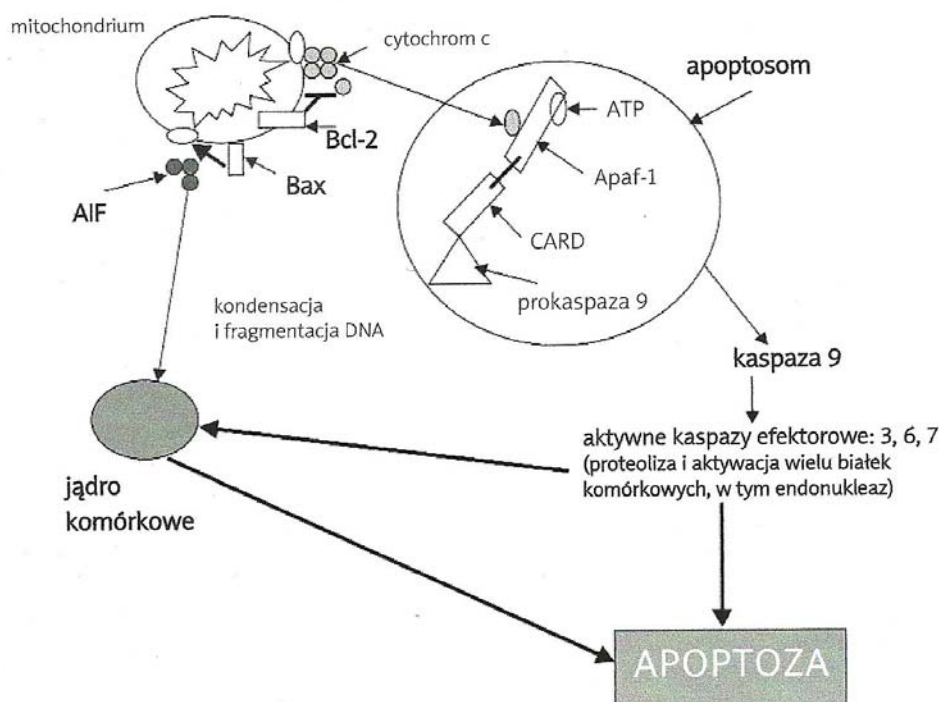
Wiele badań *in vitro* wskazuje, że w obecności RFT dochodzi do uszkodzeń i zmian w morfologii komórek śródbłonna [76,77,78]. W 1978 Sacks i in. przeprowadzili eksperyment, w którym znakowane radioaktywnie ludzkie komórki śródbłonna inkubowali z aktywowanymi neutrofilami, obserwując po pewnym czasie wzrost poziomu radioaktywnego chromu w medium hodowlanym [79]. Próbując wyjaśnić mechanizm odpowiedzialny za destrukcję komórek śródbłonna, do medium hodowlanego dodano wybrane enzymy o właściwościach antyoksydacyjnych, takie jak katalaza i dysmutaza ponadtlenkowa, które skutecznie ograniczyły wpływ radioaktywnego chromu (^{51}Cr). Wyniki tego eksperymentu potwierdziły, że czynnikami odpowiedzialnymi za uszkodzenie śródbłonna są uwalniane przez neutrofile RFT.

W dalszych badaniach wykazano, że w zależności od dawki i czasu ekspozycji, RFT wywołują apoptozę lub nekrozę komórek śródbłonka [76,77,78]. Obecny stan wiedzy pozwala przypuszczać, że apoptoza jest efektem różnych szlaków sygnałowych, uruchamianych w komórce pod wpływem RFT, natomiast proces nekrozy spowodowany jest dezintegracją błony komórkowej w wyniku bezpośredniego działania RFT na komórki śródbłonka. Oba procesy różnią się wywoływanyymi zmianami morfologicznymi i biochemicznymi w obrębie komórek, które scharakteryzowano w Tabeli 4 [80].

Tabela 4. Zmiany biochemiczne i morfologiczne w komórkach wywołane apoptozą lub nekrozą [80].

	Apoptoza	Nekroza
Sposób eliminacji komórki	programowana, genetycznie kontrolowana śmierć komórki	chaotyczny model śmierci
Czas	śmierć komórki jest procesem wieloetapowym, ale szybko zachodzącym	śmierć komórki w bardzo krótkim czasie (kilka minut)
Nakład energii	proces czynny, endoenergetyczny	nie wymaga nakładu energii
Przebieg procesu	obkurczenie jądra i całej komórki, zagęszczenie i fragmentacja DNA, pofałdowanie błony komórkowej, powstawanie i uwalnianie ciałek apoptycznych (zachowanie ciągłości błony)	utrata integralności błony cytoplazmatycznej, pęcznienie komórki i powstanie jądra pyknotycznego, obrzęk mitochondriów, uwolnienie zawartości komórek do otaczającego środowiska pozakomórkowego
Wpływ na otaczające komórki	ciałka apoptotyczne są szybko fagocytowane przez makrofagi i sąsiadujące komórki	obecność produktów rozpadu komórki może uszkadzać sąsiadujące komórki
Odpowiedź organizmu	nie dochodzi do uruchomienia mechanizmów odpowiedzi zapalnej	wywołanie reakcji obronnej organizmu z wyzwoleniem reakcji zapalnej

Prawdopodobnie RFT uruchamiają szlak apoptozy w komórkach śródbłonka poprzez aktywację czynnika jądrowego kappa (NF- κ B) [81]. W wyniku indukcji NF- κ B dochodzi do spadku ekspresji białka antyapoptycznego Bcl-2, przy jednoczesnej wzmożonej transkrypcji genu Bax, kodującego białko proapoptotyczne o tej samej nazwie. Przesunięcie równowagi w stronę białek promujących apoptozę doprowadza do otwarcia kanałów w obrębie zewnętrznej błony mitochondrialnej i wypływu cytochromu c z przestrzeni międzybłonowej mitochondrium do cytoplazmy. W obrębie cytozolu dochodzi do utworzenia apoptosomu i aktywacji kaspaz, które odpowiadają za proteolizę białek komórkowych i fragmentację DNA (Rycina 11).



Rycina 11. Proces formowania się apoptosomu. AIF- czynnik indukujący apoptozę (*apoptosis inducing factor*), CARD-domena werbunku kaspaz (*caspase and RIP adapter with death domain*), Apaf-1- czynnik 1 aktywujący proteazę (*apoptosis protease activating factor-1*) [80].

Jak wynika z badań Bresgena i in., RFT wykazują efekt genotoksyczny wobec komórek śródbłonna, przejawiający się zwiększaniem częstości występowania aberracji chromosomowych oraz pęknięć nici DNA [82]. Istnieje więc przypuszczenie, że obserwowane zmiany w obrębie materiału genetycznego mogą stanowić sygnał do uruchomienia opisanych powyżej mechanizmów apoptozy. Ponadto apoptoza komórek śródbłonna może zostać zainicjowana także na skutek zaburzeń w ich kontakcie z błoną podstawną. W badaniach Warrena i in. wykazano, że w zjawisku tym kluczową rolę odgrywają aktywowane pod wpływem RFT metaloproteinazy, zwłaszcza MMP-9, która poprzez degradację komponentów macierzy zewnątrzkomórkowej powoduje odłączanie się komórek śródbłonna od błony podstawnej i inicjację ich programowanej śmierci [78].

RFT mogą także sprzyjać adhezji leukocytów do powierzchni śródbłonna i w ten sposób pośrednio wpływać na jego uszkodzenia. Prawdopodobnie w obecności RFT dochodzi do wzmożonej ekspresji na powierzchni komórek śródbłonna, molekuł adhezyjnych, takich jak selektyna P czy PAF, uczestniczących w interakcji pomiędzy śródbłonkiem a krążącymi neutrofilami [83]. Zgodnie z mechanizmem opisanym w podrozdziale 2.2.3, bezpośredni kontakt neutrofilów ze śródbłonkiem, powoduje aktywację tych pierwszych i towarzyszące temu uwolnienie do przestrzeni zewnątrzkomórkowej kolejnych RFT oraz proteaz.

2.3.3. Wybrane wykładniki stresu oksydacyjnego

Stres oksydacyjny to stan w którym dochodzi do zwiększonej aktywności wolnych rodników. Rozwija się on w następstwie zaburzeń równowagi pomiędzy produkcją a usuwaniem toksycznych pochodnych tlenu. Zaburzenie równowagi pomiędzy układem utleniaczy a antyutleniaczy może prowadzić do nieodwracalnych zmian w organizmie oraz przyczyniać się do uszkodzenia tkanek w różnych stanach chorobowych.

2.3.3.1. Aldehyd dimalonowy (MDA)

Bezpośrednim przejawem niekorzystnych zmian wywołanych działaniem RFT jest zjawisko peroksydacji lipidów, prowadzące w konsekwencji do uszkodzenia błon biologicznych i inaktywacji białek enzymatycznych. Do oceny aktywności RFT, a tym samym stopnia zaawansowania zachodzących procesów peroksydacji lipidów, wykorzystuje się oznaczenie stężenia dialdehydu malonowego (MDA) w płynach ustrojowych lub homogenatach tkankowych.

W wyniku procesu peroksydacji lipidów powstają krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe, alkohole, cykliczne endonadtlenki oraz aldehydy, w tym MDA. Wytwarzany w procesie peroksydacji lipidów MDA wykazuje dużą reaktywność względem białek i kwasów nukleinowych. Z miejsc, w których powstaje, łatwo przenika do odległych tkanek i tam, dzięki możliwości tworzenia wiązań kowalencyjnych z biomolekułami, może modyfikować ich strukturę i zmieniać ich właściwości.

Produkty reakcji MDA z kwasem tiobarbiturowym (TBA) określa się jako produkty TBA-reaktywne i uważa za marker nieenzymatycznego procesu peroksydacji lipidów [84].

2.3.3.2. Całkowita zdolność antyoksydacyjna (CZA)

Innym nieenzymatycznym markerem antyoksydacyjnym jest ocena całkowitej zdolności antyoksydacyjnej (CZA), która odzwierciedla całkowitą pojemność bariery antyoksydacyjnej danej komórki, tkanki, narządu czy płynu ciała. Na wartość CZA zasadniczy wpływ mają enzymy antyoksydacyjne, jak również stężenie niskocząsteczkowych antyoksydantów. Wydaje się, że wartość tego parametru może być miarą równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej organizmu oraz wskaźnikiem wyczerpania rezerw antyoksydacyjnych, któ-

re obserwuje się w przebiegu wielu chorób. Istnieje 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 [85].

2.3.3.3. Kwas moczowy

Kwas moczowy jest produktem degradacji puryn, należącym do niskocząsteczkowych, rozpuszczalnych w wodzie antyoksydantów organizmu człowieka. Ze względu na silne właściwości redukujące jego udział w całkowitym potencjale antyoksydacyjnym krwi wynosi ponad 60% [86]. Kwas moczowy posiada zdolność eliminowania rodnika hydroksylowego, nadtlenków lipidowych i tlenu singletowego. W reakcjach z wolnymi rodnikami zredukowana postać kwasu moczowego przechodzi w utlenioną określaną jako kwas allantoinowy. Ocena molowego stosunku stężenia kwasu moczowego do allantoiny przeprowadzana we krwi oraz innych płynach ciała uznawana jest za czuły marker stresu oksydacyjnego. Inną ważną właściwością kwasu moczowego oprócz zmiatania wolnych rodników jest zapobieganie ich powstawaniu poprzez chelatowanie jonów metali przejściowych np. jonów żelaza. W ten sposób kwas moczowy chroni inne antyoksydanta np. kwas askorbinowy przed utratą ich właściwości biologicznych [87].

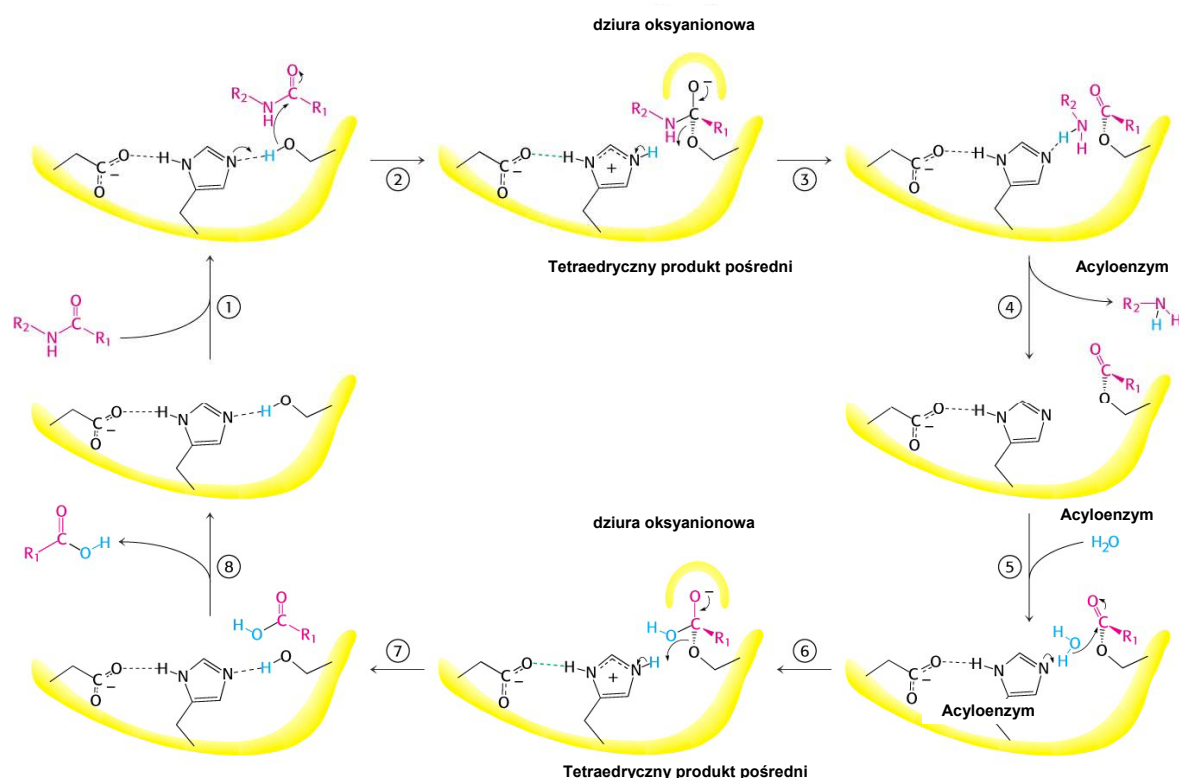
2.3.4. Neutrofilowa elastaza – struktura i funkcje

W wyniku aktywacji, neutrofile uwalniają nie tylko RFT, ale także enzymy ziarnistości cytoplazmatycznych, w tym elastazę (NE). Enzym ten należy do proteaz serynowych, które w neutralnym pH osiągają optimum swojej aktywności. Proces syntezy NE rozpoczyna się w mieloblastach, a kończy się na poziomie promielocyta [88]. Dojrzałe neutrofile nie wykazują zdolności syntezy NE *de novo*, a ich rola ogranicza się jedynie do magazynowania aktywnej formy enzymu i jego uwalniania z ziarnistości azurofilnych pod wpływem określonego bodźca. Czynnikiem stymulującym uwalnianie NE są niektóre cytokiny i chemoatraktanty takie jak TNF- α , interleukina 8 (IL-8), C5a, fMLP (Nformylometionylleucynofenyloalanina) oraz bakteryjny lipopolisacharyd (LPS) [89,90,91].

NE (E.C.3.4.21.37) składa się z pojedynczego łańcucha polipeptydowego, zawierającego 219 reszt aminokwasowych, stabilizowanego przez 4 mostki disulfidowe. Do łańcucha

polipeptydowego przy udziale reszt asparaginianowych w pozycji 95 i 144, przyłączone są dwa oligosacharydy [92,93]. W strukturze NE wyodrębnić można obszar wysoce konserwatywny, charakterystyczny dla wszystkich proteaz serynowych, tzw. triadę katalityczną, w skład której wchodzi trzy reszty aminokwasowe His-41, Asp-88 i Ser-173. NE odpowiada za degradację wiązania peptydowego, w skład którego wchodzi alifatyczny, niepolarny aminokwas o niskiej masie molowej, alanina lub walina [94,95].

Hydroliza wiązania peptydowego z udziałem NE rozpoczyna się od nukleofilowego ataku atomu tlenu grupy –OH seryny 173 na karbonylowy atom węgla hydrolizowanego wiązania peptydowego (Rycina 12).



Rycina 12. Hydroliza wiązania peptydowego z udziałem proteazy serynowej (zmodyfikowane według [96]).

Na tym etapie powstaje tetraedryczny związek pośredni z pojedynczym wiązaniem między atomem węgla i tlenu w grupie karbonylowej. Ponadto atom wodoru z seryny zostaje przeniesiony na resztę histydyny, ta z kolei przekazuje proton na atom azotu degradowanego wiązania peptydowego, które w rezultacie ulega hydrolizie. Następuje odłączenie aminowej części substratu i powstanie przejściowego kompleksu acyloenzymu. Ten proces kończy pierwszy etap hydrolizy peptydu zwany acylacją. W drugim etapie zwanym deacylacją, miejsce aminowej części substratu zajmuje cząsteczka wody. Reszta histydyny 41 odciąga proton

z cząsteczki wody, a powstały jon OH^- atakuje natychmiast karbonylowy atom węgla grupy acylowej. Podobnie jak w acylacji powstaje przejściowy tetraedryczny związek pośredni. Drugi etap kończy przeniesienie protonu z histydyny 41 na atom tlenu seryny 173, czemu towarzyszy uwolnienie kwasowej części substratu.

NE jest jednym z aktywnych składników systemu fagocytarnego neutrofilów. Bierze udział w degradacji zewnątrz- i wewnątrzkomórkowego materiału pobranego w procesie fagocytozy. Ze względu na fakt, że NE wykazuje zdolność proteolizy większości białek macierzy zewnątrzkomórkowej, takich jak elastyna, kolagen, fibronektyna i proteoglikany, aktywnie uczestniczy w procesach przebudowy i naprawy tkanek własnych gospodarza [97]. Jako związek o właściwościach antybakteryjnych bierze udział w odpowiedzi immunologicznej wywołanej różnymi patogenami [98,99]. Dowiedziono, że NE może być także negatywnym modulatorem odpowiedzi immunologicznej, ze względu na zdolność degradacji immunoglobulin oraz niektórych cytokin prozapalnych takich jak $\text{TNF-}\alpha$, interleukina 2 (IL-2) oraz interleukina 6 (IL-6). [100,101,102]. Ponadto NE bierze udział w unieczynnieniu niektórych czynników krzepnięcia krwi oraz inhibitorów proteaz [100].

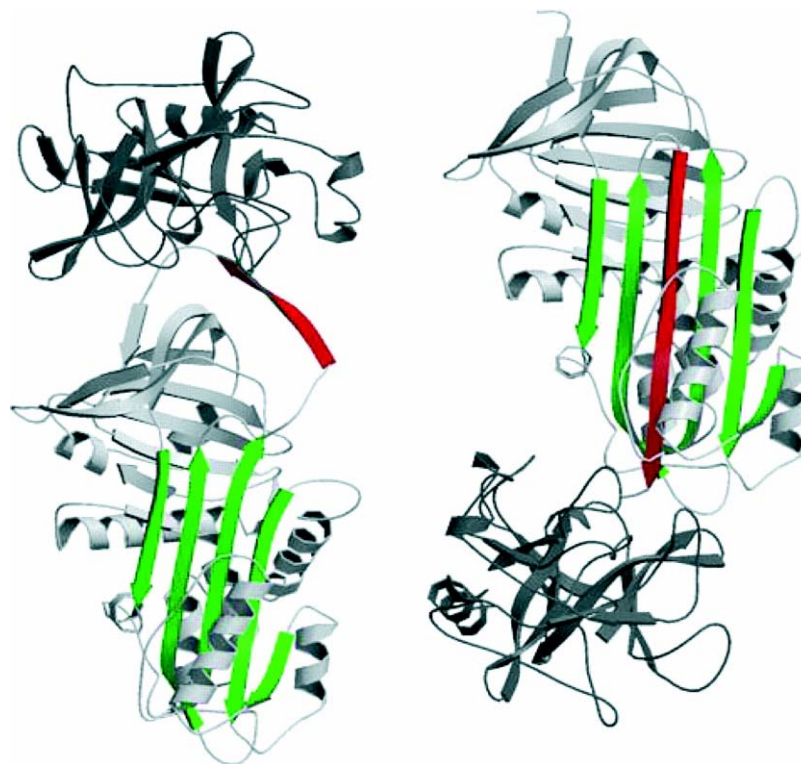
Za fizjologiczną regulację aktywności NE odpowiedzialne są jej endogenne białkowe inhibitory występujące w surowicy krwi i innych płynach ciała: alfa-1-antytrypsyna, alfa-2-makroglobulina, wydzielniczy inhibitor leukocytarnej elastazy (SLPI), elafina. W prawidłowych warunkach 90% całkowitej puli NE pozostaje w kompleksie ze swoim głównym inhibitorem – alfa-1-antytrypsyną, co przeciwdziała niekontrolowanemu trawieniu białek gospodarza [103]. Jednak w stanach patologicznych, w których następuje nadmierne uwalnianie enzymu lub obniżenie stężenia jego aktywnych inhibitorów, może pojawić się pula wolnej, niezwiązanej NE o destrukcyjnych właściwościach wobec otaczających tkanek.

2.3.4.1. Alfa-1-antytrypsyna jako inhibitor neutrofilowej elastazy

Alfa-1-antytrypsyna (AAT) to glikoproteina o masie cząsteczkowej około 52 kDa, zbudowana z pojedynczego łańcucha polipeptydowego, liczącego 394 reszty aminokwasowe, do którego w pozycji 46, 83 i 247 przyłączone są trzy podstawniki cukrowe [104]. Stanowi główny składnik frakcji $\alpha 1$ -globulinowej ludzkiego osocza, pełniąc w nim funkcje najważniejszego inhibitora proteaz serynowych: elastazy, katepsyny G i proteinazy 3, z którymi łączy się w stosunku stechiometrycznym 1:1. Struktura przestrzenna AAT oparta jest na trzech β -pofałdowaniach i dziewięciu α -helisach. Blisko karboksylowego końca białka występuje domena układająca się w strukturę reaktywnej pętli o giętkiej strukturze, zawierająca specy-

ficzną sekwencję czterech aminokwasów Pro-Met-Ser-Ile [105]. Obecna w tej sekwencji Met-358 jest bezpośrednio odpowiedzialna za inaktywację NE.

Proces inhibicji NE przy udziale AAT zachodzi w bardzo specyficzny sposób. W pierwszym etapie reaktywna pętla AAT rozpoznawana jest przez NE. Następuje zakotwiczenie pętli w centrum aktywnym enzymu, czemu towarzyszy jednoczesna degradacja przez NE wiązania peptydowego w obrębie AAT między kluczową Met-358 a sąsiadującą z nią seryną. Zdegradowana pętla AAT ulega insercji między trzy β -pofałdowania AAT, a zasocjowana z nią NE, ślizgając się po powierzchni inhibitora, zostaje przeniesiona na przeciwstawnym końcu AAT. Proces ten powoduje zmianę konformacyjną AAT, która nie może zostać strawiona przez NE a jedynie rozpoznana przez receptory na powierzchni hepatocytów, które w ten sposób eliminują z krwioobiegu kompleksy NE-AAT (Rycina 13) [104].



Rycina 13. Inhibicja NE przy udziale AAT. NE (kolor szary), β -pofałdowania AAT (kolor zielony), aktywna pętla AAT (kolor czerwony) [104].

Gen kodujący AAT, usytuowany na długim ramieniu chromosomu 14, składa się z siedmiu eksonów oraz sześciu intronów. Gen koduje łańcuch polipeptydowy o długości 418 aminokwasów, w obrębie którego znajduje się peptyd sygnałowy odcinany podczas transportu białka do retikulum endoplazmatycznego hepatocytów. W siateczce endoplazmatycznej zachodzi również proces potranslacyjnego wbudowania oligosacharydów w cząsteczkę AAT

[106]. Z uwagi na fakt, że gen dla AAT wykazuje wysoki polimorfizm, możliwe jest występowanie różnych fenotypów tego białka. Fenotypowanie odbywa się na podstawie punktu izoelektrycznego i szybkości migracji na żelu poliakrylamidowym. W wyniku rozdziału elektroforetycznego otrzymuje się cztery frakcje: M (*medium*), S (*slow*), F (*fast*) i Z (*very slow*) [107].

Wyróżnia się trzy podstawowe warianty AAT w zależności od aktywności inhibitorowej i stężenia w surowicy krwi. Pierwszy z nich to wariant prawidłowy, występujący u ponad 90% populacji, reprezentowany przez allel M i jego podtypy M1-M4. Odpowiada on genotypom homozygotycznym MM i przejawia się fenotypem PiMM. W tym wariacie stężenie AAT w surowicy waha się od 20 do 48 $\mu\text{mol/l}$, a inhibicja NE przebiega prawidłowo. Wariant niedoborowy, reprezentowany przez allele S i Z, odpowiada genotypom homozygotycznym SS oraz ZZ i przejawia się fenotypami PiSS i PiZZ. Częstość ich występowania wynosi 2-4% dla PiSS i 1-2% dla PiZZ, a stężenie AAT w surowicy waha się odpowiednio od 13 do 33 $\mu\text{mol/l}$ oraz od 2,5 do 7 $\mu\text{mol/l}$. U homozygot SS, podobnie jak w przypadku heterozygot MS i MZ, stężenie AAT jest różne, ale zwykle nie spada poniżej 50%, dlatego inhibicja NE przebiega prawidłowo. U homozygot ZZ, ze względu na niskie stężenie AAT, jej zdolności inhibitorowe są znacznie upośledzone.

W kolejnym wariacie określanym jako null, biosynteza AAT nie występuje w ogóle lub syntetyzowane jest szczątkowe białko ulegające degradacji. Jest to w większości przypadków wynikiem mutacji prowadzącej do powstania kodonu stop.

Oprócz trzech głównych wariantów opisanych powyżej, w populacji ludzkiej z mniejszą częstością występuje także wariant dysfunkcji, charakteryzujący się zaburzeniami w funkcji inhibitorowej AAT, przy jej prawidłowym stężeniu w surowicy krwi. Obserwowany efekt jest prawdopodobnie następstwem mutacji punktowej, w wyniku której reszta metioniny obecna w pozycji 358, kluczowa dla aktywności inhibitorowej białka, zostaje zamieniona na argininę [107,108].

2.3.4.2. Zaburzenia w równowadze elastaza – alfa-1-antytrypsyna

Z badań klinicznych wynika, że zaburzenia w równowadze między NE a jej głównym inhibitorem, AAT leżą u podłoża wielu chorób. Dowiedziono, że genetyczne przyczyny niedoboru lub dysfunkcji AAT, opisane w podrozdziale 2.3.4.1, odpowiadają za występowanie rozedmy płuc, przewlekłej choroby obturacyjnej płuc, marskości wątroby oraz rozwój głębokiego zapalenia tkanki podskórnej. Za obciążony największym ryzykiem powikłań uznaje się

genotyp ZZ, który warunkuje nie tylko obniżone stężenie AAT w surowicy krwi, ale także gromadzenie się jej polimerów w hepatocytach, skutkujące uszkodzeniami wątroby [108].

Oprócz genetycznych przyczyn zachwiania równowagi proteazowo – antyproteazowej, istnieją inne znacznie częściej występujące mechanizmy sprzyjające niekontrolowanej aktywności NE. Jednym z nich jest masywne uwolnienie enzymu przez pobudzone stanem zapalnym neutrofile i osiągnięcie stężenia znacznie przewyższającego zdolności inhibitorowe AAT [109]. Taką sytuację stwierdza się u pacjentów z tętniakami mózgu, w surowicy których obserwuje się wyższe, w porównaniu z osobami zdrowymi, stężenie NE przy jednoczesnym braku statystycznej różnicy w stężeniu AAT [10]. Mimo, że poziom AAT u pacjentów z tętniakami pozostaje prawidłowy, rosnące stężenie NE prowadzi do pojawienia się nierównowagi proteazowo-antyproteazowej, sprzyjającej destrukcyjnym właściwościom enzymu. Z kolei w badaniach Vignola i in., prowadzonych w grupie pacjentów cierpiących na astmę i chroniczne zapalenie oskrzeli wykazano, że wzrost stężenia NE może uruchamiać mechanizm kompensacyjny polegający na jednoczesnym wzroście stężenia AAT. Przy czym okazuje się on nieskuteczny, o czym świadczy wysoka aktywność NE obserwowana w ślinie i płwocinie chorych [110].

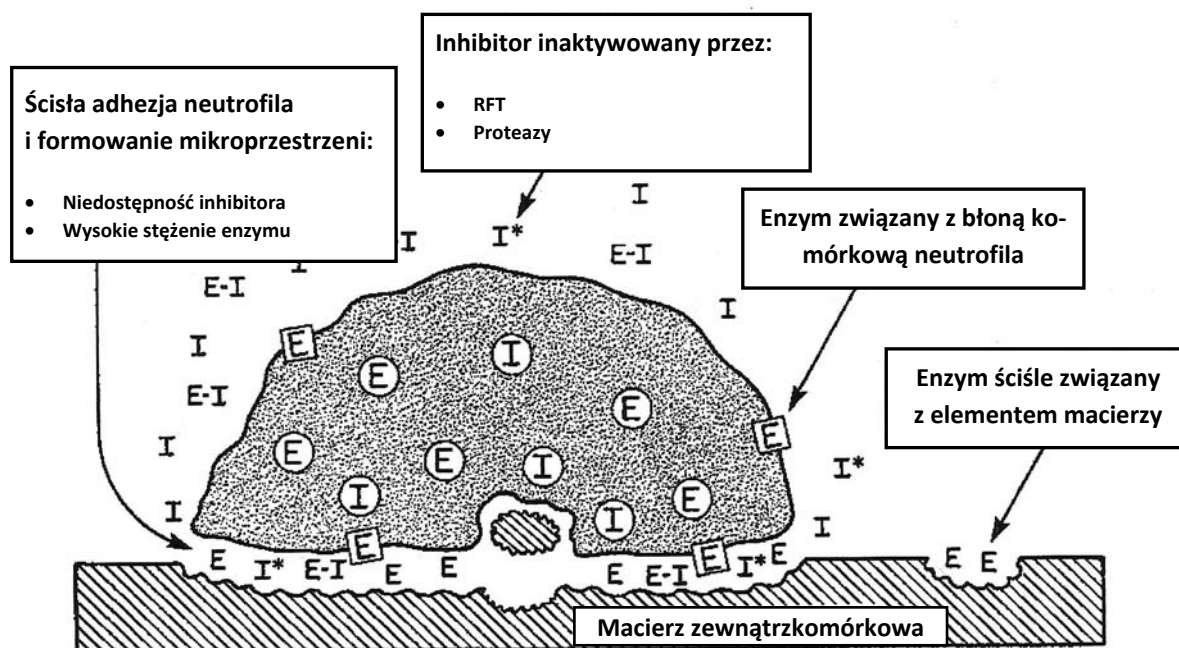
Prawidłowe stężenie AAT nie gwarantuje skutecznej inaktywacji NE, ponieważ oprócz opisanych wcześniej niedoborów ilościowych inhibitora może także wystąpić jego deficyt czynnościowy [109] (Rycina 13). Głównymi czynnikami inaktywującymi AAT są RFT, utleniające kluczową dla właściwości inhibitorowych metioninę w pozycji 351 lub 358 łańcucha polipeptydowego [13]. Ueda i in. wykorzystując jako pierwsi przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko oksydacyjnie zmodyfikowanej AAT, wykryli jej wysokie stężenie w surowicy pacjentów z reumatycznym zapaleniem stawów oraz innymi schorzeniami o podłożu zapalnym takimi jak sepsa, nowotwory, zawał serca, zapalenie płuc [111]. Autorzy pracy stwierdzili, że głównym źródłem RFT w tych jednostkach chorobowych są prawdopodobnie aktywowane stanem zapalnym neutrofile. Wykorzystując tę samą metodę detekcji, utlenioną AAT wykryto także we krwi osób poddawanych regularnej hemodializie, u których jej stężenie korelowało dodatnio ze wskaźnikiem grubości kompleksu *intima-media* tętnic szyjnych (*carotid intima-media thickness – CIMT*) [112]. Wyniki powyższych badań sugerują, że AAT jest silnie podatna na działanie RFT, przez co jej zdolności inhibitorowe w stanach patologicznych, którym towarzyszy nasilony stres oksydacyjny, mogą ulec znacznemu osłabieniu.

Innym źródłem RFT, o destrukcyjnych wobec AAT właściwościach, jest dym papierosowy. Wykazano, że ekspozycja na dym papierosowy powoduje wzrost stężenia oksydacyjnie zmodyfikowanej AAT w popłuczynach oskrzelikowo-pęcherzykowych (BAL) i homogena-

tach płucnych zwierząt eksperymentalnych [113]. Prawdopodobnie wywołana dymem papierosowym oksydacyjna modyfikacja AAT odpowiada za obserwowany u palaczy spadek jej aktywności inhibitorowej wobec NE [114,115]. Konsekwencją jest wzrost aktywności NE we krwi obwodowej i innych płynach ciała osób palących, sprzyjający rozwojowi chorób układu oddechowego takich jak rozedma czy obturacyjna choroba płuc [116,117].

Kolejnym powodem dysfunkcji AAT może być jej proteolityczna degradacja katalizowana przez niektóre metaloproteinazy: MMP-1, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9 [118,119,120] (Rycina 13). Wymienione enzymy dokonują cięcia proteolitycznego pomiędzy dwoma resztami aminokwasowymi Phe352-Leu353 lub Pro357-Met358 w łańcuchu polipeptydowym powodując utratę właściwości inhibitorowych AAT. Ponadto sama NE może powodować proteolityczną inaktywację swojego inhibitora [121]. Obecność proteolitycznie zmodyfikowanych fragmentów AAT wykazano w próbach BAL pacjentów cierpiących na rozstrzenie oskrzeli, u których jednocześnie stwierdzono wysoką aktywność NE [122].

Oprócz wyżej opisanych stanów patologicznych, istnieją także stany fizjologiczne, w których przy prawidłowym stężeniu biologicznie aktywnej AAT, ujawnia się proteolityczna aktywność NE (Rycina 14). Ma to miejsce w sytuacji ścisłej adhezji neutrofilem do powierzchni białek macierzy zewnątrzkomórkowej [123]. Proces ten powoduje tworzenie się mikroprze-strzeni pomiędzy neutrofilem a białkiem macierzy, niedostępnej dla inhibitorów proteaz ze względu na ich dużą masę cząsteczkową. W tym mikrośrodowisku o wysokiej koncentracji NE i bez obecności inhibitorów zachodzi proces trawienia białek. Wykazano także, że sama NE związana ściśle ze swoim substratem – elastyną, jest oporna na działanie AAT [124].



Rycina 14. Mechanizmy sprzyjające proteolitycznej aktywności NE w obecności cząsteczek inhibitora. E-enzym, I-inhibitor, E-I-nieaktywny kompleks enzym-inhibitor, I*-inaktywowany inhibitor (zmodyfikowane według [109]).

Oprócz NE wydzielanej do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, istnieje również forma błonowa enzymu, uczestnicząca w procesie aktywnego przechodzenia neutrofilów przez ścianę naczynia krwionośnego, która pozostaje niewrażliwa wobec swoich naturalnych inhibitorów [125,126] (Rycina 14). Mechanizm tego zjawiska jest do tej pory niewyjaśniony, ale prawdopodobnie związany jest z zawadą steryczną, która uniemożliwia efektywne łączenie się wysokocząsteczkowych inhibitorów z NE w obrębie błony komórkowej.

2.3.5. Udział elastazy w uszkodzeniu śródbłonna

Przeprowadzone 1985 roku badania Smedley'a i in. dowiodły, że udział NE w uszkodzeniu śródbłonna może być istotniejszy niż RFT [127]. Autorzy wykazali, że 4 godzinna inkubacja neutrofilów z radioaktywnie znakowanymi komórkami śródbłonna, zwiększa wpływ radioaktywnego indu (^{111}In) i powoduje wzrost radioaktywności medium hodowlanego. Próbuąc zidentyfikować czynniki odpowiedzialne za destrukcję śródbłonna, te same komórki poddano inkubacji osobno z NE oraz nadtlenkiem wodoru obserwując porównywalny z początkiem eksperymentu wzrost radioaktywności jedynie w przypadku wykorzystania proteazy. Ostatecznie udział NE w destrukcji śródbłonna potwierdziło wykorzystanie jej syn-

tetycznych inhibitorów, które zahamowały wpływ radioaktywnego ^{111}In . Fakt, że poziom radioaktywnego ^{111}In w medium hodowlanym korelował dodatnio ze stężeniem wewnątrzkomórkowej dehydrogenazy mleczanowej sugerował, że głównym mechanizmem odpowiedzialnym za uszkodzenia komórek śródbłonka w obecności NE jest ich cytoliza.

Kolejne badania dowiodły, że nie jest to jedyny mechanizm destrukcyjnego wpływu NE na śródbłonek. Ballieux i in. wykazali, że krótsza inkubacja NE z kulturą ludzkich komórek śródbłonka tylko w 19% odpowiada za ich cytolizę i aż w 60% powoduje ich odłączanie się od monowarstwy komórkowej [8]. Utrata kontaktu komórek śródbłonka ze składnikami błony podstawnej indukuje ich apoptozę, prawdopodobnie na skutek zaburzeń w syntezie DNA i transkrypcji RNA [128]. Potwierdziły to badania Yang i in., którzy w obecności NE o różnych stężeniach zaobserwowali biochemiczne i morfologiczne zmiany komórek śródbłonka, charakterystyczne dla procesu apoptozy, a ponadto odnotowali dodatnią korelację między procentem apoptotycznych komórek a liczbą komórek ulegających odłączeniu od ścianek naczynia hodowlanego [7]. Prawdopodobnie udział NE w odłączaniu komórek od monowarstwy śródbłonka wynika ze zdolności tego enzymu do degradacji szerokiego zakresu białek macierzy zewnątrzkomórkowej.

Dowiedziano, że NE powoduje wzrost przepuszczalności śródbłonka nie tylko poprzez cytolizę i odłączanie komórek od błony podstawnej, ale także na skutek degradacji VE kadheryny, ważnego składnika śródbłonkowych połączeń międzykomórkowych [129]. W badaniach Cardena i in. degradacji VE-kadheryny w obecności neutrofilów, a następnie samej NE, towarzyszyło dodatkowo pojawienie się jej rozpuszczalnej frakcji (sVE-kadheryny) w medium hodowlanym [9].

Oprócz bezpośredniego, niekorzystnego wpływu NE na śródbłonek naczyń, jej działanie może mieć charakter pośredni, polegający na zaburzeniu ustrojowej równowagi proteazowo-antyproteazowej. Wiele badań wskazuje, że NE odpowiada za proteolizę nieaktywnych zymogenów MMP-2, MMP-3, MMP-9 [130,131,132] do krótszych fragmentów o określonej aktywności enzymatycznej. Jednocześnie poprzez proteolizę NE inaktywuje tkankowe inhibitory metaloproteinaz przesuując stan równowagi na korzyść enzymów, które w tych okolicznościach mogą niszczyć tkanki gospodarza, w tym także śródbłonek wyściełający naczynia krwionośne [133].

3. Cel pracy

Wiele badań wskazuje na udział NE w proteolitycznej degradacji ściany żyłnej w przebiegu PNŻ. Jednak do tej pory nie określono faktycznej relacji między enzymem a jego inhibitorem oraz nie ustalono roli stresu oksydacyjnego w kształtowaniu się ich wzajemnych stosunków.

Celem podjętych w przedstawionej pracy badań była:

- 1) Ocena parametrów równowagi NE-AAT, dokonana poprzez pomiar stężenia NE, aktywności elastolitycznej oraz aktywności AAT w surowicy/osoczu pacjentów z PNŻ,
- 2) Ocena wykładników równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjną, realizowana poprzez oznaczenie wybranych parametrów stresu oksydacyjnego w surowicy/osoczu pacjentów z PNŻ,
- 3) Ocena parametrów równowagi NE-AAT oraz stresu oksydacyjnego w zależności od nasilenia choroby oraz czasu jej trwania,
- 4) Zbadanie współzależności między parametrami równowagi NE-AAT oraz stresu oksydacyjnego a wybranymi markerami uszkodzenia śródbłonka - rozpuszczalną frakcją śródbłonkowej kadheryny (sVE – kadheryny) i trombomoduliny (sTM).

4. Materiał

Grupę badaną stanowiło 58 pacjentów z PNŻ (45 kobiet, 13 mężczyzn), w wieku od 26 do 65 lat (średnia wieku: $44,59 \pm 10,23$), leczonych w Klinice Chirurgii Ogólnej i Naczyni UM oraz w Poznaniu. U wszystkich pacjentów wykonane zostały badania podmiotowe oraz badanie przedmiotowe: ultrasonograficzne badanie Duplex-Doppler. Badanie dopplerowskie z podwójnym obrazowaniem układu żylnego wykonywano aparatem Sonoline Elegra firmy Simens Logic 7. Żyłę układu powierzchownego i głębokiego kończyn dolnych badano w pozycji stojącej, głowicami liniowymi o częstotliwości 5-9 MHz i 5-12 MHz. Preferowaną metodą wykrywania obecności skręplin w pniach żylnych była próba uciskowa. W przypadku niemożności wykonania wydolnej próby uciskowej za kryterium drożności naczyń uznawano wypełnienie kolorem całego przekroju podłużnego i poprzecznego naczynia po wymuszeniu przepływu przez ucisk naczyń na obwodzie lub podczas próby Valsalwy. Wydolność układu zastawkowego oceniano na podstawie analizy wykresu Dopplera spektralnego. Badanie wykonywano na przekrojach podłużnych naczyń przy zachowaniu kąta insonacji $< 60^\circ$. Przepływ w naczyniu wymuszano poprzez ręczne uciśnięcie obwodowych odcinków pni naczyniowych, zazwyczaj na łydce. Za objaw niewydolności układu zastawkowego przyjęto refluks o czasie trwania dłuższym od 0,5 sekundy.

Na podstawie przeprowadzonych badań pacjenci podzieleni zostali na dwie podgrupy w zależności od obrazu klinicznego choroby. **Grupę M** ($n=34$, średnia wieku: $41,76 \pm 8,76$) stanowili pacjenci z łagodnym obrazem klinicznym choroby tzn. z żylakami i towarzyszącym im obrzękiem (grupy C2, C3 według klasyfikacji CEAP). **Grupę S** ($n=24$, średnia wieku: $48,44 \pm 11,19$) stanowili pacjenci z ciężką postacią kliniczną choroby, tzn. ze zmianami skórnymi przypisywanymi, chorobom żył, przebarwieniami, wypryskiem żylnym, zapaleniem tkanki podskórnej, owrzodzeniami lub wygojonymi owrzodzeniami (grupy C4, C5, C6 według klasyfikacji CEAP). Pacjenci ze względu na czas trwania choroby podzieleni zostali na dwie podgrupy, chorujący **1-10 lat** ($n=32$, średnia wieku: $40,03 \pm 8,62$) oraz **> 10 lat** ($n=26$, średnia wieku: $51,19 \pm 7,54$). Ponadto w badaniach uwzględniono płeć pacjentów, a wszystkie parametry analizowano zarówno w grupie kobiet z PNŻ ($n=45$, średnia wieku: $45,18 \pm 10,54$) jak i mężczyzn z PNŻ ($n=8$, średnia wieku: $42,71 \pm 9,71$).

Z badań wykluczono pacjentów, u których rozpoznano żylną chorobę zatorowo zakrzepową (żchzz), zakrzepowe zapalenie żył powierzchownych, choroby tkanki łącznej, miażdżycowe niedokrwienia kończyn dolnych, cukrzycę. W badaniu nie uczestniczyli chorzy

z żylakami wtórnymi, po przebytych zapaleniach żył głębokich i powierzchownych, chorzy u których wykonywano wcześniej miniflebektomie lub zabiegi z wykorzystaniem żył układu powierzchownego w pomostowaniu tętnic. Ponadto nie kwalifikowano chorych po złamaniach kończyn dolnych lub urazach mogących skutkować procesem zapalnym w ścianie naczynia żylnego.

Materiał do badań stanowiło osocze pobrane do probówek z wersenianem sodu oraz surowica wyizolowane z krwi żyły obwodowej na kończynie górnej.

W badaniach kontrolnych wykorzystano osocze i surowice od 25 kobiet i 8 mężczyzn bez objawów PNŻ, w wieku od 26 do 61 lat (średnia wieku: $41,87 \pm 6,99$).

Projekt badań uzyskał akceptację Komisji Bioetycznej Akademii Medycznej im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu (numer decyzji 236/09 z dnia 05.03.2009).

5. Metodyka badań

5.1. Odczynniki

5.1.1. Oznaczanie całkowitego stężenia neutrofilowej elastazy (NE)

- Wykorzystano test firmy Hycult Biotech
Human Elastase ELISA kit, nr katalogowy: HK319

5.1.2. Pomiar aktywności elastolitycznej

- Bufor TRIS-HCl, 0,2M - pH 7,6
- N-sukcynylo-trialanylo-p-nitroanilid (Suc-Ala3-pNA), 12 mM

5.1.3. Pomiar aktywności alfa-1-antytrypsyny (AAT)

- Wykorzystano test firmy Pathway Diagnostics, UNITEST Alpha-1-antitrypsin,
nr katalogowy: UD 0076

5.1.4. Oznaczenie stężenia białka C-reaktywnego wysokiej czułości (hsCRP)

- Wykorzystano test ELISA firmy DGR International, CRP, HS (C-reactive protein),
nr katalogowy: EIA-3954

5.1.5. Oznaczanie stężenia dialdehydu malonowego (MDA)

- Kwas trójchlorooctowy (TCA) - 15%
- Kwas tiobarbiturowy (TBA) - 0,375%
- Kwas chlorowy (HCl) - 0,25 M
- Siarczan dodecyłu sodu (SDS) - 8,1%
- Butylohydroksytoluen (BHT) - 2,5 μ M
- 1,1,3,3-Tetrametoksypropanu – 50 μ M

5.1.6. Pomiar całkowitej zdolności antyoksydacyjnej surowicy (CZA)

- Bufor fosforanowy, 0,1 M
- 0,2 M NaH_2PO_4 , 0,2 M Na_2HPO_4 - pH 7,0

- Sól amonowa kwasu 2,2-azinobis(3-etylobenzo-tiazolinio-6-sulfonowego) (ABTS) – 5 mM
- 2,2'-azobis(2-amidynopropan) (AAPH) – 200 mM
- Trolox – 1 mM

5.1.7. Oznaczenie stężenia kwasu moczowego

- Wykorzystano test firmy Biomaxima, nr katalogowy: 1-043-0150

5.1.8. Oznaczenie stężenia rozpuszczalnej śródbłonkowej kadheryny (sVE-kadheryny)

- Wykorzystano test firmy eBioscience, Human sVE-cadherin ELISA kit, nr katalogowy: BS-BMS253INST

5.1.9. Oznaczenie stężenia rozpuszczalnej trombomoduliny (sTM)

- Wykorzystano test firmy Gen-Probe, Human CD141/trombomodulin ELISA kit, nr katalogowy: 850.720.192

5.2. Oznaczenie całkowitego stężenia neutrofilowej elastazy (NE)

Oznaczenie całkowitego stężenie elastazy (NE), wolnej jak i związanej ze swoim inhibitorem alfa-1-antytrypsyną (AAT) w próbkach osocza wykonano przy użyciu testu ELISA firmy Hycult Biotech.

Zasada metody ELISA opierała się na katalitycznych właściwości enzymów użytych do wykrywania i ilościowego oznaczania białka w reakcjach immunologicznych. NE (antygen) ulegała połączeniu do poliklonalnego przeciwciała zaadsorbowanego na powierzchni studzienki. Do związanego białka w drugim etapie przyłączało się przeciwciało monoklonalne sprzężone z biotyną. W dalszych reakcjach biotyna łączyła się ze streptawidyną sprzężoną z peroksydazą chrzanową. Ostatnim etapem było dodanie tetrametylobenzydyny (TMB), substratu dla peroksydazy chrzanowej, przekształcanej w barwny produkt. Intensywność powstałego zabarwienia proporcjonalna do stężenia NE, w badanej próbce, mierzona była spektrofotometrycznie przy długości fali 450 nm.

Wartością graniczną dla testu do oznaczania NE było stężenie 0,4 ng/ml. Współczynnik zmienności międzyseryjnej (*intra-assay coefficient of variation*) wynosił 3,0%, natomiast współczynnik zmienności wewnątrzseryjnej (*inter assay coefficient of variation*) wynosił

7,2%. Reagenty przygotowane zostały zgodnie z protokołem dołączonym do testu. Oznaczenie wykonano zgodnie z procedurą rekomendowaną przez producenta testu.

5.3. Pomiar aktywności elastolitycznej surowicy

Pomiar aktywności elastolitycznej surowicy wykonany został w oparciu o metodę spektrofotometryczną przy wykorzystaniu syntetycznego substratu: N-sukcynylo-trialanylo-p-nitroanilidu [134]. Zasada metody polegała na enzymatycznym odłączeniu od substratu, pod wpływem NE, p-nitroaniliny, czemu towarzyszył przyrost absorpcji przy długości fali 410 nm.

W badaniach wykorzystana została mikrometoda, w której 60 μL surowicy inkubowano przez 2 minuty z 100 μL buforu Tris-HCl w temperaturze 37 $^{\circ}\text{C}$. Po tym czasie dodawano 60 μL substratu rozpuszczonego uprzednio w buforze oraz 30 μL wody destylowanej. Całość inkubowano w temperaturze 37 $^{\circ}\text{C}$ przez 17 minut, a następnie dokonano pierwszego odczytu absorbancji (A_1). Po upływie 100 minut od pierwszego odczytu nastąpił drugi odczyt absorbancji (A_2), a na podstawie wartości różnicy $A_2 - A_1$, dla każdej próbki obliczony został przyrost absorbancji na minutę ($\Delta A/\text{min}$). Poprzez podstawienie uzyskanej wartości do poniższego wzoru wyznaczona została aktywność enzymatyczna wyrażona w jednostkach aktywności elastazy na 1 L osocza. Za 1 U przyjęto ilość enzymu powodującą przekształcenie 1 μmola substratu w ciągu 1 minuty w temperaturze 37 $^{\circ}\text{C}$.

$$U/L = \frac{\Delta A / \text{min} \times 0,250 \times 4,2}{8,8 \times 0,06} \times 1000$$

0,250 – całkowita objętość próby (ml).

4,2 – współczynnik rozcieńczenia

8,8 – molowy współczynnik ekstynkcji dla p-nitroanilidu ($\mu\text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$).

0,06 – objętość surowicy (ml).

5.4. Pomiar aktywności alfa-1-antytrypsyny (AAT)

Pomiar aktywności AAT przeprowadzono w oparciu o metodę spektrofotometryczną. Próbkę osocza rozcieńczano z użyciem buforu TRIS-HCl, który dodatkowo zawierał metyloaminę inaktywującą α_2 -makroglobulinę. Równolegle z badanymi próbkami przygotowano krzywą wzorcową poprzez wielokrotne rozcieńczenie próbki osocza o znanej aktywności alfa-1-antytrypsyny. Po naniesieniu prób na mikropłytkę inkubowano je w temperaturze 37°C przez kilka minut. W czasie inkubacji do każdego z dołków wprowadzana nadmiar trypsyny, z której część wiązana była natychmiast przez obecną w próbkach osocza AAT. Ilość pozostałej niezwiązanej trypsyny mierzono wykorzystując jej zdolność do degradacji peptydu Bz-Val-Gly-Arg-pNA, czemu towarzyszyło uwolnienie p-nitroaniliny i przyrost absorpcji przy długości fali 410 nm. Przyrost absorbancji wyrażony jako \log_{A405} był odwrotnie proporcjonalny do aktywności alfa-1-antytrypsyny w badanych próbkach.

5.5. Oznaczanie stężenia białka C-reaktywnego wysokiej czułości (hs CRP)

Oznaczanie stężenia białka C-reaktywnego wysokiej czułości (hs CRP) w próbkach surowicy wykonano przy użyciu testu ELISA firmy DRG International. Wartością graniczną dla testu do oznaczania hs CRP było stężenie 0,1 mg/l. Współczynnik zmienności międzyseryjnej (*intra-assay coefficient of variation*) wynosił 4,4%, natomiast współczynnik zmienności wewnątrzseryjnej (*inter assay coefficient of variation*) wynosił 3,2%. Reagenty przygotowane zostały zgodnie z protokołem dołączonym do testu. Oznaczenie wykonano zgodnie z procedurą rekomendowaną przez producenta testu.

5.6. Oznaczanie stężenia dialdehydu malonowego (MDA)

Oznaczenie stężenia MDA prowadzono w oparciu o metodę spektrofotometryczną, wykorzystującą zdolność tworzenia przez MDA barwnego kompleksu z kwasem tiobarbiturowym (TBA) w środowisku kwaśnym [135,136].

Do 100 μ l osocza dodawano SDS i BHT w ilości 50 μ l, a następnie wprowadzano 800 μ l mieszaniny reakcyjnej zawierającej 15% TCA, 0,375% TBA oraz 0,25 M HCl. Całość inkubowano we wrzącej łaźni wodnej przez 30 minut. Po tym czasie próby schładzano

a barwny kompleks ekstrahowany przy użyciu n-butanolu. Po odwirowaniu próbek przy 1500g przez 10 minut dokonywano pomiaru absorbancji górnej warstwy przy dwóch długościach fali 532 nm i 572 nm. Absorbancję odczytaną przy 572 nm odejmowano od wartości uzyskanej przy 532 nm, w celu wyeliminowania ewentualnej interferencji TBA z innymi niż MDA związkami. Stężenie MDA odczytywano z krzywej wzorcowej przygotowanej dla 1,1,3,3-tetrametoksypropanu w zakresie stężeń 0 – 50 nmol/ml.

5.7. Pomiar całkowitej zdolności antyoksydacyjnej surowicy (CZA)

Pomiar całkowitej zdolności antyoksydacyjnej surowicy (CZA) przeprowadzono w oparciu o metodę spektrofotometryczną wykorzystującą zdolność obecnych w surowicy antyoksydantów do hamowania utleniania 2,2'-azynobis(3-etylotiazolino-6-sulfonianu) (ABTS) [137].

W metodzie tej 2,2'-azobis(2-amidynopropan) (AAPH) w temperaturze 37°C ulegał spontanicznemu rozpadowi do wolnych rodników. Pierwotne rodniki w obecności tlenu przekształcały się w rodniki alkoksyłowe i nadtlenkowe, które następnie utleniały ABTS do zielononiebieskiego kationorodnika ABTS^{•+}. Obecne w próbce antyoksydanty, reagowały z wolnymi rodnikami powstającymi w układzie lub redukowały powstający kationorodnik ABTS^{•+}. Czas indukcji, czyli czas od momentu dodania AAPH do mieszaniny reakcyjnej zawierającej badaną próbę, do czasu pojawienia się zielononiebieskiego zabarwienia był proporcjonalny do ilości antyoksydantów obecnych w tej próbce.

Każdorazowo do kuwетки spektrofotometrycznej pipetowano następujące odczynniki: 890 µL buforu fosforanowego, 30 µL ABTS, 10 µL surowicy oraz na końcu 100µL roztworu AAPH. Po dokładnym wymieszaniu zawartości kuwety, umieszczano w komorze spektrofotometru, po uprzednim doprowadzeniu temperatury do 37°C. Od tego momentu śledzono czas po którym następował przyrost absorbancji roztworu przy długości fali 414 nm. Z wykresu zależności absorbancji próbki od czasu reakcji wyznaczano tzw. okres indukcji. Całkowitą zdolność antyoksydacyjną badanej próbki surowicy odczytywano z krzywej wzorcowej przygotowanej dla Troloksu, przedstawiającej zależność okresu indukcji od stężenia Troloksu w próbce. Zakres stężeń Troloksu wykorzystany do przygotowania krzywej wzorcowej mieścił się w zakresie 1 – 7 µM. Całkowitą zdolność antyoksydacyjną surowicy pacjentów wyrażano w równoważnikach Troloksu.

5.8. Oznaczanie stężenia kwasu moczowego

Oznaczanie stężenia kwasu moczowego w próbkach surowicy wykonywano przy użyciu diagnostycznego testu firmy Biomaxima. Zasada pomiaru opierała się na enzymatycznym utlenianiu kwasu moczowego do allantoiny i nadtlenu wodoru. W drugim etapie uprzednio powstały nadtlenek wodoru reagował z 4-aminoantypiryną tworząc barwny produkt. Intensywność zabarwienia, mierzona przy długości fali 550 nm, była wprost proporcjonalna do stężenia kwasu moczowego w próbce.

Wartością graniczną dla testu do oznaczania było stężenie kwasu moczowego 0,4 ng/ml. Współczynnik zmienności międzyseryjnej (*intra-assay coefficient of variation*) wynosił 3,0%, natomiast współczynnik zmienności wewnątrzseryjnej (*inter assay coefficient of variation*) wynosił 2,0%. Reagenty przygotowane zostały zgodnie z protokołem dołączonym do testu. Oznaczenie wykonane zostało zgodnie z procedurą rekomendowaną przez producenta testu

5.9. Oznaczanie stężenia rozpuszczalnej śródbłonkowej kadheryny (sVE-kadheryny)

Oznaczanie całkowitego stężenie rozpuszczalnej śródbłonkowej kadheryny (sVE-kadheryny) w próbkach osocza wykonano przy użyciu testu ELISA firmy eBioscience. Wartością graniczną dla testu do oznaczania sVE-kadheryny było stężenie 0,05 ng/ml. Współczynnik zmienności międzyseryjnej (*intra-assay coefficient of variation*) wynosił 9,5%, natomiast współczynnik zmienności wewnątrzseryjnej (*inter assay coefficient of variation*) wynosił 11,8%. Reagenty przygotowane zostały zgodnie z protokołem dołączonym do testu. Oznaczenie wykonany został zgodnie z procedurą rekomendowaną przez producenta testu.

5.10. Oznaczanie stężenia rozpuszczalnej trombomoduliny (sTM)

Oznaczenie stężenia rozpuszczalnej trombomoduliny (sTM) w próbkach osocza wykonano przy użyciu testu ELISA firmy Gen-Probe. Wartością graniczną testu do oznaczania sTM było stężenie 0,31 ng/ml. Współczynnik zmienności międzyseryjnej (*intra-assay coefficient of variation*) wynosił 3,9%, natomiast współczynnik zmienności wewnątrzseryjnej (*inter assay coefficient of variation*) wynosił 9,8%. Reagenty przygotowane zostały zgodnie z pro-

tokołem dołączonym do testu. Oznaczenie wykonano zgodnie z procedurą rekomendowaną przez producenta testu.

5.11. Analiza statystyczna

Obliczenia statystyczne wykonano przy pomocy programu GraphPad Prism 5.0. Uzyskane wyniki przedstawiono w postaci średnich arytmetycznych wraz z odchyleniem standardowym lub jako medianę oraz górny i dolny kwartył. Normalność rozkładu zmiennych sprawdzano testem Kołomogorowa-Smirnowa. Dla porównania zmiennych, spełniających kryterium normalności rozkładu, między dwoma lub większą liczbą grup wykorzystano test t-Studenta lub jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA.

W przypadku rozkładu nie będącego rozkładem normalnym dla porównania zmiennych pomiędzy dwoma lub większą liczbą grup wykorzystano test U-Mann Whitney lub test Kruskalla-Wallisa. Do oceny zmiennych jakościowych wykorzystano test χ^2 . Zależność pomiędzy oznaczanymi parametrami analizowano za pomocą korelacji Pearsona lub korelacji porządku rang Spearmana. Znamienność statystyczną przyjęto na poziomie istotności $p < 0,05$.

6. Wyniki

6.1. Ocena parametrów równowagi NE-AAT oraz stężenia hsCRP

6.1.1. Ocena parametrów równowagi NE-AAT i stężenia hsCRP w całej grupie pacjentów z PNŻ

Pierwszym etapem przeprowadzonych badań było określenie relacji między NE a jej inhibitorem – AAT w całej grupie pacjentów z PNŻ. Jako parametry służące do oceny równowagi NE-AAT wybrano analizę stężenia i aktywności NE, przeprowadzoną równoległe z oznaczeniem aktywności AAT. Jako marker stanu zapalnego wykorzystano ocenę stężenia hsCRP.

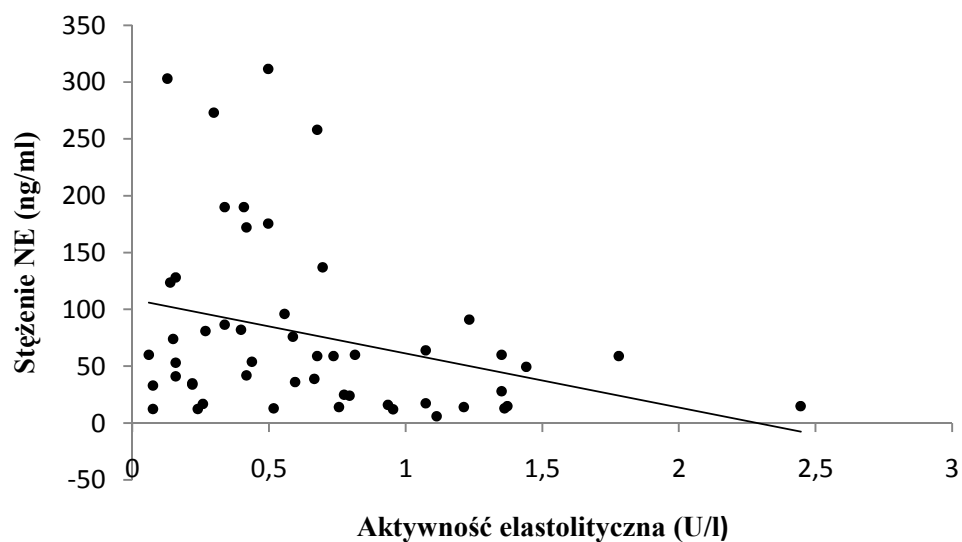
Na podstawie uzyskanych wyników nie stwierdzono statystycznie istotnych zmian w stężeniu NE w grupie pacjentów w porównaniu z grupą kontrolną. W surowicy chorych, w odniesieniu do grupy kontrolnej, wykazano natomiast statystycznie istotnie niższą aktywność elastolityczną przy jednoczesnej wyższej aktywności AAT. Stężenie hsCRP w grupie pacjentów z PNŻ pozostawało bez zmian w porównaniu z osobami zdrowymi (Tabela 5).

Tabela 5. Ocena parametrów równowagi NE-AAT i stężenia hsCRP w całej grupie pacjentów z PNŻ w odniesieniu do grupy kontrolnej.

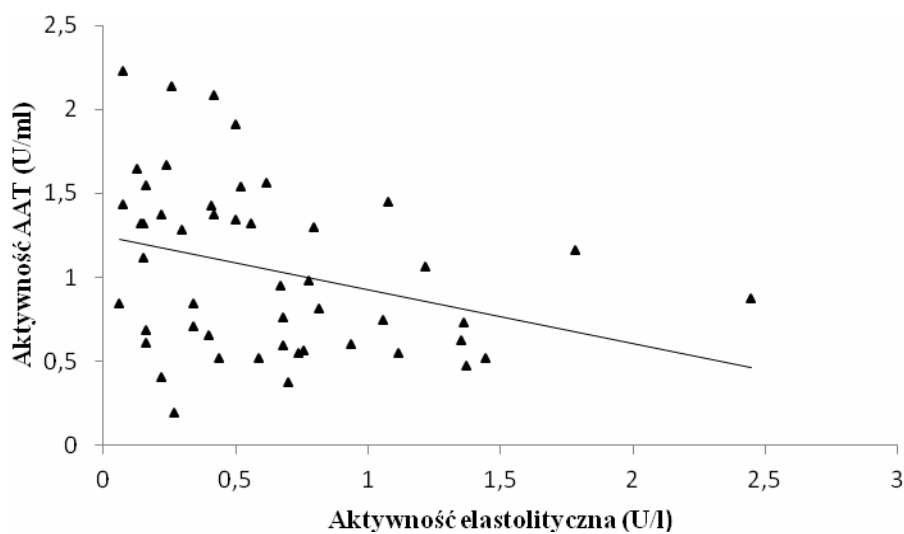
Parametr	Grupa kontrolna (n=33)	Pacjenci z PNŻ (n=58)	p
Stężenie NE (ng/ml)	44 (26 – 85) ¹	52,5 (17,38 – 87,63)	0,993
Aktywność elastolityczna (U/l)	0,736 (0,099 – 1,253)	0,587 (0,258 – 0,954) [*]	0,034
Aktywność AAT (U/ml)	0,806 ±0,205 ²	1,051±0,497 [*]	0,019
Stężenie hsCRP (mg/l)	1,63 (0,17-2,40)	1,16 (0,28-2,72)	0,651

¹ Mediana (dolny – górny kwartył), ² Średnia±odchylenie standardowe, ^{*} Pacjenci z PNŻ vs kontrola, p≤0,05

W grupie pacjentów z PNŻ aktywność elastolityczna surowicy korelowała ujemnie, chociaż słabo ze stężeniem NE (Rycina 15) oraz aktywnością AAT (Rycina 16).



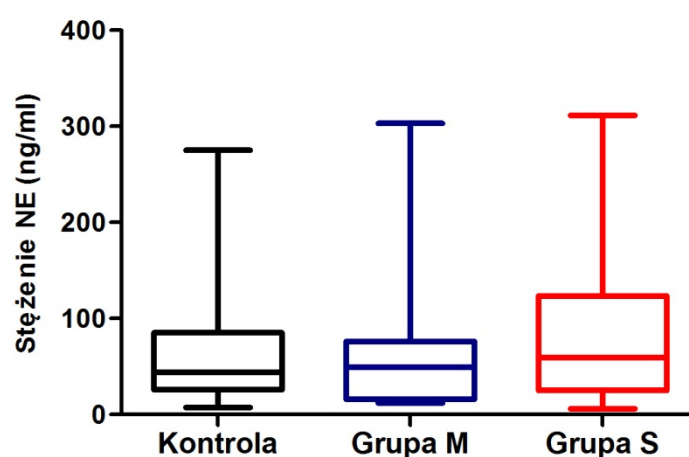
Rycina 15. Ujemna korelacja między aktywnością elastolityczną surowicy a stężeniem NE u pacjentów z PNŻ [$r=(-0,325)$ $p=0,038$].



Rycina 16. Ujemna korelacja między aktywnością elastolityczną surowicy a aktywnością AAT u pacjentów z PNŻ [$r=(-0,351)$ $p=0,015$].

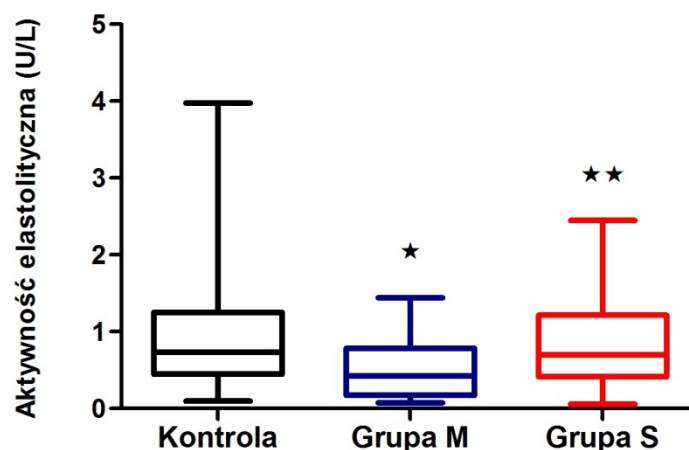
6.1.2. Ocena parametrów równowagi NE-AAT i stężenia hsCRP w zależności od postaci klinicznej PNŻ

W kolejnym etapie parametry równowagi NE-AAT i stężenie hsCRP analizowano u pacjentów z łagodną (grupa M) i ciężką (grupa S) postacią kliniczną PNŻ. W tym wypadku wykazano tendencję do wzrostu stężenia NE wraz ze stopniem nasilenia PNŻ, która okazała się statystycznie nieistotna [kontrola: 44 (26-85) ng/ml, grupa M: 49,5 (16-76) ng/ml, grupa S: 59 (25- 123,5) ng/ml, $p=0,626$] (Rycina 17).



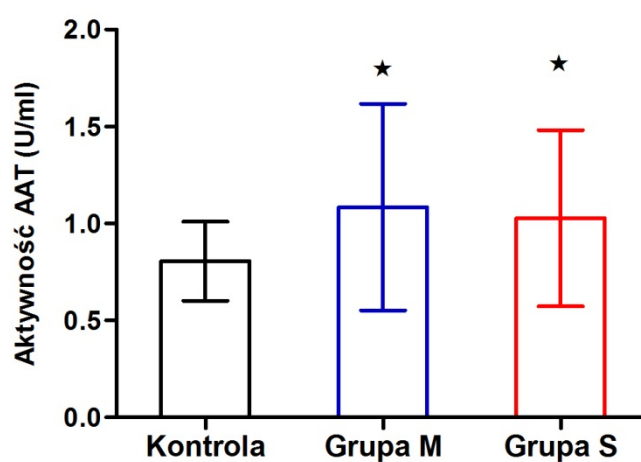
Rycina 17. Stężenie NE w osoczu pacjentów z łagodną (grupa M) i cięższą (grupa S) postacią kliniczną PNŻ.

U pacjentów z łagodnym obrazem klinicznym choroby (grupa M) stwierdzono obniżoną aktywność elastolityczną surowicy w porównaniu z grupą kontrolną [grupa M: 0,422 (0,174-0,785) U/l vs kontrola: 0,736 (0,447-1,253) U/l, $p=0,004$] (Rycina 18). U pacjentów w cięższym stadium klinicznym PNŻ (grupa S) następował wzrost aktywności elastolitycznej surowicy w porównaniu z grupą M, osiągający poziom porównywalny z tym odnotowanym w grupie kontrolnej [grupa M: 0,422 (0,174-0,785) U/l vs grupa S: 0,696 (0,418-1,213) U/l, $p=0,037$] (Rycina 18).



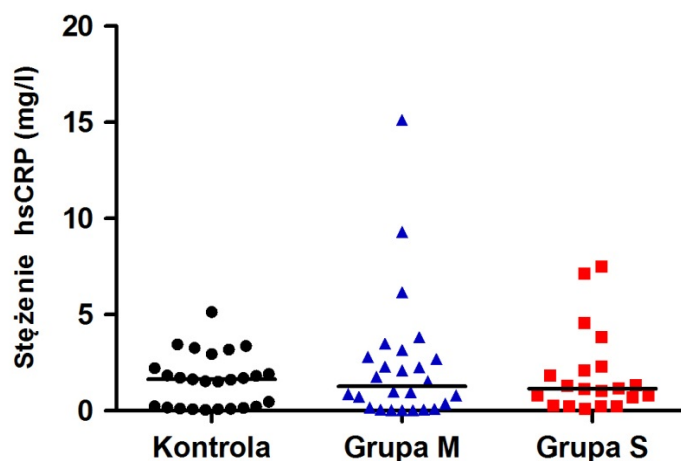
Rycina 18. Aktywność elastolityczna surowicy pacjentów z łagodną (grupa M) i cięższą postacią (grupa S) kliniczną PNŻ. * Grupa M vs kontrola, $P \leq 0,05$; ** Grupa S vs grupa M, $p \leq 0,05$.

Aktywność AAT zarówno w grupie M jak i grupie S pozostawała podwyższona w odniesieniu do grupy kontrolnej [grupa M: $1,085 \pm 0,533$ U/ml, grupa S: $1,027 \pm 0,453$ U/ml vs kontrola: $0,805 \pm 0,205$ U/ml, $p = 0,046$] (Rycina 19).



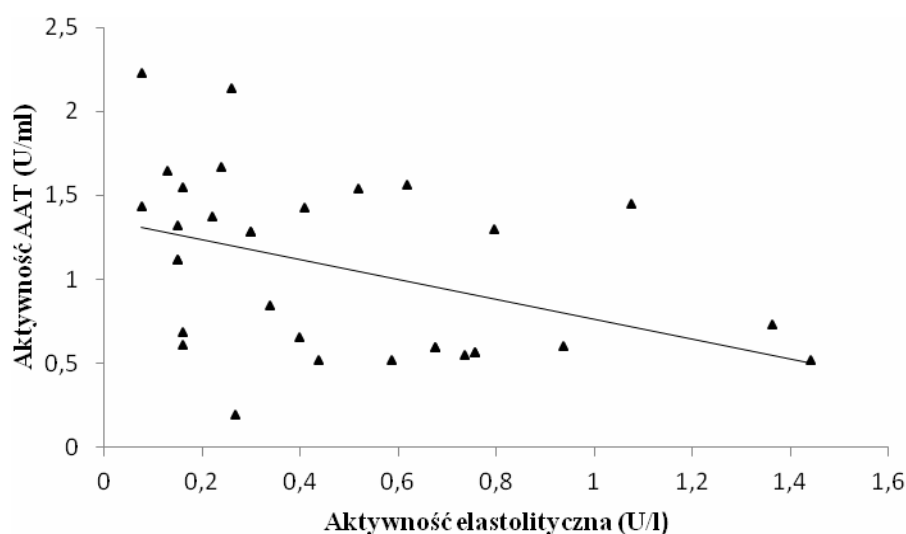
Rycina 19. Aktywność AAT surowicy pacjentów z łagodną (grupa M) i cięższą postacią (grupa S) kliniczną PNŻ. * Grupa M, grupa S vs kontrola, $p \leq 0,05$.

Stężenie hsCRP nie różniło się istotnie ani pomiędzy grupami ani w odniesieniu do osób zdrowych [grupa M: $1,27$ (0,15-2,90) mg/l, grupa S: $1,16$ (0,40-2,26) mg/l vs kontrola: $1,63$ (0,17-2,40) mg/l, $p = 0,927$] (Rycina 20).



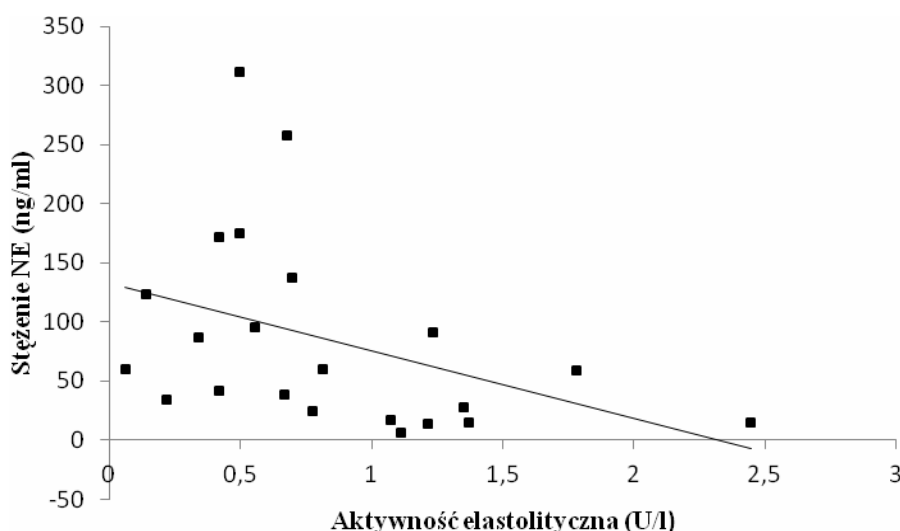
Rycina 20. Stężenie hsCRP surowicy pacjentów z łagodną (grupa M) i cięższą postacią kliniczną PNŻ (grupa S).

W grupie M wykazano ujemną korelację między aktywnością elastolityczną surowicy a aktywnością AAT (Rycina 21).



Rycina 21. Ujemna korelacja między aktywnością elastolityczną surowicy a aktywnością AAT u pacjentów z łagodną postacią kliniczną PNŻ (Grupa M) [$r=(-0,443)$ $p=0,018$].

Z kolei w grupie S aktywność elastolityczna surowicy korelowała ujemnie ze stężeniem NE (Rycina 22). Poza tym w tej samej grupie chorych wykazano statystycznie istotną dodatnią korelację między aktywnością AAT a wskaźnikiem BMI ($r=0,620$ $p=0,002$).



Rycina 22. Ujemna korelacja między aktywnością elastolityczną surowicy a stężeniem NE u pacjentów z cięższą postacią kliniczną PNŻ (Grupa S) [$r=(-0,529)$ $p=0,011$].

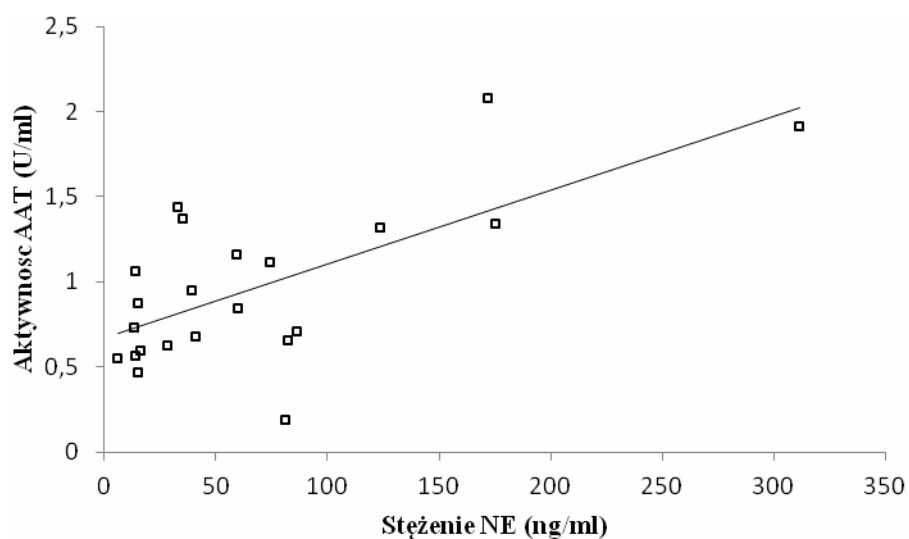
6.1.3. Ocena parametrów równowagi NE-AAT i stężenia hsCRP w zależności od czasu trwania PNŻ

Biorąc pod uwagę czas trwania choroby, pacjentów podzielono na dwie grupy, tych chorujących ≤ 10 lat oraz > 10 lat. W przypadku NE nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic w jej stężeniu między rozpatrywanymi grupami (Tabela 6). W przypadku pozostałych parametrów tylko w surowicy pacjentów chorujących ≤ 10 lat stwierdzono statystycznie niższą aktywność elastolityczną i wyższą aktywność AAT w porównaniu z grupą kontrolną. Stężenie hsCRP pozostawało bez zmian niezależnie od czasu trwania PNŻ. (Tabela 6).

Tabela 6. Wpływ czasu trwania PNŻ na analizowane parametry równowagi NE-AAT. * ≤ 10 lat vs grupa kontrolna, $p \leq 0,05$.

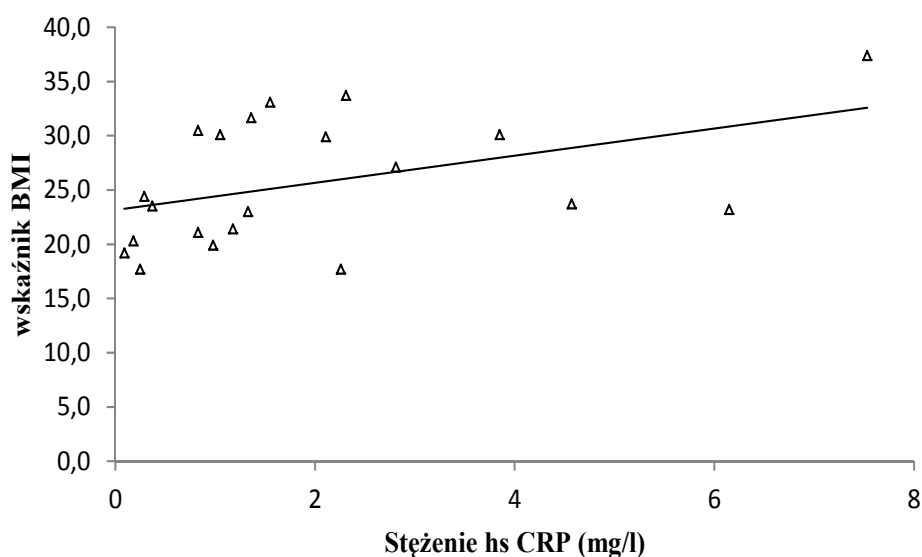
Parametr	Grupa kontrolna (n=33)	≤ 10 lat (n=32)	>10 lat (n=26)	p
Stężenie NE (ng/ml)	44 (26 – 85)	53 (20 -96)	41 (15 – 86,5)	0,930
Aktywność elastolityczna (U/l)	0,736 (0,099 – 1,253)	0,557 (0,248-0,785) *	0,666 (0,243-1,223)	0,018
Aktywność AAT (U/ml)	0,806 \pm 0,205	1,111 \pm 0,524 *	0,982 \pm 0,467	0,036
Stężenie hsCRP (mg/l)	1,63 (0,17-2,40)	1,00 (0,18-2,92)	1,33 (0,60-2,56)	0,764

W grupie pacjentów chorujących ≤ 10 lat, podobnie jak u pacjentów z łagodną postacią kliniczną PNŻ, wykazano znamiennej statystycznie ujemną korelację między aktywnością elastolityczną surowicy a aktywnością AAT ($r=-0,422$ $p=0,040$). Natomiast u pacjentów chorujących > 10 lat, analogicznie jak w grupie S, zaobserwowano ujemną korelację między aktywnością elastolityczną a stężeniem NE ($r=-0,464$ $p=0,026$). Ponadto u pacjentów chorujących > 10 lat odnotowano dodatnią korelację między stężeniem NE a aktywnością AAT (Rycina 22) oraz między stężeniem hsCRP a wartością wskaźnika BMI (Rycina 23).



Rycina 22. Dodatnia korelacja między stężeniem NE a aktywnością AAT u pacjentów chorujących na PNŻ > 10 lat [$r=0,489$ $p=0,021$].

W obu grupach pacjentów odnotowano korelację między stężeniem NE a czasem trwania choroby, przy czym w każdej z nich wykazywała ona odmienny kierunek, odwrotnie proporcjonalny u pacjentów chorujących ≤ 10 lat ($r=-0,378$ $p=0,036$) i wprost proporcjonalny w grupie chorującej na PNŻ > 10 lat ($r=0,529$ $p=0,009$).



Rycina 23. Dodatnia korelacja między stężeniem hsCRP a wartością wskaźnika BMI u pacjentów chorujących na PNŻ > 10 lat [$r=0,500$ $p=0,021$].

6.1.4. Ocena parametrów równowagi NE-AAT i stężenia hsCRP w zależności od płci pacjentów z PNŻ

Po podziale pacjentów na grupę kobiet i mężczyzn wykazano, że u pacjentów płci żeńskiej (PNŻ-♀) nie występują istotne statystycznie różnice w stężeniu NE i aktywności elastolitycznej surowicy w odniesieniu do kobiet grupy kontrolnej (Kontrola-♀). Występuje jedynie statystycznie wyższa aktywność AAT (Tabela 7). W grupie mężczyzn z PNŻ (PNŻ-♂) nie odnotowano istotnie statystycznej zmiany w stężeniu NE, stwierdzono natomiast obniżoną aktywność elastolityczną oraz podwyższoną aktywność AAT w porównaniu z mężczyznami grupy kontrolnej (Kontrola-♂) (Tabela 7). Niezależnie od płci pacjentów z PNŻ nie wykazano statystycznie istotnych różnic w stężeniu hsCRP w odniesieniu odpowiednio do zdrowych kobiet lub mężczyzn (Tabela 7). Przy czym w grupie kobiet z PNŻ stężenie hsCRP korelowało dodatnio z wartością wskaźnika BMI ($r=0,422$ $p=0,011$).

Tabela 7. Parametry równowagi NE-AAT i stężenie hsCRP w grupie chorych kobiet (PNŻ-♀) i mężczyzn (PNŻ-♂). *PNŻ-♀ vs kontrola-♀, $p \leq 0,05$; **PNŻ-♂ vs kontrola-♂, $p \leq 0,05$.

Parametr	Kontrola-♀ (n=25)	PNŻ-♀ (n=45)	p	Kontrola-♂ (n=8)	PNŻ-♂ (n=13)	p
Stężenie NE (ng/ml)	41,5 (21,5-66)	54 (22-126)	0,527	65 (31-98,5)	52 (15,5 – 62)	0,158
Aktywność elastolityczna (U/l)	0,577 (0,418-0,994)	0,587 (0,239-0,935)	0,288	1,452 (0,945-2,521)	0,686 (0,298-1,178)**	0,023
Aktywność AAT (U/ml)	0,757±0,176	0,989±0,506*	0,014	0,915±0,234	1,251±0,427**	0,037
Stężenie hsCRP (mg/l)	1,00 (0,12-1,86)	1,02 (0,28-2,98)	0,371	2,50 (1,66-3,35)	2,11 (0,38-2,30)	0,335

Kategoryzując kobiety z PNŻ na odpowiednie grupy w zależności od postaci klinicznej choroby i czasu jej trwania, w żadnej z nich nie zaobserwowano statystycznie istotnych zmian w stężeniu NE ani aktywności elastolitycznej surowicy. Jedynie w osoczu pacjentek z łagodną postacią kliniczną PNŻ (Grupa M-♀) oraz tych chorujących od ponad 10 lat (> 10 lat-♀) utrzymywała się podwyższona aktywność AAT (Tabela 8,9).

Tabela 8. Parametry równowagi NE-AAT u kobiet i mężczyzn z PNŻ podzielonych ze względu na postać kliniczną choroby. Grupa M-♀ vs kontrola-♀, $p \leq 0,05$; **Grupa M-♂ vs kontrola-♂, $p \leq 0,05$.

Parametr	Kontrola-♀ (n=25)	Grupa M-♀ (n=29)	Grupa S-♀ (n=16)	p
Stężenie NE (ng/ml)	41,5 (21,5-66)	52 (19-81)	59 (25-172)	0,678
Aktywność elastolityczna (U/l)	0,577 (0,418-0,994)	0,408 (0,159-0,756)	0,686 (0,437-1,104)	0,082
Aktywność AAT (U/ml)	0,757±0,176	1,007±0,506*	0,974±0,537	0,032
Stężenie hsCRP (mg/l)	1,00 (0,12-1,86)	0,98 (0,13-3,15)	1,15 (0,56-2,84)	0,549
Parametr	Kontrola-♂ (n=8)	Grupa M-♂ (n=5)	Grupa S-♂ (n=8)	p
Stężenie NE (ng/ml)	65 (31-98,5)	17 (14,5-58,5)	56 (22-83)	0,204
Aktywność elastolityczna (U/l)	1,452 (0,945-2,521)	0,517 (0,208-1,005)**	1,014 (0,453-2,143)	0,029
Aktywność AAT (U/ml)	0,915±0,234	1,455±0,551**	1,104±0,268	0,030
Stężenie hsCRP (mg/l)	2,50 (1,66-3,35)	2,27 (1,59-4,70)	1,18 (0,26-2,31)	0,512

Stężenie hsCRP nie różniło się istotnie w żadnej z rozpatrywanych grup pacjentek z PNŻ w odniesieniu do kobiet grupy kontrolnej (Tabela 8,9).

W przypadku mężczyzn zaobserwowano wyższą aktywność elastolityczną oraz niższą aktywność AAT jedynie u tych w łagodnym stadium klinicznym PNŻ (Grupa M-♂) lub chorujących ≤ 10 lat (≤ 10 lat-♂). Ponadto w grupie mężczyzn cierpiących na PNŻ nie dłużej niż 10 lat aktywność AAT była wyższa niż u tych z PNŻ od ponad 10 lat (Tabela 9). Stężenie hsCRP u mężczyzn z PNŻ nie różniło się istotnie w porównaniu ze zdrowymi osobami płci męskiej w żadnej z rozpatrywanych grup (Tabela 8,9).

Tabela 9. Parametry równowagi NE-AAT u kobiet i mężczyzn z PNŻ podzielonych ze względu na czas trwania choroby. * >10 lat-♀ vs kontrola-♀, $p \leq 0,05$, ** ≤ 10 lat-♂ vs kontrola-♂, $p \leq 0,05$; Ψ ≤ 10 lat-♂ vs >10 lat-♂, $p \leq 0,05$.

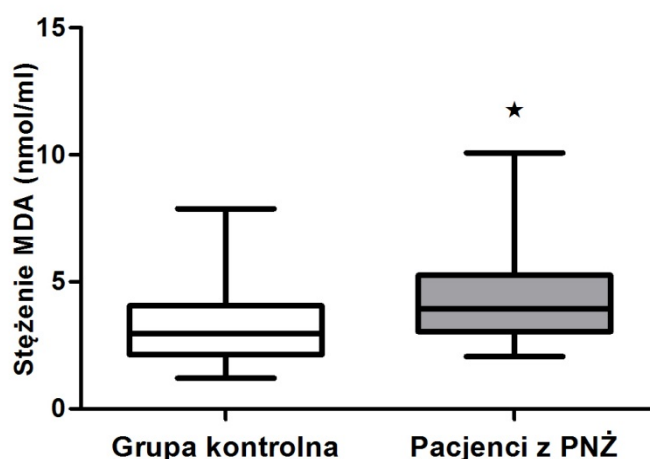
Parametr	Kontrola-♀ (n=25)	≤ 10 lat – ♀ (n=21)	>10 lat – ♀ (n=24)	p
Stężenie NE (ng/ml)	41,5 (21,5-66)	54 (20-137)	50 (25-96)	0,814
Aktywność elastolityczna (U/l)	0,577 (0,418- 0,994)	0,596 (0,239- 0,795)	0,497 (0,243- 1,084)	0,667
Aktywność AAT (U/ml)	0,757 \pm 0,176	0,967 \pm 0,521	1,010 \pm 0,503 *	0,046
Stężenie hsCRP (mg/l)	1,00 (0,12-1,86)	1,00 (0,15-3,09)	1,05 (0,33-3,33)	0,597
Parametr	Kontrola-♂ (n=8)	≤ 10 lat – ♂ (n=8)	>10 lat – ♂ (n=5)	p
Stężenie NE (ng/ml)	65 (31-98,5)	52 (23-63)	16 (14,5-75,5)	0,288
Aktywność elastolityczna (U/l)	1,452 (0,945- 2,521)	0,537 (0,298- 1,009) **	1,213 (0,497- 1,840)	0,038
Aktywność AAT (U/ml)	0,915 \pm 0,234	1,453 \pm 0,362 ** Ψ	0,846 \pm 0,191	0,002
Stężenie hsCRP (mg/l)	2,50 (1,66-3,35)	2,11 (0,19-5,15)	2,18 (1,41-2,30)	0,802

6.2. Ocena parametrów równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej

6.2.1. Ocena parametrów równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej w całej grupie pacjentów z PNŻ

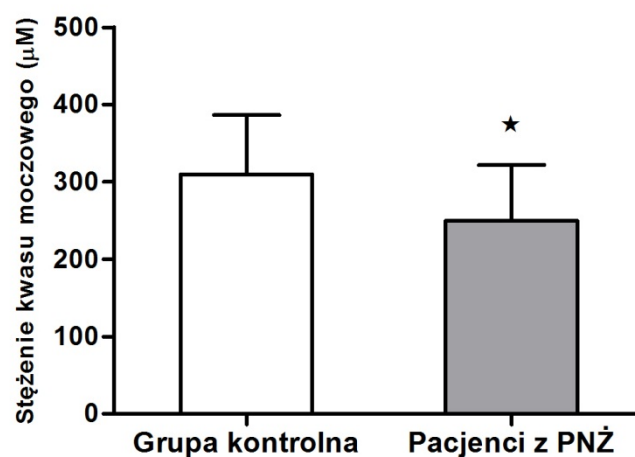
W celu oceny równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej analizie poddano stężenie MDA, kwasu moczowego oraz wartość CZA w osoczu/surowicy chorych, które odniesiono do wyników uzyskanych w grupie kontrolnej.

Na podstawie analizy statystycznej uzyskanych danych stwierdzono wyższe stężenie MDA w osoczu pacjentów z PNŻ w porównaniu z grupą kontrolną [pacjenci z PNŻ: 3,93 (3,05-5,25) nmol/ml vs grupa kontrolna: 2,96 (2,13-4,06) nmol/ml, $p=0,001$] (Rycina 24).



Rycina 24. Stężenie MDA w osoczu pacjentów z PNŻ. * Pacjenci z PNŻ vs grupa kontrolna, $p \leq 0,05$.

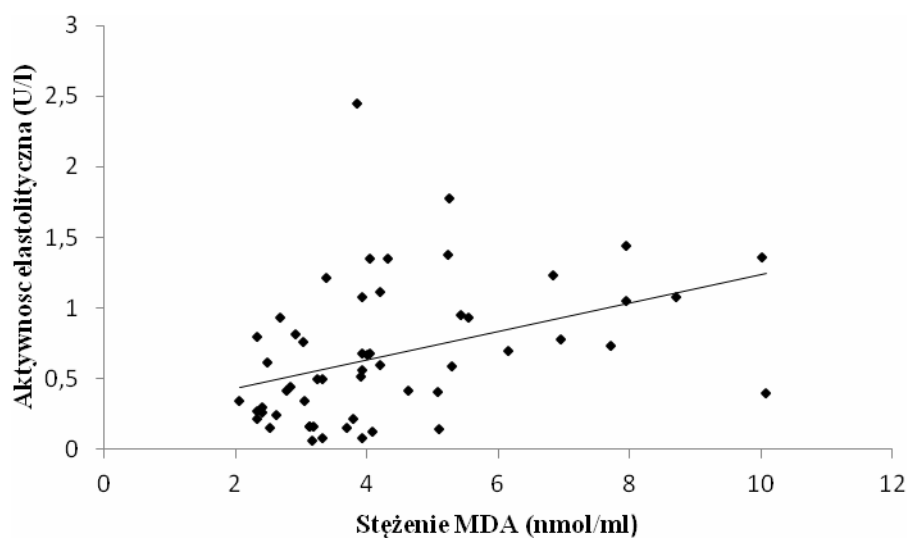
Stężenie kwasu moczowego było znacząco obniżone w surowicy chorych w porównaniu z grupą kontrolną [pacjenci z PNŻ: $250 \pm 72 \mu\text{M}$ vs grupa kontrolna: $309 \pm 77 \mu\text{M}$, $p=0,0004$] (Rycina 25).



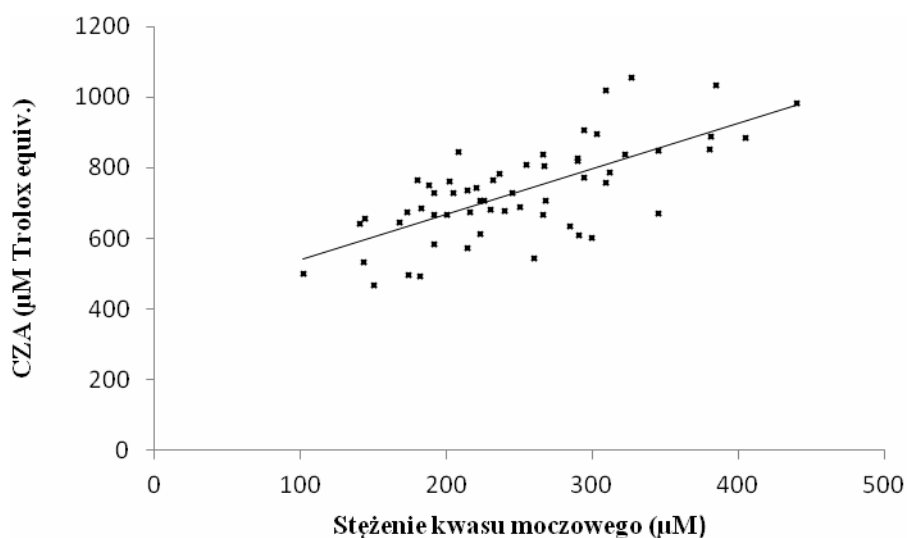
Rycina 25. Stężenie kwasu moczowego w surowicy pacjentów z PNŻ. * Pacjenci z PNŻ vs grupa kontrolna, $p \leq 0,05$.

Wartość CZA surowicy pacjentów nie różniła się istotnie statystycznie w odniesieniu do osób zdrowych [pacjenci z PNŻ: 731 ± 134 µM Trolox equiv. vs grupa kontrolna: 722 ± 118 µM Trolox equiv., $p = 0,743$].

W całej grupie pacjentów z PNŻ stężenie MDA korelowało dodatnio z aktywnością elastolityczną surowicy (Rycina 26). Wykazano także dodatnią korelację między stężeniem kwasu moczowego a wartością CZA osocza chorych (Rycina 27).



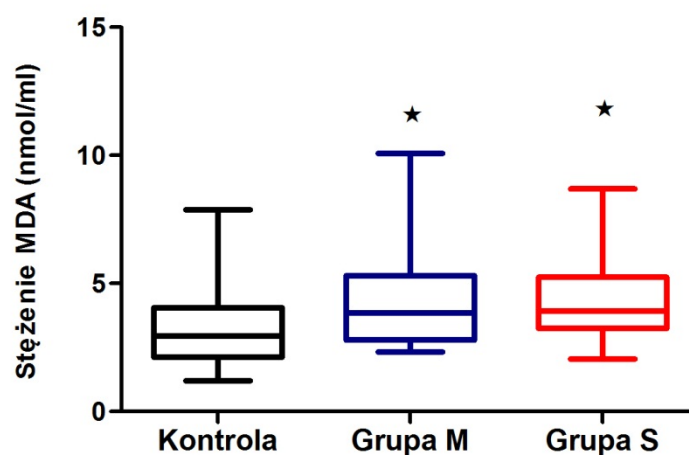
Rycina 26. Korelacja między stężeniem MDA a aktywnością elastolityczną u pacjentów z PNŻ [$r = 0,469$ $p = 0,0002$].



Rycina 27. Dodatnia korelacja między stężeniem kwasu moczowego a CZA osocza u pacjentów z PNŻ [$r=0,491$ $p=0,0001$].

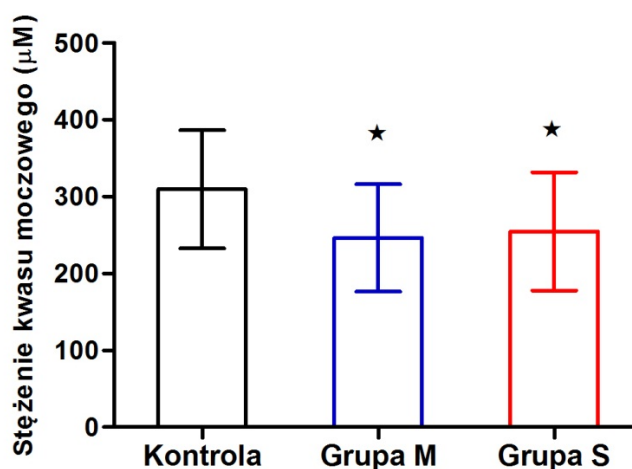
6.2.2. Ocena parametrów równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej w zależności od postaci klinicznej PNŻ

Podwyższone stężenie MDA wykazano zarówno u pacjentów z łagodną jak i cięższą postacią kliniczną PNŻ [grupa M: 3,84 (2,79-5,31) nmol/ml, grupa S: 3,93 (3,25-5,24) nmol/ml vs kontrola: 2,96 (2,13-4,06) nmol/ml, $p=0,004$] (Rycina 28).



Rycina 28. Stężenie MDA w osoczu pacjentów z łagodną (grupa M) i cięższą (grupa S) postacią kliniczną PNŻ. * Grupa M, grupa S vs kontrola, $p \leq 0,05$.

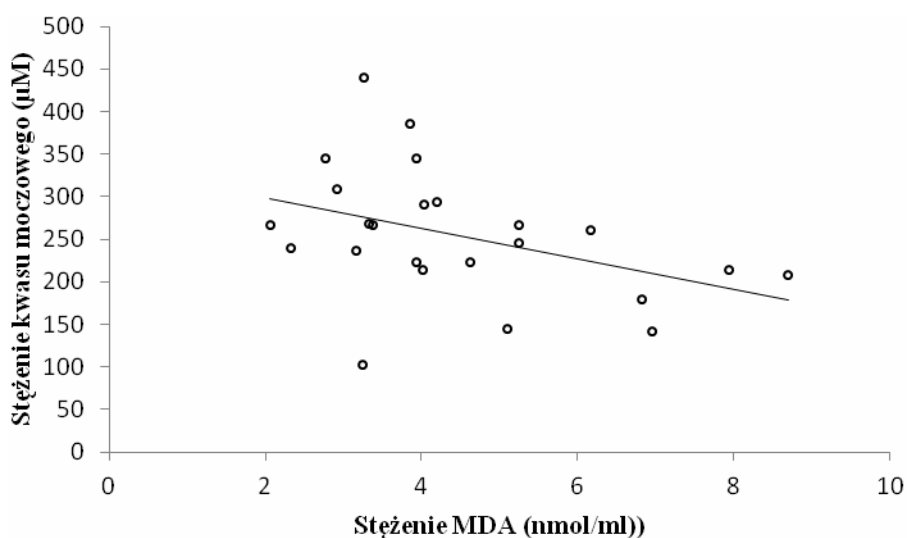
W obu grupach utrzymywało się także obniżone stężenie kwasu moczowego w odniesieniu do osób zdrowych [grupa M: $246 \pm 70 \mu\text{M}$, grupa S: $254 \pm 77 \mu\text{M}$ vs kontrola: $309 \pm 77 \mu\text{M}$, $p=0,002$] (Rycina 29).



Rycina 29. Stężenie kwasu moczowego w surowicy pacjentów z łagodną (grupa M) i ciężką (grupa S) postacią kliniczną PNŻ. * Grupa M, grupa S vs kontrola, $p \leq 0,05$.

Wartość CZA surowicy pacjentów z grupy M oraz z grupy S nie różniła się istotnie statystycznie od jej wartości w grupie kontrolnej [grupa M: $725 \pm 129 \mu\text{M Trolox equiv.}$, grupa S: $744 \pm 145 \mu\text{M Trolox equiv.}$ vs kontrola: $722 \pm 118 \mu\text{M Trolox equiv.}$, $p=0,798$].

W obu grupach stężenie MDA korelowało dodatnio z aktywnością elastolityczną, jednak w grupie S siła tej zależności była wyższa niż w grupie M (grupa M: $r=0,366$ $p=0,040$; grupa S: $r=0,493$ $p=0,017$). Tylko w grupie M stężenie MDA korelowało dodatnio ze stężeniem hsCRP ($r=0,431$ $p=0,028$). W obu grupach wykazano także dodatnią, istotną statystycznie korelację między stężeniem kwasu moczowego a CZA surowicy (grupa M: $r=0,746$ $p<0,0001$; Grupa S: $r=0,650$ $p=0,0006$). Ponadto w grupie pacjentów w cięższym stadium klinicznym choroby odnotowano odwrotną zależność między stężeniem MDA a stężeniem kwasu moczowego (Rycina 30).



Rycina 30. Ujemna korelacja między stężeniem MDA a stężeniem kwasu moczowego u pacjentów z cięższą postacią kliniczną PNŻ (Grupa S) [$r=(-0,406)$ $p=0,049$].

6.2.3. Ocena parametrów równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej w zależności od czasu trwania PNŻ

Zmiany w wartościach oznaczanych parametrów równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej zaobserwowano także dzieląc pacjentów ze względu na czas trwania choroby. Zarówno u tych chorujących krócej (≤ 10 lat) jak i dłużej (> 10 lat) wykazano podwyższone stężenie MDA i obniżone stężenie kwasu moczowego w porównaniu z grupą kontrolną. Natomiast CZA surowicy w obu grupach pozostawała bez zmian w odniesieniu do osób zdrowych (Tabela 10).

Tabela 10. Wpływ czasu trwania PNŻ na analizowane parametry równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej. * ≤ 10 lat, > 10 lat vs grupa kontrolna, $p \leq 0,05$.

Parametr	Grupa kontrolna (n=33)	≤ 10 lat (n=32)	> 10 lat (n=26)	p
Stężenie MDA (nmol/ml)	2,96 (2,13-4,06)	3,92(2,85-5,35)*	3,89 (3,12-5,24)*	0,008
Stężenie kwasu moczowego (μ M)	309 \pm 77	258 \pm 79*	240 \pm 62*	0,001
CZA (μ M Trolox equiv.)	722 \pm 118	729 \pm 126	735 \pm 146	0,929

W obu grupach pacjentów stwierdzono statystycznie istotną dodatnią korelację między stężeniem MDA a aktywnością elastolityczną surowicy (≤ 10 lat: $r=0,626$ $p=0,0003$; >10 lat: $r=0,444$ $p=0,023$) oraz między stężeniem kwasu moczowego a CZA surowicy chorych (≤ 10 lat: $r=0,685$ $p=0,0001$; > 10 lat: $r=0,775$ $p<0,0001$).

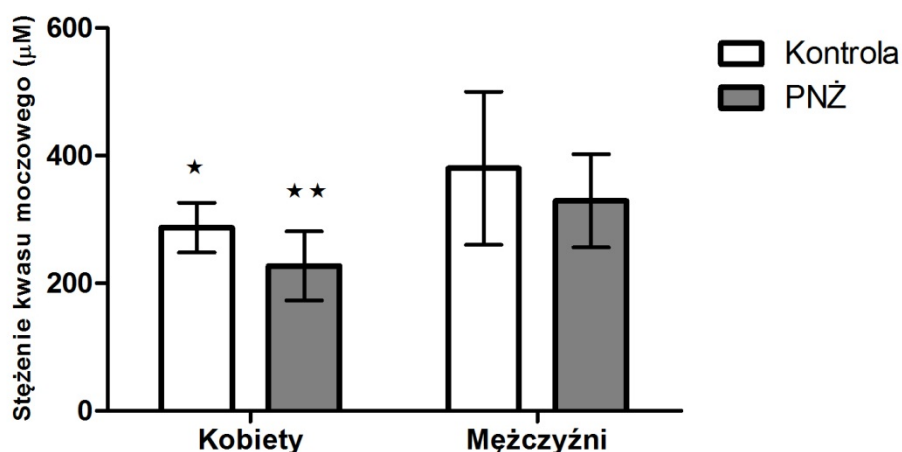
6.2.4. Ocena parametrów równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej w zależności od płci pacjentów z PNŻ

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że kobiety chorujące na PNŻ wykazują istotnie wyższe stężenie MDA oraz niższe stężenie kwasu moczowego w porównaniu z kobietami zdrowymi. Natomiast wartość CZA surowicy kobiet z PNŻ pozostaje bez zmian w odniesieniu do kobiet z grupy kontrolnej. W przypadku mężczyzn z PNŻ wartość żadnego z oznaczanych parametrów równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej nie różniła się istotnie statystycznie w porównaniu ze zdrowymi mężczyznami (Tabela 11).

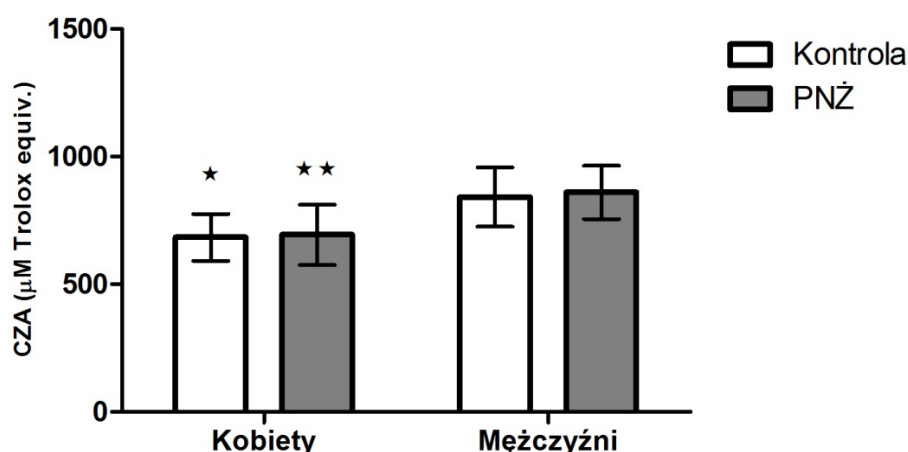
Tabela 11. Parametry równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej w grupie chorych kobiet (PNŻ-♀) i mężczyzn (PNŻ-♂). *PNŻ-♀ vs kontrola-♀, $p\leq 0,05$.

Parametr	Kontrola-♀ (n=25)	PNŻ-♀ (n=45)	p	Kontrola-♂ (n=8)	PNŻ-♂ (n=13)	p
Stężenie MDA (nmol/ml)	2,41 (2,03-4,06)	4,04 (3,08-5,40) *	0,0005	3,24 (2,92-3,96)	3,26 (2,84-3,92)	0,885
Stężenie kwasu moczowego (μ M)	287±39	227±54 *	<0,0001	380±120	329±73	0,304
CZA osocza (μ M Trolox equiv.)	684±92	694±118	0,710	842±116	860±104	0,706

Analiza statystyczna uzyskanych wyników wykazała, że zarówno kobiety z grupy kontrolnej jak i pacjentki z PNŻ, posiadają obniżone stężenie kwasu moczowego oraz niższą wartość CZA surowicy w porównaniu z odpowiednio zdrowymi lub chorymi mężczyznami (Rycina 31, 32).



Rycina 31. Stężenie kwasu moczowego w surowicy zdrowych i chorych kobiet i mężczyzn. * Kontrola-♀ vs kontrola-♂, $p \leq 0,05$; ** PNŻ-♀ vs PNŻ-♂, $p \leq 0,05$.



Rycina 32. CZA surowicy zdrowych i chorych kobiet i mężczyzn. * Kontrola-♀ vs kontrola-♂, $p \leq 0,05$; ** PNŻ-♀ vs PNŻ-♂, $p \leq 0,05$.

W grupie kobiet z PNŻ odnotowano statystycznie istotną dodatnią korelację między wartością CZA surowicy a stężeniem kwasu moczowego ($r=0,604$ $p < 0,0001$) oraz między stężeniem MDA a aktywnością elastolityczną surowicy ($r=0,554$ $p < 0,0001$). W grupie mężczyzn stężenie MDA korelowało dodatnio ze stężeniem hsCRP ($r=0,705$ $p=0,010$).

Ponadto podwyższone stężenie MDA oraz obniżone stężenie kwasu moczowego stwierdzono u kobiet z PNŻ niezależnie od stadium klinicznego PNŻ i czasu jej trwania, w przeciwieństwie do mężczyzn z PNŻ, u których w żadnej z rozpatrywanych grup nie wykazano istotnych zmian w wartościach analizowanych parametrów równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej w porównaniu z dobraną płciowo grupą kontrolną (Tabela 12,13).

Tabela 12. Parametry równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej u kobiet i mężczyzn z PNŻ podzielonych ze względu na postać kliniczną choroby. *Grupa M-♀, Grupa S-♀ vs kontrola-♀, p≤0,05.

Parametr	Kontrola-♀ (n=25)	Grupa M-♀ (n=29)	Grupa S-♀ (n=16)	p
Stężenie MDA (nmol/ml)	2,41 (2,03-4,06)	3,93 (2,92-5,40) *	4,41 (3,47-5,93) *	0,018
Stężenie kwasu moczowego (μM)	287±39	228±54 *	225±55 *	<0,0001
CZA osocza (μM Trolox equiv.)	684±92	703±127	682±108	0,754
Parametr	Kontrola-♂ (n=8)	Grupa M-♂ (n=5)	Grupa S-♂ (n=8)	p
Stężenie MDA (nmol/ml)	3,24 (2,92-3,96)	3,12 (2,54-3,92)	3,32 (2,97-3,91)	0,670
Stężenie kwasu moczowego (μM)	380±120	354±50	313±84	0,385
CZA osocza (μM Trolox equiv.)	842 ±116	848±42	868±132	0,890

Tabela 13. Parametry równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej u kobiet i mężczyzn z PNŻ podzielonych ze względu na czas trwania choroby. *≤10 lat-♀, >10 lat-♀ vs kontrola-♀, p≤0,05.

Parametr	Kontrola-♀ (n=25)	≤ 10 lat-♀ (n=24)	>10 lat-♀ (n=21)	p
Stężenie MDA (nmol/ml)	2,41 (2,03-4,06)	4,12 (2,88-5,98) *	4,01 (3,10-5,24) *	0,0004
Stężenie kwasu moczowego (μM)	287±39	223±52 *	231±57 *	<0,0001
CZA osocza (μM Trolox equiv.)	684±92	681±91	709±144	0,646
Parametr	Kontrola-♂ (n=8)	≤ 10 lat-♂ (n=8)	>10 lat-♂ (n=5)	p
Stężenie MDA (nmol/ml)	3,24 (2,92-3,96)	3,19 (2,80-3,92)	3,38 (2,92-5,34)	0,846
Stężenie kwasu moczowego (μM)	380±120	362±49	276±78	0,133
CZA osocza (μM Trolox equiv.)	842 ±116	872±106	841±111	0,828

6.3. Ocena markerów uszkodzenia śródbłonka

6.3.1. Ocena markerów uszkodzenia śródbłonka w całej grupie pacjentów z PNŻ

W badaniach ocenie poddano dwa markery uszkodzenia śródbłonka, stężenie sVE-kadheryny oraz sTM. Na podstawie uzyskanych wyników, w grupie pacjentów z PNŻ stwierdzono istotnie statystycznie niższe stężenie sVE-kadheryny i brak zmian w stężeniu sTM w porównaniu z grupą kontrolną (Tabela 14).

Tabela 14. Ocena markerów uszkodzenia śródbłonka w całej grupie pacjentów z PNŻ w odniesieniu do grupy kontrolnej.

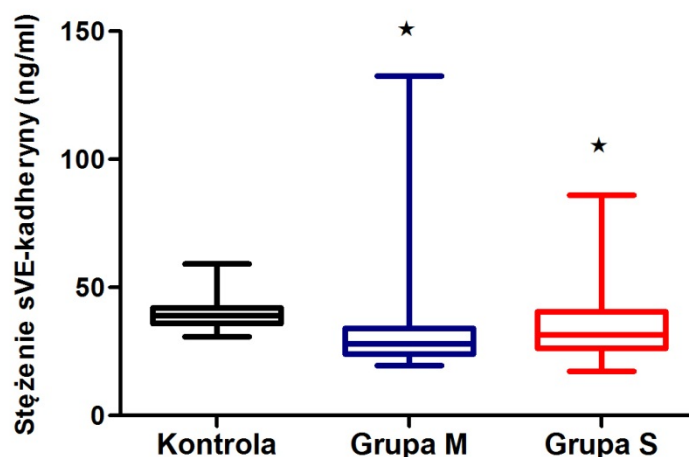
Parametr	Grupa kontrolna (n=33)	Pacjenci z PNŻ (n=58)	p
sVE-kadheryna (ng/ml)	38,92 (35,92-42,11)	29,07 (24,55-36,80) *	0,0001
sTM (ng/ml)	1,23 (0,88-1,85)	1,40 (1,10-2,27)	0,239

*Pacjenci z PNŻ vs kontrola, $p \leq 0,05$

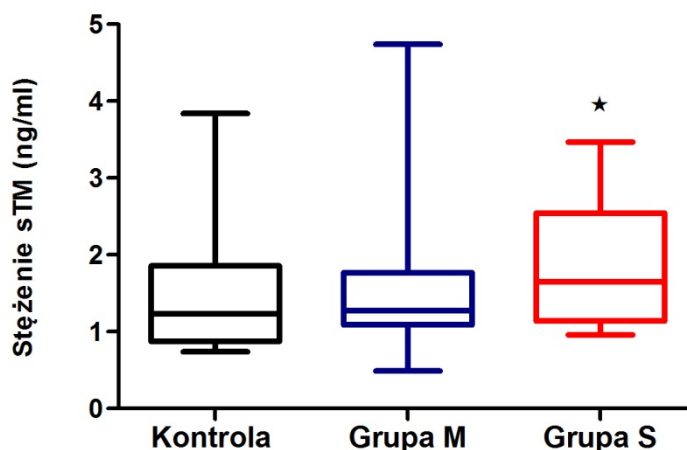
W całej analizowanej grupie chorych nie odnotowano żadnej zależności między sVE-kadheryną/lub sTM a parametrami równowagi NE-AAT oraz ocenianymi wykładnikami stresu oksydacyjnego.

6.3.2. Ocena stężenia markerów uszkodzenia śródbłonka w zależności od postaci klinicznej PNŻ

Niższe stężenie sVE-kadheryny utrzymywało się u pacjentów zarówno z łagodną jak i ostrą postacią kliniczną PNŻ w porównaniu z osobami zdrowymi [grupa M: 28,05 (24,07-34,02) ng/ml, grupa S: 31,54 (26,37-40,56) ng/ml vs. kontrola: 38,92 (35,92-42,11) ng/ml, $p=0,0004$] (Rycina 33). Natomiast w przypadku sTM, jej podwyższone stężenie zaobserwowano wyłącznie u pacjentów w cięższym stadium klinicznym PNŻ [grupa S: 1,65 (1,14-2,54) ng/ml vs. kontrola: 1,23 (0,88-1,85) ng/ml, $p=0,035$] (Rycina 34).



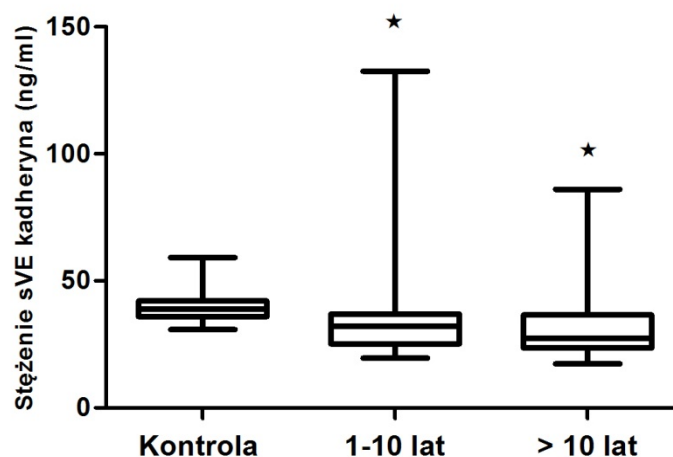
Rycina 33. Stężenie sVE-kadheryny w osoczu pacjentów z łagodną (grupa M) i cięższą (grupa S) postacią kliniczną PNŻ. * Grupa M, grupa S vs kontrola, $p \leq 0,05$.



Rycina 34. Stężenie sTM w osoczu pacjentów z łagodną (grupa M) i cięższą (grupa S) postacią kliniczną PNŻ. * Grupa S vs kontrola, $p \leq 0,05$.

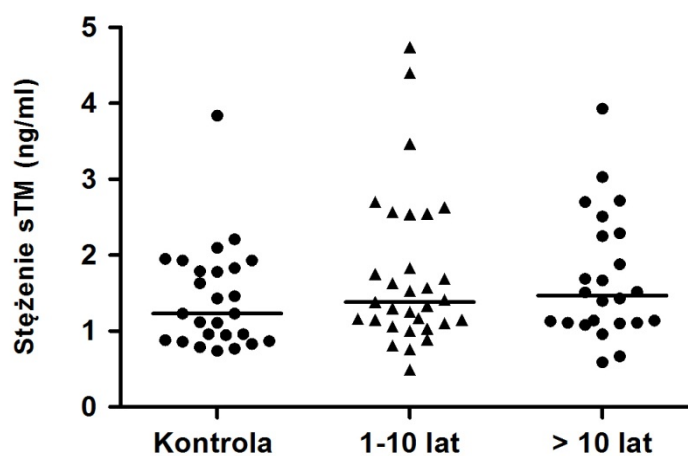
6.3.3. Ocena stężenia markerów uszkodzenia śródbłonna w zależności od czasu trwania PNŻ

Po podziale pacjentów na odpowiednie grupy w zależności od czasu trwania PNŻ, zaobserwowano, że zarówno u pacjentów chorujących krócej (≤ 10 lat) jak i dłużej (> 10 lat) stężenie sVE-kadheryny jest istotnie statystycznie obniżone w porównaniu z grupą kontrolną [≤ 10 lat: 32,20 (25,20-36,88) ng/ml, > 10 lat: 27,35 (23,62-36,51) ng/ml vs kontrola: 38,92 (35,92-42,11) ng/ml, $p=0,0004$] (Rycina 35).



Rycina 35. Stężenie sVE-kadheryny w osoczu pacjentów podzielonych ze względu na czas trwania choroby. * 1-10 lat, >10 lat vs kontrola, $p \leq 0,05$.

Wraz z wydłużaniem się czasu trwania choroby w osoczu pacjentów stężenie sTM wykazywało tendencję wzrostową, która nie osiągała jednak istotności statystycznej w porównaniu z grupą kontrolną [1-10 lat: 1,38 (1,10-2,54) ng/ml, >10 lat: 1,47 (1,11-2,28) ng/ml vs kontrola: 1,23 (0,87-1,85) ng/ml, $p=0,395$] (Rycina 36).



Rycina 36. Stężenie sTM w osoczu pacjentów podzielonych ze względu na czas trwania choroby.

6.3.4. Ocena stężenie markerów uszkodzenia śródbłonna w zależności od płci pacjentów z PNŻ

W osoczu kobiet i mężczyzn chorujących na PNŻ wykazano obniżone stężenie sVE-kadheryny w porównaniu z dobraną płciowo grupą kontrolną. W przypadku sTM jej podwyż-

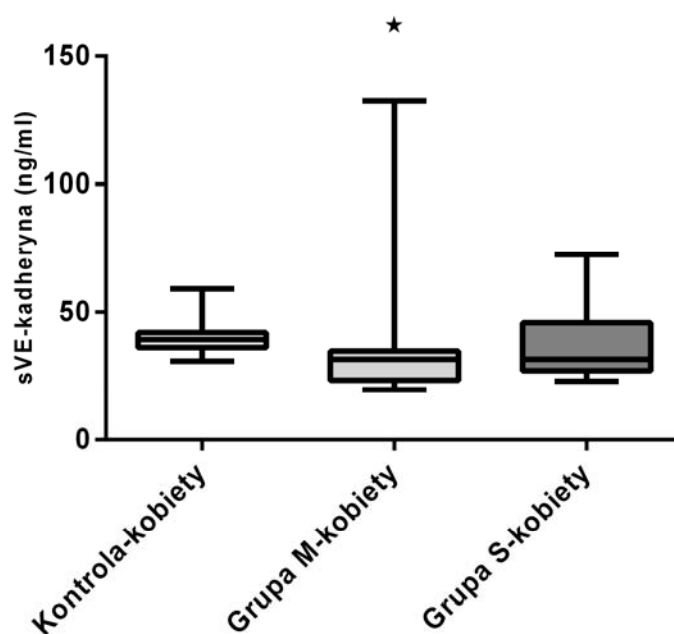
szzone stężenie stwierdzono tylko u kobiet z PNŻ, natomiast u chorych płci męskiej jej poziom był porównywalny z tym obserwowanym w grupie zdrowych mężczyzn (Tabela 15).

Tabela 15. Stężenie markerów uszkodzenia śródbłonka w grupie chorych kobiet (PNŻ-♀) i mężczyzn (PNŻ-♂). *PNŻ-♀ vs kontrola-♀, $p \leq 0,05$; **PNŻ-♂ vs kontrola-♂, $p \leq 0,05$.

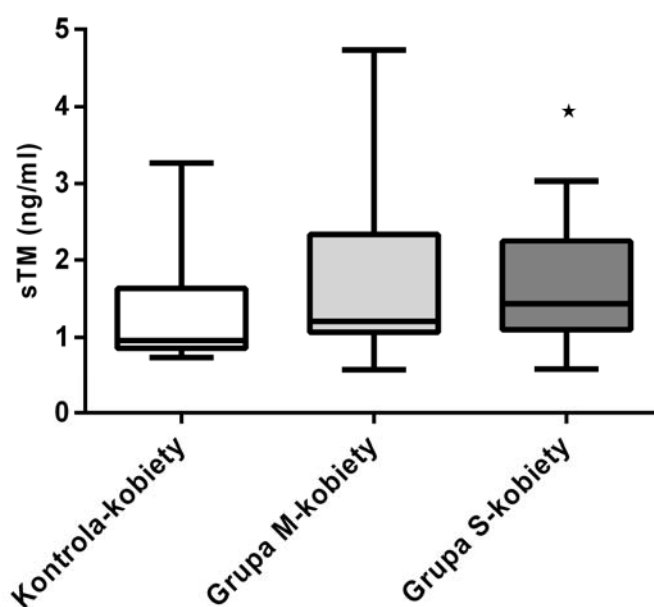
Parametr	Kontrola-♀ (n=25)	PNŻ-♀ (n=45) *	P	Kontrola-♂ (n=8)	PNŻ-♂ (n=13) **	p
Stężenie sVE-kadheryny (ng/ml)	39,30 (36,19-42,11)	31,54* (23,90-39,51)	0,001	36,08 (34,72-43,44)	26,39** (25,52-36)	0,028
Stężenie sTM (ng/ml)	0,96 (0,85-1,50)	1,31* (1,10-2,16)	0,022	1,93 (1,60-2,02)	1,63 (1,13-2,41)	0,256

W grupie mężczyzn wykazano statystycznie istotną korelację między stężeniem sTM a aktywnością elastolityczną surowicy ($r=0,582$; $P=0,037$). Z kolei stężenie sVE-kadheryny korelowało ujemnie ze stężeniem MDA ($r=-0,654$; $p=0,015$) i hs CRP ($r=-0,711$; $p=0,009$).

Obniżone stężenie sVE-kadheryny stwierdzono u kobiet z łagodną postacią kliniczną PNŻ, gdy tymczasem u pacjentek należących do grupy S jej stężenie było porównywalne z tym odnotowanym w grupie kontrolnej [Grupa M-♀: 30,34 (23,36-34,44) ng/ml vs kontrola-♀: 39,30 (36,19-42,11) ng/ml, $p=0,0005$] (Rycina 37). W porównaniu ze zdrowymi kobietami stężenie sTM było podwyższone zarówno u pacjentek z łagodną jak i cięższą postacią kliniczną PNŻ, jednak tylko w tej ostatniej grupie różnica była statystycznie istotna [Grupa S-♀: 1,43 (1,10-2,25) ng/ml vs kontrola-♀: 0,96 (0,85-1,50) ng/ml, $p=0,029$] (Rycina 38).



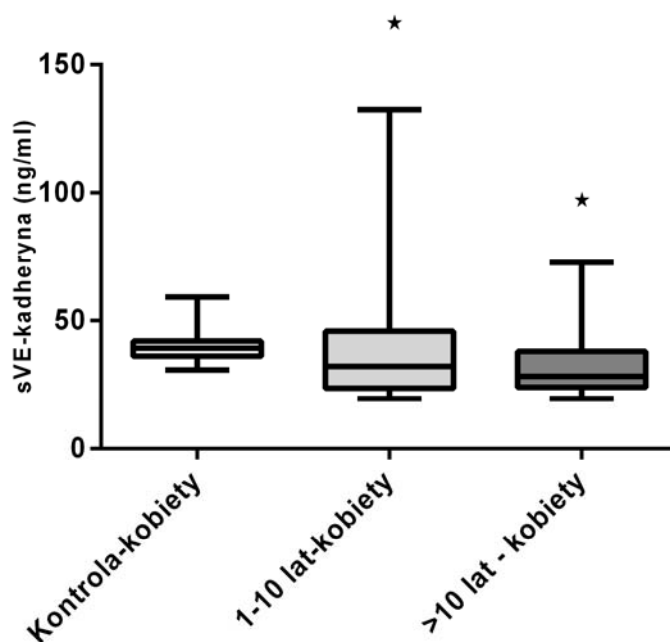
Rycina 37. Stężenie sVE-kadheryny w osoczu kobiet z łagodną i cięższą postacią kliniczną PNŻ. * Grupa M-kobiety vs kontrola-kobiety, $p \leq 0,05$.



Rycina 38. Stężenie sTM w osoczu kobiet z łagodną i cięższą postacią kliniczną PNŻ. * Grupa S-kobiety vs kontrola-kobiety, $p \leq 0,05$.

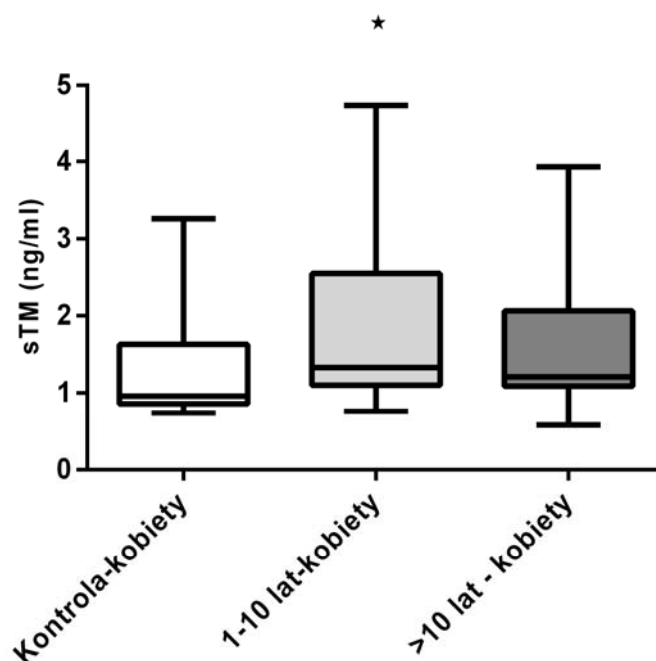
Stężenie sVE-kadheryny pozostawało obniżone w osoczu pacjentek w porównaniu ze zdrowymi kobietami niezależnie od czasu trwania choroby [1-10 lat-♀: 32,21 (23,65-45,91)

ng/ml, >10 lat-♀: 28,28 (24,11-38,01) ng/ml vs kontrola-♀: 39.30 (36,19-42,11) ng/ml, p=0,004] (Rycina 39).



Rycina 39. Stężenie sVE-kadheryny w osoczu kobiet z PNŻ podzielonych ze względu na czas trwania choroby. * 1-10 lat-kobiet, >10 lat-kobiety vs kontrola-kobiety, p≤0,05.

W grupie kobiet z PNŻ tylko krótszy czas trwania choroby (≤ 10 lat) związany był ze wzrostem stężenia sTM, natomiast u pacjentek chorujących dłużej (> 10 lat) różnica ta stawała się statystycznie nieistotna [1-10 lat-♀: 1,33 (1,10-2,55) ng/ml vs kontrola-♀: 0,96 (0,85-1,50) ng/ml, p=0,021] (rycina 40).



Rycina 40. Stężenie sTM w osoczu kobiet z PNŻ podzielonych ze względu na czas trwania choroby. * 1-10 lat-kobiety vs kontrola-kobiety, $p \leq 0,05$.

Po podziale mężczyzn na odpowiednie grupy w zależności od postaci klinicznej i czasu trwania PNŻ, w żadnej z nich nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w stężeniu sVE-kadheryny i sTM w porównaniu ze zdrowymi osobami płci męskiej (Tabela 16).

Tabela 16. Stężenie markerów uszkodzenia śródbłonna u mężczyzn z PNŻ podzielonych ze względu na postać kliniczną i czas trwania choroby.

Parametr	Kontrola-♂ (n=8)	Grupa M-♂ (n=5)	Grupa S-♂ (n=8)	p
Stężenie sVE-kadheryny (ng/ml)	36,08 (34,72-43,44)	26,04 (25,36-60,54)	27 (23,66-36,44)	0,116
Stężenie sTM (ng/ml)	1,93 (1,60-2,02)	1,34 (0,66-1,69)	1,98 (1,24-2,66)	0,141
Parametr	Kontrola-♂ (n=8)	≤ 10 lat -♂ (n=8)	>10 lat-♂ (n=5)	p
Stężenie sVE-kadheryny (ng/ml)	36,08 (34,72-43,44)	27,60 (25,83-36,88)	26,25 (20,04-56,21)	0,096
Stężenie sTM (ng/ml)	1,93 (1,60-2,02)	1,63 (1,03-2,54)	1,67 (1,31-2,49)	0,523

6.4. Podsumowanie ocenianych parametrów po podziale pacjentów na odpowiednie kwartyle

6.4.1. Porównanie oznaczanych parametrów zależnie od kwartyła stężenia NE

W kolejnej części badań podsumowano oceniane parametry dzieląc pacjentów na podgrupy w zależności od kwartyła wartości stężenia NE, aktywności elastolitycznej oraz AAT. Po podziale pacjentów ze względu na stężenie NE uzyskano 3 podgrupy, **podgrupę I** z wartościami stężeń poniżej kwartyła pierwszego ($< 17,38$ ng/ml), **podgrupę II** ze stężeniami NE zawartymi w przedziale $17,38 - 87,63$ ng/ml, odpowiadającymi II i III kwartyłowi oraz **podgrupę III**, w której stężenie NE osiągało wartości powyżej trzeciego kwartyła ($> 87,63$ ng/ml) (Tabela 17).

W odniesieniu do grupy kontrolnej tylko u pacjentów podgrupy III wykazano statystycznie istotny spadek aktywności elastolitycznej. Jednocześnie w podgrupie tej zaobserwowana znaczący wzrost aktywności AAT w porównaniu z osobami zdrowymi. W podgrupie III odnotowano także najwyższe stężenie hsCRP, jednak analiza statystyczna wykazała, że wzrost ten nie jest statystycznie istotny w odniesieniu do innych podgrup ani grupy kontrolnej.

We wszystkich podgrupach, niezależnie od kwartyła stężeń NE zaobserwowano istotnie wyższe stężenie MDA w porównaniu z grupą kontrolną. Stężenie kwasu moczowego wykazywało tendencje malejącą w poszczególnych podgrupach, jednak statystycznie istotny spadek jego poziomu wykazano w podgrupie II i podgrupie III w porównaniu z osobami z grupy kontrolnej. Wartość CZA surowicy pozostawała bez zmian między podgrupami jak i w odniesieniu do grupy kontrolnej.

W przypadku markerów uszkodzenia śródbłonna istotne statystycznie różnice wykazano tylko dla sVE-kadheryny. Jej stężenie było niższe u pacjentów z wartościami stężeń NE poniżej kwartyła I oraz powyżej kwartyła III w porównaniu z pacjentami podgrupy II oraz kontrolą. Stężenie sTM nie różniło się statystycznie w żadnej z analizowanych podgrup.

Tabela 17. Podsumowanie ocenianych parametrów po podziale pacjentów na kwartyle ze względu na stężenie NE.

	Stężenie NE (ng/ml)				p
	Kontrola	Podgrupa I kwartyl I (NE < 17,38 n)	Podgrupa II kwartyl II i III (NE 17,38-87,63)	Podgrupa III kwartyl IV (NE > 87,63)	
Wiek	41,9±8,6	46,3±8,8	44,9±10	44,4±10,8	0,469
BMI		23,74±5,37	24,31±4,20	27,14±7,03	0,203
%C4C5C6		30,77	39,28	61,54	0,730
Czas trwania choroby		11 (6-12)	10 (8-15)	7 (3-20)	0,429
hsCRP (mg/l)	1,63 (0,17-2,40)	1,78 (0,37-2,31)	1,00 (0,49-1,97)	3,83 (0,24-7,53)	0,547
Akt. elastolityczna (U/l)	0,736 (0,099-1,253)	0,944 (0,323-1,325)	0,591 (0,219-0,880)	0,418 ^b (0,228-0,616)	0,024
Akt. AAT (U/ml)	0,806±0,205	1,105±0,630	0,908±0,398	1,244±0,515 ^b	0,015
MDA (nmol/ml)	2,96 (2,13-4,06)	3,85 ^c (2,85-5,33)	3,93 ^c (2,85-5,28)	3,93 ^c (3,18-5,09)	0,019
Kw. moczowy (μM)	309±77	273±80	255±70 ^d	222±65 ^d	0,002
CZA (μM Trolox equiv.)	722±118	777±138	724±135	690±96	0,352
sVE-kadheryna (ng/ml)	38,92 (35,92-42,11)	26,25 ^{e,*} (23,87-31,11)	39,30 (36,19-42,11)	28,28 ^{e,*} (21,81-32,45)	<0,0001
sTM (ng/ml)	1,23 (0,88-1,93)	1,51 (1,04-1,79)	1,34 (1,12-2,55)	1,40 (1,008-2,395)	0,793

^b Podgrupa III vs kontrola, ^c podgrupa I, II i III vs kontrola, ^d podgrupa II i III vs kontrola, ^e podgrupa I i III vs kontrola, * podgrupa I i III vs podgrupa II

6.4.2. Porównanie oznaczanych parametrów zależnie od kwartyła aktywności elastolitycznej surowicy

Dzieląc pacjentów na kwartyle ze względu na wartość aktywności elastolitycznej surowicy uzyskano 3 podgrupy. Podgrupę I stanowili chorzy u których wartość aktywności elastolitycznej wynosiła $< 0,258$ U/l, podgrupę II pacjenci z wartościami aktywności $0,258-0,954$ U/l, natomiast podgrupę III, ci u których wartość aktywności elastolitycznej przekraczała $0,954$ U/l (Tabela 18).

Na podstawie przeprowadzonej analizy statystycznej wykazano, że stężenie NE nie różni się istotnie między podgrupami ani w odniesieniu do grupy kontrolnej. U pacjentów z najniższymi wartościami aktywności elastolitycznej ($< 0,258$ U/l) zaobserwowano znamienne statystycznie wzrost aktywności AAT. W pozostałych dwóch podgrupach aktywność AAT wykazywała tendencję spadkową, osiągając ostatecznie w podgrupie III wartość istotnie niższą niż w podgrupie I. Ponadto zaobserwowano, że w podgrupie III przeważają pacjenci z cięższą postacią kliniczną PNŻ. Stężenie hsCRP nie różniło się istotnie statystycznie ani pomiędzy grupami ani w odniesieniu do grupy kontrolnej. W przypadku ocenianych parametrów stresu oksydacyjnego wykazano, że stężenie MDA i CZA rośnie w poszczególnych podgrupach osiągając najwyższą wartość u pacjentów z najwyższą aktywnością elastolityczną surowicy (podgrupa III). Stężenie MDA w grupie II i III pozostawało podwyższone także w porównaniu z grupą kontrolną. Natomiast porównując najwyższą wartość CZA uzyskaną w podgrupie III z grupą kontrolną nie wykazano istotnej statystycznie różnicy. Stężenie kwasu moczowego było obniżone we wszystkich podgrupach, jednak tylko u pacjentów z najniższymi oraz pośrednimi wartościami aktywności elastolitycznej surowicy (podgrupa I i II) różnica to była statystycznie istotna w porównaniu z osobami zdrowymi.

W przypadku sVE-kadheryny jej stężenie było znacząco niższe we wszystkich podgrupach w odniesieniu do grupy kontrolnej. Odnotowano tendencję do wzrostu stężenia sTM wraz ze wzrostem aktywności elastolitycznej osocza, która okazała się jednak statystycznie nieistotna.

Tabela 18. Podsumowanie ocenianych parametrów po podziale pacjentów na kwartyle ze względu na aktywność elastolityczną surowicy.

	Aktywność elastolityczna (U/l)				p
	Kontrola	Podgrupa I kwartyl I (akt. elastolit. < 0,258)	Podgrupa II kwartyl II i III (akt. elastolit. 0,258-0,954)	Podgrupa III kwartyl IV (akt. elastolit. > 0,954)	
Wiek	41,9±8,6	42±10,3	45,2±9,40	48,4±10,3	0,151
BMI		26,14±6,68	23,86±5,32	26,13±4,74	0,328
%C4C5C6		23,07	37,93	69,23 ^a	0,017
Czas trwania choroby		10 (6-17)	10 (5-15)	12 (10-20)	0,218
hsCRP (mg/l)	1,63 (0,17-2,40)	1,78 (0,29-2,81)	0,98 (0,24-3,16)	2,29 (1,09-3,63)	0,330
Stężenie NE (ng/ml)	44 (26-85)	47 (33,25-111)	60 (25-172)	22,75 (14,25-59,75)	0,132
Akt. AAT (U/ml)	0,806±0,205	1,247±0,506 ^{b,*}	1,035±0,534	0,820±0,317	0,011
MDA (nmol/ml)	2,96 (2,13-4,06)	3,19 (2,87-3,85)	3,91 ^c (2,72-5,18)	5,24 ^{c,**} (3,98-7,94)	0,0003
Kw. Moczowy (μM)	309±77	234±54 ^d	243±75 ^d	265±68	0,012
CZA (μM Trolox equiv.)	722±118	697±119	709±142	792±110 [£]	0,045
sVE-kadheryna (ng/ml)	38,92 (35,92-42,11)	28,05 ^e (23,91-34,88)	31,54 ^e (25,20-40,40)	26,39 ^e (23,01-36,07)	0,0006
sTM (ng/ml)	1,23 (0,88-1,93)	1,14 (0,85-1,39)	1,55 (1,15-2,53)	1,67 (1,07-2,43)	0,083

^a Podgrupa III vs podgrupa I i II. ^b podgrupa I vs kontrola, ^{*} podgrupa I vs podgrupa III, ^c podgrupa II i III vs kontrola, ^{**} podgrupa III vs podgrupa I i II, ^d podgrupa I i II vs kontrola, [£] podgrupa III vs podgrupa I, ^e podgrupa I, II i III vs kontrola.

6.4.3. Podsumowanie oznaczanych parametrów zależnie od kwartyła aktywności AAT

Ostatni zaproponowany podział uwzględniał wartości aktywności AAT uzyskane u poszczególnych pacjentów. Dzieliąc pacjentów na odpowiednie kwartyły, uzyskano podgrupę I, w której aktywność AAT wynosiła $< 0,610$ U/ml, podgrupę II z wartościami aktywności $0,610-1,427$ U/ml oraz podgrupę III, w której aktywność AAT przekraczała $1,427$ U/ml (Tabela 19).

Na podstawie przeprowadzonej analizy statystycznej stwierdzono, że stężenie NE nie różni się pomiędzy podgrupami ani w odniesieniu do grupy kontrolnej. Pacjenci wykazujący najwyższą aktywność AAT ($>1,427$ U/ml) wykazywali niższą aktywność elastolityczną niż chorzy podgrupy I z najniższymi wartościami aktywności AAT ($< 0,610$). Poza tym aktywność elastolityczna surowicy pacjentów podgrupy II i III pozostawała obniżona także w porównaniu z grupą kontrolną. Zaobserwowano także, że pacjenci podgrupy III posiadają najwyższy wskaźnik wartości BMI. Stężenie hsCRP nie różniło się pomiędzy grupami ani w odniesieniu do grupy kontrolnej.

W każdej z analizowanych podgrup stwierdzono podwyższone stężenie MDA, ale tylko w podgrupie I i II różnica ta była istotna statystycznie w porównaniu z grupą kontrolną. Analogiczną sytuację zaobserwowano w przypadku stężenia kwasu moczowego, którego istotny spadek odnotowano u pacjentów z najniższą oraz pośrednią aktywnością AAT w porównaniu z osobami zdrowymi. W przypadku CZA surowicy nie wykazano żadnych zmian w jej wartościach między podgrupami ani w odniesieniu do grupy kontrolnej.

W stosunku do kontroli, obniżone stężenie sVE-kadheryny wykazano w podgrupie I i III, natomiast wartości stężeń sTM nie różniły się istotnie statystycznie w żadnej z rozpatrywanych podgrup.

Tabela 19. Podsumowanie ocenianych parametrów po podziale pacjentów na kwartyle ze względu na aktywność AAT.

	Aktywność AAT (U/ml)				p
	Kontrola	Podgrupa I kwartyl I (akt. AAT < 0,610)	Podgrupa II kwartyl II i III (akt. AAT 0,610-1,427)	Podgrupa III kwartyl IV (akt. AAT > 1,427)	
Wiek	41,9±8,6	45,7±8,4	45,6±11,3	40,9±8,1	0,180
BMI		22,52±3,80	25,17±4,89	28,20±6,77 ^a	0,038
%C4C5C6		30,76	59,26	27,27	0,096
Czas trwania choroby		10 (5-16)	11 (8-20)	10 (5-19)	0,614
hsCRP (mg/l)	1,63 (0,17-2,40)	0,99 (0,63-1,94)	1,16 (0,28-2,98)	2,20 (0,11- 4,77)	0,845
Stężenie NE (ng/ml)	44 (26-85)	54 (15,50-78,50)	59 (26,50-109,80)	52,50 (12,50-52,50)	0,893
Akt. elastolit. (U/ml)	0,736 (0,099-1,253)	0,696 (0,325-1,025)	0,457 ^b (0,219-0,875)	0,338 ^{b,*} (0,151-0,542)	0,014
MDA (nmol/ml)	2,96 (2,13-4,06)	4,04 ^c (2,75-5,72)	3,78 ^c (2,91-5,10)	3,26 (2,62-3,93)	0,038
Kw. Moczowy (μM)	309±77	245±53 ^d	242±63 ^d	286±106	0,003
CZA (μM Trolox equiv.)	722±118	674±127	735±124	760±155	0,379
sVE-kadheryna (ng/ml)	38,92 (35,92-42,11)	27,11 ^e (23,30-32,29)	32,96 (27,11-40,44)	26,68 ^e (24,48-28,97)	<0,0001
sTM (ng/ml)	1,23 (0,88-1,93)	1,51 (1,10-2,53)	1,50 (1,10-2,35)	1,16 (0,81-1,41)	0,392

^a Podgrupa III vs podgrupa I i II. ^b podgrupa II i III vs kontrola, ^{*} podgrupa III vs podgrupa I, ^c podgrupa I i II vs kontrola, ^d podgrupa I i II vs. kontrola, ^e podgrupa I i III vs kontrola.

7. Dyskusja

Głównym czynnikiem rozwoju PNŻ są zaburzenia mechanizmów powrotu żylnego prowadzące do powstania zastoju żylnego, odpowiedzialnego za wzrost ciśnienia żylnego. Zastój żylny i nadciśnienie żylnie uniemożliwiają efektywną wymianę gazową w obrębie kończyn dolnych, przyczyniając się do obniżonego transportu tlenu z krwi do tkanek i pojawienia się hipoksji. Coraz częściej pojawiają się przypuszczenia, że hipoksja w obrębie kończyn dolnych jest istotnym czynnikiem odpowiedzialnym za rozwój przewlekłego stanu zapalnego, który z kolei przyczynia się do patologicznej przebudowy naczynia żylnego [138,139].

W wyniku hipoksji dochodzi do wzmożonego wydzielania przez monocyty i makrofagi cytokin prozapalnych takich jak interleukina 1 β (IL-1 β), interleukina 6 (IL-6) oraz TNF- α [140]. U pacjentów z PNŻ stwierdzono ich lokalny wzrost we krwi pobranej z kończyny dolnej objętej procesem chorobowym [140] jak i we krwi obwodowej [141]. Pod wpływem wydzielonych cytokin dochodzi do aktywacji neutrofilów oraz komórek śródbłonka, które uwalniają kolejne mediatory stanu zapalnego oraz wykazują nadmierną ekspresję molekuł adhezyjnych uczestniczących w ich wzajemnych interakcjach. Badania kliniczne przekonują, że nadmierna adhezja neutrofilów do komórek śródbłonka naczyń żylnych u pacjentów z PNŻ jest prawdopodobnie spowodowana wysoką ekspresją na ich powierzchni odpowiednio integryny CD11b/CD18 [3] oraz łączącej się z nią śródbłonkowej glikoproteiny ICAM-1 [142]. Jak zostało to opisane w podrozdziale 2.1.4., nadmierne przyleganie leukocytów do ściany żyłnej może być pierwszym etapem w złożonym procesie jej patologicznej przebudowy.

W monitorowaniu ogólnoustrojowych stanów zapalnych wykorzystuje się białko C-reaktywne (*C-reactive protein*, CRP) produkowane głównie w wątrobie pod wpływem IL-6. Oznaczania białka CRP metodą ultra czułą (*high sensitive*, hs), umożliwia pomiar jego stężenia w zakresie niskich, prawidłowych wartości i jest przydatne w ocenie słabo nasilonego zapalenia, towarzyszącego niektórym jednostkom chorobowym [143]. Wzrost stężenia hsCRP został szeroko udokumentowany w rozwoju miażdżycy [144,145] czy cukrzycy typu II [146], natomiast dużo słabiej poznane jest zachowanie się tego białka w przebiegu PNŻ.

W badaniach własnych nie stwierdzono zmian w stężeniu hsCRP u pacjentów z PNŻ, ani jego korelacji ze stopniem zaawansowania czy czasem trwania choroby. Podobne wyniki uzyskał Yasim i in., którzy analizowali stężenie CRP w surowicy krwi 25 pacjentów z

pierwotnymi żyłakami kończyn dolnych, nie stwierdzając żadnych istotnych zmian w tym parametrze w porównaniu ze zdrowymi ochotnikami. W tej samej grupie pacjentów autorzy wykazali podwyższone stężenie innego markera stanu zapalnego - interleukiny 12 (IL-12), cytokiny biorącej udział w aktywacji monocytów, makrofagów oraz komórek NK (*natural killer*) [147]. Blomgren i in. ocenie poddali stężenie CRP, dzieląc pacjentów na 4 grupy: chorych z żyłakami, z żyłakami i towarzyszącymi im zmianami skórnymi, wygojonymi lub czynnymi owrzodzeniami. W żadnej z rozpatrywanych grup autorzy pracy nie zaobserwowali wzrostu stężenia CRP w odniesieniu do grupy kontrolnej [148].

Mimo, że CRP jak wynika z przeprowadzonych badań, nie jest właściwym parametrem w monitorowaniu stanu zapalnego towarzyszącego PNŻ, zmiany w jego stężeniu mogą poprzedzać wystąpienie niewydolności w obrębie układu żylnego, zwłaszcza tej o charakterze wtórnym, będącej powikłaniem żylną chorobą zakrzepowo-zatorową. Dowodów na to dostarczyły badania Krigera i in., których celem było oznaczenie stężenia białka CRP, D-dimerów oraz reologicznych parametrów krwi u chorych bezpośrednio po przebyciu zakrzepicy oraz powiązanie ich z ostatecznym wynikiem klinicznym [149]. Bezpośrednio po rozpoznaniu zakrzepicy u badanych odnotowano zwiększone stężenie CRP i D-dimerów, nasiloną agregację erytrocytów, zwiększone stężenie fibrynogenu i leukocytozę. Po upływie średnio 28 miesięcy od wystąpienia zakrzepicy dokonano u nich oceny klinicznej, obliczając wskaźnik zaawansowania żylnego stanu klinicznego (VCSS - *venous clinical severity score*). Tylko stężenie CRP i agregacja erytrocytów korelowały z ciężkością stanu niewydolności żylną wyrażoną w skali VCSS.

W patogenezie PNŻ kluczową rolę przypisuje się neutrofilom, które w wyniku nadmiernej adhezji do ściany żylną ulegają aktywacji, uwalniając do przestrzeni zewnątrzkomórkowej RFT i enzymy proteolityczne [150,151]. Niekontrolowane wydzielanie przez neutrofile wymienionych metabolitów może prowadzić do zaburzeń w funkcji i strukturze śródbłonna, skutkujących niekorzystnymi zmianami w obrębie dalszych warstw naczynia żylnego. Neutrofile wyizolowane z krwi zastoinowej żyłaków jak i krwi obwodowej pacjentów z PNŻ, wykazują zdolność wzbudzania chemiluminescencji zależnej od luminolu, świadczącej o ich wzmożonym metabolizmie tlenowym [150]. Prawdopodobnie w procesie zależnym od jonów wapnia, neutrofile uwalniają RFT, głównie anionorodnik ponadtlenkowy, zdolny do utleniania ważnych biomolekuł tj. lipidów, białek czy DNA [151,152]. Nasilona produkcja RFT może prowadzić do zaburzeń w równowadze oksydacyjno-antyoksydacyjnej i rozwoju stresu oksydacyjnego, który ocenia się poprzez pomiar stężenia produktów utleniania biocząsteczek obecnych w organizmie [84].

W niniejszych badaniach w osoczu pacjentów niezależnie od stopnia ciężkości objawów klinicznych i czasu trwania choroby wykazano podwyższone stężenie MDA, markera utleniania nienasyconych kwasów tłuszczowych. Uzyskane wyniki przekonują, że już w najwcześniejszym stadium rozwoju PNŻ może dochodzić do nasilenia procesów oksydacyjnych, skutkujących rozwojem stresu oksydacyjnego i wzrostem stężenia jego wykładników. Podobne wnioski sformułowali Kózka i in., którzy zaobserwowali wysokie stężenie MDA w osoczu krwi obwodowej pacjentów ze zdiagnozowaną PNŻ w stopniu 2 i 3 według CEAP [153]. Poprzez wykazanie wyższego stężenia MDA we krwi zastoinowej uzyskanej z żyłki w porównaniu z krwią obwodową tych samych chorych, autorzy zwrócili także uwagę na lokalne nasilenie procesów wolnorodnikowych w obrębie objętych stanem chorobowym, kończynach dolnych. Wysokie stężenie produktów utleniania nienasyconych kwasów tłuszczowych odnotowano także w homogenatach tkankowych żył odpiszczelowych pacjentów z żyłkami oraz owrzodzeniami kończyn dolnych [154,155].

O zaburzeniach w równowadze oksydacyjno-antyoksydacyjnej może świadczyć nie tylko wzrost stężenia MDA, ale obserwowany równolegle spadek stężenia kwasu moczowego w surowicy pacjentów z PNŻ. Kwas moczowy należy do endogennych antyoksydantów i odpowiada za ponad 50% aktywności antyoksydacyjnej osocza krwi [156]. Dodatnia korelacja między stężeniem kwasu moczowego a wartością całkowitej zdolności antyoksydacyjnej surowicy (CZA) zaobserwowana w niniejszych badaniach zarówno w grupie pacjentów jak i osób zdrowych, potwierdza silną zależność i wzajemne powiązanie tych dwóch parametrów. Obniżone stężenie kwasu moczowego może świadczyć o jego zużyciu w wyniku nasilenia procesów oksydacyjnych. Przypuszczenie to potwierdza stwierdzone w cięższym stadium klinicznym PNŻ niskie stężenie kwasu moczowego korelujące z wysokim stężeniem MDA. Podobne wnioski w swoich badaniach sformułowali James i in., którzy w płynie drenażowym pacjentów z owrzodzeniami kończyn dolnych, wykazali podwyższone stężenie allantoiny, produktu nieenzymatycznego utlenienia kwasu moczowego [157].

Zmniejszenie stężenia kwasu moczowego nie przekłada się jednak na wartość potencjału antyoksydacyjnego krwi, co wykazano w niniejszych badaniach poprzez brak istotnej statystycznie różnicy w wartości CZA surowicy pacjentów z PNŻ w porównaniu z osobami zdrowymi. Zjawisko to jest trudne do interpretacji, można jednak założyć, że zapewnienie skutecznej obrony organizmu przed RFT wymaga zrekompensowania niedoboru jednego z antyoksydantów wzrostem syntezy i/lub aktywności innych, przez co potencjał antyoksydacyjny płynów ciała utrzymuje się na względnie stałym poziomie.

Jak wykazano w badaniach własnych stres oksydacyjny nie ulega nasileniu mimo wzrostu ciężkości objawów klinicznych PNŻ czy czasu trwania choroby. Potwierdził to brak istotnych różnic w stężeniu ocenianych parametrów równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej między pacjentami z łagodną i ciężką postacią kliniczną PNŻ, jak i między tymi chorującymi krócej (≤ 10 lat) i dłużej (> 10 lat). Ponadto wykazano, że procesy oksydacyjne mogą odgrywać istotną rolę w patogenezie PNŻ, głównie u osób płci żeńskiej. Porównując pacjentki i pacjentów z PNŻ, odpowiednio ze zdrowymi osobami płci żeńskiej lub męskiej, tylko w przypadku kobiet z PNŻ zaobserwowano podwyższone osocze stężenie MDA i towarzyszący mu niższe stężenie kwasu moczowego. Większa podatność kobiet na działanie stresu oksydacyjnego może wynikać z mniejszej skuteczności bariery antyoksydacyjnej ich ustroju. Świadczy o tym wykazane w niniejszych badaniach zmniejszone stężenie kwasu moczowego oraz obniżony potencjał antyoksydacyjny surowicy krwi kobiet w porównaniu z mężczyznami, odnotowany zarówno w grupie badanej jak i kontrolnej.

Aktywowane stanem zapalnym neutrofile stają się nie tylko źródłem RFT, ale także licznych proteaz. Jedną z nich jest neutrofilowa elastaza (NE) uwalniania z ziarnistości azurofilnych. Dotychczasowe doniesienia potwierdzają udział NE w formowaniu się blaszki miażdżycowej [158], tętników aorty [159] oraz rozwoju mikro- i makroangiopatii cukrzycowych [160]. Sugeruje się, że aktywność proteolityczna NE może odpowiadać także za zmiany w obrębie układu żylnego w przebiegu PNŻ, o czym przekonuje wzmożone wydzielanie tej proteazy przez neutrofile wyizolowane z krwi obwodowej chorych [151,152].

W publikacjach na temat roli NE w rozwoju schorzeń układu krążenia, autorzy ograniczają się jedynie do określenia jej stężenia we krwi lub innych płynach ciała, nie uzyskując informacji na temat aktywnej formy enzymu. Za uszkodzenia w obrębie naczyń krwionośnych może odpowiadać tylko wolna, nie związana ze swoim inhibitorem NE, wykazująca zdolność proteolizy szerokiego spektrum białek macierzy zewnątrzkomórkowej. Ze względu na fakt, że aktywność proteolityczna NE ujawnia się w warunkach deficytu ilościowego a częściej jakościowego jej inhibitora - alfa-1-antytrypsyny (AAT), wnikliwa ocena ich wzajemnych relacji może wyjaśnić faktyczny udział NE w patogenezie PNŻ. Problem ten został podjęty w przedstawionych badaniach poprzez wyznaczenie aktywności AAT równoległe z oceną stężenia i aktywności NE w surowicy/osoczu krwi chorych.

U pacjentów z PNŻ wykazano tendencję zwiększanie stężenie NE wraz z nasileniem stopnia ciężkości objawów klinicznych PNŻ, która okazała się jednak statystycznie nieistotna. Odmienne wyniki uzyskał Shields i in., którzy oceniając stężenie NE w osoczu pacjentów w różnym stadium klinicznym choroby, wykazali jej istotny wzrost we wszystkich rozpatry-

wanych grupach, a więc u pacjentów z żylakami, lipodermatosklerozą i czynnymi owrzodzeniami kończyn dolnych [161]. Wytlumaczeniem tych rozbieżności może być niższa niż w badaniach własnych liczebność pacjentów zakwalifikowanych przez cytowanych autorów do poszczególnych grup.

Analiza korelacji między stężeniem NE a czasem trwania choroby, przy przyjętym okresie czasu różniącym badane grupy chorych, dowiodła, że w ciągu pierwszych 10 lat stężenie NE maleje wraz z czasem trwania choroby, natomiast w okresie dłuższym niż 10 lat stężenie proteazy zaczyna wzrastać w miarę jak czas trwania choroby wydłuża się. Mimo tego odmiennego trendu, nie wykazano różnic w stężeniu NE między pacjentami chorującymi krócej (≤ 10 lat) lub dłużej (> 10 lat), ani w odniesieniu do osób zdrowych.

W celu uzyskania informacji na temat wolnej formy enzymu, potencjalnie zdolnej do degradacji komponentów ściany żyłnej, ocenie poddano aktywność elastolityczną surowicy pacjentów z PNŻ. Wykazano mniejszą aktywność elastolityczną surowicy w całej badanej grupie chorych, a po uwzględnieniu postaci klinicznej i czasu trwania u tych z łagodnymi objawami klinicznymi i krótszym czasem trwania PNŻ (≤ 10 lat). Biorąc pod uwagę płeć pacjentów, obniżone wartości aktywności elastolitycznej obserwowano wyłącznie w grupie mężczyzn z PNŻ. Niniejsze wyniki nie potwierdzają badań Strvtinova i in., którzy w osoczu pacjentów z PNŻ w stopniu 2, 3 i 4 według CEAP odnotowali podwyższoną aktywność elastolityczną w porównaniu ze zdrowymi ochotnikami [151]. Autorzy analizowali aktywność elastazy we krwi 26 pacjentów w przedziale wiekowym 33-79 lat, ze średnią wieku 52,4 lata. W badaniach własnych grupa pacjentów była większa ($n=58$), średnia wieku wynosiła 44,6 lat, a przedział wiekowy wahał się od 26 do 65 lat. Ze względu na fakt, iż z wiekiem aktywność elastazy we krwi rośnie [162], udział starszych pacjentów w badaniach autorów, mógł w równej mierze jak ich zmniejszona liczebność rzutować na otrzymane przez nich wyniki i tłumaczyć obserwowane rozbieżności.

Aktywność elastolityczną oceniano także w zmienionej żyłakowato ścianie żyły odpiszczelowej, a wyniki przedstawione w piśmiennictwie pokazują brak wspólnych obserwacji. Gandhi i in. nie wykazali różnic w aktywności elastolitycznej w tkankach uzyskanych z żyłaka w porównaniu z prawidłową żyłą odpiszczelową [163], natomiast Urbanova i in. odnotowali istotny jej spadek [164]. Należy jednak zaznaczyć, że za aktywność elastolityczną obserwowaną w ścianie żyłnej w cytowanych badaniach odpowiadały prawdopodobnie w głównej mierze metaloproteinazy wydzielane przez makrofagi oraz komórki śródbłonna, w mniejszym zaś stopniu NE.

Badania własne oraz te pochodzące z części cytowanych prac, wskazują na obniżoną aktywność wybranych proteaz we krwi obwodowej i ścianie żyłnej pacjentów i poddają w wątpliwość postulowane mechanizmy degradacji składników macierzy zewnątrzkomórkowej ściany żyłnej jako przyczynę rozwoju PNŻ [165,166,167]. Przekonują, że równowaga między proteazami a antyproteazami w organizmie chorych przesunięta jest raczej na korzyść tych drugich. W celu potwierdzenia tego przepuszczenia w przedstawionej pracy ocenie poddano aktywność głównego inhibitora proteaz serynowych, AAT. Wykazano jednoznacznie, że obniżeniu aktywności elastolitycznej towarzyszy wzrost aktywności AAT w osoczu chorych. U pacjentów z najwyższymi wartościami aktywności AAT ($> 1,427$ U/ml) obserwowano największy spadek aktywności elastolitycznej surowicy. Ponadto stwierdzono, że we wczesnym stadium rozwoju choroby spadek aktywności elastolitycznej jest ściśle skorelowany ze wzrostem aktywności AAT.

Oceniając aktywność elastolityczną surowicy pacjentów wykorzystano syntetyczny peptyd N-sukcynylo-trialanylo-p-nitroanilid. Należy wziąć pod uwagę, że poważnym ograniczeniem tej metody jest niska specyficzność użytego substratu, która nie pozwala jednoznacznie ustalić jaki udział w jego degradacji ma elastaza pochodzenia neutrofilowego. Odnotowana w badaniach niska aktywność elastolityczna skorelowana ze wzrostem aktywności AAT, sugeruje jednak, że za obniżoną zdolność proteolityczną surowicy chorych może w dużym stopniu odpowiadać spadek aktywnej formy NE.

Wysoka wartość aktywności AAT, która odzwierciedla stężenie funkcjonalnie aktywnych cząsteczek inhibitora wynika prawdopodobnie z nadmiernej syntezy tego białka. Ze względu na fakt, że AAT należy do białek ostrej fazy, stan zapalny towarzyszący PNŻ może stymulować hepatocyty do jego produkcji [168]. Sugeruje to lepszą przydatność AAT jako wykładnika procesu zapalnego w przebiegu PNŻ w porównaniu z hsCRP w przypadku którego, jak wykazano wcześniej, nie obserwowano żadnych różnic w stężeniu we krwi pacjentów w porównaniu z osobami zdrowymi. Dotychczasowe doniesienie przekonują, że wzrostowi stężenia AAT może sprzyjać także nadwaga [169,170]. Potwierdza to stwierdzona w niniejszych badaniach dodatnia korelacja między AAT i wskaźnikiem masy ciała (BMI) oraz przekraczająca zakres normy wartość BMI ($28,20 \pm 6,77$) obserwowana u pacjentów z najwyższymi wartościami aktywności AAT w osoczu krwi ($> 1,427$ U/ml). Prawdopodobnie liczne adipokiny wydzielane przez tkankę tłuszczową osób z podwyższoną masą ciała, inicjują odpowiedź immunologiczną organizmu, przez co zwiększa się stężenie białek ostrej fazy oraz wzrasta ryzyko rozwoju zespołu metabolicznego, insulinooporności oraz powikłań sercowo-naczyniowych, w tym PNŻ [171].

Mimo, że w badaniach własnych w osoczu pacjentów z PNŻ nie stwierdzono istotnych zmian w stężeniu NE w odniesieniu do grupy kontrolnej, obserwowano duże różnice między pacjentami. U chorych należących do kwartyła o najwyższych wartościach stężenia NE, wykazano najsilniejszą aktywność AAT i jednocześnie największy spadek aktywności elastolitycznej. Ponadto po upływie 10 lat trwania choroby stwierdzono, że wyższe stężenie NE koreluje dodatnio ze wzrostem aktywności AAT, natomiast ujemnie z aktywnością elastolityczną surowicy. Obserwacje te mogą świadczyć o bezpośrednim wpływie NE na syntezę jej głównego inhibitora, procesie opisanym po raz pierwszy w badaniach Perlmuttera'a i in. [172]. Zgodnie z mechanizmem zaproponowanym przez autorów pracy, rosnące stężenie NE powoduje zwiększoną syntezę i uwalniania AAT głównie przez monocyty krwi obwodowej, prowadząc do inhibicji samego enzymu. Nie wykluczone, że podobne zjawisko symultanicznego wzrostu stężenia obu białek może zachodzić w przebiegu PNŻ. Potwierdzenie tej hipotezy wymaga jednak dalszych badań, zwłaszcza tych z użyciem technik biologii molekularnej, które pozwoliłyby ocenić wpływ NE na poziom ekspresji genu AAT w monocytach krwi obwodowej pacjentów z PNŻ.

W miarę nasilania się stopnia ciężkości objawów klinicznych PNŻ, skuteczność AAT w hamowaniu aktywności proteolitycznej NE może ulec osłabieniu. Świadczy o tym najwyższa wartość aktywności elastolitycznej stwierdzona w grupie pacjentów z największym odsetkiem tych w cięższym stadium klinicznym PNŻ, u których jednocześnie wykazano najniższą aktywność AAT osocza krwi. Obserwowane w tej samej grupie chorych wysokie stężenie MDA, przekonuje, że za spadek aktywności AAT mogą odpowiadać RFT. Dotychczasowe doniesienia wskazują, że RFT powodują utlenienie kluczowej dla właściwości inhibitorowych AAT metioniny w pozycji 351 lub 358 łańcucha polipeptydowego białka [13]. Skutkiem tej oksydacyjnej modyfikacji jest mniejsza skuteczność AAT w hamowaniu aktywności proteaz serynowych, w tym NE. O ważnej roli stresu oksydacyjnego w sprzyjaniu proteolitycznym właściwościom NE przekonuje także, stwierdzona w niniejszych badaniach dodatnia korelacja między stężeniem MDA a aktywnością elastolityczną surowicy pacjentów.

Rozpatrując całą grupę pacjentów w cięższym stadium klinicznym PNŻ, nie wykazano jednak różnic w medianie aktywności elastolitycznej w porównaniu z osobami zdrowymi. Wynika z tego, że mimo spadku aktywności AAT, który może nasilać się w miarę zaostrzenia się objawów klinicznych PNŻ, ilość funkcjonalnie aktywnych cząsteczek inhibitora pozostaje na tyle duża, iż zapewnia ochronę przed proteolitycznymi właściwościami NE.

Nadmierna ilość inhibitora w stosunku do aktywnej formy enzymu, obserwowana zwłaszcza w początkowym etapie rozwoju PNŻ, może mieć, podobnie jak jego niedobór, po-

ważne konsekwencje. Ze względu na fakt, że NE jest jedną z proteaz, która uczestniczy w metabolizmie składników macierzy zewnątrzkomórkowej, utrzymanie jej aktywności na odpowiednim poziomie warunkuje właściwy skład ilościowy i jakościowy zrębu łącznotkankowego [167].

Składniki macierzy zewnątrzkomórkowej są istotnym elementem naczyń krwionośnych decydującym o ich sprężystości i elastyczności, a także integralności budujących je komórek. Ustalenie swoistej równowagi między szybkością syntezy i szybkością degradacji komponentów macierzy ma decydujące znaczenie dla prawidłowego stanu żył i tętnic. W schorzeniach układu krążenia często obserwuje się przesunięcie równowagi na korzyść procesów sprzyjających kumulowaniu się składników macierzy w ścianie naczyń krwionośnych. W miażdżycy tętnic stwierdza się nadmierne odkładanie kolagenu, który może stanowić 60% ogólnej zawartości białek. Podejrzewa się, że kolagen tworzy struktury stanowiące rusztowanie dla zmodyfikowanych lipoprotein, sprzyjających powstawaniu blaszki miażdżycowej [173]. Prawdopodobnie jedną z głównych przyczyn gromadzenia się kolagenu w tętnicach jest jego wzmożona synteza przez migrujące i proliferujące komórki mięśni gładkich [174]. Innym powodem akumulowania się składników macierzy w ścianie naczyń krwionośnych może być ich glikacja, zachodząca szczególnie w przebiegu mikro i makroangiopatii cukrzycowych, zmniejszająca podatność białek na procesy degradacji enzymatycznej [175].

Badania ultrasonograficzne i histochemiczne naczyń żylnych pacjentów z PNŻ wskazują także na zmiany w składzie jakościowym i ilościowym elementów macierzy zewnątrzkomórkowej. W większości przypadków autorzy stwierdzają wzrost zawartości włókien kolagenowych o nieregularnym przebiegu w obrębie *intimy* i *medii* zmienionej żyłakowato żyły odpiszczelowej [1,163,176,177,178], podwyższoną zawartość lamininy oraz fibronektyny [142,179], a w początkowym etapie rozwoju PNŻ zwiększone odkładanie się włókien elastycznych [178,180]. Doniesienia te przekonują, że w przebiegu PNŻ, podobnie jak w miażdżycy tętnic, w ścianie naczyń żylnych dominują procesy kumulowania się składników białkowych. Podejrzewa się, że patologicznemu pogrubieniu ściany żyłnej sprzyjają, obecne w obrazie histopatologicznym, hiperplastyczne i hipertroficzne komórki mięśni gładkich, wykazujące zdolność wzmożonej proliferacji i syntezy elementów macierzy [180]. Innym brany pod uwagę powodem jest dysproporcja między proteazami a ich inhibitorami obniżająca szybkość degradacji elementów macierzy i powodująca ich odkładanie się w ścianie żyłnej. Parra i in. oraz Badier-Commanader i in., w homogenatach ściany żyłnej pacjentów z PNŻ wykazali obniżone stężenie i aktywność metaloproteinazy 2 (MMP-2), skorelowane ze wzrostem stężenia jej inhibitora TIMP-1 [181,182]. Stwierdzono, że proporcja ilościowa

TIMP-1/MMP-2 w homogenatach tkankowych żył pacjentów z PNŻ jest trzykrotnie większa w porównaniu z uzyskaną w ścianie naczyń osób poddawanych zabiegowi wstawienia bypasoów [182]. Aravind i in. w żyłę odpiszczelowej pacjentów z PNŻ, zwłaszcza w jej hipertroficznym proksymalnym odcinku, odnotowali wzrost stężenia inhibitorów metaloproteinaz, takich jak TIMP-2 i TIMP-3 [183].

Badania własne wskazują, że zaburzenia w równowadze proteazowo-antyproteazowej nie ograniczają się tylko do ściany żyłnej ale mogą mieć charakter ogólnoustrojowy. Świadczy o tym relacja między NE a AAT we krwi pacjentów z PNŻ przypominająca tę obserwowaną w ścianie żyłnej między metaloproteinazami a ich inhibitorami. W obu wypadkach inhibitory proteaz znajdują się w przewodzie w stosunku do aktywnej formy enzymu. Niedobór aktywnych proteaz zarówno we krwi jak i samej ścianie żyłnej obniża szybkość degradacji jej białkowych składników. Skutkiem tego może być obserwowany w przebiegu PNŻ zmieniony skład ilościowy i jakościowy elementów macierzy zewnątrzkomórkowej ściany żyłnej, zaburzający prawidłową morfologię i funkcję naczynia żylnego.

Podobne dysproporcje między proteazami a ich inhibitorami odnotowano w przebiegu schorzeń układu krążenia o podłożu miażdżycowym. W 1984 roku Bihari-Verga i in. wykazali podwyższoną aktywność inhibitorową wobec elastazy w surowicy pacjentów z miażdżycą tętnic o różnej lokalizacji [184]. Kilka lat później badania w grupie pacjentów z chorobą niedokrwienną serca, mózgu i kończyn dolnych dowiodły, że wzrost aktywności inhibitorowej wobec elastazy przekłada się na spadek aktywności elastolitycznej surowicy krwi chorych [185]. Zureik i in. przeprowadzając prospektywne badanie kohortowe w populacji 1389 osób w wieku 59-71 lat stwierdzili, że spadek aktywności elastolitycznej surowicy i towarzyszący mu wzrost aktywności inhibitorowej jest niezależnym czynnikiem ryzyka rozwoju blaszki miażdżycowej [186]. Autorzy podejrzewali, że niedobór enzymów o aktywności elastolitycznej może mieć negatywny wpływ na strukturę i rozkład komponentów białkowych ściany tętniczej. Swoje przypuszczenia poparli doniesieniami o korzystnej roli stosowania preparatów zawierających wieprzową elastazę trzustkową w przeciwdziałaniu zmianom miażdżycowym, takim jak degradacja włókien kolagenowych czy sztywnienie ściany tętnic [187,188,189,190].

Przyjmuje się, że w patogenezie PNŻ jednym z ważnych czynników inicjujących proces patologicznego remodelingu ściany żyłnej jest uszkodzenie śródbłonka, ułatwiające migrację elementów morfotycznych krwi do głębiej położonych warstw naczynia żylnego. Badania immunohistochemiczne wskazują na wzmożoną ekspresję na powierzchni śródbłonka cząsteczek adhezyjnych takich jak ICAM-1 oraz VCAM-1, uczestniczących w jego interak-

cyjach z krążącymi leukocytami [142]. We krwi obwodowej pacjentów z PNŻ stwierdza się natomiast podwyższone stężenie biochemicznych wykładników dysfunkcji śródbłonka [147, 191, 192].

Jako marker uszkodzenia śródbłonka w badaniach własnych wykorzystano sTM, stwierdzając istotny wzrost jej stężenia dopiero w cięższym stadium klinicznym choroby, a po uwzględnieniu płci pacjentów, wyłącznie u kobiet. W grupie kobiet z PNŻ uszkodzeniu śródbłonka mogą sprzyjać stwierdzone wcześniej u tej płci zaburzenia w równowadze oksydacyjno-antyoksydacyjnej. U mężczyzn istotniejszą rolę wydaje się odgrywać dysproporcja między aktywną formą elastazy a jej inhibitorem. Prowadzić to może do kumulowania się składników macierzy w ścianie żyłnej, czemu jak wynika z badań histopatologicznych, nie musi towarzyszyć przerwanie ciągłości śródbłonka [1] i tym samym wzrost parametrów jego uszkodzenia.

W schorzeniach związanych z uszkodzeniami w obrębie wyścielającego naczynia śródbłonka w tym miażdżycy tętnic, sepsie, chorobie Behceta, we krwi chorych obserwuje się wzrost stężenia sVE-kadheryny, produktu degradacji błonowej formy białka (VE-kadheryny) [67,68,193]. Za proteolizę VE-kadheryny w obrębie śródbłonkowych połączeń międzykomórkowych i wzrost jej rozpuszczalnej frakcji odpowiadają w głównej mierze proteazy uwalniane przez krążące leukocyty. W stanach patologicznych, którym towarzyszy niekontrolowany wzrost aktywności proteaz, degradacja VE-kadheryny może prowadzić do nieodwracalnych zaburzeń w integralności i przepuszczalności śródbłonka.

W osoczu pacjentów z PNŻ spodziewano się wzrostu stężenia sVE-kadheryny, jednak niezależnie od postaci klinicznej i czasu trwania choroby zaobserwowano istotny jego spadek. Obniżone stężenie sVE-kadheryn, które w grupie mężczyzn korelowało z wysokim stężeniem MDA i hsCRP może sugerować, że obserwowane zjawisko ma związek ze stanem zapalnym i stresem oksydacyjnym towarzyszącym PNŻ. Przekonują o tym badania Aleksander i in., którzy dowiedli, że ekspozycja komórek śródbłonka na działanie H₂O₂ oraz histaminy powoduje silną sekwestrację VE-kadheryny z ich powierzchni [194]. Obniżone stężenie sVE-kadheryny we krwi pacjentów z PNŻ może więc odzwierciedlać zmniejszenie powierzchniowej ekspresji białka pod wpływem cytokin prozapalnych i RFT. Wydaje się więc, że nie tylko proteoliza, ale także szlaki sygnałowe uruchamiane przez czynniki zapalne i stres oksydacyjny mogą odpowiadać za utratę VE-kadheryny w śródbłonkowych połączeniach międzykomórkowych. Jeżeli wysunięte przypuszczenia zostałyby potwierdzone przez badania histochemiczne, można by rozważać spadek powierzchniowej ekspresji VE-kadheryny jako jedną z przyczyn

wzrostu przepuszczalności śródbłonka, odpowiadającą za częstą w PNŻ tendencję do występowania obrzęków kończyn dolnych.

Na podstawie przeprowadzanych badań wykazano, że we wcześniejszym stadium rozwoju PNŻ dochodzi do przesunięcia ustrojowej równowagi NE-AAT na korzyść inhibitora, co prawdopodobnie wyklucza udział NE w proteolitycznej degradacji elementów ściany żyłnej na tym etapie rozwoju choroby. Przebudowie naczyń żylnych w przebiegu PNŻ może sprzyjać stres oksydacyjny pojawiający się w wczesnym stadium i utrzymujący się przez cały okres trwania choroby. Uszkodzenie śródbłonka w przebiegu PNŻ zostało potwierdzone przez wykazany wzrost stężenia sTM w osoczu pacjentów. Z kolei obserwowane w badaniach obniżone stężenia sVE-kadheryny, odzwierciedlające prawdopodobnie niski poziom komórkowej ekspresji tego białka, sugeruje zwiększoną przepuszczalność śródbłonka.

8. Wnioski

1. We wczesnym etapie rozwoju przewlekłej niewydolności żylnej następuje przesunięcie ustrojowej równowagi NE-AAT na korzyść inhibitora, o czym świadczy obniżona aktywność elastolityczna surowicy i towarzyszący jej wzrost aktywności AAT.
2. Czynnikiem sprzyjającym wzrostowi aktywności AAT może być nadmierna masa ciała.
3. Zaburzenia w równowadze oksydacyjno-antyoksydacyjnej, ujawniające się już we wczesnym stadium rozwoju choroby i utrzymujące się w miarę nasilania się objawów klinicznych, świadczą o istotnej roli stresu oksydacyjnego w przebiegu przewlekłej niewydolności żylnej.
4. Wykazana dodatnia korelacja między stężeniem MDA a aktywnością elastolityczną potwierdza wpływ stresu oksydacyjnego na relację NE-AAT.
5. Wzrost stężenia sTM wykazany w cięższym stadium klinicznym przewlekłej niewydolności żylnej może świadczyć o uszkodzeniu śródbłonna naczyń żylnych. Natomiast obniżone osoczowe stężenie sVE-kadheryny, odzwierciedlające jej niską śródbłonkową ekspresję może sugerować wzrost przepuszczalności śródbłonna.

9. Streszczenie

Za istotny czynnik sprzyjający powstawaniu i rozwojowi PNŻ uważa się stan zapalny, aktywujący krążące neutrofile, które w odpowiedzi uwalniają do przestrzeni zewnątrzkomórkowej RFT i liczne proteazy. Jedną z wydzielanych przez neutrofile proteaz jest elastaza o szerokim spektrum substratowym, której udział został potwierdzony w patogenezie wielu chorób układu sercowo-naczyniowego. Podejrzewa się, że neutrofilowa elastaza (NE), podobnie jak RFT, bierze udział w uszkodzeniu śródbłonna naczyń żylnych, rozpoczynając w ten sposób złożony proces ich patologicznej przebudowy.

Celem niniejszych badań było określenie relacji między NE a jej głównym inhibitorem alfa-1-antytrypsyną (AAT) oraz ocena parametrów równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej i markerów uszkodzenia śródbłonna we krwi obwodowej pacjentów z PNŻ.

Materiał do badań stanowiło osocze/surowica 58 pacjentów z PNŻ, którzy podzieleni zostali na podgrupy w zależności od postaci klinicznej i czasu trwania choroby. W skład grupy kontrolnej wchodziły 33 osoby bez objawów PNŻ. Stężenie NE i markerów uszkodzenia śródbłonna – sTM oraz sVE-kadheryny wyznaczono przy użyciu testów immunologicznych ELISA. Do pomiaru aktywności NE, AAT, stężenia kwasu moczowego, MDA oraz wartości CZA surowicy chorych wykorzystano metody spektrofotometryczne.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że stężenie NE we osoczu pacjentów nie różni się znacząco w porównaniu ze zdrowymi osobami [Pacjenci z PNŻ: 52,5 (17,38 – 87,63) ng/ml vs grupa kontrolna: 44 (26 – 85), p=0,993]. Natomiast w początkowym etapie rozwoju choroby odnotowano istotnie niższą aktywność elastolityczną [grupa M - 0,422 (0,174-0,785) U/l vs grupa kontrolna - 0,736 (0,447-1,253) U/l, p=0,004; ≤ 10 lat - 0,557 (0,248-0,785) U/l vs grupa kontrolna - 0,736 (0,447-1,253) U/l), p=0,018] skorelowaną ze wzrostem aktywności AAT [grupa M - aktywność elastolityczna: aktywność AAT r=-0,443 p=0,018; ≤ 10 lat - aktywność elastolityczna: aktywność AAT r=-0,422 p=0,040] Niezależnie od postaci klinicznej PNŻ i czasu trwania choroby we krwi pacjentów wykazano wzrost stężenia MDA [grupa M: 3,84 (2,79-5,31) nmol/ml, grupa S: 3,93 (3,25-5,24) nmol/ml vs kontrola: 2,96 (2,13-4,06) nmol/ml, p=0,004; > 10 lat: 3,89 (3,12-5,24) nmol/ml, ≤ 10 lat: 3,92(2,85-5,35) nmol/ml vs kontrola 2,96 (2,13-4,06) nmol/ml, p=0,008] i towarzyszący mu spadek poziomu kwasu moczowego [grupa M: 246±70 μM, grupa S: 254±77 μM vs kontrola: 309±77 μM, p=0,002; > 10 lat: 240±62 μM, ≤ 10 lat: 258±79 μM vs kontrola: 309±77 μM, p=0,001] W przypadku markerów uszkodzenia śródbłonna, wzrost stężenia sTM, odnotowano

dopiero w cięższym stadium klinicznym PNŻ [grupa S: 1,65 (1,14-2,54) ng/ml vs. kontrola: 1,23 (0,88-1,85) ng/ml, $p=0,035$], natomiast we wszystkich rozpatrywanych grupach chorych wykazano obniżone stężenie sVE-kadheryny [grupa M: 28,05 (24,07-34,02) ng/ml, grupa S: 31,54 (26,37-40,56) ng/ml vs kontrola: 38,92 (35,92-42,11) ng/ml, $p=0,0004$; ≤ 10 lat: 32,20 (25,20-36,88) ng/ml, >10 lat: 27,35 (23,62-36,51) ng/ml vs kontrola: 38,92 (35,92-42,11) ng/ml, $p=0,0004$].

Na podstawie przeprowadzanych badań wykazano, że w początkowym stadium rozwoju PNŻ dochodzi do przesunięcia ustrojowej równowagi NE-AAT na korzyść inhibitora, co prawdopodobnie wyklucza udział NE w proteolitycznej degradacji elementów ściany żyłnej na tym etapie rozwoju choroby. Ocena parametrów stresu oksydacyjnego wykazała istotne zaburzenia w równowadze oksydacyjno-antyoksydacyjnej, pojawiające się już we wczesnym etapie rozwoju choroby i utrzymujące się w miarę nasilania się jej objawów klinicznych. Uszkodzenie śródbłonna w przebiegu PNŻ zostało potwierdzone przez wykazany wzrost stężenia sTM w osoczu pacjentów. Z kolei obserwowane w badaniach zmniejszone stężenia sVE-kadheryny, odzwierciedlające prawdopodobnie niski poziom komórkowej ekspresji tego białka, sugeruje wzrost przepuszczalności śródbłonna.

10. Summary

It is supposed that inflammation, causing leukocyte activation, is one of the major factors responsible for the chronic venous insufficiency (CVI). Activated cells, mainly neutrophils, release reactive oxygen species and some proteases. Neutrophil elastase (NE) represents one of the proteases characterized by broad range of substrate specificity, participating in the pathogenesis of cardiovascular diseases. Some studies indicate the formation of RFT together with an increase in NE activity may play an important role in the endothelial damage during CVI development.

The aim of the present study was to determine the relationship between NE and its inhibitor alpha-1-antitrypsin (AAT) and evaluate parameters of the oxidative stress (MDA concentration, total antioxidant capacity, uric acid concentration) and the markers of endothelial damage (soluble trombospondin-1-TSP-1, soluble VE-cadherin-sVE-cadherin) in the peripheral blood of CVI patients.

The serum/plasma was obtained from 58 CVI patients divided according to disease severity (group M – mild symptoms of CVI, group S – severe symptoms of CVI) and duration (≤ 10 years, > 10 years). The control group consisted of 33 healthy donors without any clinical manifestation of CVI. The NE concentration and markers of endothelial damage – TSP-1 and sVE-cadherin were measured using ELISA tests. Elastase-like activity, AAT and total antioxidant activity as well as MDA and uric acid concentration were determined spectrophotometrically.

Concentration of NE in plasma of CVI patients was observed to be not different in comparison with a healthy control [CVI patients: 52,5 (17,38 – 87,63) ng/ml vs control group: 44 (26 – 85) ng/ml, $p=0,993$]. A significant decrease in the elastase-like activity and an increase in the AAT activity were found in patients with mild clinical symptoms of CVI and shorter duration of disease (≤ 10 years) [elastase-like activity: group M - 0,422 (0,174-0,785) U/l vs control group - 0,736 (0,447-1,253) U/l, $p=0,004$; ≤ 10 years - 0,557 (0,248-0,785) U/l vs control group - 0,736 (0,447-1,253) U/l, $p=0,018$; AAT activity: group M - 1,085 \pm 0,533 U/ml vs control group - 0,805 \pm 0,205 U/ml, $p=0,046$; ≤ 10 years - 1,111 \pm 0,524 U/ml vs control group - 0,805 \pm 0,205 U/ml, $p=0,036$]. Moreover, in these groups of patients, a significant negative correlation between AAT and elastase-like activity was noticed [group M – elastase-like activity:AAT activity $r=-0,443$ $p=0,018$; ≤ 10 years – elastase-like activity:AAT activity $r=-0,422$ $p=0,040$]. An elevated MDA concentration and a low uric acid

level were observed regardless of CVI severity and disease duration [MDA: group M - 3,84 (2,79-5,31) nmol/ml, group S - 3,93 (3,25-5,24) nmol/ml vs control - 2,96 (2,13-4,06) nmol/ml, $p=0,004$; > 10 years - 3,89 (3,12-5,24) nmol/ml, ≤ 10 years - 3,92(2,85-5,35) nmol/ml vs control - 2,96 (2,13-4,06) nmol/ml, $p=0,008$; uric acid: group M - 246 ± 70 μM , group S - 254 ± 77 μM vs control - 309 ± 77 μM , $p=0,002$; > 10 years - 240 ± 62 μM , ≤ 10 years - 258 ± 79 μM vs control - 309 ± 77 μM , $p=0,001$]. The concentration of sTM, a marker of endothelial damage, was increased only in the blood of patients with severe clinical symptoms of CVI [group S: 1,65 (1,14-2,54) ng/ml vs. control: 1,23 (0,88-1,85) ng/ml, $p=0,035$]. A low sVE-cadherin concentration was found in the plasma of all groups of patients [grupa M - 28,05 (24,07-34,02) ng/ml, group S - 31,54 (26,37-40,56) ng/ml vs. control - 38,92 (35,92-42,11) ng/ml, $p=0,0004$; ≤ 10 years - 32,20 (25,20-36,88) ng/ml, >10 years - 27,35 (23,62-36,51) ng/ml vs control: 38,92 (35,92-42,11) ng/ml, $p=0,0004$].

The results obtained in the present study are mostly contradictory to the hypothesis on the potential role of NE in the proteolytic degradation of the vein wall, as they have not shown any increase in the concentration or activity of NE in blood of CVI patients. Reversible correlation between elastase-like activity and AAT activity suggests that NE-AAT balance is rather shifted towards antiprotease. Alterations in the markers of the oxidative stress confirm the important role of reactive oxygen species in CVI pathogenesis even in the earliest stage of disease. A high concentration of sTM implies the occurrence of endothelial damage which is typical of the severe stage of the disease. A decline in blood sVE-cadherin level probably reflect a low expression of this protein at the endothelial cell surface which may be responsible for an increased endothelial leakage.

11. Wykaz stosowanych skrótów

·OH	- <i>hydroxyl radical</i> , rodnik hydroksylowy
AAT	- <i>alpha-1 antitrypsin</i> , alfa-1-antytrypsyna
ARDS	- <i>acute respiratory distress syndrom</i> , ostra niewydolność oddechowa
AT II	- <i>angiotensin II</i> , angiotensyna II
AT III	- <i>antithrombin III</i> , antytrobina III
ATP	- <i>adenosine-5'-triphosphate</i> , adenozyne 5' trifosforan
BAL	- <i>bronchoalveolar lavage</i> , popłuczynach oskrzelikowo-pęcherzykowych
bFGF	- <i>basic fibroblast growth factor</i> , zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów
BMI	- <i>body mass index</i> , wskaźnik masy ciała
cAMP	- <i>3' 5'-cyclic adenosine monophosphate</i> , 3' 5' - cykliczny adenozyneomonofosforan
CEAP	- <i>clinical, etiologic, anatomic, pathophysiologic classification</i>
CIMT	- <i>carotid intima-media thickness</i> , grubość kompleksu intima-media tętnic szyjnych
CRP	- <i>C-reactive protein</i> , białko C-reaktywne
cTM	- <i>circulating trombomodulin</i> , krążąca trombomodulina
CZA	- całkowita zdolność antyoksydacyjna
DNA	- <i>deoxyribonucleic acid</i> , kwas dezoksyrybonukleinowy
EDHF	- <i>endothelium derived hiperpolarizing factor</i> , śródbłonkowy czynnik hiperpolaryzacyjny
EGF	- <i>epidermal growth factor</i> , naskórkowy czynnik wzrostu
fMLP	- <i>N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin</i> , N-formylo-metionilo-leucynofenyloalanina
H ₂ O ₂	- <i>hydrogen peroxide</i> , nadtlenek wodoru
HOCl	- <i>hypochlorous acid</i> , kwas podchlorawy
hsCRP	- <i>high sensitivity C-reactive protein</i> , białko C-reaktywne wysokiej czułości
ICAM-1	- <i>intercellular adhesion molecule-1</i> , cząsteczka międzykomórkowej adhezji-1
IL-1	- <i>interleukin 1</i> , interlukina 1
IL-12	- <i>interleukin 12</i> , interlukina 12
IL-1B	- <i>interleukin 1B</i> , interlukina 1B
IL-6	- <i>interleukin 6</i> , interlukina 6
IL-8	- <i>interleukin 8</i> , interlukina 8
LPS	- <i>lipopolysaccharide</i> , lipopolisacharyd
LTB ₄	- <i>leukotriene B₄</i> , leukotrien B ₄
MDA	- <i>malondialdehyde</i> , dialdehyd malonowy
MMP-1	- <i>metalloproteinase 1</i> , metaloproteinaza 1
MMP-2	- <i>metalloproteinase 2</i> , metaloproteinaza 2
MMP-3	- <i>metalloproteinase 3</i> , metaloproteinaza 3
MMP-7	- <i>metalloproteinase 7</i> , metaloptoteinaza 7
MMP-8	- <i>metalloproteinase 8</i> , metaloproteinaza 8
MMP-9	- <i>metalloproteinase 9</i> , metaloproteinaza 9

NADPH	- <i>nicotine adenine dinucleotide phosphate</i> , fosforan dinukleotydu nikoty-namidoadeninowego
NE	- <i>neutrophil elastase</i> , neutrofilowa elastaza
NF-kB	- <i>nuclear factor kB</i> , czynnik jądrowy kappa
NO	- <i>nitric oxide</i> , tlenek azotu II
O ₂ ⁻	- <i>superoxide anion</i> , anionorodnik ponadtlenkowy
ONOO ⁻	- <i>peroxynitrite</i> , peroksyazotyny
PAF	- <i>platelet activating factor</i> , czynnik aktywujący płytki krwi
PAI-1	- <i>plasminogen activator inhibitor 1</i> , tkankowy inhibitor plazminogenu
PECAM-1	- <i>platelet/endothelial cell adhesion molecule-1</i> , cząsteczka adhezji komórkowej płytek i śródbłonna-1
PGF2 α	- <i>prostaglandin F2α</i> , prostoglandyna F2 α
PGI2	- <i>prostacyclin I2</i> , prostacyklina I2
PNŻ	- przewlekła niewydolność żylna
PSGL-1	- <i>P-selectin glykoprotein ligand 1</i> , glikoproteinowym ligand 1 P-selektyny
PWV	- <i>pulse wave velocity</i> , prędkość aortalnej fali tętna
RFN	- reaktywne formy azotu
RFT	- reaktywne formy tlenu
RNA	- <i>ribonucleic acid</i> , kwas rybonukleinowy
SIRS	- <i>systemic inflammatory response syndrom</i> , ogólnoustrojowa reakcja zapalna
SLPI	- <i>secretory leukocyte peptidase inhibitor</i> , wydzielniczy inhibitor leukocy-tarnej elastazy
sTM	- <i>soluble thrombomodulin</i> , rozpuszczalna trombomodulina
sVE-kadheryna	- <i>soluble vascular endothelial cadherin</i> , rozpuszczalna naczyniowo-sródbłonkowa kadheryna
TF	- <i>tissue factor</i> , czynnik tkankowy
TFPI	- <i>tissue factor pathway inhibitor</i> , inhibitor zależnej od czynnika tkankowe-go drogi krzepnięcia krwi
TIMP-1	- <i>tissue inhibitor of metalloproteinases 1</i> , tkankowy inhibitor metaloproteinaz 1
TIMP-2	- <i>tissue inhibitor of metalloproteinases 2</i> , tkankowy inhibitor metaloproteinaz 2
TIMP-3	- <i>tissue inhibitor of metalloproteinases 3</i> , tkankowy inhibitor metaloproteinaz 3
TM	- <i>thrombomodulin</i> , trombomodulina
TNF- α	- <i>tumor necrosis factor α</i> , czynnik martwicy nowotworów α
t-PA	- <i>tissue plasminogen activator</i> , tkankowy aktywator plazminogenu
TXA2	- <i>thromboxane A</i> , tromboksan A2
u-PA	- <i>urokinase plasminogen activator</i> , urokinazowy aktywator plazminogenu
VCAM-1	- <i>vascular cell adhesion protein 1</i> , cząsteczka adhezji komórkowej naczyń-1
VCSS	- <i>venous clinical severity score</i> , wskaźnik zaawansowania żylnego stanu klinicznego
VEGF	- <i>vascular endothelial growth factor</i> , naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu
VE-kadheryna	- <i>vascular endothelial cadherin</i> , naczyniowo-śródbłonkowa kadheryna
vWF	- <i>von Willebrand factor</i> , czynnik von Willebranda

12. Piśmiennictwo

- [1] Khan AA., Eid RA., Hamdi A. Structural changes in the tunica intima of varicose veins: a histopathological and ultrastructural study. *Pathology*, 2000;32:253-257.
- [2] Wali MA., Eid RA. Inimal changes in varicose vein: an ultrastructural study. *J. Smooth Muscle Res*, 2002;38:63-74.
- [3] Smith PD. Neutrophil activation and mediators of inflammation in chronic venous insufficiency. *J Vasc Res*, 1999;36:24-36.
- [4] Witko-Sarsat V., Rieu P. Descamps-Latscha B. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest*, 2000;80:617-653.
- [5] Thies RL., Autor AP. Reactive oxygen injury to cultured pulmonary artery endothelial cells: mediation by poly (ADP-ribose) polymerase activation causing NAD depletion and altered energy balance. *Arch Biochem Biophys*, 1991;286:353-363.
- [6] Van Wetering S., van Buul JP., Quik S. i in. Reactive oxygen species mediated Rac-induced loss of cell-cell adhesion in primary human endothelial cells. *J Cell Sci*, 2002;115:1837-1845.
- [7] Yang JJ., Kettritz R., Falk RJ. i in. Apoptosis of endothelial cells induced by the neutrophil serine proteases: proteinase 3 and elastase. *Am J Pathol*, 1996;149:1617-1626.
- [8] Ballieux BE., Hiemstra PS., Klar-Mohamed N. i in. Detachment and cytolysis of human endothelial cells by proteinase 3. *Eur J Immunol*, 1994;24:3211-3215.
- [9] Carden D., Xiao F., Moak C. i in. Neutrophil elastase promotes lung microvascular injury and proteolysis of endothelial cadherins. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 1998;275:H385-H392.
- [10] Baker CJ., Fiore A., Connolly AS. i in. Serum elastase and alpha-1-antitrypsin levels in patients with ruptured and unruptured cerebral aneurysms. *Neurosurgery* 1995;37:56-61.
- [11] Sun Z., Yang P. Role of imbalance between neutrophil elastase and alpha-1 antitrypsin in cancer development and progression. *Lancet Oncol*, 2004;5:182-190.
- [12] Stroncek DF., Vercellotti GM., Huh PW. i in. Neutrophil oxidants inactivate alpha-1-protease inhibitor and promote PMN-mediated detachment of cultured endothelium. Protection by free methionine. *Arteriosclerosis* 1986;6:332-340.
- [13] Taggart C., Cervantes-Laurean D., Kim G. i in. Oxidation of Methionine 351 or Methionine 358 in alpha-1-antitrypsin causes loss of anti-neutrophil elastase activity. *J Biol Chem*, 2000;275:27258-27265.

- [14] Porter JM., Moneta GL. Reporting standards in venous disease: an update. *J Vasc Surg*, 1995;21:635-645.
- [15] Adhikari A., Criqui MH., Wooll V. i in. The epidemiology of chronic venous disease. *Phlebology*, 2000;15:2-18.
- [16] Jantet G. RELIEF Study Group: Chronic venous insufficiency: Worldwide results of RELIEF Study. *Angiology*, 2002;53:245-256.
- [17] Grzela T., Jawień A. Epidemiologia przewlekłej niewydolności żyłnej. *Przew Lek*, 2004;8:29-32.
- [18] Komsuoglu B., Goldeli O., Kulan K. i in. Prevalence and risk factors of varicose vein in an elderly population. *Gerontology*, 1994;40:25-31.
- [19] Canonico S., Gallo C., Paolisso G. i in. Prevalence of varicose vein in an Italian elderly population. *Angiology*, 1998;49:129-135.
- [20] Zicot M. Venous disease and pregnancy. *Rev Med Liege*, 1999;54:424-428.
- [21] Evans CJ., Fowkes FG., Ruckley CV. i in. Prevalence of varicose vein and chronic venous insufficiency in men and women in general population: Edinburgh Vein Study. *J Epidemiol Community Health*, 1999;53:149-153.
- [22] Carpentier P., Priollet P. Epidemiology of chronic venous insufficiency. *Presse Med* 1994;23:197-201.
- [23] Marona H., Kornobis A. Patofizjologia rozwoju żylaków oraz wybrane metody ich leczenia – aktualny stan wiedzy. *Farmacja Polska*, 2009;65:88-92.
- [24] Willenberg T., Schumacher A., Amann-Vesti B. i in. Impact of obesity on venous hemodynamics of the lower limbs. *J Vasc Surg*, 2010;52:664-668.
- [25] Scott TE., LaMorte WW., Gorin DR. i in. Risk factors for chronic venous insufficiency: a dual case – control study. *J Vasc Surg*, 1995;22:622-628.
- [26] Antignani PL. Classification of chronic venous insufficiency: a review. *Angiology*, 2001;52:17-26.
- [27] Moor HD. Deep venous valves in the etiology of varicose veins. *Lancet*, 1951;2:7-10.
- [28] Rose SS., Ahmed A. Some thoughts on the aetiology of varicose veins. *J Cardiovasc Surg*, 1986;27:536-563.
- [29] Traverse JP., Brooks CE., Evans J. i in. Assessment of wall structure and composition of varicose veins with reference to collagen elastic and smooth and muscle content. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 1996;II:230-237.
- [30] Venturi M., Bonavina L., Annoni F. i in. Biochemical assay of collagen and elastin in the normal and varicose vein wall. *J Surg Res*, 1996;60:245-248.

- [31] Elsharawy MA., Naim MM., Abdelmaguid EM. i in. Role of saphenous vein wall in the pathogenesis of primary varicose veins. *Interact Cardio Vasc Thorac Surg*, 2007;6:219-224.
- [32] Żmudzińska M., Czarnecka-Operacz M. Przewlekła niewydolność żylna – aktualny stan wiedzy. *Post Dermatol Alergol*, 2005;22:65-69.
- [33] McEwan AJ., McArdle CS. Effect of hydroxyethylrutosides on blood oxygen levels and venous insufficiency symptoms in varicose veins. *Br Med J*, 1971;2:138-141.
- [34] Reikeras O., Sorlie D. The significance of arteriovenous shunting for the development of varicose veins. *Acta Chir Scand*, 1983;149:479-481.
- [35] Arnould T., Michiels C., Remacle J. Increased PMN adherence on endothelial cells after hypoxia: involvement of PAF, CD18/CD11b and ICAM-1. *Am J Physiol*, 1993;264:C11102-C11110.
- [36] Fujii Y., Johanson ME., Gores GJ. Mitochondrial dysfunction during anoxia/reoxygenation injury of liver sinusoidal endothelial cells. *Hepatology*, 1994;20:177-185.
- [37] Yan SF., Ogawa DM., Stern DJ. i in. Hypoxia - induced modulation of endothelial cell properties: regulation of barrier function and expression of interleukin-6. *Kidney Int*, 1997;51:419-425.
- [38] Michelis C., Arnould T., Remacle J. Endothelial cell responses to hypoxia: initiation of a cascade of cellular interactions. *Biochim Biophys Acta*, 2000;1497:1-10.
- [39] Scannell G., Waxman K., Vaziri ND. i in. Hypoxia – induced alteration of neutrophil membrane receptors. *J Surg Res*, 1995;59:141-145.
- [40] Michelis C., Arnould T., Remacle J. Hypoxic human umbilical vein endothelial cells induce activation of adherent polymorphonuclear leukocytes. *Blood*, 1994;83:3705-3716.
- [41] Wnuczko K., Szczepański M. Śródbłonek – charakterystyka i funkcje. *Pol Merk Lek*, 2007;XXIII:60-65.
- [42] Erdbruegger U., Haubitz M., Woywodt A. Circulating endothelial cells: A novel marker of endothelial damage. *Clin Chim Acta*, 2006;373:17-26.
- [43] Dittman WA., Majerus PW. Structure and function of thrombomodulin: a natural anticoagulant. *Blood*, 1990;75:329-326.
- [44] Blann A., Seigneur M. Soluble markers of endothelial cell function. *Clin Hemorheol Microcirc*, 1997;17:3-11.
- [45] William A., Majerus DW., Majerus PW. Structure and function of thrombomodulin: a natural anticoagulant. *Blood*, 1990;75:329-336.

- [46] Seigneur M., Dufourco P., Conri C. i in. Plasma thrombomodulin: new approach of endothelium damage. *Int Angiol*, 1993;12:355-359.
- [47] Ishii H., Majerus PW. Thrombomodulin is present in human plasma and urine. *J Clin Invest*, 1985;76:2178-2181.
- [48] Sawada K., Yamamoto H., Yago H. i in. A simple assay to detect endothelial cell injury; measurement of released thrombomodulin from cells. *Exp Mol Pathol*, 1992;57:116-123.
- [49] Blann AD., Amiral J, McCollum CN. i in. Prognostic value of increased soluble thrombomodulin and increased soluble E-selectin in ischemic heart disease. *Eur J Haematol*, 1997;59:115-120.
- [50] Seigneur M., Dufourcq P., Conri C. i in. Levels of plasma thrombomodulin are increased in atheromatous arterial disease. *Thromb Res*, 1993;71:423-431.
- [51] Dohi Y., Ohashi M., Sugiyama M. i in. Circulating thrombomodulin levels are related to the latent progression of atherosclerosis in hypertensive patients. *Hypertens Res*, 2003;26:479-483.
- [52] Widerkiewicz K., Dzianott-Pabijan D., Masłowska B. i in. Thrombomodulin in the blood of patients with acute cerebral ischaemia. *Adv Clin Exp Med*, 2006;15:271-277.
- [53] Tanaka A., Ishii H., Hiraishi S. i in. Increased thrombomodulin values in plasma of diabetic men with microangiopathy. *Clin Chem*, 1991;37:269-272.
- [54] Reverter JL., Reverter JC., Tassies D. i in. Thrombomodulin and induced tissue factor expression on monocytes are markers of diabetic microangiopathy: a prospective study on homeostasis and lipoproteins in insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Hematol*, 1997;56:93-99.
- [55] Bajaj MS., Tricomi SM. Plasma levels of the three endothelial-specific proteins, von Willebrand factor, tissue factor pathway inhibitor and thrombomodulin do not predict the development of acute respiratory distress syndrome. *Haemostasis*, 1996;26:233-243.
- [56] Endo S., Inada K., Nakae H. i in. Blood levels of endothelin-1 and thrombomodulin in patients with disseminated intravascular coagulation and sepsis. *Res Comm Molec Pathol Pharmacol*, 1995;90:277-288.
- [57] Iwashima Y., Sato T., Watanabe K. i in. Elevation of plasma thrombomodulin level in diabetic patients with early diabetic nephropathy. *Diabetes*, 1990;39:983-988.
- [58] Boffa MC. Considering cellular thrombomodulin distribution and its modulating factors can facilitate the use of plasma thrombomodulin as reliable endothelial marker? *Haemostasis*, 1996;26:233-243.

- [59] Lindahl AK., Boffa MC., Abilgaard U. Increased plasma thrombomodulin in cancer patients. *Thromb Haemost*, 1993;69:112-114.
- [60] Hanly AM., Hayanga A., Winter DC. i in. Thrombomodulin: tumour biology and prognostic implication. *Eur J Surg Oncol*, 2005;31:217-220.
- [61] Dejana E., Orsenigo F., Lampugnani MG. The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J Cell Sci*, 2008;121:2115-2122.
- [62] Shasby DM., Ries DR., Shasby SS. i in. Histamine stimulates phosphorylation of adherens junctions proteins and alters their link to vimentin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2002;282:L1330-L1338.
- [63] Angelini DJ., Hyun SW., Grigoryev DN. i in. TNF- α increases tyrosine phosphorylation of vascular endothelial cadherins and opens the paracellular pathway through fyn activation in human lung endothelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2006;291:L1232-L1245.
- [64] Hudry-Clergeon, Stengel D., Ninio E. i in. Platelet-activating factor increases VE-cadherin tyrosine phosphorylation in mouse endothelial cells and its association with the PtdIns3-kinase. *FASEB J*, 2005;19:512-520.
- [65] Xiao K., Garner J., Buckley K. i in. p-120-Catenin regulates clathrin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Mol Biol Cell*, 2005;16:5141-5151.
- [66] Herren B., Levkau B., Raines E. i in. Cleavage of beta-catenin and plakoglobin and shedding of VE-cadherins during endothelial apoptosis: evidence for a role for caspases and metalloproteinases. *Mol Biol Cell*, 1998;9:1589-1601.
- [67] Soeki T., Tamura Y., Shinohara H. i in. Elevated concentration of soluble vascular endothelial cadherin is associated with coronary atherosclerosis. *Circ J*, 2004;68:1-5.
- [68] Zhang RY., Liu YY., Li L. i in. Increased levels of soluble vascular endothelial cadherin are associated with poor outcome in severe sepsis. *J Int Med Res*, 2010;38:1497-1506.
- [69] Navaratna D., McGuire PG., Menicucci G. i in. Proteolytic degradation of VE-cadherin alters the blood – retinal barrier in diabetes. *Diabetes*, 2007;56:2380-2387.
- [70] Wróbel T., Mazur G., Wolowiec D. i in. sVE-cadherin and sCD146 serum levels in patients with multiple myeloma. *Clin Lab Haem*, 2006;28:36-39.
- [71] Babior BM. Oxidants from phagocytes: agents of defense and destruction. *Blood*, 1984;64:959-966.
- [72] El Benna J., Dang PM., Gougerot-Poscivalo MA. i in. Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. *Arch Immunol Ther Exp*, 2005;53:199-206.
- [73] Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood*, 1999;93:1464-1467.

- [74] Rutkowski R., Pancewicz SA., Rutkowski K. i in. Znaczenie reaktywnych form tlenu i azotu w patomechanizmie procesu zapalnego. *Pol Merk Lek*, 2007;23:131-134.
- [75] Rodenas J., Carbonell T., Mitjavila M. Different roles for nitrogen monoxide and peroxyxynitrite in lipid peroxidation induced by activated neutrophils. *Free Radic Biol Med*, 2000;28:374-380.
- [76] Bishop CT., Mirza Z., Crapo JD. i in. Free radical damage to cultured porcine aortic endothelial cells and lung fibroblasts: modulation by culture conditions. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1985;21:229-236.
- [77] Cho KS., Lee EH., Choi JS. i in. Reactive oxygen species-induced apoptosis and necrosis in bovine corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1999;40:911-919.
- [78] Warren MC., Bump EA., Medeiros D. i in. Oxidative stress-induced apoptosis of endothelial cells. *Free Radic Biol Med*, 2000;29:537-547.
- [79] Sacks T., Charles F., Moldow PR. i in. Oxygen radicals mediate endothelial cell damage by complement-stimulated granulocytes. An *in vitro* model of immune vascular damage. *J Clin Invest*, 1978;61:1161-1167.
- [80] Zapolska-Downar D., Sygitowicz G., Jarosz M. Znaczenie apoptozy w patogenezie miażdżycy. *Kardiol Pol*, 2008;66:347-357.
- [81] Aoki M., Nata T., Morishita R. i in. Endothelial apoptosis induced by oxidative stress through activation of NF- κ B. Antiapoptotic effect of antioxidant agents on endothelial cells. *Hypertension*, 2001;38:48-55.
- [82] Bresgen N., Karlhuber G., Krizbai I. i in. Oxidative stress in cultured cerebral endothelial cells induces chromosomal aberration, micronuclei and apoptosis. *J Neurosci Res*, 2003;72:327-333.
- [83] Sellak H., Franzini E., Hakim J. i in. Reactive oxygen species rapidly increase endothelial ICAM-1 ability to bind neutrophils without detectable upregulation. *Blood*, 1994;83:2669-2677.
- [84] Gawel S., Wardas M., Niedworok E. i in. Dialdehyd malonowy jako wskaźnik procesów peroksydacji lipidów w organizmie. *Wiad Lek*, 2005;57:453-455.
- [85] Radwańska-Wala B., Buszman E., Druźba D. Udział reaktywnych form tlenu w patogenezie ośrodkowego układu nerwowego. *Wiad Lek*, 2008;61:67-73.
- [86] Maxwell SR., Thomason H., Sandler D. i in. Antioxidant status in patients with uncomplicated insulin-dependent and non-insulin dependent diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest*, 1997;27:484-490.

- [87] Davis KJ., Sevanian A., Muakkassah-Kelly SF. i in. Uric acid – iron ions complexes. A new aspects of antioxidant functions of uric acid. *Biochem J*, 1986;235:747-754.
- [88] Lindmark A., Persson AM., Olsson I. i in. Biosynthesis and processing of cathepsin G and neutrophil elastase in the leukemic myeloid cell line U-937. *Blood*, 1990;76:2374-2380.
- [89] Topham MK., Carveth HJ., McIntyre TM. i in. Human endothelial cells regulate polymorphonuclear leukocytes degranulation. *FASEB J*, 1998;12:733-746.
- [90] Rainger GE., Rowley AF., Nash GB. Adhesion-dependent release of elastase from human neutrophils in a novel, flow-based model: specificity of different chemotactic agents. *Blood*, 1998;92:4819-4827.
- [91] Houston DS., Carson CW., Esmon CT. Endothelial cells and extracellular calmodulin inhibit monocyte tumor necrosis factor release and augment neutrophil elastase release. *J Biol Chem*, 1997;272:11778-11785.
- [92] Sinha S., Watorek W., Karr S. i in. Primary structure of human neutrophil elastase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987;84:2228-2232.
- [93] Hajjar E, Broemstrup T, Kantari C i in. Structures of human proteinase 3 and neutrophil elastase-so similar yet so different. *FEBS J*, 2010;277:2238-2254.
- [94] Bode W., Meyer Jr. E., Powers JC. Human leukocyte and porcine pancreatic elastase: x-ray crystal structures, mechanisms, substrate specificity and mechanism-based inhibitors. *Biochemistry*, 1989;28:1951-1963.
- [95] Travis J. Structure, function and control of neutrophil proteinases. *Am J Med*, 1988;84:37-42.
- [96] Strayer L. Biochemia. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2000. Rozdział 9, str 238-240
- [97] Jacob MP., Badier-Commmander C., Fontaine V. i in. Extracellular matrix remodeling in the vascular wall. *Pathol Biol*, 2001;49:326-332.
- [98] Belaaouaj AA., McCarthy R., Baumann M. i in. Mice lacking neutrophil elastase reveal impaired host defense against gram negative bacterial sepsis. *Nat Med*, 1998;4:615-618.
- [99] Garcia R., Gusmani L., Murgia R. i in. Elastase in the only human neutrophil granule protein that alone is responsible for the *in vitro* killing of *borrelia burgdoferi*. *Infect Immun*, 1998;66:1408-1412.
- [100] Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med*, 1989;320:365-376.
- [101] Ariel A., Yavin EJ., Hershkovich R. i in. IL-2 induces T cell adherence and migration by IL-2 peptides generated by leukocyte elastase. *J Immunol*, 1998;161:2465-2472.

- [102] Bank U., Kupper B., Reinhold D. i in. Evidence for crucial role of neutrophil-derived serine proteases in the inactivation of interleukine-6 at sites of inflammation. *FEBS Lett*, 1999;461:235-240.
- [103] Wulfsberg EA., Hoffman DE., Cohen MM. Alpha-1-antitrypsin deficiency: Impact of genetic discovery on medicine and society. *JAMA*, 1994;271:217-222.
- [104] Lomas DA., Perfrey H. Alpha-1-antitrypsin deficiency. Molecular pathophysiology. *Thorax*, 2004;59:529-535.
- [105] Carrell RW. Alpha-1-antitrypsin: molecular pathology, leukocytes and tissue damage. *J Clin Invest*, 1986;78:1427-1431.
- [106] Stoller JK. Aboussouan LS. Alpha-1-antitrypsin deficiency. *Lancet*, 2005;365:2225-2236.
- [107] Dymek G., Madera M., Słomka A. Aktywność α 1-antytrypsyny u osób palących i niepalących oraz w wybranych stanach patologicznych. *Med Biol Sci*, 2008;22:15-20.
- [108] Kabziński J., Kędziora J., Majsterek I. Zastosowanie rekombinowanej alfa-1-antytrypsyny w terapii medycznej. *Pol Merk Lek*, 2010;174:345-350.
- [109] Owen CA., Campbell EJ. The cell biology of leukocyte-mediated proteolysis. *J Leukocyt Biol*, 1999;65:137-150.
- [110] Vignola AM., Bonanno A., Mirabella A. i in. Increased levels of elastase and α 1-antytrypsyny in sputum of asthmatic patients. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998;157:505-511.
- [111] Ueda M., Mashiba S., Uchida K. Evaluation of oxidized alpha-1-antitrypsin in blood as an oxidative stress marker using anti-oxidative α 1-antitrypsin monoclonal antibody. *Clin Chim Acta*, 2002;317:125-131.
- [112] Honda H., Ueda M., Kojima S. i in. Assessment of myeloperoxidase and oxidative α 1-antitrypsin in patients on hemodialysis. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2009;4:142-151.
- [113] Alam S., Mahadeva R. S60 Cigarette smoke induced oxidation of α 1-antitrypsin amplifies the pulmonary inflammatory response. *Thorax*, 2010;65:A27-A32.
- [114] Evans M., Pryor W. Damage of human alpha-1-proteinase inhibitor by aqueous cigarette tar extracts and formation of methionine sulfoxide. *Chem Res Toxicol*, 1992;5:654-660.
- [115] Ogushi F., Hubbard R., Vogelmeier C. i in. Risk factor for emphysema: Cigarette smoking is associated with a reduction in the association rate constant of lung alpha-1-antitrypsin for neutrophil elastase. *J Clin Invest*, 1991;87:1060-1065.
- [116] Weitz JI., Crowley KA., Landman SL. Increased elastase activity in cigarette smokers. *Ann Intern Med*, 1987;107:680-682.

- [117] Janoff A., Raju L., Dearing R. Levels of elastase activity in bronchoalveolar lavage fluids of healthy smokers and nonsmokers. *Am Rev Respir Dis*, 1983;127:540-544.
- [118] Desrochera PE., Jeffrey JJ., Weiss SJ. Interstitial Collagenase (Matrix Metalloproteinase-1) expresses serpinase activity. *J Clin Invest*, 1991;87:2258-2265.
- [119] Margret CM., Vissers PM., Bathurst SO. i in. Cleavage and inactivation of α 1-antitrypsin by metalloproteinases released from neutrophils. *J Clin Invest*, 1988;82:706-711.
- [120] Desrochers PE., Mookhtiar K., Van Wart HE. i in. Proteolytic inactivation of α 1-proteinase inhibitor and α 1-antichymotrypsin by oxidatively activated human neutrophil metalloproteinases. *J Biol Chem*, 1992;267:5005-5012.
- [121] Cantin A., Bilodeau G., Begin R. Granulocyte elastase-mediated proteolysis of alpha-1-antitrypsin in cystic fibrosis bronchopulmonary secretions. *Pediatr Pulmonol*, 1989;7:12-17.
- [122] Sepper R., Konttinen YT., Ingman T. i in. Presence, activities and molecular forms of cathepsin G, elastase, α 1-antitrypsin and α 1 antichymotrypsin in bronchiectasis. *J Clin Immunol*, 1995;15:27-34.
- [123] Campbell EJ., Campbell MA. Pericellular proteolysis by neutrophils in the presence of proteinase inhibitors: effects of substrate opsonization. *J Cell Biol*, 1988;106:667-676.
- [124] Morrison HM., Welgus HG., Stockley RA. i in. Inhibition of human leukocyte elastase bound to elastin: relative ineffectiveness and two mechanisms of inhibitory activity. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1990;2:263-269.
- [125] Owen CA., Campbell MA., Sannes PL. i in. Cell-surface bound elastase and cathepsin G on human neutrophils. A novel, non-oxidative mechanism by which neutrophils focus and preserve catalytic activity of serine proteinases. *J Cell Biol*, 1995;131:775-789.
- [126] Cepinska G., Sandig M., Kvietys RM. PAF induced elastase dependent neutrophil transendothelial migration is associated with the mobilization of elastase to the neutrophil surface and localization to the migrating front. *J Cell Sci*, 1999;112:1937-1945.
- [127] Smedley LA., Tonnesen MG., Sandhause RA. i in. Neutrophil-mediated injury to endothelial cells. *J Clin Invest*, 1986;77:1233-1243.
- [128] Re F., Zanetti A., Sironi M i in. Inhibition of anchorage-dependent cell spreading triggers apoptosis in cultured human endothelial cells. *J Cell Biol*, 1994;127:537-546.
- [129] Hermant B., Bibert S., Concord E. i in. Identification of proteases involved in the proteolysis of vascular endothelium cadherin during neutrophil transmigration. *J Biol Chem*, 2003;278:14002-14012.

- [130] Shamamian P., Schwartz J., Pocock BJ. i in. Activation of progelatinase A (MMP-2) by neutrophil elastase, cathepsin G and proteinase-3: a role for inflammatory cells in tumor invasion and angiogenesis. *J Cell Physiol*, 2001;189:197-206.
- [131] Okada Y., Nakanishi I. Activation of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) and matrix metalloproteinase 2 (gelatinase) by human neutrophil elastase and cathepsin G. *FEBS Lett*, 1989;249:353-356.
- [132] Ferry G., Lonchamp M., Pennel L. i in. Activation of MMP-9 by neutrophil elastase in an *in vivo* model of acute lung injury. *FEBS Lett*, 1997;402:111-115.
- [133] Okada Y., Watanabe S., Nakanishi I. i in. Inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinases by neutrophil elastase and other serine proteases. *FEBS Lett*, 1988;229:157-160.
- [134] Franck C., Byrjalsen I. A simple and sensitive chromogen assay for the measurement of elastase-type enzyme activity in human plasma. *Biol Chem Hoppe-Seyler*, 1988;396:677-682.
- [135] Buege JA., Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Method Enzymol*, 1978;12:302-310.
- [136] Jentsch AM., Bachmann H., Furst P. I in. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radical Bio Med*, 1996;20:251-256.
- [137] Bartosz G., Janaszewska A., Ertel D. i in. Simple determination of peroxy radical trapping capacity. *Biochem Mol Biol Int*, 1998;46:519-28.
- [138] Michiels C., Bouaziz N., Remacle J. Role of endothelium and blood stasis in the development of varicose veins. *Int Angiol*, 2002;21:18-25
- [139] Lim CS., Gohel MS., Shepherd AC. i in. Venous hypoxia: a poorly studied etiological factor of varicose veins. *J Vasc Res*, 2011;48:185-194.
- [140] Signorelli SS., Malaponte MG., Pino LD. i in. Venous stasis causes release interleukin 1 β (IL-1 β), interleukin 6 (IL-6) and tumor necrosis factor alpha (TNF α) by monocyte-macrophage. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2000;22:311-316.
- [141] Allison MA., Cushman M., Callas PW. i in. Adipokines are associated with lower extremity venous disease: the San Diego population study. *J Thromb Haemost*, 2010;8:1912-1918.
- [142] Aunapuu M., Arend A. Histopathological changes and expression of adhesion molecules and laminin in varicose veins. *Vasa*, 2005;34:170-175.
- [143] Pepys MB., Hirschfield GM. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest*, 2003;111:1805-1812.

- [144] Ridker PM., Glynn RJ., Hennekens CH. C-reactive protein adds to the predictive value of total and HDL-cholesterol in determining risk of first myocardial infarction. *Circulation*, 1998;97:2007-2011.
- [145] Piechota W., Piechota W. Correlation of high-sensitivity CRP concentration with the extent coronary atherosclerosis in men with symptoms of ischemic heart disease. *Pol Merkur Lekarski*, 2005;18:511-515.
- [146] Kang ES., Kim HJ., Kim YM. i in. Serum high sensitivity C-reactive protein is associated with intima-media thickness in type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*, 2004;66:S115-S120.
- [147] Yasim A., Kilinc M., Aral M i in. Serum concentration of procoagulant, endothelial and oxidative stress markers in early primary varicose veins. *Phlebology*, 2008;23:15-20.
- [148] Blomgren L., Johansson G., Siegbahn A. i in. Coagulation and fibrinolysis in chronic venous insufficiency. *Vasa*, 2001;30:184-187.
- [149] Krieger E., van Der Loo B., Amann-Vesti BR. i in. C-reactive protein and red cell aggregation correlate with late venous function after acute deep venous thrombosis. *J Vasc Surg*, 2004; 40:644-649.
- [150] Whiston RJ., Hallett MB., Davies EV. i in. Inappropriate neutrophil activation in venous disease. *Br J Surg*, 1994;81:695-698.
- [151] Stvrtinova V., Jahnova E., Weissova S. i in. Inflammatory mechanism involving neutrophils in chronic venous insufficiency of lower limbs. *Bratisl Lek Listy*, 2001;102:235-239.
- [152] Stvrtinova V., Ferencikova J. Lysosomal enzymes and superoxide production in polymorphonuclear leukocytes of patients with primary varicose veins. *Cor Vasa*, 1992;34:255-264.
- [153] Kózka M., Krzyściak W., Pietrzycka A. i in. Obesity and its influence on reactive oxygen species (ROS) in the blood of patients with varicose veins of the lower limbs. *Przegl Lek*, 2009;66:213-217.
- [154] Głowiński J., Głowiński S. Generation of reactive oxygen metabolites by the varicose vein wall. *Eur J Vasc Endovasc*, 2002;23:550-555.
- [155] Karatepe O., Unal O., Ugurlucan M. i in. The impact of valvular oxidative stress on the development of venous stasis valvular oxidative stress and venous ulcers. *Angiology*, 2010;61:283-8.
- [156] De Oliveira EP., Burini RC. High plasma uric concentration: causes and consequences. *Diabetol Metabol Syndr*, 2012;4:1-7.

- [157] James TJ., Hughes MA., Cherry GW. i in. Evidence of oxidative stress in chronic venous ulcers. *Wound Repair Regen*, 2003;11:172-6.
- [158] Amaro A., Gude F., Gonzales-Juanatey JR. i in. Activity of leukocyte elastase in women with coronary artery disease documented using angiography. *J Cardiovasc Risk*, 1995;2:149-153.
- [159] Cohen JR, Parikh S, Grella L i in. Role of neutrophil in abdominal aortic aneurysm development. *Cardiovasc Surg*, 1993;1:373-376
- [160] Piwowar A., Knapik-Kordecka M. Warwas M. Concentration of leukocyte elastase in plasma and polymorphonuclear neutrophil extracts in type 2 diabetes. *Clin Chem Lab Med*, 2000;38:1257-1261.
- [161] Shields DA., Andaz SK., Sarin S. Plasma elastase in venous disease. *Br J Surg*, 1994;81:1496-1499.
- [162] Paczek L., Michalska W., Bartłomiejczyk I. Trypsin, elastase, plasmin and MMP-9 activity in the serum during the human ageing proces. *Age Ageing*, 2008;37:318-323.
- [163] Gandhi RH., Irizarry E., Nackman GB i in. Analysis of connective tissue matrix and proteolytic activity of primary varicose veins. *J Vasc Surg*, 1993;18:814-820.
- [164] Urbanova D., Prerovsky I. Enzymes in the wall of normal and varicose veins. Histochemical study. *Angiologica*, 1972;9:53-61.
- [165] Raffetto JD., Khalil RA. Matrix metalloproteinases in venous tissue remodeling and varicose vein formation. *Curr Vasc Pharmacol*, 2008;6:158-172.
- [166] Raffetto JD., Khalil RA. Mechanism of varicose veins formation: valve dysfunction and wall dilation. *Phlebology*, 2008;23:85-98.
- [167] Jacob MP., Badier-Commander C., Fontein V. i in. Extracellular matrix remodeling in the vascular wall. *Pathol Biol*, 2001;49:326-332.
- [168] Chorostowska-Wynimko J., Popławska B., Janciauskiene S. Alfa-1-antytrypsyna: rola w fizjologii i patologii człowieka. *Int Rev Allergo Clin Immunol Family Med.*, 2012;18:22-28.
- [169] Świątkowska-Stodulska R., Babińska A., Skibowska-Bielińska A. i in. Assessment of alpha-1-antytrypsin and alpha-2-macroglobulin levels in obese patients. *Pol Arch Med Wewn*, 2008;118:713-718.
- [170] Engstrom G., Hedblad B., Stavenow L. i in. Incidence of obesity-associated cardiovascular disease is related to inflammation sensitive plasma proteins: a population-based cohort study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004;24:1498-1502.
- [171] Berg AH., Scherer PE. Adipose tissue, inflammation and cardiovascular disease. *Rev Assoc Med Bras*, 2010;56:116-121.

- [172] Perlmutter DH., Travis J., Punsal PI. Elastase regulates the synthesis of its inhibitor, alpha-1-proteinase inhibitor, and exaggerates the defect in homozygous PiZZ alpha-1 PI deficiency. *J Clin Invest*, 1988;81:1774-1780.
- [173] Kuzan A., Chwiłkowska A., Kobielarz M. Metabolizm kolagenu i jego rola w miażdżycy. *Pol Merk Lek*, 2011;31:114-117.
- [174] Adiguzel E., Ahmad PJ., Franco C. i in. Collagens in the progression and complications of atherosclerosis. *Vasc Med*, 2009;14:73-89.
- [175] Brownlee M. Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annu Rev Med*, 1995;46:223-234.
- [176] Chello M., Mastroberto P., Romano R. i in. Alteration in collagen and elastin content in varicose veins. *Vasc Endovasc Surg*, 1994;28:23-27.
- [177] Wali MA., Eid RA. Changes of elastic and collagen fibers in varicose veins. *Int Angiol*, 2002;21:337-343.
- [178] Renno WM., Saleh F., Wali MA. A journey across the wall of varicose veins: what physicians do not often see with the naked eye. *Med Princ Pract*, 2006;15:9-23.
- [179] Kirsch D., Dienes HP., Kuchle R. i in. Changes in the extracellular matrix of the vein wall-the cause of primary varicosis? *Vasa*, 2000;29:173-177.
- [180] Kirsch D., Schreiber J., Dienes HP. i in. Alteration of the extracellular matrix of venous walls in varicose veins. *Vasa*, 1999;28:95-99.
- [181] Parra JR., Cambria RA., Hower CD. i in. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is increased in saphenofemoral junction of patients with varices in the leg. *J Vasc Surg*, 1998;28:669-675.
- [182] Badier-Commander C., Verbueren T., Lebard C. i in. Increased TIMP/MMP ratio in varicose veins: a possible explanation for extracellular matrix accumulation. *J Pathol*, 2000;192:105-112.
- [183] Aravind B., Saunders B., Navin T. i in. Inhibitory effect of TIMP influences the morphology of varicose veins. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2010;40:754-765.
- [184] Bihari-Verga M., Keller L., Landi A. i in. Elastase type activity, elastase inhibitory activity, lipids and lipoproteins in the sera of patients with ischemic vascular disease. *Atherosclerosis*, 1984;50:273-281.
- [185] Landi A., Bihari-Varga M., Keller L. i in. Elastase-type enzymes and their relation to blood lipids in atherosclerotic patients. *Atherosclerosis*, 1992;93:17-23.

- [186] Zureik M. , Robert L., Courbon D. i in. Serum elastase activity, serum elastase inhibitors, and occurrence of carotid atherosclerosis; the Etude sur le Vieillissement Arteriel (EVA) study. *Circulation*, 2002;105:2638-2645.
- [187] Hayashi K., Takamizawa K., Nakamura T i in. Effects of elastase on the stiffness and elastic properties of arterial walls in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis*, 1987;66:259-267.
- [188] Katsunuma H., Shimizu K., Ebihara T. i in. Anti-atherosclerotic action of elastase – with special references to its effect on elastic fibres. *Age Aging*, 1983;12:183-194.
- [189] Hasegawa M., Arai C., Abe N. i in. A biophysical study of antisclerotic agents-long-term effect of elastase as measured by aortic pulse wave velocity method. *Jpn J Geriatr*, 1984;21:115-123.
- [190] Ooyama T., Sakamoto H. Elastase in the prevention of arterial aging and the treatment of atherosclerosis. *Ciba Found Symp*, 1995;192:307-317.
- [191] Jacob MP., Cazaubon M., Scemama A. i in. Plasma matrix metalloproteinase-9 as a marker of blood stasis in varicose veins. *Circulation*, 2002;106:535-538.
- [192] Cesarone MR., Belcaro G., Pellegrini L i in. Circulating endothelial cells in venous blood as a marker of endothelial damage in chronic venous insufficiency: improvement with venoruton. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2006;11:93-98.
- [193] Habibagahi Z., Habibagahi M., Heidari M. Raised concentration of soluble form of vascular endothelial cadherin and IL-23 in sera of patients with Behcet's disease. *Mod Rheumatol*, 2010;20:154-159.
- [194] Alexander JS., Alexander BC., Eppihimer LA. i in. Inflammatory mediators induce sequestration of VE-cadherin in cultured endothelial cells. *Inflammation*, 2000;24:99-113.

13. Wykaz rycin

- Rycina 1. Obraz histologiczny prawidłowego naczynia żylnego
- Rycina 2. Obraz histologiczny żyły zmienionej żylakowato z pofałdowaną i hipertroficzną warstwą infimy
- Rycina 3. Obraz mikroskopowy patologicznych zmiany w obrębie śródbłonka
- Rycina 4. Metaboliczna i biochemiczna odpowiedź komórek śródbłonka oraz neutrofilów na stan hipoksji
- Rycina 5. Struktura i udział oksydazy NADPH w generowaniu $O_2^{\bullet-}$
- Rycina 6. Powstawanie anionorodnika ponadtlenkowego
- Rycina 7. Powstawanie nadtlenu wodoru
- Rycina 8. Powstawanie kwasu podchlorawego
- Rycina 9. Powstawanie rodnika hydroksylowego
- Rycina 10. Powstawanie nadtlenoazotynów
- Rycina 11. Proces formowania się apoptosomu
- Rycina 12. Hydroliza wiązania peptydowego z udziałem proteazy serynowej
- Rycina 13. Inhibicja NE przy udziale AAT
- Rycina 14. Mechanizmy sprzyjające proteolitycznej aktywności NE w obecności cząstek inhibitora
- Rycina 15. Ujemna korelacja między aktywnością elastolityczną surowicy a stężeniem NE u pacjentów z PNŻ
- Rycina 16. Ujemna korelacja między aktywnością elastolityczną surowicy a aktywnością AAT u pacjentów z PNŻ
- Rycina 17. Stężenie NE w osoczu pacjentów z łagodną (grupa M) i cięższą (grupa S) postacią kliniczną PNŻ
- Rycina 18. Aktywność elastolityczna surowicy pacjentów z łagodną (grupa M) i cięższą postacią (grupa S) kliniczną PNŻ
- Rycina 19. Aktywność AAT surowicy pacjentów z łagodną (grupa M) i cięższą postacią (grupa S) kliniczną PNŻ
- Rycina 20. Stężenie hsCRP surowicy pacjentów z łagodną (grupa M) i cięższą postacią (grupa S) kliniczną PNŻ

-
- Rycina 21. Ujemna korelacja między aktywnością elastolityczną surowic a aktywnością AAT u pacjentów z łagodną postacią kliniczną PNŻ (Grupa M)
- Rycina 22. Dodatnia korelacja między stężeniem NE a aktywnością AAT u pacjentów chorujących na PNŻ > 10 lat
- Rycina 23. Dodatnia korelacja między stężeniem hsCRP a wartością wskaźnika BMI u pacjentów chorujących na PNŻ > 10 lat
- Rycina 24. Stężenie MDA w osoczu pacjentów z PNŻ
- Rycina 25. Stężenie kwasu moczowego w surowicy pacjentów z PNŻ
- Rycina 26. Korelacja między stężeniem MDA a aktywnością elastolityczną u pacjentów z PNŻ
- Rycina 27. Dodatnia korelacja między stężeniem kwasu moczowego a CZA osocza u pacjentów z PNŻ
- Rycina 28. Stężenie MDA w osoczu pacjentów z łagodną (grupa M) i cięższą (grupa S) postacią kliniczną PNŻ
- Rycina 29. Stężenie kwasu moczowego w surowicy pacjentów z łagodną (grupa M) i ciężką (grupa S) postacią kliniczną PNŻ
- Rycina 30. Ujemna korelacja między stężeniem MDA a stężeniem kwasu moczowego u pacjentów z cięższą postacią kliniczną PNŻ (Grupa S)
- Rycina 31. Stężenie kwasu moczowego w surowicy zdrowych i chorych kobiet i mężczyzn
- Rycina 32. CZA surowicy zdrowych i chorych kobiet i mężczyzn
- Rycina 33. Stężenie sVE-kadheryny w osoczu pacjentów z łagodną (grupa M) i cięższą (grupa S) postacią kliniczną PNŻ
- Rycina 34. Stężenie sTM w osoczu pacjentów z łagodną (grupa M) i cięższą (grupa S) postacią kliniczną PNŻ
- Rycina 35. Stężenie sVE-kadheryny w osoczu pacjentów podzielonych ze względu na czas trwania choroby
- Rycina 36. Stężenie sTM w osoczu pacjentów podzielonych ze względu na czas trwania choroby
- Rycina 37. Stężenie sVE-kadheryny w osoczu kobiet z łagodną i cięższą postacią kliniczną PNŻ
- Rycina 38. Stężenie sTM w osoczu kobiet z łagodną i cięższą postacią kliniczną PNŻ

- Rycina 39. Stężenie sVE-kadheryny w osoczu kobiet z PNŻ podzielonych ze względu na czas trwania choroby
- Rycina 40. Stężenie sTM w osoczu kobiet z PNŻ podzielonych ze względu na czas trwania choroby

14. Wykaz tabel

- Tabela 1. Część kliniczna klasyfikacji CEAP
- Tabela 2. Zmiany w budowie histologicznej żyłaka w porównaniu z żyłą prawidłową
- Tabela 3. Zawartość ziarnistości w ludzkich neutrofilach
- Tabela 4. Zmiany biochemiczne i morfologiczne w komórkach wywołane apoptozą lub nekrozą
- Tabela 5. Ocena parametrów równowagi NE-AAT i stężenia hsCRP w całej grupie pacjentów z PNŻ w odniesieniu do grupy kontrolnej
- Tabela 6. Wpływ czasu trwania PNŻ na analizowane parametry równowagi NE-AAT
- Tabela 7. Parametry równowagi NE-AAT i stężenie hsCRP w grupie chorych kobiet (PNŻ-♀) i mężczyzn (PNŻ-♂)
- Tabela 8. Parametry równowagi NE-AAT u kobiet i mężczyzn z PNŻ podzielonych ze względu na postać kliniczną choroby
- Tabela 9. Parametry równowagi NE-AAT u kobiet i mężczyzn z PNŻ podzielonych ze względu na czas trwania choroby
- Tabela 10. Wpływ czasu trwania PNŻ na analizowane parametry równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej
- Tabela 11. Parametry równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej w grupie chorych kobiet (PNŻ-♀) i mężczyzn (PNŻ-♂)
- Tabela 12. Parametry równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej u kobiet i mężczyzn z PNŻ podzielonych ze względu na postać kliniczną choroby
- Tabela 13. Parametry równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej u kobiet i mężczyzn z PNŻ podzielonych ze względu na czas trwania choroby
- Tabela 14. Ocena markerów uszkodzenia śródbłonka w całej grupie pacjentów z PNŻ w odniesieniu do grupy kontrolnej
- Tabela 15. Stężenie markerów uszkodzenia śródbłonka w grupie chorych kobiet (PNŻ-♀) i mężczyzn (PNŻ-♂)
- Tabela 16. Stężenie markerów uszkodzenia śródbłonka u mężczyzn z PNŻ podzielonych ze względu na postać kliniczną i czas trwania choroby
- Tabela 17. Podsumowanie ocenianych parametrów po podziale pacjentów na kwartyle ze względu na stężenie NE.

Tabela 18. Podsumowanie ocenianych parametrów po podziale pacjentów na kwartyle ze względu na aktywność elastolityczną surowicy.

Tabela 19. Podsumowanie ocenianych parametrów po podziale pacjentów na kwartyle ze względu na aktywność AAT.