

# Evaluation of insulin-like growth factor I in the varicose vein wall

## Ocena zawartości insulinopodobnego czynnika wzrostu I w ścianie żyłaków kończyn

Radosław Kowalewski<sup>1</sup>, Andrzej Małkowski<sup>2</sup>, Krzysztof Sobolewski<sup>2</sup>, Marek Gacko<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Vascular Surgery and Transplantology, Medical University of Białystok, Poland (Klinika Chirurgii Naczyń i Transplantacji Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku)

<sup>2</sup>Department of Medical Biochemistry, Medical University of Białystok, Poland (Zakład Biochemii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku)

### Abstract

**Background.** Extensive extracellular matrix remodelling is present in the wall of varicose veins. The process is controlled by numerous factors, including peptide growth factors. The aim of the study was to evaluate the content of insulin-like growth factor I (IGF-I), insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP-3), and insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) in the wall of varicose veins and varicose veins complicated by thrombophlebitis.

**Material and methods.** Walls of varicose veins and varicose veins complicated by thrombophlebitis made up the studied material. Walls of normal saphenous veins, which were harvested from patients with chronic limb ischaemia undergoing infrainguinal by-pass grafting, made up the control material. Contents of IGF-I, IGFBP-3, and IGF-1R in the investigated tissues were evaluated using the ELISA method.

**Results.** IGF-I content in walls of varicose veins and varicose veins complicated by thrombophlebitis were comparable, and were increased compared to the walls of normal veins. IGFBP-3 content was significantly increased only in the walls of varicose veins complicated by thrombophlebitis. IGF-1R level were increased in the walls of varicose veins compared to the walls normal of veins; whereas, in the course of thrombophlebitis, it was increased compared to the walls of normal veins, as well as uncomplicated varicose veins.

**Conclusions.** The study results indicate differences in IGF-I, IGFBP-3, and IGF-1R content between walls of healthy veins, varicose veins, and varicose veins complicated by thrombophlebitis.

**Key words:** IGF-I, IGFBP-3, IGF-1R, thrombophlebitis, varicose veins

### Streszczenie

**Wstęp.** W ścianie żyłaków kończyn wykazano rozległą przebudowę macierzy pozakomórkowej tkanki łącznej. Proces ten jest kontrolowany przez wiele czynników, w tym przez peptydowe czynniki wzrostu. Celem pracy jest ocena zawartości insulinopodobnego czynnika wzrostu I (IGF-I), białka 3 wiążącego insulinopodobny czynnik wzrostu (IGFBP-3) oraz receptora typu I dla IGF (IGF-1R) w ścianie żyłaków i żyłaków powikłanych zakrzepowym zapaleniem.

**Materiał i metody.** Materiałem badanym były ściany żyłaków i żyłaków w stanie zakrzepowego zapalenia. Materiał kontrolny stanowiły ściany prawidłowych żył odpiszczelowych, pobrane od chorych na przewlekłe niedokrwienie kończyn, u których wykonano pomostowanie udowo-podkolanowe. Metodą ELISA oceniono zawartość IGF-I, IGFBP-3 oraz IGF-1R w badanych tkankach.

### Address for correspondence:

Dr hab. med. Radosław Kowalewski  
Klinika Chirurgii Naczyń i Transplantacji UM w Białymstoku  
ul. M. Skłodowskiej-Curie 24A, 15–276 Białystok  
tel: +48 (85) 746 82 77, fax: + 48 (85) 746 88 96  
e-mail: [korado@2com.pl](mailto:korado@2com.pl)

**Wyniki.** Zawartość IGF-I w ścianie żyłaków oraz żyłaków powikłanych zakrzepowym zapaleniem jest porównywalna i jest większa niż w ścianie żył prawidłowych. Zawartość IGFBP-3 jest większa wyłącznie w ścianie żyłaków powikłanych zakrzepowym zapaleniem. Zawartość IGF-1R w ścianie żyłaków jest większa niż w ścianie żył prawidłowych. Ponadto w przebiegu zakrzepowego zapalenia zawartość tego receptora jest większa także w porównaniu ze ścianą żyłaków niepowikłanych.

**Wnioski.** Wyniki badań wskazują na różnice w zawartości IGF-I, IGFBP-3 i IGF-1R pomiędzy ścianami żył zdrowych, żyłaków kończyn oraz żyłaków kończyn powikłanych zakrzepowym zapaleniem.

**Słowa kluczowe:** IGF-I, IGFBP-3, IGF-1R, zakrzepowe zapalenie żył, żyłaki kończyn

Acta Angiol 2011; 17, 4: 264–270

## Introduction

The multifactorial aetiology of varicose veins has still not been clearly explained, in spite of their high prevalence in the societies of developed countries. However, ample evidence implicates changes in the mechanical properties of the vein wall as a key factor in the disease pathogenesis [1–3].

The mechanical properties of the vessel wall depend to a great extent on extracellular matrix composition. Its extensive changes have been demonstrated in the wall of varicose veins [4, 5]. Tissue remodelling is a complex process, which is controlled by numerous factors, including peptide growth factors. Increased content of transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) and fibroblast growth factor (FGF) have been demonstrated in the wall of varicose veins. Furthermore, increased blood concentration of vascular endothelial growth factor (VEGF) was found in patients with varicose veins [6–9]. Another growth factor which influences extracellular matrix metabolism is insulin-like growth factor I (IGF-I). It enhances synthesis of collagen type I and selected glycosaminoglycans, among its other biological activities [10–12].

The liver is the main site of IGF-I synthesis, but the growth factor is also synthesized by endothelial cells and smooth muscle cells (SMCs) of the vessel wall [13]. Only 1% of IGF-I is present in its free form; whereas, most of the growth factor forms a complex with its binding proteins, including insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP-3), which carries about 90% of IGF-I. A complex composed of IGF-I and IGFBP-3 plays a key role in IGF-I movement to extravascular compartment [14]. Furthermore, IGFBP-3 creates a stable tissue reservoir for IGF-I because it has as much as 50 times greater affinity to IGF-I than the growth factor receptors [15]. The metabolic effects of IGF-I depend on its binding to the receptor with its subsequent autophosphorylation. A key role in biological activity of the growth factor is played by insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) [16].

## Wstęp

Dotychczas w pełni nie wyjaśniono wieloczynnikowej etiologii żyłaków kończyn, pomimo powszechnego występowania choroby w społeczeństwach krajów rozwiniętych. Spośród wielu czynników predysponujących do jej rozwoju zmianom właściwości mechanicznych ściany żyłnej przypisuje się kluczowe znaczenie w patogenezie choroby [1–3].

Właściwości mechaniczne ściany naczyniowej zależą między innymi od składu macierzy pozakomórkowej tkanki łącznej, której rozległą przebudowę wykazano w ścianie żyłaków kończyn [4, 5]. Przebudowa tkanek jest złożonym procesem kontrolowanym przez wiele czynników, w tym przez peptydowe czynniki wzrostu. W ścianie żyłaków kończyn wykazano zwiększoną zawartość transformującego czynnika wzrostu  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) oraz czynnika wzrostu fibroblastów (FGF), natomiast we krwi chorych na żyłaki kończyn odnotowano zwiększone stężenie naczyniowego czynnika wzrostu śródbłonka (VEGF) [6–9]. Kolejnym czynnikiem wzrostu, który wpływa na metabolizm macierzy pozakomórkowej, jest insulinopodobny czynnik wzrostu I (IGF-I). Zwiększa on między innymi syntezę kolagenu typu I oraz wybranych glikozoaminoglikanów [10–12].

Czynnik IGF-I jest syntetyzowany przede wszystkim w wątrobie, ale również przez komórki śródbłonka i mięśni gładkich ściany naczyniowej [13]. Tylko 1% czynnika wzrostu występuje w formie wolnej. Pozostały IGF-I związany jest z jego białkami wiążącymi, w tym w 90% z białkiem 3 wiążącym insulinopodobny czynnik wzrostu (IGFBP-3). Kompleks IGF-I i IGFBP-3 odgrywa kluczową rolę w transporcie czynnika wzrostu do przestrzeni pozanaczyniowej [14]. Ponieważ IGFBP-3 charakteryzuje się nawet 50-krotnie większym powinowactwem do IGF-I niż receptory czynnika wzrostu, to białko to pełni funkcję stabilnego rezerwuaru IGF-I w tkankach [15]. Metaboliczne efekty działania IGF-I zależą od związania się czynnika wzrostu z jego receptorem, który ulega aktywacji na drodze autofosforylacji. Kluczową

It is suspected that IGF-I may also play a role in structure as well as function alterations of the vein wall in patients with varicose veins. Thus, the aim of the study was to evaluate the content of IGF-I, IGFBP-3, and IGF-IR in the walls of varicose veins and varicose veins complicated by thrombophlebitis in comparison with the walls of normal veins.

### Material and methods

The investigation protocol was approved by the Committee for Ethics and Supervision on Human and Animal Research of the Medical University of Białystok. A total of 24 patients (16 women and 8 men; mean age  $52.9 \pm 9.2$ ; range 48–65) were enrolled in the research. All of them underwent surgery for primary varicose veins complicated by thrombophlebitis, which was treated conservatively in an acute phase of the disease. The interval between the disease onset and surgical treatment varied from 3 to 18 months ( $8.5 \pm 5.1$ ).

A preoperative Duplex Doppler examination of lower limb veins was performed in all patients. Superficial and deep veins were examined in a standing position with a 5–10 MHz linear transducer (Siemens Elegra, Siemens, Erlangen, Germany). Venous competence tests were performed in longitudinal sections, with the insonation angle less than  $60^\circ$ . Reflux time longer than 0.5 seconds was accepted as a sign of valvular incompetence. All patients in the studied group exhibited sapheno-femoral junction incompetence with reflux in the femoral region of the greater saphenous vein (GSV). The lesser saphenous vein was affected in 2 patients (8%). Patients with a history of sclerotherapy or deep vein thrombosis, as well as those with deep vein reflux, were excluded from the study.

Segments of varicose veins and varicose veins complicated by thrombophlebitis, which were collected during classical varicose vein operations from the calf region of the operated limb, made up the studied materials. The control materials consisted of segments of normal GSV harvested from 12 patients (8 women and 4 men; mean age  $57 \pm 5.1$ ; range 48–65) with chronic limb ischaemia, who underwent infrainguinal by-pass grafting. Varicose veins and pathological vein reflux were absent in the control group of patients. All collected samples were washed with 0.9% NaCl solution, weighed, cut, and stored at  $-70^\circ\text{C}$ .

Harvested tissue samples were cut into pieces, suspended in a 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.6) in a 1:3 (w/v) ratio, homogenized with a knife homogenizer (25,000 rpm for 45 s at  $4^\circ\text{C}$ ), and sonicated (20 kHz,  $4 \times 15$  s at  $4^\circ\text{C}$ ). After centrifugation ( $10,000 \times g$  for 15 minutes at  $4^\circ\text{C}$ ) the protein content was determined according to Brad-

rolę w aktywności biologicznej IGF-I odgrywa receptor typu I dla IGF-I (IGF-IR) [16].

Zakładając, że również IGF-I może uczestniczyć w zmianie struktury i funkcji ściany żyłnej u chorych na żylaki kończyn, celem pracy była ocena zawartości IGF-I, IGFBP-3 i IGF-IR w ścianie żyłaków i żyłaków powikłanych zakrzepowym zapaleniem w porównaniu ze ścianą żył prawidłowych.

### Materiał i metody

Badanie przeprowadzono po uzyskaniu zgody Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Włączono do niego 24 chorych (16 kobiet i 8 mężczyzn) w wieku 48–65 lat ( $52,9 \pm 9,2$  roku) operowanych z powodu pierwotnych żyłaków kończyn powikłanych zakrzepowym zapaleniem, które leczono zachowawczo w ostrym okresie choroby. Czas pomiędzy wystąpieniem zakrzepowego zapalenia żyłaków a leczeniem operacyjnym wynosił 3–18 miesięcy ( $8,5 \pm 5,1$  miesiąca).

U wszystkich chorych wykonano przedoperacyjnie badanie dopplerowskie z podwójnym obrazowaniem układu żylnego kończyn dolnych. Żyłę układu powierzchownego i głębokiego badano u chorego pozostającego w pozycji stojącej, głowicą liniową o częstotliwości 5–10 MHz (Siemens Elegra, Siemens, Erlangen, Niemcy). Badanie wydolności przeprowadzono na przekrojach podłużnych naczyń z zachowaniem kąta padania wiązki ultradźwiękowej mniejszego niż  $60^\circ$ . Za objaw niewydolności zastawek żylnych przyjęto refluks o czasie trwania dłuższym niż 0,5 sekundy. Niewydolność ujścia żyły odpiszczelowej z patologicznym refluksem w jej odcinku udowym stwierdzono u 24 chorych (100%), natomiast niewydolność żyły odstrzałkowej u 2 chorych (8%). Z badania wykluczono chorych z niewydolnością układu żył głębokich oraz wywiadem skleroterapii i zakrzepicy żył głębokich.

Materiałem badanym były odcinki żyłakowato rozszerzonych żył oraz odcinki żyłakowato rozszerzonych żył w stanie zakrzepowego zapalenia pobrane podczas klasycznej operacji żyłaków kończyn z goleni operowanej kończyny. Materiał kontrolny stanowiły odcinki prawidłowych żył odpiszczelowych pobrane od 12 chorych (8 kobiet i 4 mężczyzn) na przewlekłe niedokrwienie kończyn w wieku 48–65 lat ( $57 \pm 5,1$  roku), u których wykonano pomostowanie udowo-podkolanowe. W grupie kontrolnej nie stwierdzono żyłaków kończyn oraz patologicznego refluksu w układzie żylnym kończyn. Bezpośrednio po pobraniu materiał tkankowy płukano w 0,9-procentowym roztworze NaCl, ważono, porcjowano i przechowywano w temperaturze  $-70^\circ\text{C}$ .

Pobrane tkanki cięto na skrawki, zawieszano w 0,05 M buforze Tris-HCl, pH 7,6 (w stosunku 1g tkanki na 3 ml

ford method in obtained supernatants [17]. Contents of IGF-I, IGFBP-3, and IGF-IR were assessed according to the ELISA method with the following commercially available kits: Quantikine Human IGF-I Immunoassay (catalogue number DGI00; R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA), Quantikine Human IGFBP-3 Immunoassay (catalogue number DGB300; R&D Systems Inc.), and Phospho-IGF-IR (Tyr1135/1136) STAR ELISA Kit (catalogue number 17-482; Millipore, Billerica, MA, USA). Measurements were carried out according to the manual provided by the manufacturer. The results were expressed per g of protein

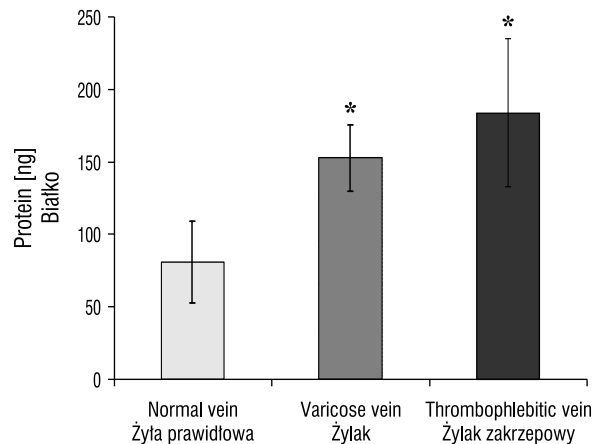
Statistical analysis of the obtained results was carried out by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test. For all tests, a  $p$  value  $< 0.05$  was considered as statistically significant. Mean values  $\pm$  standard deviations (SD) are presented.

## Results

The content of insulin-like growth factor I in the vein wall is shown in Figure 1. It was increased ( $p < 0.05$ ) in the varicose vein wall ( $152.73 \pm 22.96$  ng/g of protein) compared to the normal vein wall ( $80.76 \pm 28.38$  ng/g of protein). The IGF-I content in the vein wall in the course of thrombophlebitis ( $183.83 \pm 51.14$  ng/g of protein) was also increased ( $p < 0.05$ ) compared to the wall of normal veins, but it was not significantly changed in comparison with the wall of uncomplicated varicose veins ( $p > 0.05$ ). No gender related differences in the IGF-I content were found in control and examined groups ( $p > 0.05$ ).

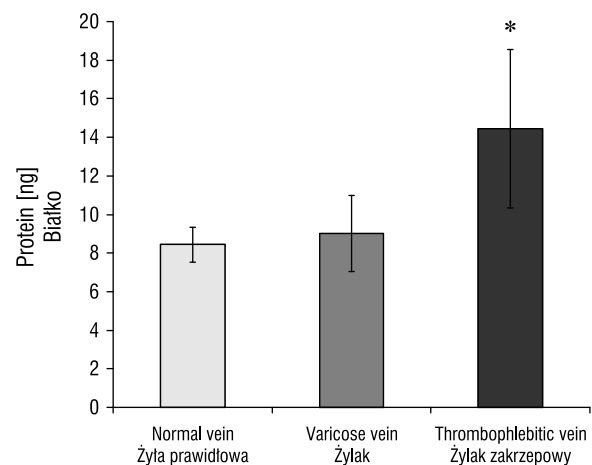
The content of insulin-like growth factor binding protein 3 in the vein wall is shown in Figure 2. It was comparable ( $p > 0.05$ ) in the walls of normal veins ( $8.45 \pm 0.9$  ng/g of protein) and varicose veins ( $9.03 \pm 1.97$  ng/g of protein). However, the IGFBP-3 content in the walls of varicose veins complicated by thrombophlebitis ( $14.45 \pm 4.09$  ng/g of protein) was significantly increased compared to that found in the walls of normal veins and uncomplicated varicose veins ( $p < 0.05$ ). No gender related differences in the IGFBP-3 content were found in control and examined groups ( $p > 0.05$ ).

The content of insulin-like growth factor I receptor in the vein walls is shown in Figure 3. It was increased ( $p < 0.05$ ) in the walls of varicose veins ( $321.28 \pm 71.14$  ng/g of protein) compared to the walls of normal veins ( $207.92 \pm 22.98$  ng/g of protein). Furthermore, the IGF-IR level was highly significantly increased in the walls of varicose veins complicated by thrombophlebitis ( $1276.47 \pm 298.66$  ng/g of protein) in comparison with the walls of normal veins ( $p < 0.001$ ),



**Figure 1.** IGF-I content in the vein wall in ng/g of protein. Statistically significant differences compared to the wall of normal veins ( $*p < 0.05$ )

**Rycina 1.** Zawartość IGF-I w ścianie żyłnej w ng w przeliczeniu na g białka. Różnice istotne statystycznie w porównaniu ze ścianą żył prawidłowych ( $*p < 0,05$ )



**Figure 2.** IGFBP-3 content in the vein wall in ng/g of protein. Statistically significant differences compared to the wall of normal veins ( $*p < 0.05$ )

**Rycina 2.** Zawartość IGFBP-3 w ścianie żyłnej w ng w przeliczeniu na g białka. Różnice istotne statystycznie w porównaniu ze ścianą żył prawidłowych ( $*p < 0,05$ )

buforu) i homogenizowano za pomocą homogenizatorów nożowego (25 000 obrotów/min, 45 s, 4°C) oraz ultradźwiękowego (20 kHz, 4 × 15 s, 4°C). Po odwirowaniu (10 000 × g, 15 min, 4°C) w płynie nadosadowym oznaczano zawartość białka metodą Bradforda [17]. Zawartość IGF-I, IGFBP-3 i IGF-IR oceniano metodą ELISA, wykorzystując następujące komercyjne zestawy: Quantikine Human IGF-I Immunoassay (numer katalogowy DGI00; R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, Stany Zjednoczone), Quantikine Human IGFBP-3 Immunoassay (numer katalogowy DGB300; R&D Systems Inc.) oraz

as well as with the walls of uncomplicated varicose veins ( $p < 0.001$ ). No gender related differences in the IGF-IR content were found in control and examined groups ( $p > 0.05$ ).

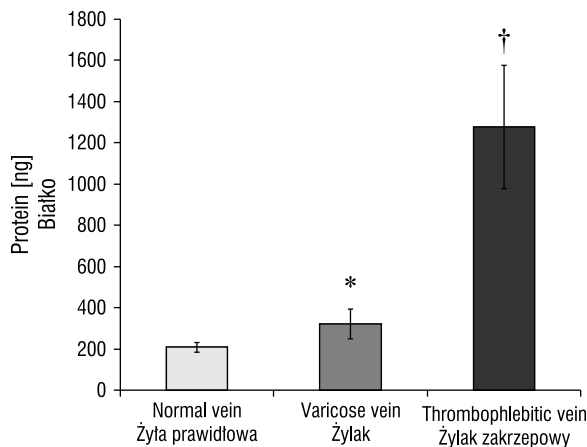
### Discussion

IGF-I is a growth factor with a multiple biological activity. It enhances collagen type I mRNA expression and protein synthesis, as well as synthesis of chondroitin and dermatan sulphates, among others [10–12]. Increased collagen type I mRNA expression and protein content, as well as increased content of chondroitin and dermatan sulphates, were found previously in the walls of varicose veins [4, 5, 8, 19]. The above-mentioned changes in extracellular matrix composition may be related to IGF-I content, which is increased in the walls of varicose veins.

IGF-I expression is suppressed by oestrogens. Furthermore, increased expression of oestrogen receptors was demonstrated in the walls of peripheral veins in females compared to males [20, 21]. However, we did not find any gender related differences in IGF-I levels in control and examined groups. Explaining this ostensible incompatibility of the obtained results with the above data, one should consider the age of the patients enrolled in the research and the fact that only progesterone receptors are present in the vein walls in postmenopausal women [20]. However, it cannot be excluded that IGF-I content in the vein walls may show gender related differences in younger patients.

IGF-I metabolic activity depends on its receptor expression and concentrations of its binding proteins [13]. IGFBP-3 is the major IGF-I binding protein. It carries about 90% of the growth factor, and its complex with IGF-I plays a key role in IGF-I blood transport and its movement to extravascular compartment [14, 15]. However, IGFBP-3 has opposite roles in controlling IGF-I activity. It limits the growth factor bioavailability and prolongs its half-life in blood; whereas cell surface associated IGFBP-3 stimulates biological activity of IGF-I in peripheral tissues [13, 15]. Furthermore, IGF-I/IGFBP-3 complex provides a stable reservoir of the growth factor in peripheral tissues and prevents its clearance from tissues to blood [15]. A “synthetic” phenotype of SMC can synthesize IGFBP-3. This type of SMC dominates in the wall of varicose veins [6, 22]. Moreover, IGFBP-3 mRNA expression and protein synthesis is enhanced by proinflammatory cytokines [13]. Considered all together, that may explain increased IGFBP-3 content in the walls of varicose veins complicated by thrombophlebitis.

Proteolytic degradation of IGFBP-3 and release of IGF-I from the complex is a prerequisite condition for



**Figure 3.** IGF-IR content in the vein wall in ng/g of protein. Statistically significant differences compared to the wall of normal veins (\* $p < 0.05$ ). Statistically significant differences compared to the wall of normal veins and uncomplicated varicose veins († $p < 0.001$ )

**Rycina 3.** Zawartość IGF-IR w ścianie żyłnej w ng w przeliczeniu na g białka. Różnice istotne statystycznie w porównaniu ze ścianą żył prawidłowych (\* $p < 0,05$ ). Różnice istotne statystycznie w porównaniu ze ścianą żył prawidłowych i żyłaków niepowikłanych († $p < 0,001$ )

Phospho-IGF-IR (Tyr1135/1136) STAR ELISA Kit (numer katalogowy 17-482; Millipore, Billerica, MA, Stany Zjednoczone). Oznaczenia wykonano w sposób zalecany przez producenta. Wyniki przeliczono na gram białka.

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej jednoczynnikowym testem wariancji ANOVA i następnie testem Tukeya. Za znamienne statystycznie przyjmowano różnice przy  $p < 0,05$ . Ryciny przedstawiają wartości średnie  $\pm$  odchylenie standardowe.

### Wyniki

Zawartość insulinopodobnego czynnika wzrostu I w ścianie żyłnej przedstawiono na rycinie 1. Zawartość IGF-I jest większa ( $p < 0,05$ ) w ścianie żyłaków ( $152,73 \pm 22,96$  ng/g białka) w porównaniu ze ścianą żył prawidłowych ( $80,76 \pm 28,38$  ng/g białka). W przebiegu zakrzepowego zapalenia zawartość IGF-I w ścianie żyłnej ( $183,83 \pm 51,14$  ng/g białka) jest również większa niż w ścianie żył prawidłowych ( $p < 0,05$ ), ale nie ulega istotnym zmianom w porównaniu ze ścianą żyłaków niepowikłanych ( $p > 0,05$ ). W grupie kontrolnej i grupach badanych nie wykazano różnic w zakresie zawartości IGF-I zależnych od płci ( $p > 0,05$ ).

Zawartość białka 3 wiążącego insulinopodobny czynnik wzrostu w ścianie żyłnej przedstawiono na rycinie 2. Zawartość IGFBP-3 w ścianie żył prawidłowych ( $8,45 \pm 0,9$  ng/g białka) i żyłaków ( $9,03 \pm 1,97$  ng/g białka) jest porównywalna ( $p > 0,05$ ). Natomiast zawartość IGFBP-3 w ścianie żyłaków powikłanych zakrzepowym

IGF-I binding to its receptor [15]. Matrix metalloproteinases (MMP-1, MMP-2, MMP-3) and cathepsin D play a role in this process [15, 23]. Walls of varicose veins and varicose veins complicated by thrombophlebitis provide favourable conditions for free IGF-I generation because of increased activity of MMP-1, MMP-2, and cathepsin D in these tissues [24, 25]. Thus, free IGF-I can be bound to its receptors. A key role in the biological activity of the investigated growth factor is played by IGF-IR [16]. Phosphorylated IGF-IR form was examined in our study because its expression indicates the receptor tissue level, and, moreover, its activation by IGF-I. We found increased IGF-IR levels in the walls of varicose veins, and varicose veins complicated by thrombophlebitis in particular.

IGF-IR expression increases with age [16]. The control and examined groups were aged matched in our study. Thus, age cannot be taken into consideration as a possible factor responsible for increased IGF-IR content in the walls of varicose veins. Thrombin is another factor which increases IGF-IR expression [13]. It can be supposed that thrombin generation in the course of thrombophlebitis results in a highly significant increase in the content of IGF-IR in the vein wall.

### Conclusions

The study results indicate differences in IGF-I, IGFBP-3, and IGF-IR content between walls of healthy veins, varicose veins, and varicose veins complicated by thrombophlebitis.

### References

1. Beebe-Dimmer JL, Pfeifer JR, Engle JS, Schottenfeld D (2005) The epidemiology of chronic venous insufficiency and varicose veins. *Ann Epidemiol*, 15: 175–184.
2. Jawien A, Grzela T, Ochwat A (2003) Prevalence of chronic venous insufficiency in men and women in Poland: multicentre cross-sectional study in 40,095 patients. *Phlebology*, 18: 110–122.
3. Naoum JJ, Hunter GC, Woodside KJ, Chen C (2007) Current advances in the pathogenesis of varicose veins. *J Surg Res*, 141: 311–316.
4. Kowalewski R, Głowiński S, Sobolewski K, Wolańska M, Płoński A (2000) Przebudowa macierzy międzykomórkowej w ścianie żyłaków. *Pol Przegl Chir*, 72: 912–920.
5. Wolanska M, Sobolewski K, Glowinski S, Kowalewski R, Plonski A (2001) Glycosaminoglycans of normal veins and their alterations in varicose veins and varicose veins complicated by thrombophlebitis. *Eur Surg Res*, 33: 28–32.
6. Badier-Commander C, Couvelard A, Henin D, Verbeuren T, Michel JB, Jacob MP (2001) Smooth muscle cell modulation and cytokine overproduction in varicose veins. An *in situ* study. *J Pathol*, 193: 398–407.
7. Kowalewski R, Malkowski A, Sobolewski K, Gacko M (2009) Evaluation of aFGF/bFGF and FGF signaling pathway in the wall of varicose veins. *J Surg Res*, 15: 165–172.
8. Kowalewski R, Malkowski A, Sobolewski K, Gacko M (2010) Evaluation of transforming growth factor- $\beta$  signaling

zapaleniem ( $14,45 \pm 4,09$  ng/g białka) jest większa niż w ścianie żył prawidłowych i żyłaków niepowikłanych ( $p < 0,05$ ). W grupie kontrolnej i grupach badanych nie wykazano różnic w zawartości IGFBP-3 zależnych od płci ( $p > 0,05$ ).

Zawartość receptora typu I dla insulinopodobnego czynnika wzrostu w ścianie żyłnej przedstawiono na rycinie 3. Zawartość IGF-IR w ścianie żyłaków ( $321,28 \pm 71,14$  ng/g białka) jest większa ( $p < 0,05$ ) niż w ścianie żył prawidłowych ( $207,92 \pm 22,98$  ng/g białka). Natomiast w ścianie żyłaków powikłanych zakrzepowym zapaleniem zawartość badanego receptora ( $1276,47 \pm 298,66$  ng/g białka) jest większa w porównaniu ze ścianą żył prawidłowych ( $p < 0,001$ ), jak również w porównaniu ze ścianą żyłaków niepowikłanych ( $p < 0,001$ ). W grupie kontrolnej i grupach badanych nie wykazano różnic w zakresie zawartości IGF-IR zależnych od płci ( $p > 0,05$ ).

### Omówienie

Czynnik IGF-I charakteryzuje się wielokierunkową aktywnością biologiczną. Zwiększa on między innymi ekspresję mRNA i syntezę kolagenu typu I, a także syntezę siarczanów chondroityny i dermatanu [10–12]. W ścianie żyłaków kończyn stwierdzono zwiększoną ekspresję mRNA i syntezę kolagenu typu I oraz zwiększoną zawartość siarczanów chondroityny i dermatanu [4, 5, 18, 19]. Powyższe zmiany w składzie macierzy pozakomórkowej można powiązać z IGF-I, którego zwiększoną zawartość autorzy pracy stwierdzili w ścianie żyłaków kończyn.

Estrogeny zmniejszają ekspresję IGF-I, a w ścianie żył obwodowych u kobiet wykazano większą ekspresję receptorów dla tych hormonów w porównaniu ze ścianą żył obwodowych u mężczyzn [20, 21]. Jednak w wykonanych badaniach nie stwierdzono różnic w zawartości IGF-I zależnych od płci zarówno w grupach badanych, jak i kontrolnej. Interpretując pozorną niezgodność uzyskanych wyników z powyższymi danymi, należy uwzględnić wiek chorych włączonych do badania oraz fakt, że w okresie przekwitania u kobiet w ścianie żyłnej są obecne wyłącznie receptory dla progesteronu [20]. Nie można jednak wykluczyć, że w młodszych grupach wiekowych zawartość badanego czynnika wzrostu w ścianie żyłnej może wykazywać różnice zależne od płci.

Metaboliczna aktywność IGF-I uwarunkowana jest ekspresją jego receptorów i stężeniem jego białek wiążących [13]. Głównym białkiem wiążącym IGF-I jest IGFBP-3, które wiąże około 90% czynnika wzrostu, a powstający kompleks odgrywa kluczową rolę w transporcie IGF-I we krwi oraz do przestrzeni pozanaczyniowej [14,

- pathway in the wall of normal and varicose veins. *Pathobiology*, 77: 1–6.
9. Yasim A, Kilinc M, Aral M et al (2008) Serum concentration of procoagulant, endothelial and oxidative stress markers in early primary varicose veins. *Phlebology*, 23: 15–20.
  10. Izumi K, Kurosaka D, Iwata T et al (2006) Involvement of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-3 in corneal fibroblasts during corneal wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47: 591–598.
  11. Kudo Y, Iwashita M, Iguchi T, Takeda Y (1996) The regulation of type-I collagen synthesis by insulin-like growth factor-I in human osteoblast-like SaOS-2 cells. *Pflugers Arch*, 433: 123–128.
  12. Thiébot B, Bichoual L, Langris M (1997) IGF-I stimulates synthesis of undersulfated proteoglycans and of hyaluronic acid by peritubular cells from immature rat testis. *Biochim Biophys Acta*, 1358: 127–141.
  13. Delafontaine P, Song YH, Li Y (2004) Expression, regulation, and function of IGF-I, IGF-IR, and IGF-I binding proteins in blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24: 435–444.
  14. Monzavi R, Cohen P (2002) IGFs and IGFBPs: role in health and disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 16: 433–447.
  15. Clemmons DR (1997) Insulin-like growth factor binding proteins and their role in controlling IGF actions. *Cytokine Growth Factor Rev*, 8: 45–62.
  16. Li M, Chiu JF, Gagne J, Fukagawa NK (2008) Age-related differences in insulin-like growth factor-I receptor signaling regulates Akt/FOXO3a and ERK/Fos pathways in vascular smooth muscle cells. *J Cell Physiol*, 217: 377–387.
  17. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248–254.
  18. Sansilvestri-Morel P, Rupin A, Badier-Commander C et al (2001) Imbalance in the synthesis of collagen type I and collagen type III in smooth muscle cells derived from human varicose veins. *J Vasc Res*, 38: 560–568.
  19. Cario-Toumaniantz C, Boularan C, Schurgers LJ et al (2007) Identification of differentially expressed genes in human varicose veins: involvement of matrix gla protein in extracellular matrix remodeling. *J Vasc Res*, 44: 444–459.
  20. Mashiah A, Berman V, Thole HH (1999) Estrogen and progesterone receptors in normal and varicose saphenous veins. *Cardiovasc Surg*, 7: 327–331.
  21. Savolainen-Peltonen H, Loubtchenkov M, Petrov L, Delafontaine P, Häyry P (2004) Estrogen regulates insulin-like growth factor I, platelet-derived growth factor A and B, and their receptors in the vascular wall. *Transplantation*, 77: 35–42.
  22. Bayes-Genis A, Conover CA, Schwartz RS (2000) The insulin-like growth factor axis: A review of atherosclerosis and restenosis. *Circ Res*, 86: 125–130.
  23. Hui W, Rowan AD, Cawston T (2001) Insulin-like growth factor I blocks collagen release and down regulates matrix metalloproteinase-1, -3, -8, and -13 mRNA expression in bovine nasal cartilage stimulated with oncostatin M in combination with interleukin 1alpha. *Ann Rheum Dis*, 60: 254–261.
  24. Glowinski S, Worowski K (1981) Cathepsin D activity and protein degradation products content in the walls of varicose veins of the lower limbs. *Eur Surg Res*, 13: 243–246.
  25. Kowalewski R, Sobolewski K, Wolanska M, Gacko M (2004) Matrix metalloproteinases in the vein wall. *Int Angiol*, 23: 164–169.

15]. Białko IGFBP-3 wykazuje przeciwstawne działanie w stosunku do związanego czynnika wzrostu. We krwi obwodowej zmniejsza ono dostępność IGF-I i wydłuża czas jego połowicznego rozpadu, natomiast na poziomie tkanek obwodowych związane z błonami komórkowymi IGFBP-3 zwiększa biologiczną aktywność czynnika wzrostu [13, 15]. Ponadto kompleks IGF-I/IGFBP-3 w tkankach obwodowych pełni funkcję stabilnego rezerwuaru czynnika wzrostu i zabezpiecza przed jego zwrotnym transportem do krwioobiegu [15]. Jednym ze źródeł IGFBP-3 są komórki mięśni gładkich o fenotypie syntetyzującym, które są dominującym typem komórek mięśni gładkich w ścianie żyłaków kończyn [6, 22]. Ekspresję mRNA i syntezę IGFBP-3 zwiększają natomiast cytokiny zapalne [13]. Fakty te mogą wyjaśniać zwiększoną zawartość IGFBP-3 w ścianie żyłaków powikłanych zakrzepowym zapaleniem.

Do związania się czynnika wzrostu z jego receptorem niezbędna jest proteolityczna degradacja IGFBP-3 i uwolnienie IGF-I z kompleksu [15]. Enzymami odgrywającymi rolę w tym procesie są metaloproteinyzyny macierzy (MMP-1, MMP-2, MMP-3) oraz kathepsyna D [15, 23]. W ścianie żyłaków i żyłaków powikłanych zakrzepowym zapaleniem istnieją korzystne warunki do generowania wolnego IGF-I w związku ze zwiększoną aktywnością MMP-1 i MMP-2 oraz kathepsyny D w tych tkankach [24, 25]. Zatem uwolniony IGF-I może związać się z jego receptorami. Kluczową funkcję w aktywności biologicznej badanego czynnika wzrostu pełni IGF-IR [16]. W niniejszych badaniach oznaczono fosforylowaną formę receptora, ponieważ jej ekspresja wskazuje nie tylko na zawartość receptora w tkankach, ale również na jego aktywację przez IGF-I. Stwierdzono zwiększoną zawartość IGF-IR w ścianie żyłaków, a zwłaszcza żyłaków powikłanych zakrzepowym zapaleniem.

Ekspresja IGF-IR zwiększa się z wiekiem [16]. Jednak wiek w grupach badanej i kontrolnej był porównywalny i nie może być brany pod uwagę jako potencjalny czynnik odpowiedzialny za wzrost zawartości receptora IGF-I w ścianie żyłaków. Kolejnym czynnikiem zwiększającym ekspresję IGF-IR jest trombina [13]. Wydaje się, że generacja tego czynnika krzepnięcia w przebiegu zakrzepowego zapalenia żyłaków może wiązać się z bardzo istotnym statystycznie zwiększeniem zawartości IGF-IR w ścianie żyłaków powikłanych zakrzepowym zapaleniem.

## Wnioski

Wyniki badań wskazują na różnice w zawartości IGF-I, IGFBP-3 i IGF-IR pomiędzy ścianami żył zdrowych, żyłaków kończyn oraz żyłaków kończyn powikłanych zakrzepowym zapaleniem.