

Inherited thrombophilia in patients with chronic venous leg ulceration

Wrodzona trombofilia u chorych z owrzodzeniem żylnym podudzi

Adam Wiszniewski¹, Ksenia Bykowska², Wojciech Jaśkowiak¹, Radosław Bilski¹, Jerzy Ratajczak³

¹Department of General and Haematological Surgery, Institute of Haematology and Blood Transfusion, Warsaw, Poland (Klinika Chirurgii Ogólnej i Hematologicznej, Instytut Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie)

²Blood Coagulation Laboratory, Institute of Haematology and Blood Transfusion, Warsaw, Poland (Zakład Hemostazy i Zakrzepic, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, w Warszawie)

³Department of Anaesthesiology and Intensive Care, Institute of Haematology and Blood Transfusion, Warsaw, Poland (Oddział Anestezjologii i Intensywnej Terapii, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, w Warszawie)

Abstract

Background. Chronic venous ulceration (CVU), which is the end stage of the complex of symptoms of chronic venous disease (CVD), is a significant health problem. One of the major causes of CVU is deep venous thrombosis (DVT). Thrombophilia is diagnosed in about 41% of patients with a history of DVT. The aim of this study was to assess the prevalence of inherited thrombophilia (IT) in patients with CVU.

Material and methods. During 24 months, a group of 110 patients with CVU and a group of 110 healthy people were studied. There were no significant differences in age or sex between the two groups. All patients in the study group were assessed as C5 or C6 according to CEAP classification. The patients underwent clinical and Doppler ultrasonography examination. Blood was drawn for antithrombin (AT), protein C (PC) and S (PS), factor V Leiden (VL), prothrombin G20210A (PT), LA, and ACL.

Results. From the group of 110 CVU patients, IT was diagnosed in 33 (30%), LA in 5 (4.5%), and ACL in 12 (10.9%).

Conclusions. Our results suggest that IT might be one of several important thrombotic risk factors which lead to CVU.

Key words: inherited thrombophilia, antiphospholipid antibodies, venous ulcer, deep vein thrombosis

Streszczenie

Wstęp. Owrzodzenie żyłne podudzi (CVU) jest końcowym etapem objawów przewlekłej choroby żyłnej (CVD). Jedną z głównych przyczyn powstawania CVU jest zakrzepica żył głębokich (DVT). Trombofilia, uznana za jeden z głównych czynników ryzyka żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej, jest zaburzeniem mechanizmu hemostazy usposabiającym do zakrzepicy. Trombofilie wykrywa się u 41% chorych z DVT. Celem pracy było ustalenie częstości występowania wrodzonej trombofilii oraz rodzaju występujących wrodzonych czynników ryzyka zakrzepicy: antytrombiny, białka C i białka S, mutacji typu Leiden genu czynnika V i mutacji G20210A genu protrombiny u chorych z owrzodzeniami żylnymi podudzi i nawrotnymi owrzodzeniami żylnymi podudzi oraz ocena ciężkości przebiegu klinicznego owrzodzenia żylnego podudzi u chorych z obecnymi wrodzonymi czynnikami ryzyka zakrzepicy oraz bez takich czynników,

Address for correspondence:

Adam Wiszniewski
ul. Pułku Baszta 4 m 56, 02–649 Warszawa
tel. +48 604 441 651, (+48 22) 349 62 69, (+48 22) 349 62 71
e-mail: adam_wiszni@interia.pl

a także ocena wpływu przeciwciał antyfosfolipidowych na rozwój owrzodzeń żylnych podudzi u chorych z wrodzoną trombofilią i bez niej.

Materiał i metody. W okresie 24 miesięcy przebadano 110 chorych z CVU (C5 i C6 według klasyfikacji CEAP) oraz 110 zdrowych osób. U każdego chorego wykonano dopplerowskie badanie USG układu żylnego, oceniono wartość wskaźnika kostka–ramię, wypełniano kwestionariusz włączenia do badania. Obwodową krew żylną pobierano w celu oznaczenia antytrombiny (AT), białka C (PC) i S (PS), czynnika V Leiden (VL), protrombiny G20210A (PT), antykoagulantu toczeniowego (LA), przeciwciał antykardiolipinowych (ACL).

Wyniki. Z grupy 110 chorych z CVU czynniki ryzyka wrodzonej trombofilii (IT) wykryto u 33 (30%), LA u 5 (4,5%), ACL u 12 (10,9%). Spośród 110 badanych 64 chorych z CVU (58,2%) przebyło DVT potwierdzoną za pomocą badania klinicznego i dopplerowskiego badania USG, w tym u 35 (31,8%) miała ona charakter nawrotowy. Wszyscy chorzy, u których wykryto czynniki ryzyka IT, LA, ACL, przebyli w przeszłości proksymalną i/lub dystalną DVT udokumentowaną dopplerowskim badaniem USG. U 88% chorych z CVU i IT wystąpiła nawrotowa DVT oraz nawrót CVU. U chorych z wrodzoną trombofilią CVU po raz pierwszy pojawiało się w młodszym wieku, utrzymywało się dłużej pomimo stosowania podobnych lub zbliżonych metod leczniczych, charakteryzowało się większą skłonnością do nawrotów w porównaniu z CVU występującym u pacjentów bez wrodzonej trombofilii.

Wnioski. Wyniki przeprowadzonych badań sugerują, że wrodzona trombofilia i nabyte czynniki krzepnięcia, pojedynczo lub współwystępując, mogą być ważnymi czynnikami zakrzepowymi doprowadzającymi do powstania i rozwoju CVU.

Słowa kluczowe: wrodzona trombofilia, przeciwciała antyfosfolipidowe, owrzodzenie żylnie podudzia, zakrzepica żył głębokich

Acta Angiol 2009; 15, 2: 61–83

Introduction

Chronic venous leg ulceration (CVU) is a significant health problem for both patients and physicians. It forms the end stage of the complex of symptoms of chronic venous disease (CVD). Chronic venous leg ulceration affects at least 0.5–2.0% of the adult population (lifetime risk), is associated with a considerable reduction in quality of life, is characterized by low healing and high recurrence (classic surgical and pharmacological treatment of CVU is unsuccessful in about 10–12% of patients), and consumes 1–2% of health care spending in most developed countries [1–4]. According to Polish epidemiological studies, the problem of chronic venous disease concerns 47% of women and 37% of men in Poland, where the vast majority of patients, according to CEAP classification, have progression of the disease and 62% of them do not treat it [5]. Each of year in Poland 60 000 people suffer from deep venous thrombosis (DVT) and 20 000 people die of pulmonary embolism (PE). In Poland 0.5–2.5% of people suffer from CVU [5]. Epidemiological studies in other European countries have estimated the prevalence of severe CVD to be between 5–9%, whereas approximately 1–2% of the general population is affected by venous leg ulceration. The prevalence of venous ulceration is 300 per 100 000 and approximately 25–66% are due

Wstęp

Przewlekła choroba żylna (CVD) jest utrwalonym zaburzeniem odpływu krwi żyłami kończyn dolnych i obejmuje zastój krwi zarówno w żyłach powierzchownych, jak i głębokich. Podstawą patologii w CVD są procesy aktywacji komórek śródbłonna żylnego, gromadzenie się krwinek białych i wydzielanie mediatorów zapalnych. Procesy zapalne i będąca jego konsekwencją przebudowa ścian i zastawek żylnych między innymi w przebiegu zmian pozakrzepowych są głównymi przyczynami niewydolności żył i kolejno ujawniających się objawów choroby [1]. Owrzodzenie żylnie podudzi jest końcowym etapem CVD.

Przewlekłe owrzodzenia żylna, które stanowią 70–80% wszystkich owrzodzeń podudzi są jednym z najistotniejszych i najtrudniejszych problemów terapeutycznych współczesnej medycyny. Szacuje się, że u 1–2% ogólnej populacji w ciągu życia wystąpi jeden lub więcej epizodów owrzodzenia żylnego podudzi. Przewlekłe owrzodzenie żylna przeważnie dotyczy kobiet (3:1), częściowo ze względu na to, że żyją one dłużej [1–3]. Jeśli natomiast częstość występowania owrzodzeń żylnych odniesie się do wieku chorego, to zgodnie z przeprowadzonymi przez Moffatta i wsp. badaniami uzyska się wyniki wskazujące na podobną chorobowość u kobiet i mężczyzn [4]. Roczna częstość wy-

to deep venous thrombosis [1, 6, 7]. In this group of patients, the diagnosis of DVT and post-thrombotic disease has often been based on the history of DVT (“clinical signs and symptoms”) or evidence of postphlebotic changes in the deep venous system in colour Doppler and/or duplex scan ultrasonography. We should remember that to estimate the true number patients with association between CVU and DVT is very difficult because DVT may be subclinical, patients can confuse superficial thrombophlebitis with DVT when giving a history, and colour Doppler and/or duplex scan ultrasonography, which is nowadays a “gold standard” in examination of the venous system, is less sensitive than venography in the detection of minor and/or distal post-thrombotic changes with localization below the knee.

The pathogenesis of the beginning of CVU at the microvascular and macrovascular level remains difficult to define, and it depends on many factors which bring about venous hypertension [8–10]. This is due to venous reflux in the superficial and/or deep venous systems and the degree of deep venous obstruction. Many risk factors have been identified for the development of DVT.

Recent reports have suggested that hypercoagulation states may be an important risk factor for venous leg ulceration. During the last decade, inherited clotting factors have been discovered and found to be of importance for the evolution of DVT. Thrombophilia may be defined as an abnormality of the clotting and/or fibrinolytic cascades that lead to a hypercoagulable state. Thrombophilia may be acquired or inherited and may predispose to arterial and/or venous thrombosis [2, 11, 12]. As DVT is clearly a great risk factor for CVU, there is perhaps a possible direct link between inherited thrombophilia and CVU.

Thrombophilia is diagnosed in about 41% of patients with a history of DVT. The common causes of inherited thrombophilia (IT) are: antithrombin, protein C and protein S deficiencies, factor V Leiden mutation, and prothrombin G20210A mutation [7] (Tables I, II). Antithrombin and protein C and protein S deficiencies can be divided into two types: type I decrease production-synthesis (decrease antigen and its activity) and type II qualitative defect (normal antigen and impaired activity and synthesis abnormal protein) [12–16]. The prothrombin G20210A (PT G20210A) mutation is associated with increased prothrombin blood levels (> 1.15 j/ml) and activation, which presumably explains the increased thrombotic risk. Factor V Leiden (FV Leiden) mutation is associated with a single point mutation, guanine instead of adenine at

stępowania owrzodzeń żylnych (C5 i C6 wg klasyfikacji CEAP) w populacji osób poniżej 45 roku życia określa się na 0,03–0,06%, w populacji osób w wieku 45–65 lat na 2–3%, w populacji osób po 65 roku życia na 4–6%, a w populacji ogólnej na 1–2% [3]. W Polsce czynne owrzodzenia żyłne podudzi występują u około 0,5% dorosłych, zaś czynne lub zagojone u 1,5% [5]. Wartości te zarówno w populacji polskiej, jak i krajów wysoko uprzemysłowionych rosną wykładniczo z wiekiem pacjentów, co sugeruje występowanie większej liczby owrzodzeń żylnych u osób starszych. Można tłumaczyć to tym, że u osób w podeszłym wieku zwiększa się między innymi ryzyko zaburzeń krzepnięcia krwi oraz skłonność do zaburzeń funkcjonowania pompy mięśniowo-powięziowej łydki. Proces starzenia się ścian naczyń żylnych postępuje u obu płci i dotyczy wszystkich odcinków układu żylnego. Wraz z wiekiem grubość ściany żyły zmniejsza się, zwiększa się ilość kolagenu, a warstwy ściany naczynia (szczególnie warstwa wewnętrzna) włóknieją. Zmniejsza się gęstość włókien elastycznych, mięśniówka błony wewnętrznej i środkowej zanika, zaś błona zewnętrzna ulega przerostowi, doprowadzając do różnych etapów rozwoju CVD [6, 7].

Owrzodzenie żyłne podudzi wiąże się z niewydolnością żył przeszywających, powierzchownych lub głębokich, względnie ich kombinacją. Powstaje w wyniku działania różnych mechanizmów, zasadniczo zależnych od podwyższonego ciśnienia żylnego, będącego podstawowym zaburzeniem CVD [8]. W przebiegu rozwijającej się niewydolności żyłnej spowodowanej chorobą żylakową, przebytą zakrzepicą żylną, niewydolnością zastawek, niewydolnością żył w wyniku ucisku dochodzi do wielu zmian w obrębie układu naczyniowego: poszerzenia naczyń, powodującego względną lub pierwotną niewydolność zastawek żylnych, wtórnego przeciążenia, zwolnienia powrotu żylnego, wzrostu ciśnienia żylnego i włócniczkowego, obrzęku, wynaczynienia krwinek, odkładania się okołowłócniczkowo złogów fibryny, zaburzenia o typie przewlekłego stanu zapalnego i niedokrwienia w obrębie powięzi, uszkodzenia włócniczek, mikrolimfangiopatii i niedotlenienia tkanek, doprowadzających w ostateczności do powstania owrzodzenia żylnego podudzia [8, 9].

Pojawiające się liczne teorie dotyczące etiopatogenezy owrzodzeń żylnych podudzi nie wyjaśniają wyczerpująco i całkowicie procesu tworzenia się owrzodzeń żylnych, dlatego też patogeneza ich powstawania na poziomie komórkowym i mikrokrążenia pozostaje wciąż kontrowersyjna i nie jest w pełni zdefiniowana.

Istnieje zgodność co do udziału nadciśnienia żylnego na poziomie makrokrążenia w powstawaniu zmian tro-

Table I. The prevalence of inherited thrombophilia (IT) and relative risk (OR) of venous thromboembolism (VTE) in European countries and caucasian race [18, 19]**Tabela I.** Częstość występowania wrodzonej trombofilii (IT) i ryzyko względne (OR) wystąpienia choroby zakrzepowo-zatorowej (VTE) w krajach europejskich wśród ludności rasy białej [18, 19]

Inherited thrombophilia Wrodzona trombofilia	General population Ogólna populacja	Patients with VTE Chorzy z wywiadem VTE	Risk VTE Ryzyko VTE (OR)
Antithrombin deficiency Niedobór antytrombiny	0.02%	1–7%	5.0
Protein C deficiency Niedobór białka C	0.2–0.4%	3–11%	6.5
Protein S deficiency Niedobór białka S	1.0%	1–13%	2.5
FV Leiden mutation Mutacja typu Leiden genu czynnika V	1–15%	16–40%	Heterozygous Postać heterozygotyczna
Heterozygous Postać heterozygotyczna			5–8
Homozygous Postać homozygotyczna			50–80
Mutacja G20210A genu protrombiny	2.3%	5–7%	Heterozygous Postać heterozygotyczna
Heterozygous Postać heterozygotyczna			2–4
Homozygous Postać homozygotyczna			10

Table II. The prevalence of inherited thrombophilia (IT) in Poland [17, 20–22]**Tabela II.** Częstość występowania wrodzonej trombofilii (IT) w Polsce [17, 20–22]

Inherited thrombophilia Wrodzona trombofilia	In general population Ogólna populacja	In patients with VTE Chorzy z wywiadem VTE
Antithrombin deficiency Niedobór antytrombiny	?	4.7%
Protein C deficiency Niedobór białka C	?	3.8%
Protein S deficiency Niedobór białka S	?	0.9%
FV Leiden mutation Mutacja typu Leiden genu czynnika V	5%	20%
Prothrombin G20210A mutation Mutacja G20210A genu protrombiny	1.8%	6.5%

VTE — venous thromboembolism (żylna choroba zakrzepowo-zatorowa)

nucleotide 1691 in exon X of the factor V gene, which is located on human chromosome 1. The activated form of coagulation factor V plays an important role in the generation of thrombosis. To prevent excessive thrombus formation, the activated form of coagulation factor V is inactivated by APC. This efficient negative feedback mechanism is disturbed in patients

ficznych w obrębie skóry w przebiegu CVD, a następnie w przekształcaniu się ich w owrzodzenie żylnie. Nadciśnienie żylnie powodujące tego typu zmiany zależy od refluku żylnego w systemie żył powierzchownych i/lub głębokich oraz stopnia niedrożności żył głębokich [10].

Wrodzona trombofilia jest to uwarunkowane genetycznie zaburzenie hemostazy usposabiające do wystąpienia zakrzepicy żylniej. Wrodzona trombofilia występuje u 10–15% populacji kaukaskiej (częstość występowania jest różna, w zależności od grupy etnicznej) i aż u 50% osób przed 40 rokiem życia z udokumentowanymi, nawrotowymi incydentami żylniej choroby zakrzepowo-zatorowej (VTE). Wrodzoną i nabytą trombofiliją wykrywa się u 41% pacjentów z wywiadem VTE [2, 11, 12]. Częstość występowania wrodzonej trombofilii przedstawiono w tabelach I i II.

Niedobory naturalnych inhibitorów krzepnięcia krwi (antytrombiny, białka C, białka S), mutację typu Leiden genu czynnika (VL) i mutację G20210A genu protrombiny (PT G20210A) powszechnie uznaje się za czynniki ryzyka wrodzonej trombofilii [12–14]. Białka te z wyjątkiem mutacji genu czynnika VL i mutacji PT G20210A należą do dwóch ważnych układów antykoagulacyjnych krwi (antytrombiny i białka C) hamujących i kontrolujących procesy krzepnięcia krwi. Wszystkie wrodzone niedobory tych białek można podzielić na dwa główne typy: typ I charakteryzujący się obniżeniem syntezy (obniżone jest zarówno stężenie antygeny, jak i jego aktywność) oraz typ II (defekt jakościowy, prawi-

with FV Leiden mutation because the mutation is located on one of the major APC-cleavage sites, leading to so-called APC resistance. Heterozygous FVLeiden mutation increases the risk of venous thrombosis 5- to 7-fold [17–24].

One of a major causes of acquired thrombophilia are antibodies type Lupus (LA) and anticardiolipin antibodies (ACL) IgG.

In an attempt to better characterize the role inherited clotting factors in patients with CVU we performed our study.

The aim of this study was:

- to assess and define the prevalence of inherited thrombophilia in patients with chronic venous and recurrent leg ulceration compared with a healthy group of people selected according to the age and sex of the patients;
- comparison of chronic venous leg ulceration in patient with and without inherited thrombophilia;
- assessment of *Lupus* antibodies (LA) and anticardiolipin antibodies (ACL) influence to chronic venous leg ulceration patient with and without thrombophilia.

Material and methods

During a 24 months period (from March 2004 to March 2006) in the Department of General and Haematological Surgery in Warsaw, a study group of 110 patients (62 women with average age 59.2 and 48 men with average age 64.5) aged 29–86 years (average 63.2) with CVU and 110 healthy people (66 women with average age 58.1 and 44 men with average age 60.6), which formed the control group, were examined. There were no significant differences in age and sex between the two groups. None of the patients in the control group had a previous history of thrombosis, anticoagulant therapy, or any other vascular or genetic diseases. The study was approved by the local ethics committee. All patients in the study group were assessed as C5 (24 patients — 21.8%) and C6 (86 patients — 78.2%), according to CEAP classification. None of the study patients had been treated with heparin and/or oral anticoagulants at the time of biological testing. We excluded from our study patients with: inflammatory states, diabetes mellitus, vasculitis, lupus erythematosus, polycythaemia vera, ulceration connected with the lymphatic system, dermatological and arterial diseases, and women who used contraceptive pills and/or hormone therapy [25, 26].

All patients underwent physical examination, colour Doppler and/or duplex scan ultrasonography, and measurement of ankle-brachial pressure index (ABPI).

dłowe stężenie antygenu przy upośledzonej aktywności) [15, 16]. Wszystkie wymienione defekty dziedziczą się autosomalnie. Wrodzona trombofilia jest chorobą wielogenową, a wystąpienie dwóch lub więcej czynników genetycznych zwiększa wielokrotnie ryzyko rozwoju VTE. Stwierdza się, że mutacja genu czynnika VL występuje u około 10% nosicieli heterozygotycznego niedoboru białka C, u 22% nosicieli heterozygotycznego niedoboru białka S, u 30% nosicieli polimorfizmu PTG20210A i u 10% nosicieli z niedoborem antytrombiny [17–22].

Ocenia się, że w przypadku naturalnych inhibitorów krzepnięcia ryzyko VTE u heterozygot względem niedoboru antytrombiny, białka C lub białka S jest zwiększone około 10-krotnie w porównaniu ze zdrową populacją. Incydenty zakrzepowe występują przed 45 rokiem życia u 60–80% osób z niedoborem inhibitora krzepnięcia. Należy dodać, że wielu badaczy upatruje największe zagrożenie wystąpienia żyłnej choroby zakrzepowatozatorowej w niedoborze antytrombiny [15, 16].

Najczęstszym, a zarazem najniebezpieczniejszym objawem wrodzonej trombofilii jest zakrzepica żył głębokich kończyn dolnych, w części przypadków powikłana zatorom tętnicy płucnej. Ryzyko wystąpienia zakrzepicy żył głębokich zwiększa się znacznie przy współistnieniu kilku wrodzonych, nabytych lub wrodzonych i nabytych (środowiskowych) czynników ryzyka zakrzepicy. Do nabytych czynników ryzyka zakrzepicy żyłnej należą między innymi: wiek > 40 lat, otyłość, ciąża, połów, hormonalna terapia zastępcza, doustne środki antykoncepcyjne, operacja, rodzaj znieczulenia, zakażenia, unieruchomienie, rozległe złamania i urazy, CVD, choroba rozrostowa i nowotworowa, niewydolność krążenia, niewydolność nerek, przeciwciała antyfosfolipidowe, czerwienica prawdziwa, nadpłytkowość, cukrzyca, miażdżyca zatorowa tętnic, hiperlipidemia [23, 24]. Za jedną z najważniejszych przyczyn nabytej trombofilii należy uznać przeciwciała typu tocznia i przeciwciała antykardiolipinowe klasy IgG. Przeciwciała te należą do grupy przeciwciał antyfosfolipidowych (APA) powstających w przebiegu chorób o podłożu autoimmunologicznym.

Założenia i cel pracy

Jest bardzo prawdopodobne, że pozakrzepowe owrzodzenie żyłne podudzi u chorych ze stwierdzoną wrodzoną trombofiliją ma cięższy przebieg, zakrzepice żyłne u tych chorych mają często charakter nawrotowy, bardziej rozległy, oporny na leczenie, endogenną fibrynolizę i rekanalizację, mogą doprowadzać do niegojenia się owrzodzeń żylnych i/lub ich nawrotów. Nieznana jest częstość występowania wrodzonych niedoborów antytrombiny, białka C i białka S oraz mutacji

We created a questionnaire which contained: personal information (age, sex, blood group, BMI), information about diseases: CVU, CVD, DVT, and/or VTE, kind of treatment for those diseases, present history, past history, concomitant (concurrent) diseases, kind of treatment, and family history (Table III).

Venous colour Doppler and/or venous duplex scan ultrasonography was performed by a single radiologist by using Acuson 128 XP/10 and Voluson 730 Expert units. The following features were performed by the radiologist during the examination:

- assessment of veins: common and external iliac, common and superficial femoral, popliteal, anterior and posterior tibial, peroneal, long and short saphenous, saphenofemoral and saphenopopliteal junctions;
- venous reflux in superficial and deep system;
- assessment of vein wall, valves, deep and superficial vein obstruction, recanalization, and collateral circulation.

All patients had measurement of ankle-brachial pressure index taken. We included in the study only those patients who had ABPI over 0.8.

Venous blood was drawn for AT, PC, PS, FV Leiden, and PT G20210A in patients with CVU and the control group. Venous blood was collected in trisodium citrate-containing (first) glass tubes. Plasma was prepared by centrifugation and separation from the cells within 30 min., frozen and stored at -70°C . Venous blood was also collected into potassium EDTA-containing (next) glass tubes for determination of the presence of FV Leiden mutation. The following tests were performed:

- AT and PC were detected using an amidolytic assay using Berichrom Antithrombin and Berichrom Protein C tests (Dade Behring, Germany);
- PC antigen was detected using an immunoelectrophoresis immunoassay test;
- AT antigen was performed on partigen plate (Dade Behring, Germany);
- PC free and PS free were detected using an ELISA (Diagnostica Stago, France);
- DNA was extracted from peripheral blood leucocytes according to Miller [27];
- Detection of the FVLeiden mutation was performed using restriction endonuclease Mnl I (New England Biolabs, Germany) [28];
- Detection of PT gene G20210A mutation was performed according to Poort et al. [29] using restriction endonuclease HindIII (Invitrogen, USA);
- ACA was performed by an ELISA method using Varelisa assay (Pharmacia, Diagnostics);

typu Leiden genu czynnika V oraz genu protrombiny G20210A u chorych z przewlekłymi owrzodzeniami żylnymi podudzi oraz z ich nawrotami. Nie wiadomo, czy wrodzona trombofilia jest czynnikiem ryzyka doprowadzającym do rozwoju od teleangiektazji i niepowikłanych żylaków kończyn dolnych przez kolejne etapy CVD, do zakrzepicy żył głębokich i ewentualnego owrzodzenia żylnego podudzi. Stwierdzenie bezpośredniej zależności pomiędzy wrodzoną trombofilią a wystąpieniem owrzodzenia żylnego podudzi pozwoliłoby na opracowanie skuteczniejszych metod zapobiegania i leczenia tej jednostki chorobowej.

Celem pracy jest:

- określenie częstości występowania wrodzonych niedoborów antytrombiny, białka C, białka S oraz mutacji typu Leiden genu czynnika V i mutacji G20210A genu protrombiny u chorych z przewlekłymi i nawrotowymi owrzodzeniami żylnymi podudzi;
- porównanie ciężkości przebiegu klinicznego owrzodzenia żylnego podudzi u chorych z obecnymi wrodzonymi niedoborami antytrombiny, białka C, białka S, mutacji typu Leiden genu czynnika V i mutacji G20210A genu protrombiny lub bez takich niedoborów;
- ocena wpływu przeciwciał typu tocznia i przeciwciał antykardiolipinowych na rozwój owrzodzeń żylnych podudzi u chorych z wrodzoną trombofilią i bez niej.

Material i metody

Grupę badaną stanowiło 110 chorych (62 kobiety i 48 mężczyzn) w wieku 29–86 lat (średni wiek $63,2 \pm 10,4$ roku) z owrzodzeniem żylnym podudzi, leczonych w okresie od marca 2004 roku do marca 2006 roku w Ambulatorium Chirurgicznym oraz w Klinice Chirurgii Ogólnej i Hematologicznej Instytutu Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie.

Grupę kontrolną stanowiło 110 zdrowych osób (66 kobiet i 44 mężczyzn) w wieku 26–82 lat (średni wiek $61,9 \pm 13,9$ roku) niezgłaszających w wywiadzie, badaniu podmiotowym i fizykalnym istotnych dolegliwości, chorób przewlekłych oraz bez obciążeń genetycznych i rodzinnych dotyczących chorób krwi oraz chorób układu żylnego i tętniczego. Obie grupy dobrze pod względem płci i wieku.

Kwalifikację chorych do grupy badanej i osób zdrowych do grupy kontrolnej przeprowadzono na podstawie wyników rutynowych badań podmiotowych i fizykalnych oraz informacji uzyskiwanych ze specjalnie opracowanej na potrzeby tych badań ankiety. Ankiety (tab. III) samodzielnie wypełniały wszystkie badane osoby.

Table III. The questionnaire filled by patients qualified to the study**Tabela III.** Ankieta wypełniana przez osoby kwalifikowane do badań

I. Personal information		
I. Dane podstawowe		
Name and surname: Imię i nazwisko:	Age: Wiek:	Date of birth: Data urodzenia:
Weight: Ciężar ciała:	Height: Wzrost	BMI:
Blood group: Grupa krwi:	Sex: Płeć:	
2. Present history		
2. Choroba podstawowa		
Localizations of CVU: Lokalizacja CVU:		
Description of CVU: Charakter zmian CVU:	Duration of CVU: Czas trwania CVU:	
Description of clinical symptoms of CVU: Rodzaj i charakter występujących objawów klinicznych CVU:		
Family history of CVU: Występowanie w rodzinie CVU:		
3. Venous thromboembolism (deep venous thrombosis/pulmonary embolism)		
3. Żyłna choroba zakrzepowo-zatorowa (zakrzepica żył głębokich/zatorowość płucna)		
When occurred: Kiedy wystąpiła:	Duration: Czas trwania:	Amounts of episodes: Liczba epizodów:
Treatment of primary VTE: Zastosowane leczenie pierwotnej VTE:		Duration of treatment: Czas trwania leczenia:
Kind of primary and secondary prophylaxis: Rodzaj profilaktyki przeciwzakrzepowej pierwotnej i wtórnej:		Duration: Czas trwania:
Family history of VTE: Występowanie w rodzinie VTE:		
Recurrent of VTE: Nawrotowa żylna VTE:		
4. Chronic venous disease (CVD)		
4. Choroba żyłkowa kończyn dolnych (CVD)		
Duration of CVD and kind of CVD: Czas trwania i rodzaj CVD:		
Varicose veins: Przebyte stany zapalne żyłaków kończyn dolnych:		
Kind of treatment of CVD: Sposób leczenia CVD:		
Family history of CVD: Występowanie w rodzinie CVD:		
5. Concomitant diseases		
5. Choroby współistniejące		
Cigarettes: Palenie tytoniu:	Alcohol: Nadużywanie alkoholu:	
Arterial hypertension: Nadciśnienie tętnicze:	Diabetes mellitus: Cukrzyca:	
Oncological diseases: Nowotwory i choroby rozrostowe:	Polycythaemia vera: Czerwienica prawdziwa:	



Table III. The questionnaire — continuation**Tabela III.** Ankieta wypełniana przez osoby kwalifikowane do badań — kontynuacja**5. Concomitant diseases****5. Choroby współistniejące**

Inflammatory states:

Zakażenia:

Bacterial

Bakteryjne:

Virus:

Wirusowe:

Protozoan:

Pierwotniakowe:

Other concomitant disease:

Inne choroby współistniejące:

Contraceptive pills:

Doustne środki antykoncepcyjne:

Hormone therapy:

Hormonalna terapia zastępcza:

Drugs and kind of treatment:

Stosowane leki w chwili badania:

Dermatological disease:

Stany zapalne i inne schorzenia dermatologiczne:

6. Kind of surgery**6. Przebyte operacje**

Vascular (arterial and venous) diseases:

Układ żylny i tętniczy:

Injury (trauma):

Urazy:

Other:

Inne:

7. ABPI:

BMI body mass indeks (wskaźnik masy ciała); CVU — chronic venous ulceration (owrzodzenie kończyn dolnych); VTE — venous thromboembolism (żylna choroba zakrzepowo-zatorowa); ABPI (ankle-brachial pressure index) — wskaźnik kostka–ramię

— LA was evaluated using LA I Screening Reagent and LA 2 Confirmation Reagent (Dade Behring, Germany). Diagnosis of LA was performed according to the International Society of Thrombosis and Haemostasis; the principle of this procedure is based on the fact that Russell's viper venom, phospholipids, and calcium in the reagent directly activate factors V and X, thereby triggering the joint cascade of the intrinsic and extrinsic coagulation pathways [30].

General laboratory examination was performed in Diagnostic Laboratory, and hemostasis and genetic examination in Department of Hemostasis and Thrombosis in Institute of Hematology and Blood Transfusion in Warsaw.

Statistic analysis

Statistic analysis was made in Statistica (Statsoft) application. For analyzing measurable values test χ^2 (2) with Yates correction was made. Differences were considered as important for the gravity level $p < 0.05$.

Results

The group of 110 patients with CVU and 110 healthy people who constituted the control group selected according to the age and sex of the patients were examined (Table IV).

Do badań włączono osoby z czynnym lub zagojonym (blizna powrzodowa) owrzodzeniem żylnym podudzi, u których wartości morfologii, glikemii i lipidogramu mieściły się w zakresie norm prawidłowych [25, 26]. Do badania włączono tylko tych chorych, których wartość wskaźnika kostka–ramię (ABPI) wynosiła powyżej 0,8.

Nie stosowano limitu wiekowego jako kryterium włączenia lub wyłączenia z badania.

Z badania wykluczono pacjentów z uogólnionymi stanami zapalnymi, cukrzycą, zapaleniem okołonaczyniowym (*vasculitis*), toczniem rumieniowatym, czerwienicą prawdziwą, owrzodzeniem pochodzenia limfatycznego, dermatologicznego, tętniczego oraz kobiety stosujące doustne środki antykoncepcyjne i/lub hormonalną terapię zastępczą.

U wszystkich pacjentów z grupy badanej przeprowadzono dopplerowskie badanie ultrasonograficzne kodowane kolorem i/lub badanie dupleksowe układu żylnego oraz w celu oceny wydolności układu tętniczego oznaczano wartość wskaźnika kostka–ramię (ABP). Dopplerowskie badania ultrasonograficzne kodowane kolorem i/lub badanie dupleksowe wykonywał ten sam radiolog przy użyciu sprzętu Acuson I28 XP oraz Voluson 730 Expert. Badania ultrasonograficzne przeprowadzono w Samodzielnej Pracowni Radiologicznej IHiT w Warszawie. Obejmowały one ocenę:

Table IV. Description of the patients with chronic venous ulcers (CVU) and of the control group**Tabela IV.** Charakterystyka osób w grupie badanej z owrzodzeniami żylnymi podudzi (CVU) i w grupie kontrolnej

	Patients with CVU Grupa badana (n = 110)	Control group Grupa kontrolna (n = 110)
Sex: female/male (average age) Płeć: żeńska/męska (średni wiek w latach dla danej płci)	62/48 (59.2/64,5)	66/44 (58.1/60.6)
Age (average) Wiek w latach — zakres (mediana)	29–86 (63.2)	26–82 (61.9)
Ulceration* Owrzodzenie żyłne*	C5 (24) and C6 (86) C5 (24) C6 (86)	Healthy people Zdrowi
Duration (average) Czas trwania owrzodzenia żylnego (średni okres)	From 3 months to 27 years (5.9 years) Od 3 miesięcy do 27 lat (średnio 5.9 roku)	
Second and more episodes (recurrence) Nawroty owrzodzeń	31	
Family history ulceration Występowanie rodzinne owrzodzeń żylnych	16	
DVT in a past history and/or duplex scan (colour Doppler) DVT w wywiadzie i/lub w badaniu ultrasonograficznym	64 (CEAP-Pr, Po)	0
Recurrence of DVT Nawroty DVT	35	0
Varicose veins Żyłaki kończyn dolnych	66	0
SVT and/or varicophlebitis Przebyte SVT i/lub żyłaków	17	0

*According to CEAP classification (zgodnie z klasyfikacją CEAP); DVT — deep venous thrombosis (zakrzepica żył głębokich); SVT — superficial vein thrombosis (zakrzepica żył powierzchownych)

From the group of 110 CVU patients, inherited thrombophilia (IT) was diagnosed in 33 (30%) (Figures 1 and 2).

The following defects of IT were present: in 20 cases — FV Leiden mutation (FV Leiden), in 8 cases — PS deficiencies, in 7 cases — PC deficiencies, in 3 cases — AT deficiencies, and in 2 cases — PT G20210A mutations. We additionally detected complicated defects of IT in 6 cases: in 2 cases — PS deficiency and FVLeiden mutation, in 2 cases — PC and PS deficiencies, in 1 case — AT and PC deficiencies, and in 1 case — FV Leiden mutation and PC and PS deficiencies (Tables V, VI).

From the control group of 110 people, inherited clotting factors were detected in 2 cases (1.8%) (Figures 1 and 2). Factor V Leiden mutation was noted in 2 cases. Any persons have not any episodes DVT in their history and/or in ultrasound examination.

In 64/110 (58.2%) patients with CVU, a history of DVT in the past was confirmed. In the remaining 46/110 (41.8%) patients with CVU, a history of DVT was negative and there was no colour Doppler and/or duplex scan ultrasonography evidence of this disease. All patients with IT had evidence of proximal DVT in their history, which was also documented by colour Doppler and/or duplex scan ultrasonography (post-throm-

- żył (biodrowej, udowej, podkolanowej, piszczelowej, strzałkowej, odpiszczałowej, odstrzałkowej, połączenie odpiszczałowo-udowe i odstrzałkowo-podkolanowe);
- refluksu żylnego w układzie powierzchownym i głębokim;
- ściany żyłnej i zastawek żylnych;
- stopnia niedrożności układu powierzchownego i głębokiego;
- stopnia rekanalizacji, lokalizacji zmian pozakrzepowych i krążenia obocznego.

W obu badanych grupach wykonano ogólne badania laboratoryjne obejmujące morfologię krwi, poziom glikemii i lipidogram (stężenie cholesterolu całkowitego, triglicerydów, cholesterolu frakcji LDL i HDL) wykonane w aparacie hematologicznym Sysmex (Kobe, Japonia), badania układu hemostazy oraz badania genetyczne. Krew do badań ogólnych pobierano na EDTA-Na₂, natomiast krew do badań układu hemostazy na 0,11 M cytrynian sodu w stosunku 9 objętości krwi do 1 objętości cytrynianu. Badania hemostazy wykonywano tego samego dnia bezpośrednio po pobraniu krwi lub w próbkach osocza przechowywanych w 1-mililitrowych porcjach w temperaturze –70°C przez okres nie dłuższy niż 1 miesiąc. Do badań genetycznych krew żylną pobierano na

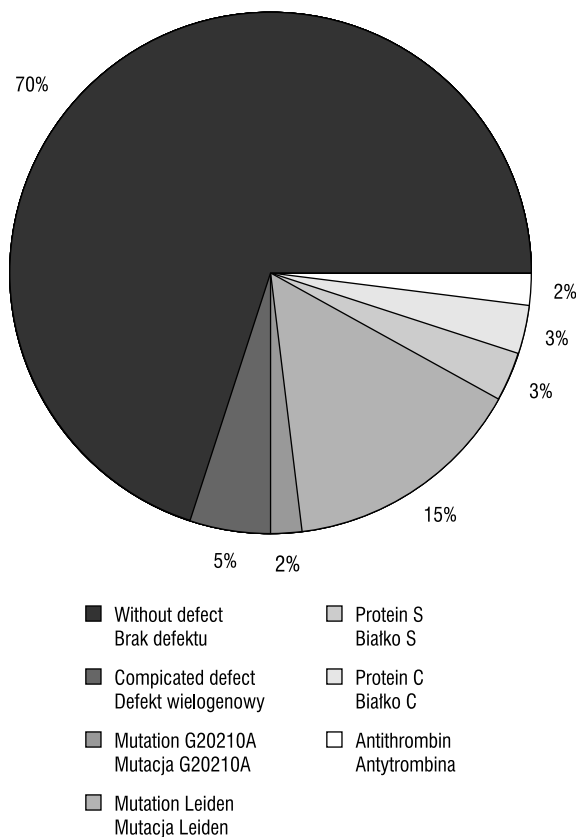


Figure 1. The prevalence of inherited thrombophilia (IT) in the study group (%)

Rycina 1. Występowanie wrodzonej trombofilii (IT) w grupie badanej (%)

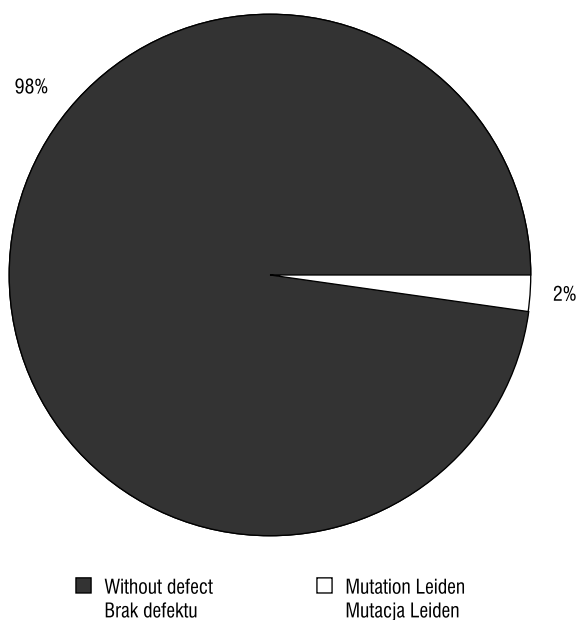


Figure 2. The prevalence of inherited thrombophilia (IT) in the control group (%)

Rycina 2. Występowanie wrodzonej trombofilii (IT) w grupie kontrolnej (%)

EDTA-Na₂ i z leukocytów izolowano DNA metodą wysalania według Millera i wsp. [27].

Badania układu hemostazy wykonywano metodami amidolitycznymi i koagulacyjnymi przy użyciu aparatu BCT (Dade-Behring, Marburg, Niemcy) oraz metodami biologii molekularnej przy użyciu termocyklera UNO II (Biometra, Göttingen, Niemcy) oraz zestawu do analizy żeli Bio-Capt (Vilber Lourmant, Francja).

Żadna osoba z grupy badanej i kontrolnej nie stosowała heparyny ani doustnych antykoagulantów w trakcie wykonywania testów i badań oraz w okresie 10 dni poprzedzających badanie.

Najpierw przeprowadzono badania przesiewowe, w tym APTT, czas protrombinowy, czas trombinowy, zawartość fibrynogenu w osoczu przy użyciu odczynników firmy Dade-Behring (Marburg, Niemcy) oraz dodatkowo badania w kierunku antykoagulantu toczeniowego. W drugim etapie przeprowadzono badania szczegółowe w kierunku wrodzonej trombofilii obejmujące: oznaczenie AT, białka C i białka S oraz mutacje typu Leiden genu czynnika V i mutacje G20210A genu protrombiny.

Aktywność antytrombiny i białka C oznaczano metodami amidolitycznymi za pomocą odpowiednio zestawu Berichrom Antithrombin III i Berichrom Protein C (Dade Behring, Marburg, Niemcy).

Oporność na aktywowane białko C badano metodą koagulacyjną za pomocą zestawu Coatest APC Resistance V (Chromogenix, Mediolan, Włochy).

Antygen wolnego białka S oznaczano metodą immunoenzymatyczną (ELISA) za pomocą zestawu Asse-rachrom Free Protein S (Diagnostic Stago, Asnieres, Francja).

Antygen antytrombiny oznaczano metodą immunodifuzji przy użyciu zestawu Nor Partigen firmy Dade Behring (Marburg, Niemcy).

Mutację typu Leiden genu czynnika V analizowano według Bertiny i wsp. [28] przy użyciu starterów firmy Invitrogen (Lexington, Stany Zjednoczone) i enzymu restrykcyjnego MnlI (New England Biolabs, Niemcy). Amplifikację DNA przeprowadzono metodą łańcuchowej polimerazy: 94°C — 5 min; 35 cykli (93°C — 1 min, 62°C — 30 s, 72°C — 90 s), 72°C — 10 min w termocyklerze firmy Biometra, przy użyciu starterów TAG CCA GGA GAC CTA ACA TGT TC i GGA ACA ACA CCA TGA TCA GAG CA firmy Invitrogen. Namnożone fragmenty DNA degradowano enzymem restrykcyjnym MnlI. Metodą elektroforezy w żelu agarozowym analizowano wielkość otrzymanych fragmentów DNA (homozygota: 130bp, 157bp; heterozygota: 93bp, 130bp, 157bp; brak mutacji: 93bp, 157bp).

Table V. Inherited risk factors of thrombosis in studied and control groups**Tabela V.** Wrodzone czynniki ryzyka zakrzepicy żylny u osób w grupie badanej i w grupie kontrolnej

IT	Patients with CVU and IT Chorzy z CVU i IT (n = 33)	Healthy people with inherited risk factors of thrombosis Osoby zdrowe z wrodzonymi czynnikami ryzyka zakrzepicy (n = 2)
Antithrombin deficiency Niedobór antytrombiny	3	0
Protein C deficiency Niedobór białka C	7	0
Protein S deficiency Niedobór białka S	8	0
Factor V Leiden mutation Mutacja typu Leiden genu czynnika V	20 (19 patients with a heterozygous pattern, 1 patient with a homozygous pattern) (19 heterozygot, 1 homozygota)	2 with heterozygous pattern 2 heterozygoty
Prothrombin G20210A mutation Mutacja G20210A genu protrombiny	2 with heterozygous pattern 2 heterozygoty	0
Total Razem	40	2

IT — inherited thrombophilia (wrodzona trombofilia); CVU chronic venous ulceration (owrzodzenie kończyn dolnych)

Table VI. Kind of multigene defects in patients with chronic venous ulceration (CVU) (n = 110)**Tabela VI.** Występowanie defektu wielogenowego u chorych z owrzodzeniem żylnym podudzi (CVU) (n = 110)

Complicated defects Defekt wielogenowy	Number of patients Liczba chorych
FV Leiden mutation and protein C and S deficiencies Mutacja typu Leiden genu czynnika V oraz niedobór białka C i białka S	1
FV Leiden mutation and protein S deficiency mutacja typu Leiden genu czynnika V i niedobór białka S	2
Protein C and S deficiencies Niedobór białka C i białka S	2
Antithrombin and protein C deficiencies Niedobór antytrombiny i białka C	1

botic features such as vein wall irregularity, valve cusp damaged, deep vein obstruction, partial recanalization, and collateral circulation were present) (Table VII and Figure 3). Visible varicose veins and/or damaged superficial venous system with inefficient valves of saphenofemoral and saphenopopliteal junctions were seen during ultrasonography examination in 66/110 (60%) of patients with CVU. Seventeen of the patients with varicose veins but without DVT in their history had a history of thrombophlebitis and/or varicophlebitis. Inherited clotting factors were not detected in any of these patients.

Mutację G20210A genu protrombiny wykrywano według Poorta i wsp [29], badając fragmenty DNA powstające po degradacji enzymem restrykcyjnym HindIII (Invitrogen, Lexington, Stany Zjednoczone) odcinka genu amplifikowanego z użyciem starterów firmy Invitrogen (Lexington, Stany Zjednoczone) [28]. Amplifikacja DNA obejmowała inkubację: 94°C — 5 min; 35 cykli (94°C — 1 min, 53,5°C — 1 min, 72°C — 90 s), 72°C — 10 min i przeprowadzono ją przy użyciu starterów TCT AGA AAC AGT TGC CTG GC i ATA GCA CTG GGA GCA TTG AAG w termocyklerze firmy Biometra. Namnożone fragmenty DNA degradowano enzymem restrykcyjnym HindIII i analizowano wielkość otrzymanych fragmentów (homozygota—pojedynczy fragment 322bp; heterozygota 345bp, 322bp, 23bp; gen prawidłowy—pojedynczy fragment 345bp).

Diagnostykę antykoagulantu toczeniowego (LA) przeprowadzano zgodnie z zaleceniami Komitetu ds. Nauki i Standaryzacji Międzynarodowego Towarzystwa ds. Zakrzepów i Hemostazy (ISTH), przy użyciu testów LA1/LA2 (Dade-Behring, Marburg, Niemcy) i Staclot LA (Diagnostica Stago, Asnieres, Francja) [30].

Przeciwciała antykardiolipinowe w klasie IgG, IgM wykrywano metodą immunoenzymatyczną (ELISA) przy zastosowaniu zestawu Varelisa (Pharmacia Diagnostics, Freiburg, Niemcy). W przypadku stwierdzenia podwyższonego miana antykardiolipin wykonywano badanie kontrolne po upływie co najmniej 12 tygodni od pierwszego oznaczenia.

Ogólne badania laboratoryjne przeprowadzono w Pracowni Diagnostyki Laboratoryjnej, a badania ukła-

Table VII. Characteristic patients with chronic venous ulceration (CVU) with and without inherited clotting factors**Tabela VII.** Charakterystyka kliniczna chorych z owrzodzeniem żylnym podudzi (CVU) z wrodzoną trombofilią i bez niej

	Patients with CVU and inherited clotting factors Pacjenci z owrzodzeniem żylnym podudzi i wrodzoną trombofilią (n = 33)	Patients with CVU without inherited clotting factors Pacjenci z owrzodzeniem żylnym podudzi bez wrodzonej trombofilii (n = 77)	p
Proximal and/or distal DVT in a past history and/or duplex scan (colour Doppler) (n = 64) Proksymalna i/lub dystalna DVT	33 (100%)	31 (40%)	0.0001
Recurrence DVT (n = 35) Nawrotowa DVT	31 (94%)	4 (5.2%)	0.0001
Recurrence CVU (n = 31) Nawrotowe CVU	29 (88%)	2 (2.6%)	0.0001
Recurrence DVT and CVU (n = 31) Nawrotowa DVT i CVU	29 (88%)	2 (2.6%)	0.0001
Time from DVT to venous ulcer Okres od DVT do powstania owrzodzenia żylnego (zakres)	From 6 months to 4 years (average 2.8 years) Od 6 miesięcy do 4 lat (średnio 2,8 roku)	2–18 years (average 6.6 years) 2–18 lat (średnio 6,6 roku)	—**
Varicose veins (n = 66) Żyłki kończyn dolnych	5 (15.1%)	61 (79.2%)	0.0001
Time from varicose veins to venous ulcer in patients without DVT Czas od wystąpienia żylaków do pojawienia się owrzodzeń u chorych bez DVT	—*	8–28 years (average 13.7 years) 8–28 lat (średnio 13,7 roku)	?

DVT — deep venous thrombosis (zakrzepica żył głębokich); CVU — chronic venous ulceration (owrzodzenie kończyn dolnych); *all patients had DVT (wszyscy chorzy z DVT); ** not applicable (nie dotyczy)

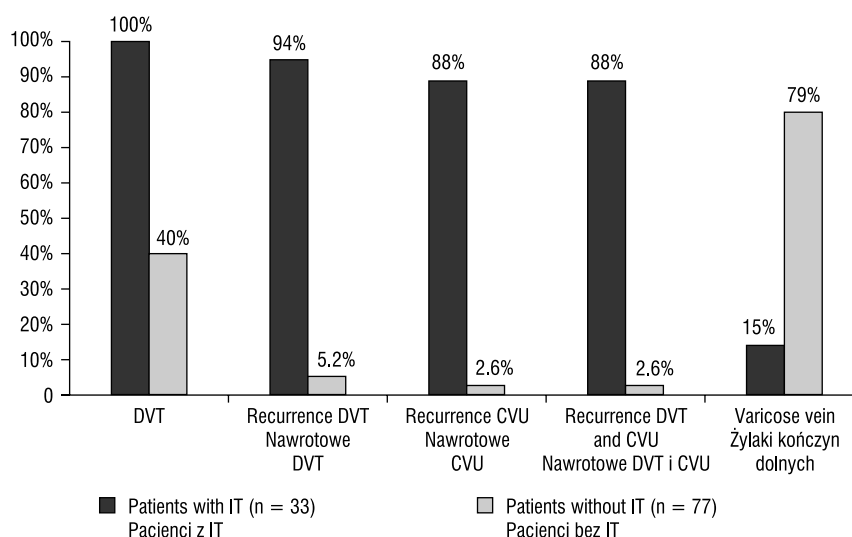


Figure 3. Comparison of patients with chronic venous ulcers (CVU) with (n = 33) and without inherited thrombophilia (IT) (n = 77)
Rycina 3. Porównanie graficzne pacjentów z owrzodzeniem żylnym podudzi (CVU) podzielonych na dwie grupy: z wykrytą i bez wykrytej wrodzonej trombofilii (IT)

Of 64 patients with CVU and DVT history, 35 presented with recurrences of DVT. From those 35 patients, 31 developed recurrent venous ulcers. 29/33

du hemostazy i badania genetyczne w Zakładzie Hemostazy i Zakrzepic Instytutu Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie.

(88%) patients from this group were diagnosed as IT carriers. The following defects of IT were present: in 18 cases FVLeiden mutations were seen (17 patients with a heterozygous pattern, 1 patient with a homozygous pattern), in 4 cases — PS deficiencies, in 3 cases — PC deficiencies, in 2 cases — PT G20210A mutations, and in 1 — AT deficiency (Table VIII). We detected complicated defects IT in 2 cases: in 1 case — PC and PS deficiency, and in 1 case — FV Leiden mutation and PC and PS deficiencies.

We compared patients with chronic venous leg ulceration with and without inherited risk factors of thrombophilia (Table IX).

Presence of LA was detected in 5 patients (4.5%), in whom two patients had inherited thrombophilia (factor V Leiden mutation, protein S deficiency). In all cases had in the history deep vein thrombosis. ACL presence was detected in 12 patients (10.9%). Presence of APA was confirmed in 14 patients from the examined group (12.7%). In the control group presence of ACL was

Table VIII. Kinds of defects in patients with recurrent deep venous thrombosis (DVT) and recurrent chronic venous ulcers (CVU) (n = 29)

Tabela VIII. Częstość występowania czynników ryzyka wrodzonej trombofilii u chorych z nawrotową zakrzepicą żył głębokich (DVT) i nawrotowym owrzodzeniem żylnym podudzi (CVU) (n = 29)

Inherited thrombophilia Wrodzona trombofilia	Number of defects Częstość występowania
Antithrombin deficiency Niedobór antytrombiny	1
Protein S deficiency Niedobór białka S	4
Protein C deficiency Niedobór białka C	3
Prothrombin G20210A mutation Mutacja G20210A genu protrombiny	2 heterozygous pattern 2 heterozygoty
Factor V Leiden mutation Mutacja typu Leiden genu czynnika V	18 (17 patients with a heterozygous pattern, 1 patient with a homozygous pattern) (17 chorych heterozygoty, 1 chory homozygota)
Protein C and S deficiencies — complicated defects Niedobór białka C i białka S — defekt złożony	1
Factor V Leiden mutation and protein C and protein S deficiencies — complicated defects Mutacja typu Leiden genu czynnika V oraz niedobór białka C i białka S — defekt złożony	1

Analiza statystyczna

Obliczenia statystyczne wykonano za pomocą programu Statistica (Statsoft). Do analizy wartości mierzalnych wykorzystano test χ^2 z poprawką Yatesa. Różnice uznawano za znamienne dla poziomu istotności $p < 0,05$.

Wyniki

Na podstawie klinicznego kryterium klasyfikacji przewlekłej choroby żylnych kończyn dolnych według CEAP u 24 chorych z grupy badanej stwierdzono stopień C5, a u 86 chorych — C6. W grupie badanej u 24 osób (21,8%) na podudziu występowały zmiany o charakterze hiperpigmentacji i przebarwień skórnych, a w okolicy kostki przyśrodkowej i/lub bocznej blizna powrzedowa po zagojonym owrzodzeniu, natomiast u 86 chorych (78,2%) stwierdzono czynne owrzodzenie w obrębie goleni. Czas trwania owrzodzenia żylnego od momentu pierwszorazowego powstania wynosił od 3 miesięcy do 27 lat (średnio 5,9 roku). Z grupy 110 chorych 31 pacjentów (28,2%) zgłosiło występowanie co najmniej 2 i więcej nawrotów owrzodzenia żylnego. U 16 osób (14,5%) stwierdzono występowanie dolegliwości i objawów przewlekłej choroby żylnych pod postacią owrzodzenia żylnego u innych członków rodziny. Na podstawie przeprowadzonego badania podmiotowego oraz wykonanego badania ultrasonograficznego układu żylnego u 64 chorych z grupy badanej (58,2%) stwierdzono przebytą zakrzepicę żył głębokich (stan patofizjologiczny Pr, Po-reflaks i niedrożność zgodnie z klasyfikacją niewydolności żylnych według CEAP), w tym u 35 (31,8%) miała ona charakter nawrotowy. Obecność żyłaków kończyn dolnych stwierdzono u 66 (60%) osób w grupie badanej, w tym 17 chorych zgłosiło w wywiadzie przebyte epizody ich zakrzepowego zapalenia potwierdzone badaniem ultrasonograficznym (uszkodzenie zastawek żylnych, zwłóknienia i zmiany pozakrzepowe w układzie żył powierzchownych). Porównanie grupy badanej i grupy kontrolnej przedstawiono w tabeli IV.

W grupie 110 pacjentów z przewlekłym owrzodzeniem żylnym podudzi wrodzoną trombofiliją wykryto u 33 osób (30%), zaś w grupie kontrolnej u 2 osób (1,8%) (poziom znamienności $p = 0,0001$) (ryc. 1 i 2).

U 33 osób w grupie badanej stwierdzono obecność 40 wrodzonych czynników ryzyka żylnych choroby zakrzepowo-zatorowej (tab. V). U 27 osób wykryto niedobór pojedynczego wrodzonego czynnika ryzyka zakrzepicy: u 2 niedobór antytrombiny, u 3 niedobór białka C, u 3 niedobór białka S, u 17 mutację typu Leiden genu czynnika V i u 2 mutację G20210A genu protrombiny. U 6 osób stwierdzono występowanie dwóch i/lub więcej wrodzonych czynników ryzyka zakrzepicy żylnych (tab. VI). W dwóch przypadkach wykryto jedno-

Table IX. Chronic venous leg ulceration (CVU) in patients with and without inherited thrombophilia (IT)**Tabela IX.** Ocena ciężkości przebiegu owrzodzenia żylnego podudzi (CVU) u chorych z i bez wrodzonej trombofilii (IT)

Symptoms Objawy kliniczne	Patients with CVU and without IT (n = 77) Chorzy z CVU bez IT	Patients with CVU and with IT (n = 33) Chorzy z CVU i IT
The age of patients when first venous ulcer — median (average age)	54.6 (44–86 years)	36.6 (29–49 years)
Wiek chorego w momencie pojawienia się pierwszego owrzodzenia żylnego — mediana (zakres)	54.6 (44–86 lat)	36.6 (29–49 lat)
Period of treatment of CVU — median (average age in months)	49 (37–86 months) 49 (37–86 miesięcy)	87 (39–231 months) 87 (39–231 miesięcy)
Czas gojenia się owrzodzenia żylnego w miesiącach — mediana (zakres)		
Duration of present CVU — median (average age in months)	5 (3–3 months)	11 (5–61 months)
Czas trwania obecnego epizodu CVU — mediana (zakres)	5 (3–3 miesięcy)	11 (5–61 miesięcy)
Surface of CVU [in cm ²] — median (average) Przybliżona powierzchnia całkowita owrzodzenia żylnego w [cm ²] — mediana (zakres)	6.5 (0.5–16.5)	7.5 (1.5–20.5)
Recurrence of CVU — median (average) Liczba epizodów owrzodzenia żylnego (nawroty) — mediana (zakres)	2 (1–3)	4 (1–7)
Scale of pain caused by CVU Nateżenie bólu spowodowanego CVU		
0 — without pain brak bólu	7 (9%)	3 (9.1%)
1 — small mały, nieutrudniający życia	22 (28.6%)	11 (33.3%)
2 — medium umiarkowany, niewymagający stosowania leków przeciwbólowych	34 (44.2%)	14 (42.4%)
3 — huge duży, wymagający stosowania leków przeciwbólowych	14 (18.2%)	5 (15.1%)

confirmed in 2 persons (1.8%) without deep vein thrombosis in history. In any person from control group LA was not present.

In patients with inherited thrombophilia, chronic venous leg ulceration was present already in age between 29 and 49 and lasted longer despite treatment, had greater tendency to convert in comparison to patients with chronic venous leg ulceration but without thrombophilia. Pain level, size and changes localization caused by venous ulceration was similar in both groups. Coexistence of two or more inherited or acquired clotting factors didn't have influence on size of the ulceration.

Discussion

Our study detected a 30% prevalence rate of IT in the patients with CVU, compared with a prevalence of 1.8% in the control group. In the study by MacKenzie more than 41% of patients with CVU had at least one identifiable thrombophilia [49]. Regarding the relation between inherited clotting factors and venous ulcerations, several hypotheses can be proposed. Venous

czesny niedobór białka C i białka S, w dwóch niedobór białka S i mutację typu Leiden genu czynnika V, w jednym niedobór antytrombiny i białka C oraz w jednym niedobór białka C, białka S oraz mutację typu Leiden genu czynnika V. Najczęściej występującym defektem wrodzonej trombofilii była heterozygotyczna mutacja typu Leiden genu czynnika V.

W grupie kontrolnej u dwóch osób wykryto mutację typu Leiden genu czynnika V. U osób z grupy kontrolnej ze stwierdzoną obecnością czynników ryzyka wrodzonej trombofilii w badaniach podmiotowym, fizykalnym ani ultrasonograficznym nie wykazano żadnych cech i objawów choroby żylniej.

Na podstawie przeprowadzonych ankiet wypełnionych w trakcie wykonywanego rutynowo badania podmiotowego i fizykalnego porównano chorych z przewlekłym owrzodzeniem żylnym podudzi z wykrytą wrodzoną trombofiliją i bez niej. Stwierdzono występowanie w wywiadzie i/lub badaniu ultrasonograficznym proksymalnej i/lub dystalnej zakrzepicy żył głębokich kończyn dolnych u wszystkich chorych z przewle-

ulcers have been reported to develop because of fibrin cuff formation or leukocyte trapping [1, 3, 31–33]. Inherited thrombophilia causes risk of deep vein thrombosis. DVT leads to venous hypertension which is one of the major factors in creation of leg venous ulceration. Fibrin cuffs impair the barrier to the diffusion of oxygen and nutrients. On the other hand, leukocytes trapped in venous walls release mediators and proteolytic enzymes leading to activation of endothelial cells and vascular and skin damage and later to venous ulcer. Inherited clotting factors can trigger the release of platelet-activating factor by endothelial cells, initiate platelet aggregation and activation, and can finally lead to the development of venous leg ulceration by creating repeated microthrombi. Decreased inhibition of coagulation may lead to an increased coagulation activity and fibrin deposition in local and systemic circulation, which can also lead to the creation of venous ulceration. Venous thrombosis in macrocirculation and microthrombi in microcirculation play important roles in the pathogenesis of CVU. Inherited thrombophilia leads to their creation and finally to CVU.

Milne et al. [34] examinations detected that from 25% to 75% of patients with chronic venous leg ulceration had in history DVT. In Baker et al. [35], 17% patients with venous ulceration had in history DVT. Strandness et al. [36] in 61 patients with DVT in 3 persons presence of venous leg ulceration was found. Mudge et al. [37] in 278 patients with DVT in 8% presence of venous ulcer was found.

In our study all patients with CVU and inherited clotting factors had in their history evidence of proximal and/or distal DVT documented by colour Doppler and/or duplex scan ultrasonography.

First examination over role of inherited clotting factors of VTE and their connection with venous ulcer was provided by Falanga et al. [41]. Tsutsui et al. [42] described patients with recurrent leg ulcer and type II protein S deficiency, Phifer et al. [43] in 3 related persons with leg ulceration found antitrombin deficiency. Grossman et al. [44] examining genesis of thrombosis in 29 patients with leg ulceration in 11 (38%) detected resistance to activated protein C, where only in 2 patients had V Leiden mutation.

Munkvad and Jorgensen [46], Ribeau deau et al. [51], and Hafner and Felten [45] found that in patients with CVU there was no difference in DVT rates between those with and those without thrombophilia. By contrast, in the other studies by Maessen-Visch et al. [47] and Grossman et al. [44], it was shown that patients with CVU and positive results for FV Leiden mutation gave a documented a history of DVT.

kłym owrzodzeniem żylnym podudzi i wrodzoną trombofilią. U 94% tych chorych występowała nawrotowa zakrzepica żył głębokich, a u 88% pacjentów z owrzodzeniem żylnym i wrodzoną trombofilią wystąpiła nawrotowa zakrzepica żył głębokich oraz nawrót owrzodzenia żylnego. U chorych z wrodzoną trombofilią czas od wystąpienia zakrzepicy żył głębokich do momentu powstania owrzodzenia żylnego podudzia był średnio 2–3-krotnie krótszy w porównaniu z pacjentami z owrzodzeniem żylnym bez stwierdzonej wrodzonej trombofilii. Porównanie i charakterystykę pacjentów z owrzodzeniem żylnym podudzi z wrodzoną trombofilią i bez niej przedstawiono w tabeli VII i na rycinie 3.

Wykryto, że w grupie chorych z owrzodzeniem żylnym podudzi bez wrodzonej trombofilii nawrotowa zakrzepica żył głębokich i nawrotowe owrzodzenie żylnego podudzi występowały znacznie rzadziej (odpowiednio u 5,2% i 2,6% pacjentów) niż u osób z wrodzoną trombofilią (94% i 88%). W grupie chorych z owrzodzeniem żylnym podudzi i wrodzoną trombofilią stwierdzono obecność żyłaków kończyn dolnych (za pomocą badania fizykalnego i/lub ultrasonograficznego) znacznie rzadziej (15,1%) niż u chorych bez obecności wrodzonych czynników ryzyka zakrzepicy żyłnej (79,2%).

Z badań przeprowadzonych przez autorów niniejszej pracy wynika, że spośród 64 pacjentów z przewlekłym owrzodzeniem żylnym podudzi i przebytą proksymalną i/lub dystalną zakrzepicą żył głębokich potwierdzoną za pomocą badania ultrasonograficznego układu żylnego u 35 osób występowała nawrotowa zakrzepica żył głębokich. Wśród 35 osób z nawrotową zakrzepicą żył głębokich u 31 występowało nawrotowe owrzodzenie żylnego podudzi, z czego u 29 (88%) chorych wykryto również wrodzoną trombofilię. Przebieg gojenia oraz leczenie owrzodzenia żylnego u tych chorych był dłuższy i trudniejszy, a owrzodzenie, mimo że nie było rozleglejsze, miało w większości przypadków brzeg głęboki i nieregularny, a dno zwłókniałe. U 29 chorych z nawrotową zakrzepicą żył głębokich, nawrotowym owrzodzeniem żylnym i stwierdzoną wrodzoną trombofilią wykryto łącznie 33 wrodzone czynniki ryzyka zakrzepicy żyłnej (w 2 przypadkach był to defekt wielogenowy) (tab. VIII).

Współwystępowanie nabytych lub wrodzonych i nabytych czynników ryzyka żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej kilkakrotnie może zwiększać możliwość rozwoju zakrzepicy, doprowadzając w późniejszym etapie do powstania owrzodzenia żylnego podudzia. Z tego powodu zbadano obecność przeciwciał antyfosfolipidowych (APA) jako jednej z najważniejszych przyczyn nabytej trombofilii, a co się z tym wiąże jednego z silniejszych nabytych czynników ryzyka wystą-

One of the greatest patients groups (88 patients) with chronic venous leg ulceration was examined and described by Rhoda Mackenzie et al. [49] from Edinburgh and Birmingham Universities. As first they provided assessment of parallel existence of all common approved factors of inherited risk factors of VTE in patients with leg venous ulceration.

Not all researchers found such a significant frequency of existence of inherited defects in patients with venous leg ulcerations. Lower frequencies of inherited risk factors of VTE in patients with venous leg ulceration were presented by Jebeleanu and Procopciuc [50] and Ribeau deau et al. [51].

Venous leg ulceration in 88–90% usually demonstrate tendency to heal, but in several patients 10–12% total healing never exists regarding leg trophic changes [52]. Epidemiological data says that in about 1/3 of patients only one episode of leg ulceration takes place, in 1/3 form two to four, and in the last 1/3, four or more times. Major problem is leg venous recurrence after its previous total healing. Leg ulcers recurrences despite treatment, in research made by Hansson, Mayberry, Dinny, Henry [53–55] is different and oscillates between 6 to 15 recurrences of leg venous ulceration annually.

Attempts to define frequency of existing inherited risk factors of VTE and antiphospholipid antibodies (APA) were made in several researches [57–63]. Ames et al. [64] found presence of V Leiden factor in 14% patients with APS and with history of DVT. Davies [65] detected mutation of gene Leiden factor V in one patient among 25 patients examined — with primary or recurrent antiphospholipid syndrome and DVT in history. Bertolaccini et al. [66] found presence of G20210A mutation of prothrombin gene in 1,3% patients with APS and DVT in history. Different results were received by Dizon-Towson et al. [67] where in any of examined persons with APS and DVT in were not detected inherited clotting factors of VTE. Fink et al. [68] examined presence of APS in patients with leg ulceration and found in 16 for 27 examined (59%) presence of LA and deep vein thrombosis in history. Barbaud et al. [69] found increased anticardiolipin titer in 39,6% of patients with leg ulceration and DVT in history.

In patients with recurrences of DVT and venous ulcer, IT was detected in 88% of studied cases. Recurrent venous thrombosis in patients with inherited thrombophilia leads to recurrent CVU. These dates support the hypothesis that such patients should have prolonged anticoagulation therapy to prevent new episodes of DVT and CVU.

U wszystkich osób włączonych do badania wykonano test na obecność antykoagulantu tocznia (LA) i przeciwciał anatykardiolipinowych (ACL). Stwierdzono obecność LA u 5 chorych (4,5%), w tym u dwóch z wrodzoną trombofiliją. W jednym przypadku obecności LA towarzyszyła mutacja typu Leiden genu czynnika V, zaś w drugim — niedobór białka S. We wszystkich 5 przypadkach, w których stwierdzono obecność LA, wykazano zakrzepicę żył głębokich w wywiadzie i/lub potwierdzoną za pomocą badania ultrasonograficznego zakrzepicę przebytą. Wysokie miano ACL wykryto u 12 chorych (10,9%) (8 w klasie IgG, 3 w klasie IgM i jeden w klasie IgG i IgM). U 3 chorych z podwyższonym mianem ACL klasy IgG stwierdzono również obecność LA. Łącznie obecność przeciwciał antyfosfolipidowych (APA) stwierdzono u 14 pacjentów w badanej grupie (12,7%). Trzech chorych ze zwiększonym stężeniem ACL i obecnością LA przebyło zakrzepicę żył głębokich potwierdzoną za pomocą badania ultrasonograficznego. U tych osób nie wykryto dodatkowej obecności defektów wrodzonej trombofilii. Spośród 9 pacjentów z izolowanym podwyższonym mianem ACL 4 (2 w klasie IgG, jeden w klasie IgM, jeden w klasie IgG i IgM) przebyło epizody zakrzepicy żył głębokich, z czego u 2 z nich (u jednej w klasie IgG i jednej w IgG i IgM) występowała mutacja typu Leiden genu czynnika V.

W grupie kontrolnej zwiększone miano ACL stwierdzono u 2 osób (1,8%) (2 pacjentów w klasie IgG) bez wykazanej w badaniach podmiotowych, fizykalnych i ultrasonograficznych przebytej zakrzepicy żył głębokich. U żadnej osoby w grupie kontrolnej nie wykryto obecności LA.

Dokonano oceny ciężkości przebiegu owrzodzenia żylnego podudzi u chorych z wykrytą wrodzoną trombofiliją i bez stwierdzonej obecności wrodzonych czynników ryzyka zakrzepicy żylny (tab. IX). U chorych z wrodzoną trombofiliją owrzodzenie żylny po raz pierwszy pojawiało się w młodszym wieku (pomiędzy 29 a 49 rokiem życia), utrzymywało się dłużej pomimo stosowania podobnych lub zbliżonych metod leczniczych (leki flebotropowe, kompresjoterapia, leczenie miejscowe) i charakteryzowało się ono większą skłonnością do nawrotów w porównaniu z owrzodzeniem żylnym występującym u pacjentów bez stwierdzonej obecności wrodzonej trombofilii. Poziom bólu spowodowany owrzodzeniem żylnym oraz wielkość i lokalizacja zmian troficzných była podobna w obu grupach. Współwystępowanie dwóch i/lub więcej wrodzonych czy też wrodzonych i nabytych (przeciwciała antyfosfolipidowe) czynników ryzyka VTE nie miało zasadniczego wpływu na wielkość owrzodzenia żylnego pod-

We conclude that our study results confirm that inherited thrombophilia might be one of several important risk factors leading to venous leg ulceration. Patients with inherited clotting factors have an increased risk of developing recurrent DVT and CVU. We suggest that the association between inherited thrombophilia and development of venous ulceration needs further longitudinal and controlled studies based on larger numbers of patients.

Conclusions

1. Presence of inherited thrombophilia was detected in 30% patients with venous leg ulceration and in 88% with recurrence venous ulcers in comparison with control group where 1.8% of persons had leg ulceration.
2. Most common risk factor of VTE in patients with primary and recurrent venous ulcers was factor V Leiden mutation.
3. In patients with inherited thrombophilia venous ulceration was present also in younger age, was lasting longer without healing, and had more tendencies for recurrence in comparison with patients without inherited clotting factors.
4. No differences were found in size, localization and pain level in patients with chronic venous leg ulceration with and without leg ulceration.
5. No differences were found in clinical state of venous ulcers depending on kind of inherited thrombophilia defect.
6. Presence of inherited VTE risk factors can increase risk of DVT leading in a final stage to venous ulceration.

Presence of LA and ACL coexisting with inherited thrombophilia causes to increased number of episodes of DVT, with possibility in later stages to cause venous ulcers.

udzia. Natomiast owrzodzenie żyłne u tych chorych miało charakter trudno gojącego się ze skłonnością do częstszych nawrotów. Wszyscy chorzy w tej grupie przebyli masywną proksymalną zakrzepicę żył głębokich, obejmującą żyły biodrowe i w 2 przypadkach żyłę główną dolną.

Wśród 31 osób (40%) z owrzodzeniem żylnym, bez obecności wrodzonych czynników ryzyka VTE, z przebytą zakrzepicą żył głębokich, w 5 przypadkach do wystąpienia zakrzepicy i rozwoju w późniejszym okresie owrzodzenia żylnego podudzi przypadkach mogła przyczynić się obecność przeciwciał antyfosfolipidowych.

Omówienie

Obniżenie jakości życia, wydłużone i utrudnione procesy gojenia, częstość nawrotów pomimo stosowania różnych metod leczenia, pochłaniających około 1–2% budżetów finansowych przeznaczonych na opiekę zdrowotną w krajach Europy Zachodniej i Stanach Zjednoczonych Ameryki Północnej (w Polsce koszty leczenia owrzodzeń żylnych nie są znane) — to główne przyczyny tak wnikliwego poszukiwania przyczyn powstawania, nowych metod leczenia i zapobiegania przewlekłym owrzodzeniom żylnym podudzi [1, 3, 31–33].

Wrodzona trombofilia w mniejszym lub większym stopniu usposabia do zwiększonego ryzyka wystąpienia zakrzepicy żył głębokich w porównaniu z populacją osób zdrowych. Zakrzepica żył głębokich kończyn dolnych, powodując różnego stopnia całkowitą lub częściową niedrożność żył głębokich, niewydolność zastawek oraz refluks żylny, doprowadza do powstania nadciśnienia żylnego, które jest udokumentowanym czynnikiem odgrywającym główną rolę w tworzeniu się owrzodzeń żylnych podudzi. W badaniach Milne i wsp. [34] wykazano, że u 25–75% badanych chorych z przewlekłym owrzodzeniem żylnym podudzi rozwinął się zespół pozakrzepowy w wyniku przebytej zakrzepicy żył głębokich. W badaniach przeprowadzonych w zachodniej Australii przez Bakera i wsp. [35] 17% chorych z owrzodzeniami żylnymi w wywiadzie wskazywało na przebytą zakrzepicę żył głębokich. Strandness i wsp. [36] w toku 39-miesięcznej obserwacji obejmującej 61 chorych po przebytej zakrzepicy żył głębokich stwierdzili pojawienie się owrzodzeń żylnych podudzi u 3 osób (5%). W innym badaniu przeprowadzonym przez ten sam zespół badaczy, w którym przez 25 miesięcy obserwowano 77 chorych po przebytej zakrzepicy żył głębokich, owrzodzenie żyłne wystąpiło u 5 chorych (6%). Mudge i wsp. [37] w ciągu 5 lat obserwacji obejmującej 278 chorych z jednostronną zakrzepicą żył głębokich stwierdzili pojawienie się owrzodzenia żylnego u 8% badanych. Odpowiedź na pytanie o zakres ryzyka wystąpienia owrzodzeń żylnych jako konsekwencji zespołu pozakrzepowego przynieść powinna długoletnia obserwacja obejmująca chorych po przebytych epizodach zakrzepicy żył głębokich.

Jeśli więc zakrzepica żył głębokich jest znanym i potwierdzonym czynnikiem ryzyka rozwoju owrzodzenia żylnego podudzi, to możliwe jest bezpośrednie powiązanie pomiędzy wrodzoną trombofilią a owrzodzeniem żylnym.

Wyniki przeprowadzonych przez autorów niniejszej pracy badań wskazują na występowanie u co 3. chorego z przewlekłym owrzodzeniem żylnym podudzi co najmniej jednego wrodzonego czynnika ryzyka VTE.

Na uwagę zasługuje także fakt, że każdy chory z badanej grupy, u którego stwierdzono wrodzoną trombofilię, przeżył co najmniej jeden epizod zakrzepicy żył głębokich, po którym w krótkim okresie czasu (średnio 2,8 roku) dochodziło do rozwoju owrzodzenia żylnego goleni. Nawroty owrzodzeń żylnych podudzi u ponad 2/3 chorych (88%) wiązały się z obecnością wrodzonych czynników ryzyka VTE, które doprowadzały do nawrotowych zakrzepic żył głębokich i rozwoju trudno gojących się, niegojących się lub nawracających owrzodzeń.

Wyniki obecnie przeprowadzonych badań wskazują, że u chorych z przewlekłym i nawrotowym owrzodzeniem żylnym podudzi najczęściej występującym wrodzonym czynnikiem ryzyka VTE jest mutacja typu Leiden genu czynnika V. Uzasadnia to fakt, że jest to także najczęściej występujący defekt wrodzonej trombofilii wśród ogólnej populacji oraz najczęściej występująca u osób rasy kaukaskiej przyczyna skłonności do VTE [20, 21, 38–40]. U 5,5% chorych z owrzodzeniem żylnym podudzi stwierdzono występowanie dwóch i/lub więcej wrodzonych czynników ryzyka VTE. Liczba i rodzaj wrodzonego defektu nie miały zasadniczego wpływu na lokalizację i wielkość owrzodzenia, jednak mogły pośrednio wpływać na zwiększenie ryzyka wystąpienia nawrotowej zakrzepicy żył głębokich i nawrotowych owrzodzeń żylnych. Wyniki niniejszych badań sugerują, że wrodzona trombofilia może zwiększać ryzyko wystąpienia pierwszorazowych i przyczyniać się do powstawania nawrotowych owrzodzeń żylnych podudzi.

Liczba publikacji, która ukazała się w ostatnich latach, mająca na celu wskazanie i ustalenie bezpośredniej zależności pomiędzy wrodzoną trombofilią a owrzodzeniem żylnym podudzi jest niewielka. W pracach badacze najczęściej selektywnie analizowali rolę pojedynczych naturalnych inhibitorów krzepnięcia (nie-dobór antytrombiny, białka C, białka S), mutacji typu Leiden genu czynnika V oraz oporności na aktywowane białko C, rzadziej natomiast polimorfizmu G20210A genu protrombiny w patogenezie owrzodzeń żylnych podudzi. Należy jednak podkreślić, uwzględniając przytaczane poniżej piśmiennictwo, że dotychczas pomimo przebadania niewielkiej grupy chorych z przewlekłym owrzodzeniem żylnym podudzi (w porównaniu z 1–2% ogólnej populacji, u której w ciągu życia rozwija się co najmniej jeden epizod owrzodzenia żylnego) stwierdza się stosunkowo częste występowanie u tych osób wrodzonych czynników ryzyka VTE, które doprowadzając w początkowym okresie do rozwoju zakrzepicy żył głębokich, w końcowym przyczyniają się do powstania owrzodzenia żylnego.

Pierwsze badania nad rolą wrodzonych czynników ryzyka VTE i ich związku z powstawaniem i przebie-

giem owrzodzenia żylnego podudzi przeprowadzili Falanga i wsp. [41]. Badacze ci u 5 spośród 19 chorych (26%) z owrzodzeniem żylnym podudzi (w tym 2 osób z przeżytym epizodem zakrzepicy żył głębokich) wykryli obniżone stężenia białka C i/lub białka S. Tsutsui i wsp. [42] opisali przypadek pacjenta z nawrotowym owrzodzeniem żylnym goleni i niedoborem białka S typu II. Phifer i wsp. [43] u 3 spokrewnionych ze sobą pacjentów z owrzodzeniem żylnym podudzi stwierdzili niedobór antytrombiny. Grossman i wsp. [44], badając podłoże zakrzepicy u 29 chorych z owrzodzeniem żylnym podudzi, u 11 (38%) wykryli oporność na aktywowane białko C, przy czym jedynie u 2 potwierdzili występowanie mutacji typu Leiden genu czynnika V. Hafner i von Felten [45] przebadali 20 chorych i u 4 (20%) (2 osoby z przeżytym epizodem zakrzepicy żył głębokich) stwierdzili oporność osocza na aktywowane białko C. W badaniach Munkvada i Jorgensena [46] obejmujących 46 chorych z przewlekłym owrzodzeniem żylnym goleni u 12 pacjentów (22%), w tym u 3 osób z wywiadem przebytej zakrzepicy żył głębokich, wykazano nieprawidłową oporność osocza na aktywowane białko C. Maessen-Visch i wsp. [47] spośród 92 chorych z otwartym owrzodzeniem podudzi pochodzenia żylnego i/lub blizną powrodową (stadium kliniczne C5 i C6, zgodnie z klasyfikacją niewydolności żylny według CEAP) u 21 osób (23%) wykryli mutację typu Leiden genu czynnika V (20 heterozygot, 1 homozygota). Wśród chorych z mutacją typu Leiden genu czynnika V aż u 91% badanych w wywiadzie lub wykonanym badaniu ultrasonograficznym stwierdzano epizod zakrzepicy żył głębokich, a u 38% rozwinęła się nawrotowa zakrzepica żylna. Podobne wyniki uzyskali Gaber i wsp. [48]. Badacze ci przebadali 100 pacjentów z przewlekłym owrzodzeniem żylnym podudzi i u 19 spośród 53 chorych (36%) z udokumentowanym, przeżytym epizodem zakrzepicy żył głębokich wykryli mutację typu Leiden genu czynnika V.

Jedną z największych grup chorych — aż 88 osób z przewlekłym owrzodzeniem żylnym podudzi — przebadali i opisał zespół Rhoda MacKenzie [49] z Uniwersytetu w Edynburgu i Birmingham w Wielkiej Brytanii. Badacze ci jako pierwsi dokonali oceny jednoczesnego występowania wszystkich 5 ogólnie uznanych wrodzonych czynników ryzyka VTE u chorych z owrzodzeniem żylnym podudzi. U 40% badanych chorych z przewlekłym owrzodzeniem żylnym wykryto obecność co najmniej jednego czynnika ryzyka wrodzonej trombofilii. U 4 (5%) (3 osoby z przeżytym epizodem zakrzepicy żył głębokich) był to niedobór antytrombiny; u 5 (6%) (2 osoby z przeżytym epizodem VTE) — niedobór białka C; u 6 (7%) (w tym u 3 osób z przeżytym

epizodem zakrzepowym) — niedobór białka S, u 3 osób, z których wszystkie przebyły epizod VTE — obecność mutacji G20210A genu protrombiny. Spośród 14 osób z przewlekłym owrzodzeniem żylnym podudzi, u których wykryto oporność na aktywowane białko C, u 11 stwierdzono obecność mutacji typu Leiden genu czynnika V (u 2 osób z przebytą zakrzepicą żył głębokich).

Jednak nie wszyscy badacze stwierdzali tak znaczącą częstość występowania wrodzonych defektów u chorych z owrzodzeniami żylnymi podudzi. Znacznie niższą częstość występowania wrodzonych czynników ryzyka VTE u chorych z owrzodzeniem żylnym podudzi niż w przytaczanych powyżej pracach wykazali w swoich publikacjach Jebeleanu i Procopciuc [50] oraz Ribeaudeau i wsp. [51]. Jebeleanu i Procopciuc [50] na 20 przebadanych chorych z owrzodzeniem żylnym podudzi jedynie u 2 (10%) stwierdzili stan heterozygotyczny wobec polimorfizmu PT G20210A. Natomiast Ribeaudeau i wsp. [51], badając 35 chorych z przewlekłym owrzodzeniem żylnym, tylko u 1 pacjenta (3%) wykryli mutację typu Leiden genu czynnika V.

Z niniejszych badań, jak również z prac dotyczących zależności pomiędzy wrodzoną trombofilią a przewlekłym owrzodzeniem żylnym podudzi opublikowanych w ostatnich latach, wynika, że u pacjentów z przewlekłą chorobą żylną czynniki ryzyka wrodzonej trombofilii występują znacznie częściej niż w ogólnej populacji ludzi zdrowych i podobnie często jak u chorych z przebytą zakrzepicą żył głębokich [8]. Na uwagę zasługuje fakt, że jedynie badacze z ośrodków w Edynburgu i Birmingham badali obecność wszystkich uznanych obecnie czynników ryzyka wrodzonej trombofilii u chorych z przewlekłymi owrzodzeniami żylnymi podudzi. Pozostali autorzy tylko w sposób wybiórczy oceniali obecność jednego lub dwóch wrodzonych czynników ryzyka zakrzepicy. Ze względu na małą liczbę publikacji dotyczących tego problemu i małą liczebność badanych grup chorych trudno jest obecnie stwierdzić i ustalić, co u chorych z owrzodzeniem żylnym podudzi jest najczęstszym, a co najrzadszym wrodzonym czynnikiem ryzyka żylnych chorób zakrzepowo-zatorowej oraz czy jednakowo różne wrodzone czynniki ryzyka zakrzepicy mają taki sam wpływ na rozwój i przebieg kliniczny owrzodzenia żylnego. Należy podkreślić, że w obecnej pracy przebadano najliczniejszą z dotychczas opublikowanych i dostępnych w piśmiennictwie grupę chorych (110 pacjentów oraz 110 osób w grupie kontrolnej) z owrzodzeniami żylnymi podudzi, u których badano obecność wszystkich uznanych obecnie wrodzonych czynników ryzyka żylnych chorób zakrzepowo-zatorowej. W niniejszej pracy wszyscy chorzy, u których wy-

kryto obecność czynników wrodzonej trombofilii, przebyli epizody zakrzepicy żył głębokich potwierdzone i udokumentowane za pomocą badań ultrasonograficznych. W pracach wyżej przytaczanych nie u wszystkich chorych, u których stwierdzono obecność wrodzonej trombofilii, wystąpiły udokumentowane epizody przebytej zakrzepicy żył głębokich. Należy jednak pamiętać, że trudno jest zdefiniować i ustalić, czy u danego chorego przewlekłe owrzodzenie żylnie podudzi spowodowane jest etiologią pozakrzepową czy też pierwszoplanową rolę odgrywa niewydolność zastawkowa powstała w innym mechanizmie. W niektórych przypadkach brak udokumentowanej w wywiadzie żylnych chorób zakrzepowo-zatorowej może być jednak spowodowany tym, że wiele epizodów zakrzepicy żył głębokich przebiega subklinicznie, inne są niezdiagnozowane, gdyż najczęściej wykonywane badanie ultrasonograficzne jest mniej czułe niż flebografia w ukazywaniu zmian pozakrzepowych w układzie żył głębokich, szczególnie zlokalizowanych poniżej kolana. W jeszcze innych przypadkach chorzy, przedstawiając przebieg swojej choroby, myślą przebyte epizody zakrzepicy żył głębokich z zapaleniem żył powierzchownych. Stosunkowo duża częstość występowania czynników ryzyka wrodzonej trombofilii u chorych z przewlekłą chorobą żylną niezależnie od tego, czy żylną chorobę zakrzepowo-zatorową udokumentowano w wywiadzie i/lub badaniu ultrasonograficznym, może świadczyć o znacznie większej liczbie pacjentów z owrzodzeniem żylnym pochodzenia pozakrzepowego [65, 79].

Owrzodzenia żylnie podudzi w 88–90% wykazują na ogół tendencje do gojenia, ale u niektórych chorych (10–12%) nigdy nie dochodzi do całkowitego wyleczenia zmian troficznymi w obrębie goleni. W przeprowadzonym w Szkocji badaniu *Lothian and Forth Halley Leg Ulcer Study* 20% owrzodzeń żylnych pomimo stosowanego leczenia nie uległo wygojeniu w ciągu 2 lat, a 8% było czynnych (niewygojonych) przez 5 lat. U 45% chorych epizody czynnych owrzodzeń żylnych trwały dłużej niż 10 lat, a u 21% — 5–10 lat [38, 52]. Z danych epidemiologicznych wynika, że u około 1/3 chorych występuje w ciągu życia tylko jeden epizod owrzodzenia żylnego, u 1/3 — 2–4, a u pozostałych 4 lub więcej takich incydentów. Znaczny problem stanowią nawroty owrzodzeń żylnych po ich wygojeniu. Odsetek nawrotów owrzodzeń żylnych obserwowany w badaniach przeprowadzonych przez Hanssona, Mayberr'ego, Dinna i Henry'ego pomimo stosowania leczenia (chirurgiczne, terapia uciskowa — kompresjoterapia) jest różny i waha się od 6 do 15 nawrotów owrzodzeń żylnych w ciągu roku [53–55]. Dotychczas do końca nie poznano i nie wyjaśniono przyczyn nawrotów owrzodzeń żylnych (pomijając

nieprawidłowości związane z niewłaściwym postępowaniem leczniczym lub niestosowaniem terapii leczniczej). Z badań autorów niniejszej pracy wynika, że wśród 35 osób z nawrotową zakrzepicą żył głębokich u 31 występowało nawrotowe owrzodzenie żyłne podudzi, z czego u 29 (88%) chorych wykryto również wrodzoną trombofilię, która może przyczyniać się do powstawania nawrotów owrzodzeń żylnych podudzi.

Chociaż wyniki badań wielu autorów [43, 44, 46, 47, 49, 56] wskazują na udział wrodzonej trombofilii w patogenezie owrzodzenia żylnego podudzi, to jednak dotychczas nie udało się wykazać zależności, wpływu i znaczących różnic pomiędzy ciężkością przebiegu klinicznego owrzodzenia żylnego (oceniając między innymi: czas trwania owrzodzenia, liczbę nawrotów owrzodzenia, powierzchnię owrzodzenia, lokalizację, skalę bólu wywołaną owrzodzeniem) u chorych ze stwierdzoną wrodzoną trombofilią i bez niej.

W niniejszej pracy wyniki przeprowadzonych badań wskazują na brak różnic pod względem wielkości, lokalizacji owrzodzenia i natężenia odczuwanego bólu pomiędzy chorymi z owrzodzeniem żylnym podudzi z wykazaną wrodzoną trombofilią i bez niej. Stwierdzono natomiast, że u pacjentów ze wrodzoną trombofilią owrzodzenie żyłne pojawia się wcześniej, trwa — nie gojąc się — dłużej i charakteryzuje się większą skłonnością do nawrotów niż u chorych, u których nie wykryto wrodzonych czynników ryzyka żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej. Nie zauważono znaczących różnic pod względem przebiegu i czasu trwania pierwszorazowego i nawrotowego owrzodzenia żylnego podudzi zależnych od rodzaju występującego wrodzonego defektu. W niniejszej pracy stwierdzono także, że współwystępowanie 2 i więcej wrodzonych czy też wrodzonych i nabytych (przeciwciała antyfosfolipidowe) czynników ryzyka żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej nie miało zasadniczego wpływu na wielkość owrzodzenia żylnego podudzia. Natomiast owrzodzenie żyłne u tych chorych trudno goiło się i u pacjentów tych stwierdzono skłonność do częstszych nawrotów. Chorzy w tej grupie przebyli masywną proksymalną zakrzepicę żył głębokich, obejmującą żyły biodrowe oraz żyłę główną dolną.

Piśmiennictwo dotyczące oceny i wpływu wrodzonych i nabytych czynników ryzyka VTE na przebieg kliniczny owrzodzenia żylnego podudzi jest ubogie. Obecnie jedynie grupa badaczy z Uniwersytetu w Edynburgu i Birmingham w Wielkiej Brytanii dokonała analizy przebiegu klinicznego owrzodzenia żylnego podudzi u pacjentów ze stwierdzonymi wrodzonymi czynnikami ryzyka VTE i bez ich obecności. W swojej pracy autorzy porównywali obie grupy chorych, oceniając: czas

trwania owrzodzenia, jego powierzchnię całkowitą, liczbę epizodów oraz natężenie bólu nim spowodowanego. Między grupami nie odnotowano znaczących różnic statystycznych, co jednak — jak podkreślają MacKenzie i wsp. [49] — w tym przypadku prawdopodobnie wiąże się ze zbyt małą liczbą przebadanych chorych ($n = 88$) z owrzodzeniem żylnym ze stwierdzoną wrodzoną trombofilią i bez niej.

Czynniki nabyte (środowiskowe), a w szczególności przeciwciała antyfosfolipidowe, współtowarzysząc wrodzonej trombofilii, mogą przyczyniać się do zwiększenia liczby epizodów zakrzepicy żył głębokich, zaostrzenia jej przebiegu, doprowadzając w końcowym etapie do rozwoju owrzodzeń żylnych podudzi. Zwiększone stężenie przeciwciał antykardiolipinowych w klasie IgG lub IgM występuje u około 5–10% osób ogólnej populacji [57, 58]. Antykoagulant toczeniowy wykrywa się w ogólnej populacji z częstością około 2%. Częstość występowania przeciwciał antyfosfolipidowych wśród pacjentów z wywiadem w kierunku żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej nieobciążonych SLE i innymi chorobami autoimmunologicznymi była przedmiotem badań różnych autorów. Antykoagulant toczeniowy wykrywano u 0,4–14% badanych, zaś antykardiolipiny u 2–14% takich pacjentów [59–63].

W niniejszej pracy wyniki przeprowadzonych badań wskazują na współwystępowanie przeciwciał antyfosfolipidowych u 4 spośród 33 pacjentów (12,12%) z wrodzoną trombofilią, przebytą zakrzepicą żył głębokich i owrzodzeniem żylnym goleni. W 2 przypadkach występowanie wrodzonych czynników ryzyka VTE było skojarzone z obecnością LA, w 2 przypadkach z obecnością wysokiego miana ACL klasy IgG. Wyniki niniejszej pracy mogą sugerować, że współwystępowanie wrodzonych i nabytych (przeciwciała antyfosfolipidowe) czynników ryzyka VTE powoduje, że owrzodzenie żyłne u chorych z defektem łączonym nie goi się lub trudno się goi i wiąże się ze skłonnością do częstszych nawrotów, a chorzy w tej grupie przebyli masywną proksymalną zakrzepicę żył głębokich.

Próby określenia częstości występowania wrodzonych czynników ryzyka żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej i przeciwciał antyfosfolipidowych podejmowano w kilku badaniach. Ames i wsp. [64] stwierdzili obecność czynnika V Leiden u 14% chorych z APS i wywiadem w kierunku zakrzepicy żył głębokich. Davies i wsp. [65] wykryli mutację typu Leiden genu czynnika V u jednego spośród 25 pacjentów z pierwotnym lub wtórnym zespołem antyfosfolipidowym i przebytą zakrzepicą żylną. Bertolaccini i wsp. [66] stwierdzili obecność mutacji G20210A genu protrombiny u 1,3% chorych z APS i epizodem zakrzepowym. Odmienne

wyniki uzyskali Dizon-Towson i wsp. [67], którzy u żadnej spośród badanych osób z APS i wywiadem zakrzepowym nie wykryli wrodzonych czynników ryzyka VTE. Fink i wsp. [68] badali występowanie tylko APS u chorych z owrzodzeniem żylnym podudzi, stwierdzając u 16 osób spośród 27 badanych (59%) obecność LA i przebytą zakrzepicę żył głębokich. Barbaud i wsp. [69] stwierdzili zwiększone miano antykardiolipin u 39,6% chorych z owrzodzeniem żylnym goleni i wywiadem zakrzepicy żył głębokich.

Z przeprowadzonych przez autorów niniejszej pracy badań oraz z przytoczonych publikacji wynika, że współistnienie APS z wrodzoną trombofilią, jak również samodzielne występowanie APS, zwiększając liczbę epizodów zakrzepowych, może przyczynić się do rozwoju owrzodzeń żylnych podudzi.

Wnioski

1. Obecność czynników ryzyka wrodzonej trombofilii wykryto u co trzeciego pacjenta (30%) z owrzodzeniem żylnym podudzi, u ponad 2/3 chorych (88%) z nawrotowym owrzodzeniem żylnym goleni i u 1,8% osób grupy kontrolnej.
2. Najczęściej występującym wrodzonym czynnikiem ryzyka żylnych chorób zakrzepowo-zatorowej zarówno w grupie chorych z jednorazowym, jak i nawrotowym owrzodzeniem żylnym podudzi, była mutacja typu Leiden genu czynnika V.
3. U chorych z wrodzoną trombofilią owrzodzenie żylnych podudzi pojawiało się wcześniej, trwało — nie gojąc się — dłużej i wiązało się z większą skłonnością do nawrotów w porównaniu z chorymi, u których nie wykryto wrodzonych czynników ryzyka żylnych chorób zakrzepowo-zatorowej.
4. Nie wykryto różnic pod względem wielkości, lokalizacji owrzodzenia i natężenia odczuwanego bólu pomiędzy chorymi z owrzodzeniem żylnym podudzi ze stwierdzoną wrodzoną trombofilią i bez niej.
5. Nie stwierdzono różnic pod względem przebiegu klinicznego owrzodzeń żylnych podudzi w zależności od rodzaju defektu wrodzonej trombofilii.
6. Występowanie wrodzonych czynników ryzyka żylnych chorób zakrzepowo-zatorowej może zwiększać ryzyko rozwoju zakrzepicy żył głębokich, doprowadzając w końcowym etapie do powstania owrzodzenia żylnego.
7. Obecność przeciwciał typu tocznia i przeciwciał antykardiolipinowych, współtowarzysząc wrodzonej trombofilii, przyczynia się do zwiększenia liczby epizodów zakrzepicy żył głębokich, mogąc doprowadzać w końcowym etapie do rozwoju owrzodzeń żylnych podudzi.

References

1. Ruckley CV (1997) Socioeconomic impact of chronic venous insufficiency and leg ulcer. *Angiology*, 48: 67–69.
2. Callam MJ (1994) Epidemiology of varicose veins. *Br J Surg*, 81: 167–173.
3. International Task Force (1999) The management of chronic venous disorder of the leg: an evidence-based report. *Phlebology*, 14: Suppl 1.
4. Moffatt CJ, Franks PJ, Doherty DC (2004) Prevalence of leg ulceration in a London population. *QJM*, 97: 431–437.
5. Jawień A (2001) Epidemiologia przewlekłej niewydolności żylnych w Polsce. *Choroby Żył*, 24. Publikacja medyczna firmy Servier.
6. Bergqvist D, Lindholm C, Nelzen O (1999) Chronic leg ulcers: the impact of venous disease. *J Vasc Surg*, 29: 752–755.
7. de Araujo T (2003) Managing the patient with venous ulcer. *Ann Intern Med*, 138: 326–334.
8. Laing W (1992) Chronic venous diseases of the leg. Office of Health Economics, London.
9. Harding AJ, Mann CV (eds) (1988) *Bailey and Love's Short Practice of Surgery*. Lewis, London 1988: 113.
10. Thulesius O (1996) The venous wall and valvular function in chronic venous insufficiency. *Int Angiol*, 15: 114–118.
11. Bradbury AW, Mackenzie RK, Burns P, Fegan C (2002) Thrombophilia and chronic venous ulceration. *Eur J Vasc Surg*, 24: 97–104.
12. Faioni EM, Valsecchi C, Palla A, Taioli E (1997) Free protein S deficiency is a risk factor for venous thrombosis. *Thromb Haemost*, 78: 1343–1346.
13. Conard J, Horellou MH, van Dreden P (1992) Homozygous protein C deficiency with late onset and recurrent coumarin-induced skin necrosis. *Lancet*, 339: 743–744.
14. Tripodi A, Mannucci PM (2001) Laboratory investigation of thrombophilia. *Clin Chem*, 47: 597–606.
15. Franco RF, Reitsma PH (2001) Genetic risk factors of venous thrombosis. *Hum Genet*, 109: 369–384.
16. Kearon C, Crowther M, Hirsh J (2000) Management of patients with hereditary hypercoagulable disorders. *Ann Rev Med*, 51: 169–185.
17. Bykowska K, Vertun-Baranowska B, Windyga J, Łopaciuk S (2000) Występowanie mutacji G20210A genu protrombiny w Polsce. *Pol Arch Med Wew, CIV*: 729–733.
18. Lane DA, Mannucci PM, Bauer KA (1996) Inherited thrombophilia: Part I. *Thromb Haemost*, 76: 651–662.
19. Lane DA, Mannucci PM, Bauer KA (1996) Inherited thrombophilia: Part I. *Thromb Haemost*, 76: 824–834.
20. Łopaciuk S, Bykowska K, Vertun-Baranowska B, Windyga J, Brojer E (1997) Występowanie czynnika V Leiden wśród chorych na zakrzepicę żylną i kliniczna charakterystyka nosicieli tej mutacji. *Acta Haemat Pol*, 28 (suppl 3): 317.
21. Łopaciuk S (2001) Wrodzona trombofilia. In: Łopaciuk S (ed) *Zakrzepcy i zatory*. PZWL, Warszawa.
22. Łopaciuk S (2000) Wrodzona trombofilia: patogeneza, aspekty kliniczne i leczenie. *Pol Arch Med Wew*, 5: 795–803.
23. Martinelli I (2001) Risk factors in venous thromboembolism. *Thromb. Haemost*, 86: 395–403.
24. Rosendaal FR (1999) Risk factors for venous thrombotic disease. *Thromb Haemost*, 82: 610–619.
25. Łopaciuk S (1990) Badanie układu krzepnięcia krwi. In: Pawelski S (ed) *Diagnostyka laboratoryjna w hematologii*.

- PZWL, Warszawa: 193–268.
26. Pawelski S, Maj S (1993) Normy kliniczne i choroby wewnętrzne. PZWL; Warszawa.
 27. Millera SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl Acids Res*, 16: 1215–1219.
 28. Bertina RM, Koeleman BPC, Koster T (1994) Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature*, 369: 64–67.
 29. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH (1996) A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood*, 88: 3698–3703.
 30. Laurell CB (1996) Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Analyt Biochem*, 15: 45.
 31. Allan PL, Bradbury AW, Evans CJ (2000) Patterns of reflux and the severity of varicose veins in the general population. *Edinburgh Vein Study. Euro J Vasc Endovasc Surg*, 20: 470–477.
 32. Bradbury AW, Evans CJ, Allan PL (1999) What are the symptoms of varicose veins? *Edinburgh vein study cross sectional population survey. Br Med J*, 318: 353–356.
 33. Consensus Statement (2000) The investigation of chronic venous insufficiency. *Circulation*, 102: 1–38.
 34. Milne A, Ruckley C (1994) Venous insufficiency following deep vein thrombosis. *Vasc Med Rev*, 5: 241–248.
 35. Baker SR, Stacey MC, Jopp-McKay AG (1991) Epidemiology of chronic venous ulcers. *Br J Surg*, 78: 864–867.
 36. Strandness DE, Langlois Y, Cramer M (1983) Long-term sequel of acute venous thrombosis. *J Am Med Assoc*, 250: 1289–1292.
 37. Mudge M, Leinster SJ, Hughes LE (1988) A prospective 10-year study of the post-thrombotic syndrome in a surgical population. *Ann R Coll Surg Engl*, 70: 249–252.
 38. Callam MJ, Ruckley CV, Harper DR (1985) Chronic ulceration of the leg the problem and provision of care. *Br Med J*, 290: 1855–1856.
 39. Cumming AM, Shiach CR (1999) The investigation and management of inherited thrombophilia. *Clin Lab Haemat*, 21: 77–92.
 40. Łopaciuk S, Bykowska K, Kwiecień H et al (2001) Factor V Leiden, prothrombin gene G20210A variant and methylenetetrahydrofolate reductase C677T genotype in young adult with ischemic stroke. *Clin Appl Thrombosis/Hemostasis*, 7: 346–350.
 41. Falanga V, Bontemo FA, Eaglstein WH (1990) Protein C and protein S plasma levels in patients with lipodermatosclerosis and venous ulceration. *A. Dermat*, 126: 1195–1197.
 42. Tsutsui K, Ishida W, Ohashi T, Takehara K (1997) Hereditary type IIB protein S deficiency in a patient with recurrent venous ulcers. *Dermatol*, 194: 198–199.
 43. Phifer TJ, Mills GM (1990) Occult antithrombin III deficiency: a potentially lethal complication of the postphlebotic limb. *J Vasc Surg*, 11: 586–590.
 44. Grossman D, Heald PW, Wang C (1997) Activated protein C resistance and anticardiolipin antibodies in patients with venous leg ulcers. *J Am Acad Dermatol*, 37: 409–413.
 45. Hafner J, von Felten AR (1997) Resistance to activated protein C in patients with venous leg ulcers. *Dermatol*, 195: 413–414.
 46. Munkvad S, Jorgensen M (1996) Resistance to activated protein C: a common anticoagulant deficiency in patients with venous leg ulceration. *Br J Dermat*, 134: 296–298.
 47. Maessen-Visch MB, Hamulyak K, Tazelaar DJ (1999) The prevalence of Factor V Leiden mutation in patients with leg ulcers and venous insufficiency. *A Dermatol*, 135: 41–44.
 48. Gaber Y, Siemens HJ, Schmeller W (2001) Resistance to activated protein C due to factor V Leiden mutation: high prevalence in patients with post-thrombotic leg ulcers. *Br J Dermatol*, 144: 546–548.
 49. MacKenzie RK, Ludlam CA, Ruckley CV (2002) The prevalence of thrombophilia in patients with chronic venous leg ulceration. *J Vasc Surg*, 35: 718–722.
 50. Jebeleanu G, Procopciuc L (2001) G20210A prothrombin gene mutation identified in patients with venous leg ulcers. *J Cell Moll Med*, 5: 397–401.
 51. Ribeauudeau F, Senet P, Cavuela JM (1999) A prospective coagulation study including resistance to activated protein C and mutations in factors V and II in venous leg ulcers. *Br J Dermat*, 141: 259–263.
 52. Skene AI, Smith JM, Dore CJ (1992) Venous leg ulcers: a prognostic index to predict time to healing. *Br Med J*, 305: 1119–1121.
 53. Dinn E, Henry M (1992) Treatment of venous ulceration by infection sclerotherapy and compression hosiery: a 5 year study. *Phlebology*, 7: 23–26.
 54. Hansson C, Andersson E, Swanbeck G (1987) A follow-up study of leg and foot ulcer patients. *Acta Derm Venereol*, 67: 496–500.
 55. Mayberry JC, Moneta GL, Taylor LM (1991) Fifteen year results of ambulatory compression therapy for chronic venous ulcers. *Surgery*, 109: 575–581.
 56. Lee R (2001) Factor V Leiden: a clinical review. *Amer J Med Sci*, 322: 88–102.
 57. Love PE, Santoro SA (1990) Antiphospholipid antibodies: anticardiolipin and the lupus anticoagulant in systemic lupus erythematosus (SLE) and in non-SLE disorders. Prevalence and clinical significance. *Ann Intern Med*, 112: 682–698.
 58. Vila P, Hernandez MC, Lopez-Fernandez MF, Batlle J (1994) Prevalence, follow-up and clinical significance of the anticardiolipin antibodies in normal subjects. *Thromb Haemost*, 72: 209–213.
 59. Bongard O, Reber G, Bounameaux H, de Moerloose P (1992) Anticardiolipin antibodies in acute venous thromboembolism. *Thromb Haemost*, 67: 724.
 60. Ginsberg JS, Wells PS, Bryll-Edwards P, Donovan D (1995) Antiphospholipid antibodies and venous thromboembolism. *Blood*, 86: 3685–3691.
 61. Kapiotis S, Speiser W, Pabinger-Fasching I (1991) Anticardiolipin antibodies in patients with venous thrombosis. *Haemostasis*, 21: 19–24.
 62. Lechner K (1974) Acquired inhibitors in nonhemophilic patients. *Haemostasis*, 3: 65–93.
 63. Windygaj (2002) Przeciwciała antyfosfolipidowe jako czynnik ryzyka żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej. *Praca doktorska, Warszawa*.
 64. Ames PRJ, Iannaccone L, Margaglione M, Brancaccio V

- (2001) Plasma homocysteine in patients with idiopathic antiphospholipid antibodies. XVIII Congress International Society on Thrombosis and Haemostasis, Paris, France, July 6-12, 2001; abstract P1443 (CD ROM).
65. Davies KA, Athanassiou P, Loizou S, Lane D (1995) Factor V Leiden mutation and venous thrombosis. *Lancet*, 345: 132-133.
 66. Bertolaccini ML, Atsumi T, Lanchbury JS et al (2001) Plasma tumor necrosis factor- α levels and the -238* A promoter polymorphism in patients with antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost*, 85: 198-203.
 67. Dizon-Townson D, Hutchison C, Silver R, Ware Branch D, Ward K (1995) The factor V Leiden mutation which predisposes to thrombosis is not common in patients with antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost*, 74: 1029-1034.
 68. Fink AM, Kottas-Heldenberg A et al (2002) Lupus anticoagulant and venous leg ulceration. *Br J Dermatol*, 146: 308-310.
 69. Barbaud AM, Robert B, Reichert S et al (1994) Anticardiolipin antibodies and ulcerations of the leg. *J Am Acad Dermatol*, brief communications: 670-671.