

Selected indicators of the antioxidant system in the blood of patients with lower limb varicose veins

Wybrane wskaźniki układu antyoksydacyjnego we krwi chorych z żylakami kończyn dolnych

Wirginia Krzyściak¹, Mariusz Kózka², Grzegorz Kazek¹, Marek Stępniewski¹

¹Department of Radioligand Laboratory, Faculty of Pharmacy, Jagiellonian University Medical College Cracow, Poland (Zakład Radioligandów Katedry Farmakologii Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie)

²II Chair of General Surgery, Jagiellonian University Medical College, Cracow, Poland (II Katedra Chirurgii Ogólnej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie)

Abstract

Background. Reactive oxygen species (ROS) generation plays a crucial role in chronic venous disorders (CVD). The aim of this study was to investigate whether ROS generation is changed or decreased in patients affected by varicose disease.

Material and methods. The local vein production of ROS was assessed by measuring the Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) levels and malondialdehyde (MDA) plasma concentrations in blood collected from the varicose veins and antecubital veins of 31 subjects (23 women and 8 men).

Results. An oxidant-antioxidant imbalance was detected, which displayed itself through a level of MDA concentration higher in plasma samples of varicose veins than in ulnar blood samples in both compared groups (women and men) ($p \leq 0.007$; Wilcoxon test) as well as through a reduced Ferric Reducing Ability of Plasma of samples of varicose veins. FRAP concentration was higher in plasma samples of ulnar blood than in varicose veins ($p \leq 0.002$; Wilcoxon test).

Conclusions. The study results point out the important role of oxidative stress developing in the capillary angiogenesis and varicose transformation of the surface veins in the legs.

Key words: varicose veins, antioxidant status, ferric reducing ability of plasma (FRAP) level, malondialdehyde (MDA) plasma concentrations

Streszczenie

Wstęp. Wiele wskazuje na to, że reaktywne formy tlenu odgrywają kluczową rolę w patogenezie przewlekłej choroby żyłnej. Celem pracy było określenie, czy u pacjentów z przewlekłą chorobą żylną istnieją zmiany związane z tworzeniem reaktywnych form tlenu.

Materiały i metody. Zdolność tkanki żył do produkcji reaktywnych form tlenu oceniano za pomocą oznaczenia poziomu całkowitego potencjału antyoksydacyjnego (wyrażonego jako FRAP) oraz malonyldialdehydu (MDA) w osoczu krwi pobranej z żylaków kończyn dolnych oraz żył przedramienia u 31 chorych (23 kobiet i 8 mężczyzn).

Address for correspondence:

Wirginia Krzyściak
Zakład Radioligandów Katedry Farmakologii Wydziału Farmaceutycznego CMUJ
ul. Medyczna 9, 30–688 Kraków
tel. +48 504 872 580
e-mail: wirginiakrzyściak@cm-uj.krakow.pl

Wyniki. Stwierdzono zaburzenie w równowadze oksydacyjno-antyoksydacyjnej manifestujące się poprzez zwiększone stężenie MDA w osoczu krwi z próbek pobranych z żyłaków względem stężenia we krwi z próbek pochodzących z żyły przedramienia zarówno w grupie kobiet, jak i mężczyzn ($p \leq 0,007$; test Wilcoxon) oraz zmniejszoną zdolność antyoksydacyjną osocza (FRAP) w próbkach z żyłaków. Poziom FRAP był większy w próbkach z żyły przedramienia niż w żyłakach ($p \leq 0,002$; test Wilcoxon).

Wnioski. Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować o ważnej roli stresu oksydacyjnego w patogenezie przewlekłej choroby żyłnej.

Słowa kluczowe: żyłaki, potencjał antyoksydacyjny, całkowita zdolność antyoksydacyjna osocza (FRAP), osoczowe stężenie malonyldialdehydu (MDA)

Acta Angiol 2009; 15, 1: 10–19

Introduction

Varicose veins are one of the most common lower limb vein pathologies. In developed countries almost every second person aged over 40 suffers from this form of chronic venous disease [1, 2]. The incidence rate of varices differs among men and women. The proportion of individuals with varicose veins ranges between 40 and 60% for women and from 25 to 30% for men [1, 2]. The aetiology of this disease is elusive, which makes effective preventive interventions difficult, consequently affecting the increase in the number of new cases.

In order to recognize the aetiology of varicose veins several theories have been created, each of them assuming that they originate from a single initial factor e.g. venous valves insufficiency [3, 4], hereditary weakness of the venous walls, arteriovenous fistula (AV fistula) [5], and „leukocyte trap” phenomenon i.e. accumulation of trapped leukocytes [6]. The above-mentioned theories converge at one point; they all assume increased blood pressure in the superficial vessels, which become enlarged, followed by secondary insufficiency of the venous valves. However, the causes of these phenomena are still unclear. Epidemiological studies indicate several additional risk factors other than those of genetic character. These studies emphasize the differences regarding the incidence of varicose veins with respect to age, gender, profession, and undergone pregnancies [7]. Regarding the major mechanism responsible for the incidence of varicose veins, including disorders in the venous system followed by blood stagnation and hypertension in the lower limb circulatory system, it is well recognized that the biochemical processes connecting haemostasis with changes in varicosity walls have not been explained so far.

The adverse effects of free radicals (extremely reactive and destructive forms of molecules causing many diseases) were proven many years ago [8].

Wstęp

Żyłaki stanowią jedno z najczęściej występujących schorzeń kończyn dolnych. W społeczeństwach krajów uprzemysłowionych praktycznie co druga osoba powyżej 40 roku życia cierpi na tę postać przewlekłej choroby żyłnej [1, 2]. Częstość występowania żyłaków jest różna u obu płci. Odsetek kobiet, u których występują żyłaki, waha się w granicach 40–60%. W wypadku mężczyzn wynosi on 25–30% [1, 2]. Niejasna etiologia choroby utrudnia podjęcie skutecznych działań prewencyjnych, co z kolei wpływa na wzrost zachorowań.

Wraz z próbami ustalenia etiologii żyłaków pojawiło się kilka różnych teorii, każda z nich wiąże powstawanie żyłaków z jakimś początkowym czynnikiem, na przykład z niewydolnością zastawek żylnych [3, 4], dziedzicznym osłabieniem ścian żył, przetokami tętniczko-żylnymi [5] czy też gromadzeniem uwieczonych leukocytów („pułapką leukocytarną”) [6]. Powyższe teorie łączy jedno założenie — istnienie zwiększonego ciśnienia w żyłach powierzchownych oraz ich rozszerzenie, a następnie występująca wtórnie niewydolność zastawek żylnych — jednak przyczyn powstawania tego zjawiska nadal nie wyjaśniono. W badaniach epidemiologicznych wskazuje się na istnienie dodatkowych czynników ryzyka poza genetycznymi. Zwraca się uwagę na różnice występujące pod względem częstości zachorowań w zależności od wieku, płci, zawodu czy przebytej ciąży [7]. O ile główny mechanizm odpowiadający za powstawanie żyłaków, polegający na zaburzeniu funkcji układu żylnego z następowym zastojem i nadciśnieniem w krążeniu żylnym kończyn dolnych, uznaje się za poznany, to procesy biochemiczne wiążące zastój krwi ze zmianami w ścianie żyłaka dalej pozostają niejasne.

Od dawna wiadomo, że wolne rodniki — wysoce reaktywne formy niszczycielskich cząsteczek — mają niekorzystny wpływ, przyczyniając się do powstania licznych chorób [8].

Many authors studied the influence of anoxia, resulting from blood stagnation on the interactions between epithelium and multinuclear macrophages, monocytes, and neutrophils during saphenous vein perfusion. These studies showed that the adhesion of multinuclear cells to anoxic epithelium is much stronger than for tissue with normal levels of oxygen. This phenomenon may be responsible for activating multinuclear cells with Angiotensin II, which may later activate NAD(P)H oxidase and potentiate the production of superoxide anion radicals [9]. These radicals oxidize lipids and, therefore, lead to the depletion of both enzymatic and non-enzymatic antioxidant mechanisms [10, 11]. The presence of reactive oxygen species (ROS) was proven by many different methods examining oxidation and antioxidation capability.

Our results suggest increased lipid oxidation, proven by a higher concentration of malonyldialdehyde (MDA), and decreased levels of enzymatic and non-enzymatic antioxidants manifesting as the total plasma antioxidant capacity (FRAP, ferric reducing ability of plasma), which may play a significant role when the symptoms of chronic venous insufficiency are developed.

Malonyldialdehyde is a three-carbon low-molecular weight aldehyde, a product of degradation of peroxides generated when free radicals react with polyunsaturated fatty acids [12–14].

The FRAP method allows the evaluation of both enzymatic and non-enzymatic plasma anti-oxidants (small peptides containing the reactive thiol groups, bilirubin, uric acid, and proteins *i.e.* albumins). Lowered antioxidant concentration plays a significant role in the development of oxidative stress resulting from the depletion of anti-oxidant defence mechanisms.

The objective of this study was to assess the level of lipid oxidation significant of free radical concentration in blood from varicose veins, and to compare those values with the total plasma antioxidant capacity measured with FRAP.

Material and methods

Thirty-one patients (23 women and 8 men aged from 26 to 68 years, with mean age 49.9 years \pm 12.5 SD) were enrolled in this study. All of them were treated in the 2nd Chair of General Surgery of the Jagiellonian University in Cracow because of chronic venous disease grade 2 or 3 according to CEAP classification [15]. All participants underwent a medical interview as well as physical examinations, and duplex sonography. The symptoms of chronic venous disease were observed for more than one year in all patients.

Wielu autorów badało wpływ niedotlenienia powstałego w wyniku zastoju krwi na interakcje pomiędzy śródbłonkiem a wielojądrzastymi makrofagami monocytami i neutrofilami w poddawanej perfuzji żyły odpiszczelowej. W badaniach tych wykazano, że przyleganie komórek wielojądrzastych do niedotlenionego śródbłonka żył jest dużo silniejsze niż przyleganie do prawidłowo natlenionego śródbłonka. Zjawisko to może powodować aktywację komórek wielojądrzastych zawierających angiotensynę II i może stać się z kolei sygnałem do aktywacji oksydazy NAD(P)H i wytwarzania anionorodników ponadtlenkowych [9]. Rodniki powodują utlenianie lipidów i wyczerpanie zarówno enzymatycznych, jak i nieenzymatycznych mechanizmów antyoksydacyjnych [10, 11].

Obecność reaktywnych form tlenu (ROS) wykazano za pomocą wielu metod służących do ustalania zdolności utleniającej i przeciwutleniającej.

Autorzy niniejszej pracy na podstawie zwiększonego stężenia malonyldialdehydu (MDA) oraz zmniejszonych poziomów enzymatycznych oraz nieenzymatycznych antyoksydantów [co manifestuje się jako całkowita pojemność antyoksydacyjna osocza (FRAP)] zaobserwowali w swoim badaniu nasilenie zjawiska utleniania lipidów, które może odgrywać istotną rolę w powstawaniu objawów przewlekłej choroby żyłnej.

Malonyldialdehyd jest 3-węglowym małowcząsteczkowym aldehydem, produktem rozpadu nadtlenuków powstających w wyniku oddziaływania wolnych rodników na wielonienasycone kwasy tłuszczowe [12–14].

Oznaczenie FRAP jest metodą, która pozwala oszacować zarówno enzymatyczne, jak i nieenzymatyczne antyoksydanty osoczkowe (niskocząsteczkowe peptydy zawierające grupy tiolowe, bilirubiny i kwas moczowy oraz białka: albuminy), których obniżone stężenia odgrywają znaczącą rolę w rozwoju stresu oksydacyjnego związanego z wyczerpaniem się mechanizmów obrony antyoksydacyjnej.

Celem pracy było zmierzenie poziomu utlenienia lipidów świadczącego o stężeniu wolnych rodników we krwi znajdującej się w żyłkach oraz porównanie tych wartości z całkowitą zdolnością antyoksydacyjną osocza wyrażoną przez FRAP.

Material i metody

Badaniami objęto 31 chorych (23 kobiety i 8 mężczyzn w wieku 26–68 lat; średnia wieku wynosiła 49,9 roku \pm 12,5 SD) leczonych w II Katedrze Chirurgii Ogólnej Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie z powodu przewlekłej choroby żyłnej w stopniu 2 i 3 według klasyfikacji CEAP [15]. U wszystkich chorych przeprowadzono badanie podmiotowe i przedmioto-

Blood samples were taken from the forearm vein during medical procedures preceding surgical anaesthesia. The samples of blood from varicose veins were withdrawn from the great saphenous vein (GSV) during the surgical intervention.

Consents was obtained from all patients, and the study procedure was approved by the Bioethical Committee of the Jagiellonian University in Cracow (KBET/125/B/2007).

Blood samples were added to test tubes containing K_3EDTA and then centrifuged at $2000 \times g$ for 15 minutes within 4 hours after collection.

Blood samples were stored at a temperature of $-30^\circ C$ until the level of FRAP and MDA concentration was assessed.

Measurement of malonyldialdehyde concentration

MDA concentration in blood was measured using fluorimetric assay as suggested by Buege and Aust in their method [16]. First, sample derivatization with thiobarbituric acid (TBA) was performed followed by fluorimetric measurements of the obtained red-colored chromatophore adduct. The samples were prepared for analysis in the following manner. Half a millilitre of plasma (properly diluted) was mixed with 1.5 ml of working solution mixture [working reagent; TBA/TCA/HCL diluted four times]. After shaking, the tubes were placed in a water bath for 15 minutes at a temperature of $100^\circ C$. Later, the tubes were cooled under water and vigorously shaken for one minute in order to extract the pigment to 3 ml of n-butyl alcohol. The separation of the organic phase was accelerated by centrifugation at $1000 \times g$ for 10 minutes. The standard solution was obtained after hydrolysis of 1,1,3,3-tetramethoxypropane. The concentration of hydrolyzed TBA-MDA adduct was measured as the emission of 553 nm wave with the excitation source generating waves of 532 nm length. Results were given in nmol/ml of plasma.

Measurement of the total antioxidant capacity measurement of plasma

Non-enzymatic antioxidants in blood plasma were examined through a measure of ferric reducing ability (FRAP test) using the methodology developed by Benzie and Strain [17]. FRAP level was evaluated by measurement of Fe^{3+} reduction in low pH solution (acetate buffer in concentration of 300mmol/L and $pH = 3.6$) containing 2,4,6-tripirydył-s-triazynę (TPTZ) to blue coloured Fe^{2+} form. Subsequently, spectrophotometric analysis was performed with maximum absorption at $\lambda_{max} = 593$ nm. The 0.1 ml sample was mixed with 3

we oraz badanie ultrasonograficzne metodą podwójnego obrazowania. U wszystkich chorych objawy przewlekłej choroby żyłnej występowały dłużej niż rok.

Próbki krwi z żyły przedramienia pobrano podczas procedur przeprowadzanych przed znieczuleniem do operacji. Próbki krwi z żyłaków pobrano z okolicy żyły odpiszczelowej (VSM) w trakcie zabiegu operacyjnego.

Na przeprowadzenie badań uzyskano świadomą zgodę pacjentów, a procedurę badań zaaprobowwała Komisja Bioetyczna Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie (KBET/125/B/2007).

Próbki krwi pobierano do próbek zawierających K_3EDTA i w przeciągu 4 godzin od pobrania wirowano przy przyspieszeniu $2000 \times g$ przez 15 minut. Próbki krwi przechowywano w temperaturze $-30^\circ C$ do czasu oznaczenia poziomu FRAP i stężenia MDA.

Pomiar stężenia malonyldialdehydu

Pomiaru stężenia MDA w osoczu krwi dokonano za pomocą oznaczenia fluorymetrycznego zgodnie z metodą według Buege i Aust [16]. Najpierw wykonano derywatyzację kwasem tiobarbiturowym (TBA), a potem dokonywano pomiarów fluorymetrycznych powstałego różowego ugrupowania chromatoforowego. Przygotowanie próbki do analizy polegało na zmieszaniu 0,5 ml próbki osocza (w odpowiednim rozcieńczeniu) z 1,5 ml mieszaniny roztworu roboczego (odczynnik roboczy: TBA/TCA/HCL rozcieńczony 4-krotnie wodą). Po wytrząśnięciu próbek umieszczano w łaźni wodnej na 15 minut w temperaturze $100^\circ C$. Po ochłodzeniu pod zimną wodą powstały barwnik ekstrahowano do 3 ml alkoholu n-butyłowego, intensywnie wstrząsając przez minutę. Oddzielenie fazy organicznej przyspieszono poprzez wirowanie przy $1000 \times g$ przez 10 minut. Roztwór wzorcowy otrzymano przez hydrolizę 1,1,3,3-tetrametoksypropanu. Pomiaru stężenia powstałego adduktu TBA-MDA dokonano, mierząc emisję na poziomie 553 nm, stosując źródło wzbudzenia o długości fali 532 nm. Wyniki wyrażano w nmol/ml osocza.

Pomiar całkowitej zdolności antyoksydacyjnej osocza

W celu oznaczenia nieenzymatycznych antyoksydantów w osoczu krwi dokonano pomiaru zdolności całkowitego potencjału antyoksydacyjnego osocza do redukcji jonów żelaza (FRAP). Pomiar wykonano zgodnie z metodą według Benzie i Strain [17]. Poziom FRAP zbadano poprzez oznaczenie redukcji $Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+}$ w niskim pH (bufor octanowy 300 mmol/L $pH = 3.6$) sprzężonej z tripirydylotriazyną, dającą nie-

ml of working solution [working reagent: 25 ml of 300 mM acetate buffer, pH = 3.6; 2.5 ml of tripirydyl-s-triazynie, 5 mM solution; 2.5 ml of FeCl₃, 20 mM solution]. Standard solutions were water solutions of Fe²⁺ containing from 100 to 1000 umol/L of FeSO₄. The temperature was the same for all reactions (37°C). FRAP value was given in mmol/L.

Statistical analysis

Analysis of variance (ANOVA, $p \leq 0.05$) was used to evaluate the statistical significance of the differences between groups. When the variances were inhomogeneous, Wilcoxon nonparametric test for related variables was applied. The presented values are medians \pm percentiles (from 5 to 95). Statistical analysis was performed in R language and the statistical environment designed for this language (R, version 2.6.2, Vienna, Austria) [18]. Statistical significance of variances was confirmed by Wilcoxon test. $P \leq 0.05$ was recognized as statistically significant.

Results

Lipid peroxidation

MDA concentration in the samples containing peripheral blood (0.062 ± 0.02 – 0.18 nmol/ml) was significantly lower than in the samples of blood from lower limb varicose veins (0.088 ± 0.03 – 0.29 nmol/ml; $p \leq 0.002$; Wilcoxon test) (Figure 1).

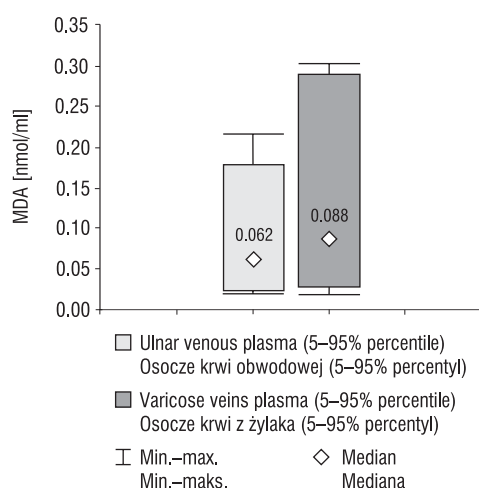


Figure 1. Concentration of malondialdehyde (MDA) in ulnar venous plasma samples and varicose veins plasma samples. Values are medians \pm 5–95% percentile. Differences are significant ($p \leq 0.002$)

Rycina 1. Stężenie malonyldialdehydu (MDA) w próbkach osocza krwi obwodowej oraz próbkach osocza krwi z żyłaków. Wartości wyrażono jako mediany \pm 5–95% percentyl. Różnice są znamienne statystycznie ($p \leq 0,002$)

biesko zabarwiony kompleks, oznaczany spektrofotometrycznie przy długości fali wykazującej maksimum absorpcji (λ_{max}) = 593 nm. Próbkę w ilości 0,1 ml mieszano z 3 ml roztworu roboczego (odczynnik roboczy: 25 ml buforu octanowego 300 mM o pH = 3,6; 2,5 ml 5 mM roztworu tripirydylo-S-triazyny; 2,5 ml 20 mM roztworu FeCl₃). Jako roztworu wzorcowego użyto wodnych roztworów wzorcowych Fe²⁺ zawierających 100–1000 umol/L FeSO₄. Wszystkie reakcje przeprowadzono w temperaturze 37°C. Wartość FRAP wyrażano w mmol/l.

Analiza statystyczna

Aby określić istotność statystyczną różnic pomiędzy grupami zastosowano analizę wariancji (ANOVA; $p \leq 0,05$). Przy braku jednorodności wariancji zastosowano nieparametryczny test Wilcoxona dla zmiennych powiązanych. Wartości przedstawiono jako mediany \pm (5–95) percentyl. Analizę statystyczną przeprowadzono w języku R i środowisku do analizy statystycznej z językiem R (R wersja 2.6.2; Wiedeń, Austria) [18]. Istotność różnic statystycznych potwierdzono za pomocą testu Wilcoxona. Wartość $p \leq 0,05$ uznawano za istotną statystycznie.

Wyniki

Peroksydacja lipidów

Stężenie MDA w próbkach osocza krwi obwodowej ($0,062 \pm 0,02$ – $0,18$ nmol/ml) było znacząco mniejsze niż w próbkach osocza krwi pochodzącej z żyłaków kończyn dolnych ($0,088 \pm 0,03$ – $0,29$ nmol/ml) ($p \leq 0,002$; test Wilcoxona) (ryc. 1).

Stężenie MDA w próbkach osocza krwi obwodowej ($0,05 \pm 0,02$ – $0,16$ nmol/ml) było znacząco mniejsze niż w próbkach osocza krwi pochodzącej z żyłaków kończyn dolnych ($0,08 \pm 0,04$ – $0,19$ nmol/ml) w grupie kobiet ($p \leq 0,007$; Wilcoxon test) (ryc. 2).

Nie zaobserwowano zwiększonego stężenia MDA w próbkach osocza krwi z żyłaków w porównaniu z odnotowanym w osoczu krwi obwodowej mężczyzn (ryc. 3).

Zmienność stężenia MDA była większa w próbkach osocza krwi z żyłaków niż w próbkach krwi obwodowej w obu porównywanych grupach (grupie kobiet i mężczyzn) (ryc. 4).

Wartości potencjału antyoksydacyjnego

Wartości całkowitego potencjału antyoksydacyjnego, wyrażonego jako FRAP w próbkach osocza krwi pochodzącej z żyłaków, były znacząco mniejsze ($0,89 \pm 0,68$ – $1,85$ nmol/l) niż w próbkach osocza krwi ob-

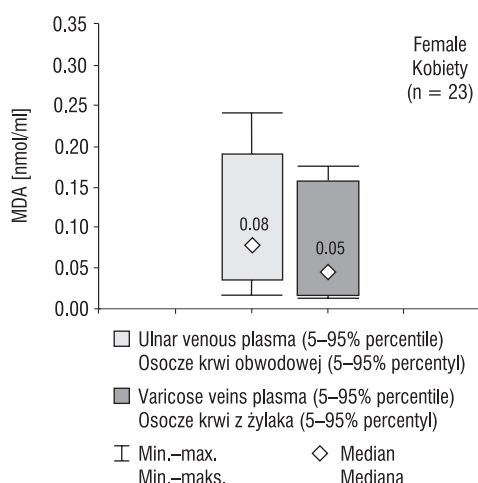


Figure 2. Concentration of malondialdehyde in ulnar venous plasma samples and varicose veins plasma samples in the female group. Values are medians \pm 5–95% percentile. Differences are significant ($p \leq 0.007$)

Rycina 2. Stężenie malonyldialdehydu w próbkach osocza krwi obwodowej oraz próbkach osocza krwi z żyłaków w grupie kobiet. Wartości wyrażone są jako mediana \pm 5–95% Percentyl. Różnice są znamienne statystycznie ($p \leq 0,007$)

In the group of female patients, MDA concentration in the samples containing peripheral blood ($0.05 \pm \pm 0.02$ – 0.16 nmol/ml) was also significantly lower than in the samples of blood from lower limb varicose veins (0.008 ± 0.04 – 0.19 nmol/ml; $p \leq 0.007$; Wilcoxon test) (Figure 2).

No such trend was noted when testing the samples of blood taken from peripheral vessels and varicose veins in male patients (Figure 3).

MDA concentration variability was higher in the samples of varicose vein blood than peripheral blood in both studied groups (women and men) (Figure 4).

Antioxidant capability value

Values of the total antioxidant capacity of blood plasma, expressed as FRAP values, were significantly lower in varicose vein blood samples (0.89 ± 0.68 – 1.85 nmol/l) when compared with peripheral blood tests (1.0 ± 0.78 – 1.92 nmol/l; $p \leq 0.002$; Wilcoxon test) (Figure 5).

The analysis of blood samples taken from women showed a similar trend, and the values of the total antioxidant capacity of varicose veins and peripheral blood were 0.89 ± 0.68 – 1.63 nmol/ml and 0.94 ± 0.82 – 1.63 nmol/ml, respectively ($p \leq 0.00003$; Wilcoxon test) (Figure 6).

As far as the male patients group was concerned, no such tendency was observed, and FRAP values measuring the total antioxidant capacity of blood plasma were similar in both peripheral and varicose vein blood samples (Figure 7).

wodowej ($1,0 \pm 0,78$ – $1,92$ nmol/l) ($p \leq 0,002$; test Wilcoxon) (ryc. 5).

Wartości całkowitego potencjału antyoksydacyjnego, wyrażonego jako FRAP w próbkach osocza krwi

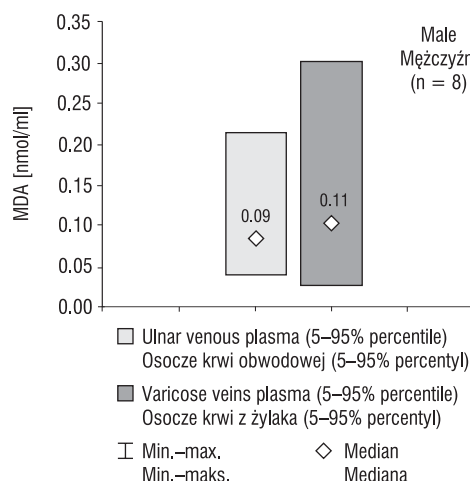


Figure 3. Concentration of malondialdehyde in ulnar venous plasma samples and varicose veins plasma samples in the male group. Values are medians \pm 5–95% percentile. Differences are not significant ($p > 0.05$)

Rycina 3. Stężenie malonyldialdehydu w próbkach osocza krwi obwodowej oraz próbkach osocza krwi z żyłaków w grupie mężczyzn. Wartości wyrażone są jako mediana \pm 5–95% Percentyl. Różnice nie są istotne statystycznie ($p > 0,05$)

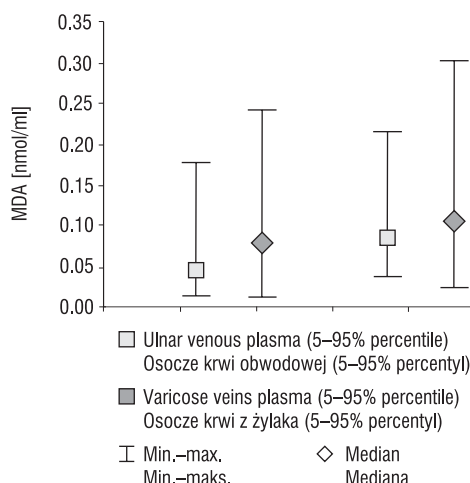


Figure 4. Concentration of malondialdehyde in ulnar venous plasma samples and varicose veins plasma samples in both compared groups. Values are medians \pm 5–95% percentile. Variabilities of MDA concentrations in ulnar venous plasma samples and in varicose veins plasma samples in both compared groups

Rycina 4. Stężenie malonyldialdehydu w próbkach osocza krwi obwodowej oraz próbkach osocza krwi z żyłaków w grupie kobiet i mężczyzn. Wartości wyrażone są jako mediana \pm 5–95% percentyl. Zmienność stężenia MDA w próbkach osocza krwi z żyłaków oraz w próbkach osocza krwi obwodowej w obu porównywanych grupach

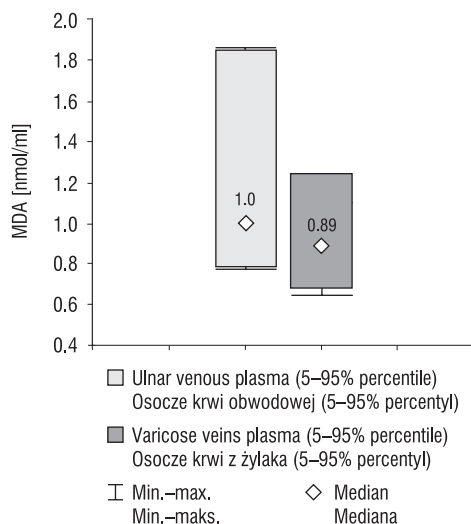


Figure 5. FRAP values in ulnar blood plasma samples and varicose veins plasma samples. Values are medians \pm 5-95% percentile. Differences are significant ($p \leq 0.002$)

Rycina 5. Stężenie malonyldialdehydu w próbkach osocza krwi obwodowej oraz próbkach osocza krwi z żyłaków w grupie kobiet i mężczyzn. Wartości wyrażone są jako mediany \pm \pm 5-95% percentyl. Zmienność stężenia MDA w próbkach osocza krwi z żyłaków oraz w próbkach osocza krwi obwodowej w obu porównywanych grupach

Discussion

Chronic venous disease (CVD), also known as chronic venous insufficiency (CVI), is characterized by a complex pathophysiology related to epithelial dysfunction and the remodelling of vein walls due to smooth muscle cell hypertrophy and inflammation caused by proinflammatory cytokine secretion from leukocytes. The activation of white blood cells is related to increased integrin expression followed by synthesis and production of proinflammatory amine molecules, proteolytic enzymes, leukotrienes, prostaglandins, bradykinin, oxygen free radicals, and possibly other inflammatory mediators. Inflammation works as a positive feedback loop, and leads to epidermal changes and subcutaneous tissue atrophy. The following risk factors for CVD were recognized: age, gender, undergone pregnancies, sitting lifestyle, and exposure to high temperatures. Current research also points to oxidative stress as a factor influencing the onset of CVD [19, 20].

Oxidative stress is defined as a lack of balance between free radical production and an organism's ability to detoxify them. This status may occur when the production of free radicals increases while antioxidant defence mechanisms become weaker.

The endothelial layer in blood vessels contains significant amounts of unsaturated fatty acids. Therefore, oxidation caused by free radicals and reactive forms

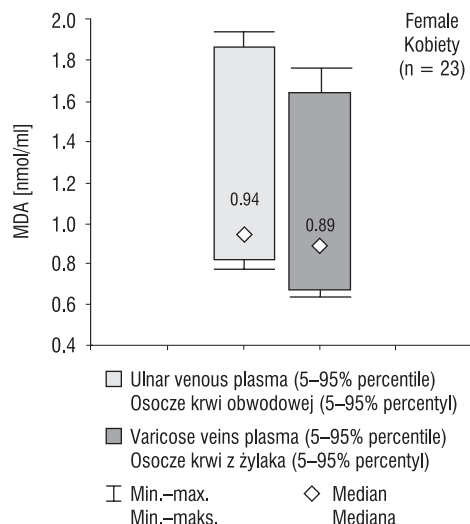


Figure 6. FRAP values in ulnar blood plasma samples and varicose veins plasma samples in the female group. Values are medians \pm 5-95% percentile. Differences are significant ($p \leq 0.00003$)

Rycina 6. Wartości FRAP w próbkach osocza krwi obwodowej oraz próbkach osocza krwi z żyłaków w grupie kobiet. Wartości wyrażone są jako mediany \pm 5-95% percentyl. Różnice są znamienne statystycznie ($p \leq 0,00003$)

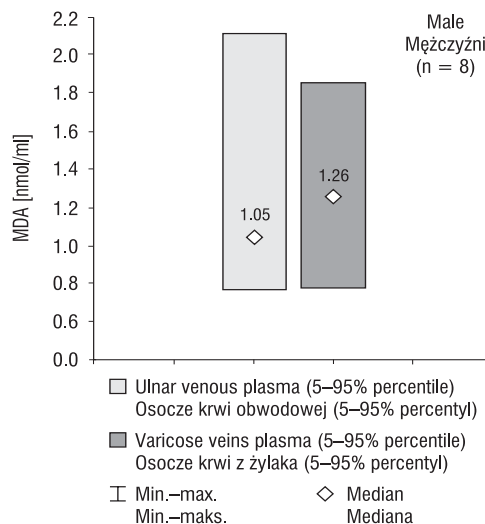


Figure 7. FRAP values in ulnar blood plasma samples and varicose veins plasma samples in the male group. Values are medians \pm 5-95% percentile. Differences are not significant ($p > 0.05$)

Rycina 7. Wartości FRAP w próbkach osocza krwi obwodowej oraz próbkach osocza krwi z żyłaków w grupie mężczyzn. Wartości wyrażone są jako mediany \pm 5-95% percentyl. Różnice nie są istotne statystycznie ($p > 0,05$)

pochodzącej z żyłaków ($0,89 \pm 0,68-1,63$ nmol/ml), były znacząco mniejsze niż w próbkach osocza krwi obwodowej ($0,94 \pm 0,82-1,63$ nmol/ml) w grupie kobiet ($p \leq 0,00003$; test Wilcoxon) (ryc. 6).

of oxygen is believed to be responsible for damages to the cell membrane and, as a result, impairment of the entire endothelium cell [21–23].

Reactive oxygen, especially through free radicals leading to tissue damage, is recognized as a pathogenic factor for lower limb varicose veins. Lipid oxidation may be evaluated directly through the concentration measurement of MDA metabolite generated during the process of oxidation. Meanwhile, the total antioxidant capacity may be evaluated via measurement of the ferric reducing ability of plasma FRAP [24].

The presented results showed different intensity levels of oxidative stress measured in the samples of blood taken from peripheral vessels when compared with the samples of blood from lower limb varicose veins in patients who underwent surgical interventions because of chronic venous insufficiency.

Additionally, the role of evaluation of lipid oxidation as an indicator of endothelium dysfunction and oxidative stress in patients with lower limb varicose veins was examined. MDA assessment is one of the most commonly used methods for lipid oxidation monitoring in biological samples. The data presented in Figure 1 show that MDA concentration was higher in plasma extracted from varicose vein blood than in blood sample taken from the forearm peripheral vein ($p \leq 0.002$).

The FRAP method gives fast and reliable results when one or more antioxidant factors are present in both water solution and plasma. The presented results of this study also suggest that levels of free radicals and lipid oxidation processes stimulated by those radicals, are gender-dependent.

The increase of MDA concentration was inversely proportional to the value of the total antioxidant capacity of plasma expressed as FRAP. The highest level of MDA and the lowest FRAP value was measured in the blood samples from lower limb varicose veins. Moreover, statistically significant differences between MDA concentration in plasma extracted from varicose vein blood and its level in blood taken from the forearm peripheral vessel, where it was much lower, were found in the group of female patients.

No statistically significant relation between the level of MDA measured in the samples of blood from varicose veins and peripheral vessels was observed in the group of men participating in this study. Similarly, no relation between total plasma antioxidant capacity (FRAP) measured in varicose veins and peripheral vein blood from male patients proved to be of statistical significance.

These results confirm the observations presented in papers published all over the world. Many researchers emphasize the key role of inflammatory status as

Nie zaobserwowano zwiększonego poziomu całkowitego potencjału antyoksydacyjnego (FRAP) w próbkach osocza krwi obwodowej w porównaniu z osoczem krwi pochodzącej z żyłaków kończyn dolnych w grupie mężczyzn (ryc.7).

Dyskusja

Przewlekła choroba żylna (CVD) charakteryzuje się złożoną strukturą patofizjologiczną wynikającą z dysfunkcji śródbłonna oraz remodelingu ścian żył następującym w wyniku przerostu komórek mięśni gładkich i stanu zapalnego powstałego jako efekt działania cytokin prozapalnych wydzielanych przez leukocyty. Aktywacji krwinek białych towarzyszy zwiększona ekspresja integryny oraz synteza i wyrzut cząsteczek prozapalnych amin, enzymów proteolitycznych, leukotrienów, prostaglandyn, bradykinin, wolnych rodników tlenowych i najprawdopodobniej także innych mediatorów stanu zapalnego. Stan zapalny działa jak dodatnie sprzężenie zwrotne, powodując zmiany skórne i zanik tkanki podskórnej. Do uznanych czynników ryzyka CVD należą: wiek, płeć, przebyte cięższe, siedzący tryb życia i ekspozycja na wysoką temperaturę. Obecnie wskazuje się również na stres oksydacyjny jako czynnik wpływający na powstanie CVD [19, 20].

Stres oksydacyjny następuje wówczas, gdy zachwiana zostaje równowaga pomiędzy produkcją wolnych rodników a zdolnościami przeciwutleniającymi organizmu. Stan ten może wystąpić zarówno w wyniku zwiększonej produkcji rodników, jak i osłabienia ochrony antyoksydacyjnej.

Ze względu na wysoką zawartość nienasyconych kwasów tłuszczowych w śródbłonnku naczyń żylnych ich utlenianie powodowane przez wolne rodniki i ROS uznaje się za ważną przyczynę uszkodzenia błony komórkowej i w konsekwencji — całej komórki [21–23].

Reaktywne formy tlenu w szczególności poprzez wolne rodniki prowadzące do uszkodzenia tkanki uznano za czynnik patogenetyczny żyłaków kończyn dolnych. Utlenianie lipidów określa się pośrednio za pomocą pomiaru stężenia MDA metabolitu powstającego w trakcie procesu utleniania. Natomiast całkowitą zdolność antyoksydacyjną osocza określa się na podstawie jego możliwości do redukcji jonów żelaza — FRAP [24].

W prezentowanym badaniu wskazano na różnice nasilenia stresu oksydacyjnego u chorych leczonych operacyjnie z powodu przewlekłej choroby żylnnej pomiędzy próbkami osocza krwi pobranej z żyły przedramienia a krwią pochodzącą z żyłaków kończyn dolnych. Dodatkowo określono rolę oznaczania utleniania lipidów jako wskaźnika dysfunkcji śródbłonna oraz stre-

a mechanism responsible for the progress of chronic venous disease and the incidence of its symptoms. Numerous studies have proven that in the course of chronic venous insufficiency the concentration of markers activating blood vessel endothelium and leukocytes increases. Moreover, reduced venous blood flow fosters interactions between leukocytes and endothelium responsible for the production of toxic metabolites e.g. MDA. Mahmoud et al. [25] found an intensified process of lipid peroxidation, expressed by increased concentration of malonyldialdehyde MDA, in deoxygenated blood vessels with insufficient valves when compared with vessels not changed by inflammatory processes. This phenomenon was also confirmed in our study.

Tryankina et al. pointed to the decrease in the number of plasma antioxidants, as well as the intensified lipid peroxidation process in patients suffering from lower limb varicose veins, in comparison to healthy people. In addition, Wlaschek et al. proved that oxidative stress overwhelms the mechanism protecting the organism from free radicals in patients with chronic venous disease [26, 27].

Studies by James et al. indicated high level of oxidative stress caused by neutrophils in patients with lower limb varicose veins. However, no statistically significant differences in total plasma antioxidant capacity (FRAP) were found in that group. As far as this issue is concerned, our results suggest the opposite since they differ significantly from the data presented by James et al. [28]. In our study, the level of FRAP was higher in samples of peripheral blood than in samples containing plasma from varicose vein blood, in which the measured values of FRAP were much lower, and this difference was of statistical significance.

Conclusions

Analysis of the presented results show significant differences in the total antioxidant capacity of plasma (FRAP value) (Figure 5) and MDA concentration (Figure 1) between plasma extracted from blood taken from the forearm peripheral vein and samples from lower limb varicose veins. Lower levels of FRAP suggest increased production of oxidative compounds, while increased MDA concentration indicates impaired antioxidant defence mechanisms. Both indicators are markers of strong oxidative stress in patients with lower limb varicose veins.

This study was supported by research grant no. k/ZBW/000256 from the Jagiellonian University Medical College Committee for Scientific Research.

su oksydacyjnego u chorych z żylakami kończyn dolnych. Oznaczenie MDA jest jedną z najczęściej stosowanych metod monitorowania utleniania lipidów w próbkach biologicznych. Z danych zaprezentowanych na rycinie 1 wynika, że stężenie MDA było większe w osoczu krwi pochodzącej z żylaków niż w osoczu z krwi pobranej z żyły przedramienia ($p \leq 0,002$).

Oznaczenie FRAP pozwala otrzymać szybkie i powtarzalne wyniki zarówno przy obecności jednego, jak i kilku składników antyoksydacyjnych w roztworach wodnych i osoczu. Na podstawie przedstawionych badań można sądzić, że poziomy wolnych rodników oraz wywoływane przez nie utlenianie lipidów zależy również od płci. Stężenia MDA miało wartość odwrotnie proporcjonalną w stosunku do wartości całkowitego potencjału antyoksydacyjnego wyrażonego jako FRAP. Największe stężenie MDA i najmniejszą wartość FRAP stwierdzono w osoczu krwi z żylaków kończyn dolnych. W grupie kobiet stwierdzono istotne statystycznie różnice pomiędzy stężeniem MDA w osoczu krwi pochodzącej z żylaka a stężeniem MDA w osoczu krwi obwodowej z żyły przedramienia, gdzie było ono znacznie mniejsze. Nie stwierdzono istotności statystycznej w wypadku stężenia MDA we krwi pobranej z żylaka i krwi obwodowej w badanej grupie mężczyzn. Podobnie w grupie mężczyzn nie wykazano istotności statystycznej pod względem wartości całkowitego potencjału antyoksydacyjnego (FRAP) we krwi żyłnej obwodowej oraz krwi pobranej z żylaka. Przedstawione wyniki są zgodne z danymi z piśmiennictwa światowego. Wielu badaczy zwraca uwagę na kluczową rolę stanu zapalnego jako mechanizmu odpowiedzialnego za postęp przewlekłej choroby żyłnej i występowanie jej objawów. W licznych pracach udowodniono wzrost stężenia markerów aktywacji śródbłonna naczyń żylnych i leukocytów w przebiegu CVD. Zwolniony przepływ żylny sprzyja interakcji leukocytów z endotelium, w wyniku której powstają toksyczne metabolity, między innymi MDA. Mahmoud i wsp. [25] stwierdzili nasilony proces peroksydacji lipidów, wyrażony zwiększonym stężeniem malonyldialdehydu w niedotlenionych naczyniach żylnych w miejscu niewydolnych zastawek, w porównaniu z naczyniami niezmiennymi procesem zapalnym, co potwierdzono również w niniejszej pracy.

Tryankina i wsp. zwrócili uwagę na zmniejszenie puli antyoksydantów osoczowych, a także nasilony proces peroksydacji lipidów u chorych z żylakami kończyn dolnych w porównaniu z grupą osób zdrowych. Wlaschek i wsp. w podobnych badaniach dowiedli, że stres oksydacyjny osłabia mechanizmy obrony przeciwrodnikowej u chorych na CVD [26, 27].

References

- Jawień A (2003) Prevalence of chronic venous insufficiency in men and women — the Polish multicentre cross sectioned study in 40095 patients. *Phlebology*, 18: 110–122.
- Wali MA, Suleiman A, Kadoumi OF et al (2002) Superoxide Radical Concentration and Superoxide Dismutase (SOD) Enzyme Activity in Varicose Veins. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*, 8: 286–290.
- Alexander CJ (1972) The theoretical basis of varicose vein formation. *Med J Aust*, 1: 258–261.
- Ludbrook J (1986) Primary great saphenous veins revisited. *World J Surg*, 10: 94–98.
- Burnard KG, Pattison M, Powell S et al (1986) Can we diagnose long saphenous vein incompetence correctly? John Libbey Phlebology, London 1986.
- Nicolaides AN (2005) Chronic venous disease and the leukocyte-endothelium interaction: from symptoms to ulceration. *Angiology*, 56 (supl 1): 11–19.
- Robertson L, Evans C, Fowkes FG (2008) Epidemiology of chronic venous disease. *Phlebology*, 23: 103–111.
- Flora SJ (2007) Role of free radicals and antioxidants in health and disease. *Cell Mol Biol*, 53: 1–2.
- Heistad DD (2006) Oxidative Stress and Vascular Disease: 2005 Duff Lecture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26: 689–695.
- Dröge W (2002) Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev*, 82: 47–95.
- Cordis GA, Das DK, Riedel W (1998) High-performance liquid chromatographic peak identification of 2, 4-dinitrophenylhydrazine derivatives of lipid peroxidation aldehydes by photodiode array detection. *J Chromatogr A*, 798: 117–123.
- Slatter DA, Bolton CH, Bailey AJ (2000) The importance of lipid-derived malondialdehyde in diabetes mellitus. *Dia-betologia*, 43: 550–557.
- Pilz J, Meineke I, Gleiter CH (2000) Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 2, 4-dinitrophenylhydrazine derivative. *J Chromatogr B Biomed Sci*, 742: 315–325.
- Rizvi SI, Jha R, Maurya PK (2006) Erythrocyte Plasma Membrane Redox System in Human Aging. *Rejuvenation Research*, 9: 470–474.
- Eklöf B, Rutherford RB, Bergan JJ et al (2004) for the American Venous Forum International Ad Hoc Committee for Revision of the CEAP Classification, Helsingborg, Sweden. Revision of the CEAP classification for chronic venous disorders: Consensus statement. *J Vasc Surg*, 40: 1248–1252.
- Buege JA, Aust SD (1978) Lipid peroxidation. *Methods Enzymol*, 51: 302–310.
- Benzie F, Iris F, Strain JJ (1996) *Analyt Biochem*, 239: 70–76.
- R Development Core Team (2008) A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. Available on <http://www.R-project.org>.
- Bertrand C, Batt AM (2003) Cytochromes P450, vascular tone varicosis. *Ann Pharm Fr*, 61: 234–242.
- Pascarella L, Schonbein GW, Bergan JJ (2005) Microcirculation and venous ulcers: a review. *Ann Vasc Surg*, 19: 921–927.
- Derin N, Izzut-Uysal VN, Agac A, Aliciguzel Y, Demir N (2004) L-carnitine protects gastric mucosa by decreasing ischemia-reperfusion induced lipid peroxidation. *J Physiol Pharmacol*, 55: 595–606.
- Janero DR (1990) Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med*, 9: 515–540.
- Riedel W, Lang U, Oetjen U, Schlapp U, Shibata M (2003) Inhibition of oxygen radical formation by methylene blue, aspirin, or alpha-lipoic acid, prevents bacterial-lipopolysaccharide-induced fever. *Mol Cell Biochem*, 247: 83–94.
- Annoopkumar-Dukie S, Walker RB, Daya S (2001) A sensitive and reliable method for the detection of lipid peroxidation in biological tissues. *J Pharm Pharmacol*, 53: 263–266.
- Wali MA, Suleiman A, Kadoumi OF i Nasr MA (2002) Superoxide Radicals Concentration and Superoxide Dismutase (SOD) Enzyme Activity in Varicose Vein. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*, 8: 286–290.
- Tryankina SA, Kolobova OI, Varshavsky BY (2003) Lipid peroxidation in pathogenesis of varix dilatation. *Klin Diagn Lab*, 6: 19–20.
- Wlaschek M, Scharffetter-Kochanek K (2005) Oxidative stress in chronic vein leg ulcers. *Wound Rep Reg*, 13: 452–461.
- James TJ, Hughes MA, Cherry GW, Taylor RP (2003) Evidence of oxidative stress in chronic venous ulcers. *Wound Rep Reg*, 11: 172–176.

W badaniach Jamesa i wsp. stwierdzono zwiększenie stresu oksydacyjnego wywołanego przez neutrofile u chorych z żylakami kończyn dolnych, natomiast nie wykazano w tej grupie chorych znaczących różnic w zakresie całkowitej pojemności antyoksydacyjnej osocza (FRAP). W tej kwestii wyniki badań autorów niniejszej pracy w istotny sposób różnią się od wyników przedstawionych przez Jamesa i wsp. [28], gdyż stwierdzono istotny statystycznie wyższy poziom FRAP w osoczu krwi obwodowej w porównaniu z jego poziomem w osoczu krwi pochodzącej z żyłki, gdzie obserwowano znaczący spadek poziomu FRAP.

Wnioski

Analizując uzyskane wyniki badań, wykazano, że w osoczu krwi pobranej z żył okolicy przedramienia znaczące różnice pod względem wartości całkowitej zdolności antyoksydacyjnej osocza (FRAP) (ryc. 5) i stężenia MDA (ryc. 1) w porównaniu z krwią pochodzącą z żyłaków kończyn dolnych. Obniżone poziomy FRAP mogą wskazywać na zwiększoną produkcję substancji utleniających, natomiast większe stężenia MDA — o upośledzeniu ochrony antyoksydacyjnej. Obydwa wskaźniki wskazują na istnienie silnego stresu oksydacyjnego u chorych z żylakami kończyn dolnych.

Badania sfinansowano z projektu badań własnych nr K/ZBW/000256 Biura Badań Naukowych Uniwersytetu Jagiellońskiego *Collegium Medicum*.