

Mariusz KÓZKA¹
 Wirginia KRZYŚCIAK²
 Agata PIETRZYCKA²
 Marek STĘPNIEWSKI²

Wpływ otyłości na poziom reaktywnych form tlenu (RTF) we krwi chorych z żylakami kończyn dolnych

Obesity and its' influence on reactive oxygen species (ROS) in the blood of patients with varicose veins of the lower limbs

¹II Katedra i Klinika Chirurgii Ogólnej
 Uniwersytet Jagielloński
 Collegium Medicum, Kraków
 Kierownik: Prof. dr hab. n. med. *Danuta Karcz*

²Samodzielna Pracownia Radioligandów,
 Wydział Farmaceutyczny
 Uniwersytet Jagielloński
 Collegium Medicum, Kraków
 Kierownik: Dr hab. med. *Marek Stępniewski*,
 Prof. UJ

Dodatkowe słowa kluczowe:
 przewlekła choroba żylna – PChŻ
 wskaźnik masy ciała – BMI
 malonyldialdehyd – MDA

Additional key words:
 chronic venous disease – CVD
 body mass index – BMI
 malonyldialdehyde – MDA

Wstęp: Uznaje się że stres oksydacyjny może być odpowiedzialny za patogenezę i rozwój wielu schorzeń, włączając w to przewlekłą chorobę żylną (PChŻ). Lokalna nadprodukcja reaktywnych form tlenu (RFT), stanowiących mediatorów zmian w ścianach naczyń przyczynia się do uszkodzenia śródbłonna i może stanowić mechanizm prowadzący do utrudnienia odpływu krwi i zastoju żylnego. Uznany klinicznym czynnikiem wpływającym na utrudnienie odpływu krwi żyłnej z kończyn dolnych jest nadwaga. **Cel pracy:** Celem pracy była ocena lokalnej produkcji RFT na podstawie pomiaru stężenia malonyldialdehydu (MDA), jako produktu peroksydacji lipidów, w próbkach krwi pochodzących z żylaków kończyn dolnych oraz krwi pobranej z żyły przedramienia u chorych poddanych leczeniu operacyjnemu z powodu żylaków kończyn dolnych. Ponadto zbadano korelację między poziomem MDA oraz indeksem masy ciała BMI. **Materiał i metody:** Badaną grupę stanowiło 31 chorych ze zdiagnozowaną przewlekłą chorobą żylną, w stopniu 2 i 3 wg CEAP zakwalifikowanych do leczenia operacyjnego. W analizowanej grupie chorych były 23 kobiety i 8 mężczyzn w wieku 26-68 lat, (średnia wieku $49,9 \pm 12,5$). Grupę kontrolną stanowiło 31 osób (20 kobiet i 11 mężczyzn w wieku 51-72 lata, średnia wieku 60 ± 12), ochotników bez objawów przewlekłej choroby żyłnej, u których krew do oznaczenia MDA pobrano z żyły przedramienia w trakcie badań okresowych. Produkty peroksydacji lipidów zostały określone przez zmierzenie reaktywnych składników reagujących z kwasem tiobarbiturowym spektrofotometrycznie, metodą podaną przez Austa. Stężenie MDA zostało wyrażone jako nmol MDA na mililitr osocza i określone fluorometrycznie przy emisji fluorescencji 553 nm i wzbudzeniu 532 nm. **Wyniki:** Stwierdzono znaczący wzrost poziomu malonyldialdehydu (MDA), w osoczu krwi z żylaka w porównaniu z

Introduction: Oxidative stress is considered as a probable mechanism in the pathogenesis and development of many diseases, including chronic venous disease (CVD). Local increased production of reactive oxygen species is taken into account as a mediator in vessel wall changes leading to damage of the endothelium and may be the mechanism leading to its' decreased blood flow and venous stasis. Obesity is a known clinical factor influencing venous blood flow from the lower limbs. **Aim:** Research aim was to evaluate the local production of ROS on the basis of malonyldialdehyde (MDA) production – a product of lipid peroxidation in blood samples taken from varicose veins of the lower limbs; as well as from blood taken from the forearms of patients that undertook surgery for lower limb varicose veins. The correlation between MDA level and body mass index (BMI) was also examined. **Materials and methods:** The examined group consisted of 31 patients with diagnosed CVD of the 2nd and 3rd degree according to CEAP qualified for surgical procedure. The analyzed group consisted of 23 females and 8 males between the ages of 26-68 years (mean age 49.9 ± 12.5). The control group included 31 patients (20 females and 11 males) between the ages of 51-72 years (mean age 60 ± 12); volunteers were without signs and symptoms of CVD whom had MDA levels measured from forearm veins during routine exam. Lipid peroxidation products were identified by measuring reactive species reaction with thiobarbital, measured by the spectrofluorometrical method given by Austa. MDA concentration were expressed as nmol of MDA per ml of plasma and measured using the fluorometric method at fluorescence emission at 553 nm and ebullition at 532 nm. **Results:** Significant increase in the MDA level in blood with various veins was noted in comparison to peripheral blood in patients with signs and symp-

Adres do korespondencji:
 Dr n. med. Mariusz Kózka
 II Katedra i Klinika Chirurgii Ogólnej UJ CM,
 31-501 Kraków, ul. Kopernika 21
 e-mail: mkozka@interia.pl
 wirginiakrzyściak@cm-uj.kr.pl

krwią obwodową u chorych z objawami PChŻ ($p \leq 0,0001$). Ponadto stężenie MDA było wyższe w osoczu krwi żyłnej chorych niż w osoczu krwi żyłnej zdrowych ochotników ($p \leq 0,0005$). Stwierdzono ponadto, że indeks masy ciała (BMI) dobrze koreluje ze zwiększonym stężeniem MDA w osoczu krwi. Stężenie MDA było wyższe u pacjentów z otyłością niż u osób z prawidłowym BMI. Różnice te były znamienne statystycznie ($p \leq 0,001$). Wnioski: 1. Przewlekła choroba żylna przebiega ze znacznie nasilonym stresem oksydacyjnym mierzonym poziomem stężenia MDA w osoczu krwi. 2. Pomiar stężenia MDA może stanowić użyteczny marker określający ryzyko zmian naczyniowych u pacjentów z przewlekłą chorobą żylną. 3. Otyłość zwiększa ryzyko peroksydacji lipidów oraz wpływa na postępujący stres oksydacyjny w grupie chorych z objawami przewlekłej choroby żyłnej.

Wprowadzenie

Coraz częściej zwiększa się na świecie liczba chorób spowodowanych nadwagą [14, 19, 35]. Różnice związane z patogenezą większości chorób naczyniowych wzbudzają coraz większe kontrowersje. Znajomość podłoża wielu z tych chorób pozwoli nie tylko skutecznie przeciwdziałać ich postępowi ale jednocześnie zwiększy szanse przeżycia. Okazuje się bowiem, że otyłość jest stosunkowo negatywnym miernikiem małej skuteczności prewencji i leczenia. Racjonalne postępowanie, polegające na redukcji nadmiaru masy tkanki tłuszczowej i zapobieganiu nawrotom otyłości, w praktyce jest realizowane w sposób mało konsekwentny [11]. Powstaje zatem liczna grupa osób z otyłością powikłaną zaburzeniami naczyniowymi. Wśród tych osób istotne miejsce zajmują chorzy z Przewlekłą Chorobą Żylną – PChŻ u których widoczne są zmiany żyłkowe [2]. Poznanie jednak wczesnych zmian patogenetycznych pozwoli na wczesne i planowe rozpoznanie, co wciąż stanowi problem w praktyce klinicznej wielu chorób naczyniowych.

Stres oksydacyjny stanowi potencjalny mechanizm włączony w patogenezę i rozwój wielu chorób, włączając przewlekłą chorobę żylną (PChŻ) [4]. Głównymi czynnikami powodującymi stres oksydacyjny są: długotrwały stan zapalny z neutrofilami obecnymi w uszkodzonej tkance, produkującymi anionorodniki nadtlenkowe w wybuchu tlenowym oraz niedotlenienie i niedokrwienie. Prozapalne cytokiny mogą stymulować do produkcji RFT komórki stanu zapalnego, także inne typy komórek – np. fibroblasty [22]. Jako że w uszkodzonych naczyniach jest stale obecny stan zapalny, wydzielone RFT mogą przez długi czas oddziaływać na tkankę, powodując lawinę zdarzeń. Cały ten proces jest sprzężeniem zwrotnym dodatnim prowadzącym do nasilenia stanu zapalnego.

PChŻ związana jest z lokalną nadprodukcją reaktywnych form tlenu (RFT), które stanowią główne mediatory zmian w ścianach naczyń [5, 7, 29]. Zmiany naczyniowe związane są z dwoma głównymi mechanizmami. Jeden związany jest z utlenianiem składników błony komórkowej, po którym następują zmiany w obrębie śródbłonna naczyń co ostatecznie prowadzi do zwiększenia przepuszczalności ściany naczyńia żylnego.

toms of CVD ($p \leq 0,0001$). Overall MDA concentration was higher in venous blood plasma in patients with CVD than in healthy volunteers ($p \leq 0,0005$). BMI substantially correlated with increased MDA concentration in blood plasma. MDA concentration was higher in obese patients than in patients with normal BMI. These results were substantially significant ($p \leq 0,001$). Conclusions: CVD is associated with increased oxidative stress measured by the level of MDA in blood plasma. Measurement of MDA may be a useful marker in evaluation of vessel changes in patients with CVD. 3. Obesity increases risk of lipid peroxidation and influences increment of oxidative stress in the group of patients with CVD.

Kolejny z mechanizmów związany jest z chemotaksją i aktywacją leukocytów i płytek krwi. Kiedy te dwa mechanizmy współdziałają ze sobą zmiany komórkowe rozszerzają się i zwiększa się zastój żylny [15, 20, 23]. Zastój jest pierwotnym czynnikiem zapoczątkowującym szereg hemodynamicznych, metabolicznych i odżywczych zmian związanych z przepływem krwi, redystrybucji mikrokrążenia, niedotlenienia tkanek oraz aktywacją leukocytów [28, 30, 31]. Przyleganie leukocytów zapoczątkowuje aktywację neutrofilów, co związane jest z różnokształtnością ich jąder komórkowych oraz zwiększa syntezę rodników nadtlenkowych które prowadzą do peroksydacji lipidów [1, 17].

Pomiar stresu oksydacyjnego wewnątrz uszkodzonych naczyń żylnych jest utrudniony przez krótki okres półtrwania i wysoką reaktywność RFT. W związku z tymi problemami stres oksydacyjny oznacza się pośrednio, poprzez produkty działania RFT – uszkodzone DNA, białka i lipidy. Metody oznaczania polegają na wykrywaniu produktów pośrednich utleniania: lipidów (malonyldialdehydu (MDA), izoprostanu); produktów utleniania DNA (8-hydroksydeoksyguanozyny); białek (oznaczanie reszt nitrotryzyny i innych).

Materiał i metoda

Lokalną produkcją reaktywnych form tlenu została oszacowana przez pomiar malonyldialdehydu jako produktu peroksydacji lipidów w próbkach osocza krwi zastoinowej z żyłaków kończyn dolnych, pochodzących od 31 pacjentów ze zdiagnozowaną przewlekłą chorobą żylną, poddawanych flebektomii oraz w osoczu krwi obwodowej z żyły przedramienia tych samych pacjentów. Chorzy to 31 osób (23 to kobiety i 8 mężczyzn w wieku 26-68 lat, gdzie średnia wieku wynosiła $49,9 \pm 12,5$ SD) ze zdiagnozowaną przewlekłą chorobą żylną, w stopniu 2 i 3 wg CEAP zakwalifikowanych do leczenia operacyjnego w II Klinice Chirurgii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego. Na prowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej UJ CM [KBET/125/B/2007].

31 osób zdrowych (20 kobiet i 11 mężczyzn w wieku 51-72 lat, gdzie średnia wieku wynosiła 60 ± 12 SD) posłużyło jako kontrola. Osoby te to zdrowi ochotnicy poddawani badaniom okresowym. MDA zmierzono w osoczu krwi z żyły przedramienia w tej grupie.

Po przeprowadzeniu wywiadu w badanej grupie 31 osób chorych na PChŻ znajdowało się: 8 osób z prawidłowym BMI (18,5-24,9) [34]; nadwagę (25,0-29,9) wykazywało 15 osób, natomiast z I stopniem otyłości (30,0-34,9) było 5 osób a z II stopniem otyłości (35,0-39,9) było 2 osoby. BMI (*body mass index* – wskaźnik masy

ciała) [19] określono: masa (kg)/wzrost (m)².

Produkty peroksydacji lipidów zostały określone przez zmierzenie reaktywnych składników reagujących z kwasem tiobarbiturowym spektrofotometrycznie, metodą podaną przez Austa (1994) [6]. Pomiaru stężenia malonyldialdehydu MDA w osoczu krwi dokonano za pomocą oznaczenia fluorymetrycznego. Najpierw wykonano derywatację kwasem tiobarbiturowym (TBA, ang. *thiobarbituric acid*) 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 czterokrotnie wodą]. Po wytrąszeniu, próbki umieszczano w łaźni wodnej na 15 min w temperaturze 100°C. Po ochłodzeniu pod zimną wodą, powstały barwnik ekstrahowano do 3,0 ml alkoholu n-butylowego intensywnie wstrząsając 1 min. Oddzielenie fazy organicznej przyspieszono poprzez wirowanie przy 1000×g przez 10 min. 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.

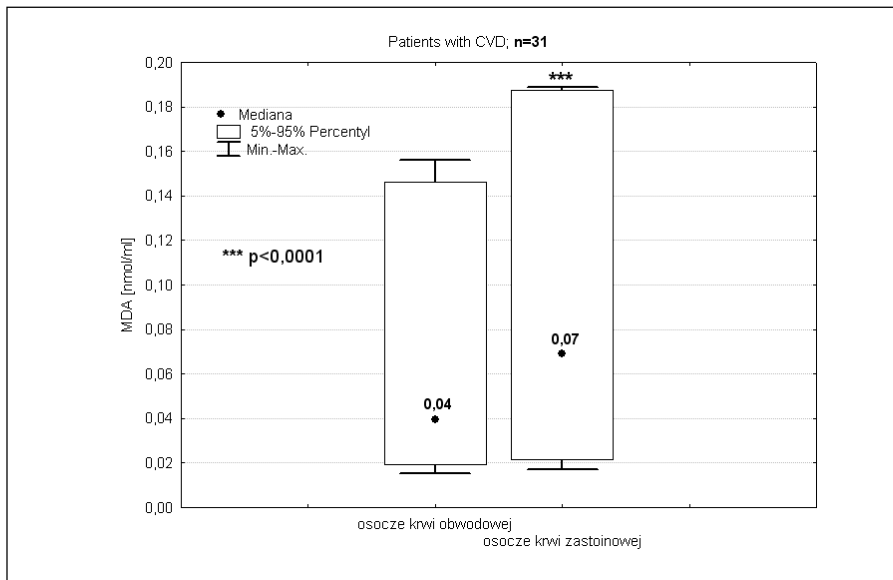
Analiza statystyczna

Analiza statystyczna została wykonana z użyciem pakietu Statistica wersji 6,0. Test *Shapiro-Wilka* został użyty do sprawdzenia normalności rozkładu. Dane zostały wyrażone jako mediany (5%-95% percentyl). Statystyczne porównania pomiędzy grupami wykonano przy pomocy testu *Wilcoxon*. Wartości, gdzie $p \leq 0,05$ przyjęto jako znamienne statystycznie. Model regresji GRM został zastosowany do wykazania zależności pomiędzy poziomem MDA u chorych (odpowiednio w osoczu krwi żyłnej oraz osoczu krwi pochodzącej z żyłaka) a indeksem masy ciała (BMI) u tych samych chorych. Różnice były statystycznie znamienne ($p \leq 0,05$).

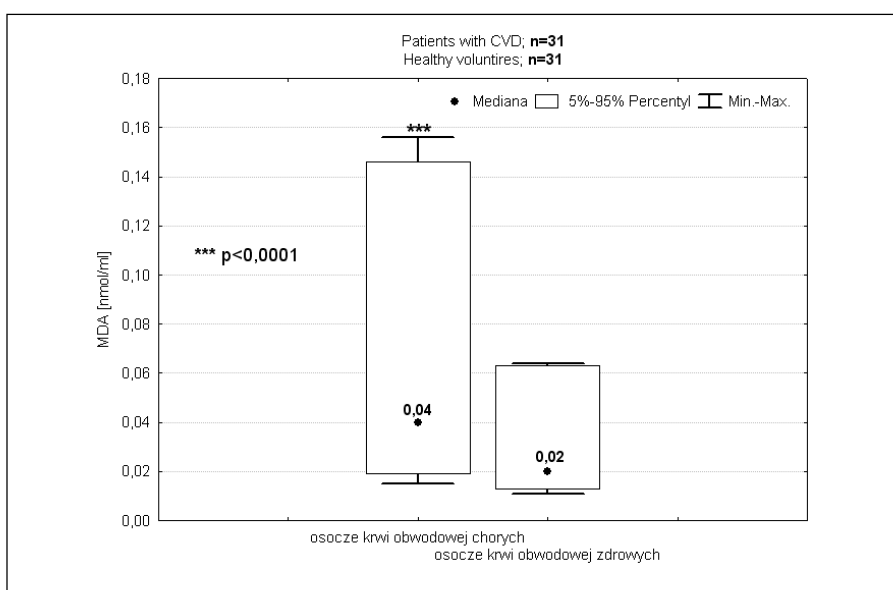
Wyniki

Stwierdzono znaczący wzrost poziomu malonyldialdehydu w osoczu krwi z żyłaka w porównaniu z krwią obwodową u tych samych pacjentów ($p \leq 0,0001$). Dodatkowo stężenie MDA było wyższe w osoczu krwi żyłnej chorych aniżeli w osoczu krwi żyłnej zdrowych ochotników ($p \leq 0,0001$) (rycina 1).

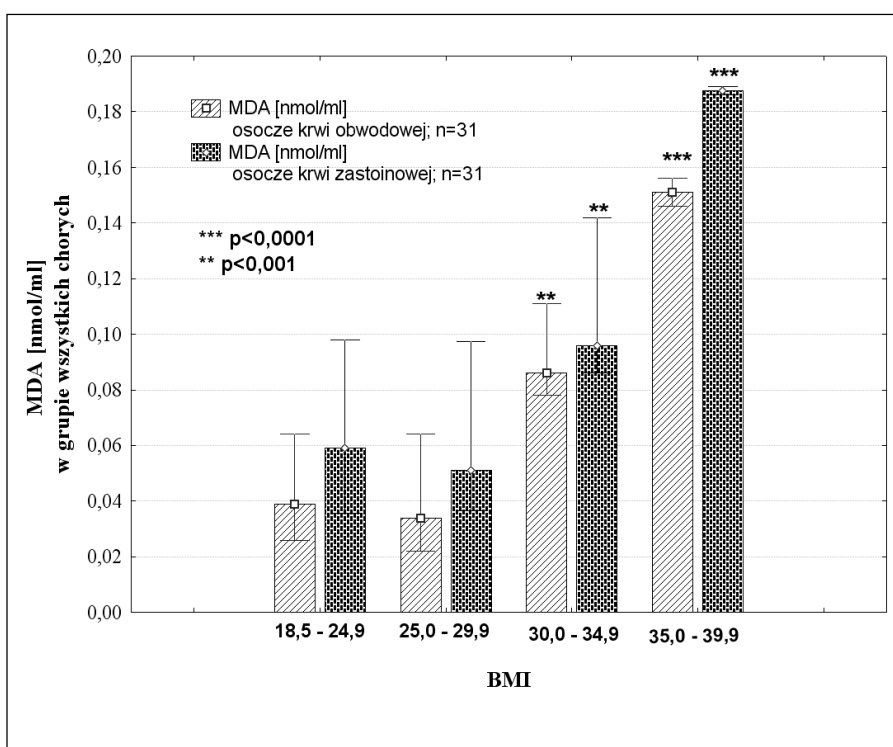
Zauważyliśmy także, że indeks masy ciała (BMI) oddziałuje na proces peroksydacji lipidów u chorych. BMI dobrze koreluje ze zwiększonym stężeniem MDA w osoczu krwi 31 pacjentów. Wykazano, że stężenie MDA było wyższe u pacjentów z otyłością niż pozostałych nie wykazujących otyłości. Różnice te były znamienne statystycznie ($p \leq 0,001$) (rycina 2).



Rycina 1
Porównanie wartości MDA w osoczu krwi obwodowej oraz w osoczu krwi zastoinowej z żyłaka w grupie chorych na PChŻ.
 Comparison of MDA values from peripheral blood plasma as well as in blood plasma from venous blood of varicose veins in patients with CVD.



Rycina 2
Porównanie wartości MDA w osoczu krwi obwodowej chorych oraz w osoczu krwi obwodowej zdrowych ochotników.
 Comparison of MDA values from peripheral blood plasma in patients with CVD and peripheral blood plasma of healthy volunteers.



Rycina 3
BMI oddziałuje na stężenie MDA w osoczu krwi obwodowej i żyłkowej chorych. Różnice te są znamienne statystycznie ($p < 0,001$).
 BMI influences the MDA concentration in peripheral blood plasma and varicose vein blood of patients. These values are statistically significant ($p < 0,001$)

Dyskusja

W przedstawionej pracy zaprezentowano różne poziomy nasilenia stresu oksydacyjnego pomiędzy próbkami osocza krwi pobranej z żyły powierzchownej przedramienia a krwią zastoinową z żyłaków kończyn dolnych u pacjentów z otyłością, cierpiących na przewlekłą chorobę żylną PChŻ.

Wykazano dominującą rolę oznaczania utleniania lipidów jako wskaźnika dysfunkcji śródbłonna oraz stresu oksydacyjnego u pacjentów z I i II stopniem otyłości, cierpiących na przewlekłą chorobę żylną. Przedstawione badania sugerują że poziomy wolnych rodników oraz prowokowane przez nie utlenianie lipidów zależy nie tylko od okolicy ciała, ale też od nasilenia stopnia otyłości w grupie osób chorych na PChŻ.

Znaczenie procesów oksydacyjnych jest niebagatelne. Ich możliwe skuteczne ograniczenie poparte monitorowaniem statusu antyoksydacyjnego może mieć niemałe znaczenie kliniczne, nie tylko w rozwoju samej przewlekłej choroby żyłnej, ale także i przede wszystkim jej powikłań tj.: nadciśnienia żylnego czy owrzodzeń żylnych.

Jak donoszą badania, zdecydowana terapia chorób sercowo-naczyniowych, jak najwcześniej zdiagnozowanych będzie odnosić korzyści, na drodze wyciszenia procesów rodnikogenyzy i zapalnych [8,25]. Ma to znaczenie zwłaszcza poprzez utrzymywanie stanu równowagi oksydacyjnej nie tylko we wczesnych fazach przewlekłej choroby żyłnej lecz także jej powikłaniach, gdyż duże wahania poziomu wolnych rodników są szczególnie niebezpieczne, nawet jeśli zmiany kliniczne są dobrze kontrolowane.

W przeprowadzonych badaniach zaobserwowano różnicę istotną statystycznie w stężeniu MDA pomiędzy osoczem krwi zastoinowej pochodzącej z żyłaków a osoczem krwi obwodowej, gdzie ten poziom był znacznie niższy. Wzrost stężenia MDA zarówno w osoczu krwi obwodowej jak i zastoinowej zachowywał się wprost proporcjonalnie w stosunku do wzrostu wskaźnika BMI u osób chorych na PChŻ. Najwyższy poziom MDA i najwyższy wskaźnik BMI zaobserwowano w osoczu krwi zastoinowej z żyłaków. W grupie zdrowych ochotników stwierdzono istotnie niższą wartość MDA w osoczu krwi obwodowej pochodzącej z żyły przedramienia, w porównaniu z grupą osób chorych, gdzie poziom MDA w osoczu krwi obwodowej był wyższy.

Yeoch Ellerton i Stacey badając zachowanie się jednego z produktów utleniania lipidów – 8 izoprostanu [37], dokonywali pomiarów stężeń tego związku testem ELISA oraz metodą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią masową. Mierzili oni również całkowitą ilość antyoksydantów badając proces utleniania specyficznego substratu. Izoprostan są cząsteczkami podobnymi do prostaglandyn powstałymi w wyniku utleniania nienasyconych kwasów tłuszczowych w błonach fosfolipidowych. Poziom 8-izoprostanu w materiale pobranym z niewydolnych naczyń żylnych był znacząco podwyższony względem naczyń niezmiennych w badaniu USG, uchodzących za wydolne, co sugerowało nasilenie procesu peroksydacji lipidów w zmienionych naczyniach żylnych.

Odmienne wyniki dotyczące poziomu malonyldialdehydu MDA uzyskano w innych pracach. W przypadku badań A. Yasim, M. Kilinc, M. Aral, H. Oksuz, M. Kabalcı, E. Eroglu i S. Imrek zwrócono uwagę, iż poziom malonyldialdehydu w osoczu krwi żyłnej pobranej z żyły przedramienia osób chorych na żyłaki kończyn dolnych nie różnił się od poziomu MDA w osoczu krwi żyłnej zdrowych ochotników [36]. Najprawdopodobniej było to związane ze sposobem, w jaki pobierano materiał do badania a następnie jego przechowywaniem. Zarówno w jednym jak i drugim przypadku krew pobierana była z żyły przedramienia po wytworzeniu miejscowej stazy. Wyższe poziomy MDA uzyskane przez powyższych autorów mogą być związane ze zbyt długim okresem przechowywania próbek krwi bez dodatku BHT, który ogranicza w sposób istotny nasilający się proces peroksydacji lipidów a także stosowaniem metody (spektrofotometryczna) o mniejszej czułości niż metoda fluorometryczna stosowana w naszych badaniach.

Podobne wyniki uzyskali także Jacob i wsp. [18], którzy nie znaleźli różnic istotnych statystycznie w poziomie malonyldialdehydu (MDA) pomiędzy osoczem krwi pochodzącej z żyły przedramienia a krwią pobraną z kończyn dolnych pacjentów cierpiących na żyłaki kończyn dolnych. Wyniki te sugerowałyby, iż zaburzenia równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej występujące lokalnie w chorych kończynach pozostają bez wpływu na krążenie systemowe.

Jest jednak powszechnie wiadome, iż wysoki poziom wolnych rodników dotyczy zmian lokalnych związanych ze zmianami w naczyniach żylnych chorych kończyn, co potwierdzone zostało w naszych badaniach a znalazło także odbicie w pracach innych autorów. Flore i wsp. [13] zwrócili uwagę na wyższy poziom wolnych rodników tlenowych w próbkach krwi pobranej z kończyn dolnych pacjentów chorych na żyłaki w porównaniu do grupy kontrolnej zdrowych ochotników.

Poczynione obserwacje korelują z obserwacjami przedstawionymi w literaturze światowej. Badacze zwracają uwagę na kluczową rolę stanu zapalnego jako mechanizmu odpowiedzialnego za postęp przewlekłej choroby żyłnej i występowanie jej objawów [21,24,27]. W licznych pracach udowodniono wzrost stężenia markerów aktywacji śródbłonna naczyń żylnych i leukocytów w przebiegu PChŻ [3,9,10,16]. Interakcji leukocytów z endoteliem, w wyniku której powstają toksyczne metabolity m.in. MDA [25] sprzyja zwolniony przepływ żylny [12]. Mahmoud A. Wali, Suleiman A. stwierdzili, nasilony proces peroksydacji lipidów, wyrażony zwiększonym stężeniem malonyldialdehydu w niedotlenionych naczyniach żylnych, w miejscu niewydolnych zastawek żylnych w porównaniu do naczyń niezmiennych procesem zapalnym, co znajduje również potwierdzenie w wynikach uzyskanych przez nas. Tryankina S.A., Kolobova O.I. oraz Varshavsky B. Ya. zwrócili uwagę na zmniejszenie puli antyoksydantów osoczowych a także nasilony proces peroksydacji lipidów u chorych z żyłakami kończyn dolnych w porównaniu do grupy osób zdrowych [32]. Badania te dowodzą jak silnie

stres oksydacyjny osłabił mechanizmy obrony przeciwrodnikowej [33] u chorych na PChŻ.

Uzyskane wyniki potwierdziły tezę, że pacjenci cierpiący na PChŻ znajdują się w stanie stresu oksydacyjnego. Nasila się peroksydacja lipidów mierzona stężeniem MDA. Ekspozycja śródbłonna naczyń żylnych na wysokie stężenia wolnych rodników może prowadzić do progresji i powikłań przewlekłej choroby żyłnej.

Wnioski

1. Przewlekła choroba żylna przebiega ze znacznie nasilonym stresem oksydacyjnym mierzonym poziomem stężenia MDA w osoczu krwi.

2. Pomiar stężenia MDA może stanowić użyteczny marker określający ryzyko zmian naczyniowych u pacjentów z przewlekłą chorobą żylną.

3. Otyłość zwiększa ryzyko peroksydacji lipidów oraz wpływa na postępujący stres oksydacyjny w grupie chorych z objawami przewlekłej choroby żyłnej.

Piśmiennictwo

1. Arnold T., Michiels C., Remacle J.: Hypoxic human umbilical veins endothelial cells induce activation of adherent polymorphonuclear leukocytes. *Blood* 1994, 83, 3705.
2. Beebe-Dimmer Jennifer L., Pfeifer John R. et al.: The Epidemiology of Chronic Venous Insufficiency and Varicose Veins. *Ann.f Epidemiol.* 2005, 15, 175.
3. Bergan J.: Molecular mechanisms in chronic venous insufficiency. *Ann. Vasc. Surg.* 2007, 21, 260.
4. Bertrand C., Batt A.M.: Cytochromes P450, vascular tone varicosis. *Ann. Pharm. Fr.* 2003, 61, 234.
5. Bjork J., Del Maestro R. F., Arfors K. E.: Evidence for participation of hydroxyl radical in increased microvascular permeability. *Agent Action Suppl.* 1980, 7, 208.
6. Buege J.A., Aust S.D.: Lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978, 51, 302.
7. Carpentier P.H.: Role of leukocytes in the pathogenesis of trophic venous disorders. *J. Mal. Vasc.* 1998, 23, 27476.
8. Chu Y., Iida S., Lund D.D.: Gene transfer of extracellular superoxide dismutase reduces arterial pressure in spontaneously hypertensive rats: role of heparin binding domain. *Circ. Res.* 2003, 92, 461.
9. Coleridge P. - Smith: Neutrophil activation and mediators of inflammation in chronic venous insufficiency. *J. Vasc. Res.* 1999, 36 (Suppl.1), 24.
10. Coleridge P.- Smith: Treatment of microcirculation disorders in venous leg ulcer. *Prog. Apply Microcirc.* 1999, 121.
11. Czech A., Bernas M., Taton J.: Serowo-naczyniowe objawy otyłości. *Endokrynologia, Otyłość i Zaburzenia Przemiany Materii* 2007, 3, 85.
12. Danielsson G. et al.: Flavonoid treatment in patients with healed venous ulcer: flow cytometry analysis suggests increased CD11b expression on neutrophil granulocytes in the circulation. *Vasc. Med.* 2003, 8, 83.
13. Flore R., Santoliquido A., Antonio D.L. et al.: Long saphenous vein stripping reduces local level of reactive oxygen metabolites in patients with varicose disease of the lower limbs. *World J. Surg.* 2003, 27, 473.
14. Freedman David S., Kettel Khan L., Serdula Mary K. et al.: Trends and Correlates of Class 3 Obesity in the United States From 1990 Through 2000. *JAMA* 2002, 288, 1723.
15. Gandhi R. H., Irizarry E., Nackman G. B. et al.: Analysis of the connective tissue matrix and proteolytic activity of primary varicose veins. *J. Vasc. Surg.* 1993, 18, 814.
16. Glowinski J., Glowinski S.: Generation of reactive oxygen metabolite by the varicose vein wall. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 2002, 23, 550.
17. Helliwell B.: Antioxidants in human health and disease. *Ann. Rev. Nutr.* 1996, 16, 33.
18. Jacob M.P., Cazaubon M., Scemama A. et al.:

- Plasma matrix metalloproteinase-9 as a marker of blood stasis in varicose veins. *Circulation* 2002, 106, 535.
19. **Kopelman P.G.:** Obesity as a medical problem *NATURE* 2000, 404, 635.
 20. **Le Devehat C., Boisseu M., Vimeux M. et al.:** Hemorheological factors in the pathophysiology of venous disease. *Clin. Hemorheol.* 1989, 9, 861.
 21. **Mastej K., Gacka M., Adamiec R.:** Usefulness evaluation endothelial markers of immuno - inflammatory activity in prognosis venous leg ulcer. *Przegl. Flebol.* 2005, 13, 3.
 22. **Meier B.:** Superoxide generation of phagocytes and nonphagocytic cells. *Protoplasma* 2001, 217, 117.
 23. **Michiels C., Arnould T., Remacle J.:** Hypoxia-induced activation of endothelial cells as possible cause of venous disease: hypothesis. *Angiology* 1993, 44, 639.
 24. **Nicolaidis A.:** Chronic venous disease and leukocyte - endothelium interaction: from symptoms to ulceration. *Angiology* 2005, 56, 11.
 25. **Rojas A.I., Phillips T.J.:** Patients with chronic leg ulcers show diminished levels of vitamins A and E, carotenes and zinc. *Dermatol. Surg.* 1999, 25, 601.
 26. **Sabaaway H.E., Zhang F., Nguyen X.:** Human heme oxygenase-1 gene transfer lowers blood pressure and promotes growth in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2001, 38, 210.
 27. **Saharay M., Shields D.A., Porter J.B et al.:** Leukocyte activity in the microcirculation of the leg in patients with chronic venous disease. *J. Vasc. Surg.* 1997, 25, 265.
 28. **Smith P.D.:** Neutrophil activation and mediators of inflammation of chronic venous insufficiency. *J. Vasc. Res.* 1999, 36, (Suppl. II), 24.
 29. **Stvrtinova V., Ferencikova J.:** Lysosomal enzymes and superoxide production in polymorphonuclear leukocytes of patients with primary varicose veins. *Cor Vasa* 1992, 34, 255.
 30. **Takase S., Lerond L., Bergan J. J. et al.:** The inflammatory reaction during venous hypertension in the rat. *Microcirculation* 2000, 7, 41.
 31. **Thomas P. R., Nash G. B., Dormandy J. A.:** White cell accumulation in dependent legs of patients with venous hypertension: a possible mechanism for trophic changes in the skin. *Brit. Med. J.* 1998, 296, 1693.
 32. **Tryankina S.A., Kolobova O.I., Varshavsky B.Y.:** Lipid peroxidation in pathogenesis of varix dilatation. *Klin. Diagn. Lab.* 2003, 6, 19.
 33. **Wlasczek M., Scharffetter-Kochanek K.:** Oxidative stress in chronic vein leg ulcers. *Wound Rep. Reg.* 2005, 13, 452.
 34. **World Health Organization Expert Committee. Physical Status:** The Use and Interpretation of Anthropometry, WHO Tech. Rep. Ser. no. 854 (World Health Organization, Geneva, 1995).
 35. **World Health Organization. Obesity:** Preventing and Managing the Global Epidemic (World Health Organization, Geneva, 1997).
 36. **Yasim A., Kilinc M., Aral M. et al.:** Serum concentration of rocoagulant, endothelial and oxidative stress markers in early primary varicose veins *Phlebology* 2008, 23,15.
 37. **Yeoh-Ellerton S., Stacey M.C.:** Iron and 8-isoprostane levels in acute and chronic wounds. *J. Invest. Dermatol.* 2003, 121, 918.