

Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Wydział Nauk o Zdrowiu

Paweł Kolano

**Udział zaburzeń angiogenezy
i macierzy zewnątrzkomórkowej
w rozwoju owrzodzeń podudzi**

Praca doktorska

Promotor: prof. zw. dr n. med. Joanna Narbutt

Pracę wykonano w Klinice Dermatologii,

Dermatologii Dziecięcej i Onkologicznej UM w Łodzi

Łódź, 2019

Streszczenie

Owrzodzenia żyłne podudzi dotykające w populacji polskiej ok. 1.5% pacjentów są obecnie jednym z ważniejszych problemów medycznych, ponieważ wymagają długotrwałej i kosztochłonnej opieki, jak również będąc chorobą stygmatyzującą dla pacjentów. Żyłne owrzodzenia podudzi definiowane są jako przewlekłe rany, nie ulegające wyleczeniu przez 6-8 tygodni lub których powierzchnia nie maleje o 20-40% po upływie co najmniej 2-4 tygodni leczenia. Najczęstszym czynnikiem etiologicznym owrzodzeń żylnych podudzi są zaburzenia hemodynamiczne w układzie żylnym kończyn dolnych, powstające w wyniku przewlekłej niewydolności żyłnej (*chronic venous insufficiency*, CVI). Ze względu na charakter tej choroby konieczne staje się określenie jakie mechanizmy są odpowiedzialne za jej rozwój, choćby ze względu na możliwość znalezienia punktu uchwytu dla nowoczesnych, spersonalizowanych terapii. Sugeruje się, że w rozwoju owrzodzeń żylnych podudzi uczestniczą białka zawiadujące remodelingiem macierzy pozakomórkowej takie jak MMP-1, MMP-9 i TIMP-1, jak również białka odpowiedzialne za angiogenezę takie jak angiogenina i VEGF. Według naszej najlepszej wiedzy brakuje badań na temat określenia udziału tych białek w rozwoju owrzodzeń żylnych podudzi dlatego też celem przeprowadzonych badań było określenie stężenia poszczególnych białek u pacjentów chorujących z powodu owrzodzeń podudzi na tle żylnym, jak i u osób zdrowych we krwi obwodowej z użyciem techniki ELISA. Dodatkowo, z wykorzystaniem metod immunohistochemicznych dokonano oceny ekspresji VEGF i katepsyny K w wycinkach skóry pobranych ze zmian o charakterze owrzodzeń podudzi oraz ze skóry zdrowej.

Do badania włączono 71 osób rasy kaukaskiej (38 kobiet i 33 mężczyzn, średnia wieku – 72,99 ± 4,82 lat), spośród których 39 stanowili pacjenci z owrzodzeniami podudzi, a 32 grupę zdrowych wolontariuszy (kontrolną). Spośród grupy badanej i kontrolnej wyodrębniono podgrupę ochotników, którzy oprócz oznaczenia podstawowych parametrów z

surowicy krwi, wyrazili zgodę na pobranie biopsji ze skóry. U wszystkich pacjentów z grupy badanej owrzodzenie było zmianą pojedynczą i znajdowało się w okolicach kostki przyśrodkowej. Opracowanie statystyczne wyników zostało wykonane z użyciem oprogramowania Statistica 13 (Statsoft, Tulsa, USA), a za poziom istotności statystycznej dla wszystkich analiz przyjęto $p < 0,05$.

Średnie stężenie MMP-1 w grupie badanej wyniosło $14,16 \pm 2,98$ ng/ml, w grupie kontrolnej $6,08 \pm 2,51$ ng/ml, średnie stężenie MMP-9 w grupie badanej wyniosło $12,45 \pm 3,8$ ng/ml, w grupie kontrolnej $6,77 \pm 2,41$ ng/ml. W obu przypadkach różnice te były istotne statystycznie. Nie zaobserwowano istotnych różnic w stężeniu TIMP-1 między grupą kontrolną, a badaną.

Średnie stężenie VEGF w grupie badanej wyniosło $589,33 \pm 346,21$ pg/ml, w grupie kontrolnej $220,28 \pm 110,36$ pg/ml. Średnie stężenie angiogeniny w grupie badanej wyniosło $1801,86 \pm 415,66$ pg/ml, a w grupie kontrolnej $1104,81 \pm 176,06$ pg/ml; w obu przypadkach różnice te były istotne statystycznie.

W badaniu immunohistochemicznym stwierdzono istotną różnicę między grupą badaną a grupą kontrolną w ekspresji katepsyny K (odpowiednio $1,007 \pm 0,3$ w porównaniu z $0,22 \pm 0,2$) i ekspresji VEGF (odpowiednio $1,17 \pm 0,59$ w porównaniu z $0,27 \pm 0,19$). Na podstawie uzyskanych wyników wnioski są następujące:

1. Podwyższone stężenie MMP-1 i MMP-9 w surowicy krwi pacjentów z grupy badanej w porównaniu do grupy kontrolnej świadczy o udziale tych metaloproteinaz w patogenezie owrzodzeń żylnych podudzi.
2. Brak istotnych różnic w stężeniu TIMP-1 między grupą kontrolną a badaną może świadczyć, że w rozwoju owrzodzeń żylnych podudzi przewagę uzyskują procesy proteolityczne.

3. Podwyższone stężenie VEGF i angiogeniny, jak również zwiększona immunohistochemiczna ekspresja VEGF w grupie badanej w porównaniu do grupy kontrolnej wskazuje, że jednoczesnym zjawiskiem do remodelingu ECM jest proces tworzenia nowych naczyń krwionośnych.
4. Zwiększona ekspresja katepsyny K w tkankach pochodzących z owrzodzeń żylnych świadczy nie tylko o jej udziale w rozwoju samego owrzodzenia, ale wskazuje też, że może istnieć nowy regulator remodelingu ECM wymagający dalszych badań.

Summary

Venous leg ulcers are affecting approximately 1,5% of patients in the Polish population and are currently one of the most important medical problems, because they require long-term and cost-intensive care and stigmatizing for patients. Venous leg ulcers are defined as chronic wounds that can not be cured for 6-8 weeks or whose surface does not decrease by 20-40% after at least 2-4 weeks of treatment. The most common etiologic factor of venous leg ulcers are haemodynamic disorders in the venous system of the lower limbs, resulting from chronic venous insufficiency (CVI). Due to the nature of this disease, it becomes necessary to determine which mechanisms are responsible for its development, to develop modern, personalized therapies. It is suggested that proteins involved in the remodeling of extracellular matrix, such as MMP-1, MMP-9 and TIMP-1, as well as proteins responsible for angiogenesis such as angiogenin and VEGF, are involved in the development of venous leg ulcers. To the best of our knowledge, there is no research on the determination of the participation of these proteins in the development of venous leg ulcers, therefore the aim of the study was to determine the concentration of individual proteins in patients suffering from leg ulcers as well as in healthy population in the peripheral blood using the ELISA technique. Additionally, using the immunohistochemical methods, the expression of the VEGF, one of the surface marker of endothelial cells and cathepsin K, which appears to be a new player involved in wound healing, skin sections taken from leg ulcer lesions was evaluated. 71 patients from Caucasian population (38 women and 33 men, the average age – $72,99 \pm 4,82$ years) were included into the study, of whom 39 were patients with leg ulcers and 32 were healthy volunteers (controls). A subgroup of volunteers was identified among the study and control groups, who in addition to the determination of basic serum parameters, agreed to take a biopsy from the skin. In all patients in the study group, the ulcer was a single lesion and was located near the medial malleolus.

Statistical analysis of the results was done using the Statistica 13 software (Statsoft, Tulsa, USA), and $p < 0,05$ was assumed as the statistical significance level for all analyzes. The mean concentration of MMP-1 in the study group was $14,16 \pm 2,98$ ng/ml, in the control group $6,08 \pm 2,51$ ng/ml, the mean concentration of MMP-9 in the study group was $12,45 \pm 3,8$ ng/ml, in the control group $6,77 \pm 2,41$ ng/ml. In both cases, these differences were statistically significant. There were no significant differences in TIMP-1 concentration between the control group and the test group. The mean VEGF concentration in the study group was $589,33 \pm 346,21$ pg/ml, in the control group $220,28 \pm 110,36$ pg/ml, and the mean angiogenin concentration in the study group was $1801,86 \pm 415,66$ pg/ml, and in the control group: $1104,81 \pm 176,06$ pg/ml; in both cases, these differences were statistically significant. In the immunohistochemistry, a significant difference was found between the test group and the control group in the expression of cathepsin K ($1,007 \pm 0,3$, respectively, as compared to $0,22 \pm 0,2$) and VEGF expression ($1,17 \pm 0,59$ respectively, compared to $0,27 \pm 0,19$). Based on the results obtained, the conclusions are as follows:

1. Increased concentration of MMP-1 and MMP-9 in the serum of patients in the test group compared to the control group shows the participation of these metalloproteinases in the pathogenesis of leg ulcers.
2. Lack of significant differences in the concentration of TIMP-1 between the control and the test group suggests that proteolytic processes have an advantage in the development of leg ulcers.
3. Increased concentration of VEGF and angiogenin, as well as increased immunohistochemical expression of VEGF in the test group compared to the control group indicates that the simultaneous phenomenon for ECM remodeling is the process of creating new blood vessels.

4. Increased expression of cathepsin K in tissues originating from venous ulcers shows not only its participation in the development of the ulcer itself, but also indicates that there may be a new ECM remodeling regulator which needs further studies.