

# Vascular endothelial growth factor and its receptors in the varicose vein wall

## Czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego i jego receptory w ścianie żyłaków kończyn

Radostaw 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.** Disturbances in the regulation of vessel wall homeostasis are a potential factor initiating varicose vein development. Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) may play a hypothetic role in this process. The aim of the study was to evaluate mRNA expression and protein content of VEGF-A and its receptors (VEGF R1, VEGF R2) in varicose veins and varicose veins complicated by thrombophlebitis.

**Material and methods.** Walls of varicose veins and varicose veins complicated by thrombophlebitis were the studied material. Walls of normal saphenous veins, which were harvested from patients with chronic limb ischaemia undergoing infrainguinal by-pass grafting, were the control material. The RT-PCR method was employed to assess mRNA expression of VEGF-A and its receptors, whereas the ELISA method was used to evaluate contents of VEGF-A and its receptors.

**Results.** VEGF-A and VEGF R2 mRNA expression is increased, whereas VEGF R1 mRNA expression is unchanged in the wall of varicose veins in comparison with the wall of normal ones. VEGF-A and VEGF R1 mRNA expression is increased in the wall of varicose veins complicated by thrombophlebitis in comparison with walls of normal and varicose veins. VEGF R2 mRNA expression is also increased in the wall of varicose veins complicated by thrombophlebitis in comparison with control veins, but it is comparable to that in the wall of varicose veins. Changes in mRNA expression are correlated with appropriate changes in protein contents of VEGF-A, VEGF R1, and VEGF R2.

**Conclusions.** The demonstrated changes in mRNA expression, as well as in the contents of VEGF-A, VEGF R1, and VEGF R2, in the wall of varicose veins may be accepted as one of the reasons for the clinical symptoms of the disease and can predispose to its progression.

**Key words:** VEGF-A, VEGF R1, VEGF R2, thrombophlebitis, varicose veins

### Streszczenie

**Wstęp.** Zaburzenia regulacji homeostazy ściany naczyniowej są potencjalnym czynnikiem inicjującym rozwój żyłaków kończyn. Hipotetyczną rolę w tym procesie może odgrywać czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego A (VEGF-A). Celem pracy była ocena ekspresji mRNA i zawartości VEGF-A oraz jego receptorów (VEGF R1, VEGF R2) w ścianie żyłaków niepowikłanych i żyłaków powikłanych zakrzepowym zapaleniem.

Address for correspondence:

Radostaw Kowalewski

Klinika Chirurgii Naczyń i Transplantacji UM w Białymstoku

ul. M. Skłodowskiej-Curie 24A, 15–276 Białystok

tel.: +48 (85) 746 82 77, faks: +48 (85) 746 88 96

e-mail: [korado@2com.pl](mailto:korado@2com.pl)

**Materiał i metody.** Materiałem badanym były ściany żyłaków niepowikłanych i żyłaków w stanie zakrzepowego zapalenia. Materiałem kontrolnym były ściany prawidłowych żył odpiszczelowych, pobrane od chorych na przewlekłe niedokrwienie kończyn, u których wykonano zabieg pomostowania udowo-podkolanowego. Na podstawie metody reakcji polimerazy łańcuchowej w połączeniu z odwrotną transkrypcją (RT-PCR) oceniono ekspresję mRNA VEGF-A i jego receptorów, natomiast wykorzystując metodę ELISA, zbadano zawartość VEGF-A i jego receptorów.

**Wyniki.** W ścianie żyłaków w porównaniu ze ścianą żył prawidłowych ekspresja VEGF-A mRNA oraz VEGF R2 mRNA jest większa, podczas gdy ekspresja VEGF R1 mRNA nie ulega istotnym zmianom. W ścianie żyłaków powikłanych zakrzepowym zapaleniem ekspresja VEGF-A mRNA i VEGF R1 mRNA jest większa w porównaniu ze ścianą żył prawidłowych i ścianą żyłaków niepowikłanych. Natomiast ekspresja VEGF R2 mRNA jest również większa niż w ścianie żył prawidłowych, ale porównywalna z ekspresją w ścianie żyłaków niepowikłanych. Zmianom w ekspresji mRNA odpowiadają zmiany w zawartości białka VEGF-A, VEGF R1 i VEGF R2 w ścianie żyłnej.

**Wnioski.** Wykazane zmiany w ekspresji mRNA i zawartości VEGF-A, VEGF R1 i VEGF R2 w ścianie żyłaków kończyn mogą być jedną z przyczyn objawów klinicznych choroby oraz predysponować do jej postępu.

**Słowa kluczowe:** VEGF-A, VEGF R1, VEGF R2, zakrzepowe zapalenie żył, żyłaki kończyn

Acta Angiol 2011; 17, 2: 141–149

## Introduction

Varicose veins are among the most common diseases in societies of developed countries, which influence to a great extent patients' quality of life. The disease is associated with numerous complications, which are present in 10% of patients, including thrombophlebitis [1–3]. Despite its great social impact, the disease pathogenesis still has not been clearly explained and is associated with numerous controversies [4–8].

Loss of ability of homeostasis regulation of the vessel wall is a potential factor initiating varicose vein development. One of the key factors involved in the maintenance of vessel wall integrity is vascular endothelial growth factor A (VEGF-A). It increases endothelial cell fenestration and permeability 50 000 times more than histamine does [9–11]. The process plays an important role in oedema formation, deposition of fibrinogen in extravascular space, fibrin cuff formation, and development of skin changes, characteristically found in chronic venous insufficiency (CVI) [12]. VEGF-A also activates nitric oxide synthase (eNOS). The process decreases vessel wall tone and may predispose to blood stasis and venous hypertension development. Furthermore, generated oxygen free radicals lead to destruction of the vessel wall [11]. However, biological activity of VEGF-A depends on its receptor expression. Among them a key role in endothelial cells is played by VEGF R2, whereas in inflammatory cells it is played by VEGF R1 [10, 13].

Previous studies on the VEGF-A role in varicose vein pathogenesis demonstrated increased plasma levels of the growth factor in patients with varicose veins in different clinical stages of CVI [12, 14, 15]. Increased plasma

## Wstęp

W społeczeństwach krajów rozwiniętych żyłaki kończyn są jedną z najbardziej rozpowszechnionych chorób, która w istotny sposób wpływa na jakość życia pacjentów. U 10% z nich rozwijają się powikłania choroby, do których zalicza się zakrzepowe zapalenie żył powierzchownych [1–3]. Pomimo dużego znaczenia społecznego choroby jej patogenezy dotychczas w pełni nie wyjaśniono i wciąż budzi ona wiele kontrowersji [4–8].

Potencjalnym czynnikiem inicjującym rozwój żyłaków kończyn jest utrata zdolności regulacji homeostazy ściany naczyniowej. Jedną z kluczowych ról w zachowaniu jej integralności odgrywa czynnik wzrostu śródbłonnka naczyniowego A (VEGF-A). Zwiększa on fenestrację komórek śródbłonnka i ich przepuszczalność 50 000 razy silniej od histaminy [9–11]. Proces ten odgrywa istotną rolę w powstawaniu obrzęków, odkładaniu fibrynogenu w przestrzeni pozanaczyniowej i tworzeniu mankietów fibrynowych oraz rozwoju zmian troficznych skóry charakterystycznych dla przewlekłej niewydolności żyłnej (CVI) [12]. Czynnikiem wzrostu śródbłonnka naczyniowego A aktywuje również syntazę tlenu azotu (eNOS), który zmniejszając napięcie ściany naczyniowej, predysponuje do zastoju krwi żyłnej i rozwoju nadciśnienia żylnego, a poprzez generację wolnych rodników pochodzenia tlenowego do destrukcji ściany naczyniowej [11]. Jednak działanie biologiczne VEGF-A jest uwarunkowane ekspresją jego receptorów, spośród których kluczową rolę w komórkach śródbłonnka odgrywa receptor 2 dla VEGF (VEGF R2), zaś w komórkach zapalnych — receptor 1 dla VEGF (VEGF R1) [10, 13].

VEGF-A levels were also found in patients with varicose veins and leg oedema. However, such a relation was not confirmed in patients with varicose veins and other CVI symptoms [14]. Furthermore, it was demonstrated that increased VEGF gene expression in varicose veins was related to sapheno-femoral junction incompetence [11].

However, plasma VEGF-A levels do not reflect in a reliable way its content in the vein wall [11, 14]. Thus, the aim of the study was to evaluate mRNA expression and protein content of VEGF-A and its receptors (VEGF R1, VEGF R2) in varicose veins and varicose veins complicated by thrombophlebitis.

### 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) undergoing surgery for primary varicose veins complicated by thrombophlebitis were enrolled in the research. 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 two patients (8%). Patients with the 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, comprised the studied materials. The control material 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  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### Evaluation of VEGF-A, VEGF R1, and VEGF R2 mRNA expression

A total of 50 mg of harvested tissue was pulverized after immersion in liquid nitrogen. RNA was isolated with AxyPrep Multisource Total RNA Miniprep Kit (catalog no. AP-MN-MS-RNA-50; Axygen Bioscience, Union City, CA, USA). The total RNA concentration was determined by densitometry. The quality of RNA was checked with a UV transilluminator after staining with ethidium bromide.

A total of 1  $\mu\text{g}$  RNA was reverse-transcribed with the use of a RevertAid™ First Stand cDNA Synthesis Kit (catalog no. K1622; Fermentas, Vilnius, Lithuania) and

W dotychczasowych badaniach nad rolą VEGF-A w patogenezie żylaków kończyn stwierdzono zwiększone stężenie tego czynnika wzrostu w osoczu chorych na żylaki kończyn w różnych stopniach klinicznego zaawansowania CVI [12, 14, 15]. Zwiększenie stężenia VEGF-A w osoczu występuje również u chorych na żylaki kończyn z towarzyszącymi obrzękami. Nie stwierdzono natomiast takiej zależności w przypadku innych objawów CVI [14]. Poza tym wykazano związek niewydolności ujścia żyły odpiszczelowej ze zwiększoną ekspresją genu VEGF-A w ścianie żylaków kończyn [11].

Stężenie VEGF-A w osoczu nie odzwierciedla jednak w wiarygodny sposób zawartości tego czynnika wzrostu w ścianie żyłnej [11, 14]. Dlatego celem pracy była ocena ekspresji mRNA i zawartości VEGF-A oraz jego receptorów (VEGF R1, VEGF R2) w ścianie żylaków niepowikłanych i żylaków powikłanych zakrzepowym zapaleniem.

### Material i metody

Badania przeprowadzono po uzyskaniu zgody Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Włączono do nich 24 chorych (16 kobiet i 8 mężczyzn) w wieku 48–65 lat ( $52,9 \pm 9,2$ ) operowanych z powodu pierwotnych żylaków kończyn powikłanych zakrzepowym zapaleniem. U wszystkich chorych w badanej grupie stwierdzono niewydolność ujścia żyły odpiszczelowej z patologicznym refluksiem w jej odcinku udowym. Niewydolność żyły odstrzałkowej odnotowano u 2 chorych (8%). Z badania wyłączono osoby z wywiadem skleroterapii, zakrzepowego zapalenia żył głębokich oraz niewydolnością układu żył głębokich. Materiałem badanym były odcinki żylakowato rozszerzonych żył oraz odcinki żylakowato rozszerzonych żył w stanie zakrzepowego zapalenia pobrane podczas klasycznej operacji żylaków kończyn. Materiałem kontrolnym były prawidłowe żyły odpiszczelowe pobrane od 12 chorych (8 kobiet i 4 mężczyzn) w wieku 48–65 lat ( $57 \pm 5,1$ ) na przewlekłe niedokrwienie kończyn, u których wykonano zabieg pomostowania udowo-podkolanowego. W grupie kontrolnej nie stwierdzono żylaków kończyn oraz patologicznego refluksu w układzie żylnym kończyn. Bezpośrednio po pobraniu materiał tkankowy płukano 0,9-procentowym roztworem NaCl, ważono, porcjowano i przechowywano w temperaturze  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### Ocena ekspresji VEGF-A, VEGF R1 i VEGF R2 mRNA

Badaną tkankę (50 mg) poddawano pulweryzacji w ciekłym azocie; RNA izolowano z wykorzystaniem AxyPrep Multisource Total RNA Miniprep Kit (nr kat. AP-MN-MS-RNA-50; Axygen Bioscience, Union City,

oligo(dT)<sub>18</sub> primers. For cDNA amplification, pairs of primers for the following nucleotide sequences were used: *homo sapiens* VEGF mRNA (NM\_001025366), *homo sapiens* fms-related tyrosine kinase 1 (FLT1-VEGF R1) mRNA (NM\_002019), and *homo sapiens* kinase insert domain receptor (KDR — VEGF R2) mRNA (NM\_002253). Polymerase chain reaction (PCR) was carried out under standard conditions [6, 7]. The results were analysed with QuantityOne software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Optical density of bands corresponding to mRNA expression of VEGF-A, VEGF R1, and VEGF R2 was normalized to optical density of bands corresponding to  $\beta$ -actin mRNA expression in each of the examined tissues. The normalized gene expression in normal veins was accepted as 100%.

### Content evaluation of VEGF-A, VEGF R1, and VEGF R2

The 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°C), and sonicated (20 kHz, 4 × 15 s at 4°C). After centrifugation (10,000 × g for 15 minutes at 4°C) the protein content was determined according to the Bradford method in the obtained supernatants [16]. Contents of VEGF-A, VEGF R1, and VEGF R2 were assessed according to the ELISA method with the following commercially available kits: Quantikine Human VEGF Immunoassay (catalog no. DVE00; R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA), Quantikine Human Soluble VEGF R1/Flt-1 Immunoassay (catalogue no. DVR100B; R&D Systems Inc.), and Quantikine Human soluble VEGF R2 Immunoassay (catalog no. DVR200; R&D Systems Inc.). Measurements were carried out according to the manual provided by the manufacturer. The results were expressed per gram of protein

### Statistical analysis

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 ± standard deviations (SD) are presented.

## Results

Expression of VEGF-A mRNA, VEGF R1 mRNA, and VEGF R2 mRNA was demonstrated in the walls of normal veins (column 1), varicose veins (column 2), and varicose veins complicated by thrombophlebitis (column 3) (Figure 1A). Its densitometric analysis is shown in figure 1B (Figure 1B). VEGF-A mRNA expression was increased (*p* < 0.001) in the walls of varicose veins

CA, Stany Zjednoczone). Całkowitą zawartość RNA oceniano za pomocą densytometrii. Jakość wyizolowanego RNA sprawdzano w ultrafiolecie po barwieniu bromkiem etydyyny.

Jeden mikrogram RNA poddano odwrotnej transkrypcji za pomocą RevertAid™ First Stand cDNA Synthesis Kit (nr kat. K1622; Fermentas, Wilno, Litwa) i starterów oligo(dT)<sub>18</sub>. Do powielenia cDNA wykorzystano pary starterów do następujących sekwencji nukleotydowych: *homo sapiens* VEGF mRNA (NM\_001025366), *homo sapiens* fms-related tyrosine kinase 1 (FLT1-VEGF R1) mRNA (NM\_002019) oraz *homo sapiens* kinase insert domain receptor (KDR-VEGF R2) mRNA (NM\_002253). Reakcję polimerazy łańcuchowej (PCR) przeprowadzono w standardowych warunkach [6, 7]. Wyniki analizowano za pomocą QuantityOne software (Bio-Rad, Hercules, Ca, Stany Zjednoczone). Gęstość optyczną pasm odpowiadających ekspresji VEGF-A, VEGF R1 i VEGF R2 mRNA znormalizowano w stosunku do gęstości optycznej pasm odpowiadających ekspresji mRNA  $\beta$ -aktyny w każdej z badanych tkanek. Znormalizowaną ekspresję genów w żyłach kontrolnych przyjęto za 100%.

### Ocena zawartości VEGF-A, VEGF R1 i VEGF R2

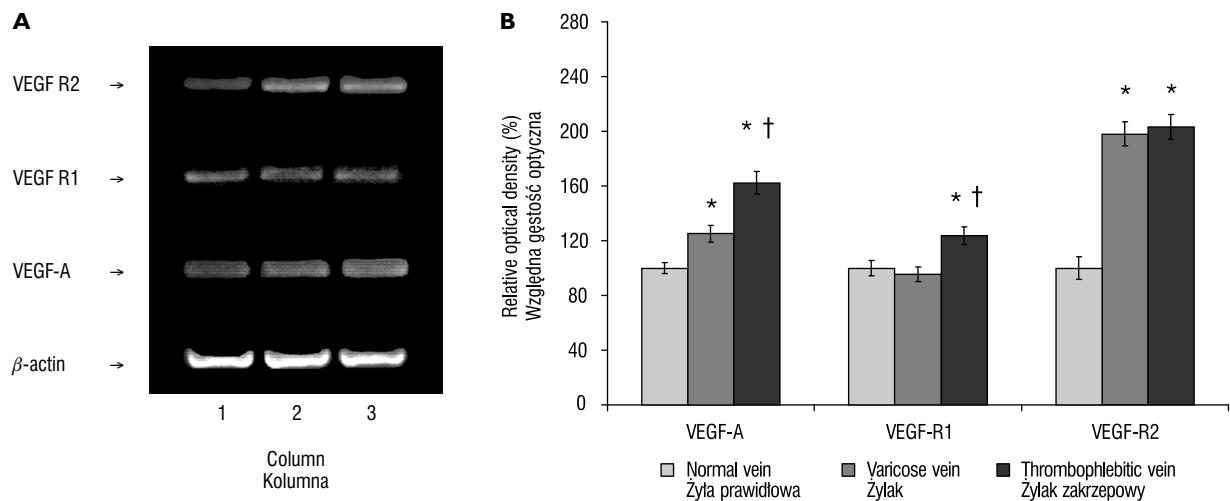
Pobrane tkanki cięto na skrawki, zawieszano w 0,05 M buforze Tris-HCl, pH = 7,6 (w stosunku 1 g tkanki na 3 ml buforu) i homogenizowano za pomocą homogenizatorów nożowego (25 000 obrotów/min, 45 s, 4°C) oraz ultradźwiękowego (20 kHz, 4 × 15 s, 4°C). Po odwirowaniu (10 000 × g, 15 min, 4°C) w płynie nadosadowym oznaczano zawartość białka metodą Bradforda [16]. Zawartość VEGF-A, VEGF R1 i VEGF R2 oceniano metodą ELISA, wykorzystując następujące komercyjne zestawy: Quantikine Human VEGF Immunoassay (nr kat. DVE00; R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, Stany Zjednoczone), Quantikine Human Soluble VEGF R1/Flt-1 Immunoassay (nr kat. DVR100B; R&D Systems Inc.) oraz Quantikine Human soluble VEGF R2 Immunoassay (nr kat. DVR200; R&D Systems Inc.). Oznaczenia wykonano w sposób zalecany przez producenta. Wyniki przeliczono na gram białka.

### Analiza statystyczna

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej, wykorzystując jednoczynnikowy test wariancji ANOVA i następnie test Tukeya. Za znamienne statystycznie przyjmowano różnice przy *p* < 0,05. Na rycinach przedstawiono wartości średnie ± odchylenie standardowe.

## Wyniki

Ekspresję VEGF-A mRNA, VEGF R1 mRNA i VEGF R2 mRNA stwierdzono w ścianie żył prawidłowych (ko-



**Figure 1. A.** Expression of VEGF-A, VEGFR 1, and VEGFR 2 mRNA in the wall of normal veins (column 1), varicose veins (column 2), and varicose veins complicated by thrombophlebitis (column 3). **B.** Densitometric analysis of VEGF-A, VEGFR 1, and VEGFR 2 mRNA expression in the investigated tissues. Optical densities of bands corresponding to VEGF-A, VEGFR 1, and VEGFR 2 mRNA expression were normalized to the optical density of the appropriate band corresponding to  $\beta$ -actin mRNA expression. The normalized expression in control veins was accepted as 100%. Statistically significant differences when compared to the wall of normal veins (\* $p < 0.001$ ). Statistically significant differences when compared to the wall of varicose veins († $p < 0.001$ )

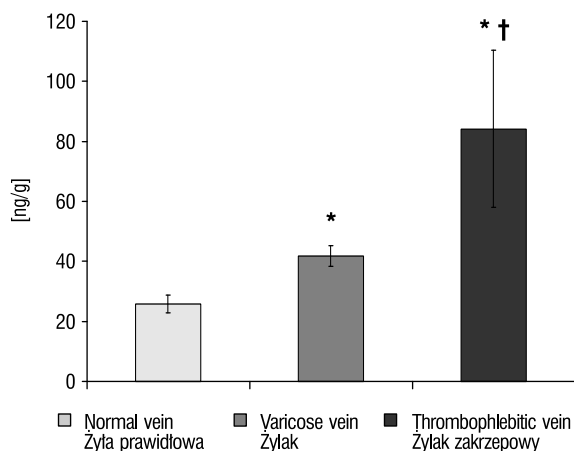
**Rycina 1. A.** Ekspresja mRNA czynnika wzrostu śródbłonnka naczyniowego A (VEGF-A) oraz jego receptorów VEGFR 1 i VEGFR 2 w ścianie żył prawidłowych (kolumna 1), żyłaków niepowikłanych (kolumna 2) i żyłaków powikłanych zakrzepowym zapaleniem (kolumna 3). **B.** Densytometryczna analiza ekspresji VEGF-A, VEGFR 1 i VEGFR 2 mRNA w badanych tkankach. Gęstości optyczne pasm odpowiadających ekspresji VEGF-A, VEGFR-1 i VEGFR-2 mRNA znormalizowano w stosunku do gęstości optycznej właściwego pasma odpowiadającego ekspresji mRNA  $\beta$ -aktyny. Znormalizowaną ekspresję w żyłach kontrolnych przyjęto za 100%. Różnice istotne statystycznie w porównaniu ze ścianą żył prawidłowych (\* $p < 0,001$ ). Różnice istotne statystycznie w porównaniu ze ścianą żyłaków niepowikłanych († $p < 0,001$ )

and varicose veins complicated by thrombophlebitis, when compared to the normal vein wall. Furthermore, VEGF-A mRNA expression in the wall of varicose veins complicated by thrombophlebitis was enhanced in comparison with the wall of varicose veins ( $p < 0.001$ ). VEGFR 1 mRNA expression was increased ( $p < 0.001$ ) in the wall of varicose veins complicated by thrombophlebitis in comparison with walls of normal and varicose veins. No difference ( $p > 0.05$ ) in VEGFR 1 mRNA expression was found between walls of normal and varicose veins. VEGFR 2 mRNA expression was increased in walls of varicose veins and varicose veins complicated by thrombophlebitis, when compared to control ones ( $p < 0.001$ ). However, it was similar in both examined groups ( $p > 0.05$ ). No gender related differences in mRNA expression were found in the control and examined groups ( $p > 0.05$ ).

VEGF-A content in the vein wall is shown in Figure 2. Its content was increased ( $p < 0.001$ ) in the varicose vein walls ( $41.76 \pm 3.43$  ng / g of protein) in comparison with the normal vein wall ( $25.79 \pm 2.93$  ng/g of protein). Furthermore, its content in the wall of varicose veins complicated by thrombophlebitis ( $84.19 \pm 26,22$  ng/g of protein) was increased ( $p < 0.001$ ) in comparison with walls of normal and varicose veins. No gender related

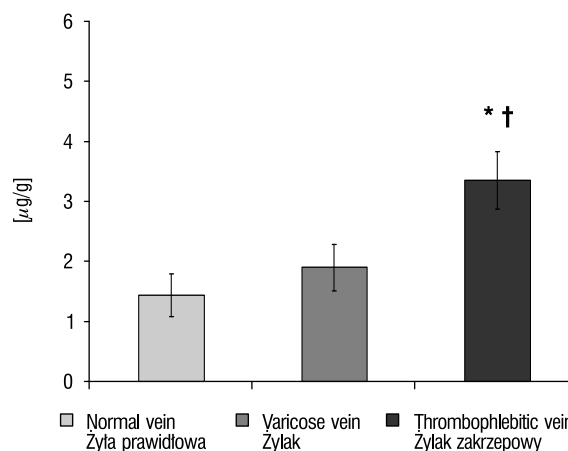
lumna 1), żyłaków niepowikłanych (kolumna 2) i żyłaków powikłanych zakrzepowym zapaleniem (kolumna 3) (ryc. 1A). Jej densytometryczną analizę przedstawiono na rycinie 1B. Ekspresja VEGF-A mRNA jest większa ( $p < 0,001$ ) w ścianie żyłaków niepowikłanych oraz żyłaków powikłanych zakrzepowym zapaleniem w porównaniu ze ścianą żył prawidłowych. Ponadto ekspresja VEGF-A mRNA w ścianie żyłaków powikłanych zakrzepowym zapaleniem jest większa niż w ścianie żyłaków niepowikłanych ( $p < 0,001$ ). Ekspresja VEGFR 1 mRNA jest większa w ścianie żyłaków powikłanych zakrzepowym zapaleniem w porównaniu ze ścianą żył prawidłowych i żyłaków niepowikłanych. Nie stwierdzono istotnych różnic w ekspresji VEGFR 1 mRNA pomiędzy ścianą żył prawidłowych i żyłaków niepowikłanych ( $p > 0,05$ ). Ekspresja VEGFR 2 mRNA w ścianie żyłaków niepowikłanych i żyłaków powikłanych zakrzepowym zapaleniem jest większa niż w ścianie żył kontrolnych ( $p < 0,001$ ) i porównywalna w obu grupach badanych ( $p > 0,05$ ). W grupie kontrolnej i grupach badanych nie wykazano różnic pod względem ekspresji mRNA zależnych od płci ( $p > 0,05$ ).

Zawartość VEGF-A w ścianie żyłnej przedstawiono na rycinie 2. Zawartość czynnika wzrostu jest więk-



**Figure 2.** VEGF-A content in the vein wall expressed as ng/g of protein. Statistically significant differences when compared to the wall of normal veins (\* $p < 0.001$ ). Statistically significant differences when compared to the wall of varicose veins († $p < 0.001$ )

**Rycina 2.** Zawartość czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego A (VEGF-A) w ścianie żylniej w ng w przeliczeniu na g białka. Różnice istotne statystycznie w porównaniu ze ścianą żył prawidłowych (\* $p < 0,001$ ). Różnice istotne statystycznie w porównaniu ze ścianą żylaków († $p < 0,001$ )



**Figure 3.** VEGF R1 content in the vein wall expressed as μg/g of protein. Statistically significant differences when compared to the wall of normal veins (\* $p < 0.001$ ). Statistically significant differences when compared to the wall of varicose veins († $p < 0.001$ )

**Rycina 3.** Zawartość receptora VEGF R1 w ścianie żylniej w μg w przeliczeniu na g białka. Różnice istotne statystycznie w porównaniu ze ścianą żył prawidłowych (\* $p < 0,001$ ). Różnice istotne statystycznie w porównaniu ze ścianą żylaków († $p < 0,001$ )

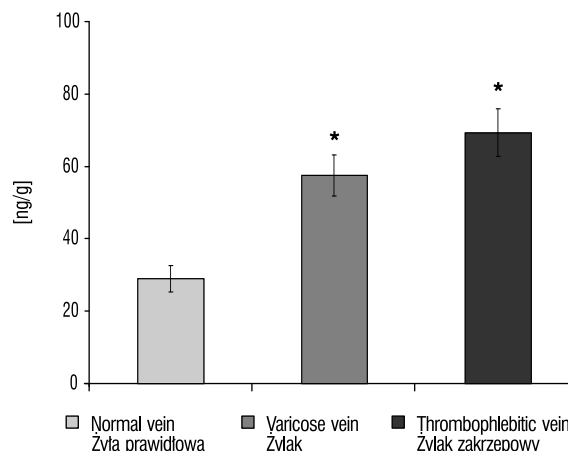
differences in VEGF-A content were found in the control and examined groups ( $p > 0.05$ ).

Content of VEGF R1 in the vein wall is shown in Figure 3. No difference ( $p > 0.05$ ) was found between walls of normal ( $1.44 \pm 0.36 \mu\text{g/g}$  of protein) and varicose veins ( $1.9 \pm 0.39 \mu\text{g/g}$  of protein). However, its content was increased ( $p < 0.001$ ) in the wall of varicose veins complicated by thrombophlebitis ( $3.36 \pm 0.48 \mu\text{g/g}$  of protein) in comparison with walls of normal and varicose veins. No gender related differences in VEGF R1 content were found in the control and examined groups ( $p > 0.05$ ).

The content of VEGF R2 in the vein wall is shown in Figure 4. It was increased ( $p < 0.001$ ) in walls of varicose veins ( $57.47 \pm 5.63 \text{ ng/g}$  of protein) and varicose veins complicated by thrombophlebitis ( $69.29 \pm 6.63 \text{ ng/g}$  of protein), when compared to control ones ( $28.92 \pm 3.7 \text{ ng/g}$  of protein). No difference in VEGF R2 content was found between varicose veins and varicose veins complicated by thrombophlebitis ( $p > 0.05$ ). No gender related differences in VEGF R2 content were found in the control and examined groups ( $p > 0.05$ ).

## Discussion

One of the key roles in the maintenance of vessel wall integrity is played by vascular endothelial growth factor



**Figure 4.** VEGF R2 content in the vein wall expressed as ng/g of protein. Statistically significant differences when compared to the wall of normal veins (\* $p < 0.001$ )

**Rycina 4.** Zawartość receptora VEGF R2 w ścianie żylniej w ng w przeliczeniu na g białka. Różnice istotne statystycznie w porównaniu ze ścianą żył prawidłowych (\* $p < 0,001$ )

sza ( $p < 0.001$ ) w ścianie żylaków niepowikłanych ( $41.76 \pm 3.43 \text{ ng/g}$  białka) w porównaniu ze ścianą żył prawidłowych ( $25.79 \pm 2.93 \text{ ng/g}$  białka). Natomiast jego zawartość w ścianie żylaków powikłanych zakrzepowym zapaleniem ( $84.19 \pm 26.22 \text{ ng/g}$  białka) jest większa niż w ścianie żył prawidłowych i żylaków niepowikłanych ( $p < 0.001$ ). W grupie kontrolnej i grupach badanych nie wykazano różnic w zawartości VEGF-A zależnych od płci ( $p > 0.05$ ).

A (VEGF-A), which may be of potential significance in varicose vein pathogenesis [9–11].

Increased plasma levels of VEGF-A were shown previously in patients with varicose veins [12, 14, 15]. Whereas, the results of our study demonstrated increased VEGF-A content in the wall of varicose veins, and varicose veins complicated by thrombophlebitis in particular, when compared to the normal vein wall. We also found that changes in VEGF-A content are related to changes in VEGF-A mRNA expression. These results are of particular importance because plasma VEGF-A levels did not reflect the growth factor role in the disease pathogenesis in a reliable way [11, 14].

Hypoxia can be thought of as a key factor leading to enhanced VEGF mRNA expression and its content increase in the wall of varicose veins [17, 18]. However, the inflammatory process should be emphasized among other factors responsible for changes in gene expression and protein content of the investigated growth factor in the wall of varicose veins complicated by thrombophlebitis. It was shown that proinflammatory cytokines — with interleukin 1 (IL-1) and tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) among them — led to increased VEGF mRNA expression and to increased VEGF-A tissue content, respectively [18, 19].

A significant role in the disease pathogenesis can be assigned to increased VEGF-A content in the varicose vein wall because the growth factor possesses multiple biological activities. It increases vessel wall permeability, which predisposes to fibrinogen deposition in the extravascular space and tissue oedema [9, 12]. VEGF-A activates eNOS in endothelial cells. This process results in decreased tone of the vein wall, which may lead, respectively, to blood stasis in the lower extremities vein system and venous hypertension development [14]. Furthermore, the examined growth factor influences extracellular matrix remodelling through regulation of numerous proteolytic enzyme synthesis [19]. It was shown that VEGF increased expression of MMP-1, MMP-2, and MMP-3 [20–22]. Increased expression of these enzymes was also demonstrated in the varicose vein wall in other studies [5, 23, 24].

The key role of VEGF in neointimal hyperplasia development cannot be passed over [22]. Thus, demonstrated changes in mRNA expression and content of VEGF-A in the varicose vein wall are another argument against using varicose saphenous veins as a material for vascular by-pass grafting, because of the increased risk of neointimal hyperplasia development.

Biological activity of VEGF-A depends on its receptor expression. VEGF R2 plays a key role among them, whereas VEGF R1 is present mostly in inflammatory cells

Zawartość receptora 1 dla VEGF w ścianie żyłnej przedstawiono na rycinie 3. Nie stwierdzono różnicy ( $p > 0,05$ ) w zawartości VEGF R1 w ścianie żył prawidłowych ( $1,44 \pm 0,36 \mu\text{g/g}$  białka) i żyłaków niepowikłanych ( $1,9 \pm 0,39 \mu\text{g/g}$  białka). Natomiast w ścianie żyłaków powikłanych zakrzepowym zapaleniem zawartość VEGF R1 ( $3,36 \pm 0,48 \mu\text{g/g}$  białka) jest większa w porównaniu ze ścianą żył prawidłowych i żyłaków niepowikłanych ( $p < 0,001$ ). W grupie kontrolnej i grupach badanych nie wykazano różnic pod względem zawartości VEGF R1 zależnych od płci ( $p > 0,05$ ).

Zawartość receptora 2 dla VEGF w ścianie żyłnej przedstawiono na rycinie 4. Zawartość VEGF R2 jest większa ( $p < 0,001$ ) w ścianie żyłaków niepowikłanych ( $57,47 \pm 5,63 \text{ ng/g}$  białka) i żyłaków powikłanych zakrzepowym zapaleniem ( $69,29 \pm 6,63 \text{ ng/g}$  białka) w porównaniu ze ścianą żył prawidłowych ( $28,92 \pm 3,7 \text{ ng/g}$  białka). Nie stwierdzono różnicy w zawartości VEGF R2 w ścianie żyłaków niepowikłanych i żyłaków powikłanych zakrzepowym zapaleniem ( $p > 0,05$ ). Poza tym w grupie kontrolnej i grupach badanych nie wykazano także różnic pod względem zawartości VEGF R2 zależnych od płci ( $p > 0,05$ ).

## Omówienie

Jedną z kluczowych ról w zachowaniu integralności ściany naczyniowej odgrywa czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego A (VEGF-A), który może mieć potencjalne znaczenie w patogenezie żyłaków kończyn [9–11].

W dotychczasowych badaniach wykazano zwiększone stężenie VEGF-A w osoczu chorych na żyłaki [12, 14, 15]. Wyniki opisanych w niniejszej pracy badań wskazują natomiast na zwiększoną zawartość VEGF-A w ścianie żyłaków, a zwłaszcza żyłaków powikłanych zakrzepowym zapaleniem, w porównaniu ze ścianą żył prawidłowych. Autorzy wykazali również, że zmiany w zawartości VEGF-A w ścianie żyłnej wiążą się ze zmienioną ekspresją VEGF-A mRNA. Spostrzeżenia te mają istotne znaczenie, ponieważ stężenie VEGF-A w osoczu nie odzwierciedlało w wiarygodny sposób roli badanego czynnika wzrostu w patogenezie choroby [11, 14].

Hipoksja jest prawdopodobnie kluczowym czynnikiem odpowiedzialnym za zwiększenie ekspresji VEGF mRNA i zawartości VEGF-A w ścianie żyłaków [17, 18]. Natomiast wśród przyczyn zmian w ekspresji genu i zawartości białka badanego czynnika wzrostu w ścianie żyłaków powikłanych zakrzepowym zapaleniem należy także podkreślić rolę stanu zapalnego. Stwierdzono bowiem, że cytokiny zapalne, a przede wszystkim interleukina 1 (IL-1) i czynnik martwicy nowotworu alfa (TNF $\alpha$ ), zwiększają ekspresję VEGF mRNA i w konsekwencji zawartość VEGF-A w tkankach [18, 19].

[13, 20]. We demonstrated increased mRNA expression and protein content of VEGFR2 only in the wall of varicose veins. Other authors have reported that hypoxia led to 10-times greater expression of VEGFR2 and lack of such a relation with VEGFR1 [18]. The results of our study reflect that observation. However, mRNA expression and protein content of VEGFR1 in the vein wall increased in the course of thrombophlebitis. VEGFR1 activation in macrophages may have an important clinical implication because it results in increased tissue factor expression and coagulation activation [25]. Consequently, thrombotic complications seem to be a secondary phenomenon to the inflammatory process in the wall of varicose veins; however, to prove the hypothesis, further studies are required.

### Conclusions

The results of our study indicate that VEGF-A gene expression and the growth factor content increase in the wall of varicose veins, and varicose veins complicated by thrombophlebitis in particular. Increased gene expression and content of VEGFR2 are present in the varicose vein wall; whereas, development of the inflammatory process in the vein wall leads to increased gene expression and content of VEGFR1. These changes may be accepted as one of the reasons for the clinical symptoms of the disease and can predispose to its progression.

### References

1. Guex JJ (1996) Thrombotic complications of varicose veins. A literature review of the role of superficial venous thrombosis. *Dermatol Surg*, 22: 378–382.
2. Guex JJ, Myon E, Didier L, Nguyen Le C, Taieb C (2005) Chronic venous disease: health status of a population and care impact on this health status through quality of life questionnaires. *Int Angiol*, 24: 258–264.
3. Wichers IM, Di Nisio M, Büller HR, Middeldorp S (2005) Treatment of superficial vein thrombosis to prevent deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a systematic review. *Haematologica*, 90: 672–677.
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. Kowalewski R, Sobolewski K, Wolańska M, Gacko M (2004) Matrix metalloproteinases in the vein wall. *Int Angiol*, 23: 164–169.
6. 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.
7. Kowalewski R, Malkowski A, Sobolewski K, Gacko M (2010) Evaluation of transforming growth factor- $\beta$  signaling pathway in the wall of normal and varicose veins. *Pathobiology*, 77: 1–6.
8. Naoum JJ, Hunter GC, Woodside KJ, Chen C (2007) Current advances in the pathogenesis of varicose veins. *J Surg Res*, 141: 311–316.

Można uznać, że zwiększona zawartość VEGF-A w ścianie żyłaków odgrywa ważną rolę w patogenezie choroby, ponieważ czynnik ten charakteryzuje się wielokierunkową aktywnością biologiczną. Zwiększa on przepuszczalność ściany naczyniowej, co predysponuje do odkładania się złogów fibrynogenu w przestrzeni pozanaczyniowej oraz obrzęków [9, 12]. Czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego A w komórkach śródbłonna aktywuje eNOS i zmniejsza napięcie ściany żyłnej, co może prowadzić do zastojów krwi w układzie żylnym kończyn i rozwoju nadciśnienia żylnego [14]. Badany czynnik wzrostu uczestniczy również w przebudowie macierzy pozakomórkowej poprzez regulację syntezy wielu enzymów proteolitycznych [19]. Wykazano, że zwiększa on ekspresję metaloproteinaz: MMP-1, MMP-2 oraz MMP-3 [20–22]. Zwiększoną zawartość i aktywność tych enzymów wykazano w ścianie żyłaków w innych badaniach [5, 23, 24].

Należy również zwrócić uwagę na kluczową rolę VEGF w rozwoju hiperplazji naczyniowej [22]. W związku z powyższym wykazane zmiany w ekspresji mRNA i zawartości VEGF-A w ścianie żyłaków są kolejnym argumentem przeciwko wykorzystywaniu zmienionych żyłakowato żył odpiszczelowych jako materiału do naczyniowych przeszczepów omijających z powodu zwiększonego ryzyka rozwoju podśródbłonkowej proliferacji włóknisto-mięśniowej.

Aktywność biologiczna VEGF-A zależy od ekspresji jego receptorów, wśród których kluczową rolę odgrywa VEGFR2, podczas gdy VEGFR1 występuje przede wszystkim w komórkach zapalnych [13, 20]. W ścianie żyłaków autorzy niniejszej pracy stwierdzili wyłącznie zwiększoną ekspresję mRNA oraz zawartość białka VEGFR2. Inni badacze wykazali, że hipoksja powoduje 10-krotny wzrost ekspresji tego receptora i brak takiej zależności w stosunku do VEGFR1 [18]. Wyniki niniejszych badań odzwierciedlają to spostrzeżenie. Natomiast zarówno ekspresja mRNA, jak i zawartość białka VEGFR1 w ścianie żyłnej zwiększyły się w przebiegu stanu zapalnego. Aktywacja VEGFR1 w makrofagach może mieć istotne znaczenie kliniczne, ponieważ prowadzi ona do zwiększonej ekspresji czynnika tkankowego i aktywacji układu krzepnięcia [25]. W związku z powyższym powikłania zakrzepowe są prawdopodobnie wtórnym zjawiskiem w stosunku do stanu zapalnego w ścianie żyłaków. Potwierdzenie tej hipotezy wymaga jednak dalszych badań.

### Wnioski

Wyniki pracy wskazują, że w ścianie żyłaków kończyn, a szczególnie tych powikłanych zakrzepowym zapaleniem, zwiększa się ekspresja genu VEGF-A i za-



9. Esser S, Wolburg K, Wolburg H, Breier G, Kurzchalia T, Risau W (1998) Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations *in vitro*. *J Cell Biol*, 140: 947–959.
  10. Ng YS, Krilleke D, Shima DT (2006) VEGF function in vascular pathogenesis. *Exp Cell Res*, 312: 527–537.
  11. Hollingsworth SJ, Powell G, Barker SG, Cooper DG (2004) Primary varicose veins: altered transcription of VEGF and its receptors (KDR, flt-1, soluble flt-1) with sapheno-femoral junction incompetence. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 27: 259–268.
  12. Shoab SS, Scurr JH, Coleridge-Smith PD (1998) Increased plasma vascular endothelial growth factor among patients with chronic venous disease. *J Vasc Surg*, 28: 535–540.
  13. Tammela T, Enholm B, Alitalo K, Paavonen K (2005) The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res*, 65: 550–563.
  14. Howlader MH, Coleridge Smith PD (2004) Relationship of plasma vascular endothelial growth factor to CEAP clinical stage and symptoms in patients with chronic venous disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 27: 89–93.
  15. 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.
  16. 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.
  17. Michiels C, Bouaziz N, Remacle J (2002) Role of the endothelium and blood stasis in the development of varicose veins. *Int Angiol*, 21 (suppl 1): 18–25.
  18. Rega G, Kaun C, Demyanets S et al (2007) Vascular endothelial growth factor is induced by the inflammatory cytokines interleukin-6 and oncostatin m in human adipose tissue *in vitro* and in murine adipose tissue *in vivo*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27: 1587–1595.
  19. Chu SC, Tsai CH, Yang SF et al (2004) Induction of vascular endothelial growth factor gene expression by proinflammatory cytokines in human pulp and gingival fibroblasts. *J Endod*, 30: 704–707.
- wartość czynnika wzrostu. Ściana żyłaków charakteryzuje się również zwiększoną ekspresją genu i zawartością VEGF R2, natomiast rozwój stan zapalny w ścianie żyłnej prowadzi do zwiększenia ekspresji genu i zawartości VEGF R1. Zmiany te mogą być jedną z przyczyn objawów klinicznych choroby oraz predysponować do jej postępu.
- Źródła finansowania: praca statutowa UM w Białymstoku.
20. Lamoreaux WJ, Fitzgerald ME, Reiner A, Hasty KA, Charles ST (1998) Vascular endothelial growth factor increases release of gelatinase A and decreases release of tissue inhibitor of metalloproteinases by microvascular endothelial cells *in vitro*. *Microvasc Res*, 55: 29–42.
  21. Pufe T, Harde V, Petersen W, Goldring MB, Tillmann B, Mentlein R (2004) Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces matrix metalloproteinase expression in immortalized chondrocytes. *J Pathol*, 202: 367–374.
  22. Wang H, Keiser JA (1998) Vascular endothelial growth factor upregulates the expression of matrix metalloproteinases in vascular smooth muscle cells: role of flt-1. *Circ Res*, 83: 832–840.
  23. Gillespie DL, Patel A, Fileta B et al (2002) Varicose veins possess greater quantities of MMP-1 than normal veins and demonstrate regional variation in MMP-1 and MMP-13. *J Surg Res*, 106: 233–238.
  24. Sansilvestri-Morel P, Rupin A, Jullien ND et al (2005) Decreased production of collagen type III in cultured smooth muscle cells from varicose vein patients is due to a degradation by MMPs: possible implication of MMP-3. *J Vasc Res*, 42: 388–398.
  25. Zachary I (1998) Vascular endothelial growth factor. *Int J Biochem Cell Biol*, 30: 1169–1174.