

UNIWERSYTET PRZYRODNICZY w LUBLINIE

Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Dyscyplina naukowa Weterynaria

lek. wet. Paulina Gawin

Rozprawa doktorska

**Badania porównawcze stężenia kolagenu 1, 3, 4 oraz metaloproteinaz 2 i 9 w surowicy
krwi świń z wadą przepukliny pachwinowej.**

Ph.D. thesis title

*Comparative study of the concentration of collagen types 1, 3, and 4 and metalloproteinases 2
and 9 in the blood serum of pigs with inguinal hernia defect.*

Rozprawa doktorska wykonana w Katedrze i Klinice Chirurgii Zwierząt

Promotor: dr hab. Adam Brodzki, prof. uczelni

Lublin, rok 2024

Składam serdeczne podziękowania

*Panu dr hab. Adamowi Brodzkiemu, prof. uczelni,
mojemu promotorowi za wyrozumiałość, pomoc i
zaangażowanie, w trakcie powstania tej pracy.*

*Dziękuję również mojej rodzinie za nieustanne wsparcie i
motywację.*

*Panu lek. wet. Wojciechowi Łużyńskiemu, mgr inż.
Karolinie Skarżyńskiej oraz Panu Waldemarowi
Kuklińskiemu dziękuję za życzliwość i pomoc podczas
realizacji projektu.*

*Serdecznie dziękuję, wszystkim tym, dzięki którym
napisanie tej pracy stało się faktem.*

Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data 08.11.2024r.

Podpis promotora

Adam Brodziński

Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Świadom/a odpowiedzialności prawnej oświadczam, że:

- niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana przez mnie samodzielnie pod kierunkiem Promotora/Promotorów/Promotora pomocniczego* i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.
- przedstawiona rozprawa doktorska nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego.
- niniejsza wersja rozprawy doktorskiej jest tożsama z załączoną na płycie CD/pendrive wersją elektroniczną.

Data 08.11.2024r.

Podpis autora

Paulina Gawin

* niepotrzebne skreślić

Spis treści

1. Streszczenie i słowa kluczowe	3
2. Streszczenie i słowa kluczowe w języku angielskim.....	4
3. Wykaz skrótów	5
4. Wstęp	7
4.1. Przepukliny	7
4.2. Techniki operacyjne przepuklin.....	13
4.3. Macierz pozakomórkowa.....	14
4.4. Kolagen (COL).....	15
4.5. Metaloproteinazy (MMP).....	19
5. Hipoteza i cel pracy	23
6. Materiały i metody	24
6.1. Materiały	24
6.2. Metody.....	25
6.3. Statystyka	30
7. Omówienie wyników badań i dyskusja	36
7.1. Wyniki	36
7.1.1. Stężenie kolagenu I w surowicy świńskiej grupy z wadą przepukliny, a grupą kontrolną	36
7.1.2. Stężenie kolagenu III w surowicy świńskiej grupy z wadą przepukliny, a grupą kontrolną	41
7.1.3. Stężenie kolagenu IV w surowicy świńskiej grupy z wadą przepukliny, a grupą kontrolną	46

7.1.4. Stężenie metaloproteinazy 2 w surowicy świńskiej grupy z wadą przepukliny, a grupą kontrolną	50
7.1.5. Stężenie metaloproteinazy 9 w surowicy świńskiej grupy z wadą przepukliny, a grupą kontrolną	54
7.1.6. Porównanie wartości stosunków: COL1/COL3	57
7.1.7. Porównanie wartości stosunków: COL1/MMP2	60
7.1.8. Porównanie wartości stosunków: COL1/MMP9	63
7.1.9. Porównanie wartości stosunków: COL3/MMP2	68
7.1.10. Porównanie wartości stosunków: COL3/MMP9	71
7.1.11. Porównanie wartości stosunków: COL4/MMP2	76
7.1.12. Porównanie wartości stosunków: COL4/MMP9	79
7.1.13. Analiza korelacji pomiędzy COL1 a MMP2 w grupie kontrolnej i badanej...	82
7.1.14. Analiza korelacji pomiędzy COL3 a MMP2 w grupie kontrolnej i badanej...	83
7.1.15. Analiza korelacji pomiędzy COL4 a MMP2 w grupie kontrolnej i badanej...	84
7.1.16. Analiza korelacji pomiędzy COL1 a MMP9 w grupie kontrolnej i badanej...	85
7.1.17. Analiza korelacji pomiędzy COL3 a MMP9 w grupie kontrolnej i badanej...	86
7.1.18. Analiza korelacji pomiędzy COL4 a MMP9 w grupie kontrolnej i badanej...	87
7.2.. Dyskusja	88
8. Stwierdzenia i wnioski	97
9. Bibliografia	98

1. Streszczenie

Badanie przepuklin pachwinowych u świń koncentrowało się na analizie poziomów kolagenów typu I, III, IV oraz metaloproteinaz 2 i 9 (MMP-2 i MMP-9) w surowicy krwi w celu określenia ich związku z występowaniem przepukliny. Przepukliny pachwinowe są powszechnym problemem chirurgicznym, a ich patogeneza jest wieloczynnikowa. Zmieniony metabolizm kolagenu oraz metaloproteinaz (enzymów degradujących macierz zewnątrzkomórkową), może odgrywać istotną rolę w rozwoju tej wady.

W badaniu porównano dwie grupy świń: z przepukliną pachwinową oraz kontrolną bez przepukliny. Próbkę krwi analizowano pod kątem poziomów kolagenów typu I, III i IV oraz MMP-2 i MMP-9, wykorzystując testy ELISA. Wyniki wykazały istotne różnice w stężeniach kolagenów i metaloproteinaz między grupami. Kolagen typu I, który jest głównym składnikiem strukturalnym tkanek, był znacząco podwyższony u świń z przepukliną (mediana 40,86 ng/ml w porównaniu do 21,66 ng/ml w grupie kontrolnej). Kolagen typu III, również wykazywał podwyższony poziom w grupie badanej (2,83 ng/ml) w stosunku do grupy kontrolnej (2,05 ng/ml). Kolagen typu IV nie wykazywał istotnych różnic między obiema grupami. MMP-2, enzym odpowiedzialny za degradację kolagenu, był znacznie wyższy u świń z przepukliną, co sugeruje jego istotną rolę w rozwoju przepukliny. MMP-9 nie wykazała istotnych różnic między grupami, co sugeruje mniejsze lub brak znaczenia tego enzymu w mechanizmie powstawania przepuklin pachwinowych u świń.

Wnioski sugerują, że kolagen I, III oraz MMP-2 mogą być potencjalnymi biomarkerami przepukliny pachwinowej, a zmiany w poziomach tych białek mogą przyczyniać się do osłabienia struktury tkanki łącznej, prowadząc do przepukliny. Dalsze badania są niezbędne, aby lepiej zrozumieć złożone interakcje między kolagenami, MMP i innymi składnikami macierzy zewnątrzkomórkowej w kontekście przepuklin pachwinowych. Zrozumienie tych mechanizmów mogłoby prowadzić do opracowania bardziej precyzyjnych metod diagnostycznych oraz skuteczniejszych terapii przepuklin, co poprawiłoby opiekę nad pacjentami cierpiącymi na przepukliny i wpłynęło na dobre praktyki hodowlane.

Słowa kluczowe: przepuklina pachwinowa, świny, kolagen, metaloproteinazy, ELISA

2. Summary

The study of inguinal hernias in pigs focused on the analysis of levels collagens type I, III, and IV, and matrix metalloproteinases 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9) in blood serum, to determine their association with the occurrence of hernias. Inguinal hernias are a common surgical problem, and their pathogenesis is multifactorial. Altered collagen metabolism and matrix metalloproteinases (enzymes responsible for degrading the extracellular matrix) may play a significant role in the development of this defect.

The study compared two groups of pigs: with inguinal hernias and a control group without hernias. Blood samples were analyzed for type I, III, and IV collagens, as well as MMP-2 and MMP-9, using ELISA tests. The results showed significant differences in the levels of collagens and metalloproteinases between the groups. Type I collagen, the primary structural component of tissues, was significantly elevated in pigs with hernias (median 40,86 ng/ml compared to 21,66 ng/ml in the control group). Type III collagen also exhibited elevated levels in the study group (2,83 ng/ml) compared to the control group (2,05 ng/ml). Type IV collagen showed no significant differences between the two groups. MMP-2, the enzyme responsible for collagen degradation, was significantly higher in pigs with hernias, suggesting its critical role in hernia development. MMP-9 did not show significant differences between the groups, indicating a lesser or no role for this enzyme in the mechanism of inguinal hernias in pigs.

The conclusions suggest that collagen I, III, and MMP-2 may be potential biomarkers for inguinal hernia, and changes in the levels of these proteins may contribute to weakening of connective tissue structure, leading to hernias. Further studies are needed to better understand the complex interactions between collagens, MMPs, and other components of the extracellular matrix in the context of inguinal hernias. Understanding these mechanisms could lead to the development of more precise diagnostic methods and more effective hernia treatments, which would improve care for patients suffering from hernias and impact good breeding practices.

Keywords: inguinal hernia, swine, collagen, metalloproteinases, ELISA

3. Wykaz skrótów

ACAN (ang. Aggrecan gene) - gen agrekanu

AUC (ang. Area Under the Curve) – pole pod krzywą

CCBE1 (ang. Collagen and Calcium-Binding EGF Domain 1 gene) - gen kolagenu i wiążącej wapń domeny EGF 1

CL (ang. Confidence Interval) – przedział ufności

COL (ang. Collagen) - kolagen

COL11A2 (ang. Collagen Type XI Alpha 2 Chain gene) - gen kolagenu typu XI łańcuch alfa 2

COL1A1 (ang. Collagen Type I Alpha 1 Chain gene) - gen kolagenu typu I łańcuch alfa 1

COL1A2 (ang. Collagen Type I Alpha 2 Chain gene) - gen kolagenu typu I łańcuch alfa 2

COL3A1 (ang. Collagen Type III Alpha 1 Chain gene) - gen kolagenu typu III łańcuch alfa 1

COL6A5 (ang. Collagen Type VI Alpha 5 Chain gene) - gen kolagenu typu VI łańcuch alfa 5

CTSW (ang. Cathepsin W gene) - gen katepsyny W

ECM (ang. Extracellular Matrix) - macierz zewnątrzkomórkowa

ELISA (ang. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) - test immunoenzymatyczny

EPYC (ang. Epiphycan gene) - gen epifikanu

FACIT (ang. Fibril-Associated Collagens with Interrupted Triple Helices) - kolageny związane z fibrylami z przerwanyimi potrójnymi helisami

FAS (ang. Fas Ligand (TNF)) - Ligand Fas (TNF)

FCR (ang. Feed Conversion Ratio) - wskaźnik konwersji paszy

FN (ang. False Negative) - liczba fałszywie negatywnych wyników

FP (ang. False Positive) - liczba fałszywie pozytywnych wyników

GERD (ang. Gastroesophageal Reflux Disease) - choroba refluksowa przełyku

Gly (ang. Glycine) – glicyna

GPI (ang. glycosylphosphatidylinositol) - glikofosfatydyloinozytol

HRP (ang. Horseradish Peroxidase) - peroksydaza chrzanowa

Krzywa ROC (ang. Receiver Operating Characteristic) – krzywa operacyjno-charakterystyczna odbiornika

LGALS3 (ang. Galectin 3 gene) - gen galektyny 3

MMP (ang. Matrix Metalloproteinases) - metaloproteinazy macierzy

mRNA (ang. Messenger RNA) - matrycowe RNA

OD (ang. Optical Density) - gęstość optyczna

p (ang. Probability) - prawdopodobieństwo

PH (ang. Parastomal Hernia) – przepuklina okołostomijna

PPII (ang. Polyproline II helix) - helisa poliproliny II

RNA (ang. Ribonucleic Acid) - kwas rybonukleinowy

S100A4 (ang. S100 Calcium Binding Protein A4 gene) - gen białka wiążącego wapń
S100A4

SDS (ang. Sodium Dodecyl Sulfate) - laurylosiarczan sodu

SPINT1 (ang. Serine Peptidase Inhibitor Kunitz Type 1 gene) - gen inhibitora peptydazy serynowej typu Kunitza 1

TIMP (ang. Tissue Inhibitor of Metalloproteinases) - tkankowy inhibitor metaloproteinaz

TMB (ang. Tetramethylbenzidine) – tetrametylobenzydyna

TN (ang. True Negative) - liczba prawdziwie negatywnych wyników

TNF (ang. Tumor Necrosis Factor) - czynnik martwicy nowotworów

TP (ang. True Positive) - liczba prawdziwie pozytywnych wyników

VEGF (ang. Vascular Endothelial Growth Factor) - czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego

VIT (ang. vitronectin gene) – gen witronektyny

4. Wstęp

Przepukliny, to jedno z najczęściej występujących schorzeń układu pokarmowego w chirurgii ogólnej zarówno u ludzi jak i zwierząt, w tym również u świń. Występowanie przepuklin stanowi poważny problem w dużych jak i małych gospodarstwach. Są to jedne z najczęściej występujących wad wrodzonych u trzody chlewnej stanowiące duże wyzwanie dla lekarzy weterynarii i hodowców. Pojawienie się przepuklin w stadzie to poważne zaburzenie dobrostanu zwierząt i wzrost kosztów produkcji.

W rzeczywistości zwierzęta obciążone tymi wadami wykazują obniżoną wydajność produkcyjną jako zwierzę hodowlane. Wykazują gorszy przyrost. Nie są w stanie efektywnie się odżywiać. Wpływa to na wzrost kosztów paszy na sztukę czyli tzw. wzrost FCR (konwersja paszy na kilogram przyrostu), słabą klasę mięsności, która również ma wpływ na straty finansowe hodowcy oraz wzrost śmiertelności. Takie zwierzęta wymagają większej opieki weterynaryjnej niż zdrowe, co również stanowi dodatkowe obciążenie finansowe dla producentów. Na ww. czynniki ma również wpływ ból i dyskomfort, które stanowią poważne zaburzenie dobrostanu zwierzęcia (1, 2).

Zwierzęta z przepuklinami wymagają specjalistycznej, najczęściej chirurgicznej interwencji weterynaryjnej, gdyż wykazują gorsze przyrosty (wzrost FCR – konwersja paszy na kilogram przyrostu). Zaniechanie leczenia operacyjnego wpływa na słabą klasę mięsności i grozi także powikłaniami z zejściem śmiertelnym włącznie. Chore zwierzęta cierpią, co wpływa na brak dobrostanu. Powyższe czynniki mają decydujące znaczenie w opłacalności hodowli.

4.1. Przepukliny

Przepukliny należą do najczęstszych chorób w chirurgii, są ciągle przedmiotem badań. Istnieje wiele rodzajów przepuklin, których poznanie na podstawie anatomii szczegółowej i morfologii pozwala na pewniejsze rozpoznanie i określenie zasad postępowania (3). Operacje przepuklin są często przeprowadzanym zabiegiem wykonywanym przez lekarzy opiekujących się fermami (4).

Przepukliny powstają w wyniku patologicznego podskórnego uwypuklenia się narządów jamy brzusznej przez wrodzone lub nabyte przerwanie ciągłości wewnętrznych powłok ściany brzucha, czyli tkanki łącznej i mięśniowej.

W skład każdej przepukliny wchodzi 3 elementy (5) :

- pierścień przepuklinowy - to szczelina, np. w ścianie brzucha, którą tworzą różne warstwy tkanek, takie jak mięśnie, ścięgna, tkanka bliznowata itp. Lokalizacja tej szczeliny decyduje o tym, jak przepuklina jest określana, np. przepuklina pachwinowa, pępkowa, pooperacyjna, przeponowa (w okolicy przepony), pourazowa.

- worek przepuklinowy - zbudowany z otrzewnej wystający przez pierścień przepuklinowy. Na zewnątrz worek przepuklinowy otoczony jest podskórną tkanką tłuszczową i skórą. Warstwy te nazywane są pokryciem przepukliny.

- treść przepukliny - która może składać się z pętli jelit, sieci, żołądka, macicy lub pozostałych narządów jamy brzusznej. Worek przepuklinowy zawiera zazwyczaj płyn zwany wodą przepuklinową, (płyn otrzewnowy) sprzyjający przesuwaniu się zawartości przepukliny (5, 6).

Ze względu na położenie przepukliny rozróżnia się:

- przepukliny pępkowe
- przepukliny pachwinowe
- przepukliny mosznowe
- przepukliny brzuszne
- przepukliny otrzewnowe
- przepukliny przeponowe (5)

U ludzi, przepukliny dzieli się na:

- przepukliny nadbrzusne występujące w obszarze powyżej pępka i poniżej klatki piersiowej. Powodem jest osłabienie ściany brzucha, co umożliwia wypychanie tkanki tłuszczowej. Przepukliny nadbrzusza są bardziej powszechne u dorosłych. W większości przypadków są obecne od urodzenia, ale mogą również pojawić się w późniejszym okresie życia (7).

- przepukliny udowe powstają tuż poniżej więzadła pachwinowego, gdy zawartość jamy brzusznej przechodzi przez naturalnie występujące osłabienia w ścianie brzucha, nazywane kanałem udowym. Przepuklina ta może manifestować się jako mały lub średniej wielkości elastyczny, odprowadzalny twór w pachwinie. Przepukliny udowe mogą występować zarówno u kobiet jak i mężczyzn, z czego u kobiet występują 10 razy częściej (8).

- przepukliny rozworu przełykowego to rodzaj przepukliny, w której narządy jamy brzusznej, zwykle żołądek, wsuwają się przez przeponę do śródpiersia. Może to prowadzić do choroby refluksowej przełyku (GERD), objawiających się takimi dolegliwościami jak kwasowy smak w ustach lub zgaga. Najczęstszymi przyczynami tej przepukliny są otyłość oraz starszy wiek (9).

- przepukliny pooperacyjne dotyczą przepukliny ściany brzucha w miejscu wcześniejszego nacięcia chirurgicznego. Przepukliny pooperacyjne w środkowej części są bardziej powszechne niż w innych miejscach (10) i często występują po operacjach żołądka. Jeżeli rana powłok brzusznych nie wygoi się całkowicie, pacjent może być podatny na rozwój przepukliny (11).

Przepuklina pachwinowa jest tworem w warstwie mięśniowej mięśnia skośnego i poprzecznego brzucha, który umożliwia przejście narządów wewnątrzbrzusznych lub pozaotrzewnowych przez kanał pachwinowy (12). U ludzi przepuklina pachwinowa, czyli przemieszczenie zawartości jamy brzusznej przez kanał pachwinowy, występuje częściej po prawej stronie niż po lewej (11). Kanał pachwinowy jest krótkim przejściem, które rozciąga się w kierunku dolnym i przyśrodkowym przez dolną część ściany brzucha. Jest on położony wyżej i równoległe do więzadła pachwinowego. Kanał pachwinowy pełni rolę drogi, przez którą struktury mogą przemieszczać się z wnętrza jamy brzusznej do narządów płciowych zewnętrznych. Jednakże, obecność kanału pachwinowego może spowodować osłabienie ściany brzucha i zwiększyć ryzyko wystąpienia przepukliny (13). Kanał pachwinowy przebiega skośnie pomiędzy pierścieniami pachwinowym zewnętrznym i wewnętrznym. Jego przednią ścianę tworzy ścięgno mięśnia skośnego zewnętrznego, a tylną więzadło pachwinowe i ścięgno mięśnia pachwinowego. Dzięki skośnemu kierunkowi kanału pachwinowego możliwe jest dopasowanie ściany przedniej i tylnej przy wzroście ciśnienia wewnątrzbrzuszego (14).

Przepukliny ściany brzucha powstają w wyniku utraty struktury i funkcji w warstwie nośnej mięśni, ścięgien i powięzi. Mogą mieć charakter pierwotny, gdy patologia dotyczy powięzi lub wtórny kiedy patologia wynika z niewydolności rany chirurgicznej. W obu przypadkach dochodzi do defektów komórkowych i zewnątrzkomórkowych macierzy molekularnej (15). W przypadku wtórnej patologii powięzi dochodzi do uszkodzenia rany po laparotomii, a płaszczyzny powięziowe zastępowane są tkanką bliznowatą, a każda próba naprawy zwiększa szansę nawrotu przepukliny pachwinowej (16, 17). Badania wykazały, że

blizny pochodzące od pacjentów z przepukliną pachwinową mogą wykazywać zaburzenia w funkcjonowaniu fibroblastów i kolagenu rany (18). Możliwe jest, że przewlekłe obciążenie wywołuje patologiczne zmiany w funkcji strukturalnej tkanki, komórkowej i molekularnej, bez uprzedniego defektu biologicznego (19). Nieduże przepukliny stanowią potencjalny problem, ale nie trudność jeżeli chodzi o funkcjonowanie osobnika lub powikłania po zabiegu. Duży problem stanowią konsekwencje występowania takiej przepukliny, czyli uwięzienie pętli jelit w przepuklinie, która w niektórych przypadkach może zostać ściśnięta i odcięta od dopływu krwi z możliwością perforacji ściany jelita. Jeżeli dojdzie do perforacji może to spowodować zapalenie otrzewnej. Tego typu przypadki są nagłymi przypadkami chirurgicznymi, które mogą zagrażać życiu (20).

Na powstawanie przepuklin mają wpływ czynniki zarówno genetyczne jak i środowiskowe. Szacuje się, że przepukliny pępkowe stanowią od 0,4% do 1,2% u świń (1,21,22) z szacowaną odziedziczalnością na poziomie 0,25 (23). Przepukliny mosznowe występują z częstością pomiędzy 0,5%, a 1,5% z szacowaną odziedziczalnością 0,3 u różnych ras (21, 24, 25).

Jednym z czynników mających wpływ na powstawanie przepuklin pępkowych mają geny recesywne o pełnej penetracji oraz geny dominujące o niepełnej penetracji, jednak mechanizm ich transmisji jest słabo poznany (26-29).

Z sekwencjonowanego RNA z tkanki pępowinowej wykazano kilkadziesiąt ważnych procesów biologicznych, które mogą mieć wpływ na powstawanie przepuklin pępkowych, z czego najważniejszymi i najsilniejszymi kandydatami są geny kodujące m.in. MMP i COL mające wpływ na przebudowę macierzy pozakomórkowej oraz biorące udział w produkcji, integralności i odporności kolagenu (30).

Sugeruje się dziedziczny wpływ na powstawanie przepuklin pępkowych, a Zhao i wsp. (31) wykazali w swoich badaniach, że niektóre specyficzne geny są powiązane z tym schorzeniem, jednak nie mają one kompletnej nad tym kontroli (32).

W przypadku powstawania przepuklin pępkowych prawdopodobnie istnieje duża korelacja między czynnikami genetycznymi, a środowiskowymi (32). W rzeczywistości wpływ na wystąpienie przepukliny pępkowej mają czynniki środowiskowe zakłócające zamknięcie pępowiny (33).

Na rozwój przepukliny pępkowej mogą mieć wpływ takie czynniki zewnętrzne jak wysokie ciśnienie w jamie brzusznej, niewłaściwe usunięcie pępowiny, infekcje pępowiny czy zarządzanie stadem. Zaobserwowano, że spokrewnione zwierzęta zarządzane w ten sam sposób prezentują różne fenotypy, tzn. część osobników była zdrowa, a część była dotknięta przepukliną (34). Wskazuje to, że na występowanie przepuklin pępkowych mają geny i czynniki zewnętrzne (35).

W przypadku przepuklin mosznowych i pachwinowych; mosznowa występuje tylko w przypadku płci męskiej, z czego przepuklina mosznowa lewostronna występuje częściej (36,37). Pachwinowa jest skorelowana z obiema płciami. Tylko na podstawie badania klinicznego możliwe jest rozróżnienie przepukliny pachwinowej i mosznowej.

Wpływ na powstawanie przepuklin mosznowych i pachwinowych mają nie tylko czynniki środowiskowe, ale również genetyczne z udziałem wielu genów i prawdopodobnie o niepełnej penetracji, choć mechanizm dziedziczenia nie został do dziś do końca poznany (37-39). U ludzi stwierdzono wysoki współczynnik segregacji, czyli dziedziczenia autosomalnego dominującego z niepełną penetracją i wpływ płci. Autorzy badania zauważyli preferencyjne przenoszenie genu choroby od ojca i zasugerowali rolę imprintingu genomowego w etiologii powstawania przepuklin u ludzi (40).

Kanał pachwinowy jest krótkim przejściem przebiegającym w dolnej części wewnętrznej ściany jamy brzusznej. Jego funkcją jest umożliwienie migracji jąder do moszny. Jądra powstają w okresie życia płodowego i rozwijają się w okolicy lędźwiowej brzucha, w drugim miesiącu ciąży zaczynają schodzić do worka mosznowego z przedniej ściany jamy brzusznej przez wyrostek pochwowy łac. processus vaginalis (uwypuklenie otrzewnej, które wnika do kanału pachwinowego pomagając w przesuwaniu się jąder do moszny) i siłę napędową generowaną przez mięśnie pochodzące z jądrovodu (łac. gubernakulum), czyli więzadła łączącego jądra i mosznę. Proces zstępowania jąder do moszny kończy się tuż przed porodem lub zaraz po nim, gdy przebiega on prawidłowo pierścień i kanał pachwinowy zmniejsza swoją średnicę, a wyrostek pochwowy ulega częściowemu zarośnięciu, dzięki czemu jądra pozostają na stałe w worku mosznowym. Etiologia powstawania przepuklin pachwinowych i mosznowych wciąż nie jest wyjaśniona. Niektórzy sugerują, że jedną z przyczyn powstawania przepuklin pachwinowych i mosznowych jest nieprawidłowa obliteracja wyrostka pochwowego po zejściu jąder lub nieprawidłowa involucja wewnętrznego pierścienia pachwinowego, który nie zamknął się

prawidłowo po zejściu jąder do moszny (41-44). Inni sugerują, że przyczyną powstawania przepuklin pachwinowych może być nieprawidłowo szeroki kanał pachwinowy powstały poprzez niefizjologiczne rozciągnięcie go przez pęczniejące gubernakulum, akumulację hialuronanu lub przez upośledzoną jego degradację. Są to czynniki predysponujące do powstania przepukliny pachwinowej podczas lub zaraz po zejściu jąder (43). Upośledzone unerwienie działające na okolicę pachwiny (45,46) lub niska odporność tego miejsca (47) wynikająca z zaburzeń metabolizmu i hydrolizy składników macierzy pozakomórkowej (kolagen, struktury włókien mięśniowych) (48) mających wpływ na upośledzenie naprawy tkanki łącznej (49), również mogą przyczyniać się do powstawania przepuklin.

Opisany wyżej mechanizm opisuje powstawanie przepuklin pachwinowych pośrednich, gdzie przepuklina przechodzi przez wewnętrzny pierścień pachwinowy, w dół kanału pachwinowego wychodząc przez zewnętrzny kanał pachwinowy (50). Wyróżniamy również przepukliny pachwinowe bezpośrednie, które przeważnie dotyczą mężczyzn (51). Przepuklina ta wychodzi przez osłabione miejsce w ścianie brzucha, w pobliżu dołu pachwinowego przyśrodkowego, w obrębie regionu anatomicznego zwanego trójkątem Hesselbacha, który jest określony przez boczny brzeg mięśnia prostego brzucha, więzadła pachwinowego i tętnicę nadbrzuszną dolną (50).

Gdy u pacjenta rozwija się jednocześnie przepuklina pachwinowa pośrednia i bezpośrednia nazywamy taką przepuklinę przepukliną pantolonową (52).

W przypadku czynników środowiskowych w mechanizmie powstawania przepuklin ogromny wpływ ma powstawanie tej wady ma zarządzanie stadem, zwłaszcza na etapie porodu prosiąt, np. nadmierne rozciągnięcie prosięcia, a co za tym idzie naprężenie pępownicy. W przypadku krwotoków z pępownicy przy zakładaniu opaski uciskowej ważna jest również odległość od skóry, ponieważ zbyt bliskie założenie opaski może powodować nadmierne naprężenie i osłabienie okolicznych tkanek. Wszelkie sytuacje, które będą prowadzić do gwałtownego i silnego wzrostu ciśnienia wewnątrzbrzusznego – zła defekacja, przeciskanie się zwierząt przez zbyt małe przejścia (między budynkami, do koryta itp.), walka o hierarchię, np. do sutka maciory (zbyt częste meblowanie prosiąt), przeganianie zwierząt (kotłowanie się zwierząt przy przejściach). Warunki środowiskowe to również zachowanie odpowiedniej temperatury na budynkach – zwierzęta mają tendencję do gromadzenia się w przypadku zbyt niskich temperatur. Zachowanie odpowiedniej higieny

na budynkach oraz stosowanie odpowiedniej dezynfekcji będzie prowadzić do zmniejszenia presji zakażeń pępowiny i zakażeń ogólnych bakteriami bytującymi w środowisku (53).

4.2. Techniki operacyjne przepuklin

Techniki naprawy przepuklin są proste, jednak największą skuteczność przeprowadzonego zabiegu obserwuje się w przypadku wykonywania zabiegu u młodych zwierząt. Nie zawsze jednak hodowca wcześniej zaobserwuje wszystkie sztuki obarczone taką wadą. Zabieg ten wykonany w starszym wieku może być obciążony dużymi komplikacjami zaczynając od zrostów, niedrożności jelit, martwicy czy nawet pęknięcia narządów. U świń o dużej masie ciała naprawa przepukliny jest trudniejsza ze względu na dłuższy pierścień pachwinowy z równoczesnym napięciem i osłabieniem mięśni ściany brzucha w okolicy przepukliny.

Przed zabiegiem ważne jest badanie kliniczne zwierzęcia i ustalenie, czy przepuklina jest jedno- czy dwustronna oraz sprawdzenie możliwości odprowadzenia treści przepukliny do jamy brzusznej. Jest to istotne ponieważ pozwala ocenić czy nie doszło do zmian zapalnych w obrębie worka przepuklinowego i powstania zrostów w okolicach jelit z workiem przepuklinowym. W takim przypadku należy rozważyć opłacalność przeprowadzenia takiego zabiegu. Rokowania są ostrożne, a ryzyko powikłań oraz możliwość powstania zrostów w obrębie jamy brzusznej wzrasta. W konsekwencji takie prosięta mogą nie przyrastać prawidłowo i z ekonomicznego punktu widzenia eutanazja takich zwierząt na odpowiednio wczesnym etapie jest o wiele bardziej opłacalna niż skomplikowane leczenie z wątpliwym rokowaniem. Dodatkowo śmiertelność u takich zwierząt po zabiegu jest wysoka.

Jako postępowanie przedoperacyjne zalecana jest głodówka 24 godziny przed planowanym zabiegiem i izolacja zwierzęcia od pozostałej części stada w specjalnie do tego wyodrębnionym kojcu szpitalnym. Głodówka zwierząt zmniejsza ilość pokarmu w przewodzie pokarmowym co ułatwia przeprowadzenie zabiegu, ułatwia znieczulenie oraz zmniejsza prawdopodobieństwo wystąpienia powikłań pooperacyjnych. W przypadku, gdy operowane są prosięta ssące niemożliwym jest przeprowadzenie 24 godzinnej głodówki, w takim wypadku zwierzęta karmione są do momentu zabiegu, natomiast po operacji powinny zostać odizolowane od maciory na czas wybudzenia się ze znieczulenia ponieważ istnieje duże ryzyko przygniecenia znieczulonych prosiąt przez matkę. U tak młodych zwierząt przeprowadzenie zabiegu jest stosunkowo łatwe z mniejszą częstotliwością powikłań

pooperacyjnych. Zwierzęta poddawane są premedykacji za pomocą azaperonu (Stresnil 40 mg/ml, Elanco, Niemcy) w iniekcji podanej domięśniowo w dawce 2mg/kg. m.c. (1ml/20 kg), po 10 minutach w celu osiągnięcia znieczulenia ogólnego podawana jest ketamina (Vetaketam 100mg/ml, VET-AGRO Sp. Zo.o., Polska) w dawce 10 mg/kg. m.c. (1ml/10kg) podawana domięśniowo. Efekt znieczulenia uzyskiwany jest po około 5 minutach i utrzymuje się do 20-30 minut i w tym czasie należy wykonać zabieg.

Zwierzęta powinny zostać wywiązane na stole operacyjnym tak aby kończyny miedniczne znajdowały się wyżej, aby siłą grawitacji jelita zsunęły się do jamy brzusznej ułatwiając repozycję treści przepukliny. Zabieg repozycji przepukliny wykonywany jest w warunkach fermowych dlatego należy starać się o jak najbardziej sterylne warunki. Pole operacyjne powinno zostać wcześniej dokładnie umyte, a następnie zdezynfekowane (np. jodyną). Cięcie wykonuje się bocznie od ostatniego pakietu sutków w linii strzałkowej na około 2 cm. Przyśrodkowo uwidoczni się węzeł nadwymieniowy, którego uszkodzenie może powodować silne krwawienie. Po nacięciu skóry i tkanki podskórnej uwidoczni się worek przepuklinowy z zawartością, czyli jelitami i jądrami, jeżeli nie są to kastrowane knurki. Należy ostrożnie otworzyć worek przepuklinowy, z którego nastąpi ewakuacja jelit i jąder na zewnątrz. W przypadku zrostów jelit do ściany brzucha lub worka przepuklinowego należy cięcie poszerzyć w stronę moszny i ostrożnie odpreparować jelita. Kiedy jelita zostaną odprowadzone do jamy brzusznej należy zamknąć kanał pachwinowy za pomocą szwów węzełkowych nitką o rozmiarze powyżej np nr 3, która nie przecina szytych tkanek. Po zamknięciu pierścienia pachwinowego należy sprawdzić szczelność założonych szwów poprzez oburęczny ucisk na jamę brzuszną, jeżeli treść dalej się wydostaje należy założyć kolejne szwy. W kolejnym etapie zszywana jest skóra, najczęściej szwem materacowym poziomym (w zależności od cięcia wystarczy jeden lub dwa szwy). Ranę zabezpiecza się antybiotykiem w sprayu.

W opiece pooperacyjnej stosuje się ogólnie w iniekcji domięśniowej antybiotyki o szerokim spektrum działania przez kolejne 3-5 dni oraz leki przeciwzapalne. Szwy usuwa się po około 7 dniach.

4.3. Macierz pozakomórkowa

Macierz pozakomórkowa (ECM) to skomplikowana struktura złożona z wielu składników specyficznych dla określonych komórek i tkanek, które łącząc się tworzą stabilną strukturę nadając określone właściwości mechaniczne (54,55).

Macierz komórkowa składa się z 3 elementów: wody, białek i polisacharydów, stosunek poszczególnych składników różni się w zależności od tkanki, którą buduje komórka. ECM podlega nieustannej przebudowie zarówno enzymatycznie jak i nieenzymatycznie. Dzięki takim właściwościom ECM buduje biomechaniczne i biochemiczne właściwości narządów odpornych na różne czynniki, takie jak rozciąganie, ściskanie, elastyczność, a także ma właściwości buforujące i ochronne utrzymując właściwą homeostazę zewnątrzkomórkową w komórkach poprzez możliwość gromadzenia wody (56).

Głównymi składnikami macierzy pozakomórkowej są kolageny, elastyna, proteoglikany i glikoproteiny, które łącząc komórki nadają im odpowiednie właściwości fizyczne i biochemiczne. W skład ECM wchodzi również czynniki wzrostu. Dzięki tym wszystkim elementom macierz bierze udział w wielu biologicznych procesach takich jak apoptoza, adhezja, proliferacja, migracja, polaryzacja czy różnicowanie (54, 55).

Udział genów m.in. ACAN, SPINT1, VIT, MMP-13, MMP-9, COL11A2, COL6A5, CCBE1, LGALS3, CTSW, S100A4 i EPYC w procesach biologicznych macierzy pozakomórkowej wskazuje na ich udział w sygnałach biochemicznych i wsparciu strukturalnym w komórkach i tkankach (57). Wyżej wymienione geny będąc odpowiedzialne za funkcjonowanie ECM zostały również powiązane z powstawaniem przepuklin pępkowych u świń, wpływ na to może mieć np. problem z produkcją kolagenu (30, 58). Odkrycia Souzy również potwierdziły, że geny związane z ECM mogą wywołać przepukliny pępkowe u świń wskazując przy tym jak duży wpływ na występowanie tej wady ma ECM i jej komponenty (30).

4.4. Kolagen (COL)

Kolagen i jego rola jako jeden z komponentów ECM jest przedmiotem wielu badań naukowych w procesie powstawania przepuklin.

Kolagen to najobficiej występujące u zwierząt włókniste białko strukturalne tworzące prawoskrętną helisę. Zbudowana jest z trzech lewoskrętnych ułożonych równolegle podobnych lub różnych łańcuchów polipeptydowych. Jest również najbardziej rozpowszechnionym składnikiem ECM (59, 60).

Ścisłe przyleganie do siebie helis typu poliproliny II (PPII) wymaga, aby co trzecia reszta była Gly, w konsekwencji otrzymujemy powtarzalną sekwencję XaaYaaGly, gdzie

Xaa i Yaa stanowią dowolne aminokwasy. Takie powtórzenia występują we wszystkich rodzajach kolagenu, choć ulegają zakłóceniu w niektórych fragmentach kolagenów niefibrylarnych (61).

W pozycjach Xaa i Yaa często występują odpowiednio Xaa jako (2s)-prolina (Pro, 28%) i Yaa (2s,4R)-4-hydroksypolina (Hyp, 38%). ProHypGly jest najczęstszym zestawieniem w kolagenie (10,5%) (62).

Wyróżniamy 46 różnych łańcuchów kolagenowych, które biorą udział w budowaniu różnych typów kolagenu (55, 63). Wśród różnych rodzajów kolagenu zidentyfikowano aż 29 różnych typów pochodzących z różnych tkanek biologicznych. Każdy z tych typów kolagenu ma swoje unikalne sekwencje, struktury i właściwości funkcjonalne (64, 65).

Kolagen dzielimy na kolageny tworzące fibryle (np. Typ I,II,III), tworzące sieć (typ IV budujący błonę podstawną), kolageny związane z fibrylami z przerwami w ich potrójnych helisach lub FACIT (typ IX, XII) i inne (typ VI) (66).

Proces tworzenia kolagenu wymaga odpowiednich składników budulcowych takich jak aminokwasy, witaminy i minerały śladowe. Aminokwasy takie jak arginina i glutamina odgrywają szczególnie ważną rolę w syntezie kolagenu ponieważ dostarczają jeden z głównych składników kolagenu, czyli prolinę (67). Glutamina dodatkowo może poprawiać wchłanianie witaminy C przez komórki (68).

Witamina C jest kofaktorem hydrolaz prolinowych, które są niezbędne do hydroksylacji proliny podczas biosyntezy kolagenu, co ma bezpośredni wpływ na strukturę i stabilność kolagenu (69). Natomiast cynk, jako kofaktor metaloenzymów, jest niezbędny w zewnątrzkomórkowym przetwarzaniu śródmiąższowych prokolagenów, umożliwiając tworzenie fibryli kolagenowych (70).

Kolagen typu I jest głównym składnikiem włókien kolagenowych, które tworzą strukturę tkanki łącznej w organizmie. Włókna kolagenowe typu I powszechnie występują w skórze, kościach, torebkach narządów, ścięgnach, rogówce i powięzi (71, 72).

Kolagen składa się z trzech lewoskrętnych helis poliprolinowych, połączonych w jedną potrójną prawoskrętną helisę. Gen COL1A1 koduje łańcuch pro-COLalfa1, a gen COL1A2 koduje łańcuch pro-COLalfa2. Prokolagen I jest heterotrimerem składającym się z dwóch łańcuchów pro-COLalfa1 i jednego pro-COLalfa2 (73). Po połączeniu łańcuchów

prokolagenów I następuje obróbka potranslacyjna wewnątrz komórki, stabilizacja kolagenu, a potem stabilizacja włókienek kolagenu już poza komórką (73-75).

Kolagen typu III jest homotrimerycznym białkiem, składającym się z trzech identycznych łańcuchów peptydowych (monomerów), z których każdy nazywany jest łańcuchem alfa 1 kolagenu typu III. Formalnie monomery zwane są kolagenem typu III łańcuch alfa 1 i u ludzi są kodowane przez gen COL3A1. Kolagen typu III jest jednym z kolagenów fibrylarnych, których białka mają długą nieelastyczną, potrójnie helikalną domenę (76, 77).

Kolagen typu III występuje jako główny składnik strukturalny w wydrążonych narządach, takich jak duże naczynia krwionośne, macica i jelita. Pojawia się również w wielu innych tkankach razem z kolagenem typu I (78).

Kolagen typu IV wstępuje głównie w blaszce podstawnej. Domena C4 kolagenu na C-końcu nie jest usuwana w procesie obróbki potranslacyjnej, a włókna łączą się ze sobą głowami, a nie równolegle. Kolagen IV nie posiada regularnej glicyny w co trzeciej reszcie, niezbędnej dla ścisłej helisy kolagenowej. Obie te cechy powodują, że kolagen typu IV formuje się w arkusz, formę blaszki podstawnej. Kolagen IV występuje we wszystkich gatunkach metazoicznych, którym służy jako ewolucyjny krok do wielokomórkowości (79). Kolagen typu IV jest odpowiedzialny za zapewnienie rusztowania dla stabilności i montażu. Występuje głównie w pozakomórkowych błonach podstawnych (80). Pomaga w adhezji komórek, migracji, przetwarzaniu, ekspansji i różnicowaniu (81).

Najbardziej powszechnym i obfitym kolagenem jest kolagen typu I (82). Kolagen jest głównym składnikiem macierzy zewnątrzkomórkowej w procesie gojenia się ran. Kolagen typu I oraz III są głównymi składnikami większości macierzy zewnątrzkomórkowej. Kolagen typu V jest niezbędny do tworzenia włókien kolagenowych typu I. Kolagen typu V określa wynikową jakość tkanki (83).

Kolagen typu I to dojrzała i najstabilniejsza forma kolagenu. Kolagen typu III reprezentuje niedojrzałą izoformę, która występuje w większym stężeniu w ECM u pacjentów z przepuklinami pooperacyjnymi i pachwinowymi (84, 85).

Kolagen jest związany z patogenezą powstawania przepuklin pachwinowych (48, 86). Badania nad kolagenem w kontekście przepuklin pachwinowych wykazały, że zwiększona

zawartość kolagenu typu III i zmniejszony stosunek kolagenu typu I/III mogą przyczyniać się do zmian strukturalnych (87, 88).

Zmniejszony stosunek kolagenu I do III w tkance łącznej u pacjentów z przepukliną ściany brzucha może być spowodowany defektem syntezy kolagenu o charakterze pierwotnym albo zmniejszonej ekspresji kolagenu z powodu nadmiernej degradacji ECM, w których udział bierze między innymi MMP (89).

Proces dojrzewania kolagenu, podczas którego powstają wiązania poprzeczne, przyczynia się do stabilizacji kolagenu, nadając mu nierozpuszczalność i odporność na działanie proteaz. Są połączone przez łańcuchy tej samej cząsteczki i sąsiednich cząsteczek kolagenu. Mogą się one różnić w zależności od rozmieszczenia struktur kolagenowych w organizmie (90).

W badaniach Pans i wsp. badających biochemiczne właściwości kolagenu oraz pochewki mięśnia prostego brzucha, uzyskano znacznie większe ilości kolagenu z powięzi poprzecznej ściany brzucha (91-94). U pacjentów z przepukliną pachwinową, zarówno po stronie gdzie występowała przepuklina, jak i po stronie przeciwnej wykazały zwiększoną rozciągliwość i elastyczność, podczas gdy w badaniach histochemicznych wykazały dezorganizację struktury kolagenu ze zwiększoną ilością monofilamentów (95). Po oznaczeniu mRNA typu I oraz III w hodowli fibroblastów z tkanek łącznych skóry u pacjentów z przepukliną pachwinową i bez niej, wykazano statystycznie znaczące obniżenie stosunku kolagenu I/III u pacjentów z przepukliną. Zmiany struktur metabolizmu kolagenu, czy też wynik zaburzeń degradacji kolagenu (96).

Zrozumienie różnych typów kolagenu, ich właściwości i mechanizmów działania jest istotne dla diagnozy, leczenia i profilaktyki przepuklin. Dalsze badania w tej dziedzinie mogą przyczyniać się do opracowania skuteczniejszych metod terapeutycznych oraz strategii zapobiegania nawrotom przepuklin pachwinowych. Oprócz zwiększenia wiedzy na temat kolagenu, istnieje również rosnące zainteresowanie różnymi strategiami leczenia, takimi jak terapia genowa, terapia komórkowa i stosowanie biomateriałów, które mają na celu naprawę i wzmocnienie ściany brzucha poprzez zwiększenie produkcji i odpowiedniej modyfikacji kolagenu.

Podsumowując, kolagen odgrywa kluczową rolę w budowie i funkcjonowaniu ściany brzucha oraz w powstawaniu przepuklin pachwinowych. Jego różne typy mają unikalne właściwości i funkcje, które wpływają na strukturę i wytrzymałość tkanki łącznej. Badania

nad kolagenem są istotne dla lepszego zrozumienia procesów patologicznych w przepuklinach i mogą przyczynić się do opracowania nowych terapii i strategii zapobiegania tej dolegliwości.

4.5. Metaloproteinazy (MMP)

Metaloproteinazy należą do enzymów proteolitycznych zbudowanych z wielu domen gdzie centrum katalitycznym jest jon cynku. MMP wydzielane jest poza komórkę w postaci proenzymu lub pozostaje związane z błonami komórkowymi.

Wyróżniamy 21 enzymów MMP, które różnią się od siebie strukturą czwartorzędową oraz swoistością substratową. MMP dzielimy na matrylizyny, kolagenazy, tromelizyny, gelatynazy i błonowe MMP (97).

Matrylizyny to najmniejsze MMP nazywane również endometalopeptydazami (MMP-1, MMP-7) – ich substratami są makrocząsteczki macierzy pozakomórkowej oraz cząsteczki na powierzchni komórki (FAS-ligandy, pro-TNF, E-kahedryna) przez co biorą udział w procesach fizjologicznych np. apoptoza komórki (98).

Kolagenazy, czyli MMP-1, MMP-8, MMP-13, których substratami są kolageny typu I,II,III,V,IX. Kolagenazy hydrolizują strukturę superhelisy kolagenu między $\frac{1}{4}$ a $\frac{3}{4}$ długości łańcucha peptydowego (99, 100).

Stromelizyny, to MMP-3, MMP-10 posiadają tą samą swoistość substratową, ale MMP-3 wykazuje większą efektywność proteolityczną (98).

Gelatynazy, czyli MMP-2, MMP-9 wykazują dużą swoistość substratową względem zdenaturowanej formy kolagenu i żelatyny (101). MMP-2 hydrolizuje wiązania peptydowe w kolagenie I, II i III (102).

Błonowe MMP, do tej grupy należy 6 enzymów podzielonych na 2 podgrupy. W grupie pierwszej znajdują się makrocząsteczki typu I białek błonowych (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-24). W grupie drugiej znajdują się białka połączone z GPI (glikofosfadyloinozytolem) – MMP-17, MMP-25 (98).

Pozostałe 21 MMP nie zostało przypisane do żadnych z powyższych grup.

MMP składają się głównie z 4 części: domeny katalitycznej, prodomeny, domeny hemopeksyny i elastycznego łącznika. Za główną funkcję MMP, czyli działanie

proteolityczne enzymu odpowiada domena katalityczna, w której skład wchodzi jon cynku i zazwyczaj 3 jony wapniowe.

W prodomecie (która znajduje się na końcu aminowym MMP) znajduje się propeptyd, który odpowiada za utrzymanie enzymu w postaci nieaktywnej. Domena hemopeksyny pomaga we właściwym wykryciu substratu, np. w grupie kolagenaz umożliwia zapoczątkowanie procesu trawienia superhelisy kolagenowej (103-105).

MMP syntetyzowane są w postaci preproenzymu, a do przestrzeni zewnątrzkomórkowej wyzwala się jako proenzymy. Po usunięciu prodomey następuje aktywacja enzymu poprzez odsłonięcie miejsca aktywnego. Proces ten wyzwala udział enzymów proteolitycznych, trypsyna, plazmina, oksydanty, obniżone pH, laurylosiarczan sodu (SDS), chlorek rtęci (III) (HgCl_2), utleniony glutation i podwyższona temperatura (106, 107).

Rolą MMP jest degradowanie białek macierzy zewnątrzkomórkowej i kolagenu, laminy, proteoglikanów, fibronektyny. W fizjologicznych warunkach MMP bierze udział w takich procesach jak angiogeneza, embriogeneza czy przebudowa tkanek. MMP degradując elementy ECM uwalnia np. czynniki wzrostu, mając wpływ na komórkę czy inne molekuly, które potem biorą udział w budowaniu receptorów komórkowych lub procesach immunologicznych. W patologicznych stanach MMP biorą udział w chorobach nowotworowych, chorobie Alzheimera czy chorobach sercowo-naczyniowych (108).

MMP-2 zwana jest również żelatynazą A, kolagenazą typu IV o masie cząsteczkowej 72kDa zlokalizowana w regionie genomowym 16q13 (89). MMP-2 może rozszczepiać żelatynę, kolageny typu I, IV i V, elastynę i witronektynę (109).

Żelatynazy degradują kolagen w błonach podstawnych naczyń krwionośnych. MMP-2 ułatwia migrację komórek poprzez bezpośrednią degradację błony podstawnej, umożliwiając na przykład infiltrację neutrofilów limfocytów lub uwalnianie chemoatraktantów (110). MMP-2 bierze udział zarówno w aktywacji, jak i hamowaniu stanu zapalnego poprzez uwalnianie mediatorów prozapalnych.

MMP-9 jest żelatynazą B, kolagenazą typu IV, zlokalizowaną w regionie genomowym 20q11*2-q13*1 i degraduje głównie elastynę i kolagen IV. MMP-9 uczestniczy w takich procesach jak angiogeneza, gojenie ran czy w uszkodzeniu niedokrwiennym po zawale mięśnia sercowego (111-113). MMP-9 jest niezdolna do bezpośredniej proteolizy kolagenu

I (109). Stwierdzono, że kolagen typu IV, V, VII, X i XIV, fibronektyna i laminina są trawione przez MMP-9 (114).

Biologicznie aktywna forma czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF) jest uwalniana przez MMP-9, odgrywając kluczową rolę w angiogenezie. Bezpośrednia proteolityczna degradacja białek błony podstawnej naczyń uzupełnia ten proces, wykazując, że MMP-9 nawet bardziej niż MMP-2, może odgrywać ważną rolę w tworzeniu nowych naczyń krwionośnych. Stwierdzono, że w modelu ksenoprzeszczepu domena hemopeksynowa MMP-9 była czynnikiem hamującym angiogenezę, o czym świadczy zmniejszona inwazja komórek glejaka z nadekspresją domeny hemopeksynowej MMP-9 (115).

W badaniach aktywność metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9 w hodowli fibroblastów powięzi poprzecznej u młodych pacjentów z przepuklinami pachwinowymi prostymi i skośnymi stwierdzając zwiększoną ekspresję MMP-2 u pacjentów z przepukliną prostą, w porównaniu z grupą kontrolną przy braku wykrywalnej aktywności MMP-9. Na tej podstawie możemy wnioskować, że MMP-2 może brać udział w degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej powięzi poprzecznej u pacjentów z przepukliny pachwinowej, a utrzymujące się zmiany poziom MMP-2 w hodowli komórkowej sugerują raczej istnienie defektu genetycznego lub nieodwracalnych zmian genetycznych jako przyczyny tej patologii, a nie czynników środowiskowych, które mogą być później zaangażowane w proces powstawania przepukliny (116).

W jednym z badań nad rolą w MMP w przepuklinie oceniono dwie metaloproteinazy macierzy MMP-2 i MMP-9 oraz ich główne inhibitory TIMP-1 i TIMP-2 u pacjentów poddanych zabiegowi naprawy przepukliny pachwinowej oraz u osób tworzących grupę kontrolną. Kwantyfikację MMP/TIMP przeprowadzono przy użyciu testu ELISA w próbkach tkanki powięzi brzusznej i przedoperacyjnych próbkach osocza. Z wyników wiemy, że eksplantaty tkankowe od pacjentów z przepukliną wytwarzały istotnie wyższe poziomy MMP-9 i MMP-2 oraz obniżone stężenia TIMP-1 i TIMP-2 w porównaniu z grupą kontrolną. W osoczu stwierdzono odwrotną korelację w odniesieniu do stężenia MMP, krążące poziomy MMP-9 i MMP-2 były znacznie niższe u pacjentów z przepukliną pachwinową niż w grupie kontrolnej. Również stwierdzono, że podwyższony poziom TIMP-2 i obniżony poziom TIMP-1 w osoczu pojawia się u osób z przepukliną pachwinową. Dzięki temu badaniu możemy wywnioskować, że brak aktywności MMP/TIMP wskazuje

na dysregulację procesu degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej u pacjentów z przepukliną pachwinową. Dlatego możemy wyciągnąć hipotezę, że upośledzony metabolizm kolagenu może być podstawowym mechanizmem patofizjologicznym powstawania przepukliny (117).

Podsumowując całkowita degradacja kolagenu jest wynikiem współpracy kilku metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej. Metaloproteinazy są enzymami proteolitycznymi, których aktywność jest precyzyjnie regulowana przez inhibitory TIMP. MMP-2 i MMP-9 są kluczowymi czynnikami degradacji kolagenu, elastyny i innych składników ECM. Równowaga między aktywnością metaloproteinaz, a poziomem kolagenu jest istotna dla utrzymania homeostazy i prawidłowego funkcjonowania tkanki. Dysregulacja MMP i COL może prowadzić do różnych chorób. Badania nad rolą MMP i COL w różnych schorzeniach, w tym w przepuklinie pachwinowej mają istotne znaczenie dla lepszego zrozumienia patofizjologii i potencjalnego rozwoju terapii.

5. Hipoteza i cel pracy

W dostępnym piśmiennictwie wiele miejsca poświęca się badaniom roli składników tkanki łącznej w procesach fizjologicznych oraz w mechanizmach powstawania różnych chorób w tym przepuklin. Wydaje się zatem celowe określenie ich wartości u zwierząt obciążonych wadą przepukliny. Ocena zależności stężeń w surowicy pozwoliłaby na monitorowanie chorych zwierząt w stadzie i opracowanie dobrych praktyk produkcyjnych w hodowli świń.

W tym celu postawiono hipotezy badawcze:

1. U zwierząt obciążonych przepukliną pachwinową poziom kolagenu typu COL1, COL3 i COL4 będzie znacząco różnił się w porównaniu do grupy kontrolnej, co może sugerować zaburzenia w metabolizmie składników tkanki łącznej.
2. Poziomy metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9 będą podwyższone u zwierząt z przepukliną pachwinową w porównaniu do grupy kontrolnej, co wskazywałoby na udział tych enzymów w degradacji kolagenu i mechanizmach powstawania przepukliny.
3. Istnieje korelacja między poziomem wybranych typów kolagenu (COL1, COL3, COL4), a poziomami metaloproteinaz (MMP-2, MMP-9) u zwierząt z przepukliną pachwinową, co może świadczyć o ich wzajemnym wpływie na procesy degeneracyjne tkanki łącznej.

Aby zweryfikować te hipotezy postanowiono jako cel pracy określić w surowicy zwierząt z przepukliną pachwinową oraz w grupie kontrolnej:

1. Poziom kolagenu - COL1, COL3, COL4.
2. Poziom metaloproteinaz - MMP-2, MMP-9.
3. Określić różnicę w poziomie zawartości kolagenu - COL1, COL3, COL4 u zwierząt obciążonych wadą przepukliny pachwinowej, a grupą kontrolną.
4. Określić różnicę w poziomie zawartości metaloproteinaz MMP-2, MMP9 u zwierząt z przepukliną pachwinową, a grupą kontrolną.
5. Podjąć próbę oceny korelacji między poziomem wybranych typów kolagenu, a poziomami metaloproteinaz u zwierząt z przepukliną pachwinową i w grupie kontrolnej.

6. Materiały i metody

6.1. Materiały

Materiał pobrano z fermy, na której przebywa ok. 16 000 zwierząt, w tym 2285 sztuk macior hodowanych w oparciu o genetykę Choice Genetic Naima. Na fermie znajduje się łącznie 510 miejsc porodowych. Wszystkie zwierzęta w hodowli są inseminowane sztucznie przy użyciu mieszanki nasienia. W grupie która została wybrana do badań, maciory były kryte knurem Excellium. Prosięta są odsadzane od macior w wieku 28 dni, gdzie następnie przebywają na odchowali przez kolejne 42 dni, po tym czasie zwierzęta są sprzedawane do ferm tuczowych.

Ważnym aspektem badanej fermy było to, że prosięta nie są tam poddawane procedurze kastracji. To z kolei prowadzi do występowania dużej ilości przepuklin pachwinowych - ok 4-5% na jedną grupę porodową liczącą ok. 102 macior i 1300-1500 sztuk prosiąt.

Do badań wybrano 87 sztuk w tym 28 sztuk stanowiło grupę kontrolną, zaś pozostałe 59 sztuk to zwierzęta grupy badanej, które były obciążone wadą przepukliny pachwinowej.

Należy podkreślić, że wszystkie zwierzęta były w tym samym wieku, czyli były to prosięta w 3 tygodniu życia (18-21 dzień życia). Wszystkie pochodziły od macior i knurów tej samej genetyki. Były to niekastrowane knurki.

Zwracano również na wagę badanych prosiąt. Średnia waga zwierząt z grupy badanej to 5,66 kg, a grupy kontrolnej 5,12 kg. Przy badaniu przepuklin, stwierdzono, że na 59 badanych przepuklin 12 sztuk to przepukliny prawostronne, 3 sztuki obustronne, a 44 sztuk to przepukliny lewostronne.

Od każdej sztuki pobrano po 7,5 ml krwi z żyły czołowej przedniej. Do pobrania krwi użyto igieł 18G, 1,2mmx40mm (KDM GmbH, Niemcy) oraz probówko-strzykawkę (KABE Labortechnik GmbH, Niemcy), przeznaczonych do pobierania krwi na surowicę z granulatem i środkiem przyspieszającym wykrzepianie krwi.

Po pobraniu krew umieszczono w pionie przez 30 min w temperaturze pokojowej w celu uzyskania skrzepu, a następnie odwirowywano przez 15 min przy 1700 obrotów na minutę. Użyto do tego wirówki Hunan Xingke model TDL – 4ZB (Hunan XINGKE Scientific Instruments Co., Ltd, Chiny). Po tej procedurze uzyskaną surowicę przeniesiono

do 8 eppendorfów, do każdego z nich przelano po 0,4 ml. Tak przygotowaną surowicę zamrożono w -80 stopniach do czasu dalszych analiz.

6.2. Metody

Do oznaczenia stężeń COL 1, COL3, COL4, MMP-2 i MMP-9 użyto zestawów ELISA do ilościowego pomiaru in vitro z surowicy świńskiej. Metoda ELISA została wybrana z kilku istotnych powodów. Pierwszym z nich jest jego czułość oraz precyzja, dzięki czemu mogliśmy wykryć niskie stężenia kolagenu w surowicy, co umożliwiło monitorowanie zmian poziomu kolagenu oraz metaloproteinaz. Metoda ta również daje możliwość określenia dokładnej ilości badanej substancji we krwi, a ze względu na jej specyficzność pozwala na identyfikację konkretnego rodzaju kolagenu lub metaloproteinaz w próbce.

Metoda ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), czyli enzymatyczny odczyn immunoadsorpcyjny, są to laboratoryjne badania diagnostyczne, które umożliwiają wykrywanie i ilościowe oznaczanie różnych substancji biologicznych, takich jak przeciwciała, antygeny, białka czy hormony. Metoda ELISA opiera się na reakcji antygen-przeciwciało, która jest wykrywana przy użyciu enzymu wiążącego. Badanie to polega na tym, że umieszczamy interesującą nas próbkę biologiczną na płytce, na której znajdują się już znane antygeny lub przeciwciała. Jeżeli odpowiednie substancje występują w próbce, następuje reakcja, która jest wykrywana przez odczyt spektrofotometryczny, umożliwia to dokładne wykrycie i pomiar stężenia badanej próbki. Ta technika jest szeroko stosowana w diagnostyce chorób, monitorowaniu terapii oraz badaniach immunologicznych. Jej zaletami są wysoka czułość, precyzja i możliwość automatyzacji, co przyczynia się do dokładnych i wiarygodnych wyników.

Testy ELISA dzielimy na:

- I. Test bezpośredni
- II. Test pośredni
- III. Test podwójnego wiązania (kanapkowy)
- IV Test kompetencyjny

Do badań własnych użyto testu podwójnego wiązania ELISA (test kanapkowy), a dokładnie Pig Collagen Type I (COL1) ELISA Kit, Pig Collagen Type III (COL3) ELISA Kit, Pig Collagen Type IV (COL4) ELISA Kit, Pig Matrix Metalloproteinase 9 (MMP9) ELISA Kit, Pig Matrix Metalloproteinase 2 (MMP2) ELISA Kit, wszystkie firmy Abbeva

(Abbexa, Anglia). Są to zestawy do ilościowego pomiaru in vitro kolagenu świńskiego typu I, II, IV oraz metaloproteinazy typu 2 i 9 w surowicy. Badania były wykonywane w aparacie do techniki ELISA, czyli analizatora ETI-Max 3000 (Diasorin S.p.A., Włochy), który wykonał pełne przetwarzanie, pomiary fotometryczne i ocenę próbek.

Test kanapkowy ELISA polega na naniesieniu przeciwciała wychwytyjącego na studzienki płytki (118). Nazwa „kanapkowy” wynika z faktu, że antygeny zostają umieszczone pomiędzy dwoma przeciwciałami - wychwytyjącym i wykrywającym (119).

Ten typ ELISA charakteryzuje się najwyższą czułością spośród wszystkich metod ELISA (120). Jednak jego głównymi wadami są dłuższy czas wykonania, wyższe koszty oraz potrzeba stosowania „dopasowanych par” przeciwciał oraz drugorzędowych przeciwciał dla antygenów dwuwartościowych i wielowartościowych (121).

Testy wykonano zgodnie z protokołem i zaleceniami producenta.

Zestaw jest oparty na technologii kanapkowego testu immunoenzymatycznego. Przeciwciało jest wstępnie naniesione na 96-dołkową płytkę. Standardy, próbki testowe i odczynnik skoniugowany z biotyną dodaje się do studzienek, a następnie inkubuje się. Kolejnym krokiem jest dodanie odczynnika skoniugowanego z HRP (peroksydaza chrzanowa) i ponowna inkubacja całej płytki. Na każdym etapie usuwa się niezwiązane koniugaty stosując bufor do przemywania. Substrat TMB (3,3',5,5'-tetrametylobenzydyna) służy do ilościowego określenia reakcji enzymatycznej HRP. Po dodaniu substratu TMB, tylko studzienki, które zawierają wystarczającą ilość kolagenu lub MMP wytworzą niebieski produkt, który po dodaniu kwasu zmieni kolor na żółty. Intensywność żółtego koloru jest proporcjonalna do ilości COL lub MMP związanego na powierzchni płytki. Stężenia COL i MMP odczytuje się fotometrycznie za pomocą OD (gęstość optyczna).

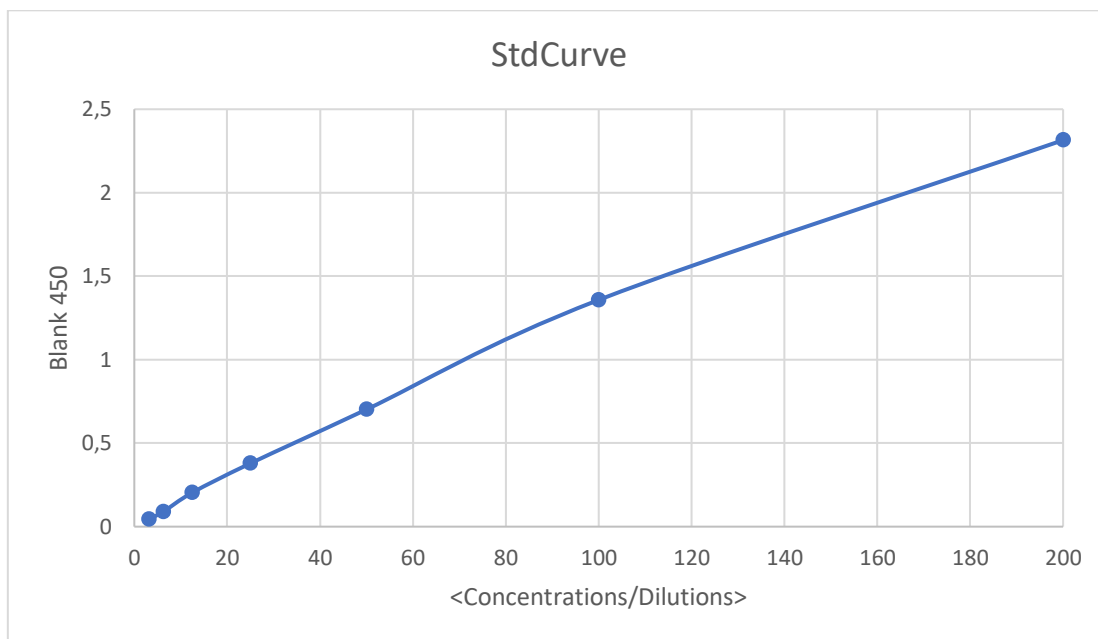
Przed użyciem składniki zestawu i próbki zostały doprowadzone do temperatury pokojowej (18-25°C). Następnie do odpowiednich dołków dodano po 100 µl standardu, kontroli i próbki, po czym całość inkubowano pod pokrywką przez 1 godzinę w temperaturze 37°C. Po upływie godziny, płyn został usunięty, a do każdego dołka dodano 100 µl roboczego odczynnika A. Po tej czynności przeprowadzono kolejną godzinową inkubację w temperaturze 37°C. Ponownie usunięto płyn, a płytkę przemyto trzykrotnie buforem płuczającym. Następnie dodano 100 µl roboczego odczynnika B do każdego dołka i

inkubowano w temperaturze 37°C przez 30 min. Po tym etapie roztwór usunięto, a płytkę przemyto pięciokrotnie buforem płuczącym. Do każdej studzienki naniesiono po 90 µl substratu TMB i całość inkubowano w temperaturze 37°C przez 20 min. Po tym czasie dodano po 50 µl roztworu zatrzymującego reakcję do każdego dołka. W końcowym etapie absorbancję próbek zmierzono przy długości fali 450 nm.

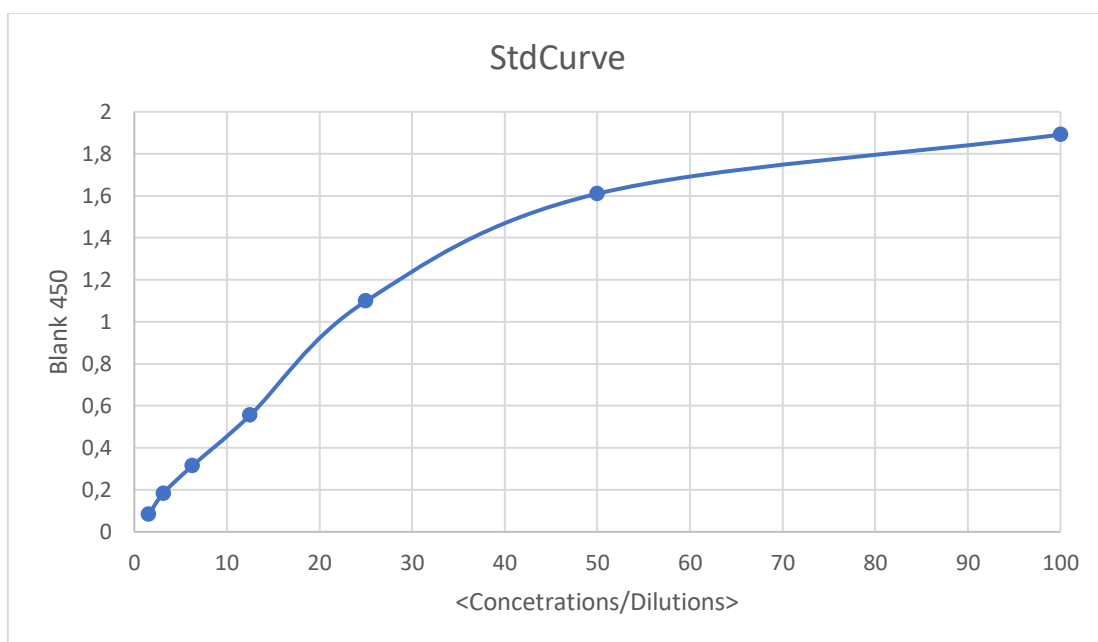
HRP (horseradish peroxidase), czyli peroksydaza chrzanowa, jest enzymem wykorzystywanym jako znacznik w testach ELISA, która jest związana z przeciwciałami/antygenami jako marker do wykrywania obecności lub ilości badanego antygeny/przeciwciała w próbce (122). Po związaniu przeciwciała/antygeny znakowanego peroksydazą z badanym antygenem/przeciwciałem nadmiar zostaje usunięty przez płukanie, pozostawiając jedynie związane kompleksy na powierzchni płytki. Następnie dodaje się substrat TMB (3,3',5,5'-tetrametylobenzodyna), które jest jednym z najczęściej używanych substratów w testach ELISA. Stosuje się go do ilościowego określenia reakcji enzymatycznej HRP (peroksydaza chrzanowa). Wprowadzenie substratu TMB powoduje, że enzym katalizuje reakcję chemiczną, w której substrat TMB jest przekształcany w barwny produkt o kolorze niebieskim. Po dodaniu substratu TMB, tylko studzienki zawierające wystarczającą ilość badanej substancji będą wytwarzać produkt o niebieskim zabarwieniu, który następnie zmieni kolor na żółty po dodaniu kwaśnego roztworu zatrzymującego reakcję. Intensywność żółtego zabarwienia jest proporcjonalna do ilości badanej substancji związanego na płytce (123).

Gęstość optyczną (OD) zmierzono fotometrycznie przy długości fali 450 nm, z którego można było obliczyć stężenie badanej substancji. Gęstość optyczna (OD) to miara ilości światła pochłanianego przez próbkę w badaniu spektrofotometrycznym, gdzie promieniowanie o określonej długości fali przechodzi przez próbkę, a część tego światła pochłaniana jest przez substancję. Pozostałe światło przechodzi przez próbkę i pada na detektor. Gęstość optyczna jest obliczona jako stosunek ilości światła pochłoniętego przez próbkę do ilości światła padającego na próbkę, której wartość zwykle wyrażana jest jako jednostka bezwymiarowa i oznaczana jest jako OD (124).

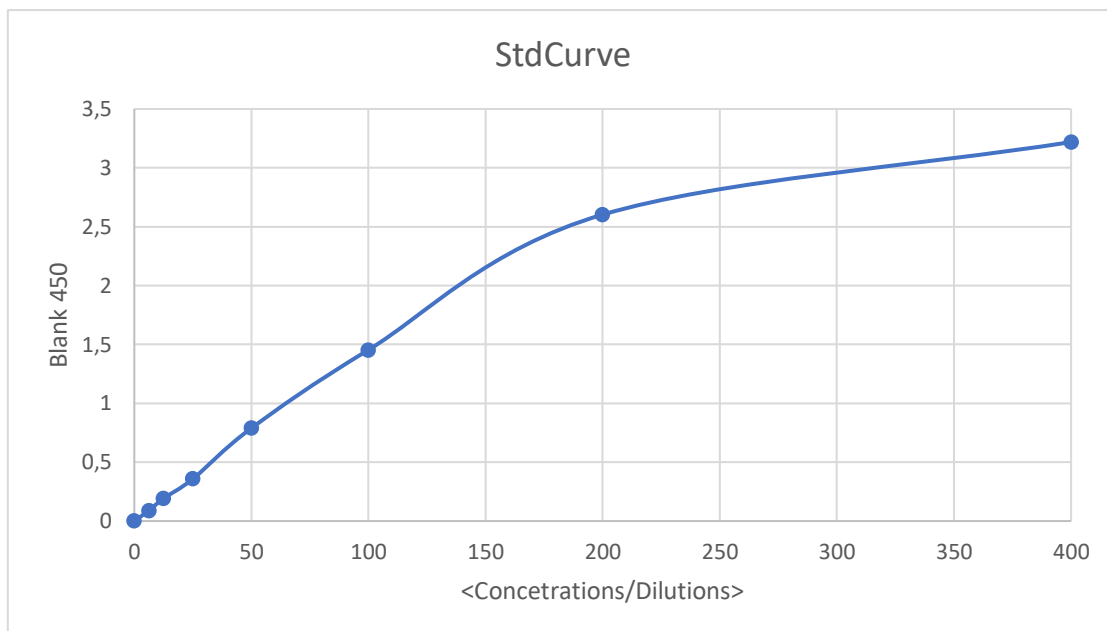
Krzywe standardowe dla COL1, COL3, COL4, MMP2 i MMP9 przedstawiono na wykresach.



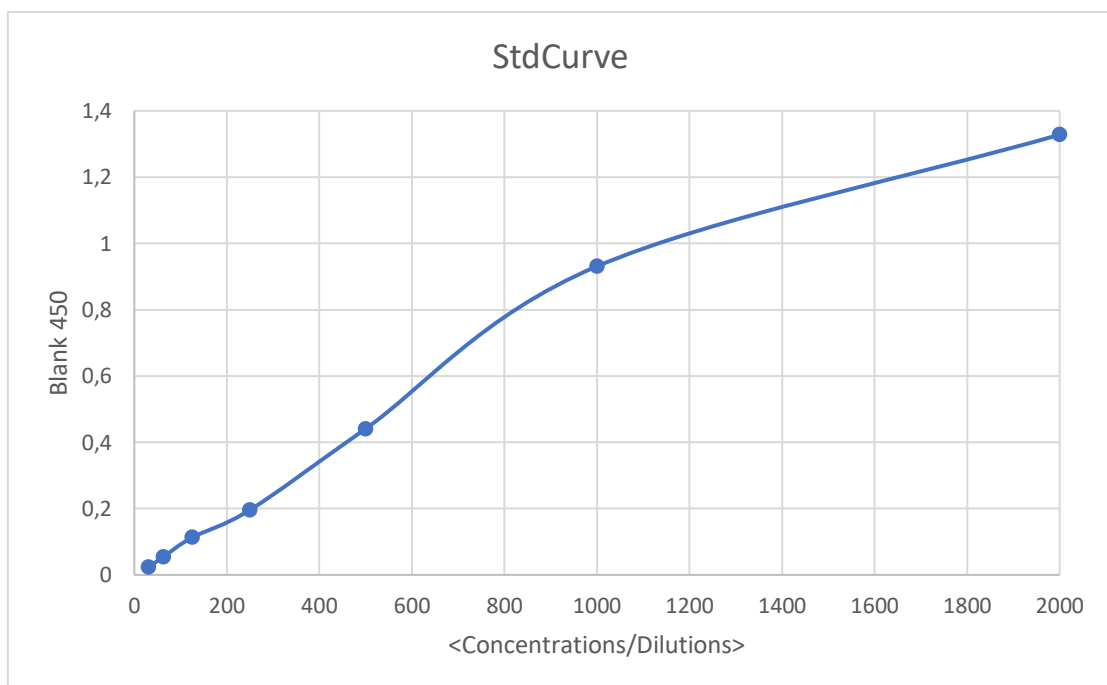
Rycina 1. Krzywa standardowa dla COL1. Na osi x przedstawiono rozcieńczenia/stężenia (ng/ml), a na osi y wartość absorbancji przy 450 nm (Blank 450).



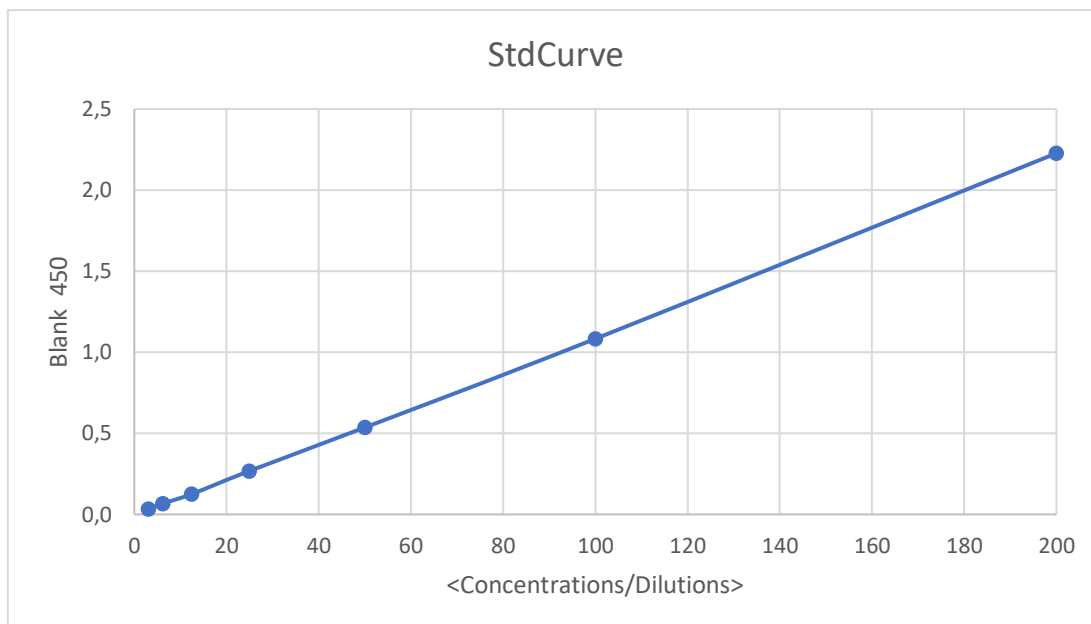
Rycina 2. Krzywa standardowa dla COL3. Na osi x przedstawiono rozcieńczenia/stężenia (ng/ml), a na osi y wartość absorbancji przy 450 nm (Blank 450).



Rycina 3. Krzywa standardowa dla COL4. Na osi x przedstawiono rozcieńczenia/stężenia (ng/ml), a na osi y wartość absorbancji przy 450 nm (Blank 450).



Rycina 4. Krzywa standardowa dla MMP-2. Na osi x przedstawiono rozcieńczenia/stężenia (pg/ml), a na osi y wartość absorbancji przy 450 nm (Blank 450).



Rycina.5. Krzywa standardowa dla MMP-9. Na osi x przedstawiono rozcieńczenia/stężenia (ng/ml), a na osi y wartość absorbancji przy 450 nm (Blank 450).

6.3. Statystyka

W celu analizy statystycznej uzyskanych wyników wykorzystano program Statistica 13.3 (StatSoft, Polska). Analiza normalności rozkładu wykazała, że uzyskany zbiór danych nie ma rozkładu normalnego. W związku z tym zastosowano nieparametryczne testy statystyczne: test U Manna-Whitneya oraz korelację rang Spearmana. Porównano wartości dla COL1, COL3, COL4, MMP2, MMP9 pomiędzy kontrolą a grupą badaną, gdy prawdopodobieństwo testowe (wartość p) przyjmowało wartość $< 0,05$, wynik uznano za statystycznie istotny. Dodatkowo użyto regresji logistycznej oraz krzywej ROC w celu określenia czy dany parametr może być predyktorem wystąpienia przepukliny.

W celu prezentacji danych w sposób przystępny i zrozumiały posłużono się na wstępie statystyką opisową uwzględniającą takie pojęcia jak:

Grupa średnia (średnia arytmetyczna) - grupa średnia jest obliczana poprzez dodanie wszystkich wartości w zestawie danych i podzielenie przez liczbę obserwacji. Jest to najczęściej stosowana miara centralna, która odzwierciedla wartość przeciętną w zbiorze danych. Średnia jest przedstawiana jako suma wartości podzielona przez liczbę obserwacji.

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{N} = \frac{\sum_{j=1}^N x_j}{N}$$

Gdzie:

\bar{x} – symbol średniej arytmetycznej,

x_j – warianty cechy mierzalnej,

N – liczebność badanej zbiorowości.

Minimum to najmniejsza wartość występująca w zestawie danych. Wskazuje dolne ograniczenie danych, czyli wartość, poniżej której nie ma innych mniejszych wartości.

Maximum to największa wartość występująca w zestawie danych. Wskazuje górne ograniczenie danych, czyli wartość, powyżej której nie ma innych większych wartości.

Dolny kwartył (Q1) to wartość, poniżej której znajduje się 25% danych mniejszych lub równych dolnemu kwartyłowi, pozostałe 75% jest większe lub równie Q1.

Mediana (tzw. kwartył drugi, Q2) - jest wartością, która dzieli uporządkowany zestaw danych na dwie równe części. W połowie danych wartości są mniejsze niż mediana, a w drugiej połowie są większe. Aby obliczyć medianę, dane muszą być uporządkowane od najmniejszej do największej wartości, a następnie wybierana jest środkowa wartość.

$$M_e = \frac{x_{N+1}}{2}, \text{ gdy } N \text{ jest nieparzyste}$$

$$M_e = \frac{x_{\frac{n}{2}} + x_{\frac{n}{2}+1}}{2}, \text{ gdy } N \text{ jest parzyste}$$

Górny kwartył (Q3) to wartość, poniżej której 75% danych jest mniejszych lub równych górnemu kwartyłowi, a pozostałe 25% danych może być równe lub większe od Q3 (125).

Odchylenie standardowe jest miarą rozproszenia danych, która określa, jak bardzo wartości w zestawie danych różnią się od grupy średniej. Im większe odchylenie standardowe, tym większa zmienność danych. Oblicza się je poprzez pierwiastkowanie wariancji, czyli średniej kwadratowej różnicy między wartościami w zestawie danych, a grupą średnią (126).

$$\sigma = \sqrt{\frac{(x_1 - \bar{x})^2 + (x_2 - \bar{x})^2 + \dots + (x_n - \bar{x})^2}{n}}$$

Gdzie:

σ - odchylenie standardowe

\bar{x} - średnia arytmetyczna z próby

x_n - kolejne wartości danej zmiennej

n - liczba elementów w próbie

W celu porównania stosunku wartości kolagenu i metaloproteinaz pomiędzy kontrolą, a grupą badaną wykorzystano testy nieparametryczne (metoda U Manna-Whitneya) jest to grupa metod statystycznych wykorzystywanych w analizie danych, które nie wymagają spełnienia konkretnych założeń co do rozkładu danych. Są stosowane w przypadkach, gdy dane nie spełniają założeń normalności lub gdy mamy do czynienia z danymi rangowymi lub kategorycznymi (127).

Poprawka na ciągłość w teście Manna-Whitneya jest stosowana w przypadku, gdy dane w próbach są ciągłe, ale mają powtarzające się wartości. W takich sytuacjach, rangowanie danych może wprowadzić niepożądane efekty, a poprawka na ciągłość pomaga uwzględnić duplikaty i poprawnie obliczyć statystykę U (128).

Wzór na statystykę testową z poprawką na ciągłość:

$$Z = \frac{\left|U - \frac{n_1 n_2}{2}\right| - 0.5}{\sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 + 1)}{12} - \frac{n_1 n_2 \sum (t^3 - t)}{12(n_1 + n_2)(n_1 + n_2 - 1)}}$$

Wartość "Z" wartość statystyki testowej, aby ocenić, czy istnieje istotna różnica między medianami dwóch prób. W przypadku testu U Manna-Whitneya z poprawką na ciągłość, wartość "Z" jest obliczana na podstawie wartości "U" i wielkości prób w obu grupach (128).

Wartość "U" to wartość testowa obliczana na podstawie sumy rang dla jednej z grup. W przypadku porównywania dwóch grup, wartość "U" dla grupy pierwszej jest równa sumie jej rang. Wartość "U" może być wykorzystana do obliczenia wartości "Z" (128).

$$U = n_1 n_2 + \frac{n_1(n_1 + 1)}{2} - R$$

Gdzie:

n- to liczność prób

R – suma rang prób

Wartość "n" oznacza liczbę obserwacji w próbie. Jest to ważny parametr statystyczny, który określa wielkość próby, na podstawie której są przeprowadzane obliczenia statystyczne. W przypadku testu U Manna-Whitneya z poprawką na ciągłość, "n" jest wykorzystywane do obliczenia wartości "U" i wartości "Z". Im większa liczba obserwacji, tym większa precyzja statystyczna wyników testu.

Suma rang w teście U Manna-Whitneya to suma miejsc, które są przypisane posortowanym obserwacjom w jednej z prób. Połączone obie próby, czyli próba pierwsza i próba druga, są rangowane wspólnie i każdej obserwacji przypisywana jest jej odpowiednia ranga (miejsce) w porządku rosnącym. Obserwacje są porządkowane rosnąco lub malejąco i otrzymują odpowiednie liczby rang. Suma rang to suma tych przypisanych miejsc dla jednej z prób. Umożliwia również wyliczenie statystyki U (129).

Wartość „p” jest to miara określająca istotność statystyczną różnicy między dwiema niezależnymi próbami, w teście U Manna-Whitneya pozwala na dokonanie statystycznego wyboru, czy różnice między próbami są istotne czy przypadkowe. Małe wartości p (zazwyczaj mniejsze niż ustalony poziom istotności, np. 0.05) wskazują, że różnice między próbami są prawdopodobnie istotne, co oznacza, że można odrzucić hipotezę zerową, czyli założenie, że próby pochodzą z tej samej populacji. Wartości p większe niż poziom

istotności sugerują, że różnice między próbami mogą być wynikiem przypadku, a hipoteza zerowa nie może być odrzucona (128).

Korelacja porządku rang Spearmana to nieparametryczna miara korelacji używana do oceny stopnia zależności między dwiema zmiennymi rangowymi lub porządkowymi. Ta miara bazuje na przypisaniu rang do danych, a następnie oblicza współczynnik korelacji na podstawie różnic między rangami w obu zmiennych (130).

Regresja logistyczna to jedno z narzędzi analizy statystycznej stosowane do przewidywania prawdopodobieństwa wystąpienia pewnego zdarzenia na podstawie jednej lub wielu zmiennych niezależnych. Zwykle stosuje się ją, gdy zmienna zależna jest kategorierna i przyjmuje dwie wartości, chociaż można ją również stosować do zmiennych z wieloma kategoriami (131). W naszym przypadku przyjmowała dwie wartości 0 – zdrowe, 1 – z przepukliną.

Krzywa ROC (Receiver Operating Characteristic) jest graficzną reprezentacją zdolności testu diagnostycznego do rozróżniania pomiędzy dwiema klasyfikacjami: chorymi i zdrowymi. Na osi X krzywej ROC przedstawiona jest 1 - specyficzność, a na osi Y czułość.

Czułość (sensitivity) - prawdopodobieństwo, że test będzie pozytywny, gdy przepuklina jest obecna:

$$\text{Czułość} = \frac{TP}{TP + FN}$$

Specyficzność (specificity) - prawdopodobieństwo, że test będzie negatywny, gdy przepuklina jest nieobecna:

$$\text{Specyficzność} = \frac{TN}{TN + FP}$$

Gdzie:

TP (True Positive) to liczba prawdziwie pozytywnych wyników,

TN (True Negative) to liczba prawdziwie negatywnych wyników,

FP (False Positive) to liczba fałszywie pozytywnych wyników,

FN (False Negative) to liczba fałszywie negatywnych wyników (132).

Analiza wyników badań ELISA za pomocą testu U Manna-Whitneya, korelacji rang Spearmanna, regresji logistycznej oraz krzywej ROC jest skomplikowanym, ale istotnym procesem, który pomaga zrozumieć dane badawcze na głębszym poziomie.

7. Omówienie wyników badań i dyskusja

7.1. Wyniki

7.1.1. Stężenie kolagenu I w surowicy świńskiej grupy z wadą przepukliny, a grupą kontrolną.

Tabela 1. Statystyczna charakterystyka zmiennej COL 1 w grupie badanej i kontrolnej.

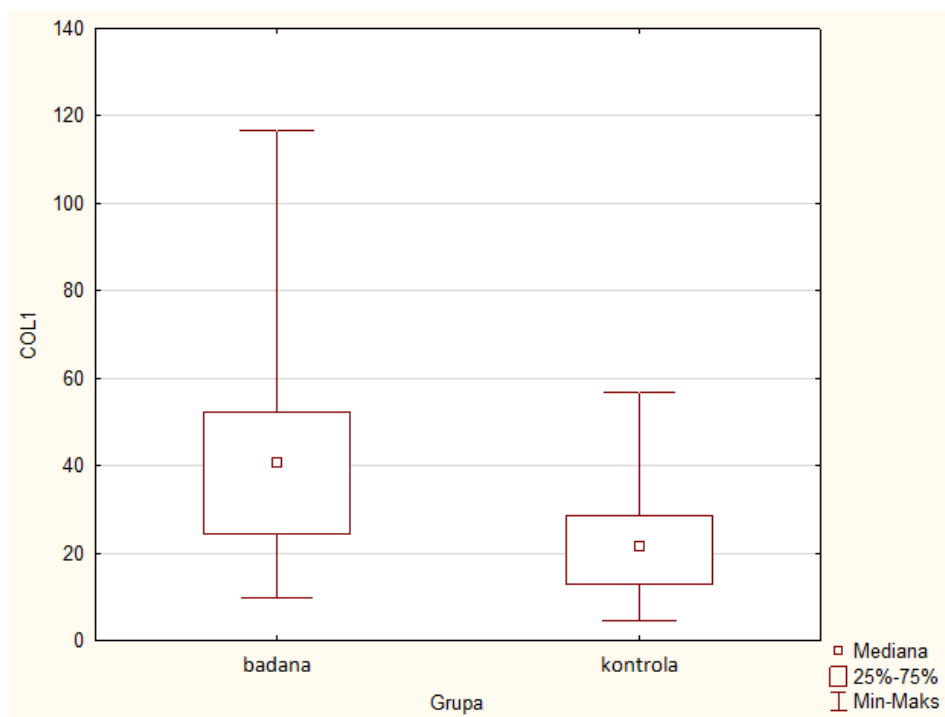
grupa	badana	kontrolna
ilość (szt)	59	28
średnia (ng/ml)	39,94	22,79
mediana (ng/ml)	40,86	21,66
minimum (ng/ml)	9,652	4,540
maksimum (ng/ml)	116,60	56,70
dolny kwartył (ng/ml)	24,34	12,774
górnny kwartył (ng/ml)	52,32	28,71
kwartył rozstęp (ng/ml)	27,98	15,94
odchylenie standardowe (ng/ml)	19,03	14,70

Stężenie kolagenu typu I w surowicy krwi świńskiej jest wyższe w grupie badanej niż w grupie kontrolnej, co widać po wyższej medianie i średniej. Przeciętne stężenie (średnia) w grupie badanej wynosi 39,94 ng/ml, podczas gdy w grupie kontrolnej jest to 22,79 ng/ml. Mediana, czyli środkowa wartość stężenia, w grupie badanej wynosi 40,86 ng/ml, a w grupie kontrolnej 21,66 ng/ml, co oznacza, że połowa zwierząt w każdej grupie ma stężenie wyższe, a połowa niższe niż ta wartość. W grupie badanej obserwuje się większą zmienność wyników, co widać po wyższym odchyleniu standardowym i większym rozstępie kwartyłowym w porównaniu do grupy kontrolnej. Grupa kontrolna wykazuje niższe stężenia i bardziej jednolite wyniki.

Tabela 2. Wyniki testu U Manna-Whitneya (z poprawką na ciągłość) dla zmiennej COL 1 względem grupy z zaznaczeniem, które wyniki są istotne ($p < 0,05$).

Zmienna COL1		
Test U Manna-Whitneya (z poprawką na ciągłość)	Sum.rang badana	3034,000
	Sum.rang kontrola	794,000
	U	388,0000
Względem zmiennej: Grupa	Z	3,974864
	p	0,000070
Zaznaczone wyniki są istotne z $p < ,05000$	Z popraw.	3,975118
	p	0,000070
	N ważn. badana	59
	N ważn. kontrola	28
	2*1str. dokł. p	0,000042

W przeprowadzonym teście U Manna-Whitneya z poprawką na ciągłość stwierdzono istotną statystycznie różnicę w stężeniach COL 1 pomiędzy grupą badaną, a grupą kontrolną. Wynik analizy wskazuje na znaczącą dysproporcję w poziomach COL 1 w obu grupach, co potwierdza wartość $p < 0,001$.

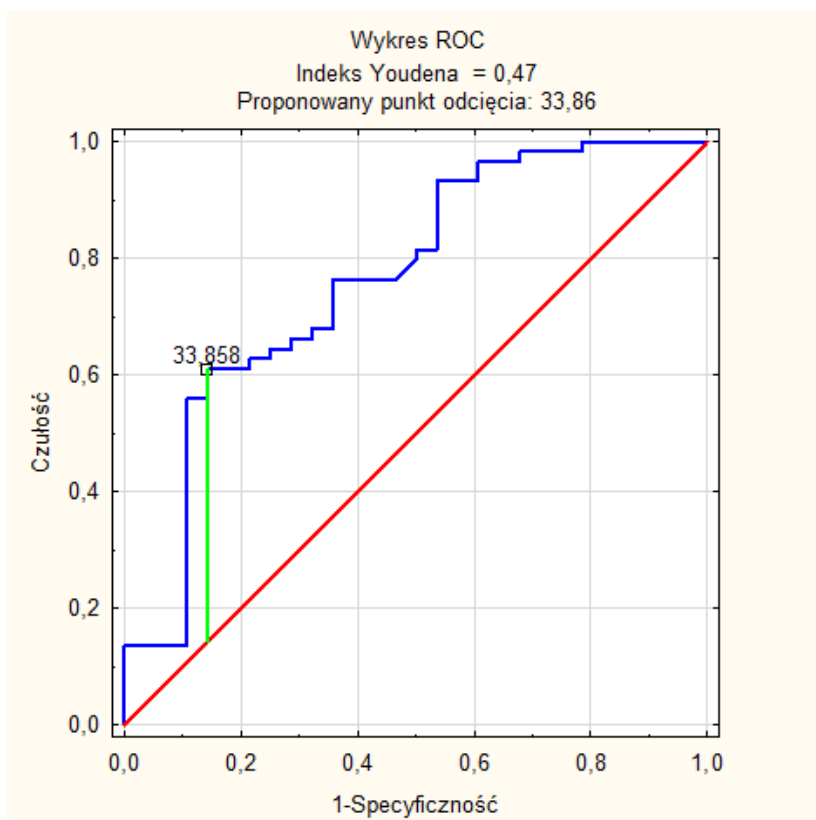


Rycina 6. Wykres pudełkowy, który obrazuje rozkład wartości zmiennej COL 1 w dwóch grupach: badanej i kontrolnej. Oś pionowa (y) - zawiera wartości zmiennej COL 1. Oś pozioma (x) - oznaczone są dwie grupy: badana i kontrolna.

Tabela 3. Wyniki regresji logistycznej z analizą wpływu zmiennej zależnej „grupa” i zmiennej niezależnej „COL1”.

N=87	Model: Regr. logistyczna (logit) N zer: 28 jedynek: 59 (Wyniki w Skoroszyt1) Zmn. zal.: Grupa Strata: Największe prawd. bł.średn kw.skal. Całkowita strata: 45,271960303 Chi2(1)=18,771 p=,00001	
	Stała B0	COL1
Ocena	-1,304964	0,06780779
Błąd standard.	0,5632115	0,01864839
t(85)	-2,317005	3,63612
p	0,02290862	0,0004734428
-95%CL	-2,42478	0,03072979
+95%CL	-0,1851488	0,1048858
Chi-kwadrat Walda	5,368515	13,22137
p	0,02050971	0,0002772098
Iloraz szans z.jedn.	0,2711822	1,07016
-95%CL	0,08849762	1,031207
+95%CL	0,8309807	1,110584
Iloraz szans zakr.		1997,448
-95%CL		31,3142
+95%CL		127411,8

Wzrost stężenia COL 1 istotnie statystycznie wpływa na wystąpienie przepukliny. Wynika to z ilorazu szans (OR) wynoszącego 1,07, co oznacza, że każde zwiększenie poziomu COL 1 o jedną jednostkę (ng/ml) wiąże się z 7% wzrostem prawdopodobieństwa wystąpienia przepukliny. Ten związek jest statystycznie istotny, co potwierdza bardzo niska wartość p ($p < 0,001$) oraz wąski przedział ufności dla ilorazu szans (95% CL: 1,03 – 1,11). Istnieje duże prawdopodobieństwo, iż w populacji ogólnej zwiększone stężenie COL 1 faktycznie wpływa na wzrost ryzyka przepukliny.



Rycina 7. Wykres krzywej ROC dla predykcji wystąpienia przepukliny na podstawie stężenia COL1. Oś pionowa (y) – czulość (wartości na tej osi mieszczą się w zakresie od 0 do 1, gdzie 1 oznacza perfekcyjną czulość, a 0 brak zdolności do wykrywania przypadków przepukliny). Oś pozioma (x): 1 – specyficzność (odwrotność specyficzności), czyli miara błędnie zakwalifikowanych przypadków. Wartości mieszczą się w zakresie od 0 do 1, gdzie 0 oznacza brak fałszywych alarmów, a 1 oznacza, że wszystkie przypadki są fałszywie pozytywne.

Tabela 4. Wartości współczynnika AUC dla zmiennej COL 1 w modelu predykcji przepukliny.

Zmienna: COL1					
AUC	SE	AUC Dolny 95%	AUC Górny 95%	$z = (v1-0,5)/v2$	p
0,765	0,057	0,653	0,877	4,646	0,0000

COL 1 może spełniać funkcję predyktora w ocenie ryzyka wystąpienia przepukliny. Model diagnostyczny, oparty na stężeniu COL 1, wykazuje dobrą skuteczność predykcyjną, z mocą testu wynoszącą 0,765 ($AUC > 0,5$) oraz wysoką istotność statystyczną ($p < 0,001$). Wyznaczono proponowany punkt odcięcia wynoszący 33,858 ng/ml. Oznacza to, że u badanych sztuk, u których stężenie COL 1 przekracza tę wartość, istnieje zwiększone prawdopodobieństwo wystąpienia przepukliny.

Tabela 5. Wyniki diagnostyczne testu przewidującego przepuklinę na podstawie zmiennej COL 1.

COL1	33,858
Badana	1
Kontrola	0
True positives	36
False positives	4
False negatives	23
True negatives	24
Sensitivity	0,610
Specificity	0,857
1-specificity	0,143
ACC	0,690
PPV	0,900
NPV	0,511
False positive ratio	0,143
False negative ratio	0,390
LR(+)	4,271
Error rate	0,310
Youden	0,467
LR(-)	0,455

Czułość 0,61

61,0% sztuk z przepukliną zostanie prawidłowo zakwalifikowana, czyli uzyska dodatni wynik testu.

Specyficzność 0,857

85,7% sztuk zdrowych uzyska wynik negatywny.

ACC (dokładność) – 0,690

W przypadku 69% badanych sztuk można być pewnym postawionej diagnozy.

PPV (wartość predykcyjna dodatnia) - 0,9

W przypadku 90,0% badanych sztuk uzyskujących wynik dodatni można być pewnym, że są obarczone wadą przepukliny.

NPV (wartość predykcyjna ujemna) – 0,511

W przypadku 51,1% badanych sztuk uzyskujących wynik negatywny można być pewnym, że są sztukami zdrowymi.

LR (+) – 4,271 – iloraz wiarygodności wyniku dodatniego

Szansa na to, że pozytywny wynik testu otrzyma sztuka z przepukliną jest ponad 4- krotnie większa, niż szansa, że wynik pozytywny otrzyma sztuka zdrowa.

LR (-) – 0,455 iloraz wiarygodności wyniku ujemnego

Szansa na to, że negatywny wynik testu otrzyma sztuka z przepukliną stanowi 45,5% szans na to, że negatywny wynik testu otrzyma zdrowa sztuka.

7.1.2. Stężenie kolagenu III w surowicy świńskiej grupy z wadą przepukliny, a grupą kontrolną.

Tabela 6. Statystyczna charakterystyka zmiennej COL 3 w grupie badanej i kontrolnej.

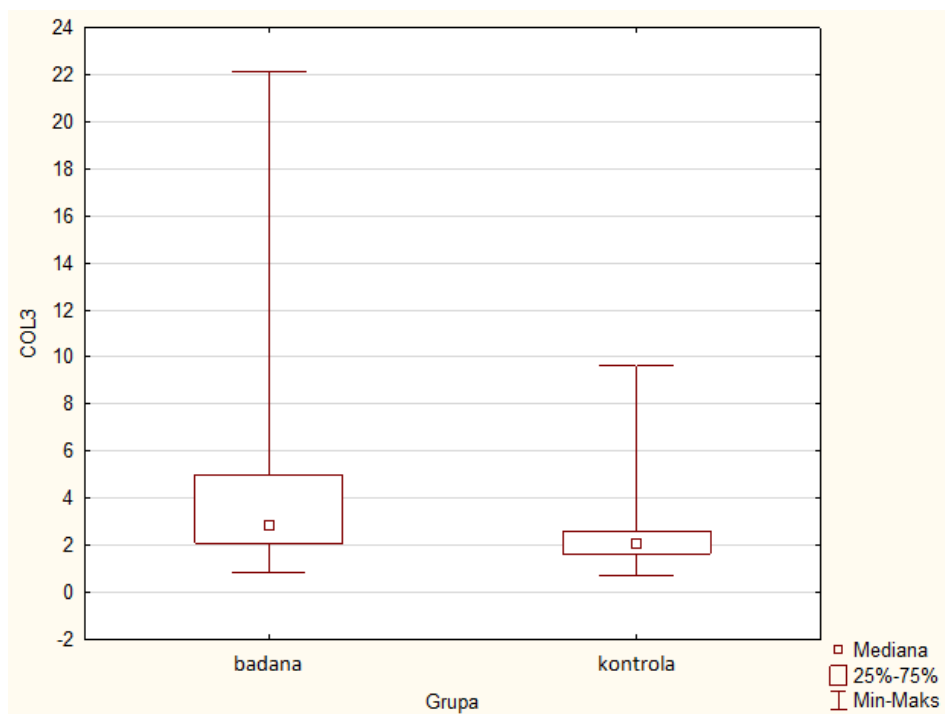
grupa	badana	kontrolna
ilość (szt)	59	28
średnia (ng/ml)	4,42	2,61
mediana (ng/ml)	2,83	2,05
minimum (ng/ml)	0,875	0,745
maksimum (ng/ml)	22,10	9,60
dolny kwartył (ng/ml)	2,09	1,639
górnny kwartył (ng/ml)	4,99	2,61
kwartył rozstęp (ng/ml)	2,90	0,97
odchylenie standardowe (ng/ml)	4,23	1,99

Stężenie kolagenu typu III w surowicy krwi świńskiej jest wyższe w grupie badanej w porównaniu do grupy kontrolnej, co potwierdzają zarówno wyższe wartości mediany i średniej. Przeciętne stężenie, czyli średnia, w grupie badanej wynosi 4,42 ng/ml, podczas gdy w grupie kontrolnej jest to 2,61 ng/ml. Mediana, czyli środkowa wartość stężenia, w grupie badanej osiąga 2,83 ng/ml, natomiast w grupie kontrolnej wynosi 2,05 ng/ml. Oznacza to, że połowa zwierząt w obu grupach ma stężenia powyżej, a połowa poniżej tych wartości. Podobnie jak w przypadku kolagenu typu I, w grupie badanej stwierdzono większą zmienność wyników. Jest to widoczne poprzez wyższe odchylenie standardowe oraz szerszy rozstęp kwartyłowy w porównaniu do grupy kontrolnej, co sugeruje większe zróżnicowanie stężeń w tej grupie. W grupie kontrolnej obserwuje się niższe wartości stężeń oraz bardziej jednolite wyniki, co oznacza mniejsze odchylenie od średniej i bardziej spójny rozkład wartości wśród badanych zwierząt.

Tabela 7. Wyniki testu U Manna-Whitneya (z poprawką na ciągłość) dla zmiennej COL 3 względem grupy z zaznaczeniem, które wyniki są istotne ($p < 0,05$).

Zmienna COL3		
Test U Manna-Whitneya (z poprawką na ciągłość)	Sum.rang badana	2905,000
	Sum.rang kontrola	923,000
	U	517,0000
Względem zmiennej: Grupa	Z	2,802847
	p	0,005066
Zaznaczone wyniki są istotne z $p < ,05000$	Z popraw.	2,803192
	p	0,005060
	N ważn. Badana	59
	N ważn. Kontrola	28
	2*1 str dokł. p	0,004614

W teście U Manna-Whitneya z poprawką na ciągłość wykazano istotną statystycznie różnicę w stężeniach COL 3 między grupą badaną, a grupą kontrolną. Analiza wskazuje, że poziomy COL 3 w obu grupach znacząco się różni, co potwierdza wartość $p < 0,01$.

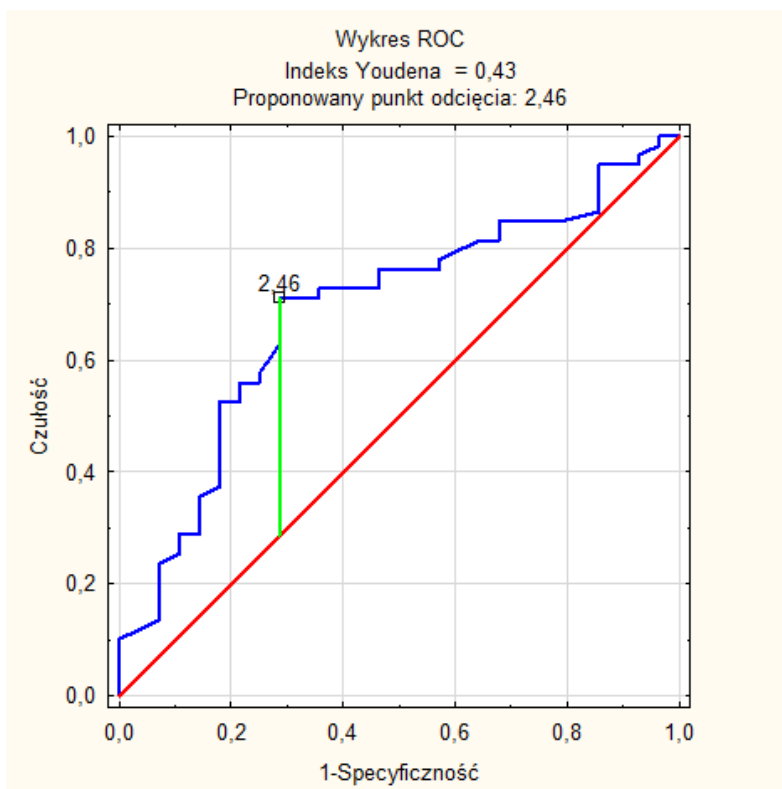


Rycina 8. Wykres pudełkowy, który obrazuje rozkład wartości zmiennej COL 3 w dwóch grupach: badanej i kontrolnej. Oś pionowa (y) - zawiera wartości zmiennej COL 3. Oś pozioma (x) - oznaczone są dwie grupy: badana i kontrolna.

Tabela 8. Wyniki regresji logistycznej z analizą wpływu zmiennej zależnej „grupa” i zmiennej niezależnej „COL3”.

N=87	Model: Regr. logistyczna (logit) N zer: 59 jedynek: 28 (Wyniki w Skoroszyt1) Zmn. zal.: Grupa Strata: Największe prawd. bł.średnkw.skala. Całkowita strata: 51,528665324 Chi2(1)=6,2578 p=,01237	
	Stała B0	COL3
Ocena	0,02798291	-0,2385789
Błąd standard.	0,4214352	0,1248376
t(85)	0,06639907	-1,911114
p	0,947216	0,05936041
-95%CL	-0,8099433	-0,4867896
+95%CL	0,865909	0,009631755
Chi-kwadrat Walda	0,004408836	3,652355
p	0,9470605	0,05599889
Iloraz szans z.jedn.	1,028378	0,7877465
-95%CL	0,4448833	0,6145963
+95%CL	2,377166	1,009678
Iloraz szans zakr.		0,006062767
-95%CL		0,0000299106
+95%CL		1,2289

Wzrost stężenia COL3 nie wpływa na ryzyko wystąpienia przepukliny, co zostało potwierdzone przez brak statystycznej istotności w analizie ($p > 0,05$). Oznacza to, że różnice w poziomach COL3 nie przekładają się znacząco na prawdopodobieństwo wystąpienia tej wady.



Rycina 9. Wykres krzywej ROC dla predykcji wystąpienia przepukliny na podstawie stężenia COL3. Oś pionowa (y) – czulość (wartości na tej osi mieszczą się w zakresie od 0 do 1, gdzie 1 oznacza perfekcyjną czulość, a 0 brak zdolności do wykrywania przypadków przepukliny). Oś pozioma (x): 1 – specyficzność (odwrotność specyficzności), czyli miara błędnie zakwalifikowanych przypadków. Wartości mieszczą się w zakresie od 0 do 1, gdzie 0 oznacza brak fałszywych alarmów, a 1 oznacza, że wszystkie przypadki są fałszywie pozytywne.

Tabela 9. Wartości współczynnika AUC dla zmiennej COL 3 w modelu predykcji przepukliny.

Zmienna: COL3					
AUC	SE	AUC Dolny 95%	AUC Górny 95%	$Z = (v-0,5)/v2$	p
0,688	0,06	0,57	0,806	3,116	0,0018

COL 3 może spełniać funkcję predyktora w ocenie ryzyka wystąpienia przepukliny. Moc testu wynosi 0,688 ($AUC > 0,5$) z wysoką istotnością statystyczną ($p < 0,01$). Wyznaczono proponowany punkt odcięcia wynoszący 2,46 ng/ml. Oznacza to, że u badanych sztuk, u których stężenie COL 3 przekracza tę wartość, istnieje zwiększone prawdopodobieństwo wystąpienia przepukliny.

Tabela 10. Wyniki diagnostyczne testu przewidującego przepuklinę na podstawie zmiennej COL 3.

COL 3	2,46
Badana	1
Kontrola	0
True positives	42
False positives	8
False negatives	17
True negatives	20
Sensitivity	0,712
Specificity	0,714
1-specificity	0,286
ACC	0,713
PPV	0,840
NPV	0,541
False positive ratio	0,286
False negative ratio	0,288
LR(+)	2,492
Error rate	0,287
Youden	0,426
LR(-)	0,403

Czułość 0,712

71,2% sztuk z przepukliną zostanie prawidłowo zakwalifikowana, czyli uzyska dodatni wynik testu.

Specyficzność 0,714

71,4% sztuk zdrowych uzyska wynik negatywny.

ACC (dokładność) – 0,713

W przypadku 71,3% badanych sztuk można być pewnym postawionej diagnozy.

PPV (wartość predykcyjna dodatnia) - 0,84

W przypadku 84,0% badanych sztuk uzyskujących wynik dodatni można być pewnym, że jest obciążona wadą przepukliny.

NPV (wartość predykcyjna ujemna) – 0,541

W przypadku 54,1% badanych sztuk uzyskujących wynik negatywny można być pewnym, że są zdrowe.

LR (+) – 2,492 – iloraz wiarygodności wyniku dodatniego

Szansa na to, że pozytywny wynik testu otrzyma sztuka z przepukliną jest ponad 2- krotnie większa, niż szansa, że wynik pozytywny otrzyma sztuka zdrowa.

LR (-) – 0,403 iloraz wiarygodności wyniku ujemnego

Szansa na to, że negatywny wynik testu otrzyma sztuka z przepukliną stanowi 40,3% szans na to, że negatywny wynik testu otrzyma zdrowa sztuka.

7.1.3. Stężenie kolagenu IV w surowicy świńskiej grupy z wadą przepukliny, a grupą kontrolną.

Tabela 11. Statystyczna charakterystyka zmiennej COL 4 w grupie badanej i kontrolnej.

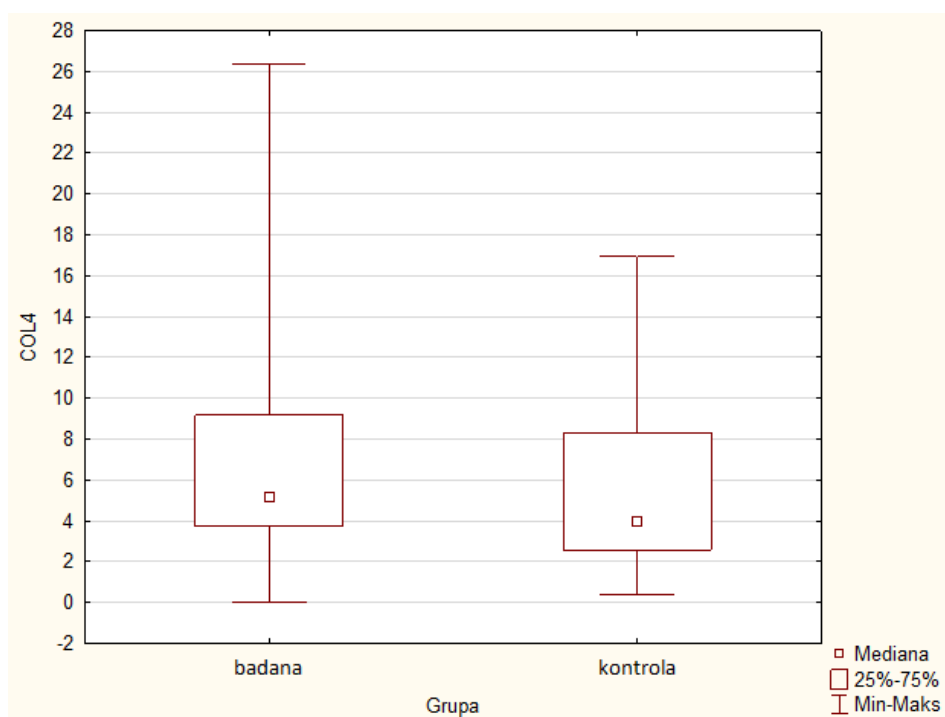
grupa	badana	kontrolna
ilość (szt)	59	28
średnia (ng/ml)	7,08	5,40
mediana (ng/ml)	5,14	3,96
minimum (ng/ml)	0,00	0,42
maksimum (ng/ml)	26,40	16,90
dolny kwartyl (ng/ml)	3,75	2,570
górnny kwartyl (ng/ml)	9,17	8,34
kwartyl rozstęp (ng/ml)	5,42	5,76
odchylenie standardowe (ng/ml)	5,43	3,75

Stężenie kolagenu IV w surowicy krwi świńskiej jest wyższe w grupie badanej niż w grupie kontrolnej, co potwierdzają zarówno wyższa średnia (7,08 ng/ml w porównaniu do 5,40 ng/ml), jak i mediana (5,14 ng/ml w porównaniu do 3,96 ng/ml). Grupa badana charakteryzuje się także większą zmiennością wyników, co widać po szerszym zakresie wartości (0,00–26,4 ng/ml) oraz wyższym odchyleniu standardowym - 5,43 ng/ml w stosunku do 3,75 ng/ml w grupie kontrolnej, która wykazuje bardziej jednolite stężenia, z mniejszą rozpiętością wyników i niższymi wartościami.

Tabela 12. Wyniki testu U Manna-Whitneya (z poprawką na ciągłość) dla zmiennej COL 4 względem grupy z zaznaczeniem, które wyniki są istotne ($p < 0,05$).

Zmienna COL4		
Test U Manna-Whitneya (z poprawką na ciągłość)	Sum.rang badana	2741,000
	Sum.rang kontrola	1087,000
	U	681,0000
Względem zmiennej: Grupa	Z	1,312841
	p	0,189237
Zaznaczone wyniki są istotne z $p < ,05000$	Z popraw.	1,313260
	p	0,189096
	N ważn. Badana	59
	N ważn. Kontrola	28
	2*1 str dokł. p	0,190425

Nie wykazano istotnej statystycznie różnicy w stężeniach COL 4 pomiędzy grupą badaną i grupą kontrolną ($p > 0,05$).

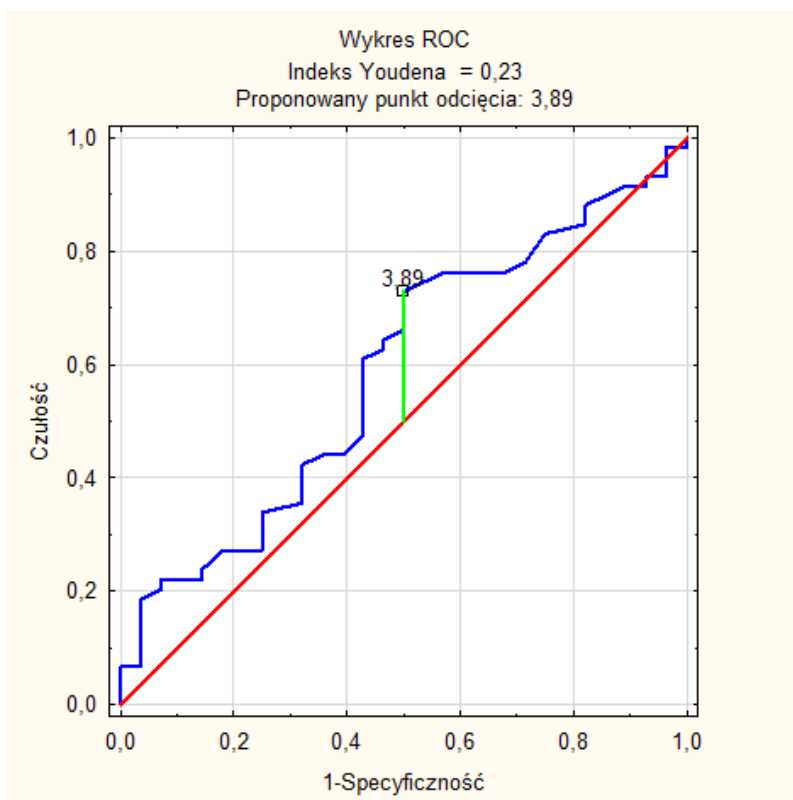


Rycina 10. Wykres pudełkowy, który obrazuje rozkład wartości zmiennej COL 4 w dwóch grupach: badanej i kontrolnej. Oś pionowa (y) - zawiera wartości zmiennej COL 4. Oś pozioma (x) - oznaczone są dwie grupy: badana i kontrolna.

Tabela 13. Wyniki regresji logistycznej z analizą wpływu zmiennej zależnej „grupa” i zmiennej niezależnej „COL4”.

N=87	Model: Regr. logistyczna (logit) N zer: 59 jedynek: 28 (Wyniki w Skoroszyt1) Zmn. zal.: Grupa Strata: Największe prawd. bł.średnkw.skal. Całkowita strata: 53,467822738 Chi2(1)=2,3795 p=,12295	
	Stała B0	COL4
Ocena	-0,2592584	-0,07888591
Błąd standard.	0,39189	0,0545711
t(85)	-0,661559	-1,445562
p	0,5100433	0,151977
-95%CL	-1,038441	-0,1873879
+95%CL	0,519924	0,02961605
Chi-kwadrat Walda	0,4376604	2,08965
p	0,5082586	0,1483098
Iloraz szans z.jedn.	0,7716236	0,9241453
-95%CL	0,3540062	0,8291221
+95%CL	1,6819	1,030059
Iloraz szans zakr.		0,1247057
-95%CL		0,007117736
+95%CL		2,184894

Wzrost stężenia COL 4 nie wpływa na wystąpienie wady przepukliny ($p > 0,05$).



Rycina 11. Wykres krzywej ROC dla predykcji wystąpienia przepukliny na podstawie stężenia COL 4. Oś pionowa (y) – czułość (wartości na tej osi mieszczą się w zakresie od 0 do 1, gdzie 1 oznacza perfekcyjną czułość, a 0 brak zdolności do wykrywania przypadków przepukliny). Oś pozioma (x): 1 – specyficzność (odwrotność specyficzności), czyli miara błędnie zakwalifikowanych przypadków. Wartości mieszczą się w zakresie od 0 do 1, gdzie 0 oznacza brak fałszywych alarmów, a 1 oznacza, że wszystkie przypadki są fałszywie pozytywne.

Tabela 14. Wartości współczynnika AUC dla zmiennej COL 4 w modelu predykcji przepukliny.

Zmienna: COL4					
AUC	SE	AUC Dolny 95%	AUC Górny 95%	$z = (v1-0,5)/v2$	p
0,588	0,065	0,46	0,715	1,351	0,1767

COL 4 nie może spełniać funkcji predyktora. Analiza wskazuje na stosunkowo niską moc testu (0,588), co świadczy o ograniczonej zdolności modelu do prawidłowego rozróżniania przypadków. Wartość AUC, która nieznacznie przekracza 0,5, sugeruje, że model działa zaledwie nieco lepiej niż przypadkowe klasyfikowanie. Dodatkowo brak statystycznej istotności ($p > 0,05$) potwierdza, że COL4 nie odgrywa istotnej roli jako predyktor w tym kontekście.

7.1.4. Stężenie metaloproteiny 2 w surowicy świńskiej grupy z wadą przepukliny, a grupą kontrolną.

Tabela 15. Statystyczna charakterystyka zmiennej MMP 2 w grupie badanej i kontrolnej.

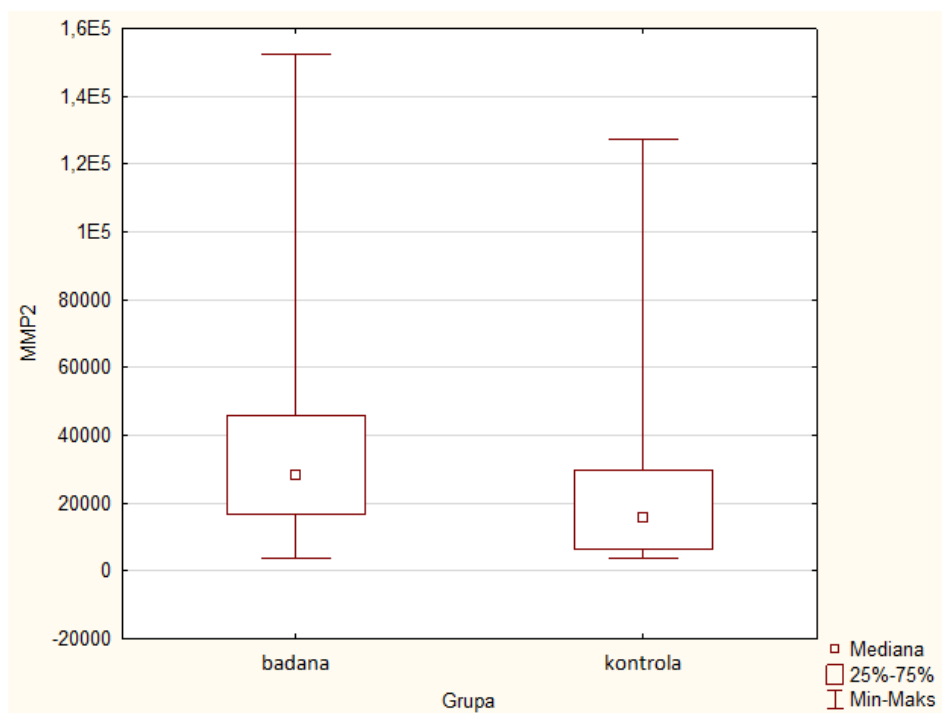
grupa	badana	kontrolna
ilość (szt)	59	28
średnia (pg/ml)	35 210,65	28 112,24
mediana (pg/ml)	28 285,71	15 714,29
minimum (pg/ml)	3 714,286	3 714,286
maksimum (pg/ml)	152 285,70	127 142,90
dolny kwartył (pg/ml)	16 857,14	6 571,429
górnny kwartył (pg/ml)	46 000,00	29 571,43
kwartył rozstęp (pg/ml)	29 142,86	23 000,00
odchylenie standardowe (pg/ml)	28 159,36	33 166,14

Stężenie metaloproteiny 2 jest wyższe w grupie badanej niż w grupie kontrolnej, co potwierdzają zarówno wyższa średnia (35 210,65 pg/ml w porównaniu do 28 112,24 pg/ml), jak i mediana (28 285,71 pg/ml w porównaniu do 15 714,29 pg/ml). W grupie badanej obserwuje się szerszy zakres stężeń (3 714,286–152 285,70 pg/ml) niż w kontrolnej (3 714,286–127 142,90 pg/ml). Grupa badana wykazuje także większy rozstęp kwartyłowy (29 142,86 pg/ml (grupa kontrolna - 23 000,00 pg/ml), co wskazuje na większą rozpiętość wyników. Mimo to, grupa kontrolna charakteryzuje się większym odchyleniem standardowym wynoszącym 33 166,14 pg/ml, niż w grupie badanej 28 159,36 pg/ml, co sugeruje większą zmienność stężeń w tej grupie.

Tabela 16. Wyniki testu U Manna-Whitneya (z poprawką na ciągłość) dla zmiennej MMP 2 względem grupy z zaznaczeniem, które wyniki są istotne ($p < 0,05$).

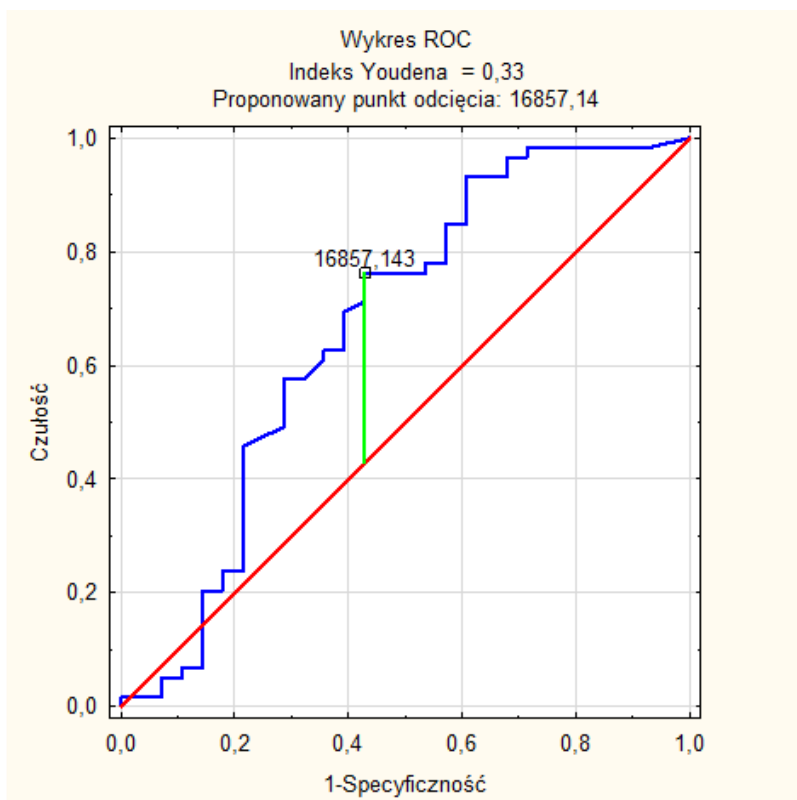
Zmienna MMP2		
Test U Manna-Whitneya (z poprawką na ciągłość)	Sum.rang badana	2871,500
	Sum.rang kontrola	956,500
	U	550,5000
Względem zmiennej: Grupa	Z	2,498486
	p	0,012473
Zaznaczone wyniki są istotne z $p < ,05000$	Z popraw.	2,498805
	p	0,012462
	N ważn. Badana	59
	N ważn. Kontrola	28
	2*1 str dokł. p	0,011709

Wykazano istotną statystycznie różnicę w stężeniach MMP 2 pomiędzy grupą badaną i grupą kontrolną ($p < 0,05$).



Rycina 12. Wykres pudełkowy, który obrazuje rozkład wartości zmiennej MMP2 w dwóch grupach: badanej i kontrolnej. Oś pionowa (y) - zawiera wartości zmiennej MMP2. Oś pozioma (x) - oznaczone są dwie grupy: badana i kontrolna.

Estymacja w regresji logistycznej dla zmiennej MMP2 była niepewna, prawdopodobnie z powodu nadmiarowości danych utrudniając precyzyjne oszacowanie jej wpływu.



Rycina 13. Wykres krzywej ROC dla predykcji wystąpienia przepukliny na podstawie stężenia MMP2. Oś pionowa (y) – czulość (wartości na tej osi mieszczą się w zakresie od 0 do 1, gdzie 1 oznacza perfekcyjną czulość, a 0 brak zdolności do wykrywania przypadków przepukliny). Oś pozioma (x): 1 – specyficzność (odwrotność specyficzności), czyli miara błędnie zakwalifikowanych przypadków. Wartości mieszczą się w zakresie od 0 do 1, gdzie 0 oznacza brak fałszywych alarmów, a 1 oznacza, że wszystkie przypadki są fałszywie pozytywne.

Tabela 17. Wartości współczynnika AUC dla zmiennej MMP 2 w modelu predykcji przepukliny.

Zmienna: MMP2					
AUC	SE	AUC Dolny 95%	AUC Górny 95%	$z = (v1-0,5)/v2$	p
0,667	0,069	0,531	0,802	2,414	0,0158

MMP 2 może spełniać rolę predyktora w ocenie ryzyka wystąpienia przepukliny. Analiza wskazuje, że moc testu wynosi 0,667 ($AUC > 0,5$) oraz istotność statystyczną ($p < 0,05$). Wyznaczono optymalny punkt odcięcia na poziomie 16857,143 pg/ml. Oznacza to, że u badanych sztuk, u których stężenie MMP 2 przekracza ten poziom, będą zakwalifikowane jako sztuki ze zwiększonym prawdopodobieństwem wystąpienia przepukliny.

Tabela 18. Wyniki diagnostyczne testu przewidującego przepuklinę na podstawie zmiennej MMP 2.

MMP 2	16857,143
Badana	1
Kontrola	0
True positives	45
False positives	12
False negatives	14
True negatives	16
Sensitivity	0,763
Specificity	0,571
1-specificity	0,429
ACC	0,701
PPV	0,789
NPV	0,533
False positive ratio	0,429
False negative ratio	0,237
LR(+)	1,780
Error rate	0,299
Youden	0,334
LR(-)	0,415

Czułość 0,763

76,3% sztuk z przepukliną zostanie prawidłowo zakwalifikowana, czyli uzyska dodatni wynik testu.

Specyficzność 0,571

57,1% sztuk zdrowych uzyska wynik negatywny.

ACC (dokładność) – 0,701

W przypadku 70,1% badanych sztuk można być pewnym postawionej diagnozy.

PPV (wartość predykcyjna dodatnia) - 0,789

W przypadku 78,9% badanych sztuk uzyskujących wynik dodatni można być pewnym, że są sztukami z przepukliną.

NPV (wartość predykcyjna ujemna) – 0,533

W przypadku 53,3% badanych sztuk uzyskujących wynik negatywny można być pewnym, że są zdrowe.

LR (+) – 1,780 – iloraz wiarygodności wyniku dodatniego

Szansa na to, że pozytywny wynik testu otrzyma sztuka z przepukliną jest 1,78 raza większa, niż szansa, że wynik pozytywny otrzyma sztuka zdrowa.

LR (-) – 0,415 iloraz wiarygodności wyniku ujemnego

Szansa na to, że negatywny wynik testu otrzyma sztuka z przepukliną stanowi 41,5% szans na to, że negatywny wynik testu otrzyma sztuka zdrowa.

7.1.5. Stężenie metaloproteinazy 9 w surowicy świńskiej grupy z wadą przepukliny, a grupą kontrolną.

Tabela 19. Statystyczna charakterystyka zmiennej MMP 9 w grupie badanej i kontrolnej.

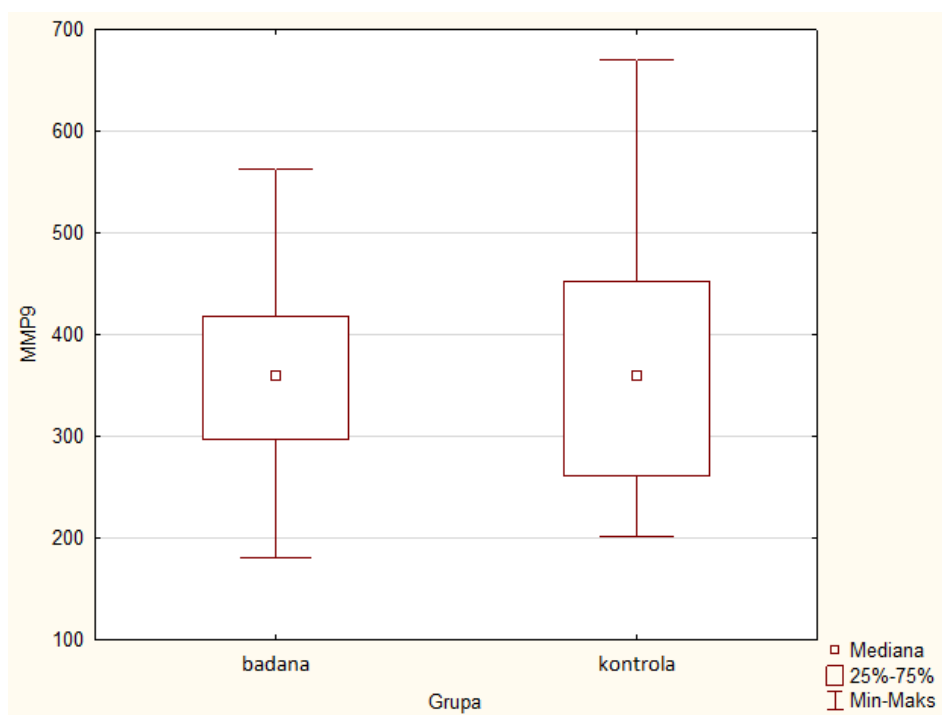
grupa	badana	kontrolna
ilość (szt)	59	28
średnia (ng/ml)	363,39	371,62
mediana (ng/ml)	359,49	360,41
minimum (ng/ml)	179,93	201,76
maksimum (ng/ml)	563,20	670,60
dolny kwartył (ng/ml)	296,50	260,57
górnny kwartył (ng/ml)	418,35	452,17
kwartył rozstęp (ng/ml)	121,85	191,60
odchylenie standardowe (ng/ml)	87,65	126,10

Stężenie substancji w grupach badanej i kontrolnej jest bardzo zbliżone, o czym świadczą wartości średnich (363,39 ng/ml w grupie badanej i 371,62 ng/ml w grupie kontrolnej) oraz median (359,49 ng/ml w grupie badanej, 360,41 ng/ml w grupie kontrolnej). W grupie badanej stężenia wahają się od 179,93 ng/ml do 563,20 ng/ml, natomiast w grupie kontrolnej zakres ten wynosi od 201,76 ng/ml do 670,60 ng/ml, co wskazuje na większą zmienność w grupie kontrolnej. Grupa kontrolna wykazuje również większy kwartyłowy rozstęp (191,60 ng/ml grupa kontrolna, 121,85 ng/ml grupa badana) oraz wyższe odchylenie standardowe (126,10 ng/ml grupa kontrolna, 87,65 ng/ml dla grupa badana), co sugeruje, że wyniki w tej grupie są bardziej rozproszone i zróżnicowane.

Tabela 20. Wyniki testu U Manna-Whitneya (z poprawką na ciągłość) dla zmiennej MMP 9 względem grupy z zaznaczeniem, które wyniki są istotne ($p < 0,05$).

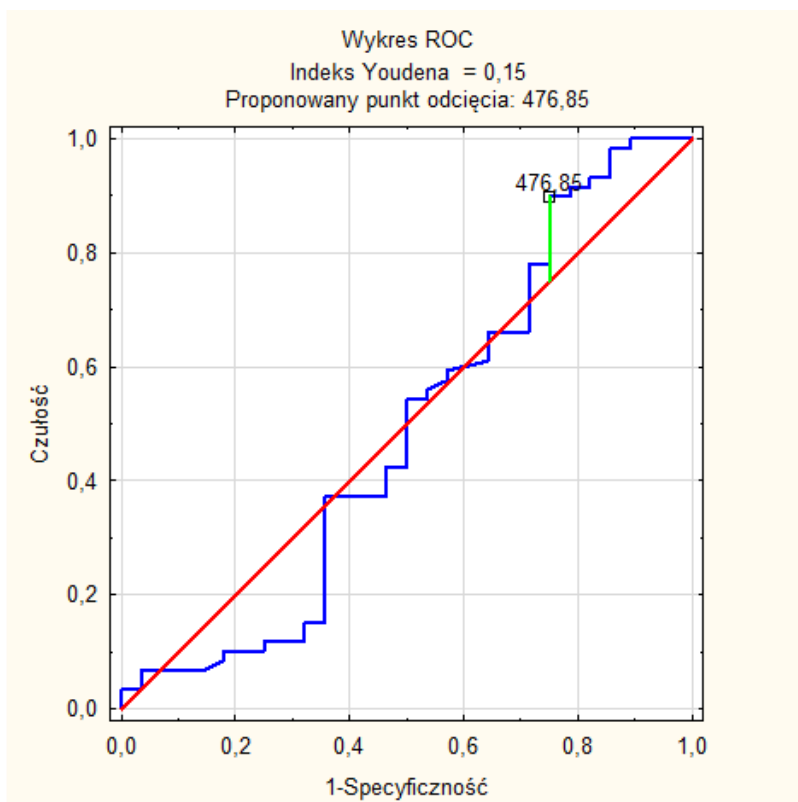
Zmienna MMP9		
Test U Manna-Whitneya (z poprawką na ciągłość)	Sum.rang badana	2620,000
	Sum.rang kontrola	1208,000
	U	802,0000
Względem zmiennej: Grupa	Z	0,213507
	p	0,830932
Zaznaczone wyniki są istotne z $p < ,05000$	Z popraw.	0,213514
	p	0,830926
	N ważn. Badana	59
	N ważn. Kontrola	28
	2*1 str dokł. p	0,831951

Nie wykazano istotnej statystycznie różnicy w stężeniach MMP 9 pomiędzy grupą badaną i grupą kontrolną ($p > 0,05$).



Rycina 14. Wykres pudełkowy, który obrazuje rozkład wartości zmiennej MMP 9 w dwóch grupach: badanej i kontrolnej. Oś pionowa (y) - zawiera wartości zmiennej MMP 9. Oś pozioma (x) - oznaczone są dwie grupy: badana i kontrolna.

Estymacja w regresji logistycznej dla zmiennej MMP 9 była niepewna, prawdopodobnie z powodu nadmiarowości danych utrudniając precyzyjne oszacowanie jej wpływu.



Rycina 15. Wykres krzywej ROC dla predykcji wystąpienia przepukliny na podstawie stężenia MMP9. Oś pionowa (y) – czulość (wartości na tej osi mieszczą się w zakresie od 0 do 1, gdzie 1 oznacza perfekcyjną czulość, a 0 brak zdolności do wykrywania przypadków przepukliny). Oś pozioma (x): 1 – specyficzność (odwrotność specyficzności), czyli miara błędnie zakwalifikowanych przypadków. Wartości mieszczą się w zakresie od 0 do 1, gdzie 0 oznacza brak fałszywych alarmów, a 1 oznacza, że wszystkie przypadki są fałszywie pozytywne.

Tabela 21. Wartości współczynnika AUC dla zmiennej MMP 9 w modelu predykcji przepukliny.

Zmienna: MMP9					
AUC	SE	AUC Dolny 95%	AUC Górny 95%	$z = (v1-0,5)/v2$	p
0,485	0,073	0,343	0,628	-0,2	0,8413

MMP9 nie może spełniać funkcji skutecznego predyktora. Moc testu wynosząca 0,485 ($AUC < 0,5$) wskazuje na brak predykcyjnej zdolności tego markera. Ponadto brak istotności statystycznej ($p > 0,05$) potwierdza, że MMP9 nie ma znaczącego wpływu jako predyktor w analizowanym modelu.

7.1.6. Porównanie wartości stosunków: COL1/COL3

Tabela 22. Statystyczna charakterystyka zmiennej COL1/COL3 w grupie badanej i kontrolnej.

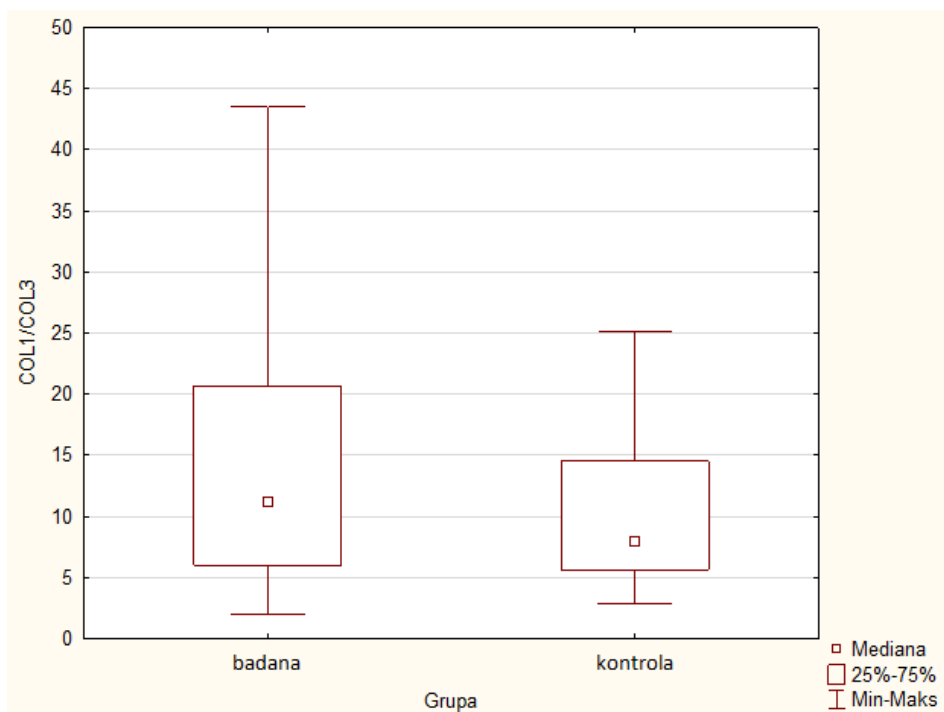
grupa	badana	kontrolna
ilość (szt)	59	28
średnia	14,29	9,90
mediana	11,26	8,01
minimum	1,955	2,902
maksimum	43,50	25,20
dolny kwartyl	6,01	5,623
górnny kwartyl	20,66	14,52
kwartyl rozstęp	14,64	8,90
odchylenie standardowe	10,38	5,81

W grupie badanej średnia wartość stosunku COL1/COL3 wynosi 14,29, a w grupie kontrolnej 9,90, co wskazuje na wyższe stężenie w grupie badanej. Mediana również jest wyższa w grupie badanej (11,26) w porównaniu do kontrolnej (8,01). Zakres wartości w grupie badanej (1,955 - 43,50) jest szerszy niż w grupie kontrolnej (2,902 - 25,20), co sugeruje większą zmienność wyników. Grupa badana wykazuje również większy rozstęp kwartylowy 14,64 (grupa kontrolna - 8,90) oraz wyższe odchylenie standardowe 10,38 (grupa kontrolna - 5,81), co potwierdza większe zróżnicowanie wyników w tej grupie.

Tabela 23. Wyniki testu U Manna-Whitneya (z poprawką na ciągłość) dla zmiennej COL1/COL3 względem grupy z zaznaczeniem, które wyniki są istotne ($p < 0,05$).

Zmienna COL1/COL3		
Test U Manna-Whitneya (z poprawką na ciągłość)	Sum.rang badana	2763,000
	Sum.rang kontrola	1065,000
	U	659,0000
Względem zmiennej: Grupa	Z	1,512720
	p	0,130352
Zaznaczone wyniki są istotne z $p < ,05000$	Z popraw.	1,512720
	p	0,130352
	N ważn. Badana	59
	N ważn. Kontrola	28
	2*1 str dokł. p	0,130929

Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w wartościach stosunku COL1 do COL3 między grupą badaną, a grupą kontrolną. Wyniki analizy wskazują, że różnice między tymi grupami nie osiągnęły poziomu istotności statystycznej ($p > 0,05$).

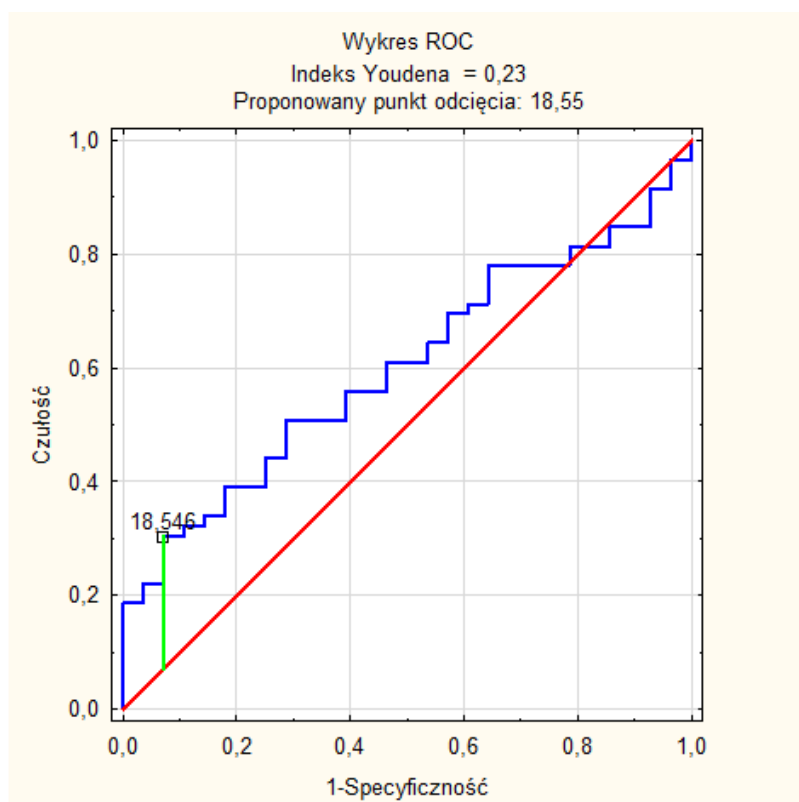


Rycina 16. Wykres pudełkowy, który obrazuje rozkład wartości zmiennej COL1/COL3 w dwóch grupach: badanej i kontrolnej. Oś pionowa (y) - zawiera wartości zmiennej COL1/COL3. Oś pozioma (x) - oznaczone są dwie grupy: badana i kontrolna.

Tabela 24. Wyniki regresji logistycznej z analizą wpływu zmiennej zależnej „grupa” i zmiennej niezależnej „COL1/COL3”.

N=87	Model: Regr. logistyczna (logit) N zer: 59 jedynek: 28 (Wyniki w Skoroszyc1) Zmn. zal.: Grupa Strata: Największe prawd. bł.średnkw.skala. Całkowita strata: 52,304610436 Chi2(1)=4,7059 p=,03007	
	Stała B0	COL1/COL3
Ocena	-0,02383408	-0,06087688
Błąd standard.	0,4070549	0,03067598
t(85)	-0,0585525	-1,984513
p	0,953446	0,05042455
-95%CL	-0,8331683	-0,121869
+95%CL	0,7855002	0,0001151979
Chi-kwadrat Walda	0,003428395	3,93829
p	0,9533089	0,04720724
Iloraz szans z.jedn.	0,9764477	0,9409391
-95%CL	0,4346699	0,8852644
+95%CL	2,193504	1,000115
Iloraz szans zakr.		0,07955241
-95%CL		0,006298344
+95%CL		1,004802

Wzrost stosunku stężenia COL1/COL3 nie wpływa na wystąpienie przepukliny ($p > 0,05$).



Rycina 17. Wykres krzywej ROC dla predykcji wystąpienia przepukliny na podstawie stężenia COL1/COL3. Oś pionowa (y) – czulość (wartości na tej osi mieszczą się w zakresie od 0 do 1, gdzie 1 oznacza perfekcyjną czulość, a 0 brak zdolności do wykrywania przypadków przepukliny). Oś pozioma (x): 1 – specyficzność (odwrotność specyficzności), czyli miara błędnie zakwalifikowanych przypadków. Wartości mieszczą się w zakresie od 0 do 1, gdzie 0 oznacza brak fałszywych alarmów, a 1 oznacza, że wszystkie przypadki są fałszywie pozytywne).

Tabela 25. Wartości współczynnika AUC dla zmiennej COL1/COL3 w modelu predykcji przepukliny.

Zmienna: COL1/COL3					
AUC	SE	AUC Dolny 95%	AUC Górny 95%	$Z = \frac{AUC - 0,5}{\sqrt{SE}}$	P
0,601	0,061	0,482	0,72	1,667	0,0954

Stosunek COL1/COL3 nie wykazuje odpowiednich właściwości do pełnienia funkcji predyktora. Moc testu wynosząca 0,601, nie osiąga wystarczającego poziomu, aby uznać stosunek COL1/COL3 za skuteczny predyktor. Brak statystycznej istotności ($p > 0,05$)

potwierdza, że wskaźnik ten nie odgrywa znaczącej roli w prognozowaniu analizowanego zjawiska.

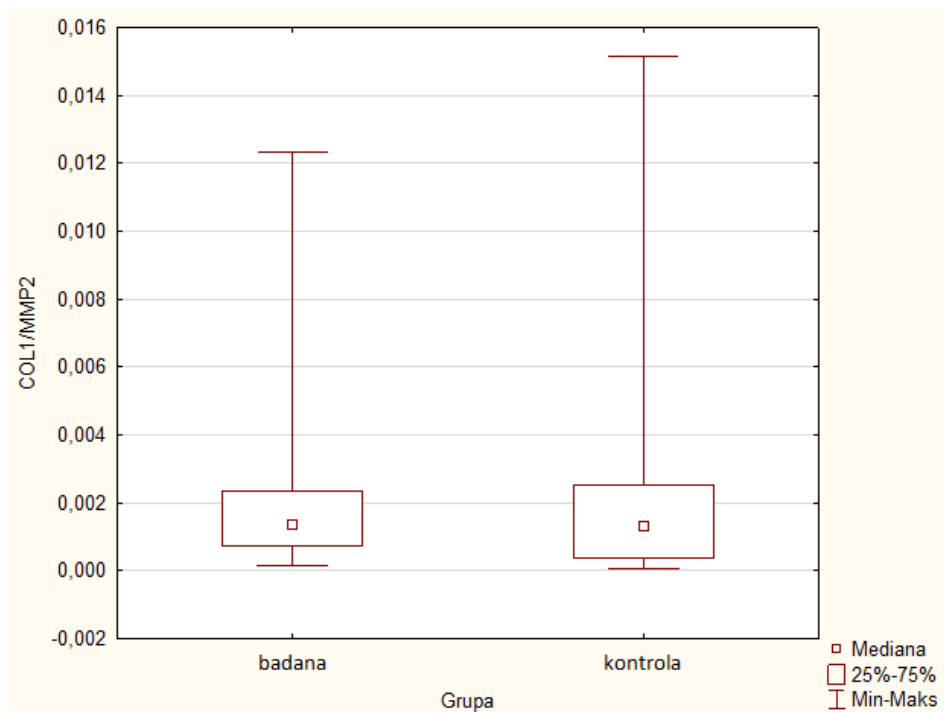
7.1.7. Porównanie wartości stosunków: COL1/MMP2

Wyniki statystyki opisowej wskazują, że zarówno w grupie badanej, jak i kontrolnej nie zaobserwowano żadnych mierzalnych wartości w stosunku COL1/MMP2.

Tabela 26. Wyniki testu U Manna-Whitneya (z poprawką na ciągłość) dla zmiennej COL1/MMP2 względem grupy z zaznaczeniem, które wyniki są istotne ($p < 0,05$).

Zmienna COL1/MMP2		
Test U Manna-Whitneya (z poprawką na ciągłość)	Sum.rang badana	2658,000
	Sum.rang kontrola	1170,000
	U	764,0000
Względem zmiennej: Grupa	Z	0,558752
	p	0,576331
Zaznaczone wyniki są istotne z $p < 0,05000$	Z popraw.	0,558752
	p	0,576331
	N ważn. Badana	59
	N ważn. Kontrola	28
	2*1 str dokł. p	0,578460

Nie wykazano istotnej statystycznie różnicy w wartościach stosunku COL1/MMP2 pomiędzy grupą badaną i grupą kontrolną ($p > 0,05$).

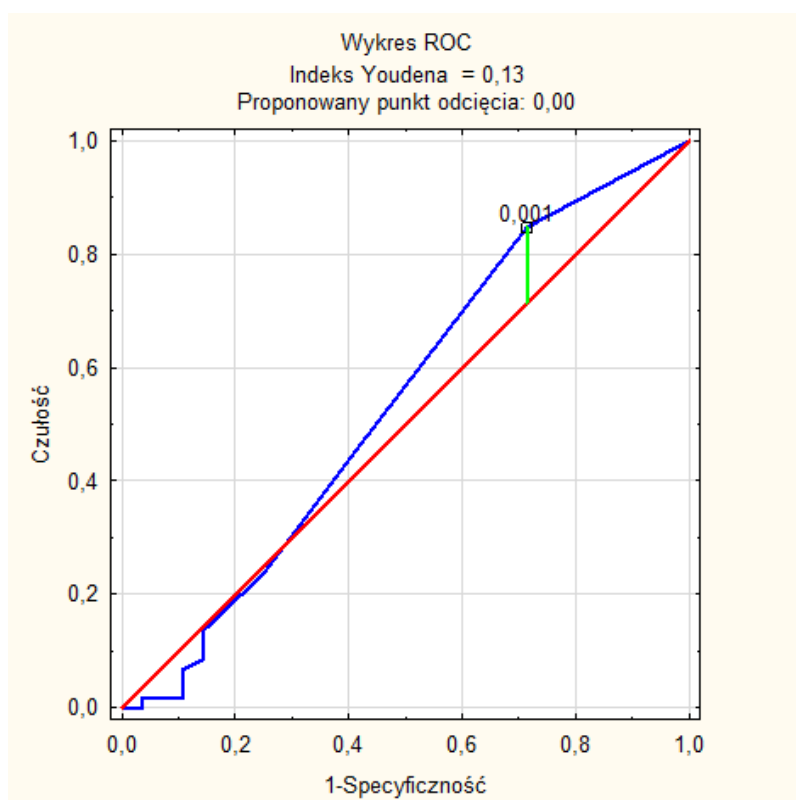


Rycina 18. Wykres pudełkowy, który obrazuje rozkład wartości zmiennej COL1/MMP2 w dwóch grupach: badanej i kontrolnej. Oś pionowa (y) - zawiera wartości zmiennej COL1/MMP2. Oś pozioma (x) - oznaczone są dwie grupy: badana i kontrolna.

Tabela 27. Wyniki regresji logistycznej z analizą wpływu zmiennej zależnej „grupa” i zmiennej niezależnej „COL1/MMP2”.

N=87	Model: Regr. logistyczna (logit) N zer: 59 jedynek: 28 (Wyniki w Skoroszyt1)	
	Zmn. zal.: Grupa Strata: Największe prawd. bł.średnkw.skal. Całkowita strata: 54,440780130 Chi2(1)=,43358 p=,51024	
	Stała B0	COL1/MMP2
Ocena	-0,8721856	59,87568
Błąd standard.	0,3014558	90,17859
t(85)	-2,893245	0,6639678
p	0,004842241	0,508508
-95%CL	-1,47156	-119,4235
+95%CL	-0,2728107	239,1749
Chi-kwadrat Walda	8,37087	0,4408533
p	0,003815403	0,5067157
Iloraz szans z.jedn.	0,4180369	
-95%CL	0,229567	0
+95%CL	0,7612368	
Iloraz szans zakr.		2,463372
-95%CL		0,1656089
+95%CL		36,64177

Wzrost stosunku stężenia COL1/MMP2 nie wpływa na wystąpienie przepukliny ($p > 0,05$).



Rycina 19. Wykres krzywej ROC dla predykcji wystąpienia przepukliny na podstawie stężenia COL1/MMP2. Oś pionowa (y) – czulość (wartości na tej osi mieszczą się w zakresie od 0 do 1, gdzie 1 oznacza perfekcyjną czulość, a 0 brak zdolności do wykrywania przypadków przepukliny). Oś pozioma (x): 1 – specyficzność (odwrotność specyficzności), czyli miara błędnie zakwalifikowanych przypadków. Wartości mieszczą się w zakresie od 0 do 1, gdzie 0 oznacza brak fałszywych alarmów, a 1 oznacza, że wszystkie przypadki są fałszywie pozytywne.

Tabela 28. Wartości współczynnika AUC dla zmiennej COL1/MMP2 w modelu predykcji przepukliny.

Zmienna: COL1/MMP2					
AUC	SE	AUC Dolny 95%	AUC Górny 95%	$Z = \frac{AUC - 0,5}{\sqrt{SE}}$	P
0,54	0,07	0,403	0,678	0,574	0,5663

COL1/MMP2 nie może spełniać funkcji predyktora ryzyka wystąpienia przepukliny. Moc testu jest niska i wynosi 0,54 ($AUC > 0,5$). Dodatkowo wartość prawdopodobieństwa przekracza poziom istotności ($p > 0,05$).

7.1.8. Porównanie wartości stosunków: COL1/MMP9

Tabela 29. Statystyczna charakterystyka zmiennej COL1/MMP9 w grupie badanej i kontrolnej.

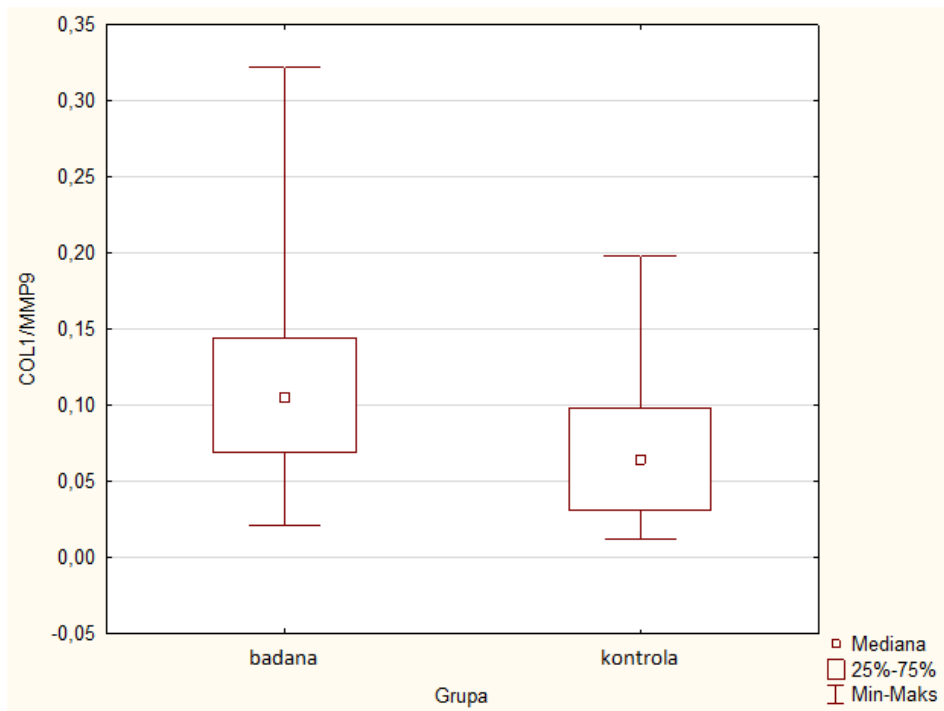
grupa	badana	kontrolna
ilość (szt)	59	28
średnia	0,12	0,07
mediana	0,11	0,06
minimum	0,022	0,012
maksimum	0,30	0,20
dolny kwartyl	0,07	0,031
górnny kwartyl	0,14	0,10
kwartyl rozstęp	0,08	0,07
odchylenie standardowe	0,06	0,05

Wyniki statystyki opisowej pokazują, że stosunek COL1/MMP9 jest nieco wyższy w grupie badanej niż w kontrolnej, z średnią 0,12 w grupie badanej i 0,07 w grupie kontrolnej. Mediana również jest wyższa w grupie badanej (0,11) niż w kontrolnej (0,06). Zakres wartości stosunków w grupie badanej (0,022–0,30) jest szerszy niż w kontrolnej (0,012–0,20). Dolny kwartyl wynosi 0,07 w grupie badanej i 0,031 w kontrolnej, natomiast górny kwartyl odpowiednio to 0,14 i 0,10, co wskazuje na zbliżoną rozpiętość wyników w obu grupach. Odchylenie standardowe jest nieco wyższe w grupie badanej 0,06 (w grupie kontrolnej - 0,05), co sugeruje większą zmienność wyników.

Tabela 30. Wyniki testu U Manna-Whitneya (z poprawką na ciągłość) dla zmiennej COL1/MMP9 względem grupy zaznaczeniem, które wyniki są istotne ($p < 0,05$).

Zmienna COL1/MMP9		
Test U Manna-Whitneya (z poprawką na ciągłość)	Sum.rang badana	3008,000
	Sum.rang kontrola	820,000
Względem zmiennej: Grupa	U	414,0000
	Z	3,738644
Zaznaczone wyniki są istotne z $p < ,05000$	p	0,000185
	Z popraw.	3,738644
	p	0,000185
	N ważn. Badana	59
	N ważn. Kontrola	28
	2*1 str dokł. p	0,000126

Analiza wykazała statystycznie istotną różnicę w wartościach stosunku COL1 do MMP9 między grupą badaną, a grupą kontrolną. Wynik ten, przy wysokiej istotności statystycznej ($p < 0,001$), sugeruje wyraźne różnice między obiema grupami.

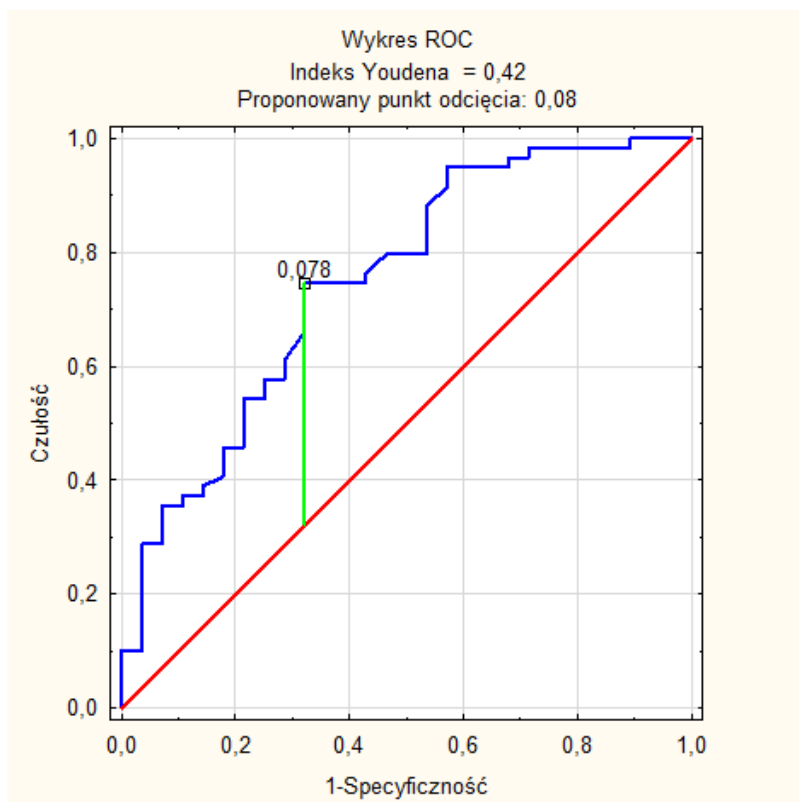


Rycina 20. Wykres pudełkowy, który obrazuje rozkład wartości zmiennej COL1/MMP9 w dwóch grupach: badanej i kontrolnej. Oś pionowa (y) - zawiera wartości zmiennej COL1/MMP9. Oś pozioma (x) - oznaczone są dwie grupy: badana i kontrolna.

Tabela 31. Wyniki regresji logistycznej z analizą wpływu zmiennej zależnej „grupa” i zmiennej niezależnej „COL1/MMP9”.

N=87	Model: Regr. logistyczna (logit) N zer: 59 jedynek: 28 (Wyniki w Skoroszyt1) Zmn. zal.: Grupa Strata: Największe prawd. bł.średnkw.skala. Całkowita strata: 46,948060616 Chi2(1)=15,419 p=,00009	
	Stała B0	COL1/MMP9
Ocena	1,020147	-20,095
Błąd standard.	0,5426343	6,113185
t(85)	1,879989	-3,287158
p	0,06353506	0,001472506
-95%CL	-0,05875561	-32,24965
+95%CL	2,099049	-7,940352
Chi-kwadrat Walda	3,53436	10,8054
p	0,06011857	0,001013132
Iloraz szans z.jedn.	2,773602	0,000000001874356
-95%CL	0,9429372	9,86631700E-15
+95%CL	8,158409	0,0003560812
Iloraz szans zakr.		0,00197633
-95%CL		0,00004573354
+95%CL		0,08540517

W przeprowadzonej analizie regresji logistycznej otrzymano ujemny współczynnik dla zmiennej COL1/MMP9, co sugeruje, że wyższe wartości tej zmiennej zmniejszają prawdopodobieństwo przynależności do grupy badanej. Jest to sprzeczne z wcześniejszymi wynikami i założeniami, dlatego nie uwzględniono jej w interpretacji.



Rycina 21. Wykres krzywej ROC dla predykcji wystąpienia przepukliny na podstawie stężenia COL1/MMP9. Oś pionowa (y) – czułość (wartości na tej osi mieszczą się w zakresie od 0 do 1, gdzie 1 oznacza perfekcyjną czułość, a 0 brak zdolności do wykrywania przypadków przepukliny). Oś pozioma (x): 1 – specyficzność (odwrotność specyficzności), czyli miara błędnie zakwalifikowanych przypadków. Wartości mieszczą się w zakresie od 0 do 1, gdzie 0 oznacza brak fałszywych alarmów, a 1 oznacza, że wszystkie przypadki są fałszywie pozytywne.

Tabela 32. Wartości współczynnika AUC dla zmiennej COL1/MMP9 w modelu predykcji przepukliny.

Zmienna: COL1/MMP9					
AUC	SE	AUC Dolny 95%	AUC Górny 95%	$Z = \frac{AUC - 0,5}{\sqrt{SE}}$	p
0,749	0,057	0,637	0,861	4,362	0,0000

COL1/MMP9 może spełniać funkcję predyktora w ocenie ryzyka wystąpienia przepukliny. Moc testu wynosi 0,749 ($AUC > 0,5$) z wysoką istotnością statystyczną ($p < 0,001$). Wyznaczono optymalny punkt odcięcia na poziomie 0,078. Oznacza to, że sztuki, u których wskaźnik COL1/MMP9 przekroczy tę wartość, będą klasyfikowane jako sztuki ze zwiększonym prawdopodobieństwem wystąpienia przepukliny.

Tabela 33. Wyniki diagnostyczne testu przewidującego przepuklinę na podstawie zmiennej COL1/MMP9.

COL1/MMP9	0,078
Badana	1
Kontrola	0
True positives	44
False positives	9
False negatives	15
True negatives	19
Sensitivity	0,746
Specificity	0,679
1-specificity	0,321
ACC	0,724
PPV	0,830
NPV	0,559
False positive ratio	0,321
False negative ratio	0,254
LR(+)	2,320
Error rate	0,276
Youden	0,424
LR(-)	0,375

Czułość 0,746

74,6% sztuk z przepukliną zostanie prawidłowo zakwalifikowana, czyli uzyska dodatni wynik testu.

Specyficzność 0,679

67,9% sztuk zdrowych uzyska wynik negatywny.

ACC (dokładność) – 0,724

W przypadku 72,4% sztuk badanych można być pewnym postawionej diagnozy.

PPV (wartość predykcyjna dodatnia) - 0,830

W przypadku 83,0% sztuk badanych uzyskujących wynik dodatni można być pewnym, że są sztukami z przepukliną.

NPV (wartość predykcyjna ujemna) – 0,559

W przypadku 55,9% sztuk badanych uzyskujących wynik negatywny można być pewnym, że są sztukami zdrowymi.

LR (+) – 2,320 – iloraz wiarygodności wyniku dodatniego

Szansa na to, że pozytywny wynik testu otrzyma sztuka z przepukliną jest ponad 2 - krotnie większa, niż szansa, że wynik pozytywny otrzyma sztuka zdrowa.

LR (-) – 0,375 iloraz wiarygodności wyniku ujemnego

Szansa na to, że negatywny wynik testu otrzyma sztuka z przepukliną stanowi 37,5% szans na to, że negatywny wynik testu otrzyma sztuka zdrowa.

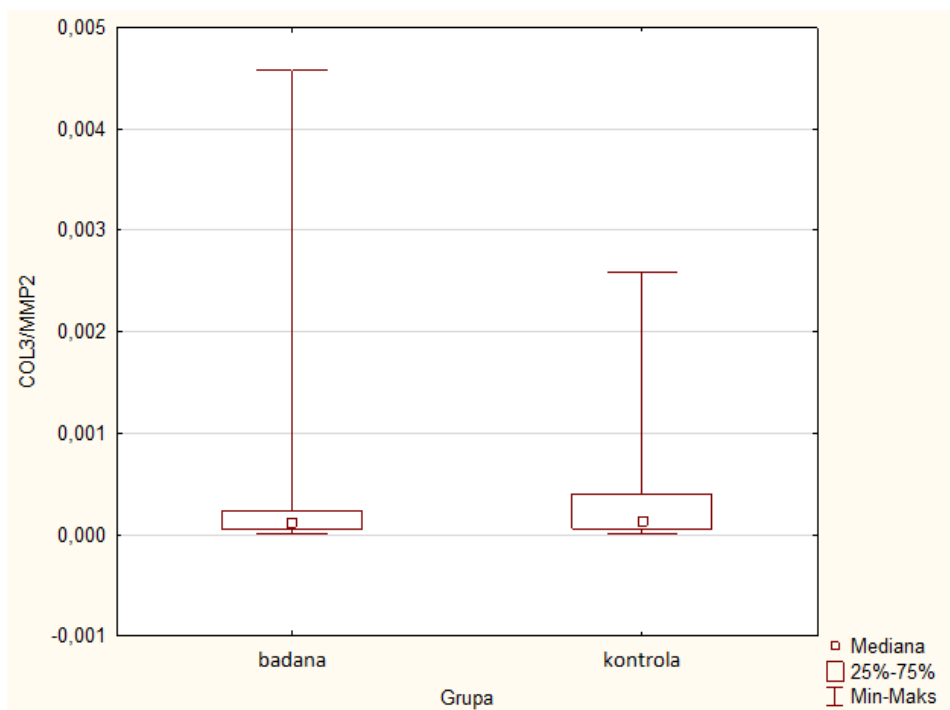
7.1.9. Porównanie wartości stosunków: COL3/MMP2

Wyniki statystyki opisowej wskazują, że zarówno w grupie badanej, jak i kontrolnej nie zaobserwowano żadnych mierzalnych wartości w stosunku COL3/MMP2.

Tabela 34. Wyniki testu U Manna-Whitneya (z poprawką na ciągłość) dla zmiennej COL3/MMP2 względem grupy z zaznaczeniem, które wyniki są istotne ($p < 0,05$).

Zmienna COL3/MMP2		
Test U Manna-Whitneya (z poprawką na ciągłość)	Sum.rang badana	2555,000
	Sum.rang kontrola	1273,000
Względem zmiennej: Grupa	U	785,0000
	Z	-0,367959
Zaznaczone wyniki są istotne z $p < ,05000$	p	0,712904
	Z popraw.	-0,367959
	p	0,712904
	N ważn. Badana	59
	N ważn. Kontrola	28
	2*1 str dokł. p	0,714533

Nie wykazano istotnej statystycznie różnicy w wartościach stosunku COL 3/MMP 2 pomiędzy grupą badaną i grupą kontrolną ($p > 0,05$).

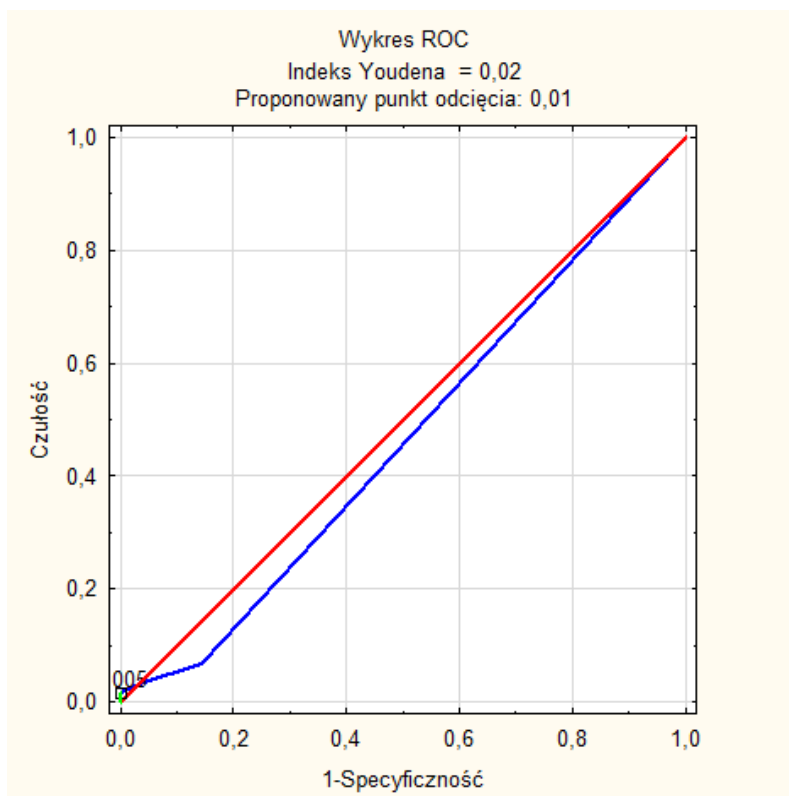


Rycina 22. Wykres pudełkowy, który obrazuje rozkład wartości zmiennej COL3/MMP2 w dwóch grupach: badanej i kontrolnej. Oś pionowa (y) - zawiera wartości zmiennej COL3/MMP2. Oś pozioma (x) - oznaczone są dwie grupy: badana i kontrolna.

Tabela 35. Wyniki regresji logistycznej z analizą wpływu zmiennej zależnej „grupa” i zmiennej niezależnej „COL3/MMP2”.

N=87	Model: Regr. logistyczna (logit) N zer: 59 jedynek: 28 (Wyniki w Skoroszyt1) Zmn. zal.: Grupa Strata: Największe prawd. bł.średnkw.skala. Całkowita strata: 54,647212295 Chi2(1)=,02072 p=,88555	
	Stała B0	COL3/MMP2
Ocena	-0,760928	52,46323
Błąd standard.	0,253937	361,6675
t(85)	-2,996522	0,1450593
p	0,003578508	0,8850075
-95%CL	-1,265823	-666,6287
+95%CL	-0,2560331	771,5552
Chi-kwadrat Walda	8,979146	0,0210422
p	0,002732875	0,884665
Iloraz szans z.jedn.	0,4672326	
-95%CL	0,2820072	0
+95%CL	0,7741163	
Iloraz szans zakr.		1,271071
-95%CL		0,04746327
+95%CL		34,0394

Wzrost stosunku stężenia COL3/MMP2 nie wpływa na wystąpienie przepukliny ($p > 0,05$).



Rycina 23. Wykres krzywej ROC dla predykcji wystąpienia przepukliny na podstawie stężenia COL3/MMP2. Oś pionowa (y) – czułość (wartości na tej osi mieszczą się w zakresie od 0 do 1, gdzie 1 oznacza perfekcyjną czułość, a 0 brak zdolności do wykrywania przypadków przepukliny). Oś pozioma (x): 1 – specyficzność (odwrotność specyficzności), czyli miara błędnie zakwalifikowanych przypadków. Wartości mieszczą się w zakresie od 0 do 1, gdzie 0 oznacza brak fałszywych alarmów, a 1 oznacza, że wszystkie przypadki są fałszywie pozytywne.

Tabela 36. Wartości współczynnika AUC dla zmiennej COL3/MMP2 w modelu predykcji przepukliny.

Zmienna: COL3/MMP2					
AUC	SE	AUC Dolny 95%	AUC Górny 95%	$Z = \frac{AUC - 0,5}{\sqrt{0,5(1-0,5)}}$	p
0,464	0,068	0,331	0,597	-0,532	0,5945

Stosunek COL3/MMP2 nie wykazuje wystarczających właściwości predykcyjnych. Moc testu wynosząca 0,464 ($AUC < 0,5$) wskazują, że model oparty na tym wskaźniku nie jest skuteczny w przewidywaniu analizowanego zjawiska. Brak istotności statystycznej ($p > 0,05$) potwierdza, że stosunek COL3/MMP2 nie odgrywa istotnej roli jako predyktor.

7.1.10. Porównanie wartości stosunków: COL3/MMP9

Tabela 37. Statystyczna charakterystyka zmiennej COL3/MMP9 w grupie badanej i kontrolnej.

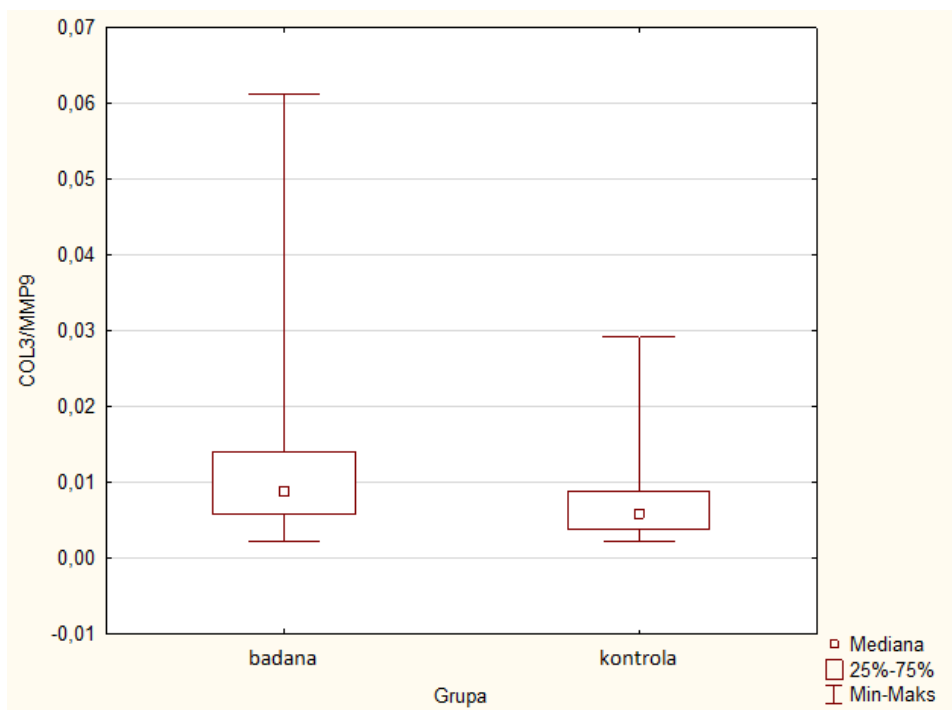
grupa	badana	kontrolna
ilość (szt)	59	28
średnia	0,01	0,01
mediana	0,01	0,01
minimum	0,002	0,002
maksimum	0,10	0,00
dolny kwartył	0,01	0,004
górnny kwartył	0,01	0,001
kwartył rozstęp	0,01	0,00
odchylenie standardowe	0,01	0,001

Wyniki dla zmiennej COL3/MMP9 w obu grupach są podobne. Zarówno średnia, jak i mediana wynoszą 0,01 w obu grupach. Wartości minimalne wynoszą 0,002, jednak maksymalna wartość w grupie badanej osiąga 0,10, podczas gdy w grupie kontrolnej nie przekracza 0,00. Dolny kwartył w grupie badanej wynosi 0,01, a w kontrolnej 0,004, co wskazuje na nieco niższe wartości w grupie kontrolnej. Odchylenie standardowe jest większe w grupie badanej (0,01) niż w kontrolnej (0,001), co sugeruje większą zmienność w grupie badanej.

Tabela 38. Wyniki testu U Manna-Whitneya (z poprawką na ciągłość) dla zmiennej COL3/MMP9 względem grupy z zaznaczeniem, które wyniki są istotne ($p < 0,05$).

Zmienna COL3/MMP9		
Test U Manna-Whitneya (z poprawką na ciągłość)	Sum.rang badana	2895,000
	Sum.rang kontrola	933,000
	U	527,0000
Względem zmiennej: Grupa	Z	2,711993
	p	0,006688
Zaznaczone wyniki są istotne z $p < ,05000$	Z popraw.	2,711993
	p	0,006688
	N ważn. Badana	59
	N ważn. Kontrola	28
	2*1 str dokł. p	0,006183

Wykazano istotną statystycznie różnicę w wartościach stosunku COL3/MMP9 pomiędzy grupą badaną i grupą kontrolną ($p < 0,01$).

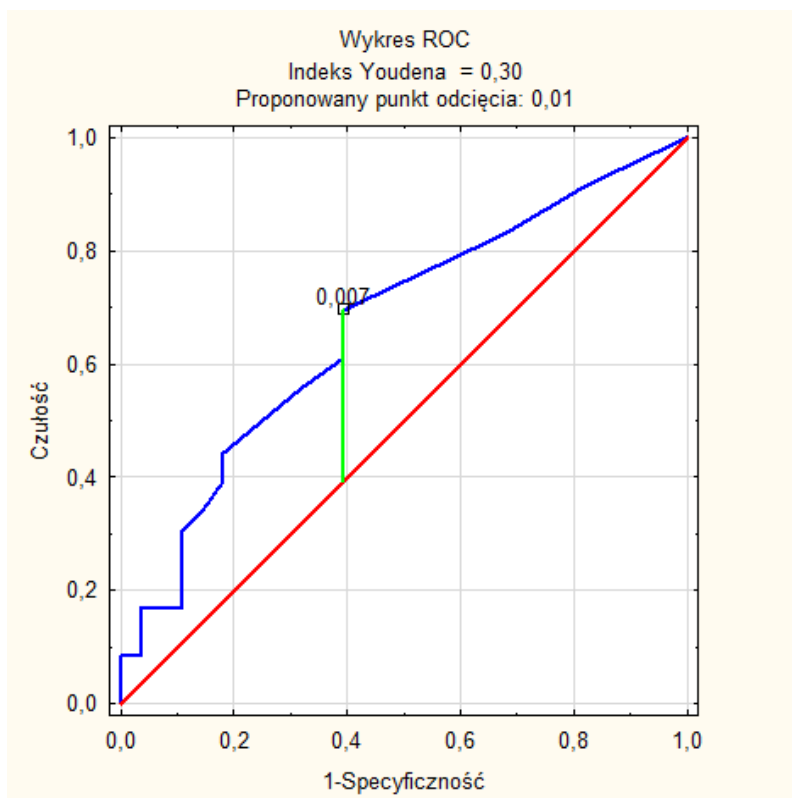


Rycina 24. Wykres pudełkowy, który obrazuje rozkład wartości zmiennej COL3/MMP9 w dwóch grupach: badanej i kontrolnej. Oś pionowa (y) - zawiera wartości zmiennej COL3/MMP9. Oś pozioma (x) - oznaczone są dwie grupy: badana i kontrolna.

Tabela 39. Wyniki regresji logistycznej z analizą wpływu zmiennej zależnej „grupa” i zmiennej niezależnej „COL3/MMP9”.

N=87	Model: Regr. logistyczna (logit) N zer: 59 jedynek: 28 (Wyniki w Skoroszyt1) Zmn. zal.: Grupa Strata: Największe prawd. bł.średnkw.skala. Całkowita strata: 51,959539685 Chi2(1)=5,3961 p=,02019	
	Stała B0	COL3/MMP9
Ocena	-0,01506253	-77,27401
Błąd standard.	0,4129615	40,55237
t(85)	-0,03647442	-1,905536
p	0,9709896	0,06009099
-95%CL	-0,8361406	-157,903
+95%CL	0,8060156	3,35496
Chi-kwadrat Walda	0,001330383	3,631069
p	0,9709043	0,05671932
Iloraz szans z.jedn.	0,9850503	2,75627700E-34
-95%CL	0,4333799	0
+95%CL	2,238969	28,64445
Iloraz szans zakr.		0,01037379
-95%CL		0,00008825396
+95%CL		1,219385

Wzrost stosunku stężenia COL3/MMP9 nie wpływa na wystąpienie przepukliny ($p > 0,05$).



Rycina 25. Wykres krzywej ROC dla predykcji wystąpienia przepukliny na podstawie stężenia COL3/MMP9. Oś pionowa (y) – czulość (wartości na tej osi mieszczą się w zakresie od 0 do 1, gdzie 1 oznacza perfekcyjną czulość, a 0 brak zdolności do wykrywania przypadków przepukliny). Oś pozioma (x): 1 – specyficzność (odwrotność specyficzności), czyli miara błędnie zakwalifikowanych przypadków. Wartości mieszczą się w zakresie od 0 do 1, gdzie 0 oznacza brak fałszywych alarmów, a 1 oznacza, że wszystkie przypadki są fałszywie pozytywne.

Tabela 40. Wartości współczynnika AUC dla zmiennej COL3/MMP9 w modelu predykcji przepukliny.

Zmienna: COL3/MMP9					
AUC	SE	AUC Dolny 95%	AUC Górny 95%	$Z = (v1-0,5)/v2$	P
0,666	0,061	0,546	0,787	2,715	0,0066

Stosunek COL3/MMP9 może spełniać funkcję predyktora. Moc testu wynosi 0,666 (AUC > 0,5) wskazuje na umiarkowaną skuteczność modelu w przewidywaniu ryzyka. Istotność statystyczna testu ($p < 0,01$) dodatkowo potwierdza przydatność wskaźnika w tym kontekście. Proponowany punkt odcięcia to 0,007. Sztuki badane, u których wartości COL3/MMP9 przyjmują wartości powyżej punktu odcięcia będą zakwalifikowane jako sztuki ze zwiększonym prawdopodobieństwem wystąpienia przepukliny.

Tabela 41. Wyniki diagnostyczne testu przewidującego przepuklinę na podstawie zmiennej COL3/MMP9.

COL3/MMP9	0,007
Badana	1
Kontrola	0
True positives	41
False positives	11
False negatives	18
True negatives	17
Sensitivity	0,695
Specificity	0,607
1-specificity	0,393
ACC	0,667
PPV	0,788
NPV	0,486
False positive ratio	0,393
False negative ratio	0,305
LR(+)	1,769
Error rate	0,333
Youden	0,302
LR(-)	0,502

Czułość 0,695

69,5% sztuk z przepukliną zostanie prawidłowo zakwalifikowana, czyli uzyska dodatni wynik testu.

Specyficzność 0,607

60,7% sztuk zdrowych uzyska wynik negatywny.

ACC (dokładność) – 0,667

W przypadku 66,7% sztuk badanych można być pewnym postawionej diagnozy.

PPV (wartość predykcyjna dodatnia) - 0,788

W przypadku 78,8% sztuk badanych uzyskujących wynik dodatni można być pewnym, że są sztukami z przepukliną.

NPV (wartość predykcyjna ujemna) – 0,486

W przypadku 48,6% sztuk badanych uzyskujących wynik negatywny można być pewnym, że jest zdrową sztuką.

LR (+) – 1,769 – iloraz wiarygodności wyniku dodatniego

Szansa na to, że pozytywny wynik testu otrzyma sztuka z przepukliną jest 1,769 razy większa, niż szansa, że wynik pozytywny otrzyma sztuka zdrowa.

LR (-) – 0,502 iloraz wiarygodności wyniku ujemnego

Szansa na to, że negatywny wynik testu otrzyma sztuka z przepukliną stanowi 50,2% szans na to, że negatywny wynik testu otrzyma sztuka zdrowa.

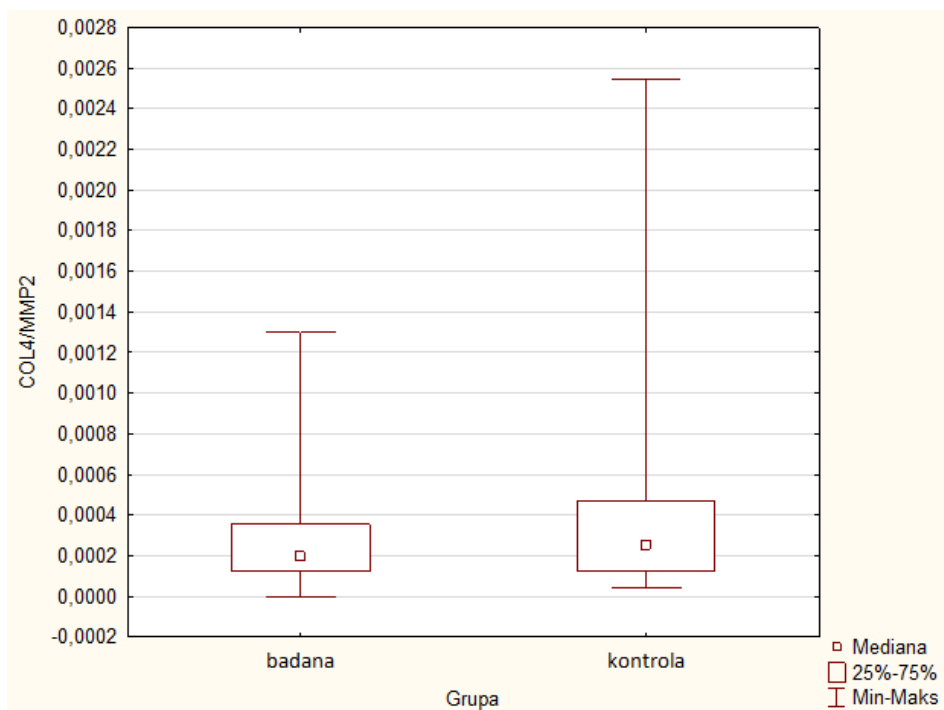
7.1.11. Porównanie wartości stosunków: COL4/MMP2

Wyniki statystyki opisowej wskazują, że zarówno w grupie badanej, jak i kontrolnej nie zaobserwowano żadnych mierzalnych wartości w stosunku COL4/MMP2.

Tabela 42. Wyniki testu U Manna-Whitneya (z poprawką na ciągłość) dla zmiennej COL4/MMP2 względem grupy z zaznaczeniem, które wyniki są istotne ($p < 0,05$).

Zmienna COL4/MMP2		
Test U Manna-Whitneya (z poprawką na ciągłość)	Sum.rang badana	2486,000
	Sum.rang kontrola	1342,000
Względem zmiennej: Grupa	U	716,0000
	Z	-0,994852
Zaznaczone wyniki są istotne z $p < ,05000$	p	0,319809
	Z popraw.	-0,994852
	p	0,319809
	N ważn. Badana	59
	N ważn. Kontrola	28
	2*1 str dokł. p	0,321842

Nie wykazano istotnej statystycznie różnicy w wartościach stosunku COL4/MMP2 pomiędzy grupą badaną i grupą kontrolną ($p > 0,05$).

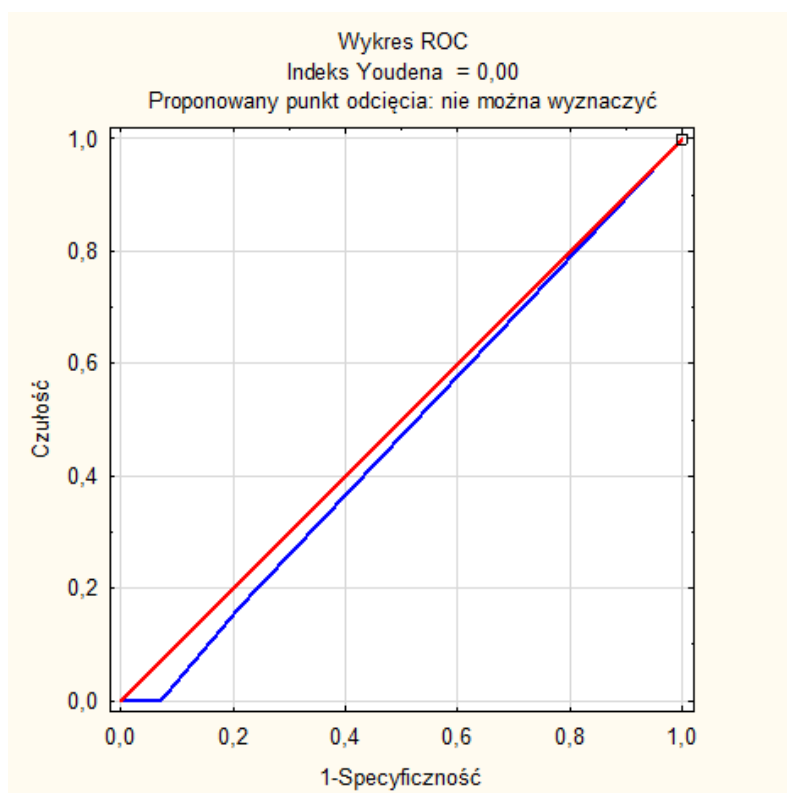


Rycina 26. Wykres pudełkowy, który obrazuje rozkład wartości zmiennej COL4/MMP2 w dwóch grupach: badanej i kontrolnej. Oś pionowa (y) - zawiera wartości zmiennej COL4/MMP2. Oś pozioma (x) - oznaczone są dwie grupy: badana i kontrolna.

Tabela 43. Wyniki regresji logistycznej z analizą wpływu zmiennej zależnej „grupa” i zmiennej niezależnej „COL4/MMP2”.

N=87	Model: Regr. logistyczna (logit) N zer: 59 jedynek: 28 (Wyniki w Skoroszyt1) Zmn. zal.: Grupa Strata: Największe prawd. bł.średnkw.skal. Całkowita strata: 53,382704223 Chi2(1)=2,5497 p=,11032	
	Stała B0	COL4/MMP2
Ocena	-1,061509	899,389
Błąd standard.	0,3119182	586,867
t(85)	-3,403163	1,532526
p	0,001017982	0,1291063
-95%CL	-1,681686	-267,4598
+95%CL	-0,4413315	2066,238
Chi-kwadrat Walda	11,58152	2,348636
p	0,0006669216	0,1254025
Iloraz szans z.jedn.	0,3459336	
-95%CL	0,1860601	0
+95%CL	0,6431795	
Iloraz szans zakr.		9,833864
-95%CL		0,5067389
+95%CL		190,8377

Wzrost stosunku stężenia COL 4/MMP 2 nie wpływa na wystąpienie przepukliny ($p > 0,05$).



Rycina 27. Wykres krzywej ROC dla predykcji wystąpienia przepukliny na podstawie stężenia COL4/MMP2. Oś pionowa (y) – czulość (wartości na tej osi mieszczą się w zakresie od 0 do 1, gdzie 1 oznacza perfekcyjną czulość, a 0 brak zdolności do wykrywania przypadków przepukliny). Oś pozioma (x): 1 – specyficzność (odwrotność specyficzności), czyli miara błędnie zakwalifikowanych przypadków. Wartości mieszczą się w zakresie od 0 do 1, gdzie 0 oznacza brak fałszywych alarmów, a 1 oznacza, że wszystkie przypadki są fałszywie pozytywne.

Tabela 44. Wartości współczynnika AUC dla zmiennej COL4/MMP2 w modelu predykcji przepukliny.

Zmienna: COL4/MMP2					
AUC	SE	AUC Dolny 95%	AUC Górny 95%	z $=\frac{(v-0,5)}{\sqrt{v}}$	P
0,472	0,068	0,338	0,605	-0,419	0,6752

Stosunek COL4/MMP2 nie wykazuje predyspozycji do pełnienia funkcji predyktora. Moc testu wynosi 0,472 ($AUC < 0,5$) sugerując, że model nie jest w stanie adekwatnie przewidywać analizowanego zjawiska. Brak istotności statystycznej ($p > 0,05$) potwierdza, że stosunek COL4/MMP2 nie ma znaczącego wpływu jako predyktor w kontekście badania.

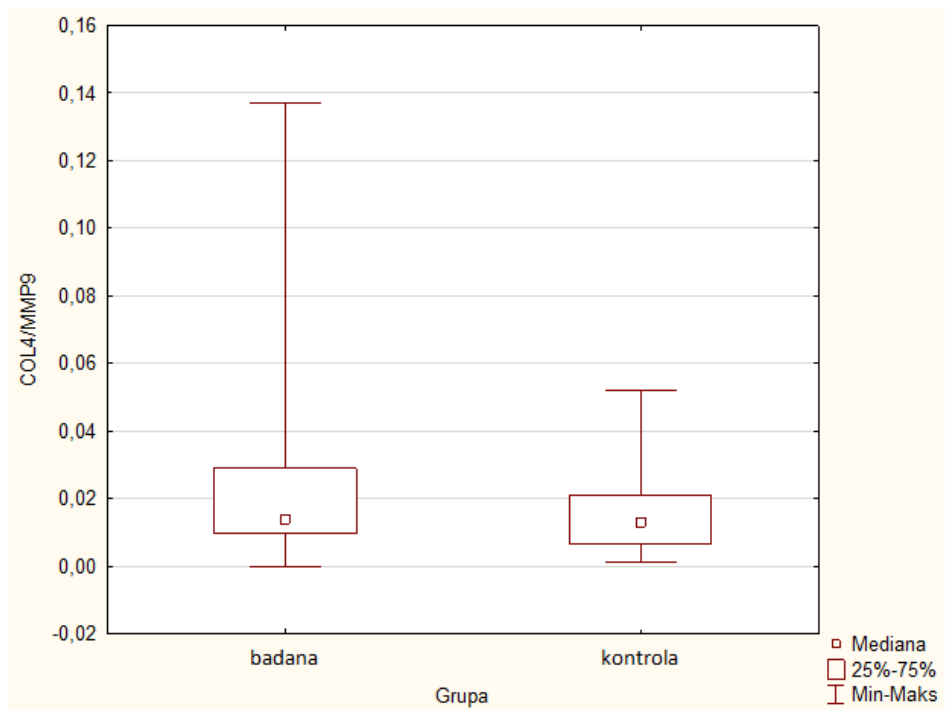
7.1.12. Porównanie wartości stosunków: COL4/MMP9

Wyniki statystyki opisowej wskazują, że zarówno w grupie badanej, jak i kontrolnej nie zaobserwowano żadnych mierzalnych i istotnych w stosunku COL4/MMP9.

Tabela 45. Wyniki testu U Manna-Whitneya (z poprawką na ciągłość) dla zmiennej COL4/MMP9 względem grupy z zaznaczeniem, które wyniki są istotne ($p < 0,05$).

Zmienna COL4/MMP9		
Test U Manna-Whitneya (z poprawką na ciągłość)	Sum.rang badana	2720,000
	Sum.rang kontrola	1108,000
Względem zmiennej: Grupa	U	702,0000
	Z	1,122047
Zaznaczone wyniki są istotne z $p < ,05000$	p	0,261843
	Z popraw.	1,122053
	p	0,261841
	N ważn. Badana	59
	N ważn. Kontrola	28
	2*1 str dokł. p	0,263583

Nie wykazano istotnej statystycznie różnicy w wartościach stosunku COL4/MMP9 pomiędzy grupą badaną i grupą kontrolną ($p > 0,05$).

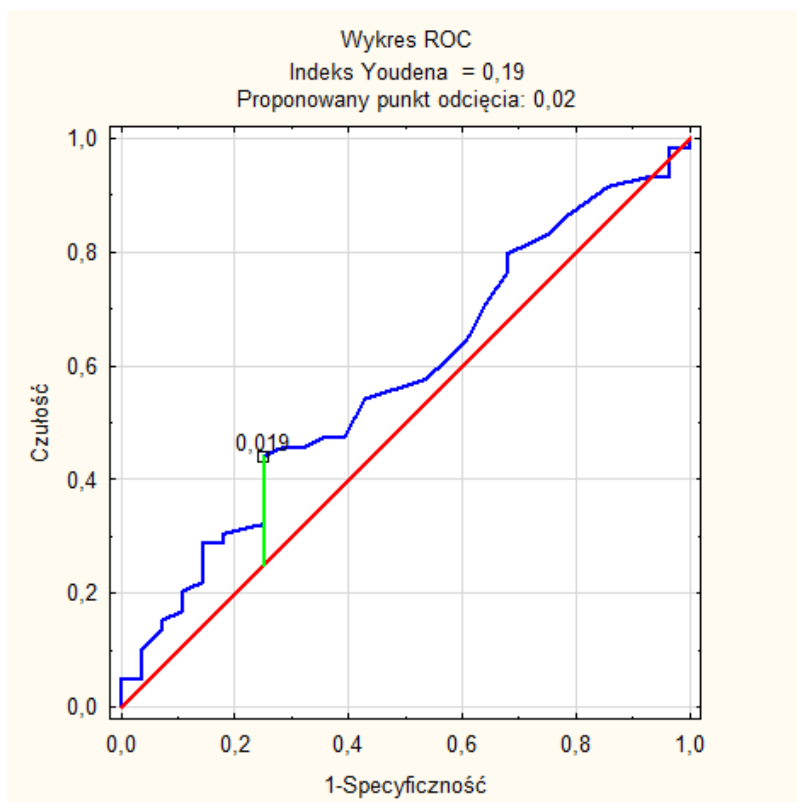


Rycina 28. Wykres pudełkowy, który obrazuje rozkład wartości zmiennej COL4/MMP9 w dwóch grupach: badanej i kontrolnej. Oś pionowa (y) - zawiera wartości zmiennej COL4/MMP9. Oś pozioma (x) - oznaczone są dwie grupy: badana i kontrolna.

Tabela 46. Wyniki regresji logistycznej z analizą wpływu zmiennej zależnej „grupa” i zmiennej niezależnej „COL4/MMP9”.

N=87	Model: Regr. logistyczna (logit) N zer: 59 jedynek: 28 (Wyniki w Skoroszyt1) Zmn. zal.: Grupa Strata: Największe prawd. bł.średnkw.skala. Całkowita strata: 53,714012005 Chi2(1)=1,8871 p=,16954	
	Stała B0	COL4/MMP9
Ocena	-0,3622518	-20,85109
Błąd standard.	0,3711817	16,91665
t(85)	-0,975942	-1,232578
p	0,3318626	0,2211315
-95%CL	-1,10026	-54,48592
+95%CL	0,3757568	12,78373
Chi-kwadrat Walda	0,9524627	1,51925
p	0,3291006	0,2177421
Iloraz szans z.jedn.	0,6961071	0,0000000008800065
-95%CL	0,3327844	2,17303900E-24
+95%CL	1,456093	356372,4
Iloraz szans zakr.		0,05716772
-95%CL		0,0005653473
+95%CL		5,78078

Wzrost stosunku stężenia COL4/MMP9 nie wpływa na wystąpienie przepukliny ($p > 0,05$).



Rycina 29. Wykres krzywej ROC dla predykcji wystąpienia przepukliny na podstawie stężenia COL4/MMP9. Oś pionowa (y) – czulość (wartości na tej osi mieszczą się w zakresie od 0 do 1, gdzie 1 oznacza perfekcyjną czulość, a 0 brak zdolności do wykrywania przypadków przepukliny). Oś pozioma (x): 1 – specyficzność (odwrotność specyficzności), czyli miara błędnie zakwalifikowanych przypadków. Wartości mieszczą się w zakresie od 0 do 1, gdzie 0 oznacza brak fałszywych alarmów, a 1 oznacza, że wszystkie przypadki są fałszywie pozytywne.

Tabela 47. Wartości współczynnika AUC dla zmiennej COL4/MMP9 w modelu predykcji przepukliny.

Zmienna: COL4/MMP9					
AUC	SE	AUC Dolny 95%	AUC Górny 95%	$Z = \frac{AUC - 0,5}{\sqrt{SE}}$	p
0,577	0,065	0,45	0,703	1,186	0,2355

Stosunek COL4/MMP9 nie może spełniać funkcji predyktora. Moc testu wynosi 0,577 (AUC > 0,5) oraz brak istotności statystycznej (p > 0,05) wskazuje, że stosunek COL4/MMP9 nie odgrywa istotnej roli jako predyktor w analizowanym przypadku.

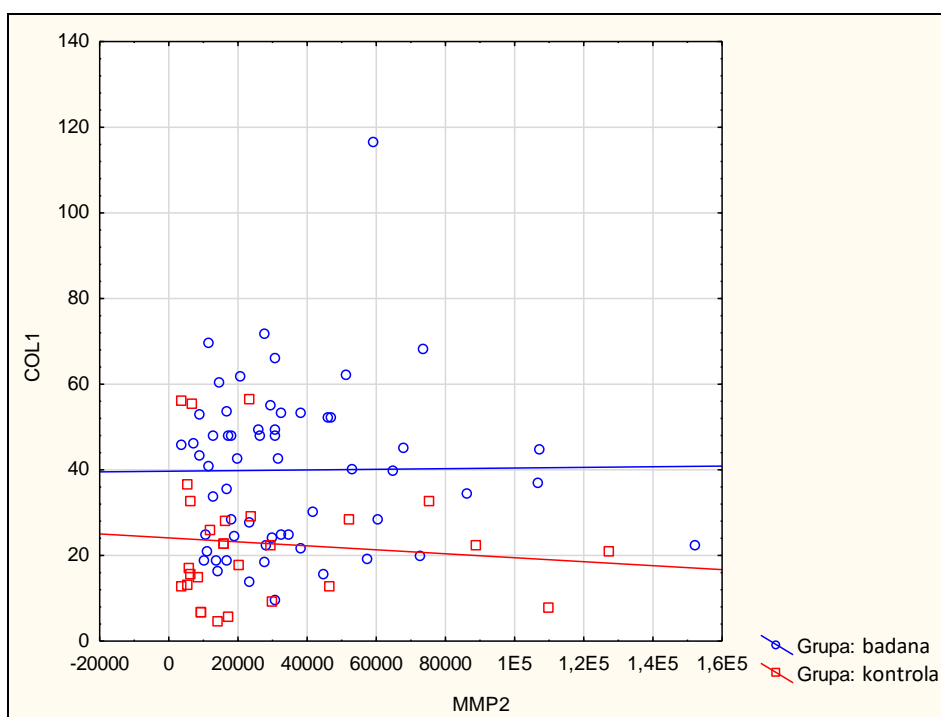
7.1.13. Analiza korelacji pomiędzy COL 1 a MMP 2 w grupie kontrolnej i badanej

Wykonano test korelacji porządku rang Spearmana z oznaczeniem wspólnej korelacji, które są istotne kiedy $p < 0,05$.

Tabela 48. Korelacja rang Spearmana między zmiennymi COL1 i MMP2 w grupie badanej i kontrolnej.

Para zmiennych	Wyniki zagregowane Korelacja porządku rang Spearmana (Arkusz in Skoroszyt1) BD usuwane parami Oznaczone wsp. korelacji są istotne z $p < ,05000$				
	Grupa	N Ważnych	R Spearman	t(N-2)	p
COL1 & MMP2	badana	59	0,017788	0,13432	0,893622
COL1 & MMP2	kontrola	28	-0,054498	-0,27830	0,782983

Nie stwierdzono istotnej statystycznie korelacji pomiędzy stężeniami COL1 i MMP2 w grupie badanej, ani w grupie kontrolnej ($p > 0,05$).



Rycina 30. Zależność między stężeniem COL1 a MMP2 w grupach badanej i kontrolnej. Oś pozioma (x) - wartości zmiennej MMP2 wyrażone w jednostkach pg/ml. Oś pionowa (y) - wartości zmiennej COL1 wyrażone w jednostkach ng/ml.

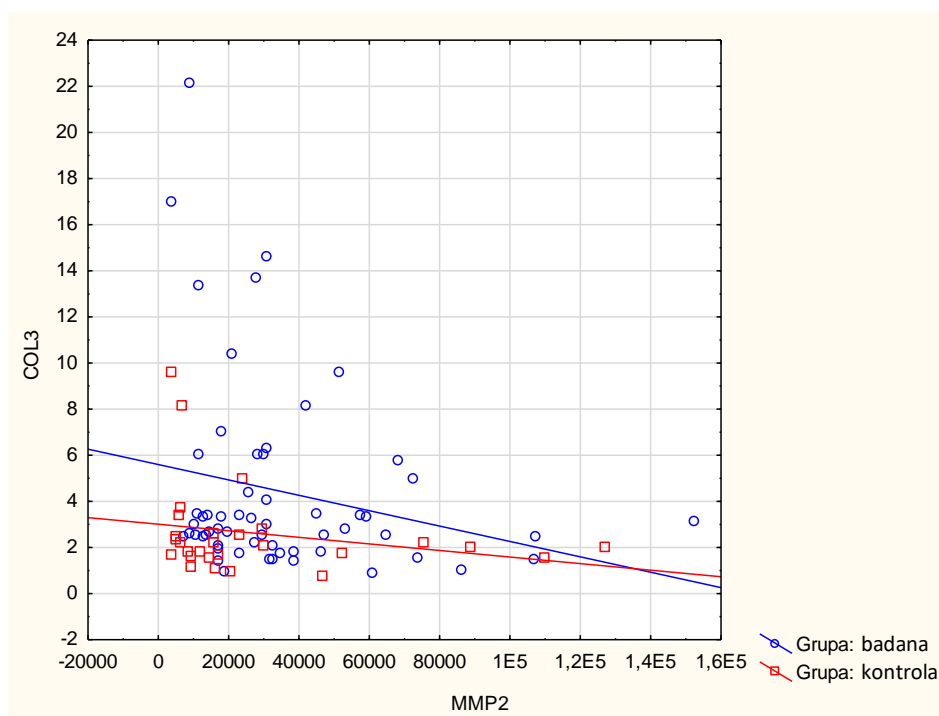
7.1.14. Analiza korelacji pomiędzy COL3 a MMP2 w grupie kontrolnej i badanej

Wykonano test korelacji porządku rang Spearmana z oznaczeniem wspólnej korelacji, które są istotne kiedy $p < 0,05$.

Tabela 49. Korelacja rang Spearmana między zmiennymi COL3 i MMP2 w grupie badanej i kontrolnej.

Para zmiennych	Wyniki zagregowane Korelacja porządku rang Spearmana (Arkusz in Skoroszyt1) BD usuwane parami Oznaczone wsp. korelacji są istotne z $p < ,05000$				
	Grupa	N Ważnych	R Spearman	t(N-2)	p
COL3 & MMP2	badana	59	-0,213454	-1,64956	0,104535
COL3 & MMP2	kontrola	28	-0,314384	-1,68867	0,103243

Nie stwierdzono istotnej statystycznie korelacji pomiędzy stężeniami COL 3 i MMP 2 w grupie badanej, ani w grupie kontrolnej ($p > 0,05$).



Rycina 31. Zależność między stężeniem COL3 a MMP2 w grupach badanej i kontrolnej. Oś pozioma (x) - wartości zmiennej MMP2 wyrażone w jednostkach pg/ml. Oś pionowa (y) - wartości zmiennej COL3 wyrażone w jednostkach ng/ml.

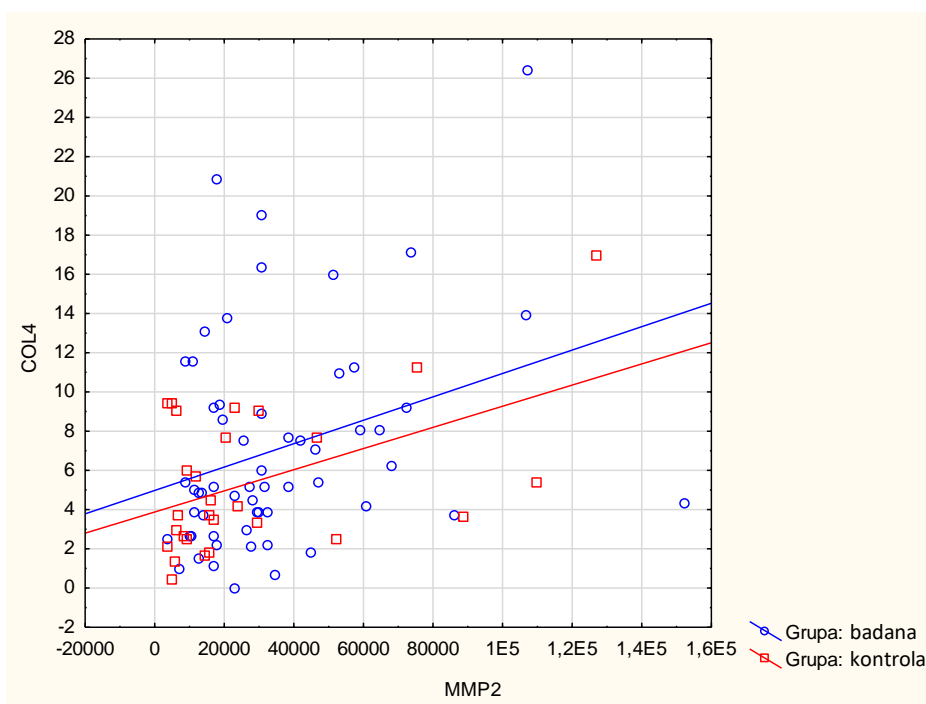
7.1.15. Analiza korelacji pomiędzy COL 4 a MMP 2 w grupie kontrolnej i badanej

Wykonano test korelacji porządku rang Spearmana z oznaczeniem wspólnej korelacji, które są istotne kiedy $p < 0,05$.

Tabela 50. Korelacja rang Spearmana między zmiennymi COL4 i MMP2 w grupie badanej i kontrolnej.

Para zmiennych	Wyniki zagregowane Korelacja porządku rang Spearmana (Arkusz in Skoroszyt1) BD usuwane parami Oznaczone wsp. korelacji są istotne z $p < 0,05000$				
	Grupa	N Ważnych	R Spearman	t(N-2)	p
COL4 & MMP2	badana	59	0,304924	2,41725	0,018860
COL4 & MMP2	kontrola	28	0,303234	1,62259	0,116741

Stwierdzono istotną statystycznie korelację pomiędzy stężeniami COL4 a stężeniem MMP2 w grupie badanej ($p < 0,05$). Mamy do czynienia z przeciętną korelacją dodatnią ($r = 0,30$) – wraz ze wzrostem stężenia MMP2 rośnie stężenie COL4. Korelacji takiej nie stwierdzono w grupie kontrolnej.



Rycina 32. Zależność między stężeniem COL4 a MMP2 w grupach badanej i kontrolnej. Oś pozioma (x) - wartości zmiennej MMP2 wyrażone w jednostkach pg/ml. Oś pionowa (y) - wartości zmiennej COL4 wyrażone w jednostkach ng/ml.

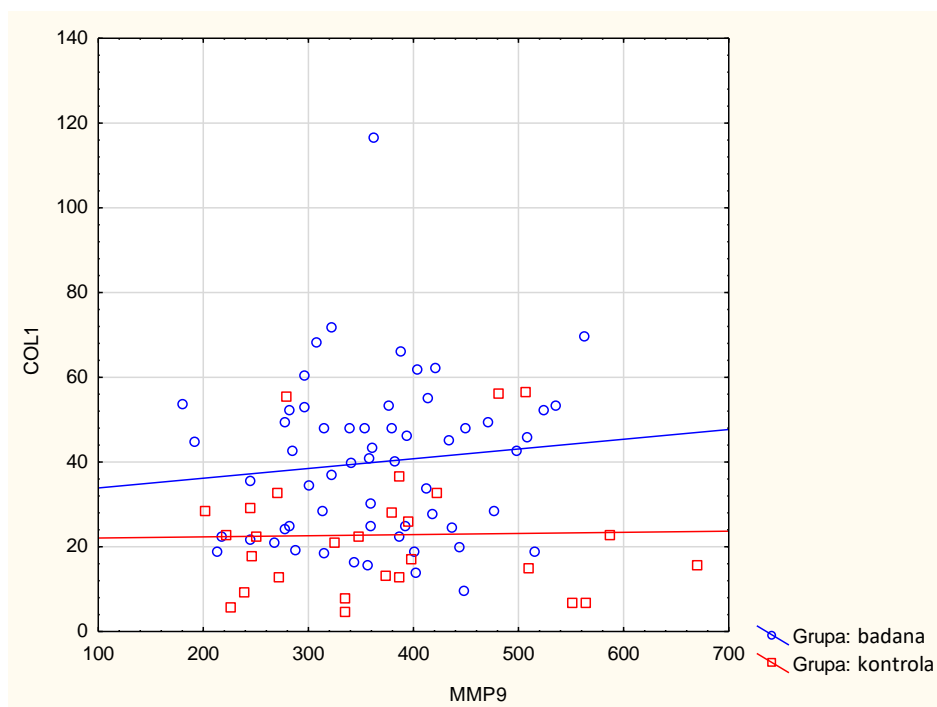
7.1.16. Analiza korelacji pomiędzy COL 1 a MMP 9 w grupie kontrolnej i badanej

Wykonano test korelacji porządku rang Spearmana z oznaczeniem wspólnej korelacji, które są istotne kiedy $p < 0,05$.

Tabela 51. Korelacja rang Spearmana między zmiennymi COL 1 i MMP 9 w grupie badanej i kontrolnej.

Para zmiennych	Wyniki zagregowane Korelacja porządku rang Spearmana (Arkusz in Skoroszyt1) BD usuwane parami Oznaczone wsp. korelacji są istotne z $p < ,05000$				
	Grupa	N Ważnych	R Spearman	t(N-2)	p
COL1 & MMP9	badana	59	0,103671	0,78694	0,434577
COL1 & MMP9	kontrola	28	0,015601	0,07956	0,937195

Nie stwierdzono istotnej statystycznie korelacji pomiędzy stężeniami COL 1 i MMP 9 w grupie badanej, ani w grupie kontrolnej ($p > 0,05$).



Rycina 33. Zależność między stężeniem COL1 a MMP9 w grupach badanej i kontrolnej. Oś pozioma (x) - wartości zmiennej MMP9 wyrażone w jednostkach ng/ml. Oś pionowa (y) - wartości zmiennej COL1 wyrażone w jednostkach ng/ml.

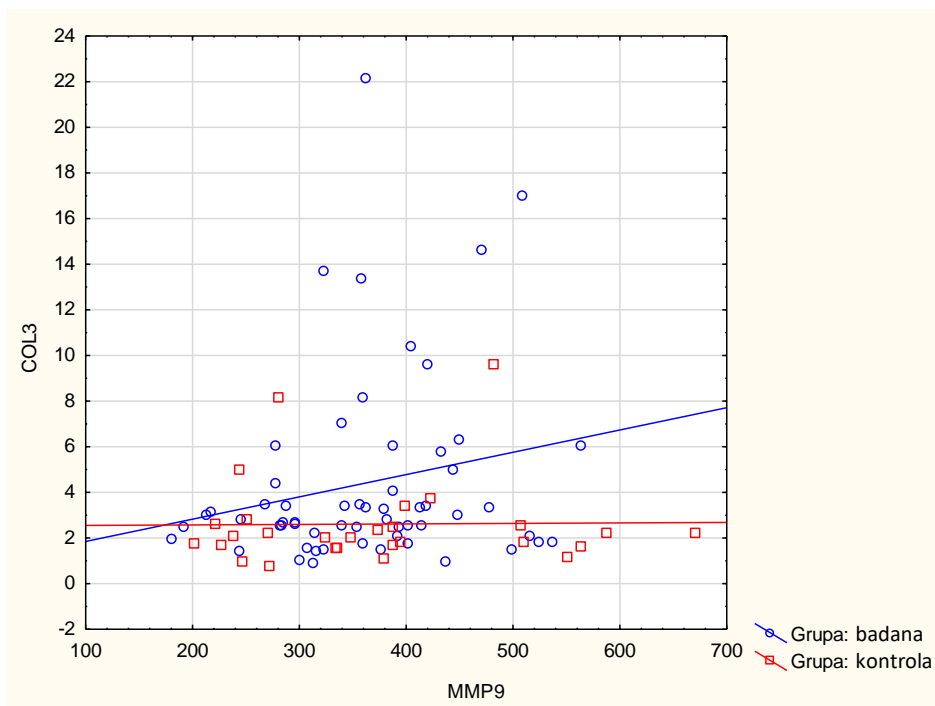
7.1.17. Analiza korelacji pomiędzy COL 3 a MMP 9 w grupie kontrolnej i badanej

Wykonano test korelacji porządku rang Spearmana z oznaczeniem wspólnej korelacji, które są istotne kiedy $p < 0,05$.

Tabela 52. Korelacja rang Spearmana między zmiennymi COL 3 i MMP 9 w grupie badanej i kontrolnej.

Para zmiennych	Wyniki zagregowane Korelacja porządku rang Spearmana (Arkusz in Skoroszyt1) BD usuwane parami Oznaczone wsp. korelacji są istotne z $p < ,05000$				
	Grupa	N Ważnych	R Spearman	t(N-2)	p
COL3 & MMP9	badana	59	0,163257	1,24932	0,216653
COL3 & MMP9	kontrola	28	0,053943	0,27546	0,785142

Nie stwierdzono istotnej statystycznie korelacji pomiędzy stężeniami COL 3 i MMP 9 w grupie badanej, ani w grupie kontrolnej ($p > 0,05$).



Rycina 34. Zależność między stężeniem COL3 a MMP9 w grupach badanej i kontrolnej. Oś pozioma (x) - wartości zmiennej MMP9 wyrażone w jednostkach ng/ml. Oś pionowa (y) - wartości zmiennej COL3 wyrażone w jednostkach ng/ml.

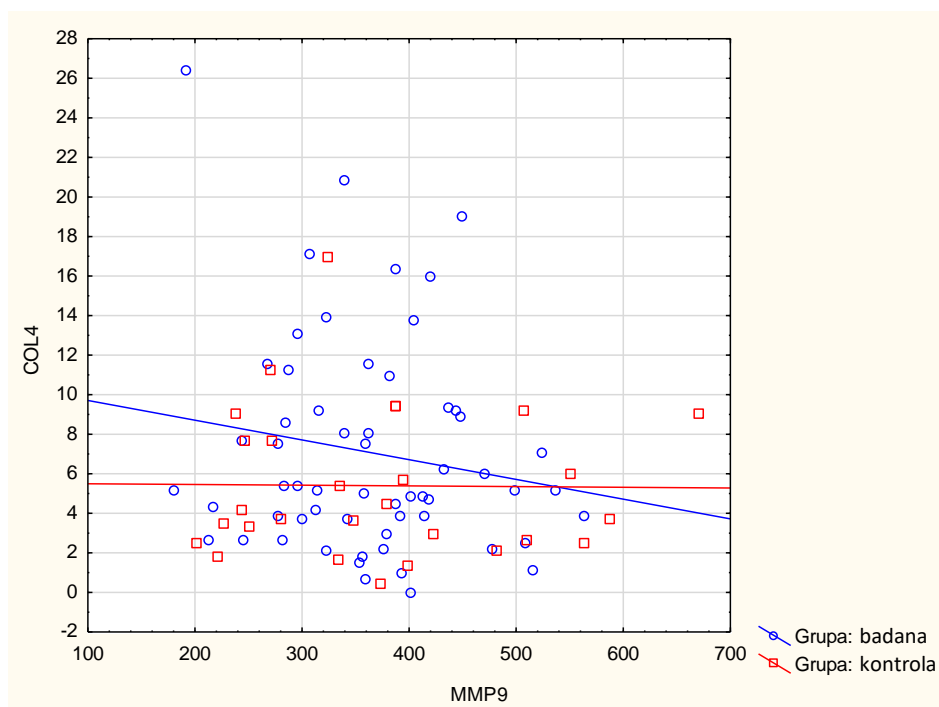
7.1.18. Analiza korelacji pomiędzy COL 4 a MMP 9 w grupie kontrolnej i badanej

Wykonano test korelacji porządku rang Spearmana z oznaczeniem wspólnej korelacji, które są istotne kiedy $p < 0,05$.

Tabela 53. Korelacja rang Spearmana między zmiennymi COL 4 i MMP 9 w grupie badanej i kontrolnej.

Para zmiennych	Wyniki zagregowane Korelacja porządku rang Spearmana (Arkusz in Skoroszyt1) BD usuwane parami Oznaczone wsp. korelacji są istotne z $p < ,05000$				
	Grupa	N Ważnych	R Spearman	t(N-2)	p
COL4 & MMP9	badana	59	-0,090663	-0,68732	0,494666
COL4 & MMP9	kontrola	28	0,007669	0,03911	0,969104

Nie stwierdzono istotnej statystycznie korelacji pomiędzy stężeniami COL 4 i MMP 9 w grupie badanej, ani w grupie kontrolnej ($p > 0,05$).



Rycina 35. Zależność między stężeniem COL4 a MMP9 w grupach badanej i kontrolnej. Oś pozioma (x) - wartości zmiennej MMP9 wyrażone w jednostkach ng/ml. Oś pionowa (y) - wartości zmiennej COL3 wyrażone w jednostkach ng/ml.

7.2. Dyskusja

Przepukliny to wady, u podstaw których leżą zarówno czynniki zewnętrzne oraz na powstanie których mają również wpływ czynniki wewnętrzne. Sugeruje się, że zmiany w składzie kolagenu mogą być jedną z przyczyn powstawania przepuklin, i mogą mieć charakter ogólnoustrojowy np. przepukliny brzucha u ludzi, które prawdopodobnie związane są ze zwiększonym rozkładem kolagenu, zarówno w tkance powięziowej jak i również wykazano je w biopsji skóry (133).

Nieprawidłowy metabolizm kolagenu i metaloproteinaz może wpływać na powstawanie przepuklin, ze względu na swoje funkcje, które pełni w organizmie. W badaniach własnych skupiono się na poziomie krążących COL 1,3,4 i MMP 2 i 9 w surowicy krwi u świń z przepukliną pachwinową. Wyniki tych badań sugerują istotną statystycznie różnicę między grupą świń z przepuklinami, a grupą kontrolną bez przepukliny. Analiza wskazuje, że stężenie kolagenu I, III oraz MMP-2 są istotnie związane z obecnością przepukliny. Wzrost stężenia kolagenu I, III lub MMP-2 zwiększa szanse na wystąpienie przepukliny, co może być istotne klinicznie i pomocne w zrozumieniu mechanizmów związanych z powstawaniem tego schorzenia. Nie wykazano jednak istotnej statystycznie różnicy w stosunku stężenia kolagenu I do kolagenu III, tak jak miało to miejsce w przypadku u ludzi z wadą przepukliny pachwinowej. Wykazano jednak istotną statystycznie różnicę w stosunku stężenia COL1/MMP9, COL3/MMP9 (test U Manna–Whitneya, krzywa ROC) oraz COL4/MMP2 (korelacja rang Spearmana).

Kolageny są kluczowymi składnikami macierzy zewnątrzkomórkowej, odgrywającymi centralną rolę w zachowaniu strukturalnej i funkcjonalnej integralności tkankowej. Typy kolagenów, takie jak COL1, COL3 i COL4, różnią się lokalizacją i funkcją, co ma znaczenie w kontekście różnych stanów patologicznych, w tym przepuklin.

Powstawanie i nawroty przepuklin ściany jamy brzusznej są częstsze u pacjentów z chorobami tkanki łącznej (134-136) oraz tętniakami aorty brzusznej (137-139), co potwierdza potencjalną rolę zaburzonego metabolizmu tkanki łącznej.

Nieprawidłowy metabolizm kolagenu może przyczyniać się do zmniejszonej wytrzymałości na rozciąganie i stabilności mechanicznej tkanki łącznej oraz tkanki bliznowatej (95, 140-143), a zmieniony stosunek między różnymi typami kolagenu może wynikać zarówno z modyfikacji procesów syntezy, jak i z niezrównoważonego rozkładu

tego białka. Rozkład kolagenu jest kontrolowany przez aktywność metaloproteinaz macierzy (144).

Integralność ściany brzucha jest ściśle związana z zachowaną strukturą mięśniową i powięziową. Mechaniczne właściwości każdej powięzi zależą głównie od rodzaju tkanki łącznej i jej składników, zwłaszcza kolagenów. W skórze, pełniąc istotną rolę w tej strukturze, dominującym typem kolagenu jest dojrzały i mechanicznie stabilny kolagen typu I. Natomiast w początkowych etapach gojenia się ran często obserwuje się obecność niedojrzałego i mechanicznie niestabilnego kolagenu typu III (145). Kolagen typu I, będący silnym i powszechnie występującym w organizmie ludzkim kolagenem, obecny jest w takich strukturach jak powięź, skóra, więzadła oraz tkanki włókniste. Odpowiada on za mechaniczną odporność tkanek. Kolagen typu III (COL3), obficie występujący w tkankach o szybkiej regeneracji takich jak skóra czy naczynia krwionośne, jest bardziej elastyczny w porównaniu do kolagenu typu I, z którym często współistnieje w tych samych włóknienkach (141, 146, 147). Zmiany w stosunku kolagenu typu I do III są wykrywalne na poziomie mRNA (95, 96, 148-150) i obserwuje się je nie tylko lokalnie w powięzi, ale również w skórze (85, 87) oraz powięzi (151) pacjentów z przepukliną, co sugeruje systemowy charakter tych defektów. Zmiany w proporcjach tych dwóch typów kolagenów mogą wpływać na elastyczność i wytrzymałość tkanek, co odgrywa kluczową rolę w kontekście przepuklin. U osób cierpiących na przepukliny, obserwuje się zwiększoną ilość kolagenu typu III, co może być wynikiem zaburzeń metabolicznych (88).

W badaniach Klinge i współ, zarówno analiza immunohistochemiczna, jak i analiza Western blot wykazały znaczące zmniejszenie stosunku kolagenu typu I do III w skórze pacjentów cierpiących na przepuklinę pachwinową pośrednią lub bezpośrednią, co towarzyszyło wzrostowi poziomu kolagenu typu III. Zmieniona proporcja kolagenu I/III może wpływać na obniżenie wytrzymałości mechanicznej tkanek (88, 152). Należy podkreślić, że te subtelne zmiany w proporcjach kolagenów mogą mieć wpływ na całkowitą wytrzymałość i funkcjonalność ściany brzusznej, co z kolei może przyczyniać się do rozwoju przepuklin oraz ich nawrotów.

Również w badaniu Zhao i współ. wykazano, że poziomy ekspresji kolagenu III były podwyższone u pacjentów z przepukliną okołostomijną (PH) i że stosunek kolagenu I/III był znacznie zmniejszony, co sugeruje, że kolagen III może odgrywać kluczową rolę w wystąpieniu PH (153).

Sugeruje się, że przepukliny mogą być związane z nieodpowiednim poziomem macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM), co wpływa na zmianę obrotu kolagenu (154). Stabilność macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) bezpośrednio koreluje z poziomami syntezy i degradacji kolagenu (155). Ze względu na składniki macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM), degradacja kolagenu może mieć istotny wpływ na morfogenezę, rozwój, przebudowę tkanek oraz procesy naprawcze (156). Ponadto, degradacja macierzy zewnątrzkomórkowej może być indukowana przez metaloproteinazy macierzy (MMP) (89).

W badaniach własnych wykazano znaczące różnice w poziomach kolagenu typu I między świniami z przepukliną pachwinową, a zdrowymi osobnikami z grupy kontrolnej. Mediana stężenia kolagenu w tych grupach wynosiła odpowiednio 40,86 ng/ml i 21,66 ng/ml, z istotnością statystyczną na poziomie $p < 0,001$. Co więcej, regresja logistyczna ukazała związek między wyższym stężeniem tego białka, a zwiększonym ryzykiem przepukliny. Z każdym wzrostem stężenia kolagenu I o jednostkę (ng/ml) ryzyko to wzrastało o około 7%. Analiza krzywej ROC, z wartością AUC równą 0,765, potwierdza, że poziom kolagenu I efektywnie różnicuje między świniami z przepuklinami a grupą kontrolną, co świadczy o dobrych zdolnościach diagnostycznych tego parametru.

W przeprowadzonych badaniach własnych zaobserwowano istotną statystycznie różnicę w poziomach kolagenu III między grupą zwierząt z przepukliną, a grupą kontrolną. Mediana stężeń dla grupy badanej wynosiła 2,83 ng/ml, natomiast dla grupy kontrolnej 2,05 ng/ml, co z istotnością statystyczną ($p < 0,01$), czyli poniżej standardowego progu istotności wynoszącego $p < 0,05$ potwierdza, że różnice te nie są przypadkowe.

Mimo to, przeprowadzona regresja logistyczna nie wykazała istotnej statystycznie zależności między wzrostem stężenia kolagenu III, a wzrostem ryzyka wystąpienia przepuklin. Krzywa ROC z proponowanym punktem odcięcia dla COL3 na poziomie 2,46 ng/ml, umożliwia jednak efektywną klasyfikację świń z przepukliną, gdy ich poziom COL3 przekracza tę wartość. Wyniki te wskazują na złożoność relacji między poziomem kolagenu III, a występowaniem przepuklin, sugerując potrzebę dalszych badań w tej dziedzinie.

Badania Henriksen i współpracowników wykazały zróżnicowany obraz metabolizmu kolagenu u pacjentów z przepuklinami, sugerując istotne zmiany w przemianie kolagenu typu IV. Wskazują one, że zwiększony obrót kolagenu typu IV w błonie podstawnej może

wskazywać na obecność przepuklin pachwinowych i pooperacyjnych. Zmiany w metabolizmie tego kolagenu mogą odgrywać kluczową rolę w rozwoju przepuklin. Może to oznaczać, że nie tyle ilość samego kolagenu, co jego dynamika przemian jest czynnikiem ryzyka. Badania te pokazują, że zwiększony obrót kolagenu może wpływać na destabilizację macierzy tkankowej, co sprzyja powstawaniu przepuklin (157).

Z kolei w badaniach własnych na zwierzętach nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w ogólnoustrojowych poziomach tego kolagenu między grupą badaną, a kontrolną, co wskazuje na brak bezpośredniego wpływu stężenia kolagenu IV na ryzyko wystąpienia przepuklin.

Analizy wskazują, że kolagen IV nie różni się istotnie między grupą zwierząt z przepukliną, a grupą kontrolną, ani w kontekście poziomów w surowicy, ani jako czynnik ryzyka rozwoju przepukliny.

Zarówno wyniki Henriksen i współpracowników, jak i badania własne na zwierzętach dostarczają cennych informacji na temat roli kolagenu IV w rozwoju przepuklin, jednak ich interpretacja wymaga ostrożności. Szczególnie ważne jest zrozumienie, jak lokalne zmiany w macierzy tkankowej mogą wpływać na ogólnoustrojowe wskaźniki metaboliczne, co ma kluczowe znaczenie dla opracowania skuteczniejszych metod diagnostyki i terapii przepuklin.

Prawdopodobnie zmiany w kolagenie obserwowane u pacjentów z przepuklinami wynikają ze wzrostu rozkładu kolagenu przez MMP. Ponadto dostępne dane wskazują, że MMP-2 odgrywa kluczową rolę w patofizjologii przepukliny pachwinowej, zwłaszcza bezpośredniej, co zostało zaznaczone w przeglądzie autorstwa Antoniou i współautorów (144).

Zmieniona aktywność metaloproteinaz wpływa na etiopatogenezę przepukliny pachwinowej poprzez brak równowagi w szybkości metabolizmu kolagenu (144,152,157, 158). Pojawiają się dowody, iż metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP) odgrywają kluczową rolę w procesie powstawania przepuklin, szczególnie w kontekście zmian strukturalnych w tkankach łącznych. MMP to grupa enzymów proteolitycznych, które rozkładają białka macierzy zewnątrzkomórkowej, w tym kolagen i elastynę. MMP-2 i MMP-9 rozszczepiają zdenaturowany kolagen (159). Sugeruje się, że zwiększona degradacja

kolagenu przez metaloproteinazy ma wpływ na powstawanie przepuklin. Poziom białka MMP-2 był znacząco wyższy w powięzi poprzecznej, skórze oraz surowicy pacjentów cierpiących na przepuklinę pachwinową. Najwyższe wartości tego białka obserwowano u pacjentów poniżej 50 roku życia, którzy mieli bezpośrednią przepuklinę pachwinową (116,117,160-164).

Jain i in. wykazali znaczny wzrost stężenia MMP-2 w osoczu i tkance powięzi poprzecznej u pacjentów z bezpośrednią przepukliną pachwinową (165).

Sześć badań wykazało ogólnoustrojowy i lokalny wzrost stężenia MMP-2 u pacjentów z przepukliną pachwinową bezpośrednią, szczególnie wśród młodszych mężczyzn (116, 160, 162-164, 166).

W dwóch badaniach zauważono podwyższone poziomy MMP-2 i 9 w próbkach tkanki powięzi brzusznej u osób cierpiących na przepuklinę pachwinową (117,161).

W 2 badaniach Antoniou i wsp (117, 167) oznaczono ilościowo za pomocą ELISA MMP 2 i 9 oraz ich główne inhibitory TIMP 1 i 2 osocza krwi, gdzie stwierdzono obniżony poziom krążących MMP 2 i 9, wyciągając wniosek, że zaburzony metabolizm kolagenu może być patofizjologicznym mechanizmem powstawania przepukliny pachwinowej.

Strohalmova i in. (168) przeprowadziła badanie porównujące przed- i pooperacyjne stężenie w surowicy m.in. MMP2 i MMP9 przy pomocy ELISA, gdzie zaobserwowano przedoperacyjnie istotnie niższy poziom MMP2 i 9 u pacjentów z przepukliną w porównaniu z grupą kontrolną, wykazano również pooperacyjny spadek w stosunku do przedoperacyjnego poziomu większości badanych MMP oprócz MMP9, gdzie wykazano znaczny wzrost, a zanotowano największy spadek stężenia w przypadku MMP2.

W innych zaś badaniach (169) stwierdzono, nie tylko podwyższony poziom MMP-2 i 9, ale podwyższony MMP 9 u pacjentów, którzy chorowali również na inne jednostki chorobowe związane z przewlekłymi zaburzeniami żylnymi, wyciągając wniosek, że podwyższony poziom MMP-9 może być związany z innymi jednostkami chorobowymi oraz ogólnym i postępującym zaburzeniem metabolizmu kolagenu.

W badaniach własnych potwierdzono zwiększony poziom MMP-2 w surowicy u świń z przepukliną pachwinową. W teście U Manna-Whitneya wykazano statystycznie istotną

różnicę w stężeniach MMP2 między grupą badaną a kontrolną ($p < 0,05$), sugerując wyższe stężenia MMP2 w grupie z przepukliną. Wynioski z analizy ROC wskazują, że poziom MMP2 posiada umiarkowaną zdolność predykcyjną w rozróżnianiu między zwierzętami z przepukliną, a bez niej. AUC powyżej 0.5 oraz istotny statystycznie wynik sugerują, że MMP2 może służyć jako biomarker predykcyjny. Proponowany punkt odcięcia to 16857,143 pg/ml, powyżej którego badane zwierzęta mogą być klasyfikowane jako zwierzęta, u których zwiększone będzie ryzyko wystąpienia przepukliny.

Metaloproteinaza 2 (MMP2) wykazuje statystycznie istotne zwiększone stężenie w grupie świń z przepukliną w porównaniu do grupy kontrolnej, co sugeruje, że MMP2 może być związana z mechanizmami patofizjologicznymi przepukliny lub jej odpowiedzią zapalną. Wskazuje to, że bezpośrednia przepuklina pachwinowa może być schorzeniem ogólnoustrojowym, prawdopodobnie związanym z systemowym zwiększeniem aktywności MMP-2. Jest to zgodne z wynikami wcześniejszych badań. (116, 117, 160-166).

W badaniach własnych nad rolą metaloproteinazy 9 (MMP-9) w rozwoju przepuklin nie zaobserwowano znaczących różnic w stężeniach tego enzymu między grupą świń z przepuklinami, a grupą kontrolną. Statystyczne analizy wykazały, że różnice w poziomach MMP-9 nie są istotne ($p > 0,05$), co sugeruje, że jego obecność w surowicy nie różni się znacząco między świniąmi dotkniętymi przepuklinami, a zdrowymi. Dodatkowo, zarówno wartości mediany, jak i zakresy stężeń MMP-9 były podobne w obu grupach, co dodatkowo podkreśla brak istotnych odchyleń.

Krzywa ROC, która ocenia zdolność MMP-9 do działania jako czynnik predykcyjny dla przepuklin, również nie wykazała różnic między grupami, co wzmacnia wniosek, że MMP-9 prawdopodobnie nie odgrywa kluczowej roli w mechanizmach prowadzących do powstawania przepuklin, ani w odpowiedzi organizmu na tę chorobę w badanej populacji. Wynik ten sugeruje, że procesy związane z przepukliną mogą być skomplikowane i wymagać dalszych badań, by zrozumieć pełny obraz interakcji enzymów macierzy zewnątrzkomórkowej z tkankami ciała.

W dalszych analizach podjęto próbę znalezienia zależności pomiędzy poziomami kolagenu 1,3,4 oraz metaloproteinaz 2 i 9 w grupie badanej oraz kontrolnej. W naszych badaniach nie wykazano zależności pomiędzy stosunkiem stężeń kolagenu I i III jak miało to miejsce u ludzi. Wykazano jednak istotną statystycznie zależność pomiędzy stężeniem

COL4/MMP2, COL1/MMP9 oraz COL3/MMP9, które również mogą wskazywać, na zaburzoną równowagę pomiędzy poziomem kolagenu, a metaloproteinazami u świń obarczonych wadą przepukliny.

Jako, że kolagen 4 jest ważnym substratem żelatynaz wykonano analizę korelacji pomiędzy kolagenem typu IV (COL4), a metaloproteinazą 2 (MMP2) w grupie badanej i kontrolnej. Zastosowano test korelacji porządkowej Spearmana do badania zależności pomiędzy poziomami COL4 i MMP2 w surowicy. Test ten jest odpowiedni do oceny związków między zmiennymi, które niekoniecznie mają rozkład normalny, a także pozwala na ocenę monotonicznych zależności.

W grupie badanej stwierdzono istotną statystycznie dodatnią korelację pomiędzy stężeniami COL4 i MMP2 ($p < 0,05$). Dodatni współczynnik korelacji ($r = 0,30$) oznacza, że może wskazywać na ich potencjalną rolę w mechanizmach powstawania przepuklin. W grupie kontrolnej, mimo zbliżonego współczynnika korelacji jak w grupie badanej, nie stwierdzono istotności statystycznej ($p > 0,05$). Brak korelacji w grupie kontrolnej podkreśla, że te biomarkery mogą być specyficznym związane z patologicznymi stanami. Wyniki te zachęcają do dalszych badań nad ich zastosowaniem w praktyce klinicznej.

W przypadku stosunku kolagenu I do metaloproteinazy 9 (COL1/MMP9), test U Manna-Whitneya wykazał istotną różnicę między grupą badaną a kontrolną. Wynik ten, przy wysokim poziomie istotności statystycznej ($p < 0,001$), wyraźnie wskazuje na znaczącą różnicę między obiema grupami. Stosunek COL1/MMP9 może pełnić rolę predyktora, co potwierdza moc testu wynosząca 0,749 ($AUC > 0,5$), również z wysoką istotnością statystyczną ($p < 0,001$).

Analiza stosunku stężenia kolagenu III do metaloproteinazy 9 (COL3/MMP9) wykazała znaczące statystycznie ($p < 0,01$) różnice między zwierzętami z przepuklinami a kontrolnymi oraz istotny wpływ tego stosunku na ryzyko przepukliny. Wynik wskazuje, że stosunek COL3 do MMP9 jest wyższy w grupie świń z przepuklinami. Analizy wg krzywej ROC wykazują dobrą zdolność do rozróżniania między zwierzętami zdrowymi, a tymi z przepuklinami, z AUC równym 0,666. Statystycznie istotne p ($p < 0,01$) wskazuje na wysoką skuteczność biomarkera COL3/MMP9 w przewidywaniu występowania przepuklin.

Poziom metaloproteinaz w organizmie jest istotny w kontekście homeostazy tkankowej i procesów remodelowania tkankowego. MMP to enzymy proteolityczne, które biorąc udział w degradacji komponentów macierzy pozakomórkowej, w tym kolagenu, może wpływać na stężenie kolagenu w organizmie. Jeśli poziom MMP jest zbyt wysoki może prowadzić do nadmiernej degradacji kolagenu, co może wpływać negatywnie na integralność strukturalną tkanek. Z drugiej strony, niedostateczna aktywność MMP może przyczynić się do nadmiernego gromadzenia się kolagenu, co z kolei może być związane z różnymi patologiami mając również wpływ na stabilność mechaniczną tkanek.

Zachowanie równowagi pomiędzy poziomem metaloproteinaz, a syntezą kolagenu jest kluczowe dla utrzymania homeostazy i funkcji tkankowej w organizmie. Dysregulacja tego procesu może przyczynić się do różnych schorzeń, takich jak choroby tkanki łącznej. Wzrost stężenia kolagenu I i III oraz MMP2 w grupie z przepuklinami może sugerować pewnie zmiany w składzie i aktywności tkanki łącznej, co może mieć wpływ na rozwijanie się przepuklin np.:

1. Naruszenie homeostazy tkankowej, gdzie wzrost stężenia kolagenu I i III może wskazywać na intensywną syntezę kolagenów lub zwiększoną stabilność tkanki łącznej, jednak równoczesny wzrost MMP2 sugeruje równoczesną degradację kolagenu co może prowadzić do zakłócenia homeostazy tkankowej.

2. Rozregulowanie procesów remodelingu tkanki: zwiększone stężenie MMP 2 wskazuje na zwiększoną aktywność enzymu proteolitycznego, który uczestniczy w degradacji kolagenu, a to może wpływać na równowagę między syntezą, a degradacją kolagenu co jest kluczowe dla prawidłowego funkcjonowania tkanki łącznej.

3. Wpływ na strukturę tkanki: zmiany w stężeniu kolagenu I i III oraz metaloproteinazy mogą wpływać na strukturę tkanki łącznej, osłabiając ją lub nadmiernie modyfikując. To może sprzyjać powstawaniu defektów strukturalnych takich jak przepukliny.

4. Rola procesów zapalnych: MMP może być zaangażowana w procesy zapalne, co może dodatkowo wpływać na zmiany w składzie i funkcji tkanki łącznej.

Chociaż pojedyncze pomiary kolagenów i metaloproteinaz mogą nie wystarczać do diagnostyki czy prognozowania powstawania przepuklin, ich zrozumienie w szerszym

kontekście biologicznym i patologicznym może przyczynić się do lepszego projektowania strategii terapeutycznych. Na przykład, inhibitory MMP mogłyby być badane jako potencjalne terapie zmniejszające stopień degradacji kolagenów w przepuklinach, co mogłoby wzmacniać struktury tkankowe.

Przedstawione powyżej wyniki badań upoważniają mnie do wysnucia następujących wniosków.

8. Stwierdzenia i wnioski

1. Zwiększone stężenie MMP-2 w surowicy krwi świń z przepukliną pachwinową wskazuje na jej istotną rolę w degradacji kolagenu, co może przyczyniać się do powstawania przepuklin.
2. Deregulacja procesu degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) u świń z przepukliną pachwinową sugeruje upośledzony metabolizm kolagenu jako mechanizm patofizjologiczny.
3. Zmienione stężenia kolagenu typu I i III wpływają na integralność tkanki łącznej co wpływa na rozwój przepuklin.
4. Aktywność MMP, wpływa na poziom kolagenów i jest kluczowa dla utrzymania homeostazy tkankowej. Dysregulacja tej równowagi może prowadzić do powstania przepukliny pachwinowej.
5. Istotne statystycznie zależności pomiędzy stężeniami kolagenu I (COL1), kolagenu III (COL3) oraz MMP2 wskazują na zaburzoną równowagę między poziomem kolagenu, a metaloproteinazami u świń obarczonych wadą przepukliny.
6. Zmienione stosunki COL4/MMP2, COL1/MMP9 i COL3/MMP9 w grupie świń z przepuklinami wskazują na statystycznie istotne różnice między grupą badaną a kontrolną, co wskazuje na ich wpływ na ryzyko wystąpienia przepukliny.
7. Wartości stężenia COL1, COL3, MMP2 wykazują na ich umiarkowaną zdolność jako biomarkerów predykcyjnych. Wyższe stężenie COL 1, COL3, MMP2 w grupie świń z przepukliną wskazuje na związek z powstawaniem przepuklin.
8. Kolageny są kluczowymi składnikami ECM, a zmiany w ich stężeniach wpływają na strukturę i funkcjonalność tkanki łącznej, przyczyniając się do powstawania defektów strukturalnych.
9. W celu pełnego zrozumienia interakcji enzymów ECM z oraz możliwości wykorzystania ich jako biomarkerów w praktyce klinicznej w hodowli świń konieczne są dalsze badania.

9. Bibliografia

1. Searcy-Bernal R, Gardner IA, Hird DW. Effects of and factors associated with umbilical hernias in a swine herd. *J Am Vet Med Assoc.* 1994, 15;204(10):1660-4.
2. Edwards, M.J.; Mulley, R.C. Genetic, Developmental and Neoplastic Diseases. In *Diseases of Swine*; Straw, B.E., D'Allaire, S., Mengeling, W.L., Taylor, D.J., Eds.; Iowa State University Press: Ames, IA, USA. 1999, pp. 704–705.
3. Conze J, Klinge U, Schumpelick V. Hernias. In: Holzheimer RG, Mannick JA, editors. *Surgical Treatment: Evidence-Based and Problem-Oriented*. Munich: Zuckschwerdt. 2001, Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6888/>
4. Ciccarelli M.; Catone G.; Vullo C. Common Swine Field Reproductive Surgeries. *CT* 2023, 15, 87-97.
5. Knudson, Mert "Repair of Umbilical Hernias in Swine," *Iowa State University Veterinarian*: Vol. 23: Iss. 3, 1961, Article 7. Available at: http://lib.dr.iastate.edu/iowastate_veterinarian/vol23/iss3/7
6. <https://www.herniamed.de/en/131-structure> (dostęp: 02.09.2024).
7. Norton, Jeffrey A.. *Essential practice of surgery: basic science and clinical evidence*. Berlin: Springer. 2003, pp. 350.
8. Goethals A, Azmat CE, Adams CT. Femoral Hernia. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023, Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535449/>
9. Roman, S., & Kahrilas, P.J. The diagnosis and management of hiatus hernia. *BMJ : British Medical Journal.* 2014, 349.
10. Hope WW, Tuma F. Incisional Hernia. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. 2023.
11. Fitzgibbons RJ, Jr; Forse, RA. "Clinical practice. Groin hernias in adults". *The New England Journal of Medicine.* 2015, 372 (8): 756–63.

12. Muschaweck, U, and A Koch. "Sportlerleiste : Begriffsbestimmung, Differenzialdiagnostik und Therapie" [Sportsmen's groin : Definition, differential diagnosis and treatment]. *Der Radiologe*. 2019, 59(3) : 224-233.
13. Oliver Jones, The inguinal canal. Updated April 8, 2024, <https://teachmeanatomy.info/abdomen/areas/inguinal-canal/> (dostęp 02.09.2024).
14. John V. Kryger, in *Nelson Pediatric Symptom-Based Diagnosis*, 2018.
15. Read RC. Introduction. *Hernia*. 2006, 10(6):454–5.
16. Flum, D. R., Horvath, K., & Koepsell, T. Have outcomes of incisional hernia repair improved with time? A population-based analysis. *Annals of surgery*. 2003, 237(1), 129–135.
17. Luijendijk, R. W., Hop, W. C., van den Tol, M. P., de Lange, D. C., Braaksma, M. M., IJzermans, J. N., Boelhouwer, R. U., de Vries, B. C., Salu, M. K., Wereldsma, J. C., Bruijninx, C. M., & Jeekel, J. A comparison of suture repair with mesh repair for incisional hernia. *The New England journal of medicine*. 2000, 343(6), 392–398.
18. Skutek, M., van Griensven, M., Zeichen, J., Brauer, N., & Bosch, U. Cyclic mechanical stretching modulates secretion pattern of growth factors in human tendon fibroblasts. *European journal of applied physiology*. 2001, 86(1), 48–52.
19. Katsumi, Akira, Tomoki Naoe, Tadashi Matsushita, Kozo Kaibuchi and Martin Alexander Schwartz. "Integrin Activation and Matrix Binding Mediate Cellular Responses to Mechanical Stretch*." *Journal of Biological Chemistry*. 2005, 280, 16546 - 16549.
20. William A. Sodeman Jr. M.D., J.D., F.A.C.P., F.A.C.G., F.A.C.L.M., Thomas C. Sodeman M.D., in *Instructions for Geriatric Patients (Third Edition)*, 2005.
21. Ding, N. S., Mao, H. R., Guo, Y. M., Ren, J., Xiao, S. J., Wu, G. Z., Shen, H. Q., Wu, L. H., Ruan, G. F., Brenig, B., & Huang, L. S. A genome-wide scan reveals candidate susceptibility loci for pig hernias in an intercross between White Duroc and Erhualian. *Journal of animal science*. 2009, 87(8), 2469–2474.

22. Petersen, H. H., Nielsen, E. O., Hassing, A. G., Ersbøll, A. K., & Nielsen, J. P. Prevalence of clinical signs of disease in Danish finisher pigs. *The Veterinary record*. 2008, 162(12), 377–382.
23. Thaller, G., Dempfle, L. and Hoeschele, I., Investigation of the inheritance of birth defects in swine by complex segregation analysis. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 1996, 113: 77-92.
24. Vogt, D W, and M R Ellersieck. Heritability of susceptibility to scrotal herniation in swine. *American journal of veterinary research*. 1990, 51(9), 1501-3.
25. Lingaas, F., & Rønningen, K. Epidemiological and genetical studies in Norwegian pig herds. II. Overall disease incidence and seasonal variation. *Acta veterinaria Scandinavica*. 1991, 32(1), 89–96.
26. Labík K, Hořín P, Mikuláš L, Havránkova J: Hereditarily conditioned cases of atresia ani, hernia umbilicalis and syndactylia in cattle. *Acta Vet Brno*. 1977, 46:111–122
27. Herrmann, R., Utz, J., Rosenberger, E., Wanke, R., Doll, K., Distl, O.: Investigations on occurrence of congenital umbilical hernia in German Fleckvieh [German] *Zuchtungskunde*, 2000, 72:258-273.
28. Herrmann, R., Utz, J., Rosenberger, E., Doll, K., Distl, O.: Risk factors for congenital umbilical hernia in German Fleckvieh. *Vet J*. 2001, 162:233-40.
29. Distl, O., Herrmann, R., Utz, J., Doll, K., Rosenberger, E.: Inheritance of congenital umbilical hernia in German Fleckvieh *Journal of Animal Breeding & Genetics*. 2002, 119:264-273.
30. Souza, M. R., Ibelli, A. M. G., Savoldi, I. R., Cantão, M. E., Peixoto, J. O., Mores, M. A. Z., Lopes, J. S., Coutinho, L. L., & Ledur, M. C. Transcriptome analysis identifies genes involved with the development of umbilical hernias in pigs. *PloS one*. 2020, 15(5), e0232542.
31. Zhao X., Du Z.-Q., Vukasinovic N.V., Rodriguez F.R., Clutter A.C., Rothchild M.F. Candidate Gene Association for Hernia and Cryptorchidism in Commercial Lines of Pigs. *J. Anim. Sci*. 2008, 86:2.

32. Grindflek E., Hansen M.H.S., Lien S., van Son M. Genome-Wide Association Study Reveals a QTL and Strong Candidate Genes for Umbilical Hernia in Pigs on SSC14. *BMC Genom.* 2018, 19:412.
33. Straw B., Bates R., May G. Anatomical Abnormalities in a Group of Finishing Pigs: Prevalence and Pig Performance. *J. Swine Health Prod.* 2009, 17:4.
34. Liao, X. J., Lia, L., Zhang, Z. Y., Long, Y., Yang, B., Ruan, G. R., Su, Y., Ai, H. S., Zhang, W. C., Deng, W. Y., Xiao, S. J., Ren, J., Ding, N. S., & Huang, L. S. Susceptibility loci for umbilical hernia in swine detected by genome-wide association. *Genetika.* 2015, 51(10), 1163–1170.
35. Rutten-Ramos SC, Deen J. Association between umbilical hernias and genetic line in a swine multiplication herd and methods to differentiate the role of sire in the incidence of umbilical hernias in offspring. *J Swine Health Prod.* 2006, 14(6):317–322.
36. W. T. Magee, Inheritance of Scrotal Hernia in Swine, *Journal of Animal Science.* 1951, 10(2), 516–522.
37. Warwick, B. L. A Study of Hernia in Swine. Agricultural Experiment Station of the University of Wisconsin and United States Department of Agriculture Co-operating, 1926.
38. Mikami, H., & Fredeen, H. T. A genetic study of cryptorchidism and scrotal hernia in pigs. *Canadian journal of genetics and cytology. Journal canadien de genetique et de cytologie.* 1979, 21(1), 9–19.
39. Thaller G. Komplexe Segregationsanalyse zum Nachweis von Hauptgenen bei dichotomen Merkmalen am Beispiel der Anomalien des Schweins. Muenchen: Technische Universitaet, 1992.
40. Gong, Y., Shao, C., Sun, Q., Chen, B., Jiang, Y., Guo, C., Wei, J., & Guo, Y . Genetic study of indirect inguinal hernia. *Journal of medical genetics.* 1994, 31(3), 187–192.
41. Clarnette, T. D., Lam, S. K., & Hutson, J. M. Ventriculo-peritoneal shunts in children reveal the natural history of closure of the processus vaginalis. *Journal of pediatric surgery.* 1998, 33(3), 413–416.

42. Tanyel, F. C., & Okur, H. D. Autonomic nervous system appears to play a role in obliteration of processus vaginalis. *Hernia : the journal of hernias and abdominal wall surgery*. 2004, 8(2), 149–154.
43. Julia Beck, Kirsten Bornemann-Kolatzki, Christoph Knorr, Helge Taeubert & Bertram Brenig „Molecular characterization and exclusion of porcine GUSB as a candidate gene for congenital hernia inguinalis/scrotalis”, *BMC Veterinary Research*. 2006, volume 2, Article number: 14.
44. Grindflek, E., Moe, M., Taubert, H., Simianer, H., Lien, S., & Moen, T. (2006). Genome-wide linkage analysis of inguinal hernia in pigs using affected sib pairs. *BMC genetics*. 2006, 7, 25.
45. Amato, G., Agrusa, A., Romano, G., Salamone, G., Gulotta, G., Silvestri, F., & Bussani, R. Muscle degeneration in inguinal hernia specimens. *Hernia : the journal of hernias and abdominal wall surgery*. 2012, 16(3), 327–331.
46. Rodrigues, A. F. G., Ibelli, A. M. G., Peixoto, J. O., Cantão, M. E., Oliveira, H. C., Savoldi, I. R., Souza, M. R., Mores, M. A. Z., Carreño, L. O. D., & Ledur, M. C. Genes and SNPs Involved with Scrotal and Umbilical Hernia in Pigs. *Genes*. 2021, 12(2), 166.
47. Beuermann, C., Beck, J., Schmelz, U., Dunkelberg, H., Schütz, E., Brenig, B., & Knorr, C. (2009). Tissue calcium content in piglets with inguinal or scrotal hernias or cryptorchidism. *Journal of comparative pathology*. 2009, 140(2-3), 182–186.
48. Bendavid R. The unified theory of hernia formation. *Hernia : the journal of hernias and abdominal wall surgery*. 2004, 8(3), 171–176.
49. Franz M. G. The biology of hernia formation. *The Surgical clinics of North America*. 2008, 88(1), 1–vii.
50. Michael P. Federle, Siva P. Raman, Inguinal Hernia, In *Diagnostic Imaging, Diagnostic Imaging: Gastrointestinal (Third Edition)*, Elsevier. 2015, Pages 92-95.

51. Aya Kamaya, Jade Wong-You-Cheong, Hee Sun Park, Barton F. Lane, Fauzia Vandermeer, Katherine E. Maturen, Shweta Bhatt, Bryan R. Foster, Sathi A. Sukumar, Ashish P. Wasnik: Groin Hernia, In Diagnostic Ultrasound, Diagnostic Ultrasound: Abdomen and Pelvis, Elsevier. 2016, pages 618-623.
52. Rajkumar, K., Trivedi, A., Molavi, I., & Talishinskiy, T. Combined pantaloon and femoral hernia: a common pathology in medicine occurring simultaneously. *Journal of surgical case reports*, 2022.
53. https://www.pig333.com/pig-diseases/hernias_104 , (dostęp 02.09.2024).
54. Lu, P., Takai, K., Weaver, V. M., & Werb, Z. Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2011, 3(12).
55. Mecham, R.P., Overview of Extracellular Matrix. *Current Protocols in Cell Biology*. 2012, 57: 10.1.1-10.1.16.
56. Frantz, C., Stewart, K. M., & Weaver, V. M. The extracellular matrix at a glance. *Journal of cell science*. 2010, 123(Pt 24), 4195–4200.
57. Dragoš A, Kovács ÁT. The Peculiar Functions of the Bacterial Extracellular Matrix. *Trends in Microbiology*. Elsevier Ltd. 2017, pp. 257–266.
58. Glorieux FH. Osteogenesis imperfecta. *Best Practice and Research: Clinical Rheumatology*. 2008, pp. 85–100.
59. Brinckmann, J. Collagens at a Glance. In: Brinckmann, J., Notbohm, H., Müller, P.K. *Collagen. Topics in Current Chemistry*. Springer, Berlin, Heidelberg. 2005, 247.
60. Veit, G., Kobbe, B., Keene, D. R., Paulsson, M., Koch, M., & Wagener, R. Collagen XXVIII, a novel von Willebrand factor A domain-containing protein with many imperfections in the collagenous domain. *The Journal of biological chemistry*. 2006, 281(6), 3494–3504.

61. Brazel, D., Oberbäumer, I., Dieringer, H., Babel, W., Glanville, R. W., Deutzmann, R., & Kühn, K. Completion of the amino acid sequence of the alpha 1 chain of human basement membrane collagen (type IV) reveals 21 non-triplet interruptions located within the collagenous domain. *European journal of biochemistry*. 1987, 168(3), 529–536.
62. Ramshaw, J. A., Shah, N. K., & Brodsky, B. Gly-X-Y tripeptide frequencies in collagen: a context for host-guest triple-helical peptides. *Journal of structural biology*. 1998, 122(1-2), 86–91.
63. Ricard-Blum S. The collagen family. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2011, 3(1), a004978.
64. Zou, Y., Wang, L., Cai, P., Li, P., Zhang, M., Sun, Z., Sun, C., Xu, W., & Wang, D. Effect of ultrasound assisted extraction on the physicochemical and functional properties of collagen from soft-shelled turtle calipash. *International journal of biological macromolecules*. 2017, 105(Pt 3).
65. Gaurav Kumar Pal, P.V. Suresh, Sustainable valorisation of seafood by-products: Recovery of collagen and development of collagen-based novel functional food ingredients, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2016, 37, Part B, Pages 201-215.
66. Yue B. Biology of the extracellular matrix: an overview. *Journal of glaucoma*. 2014, 23(8 Suppl 1), S20–S23.
67. Albaugh, V. L., Mukherjee, K., & Barbul, A. Proline Precursors and Collagen Synthesis: Biochemical Challenges of Nutrient Supplementation and Wound Healing. *The Journal of nutrition*. 2017, 147(11), 2011–2017.
68. Blass, S. C., Goost, H., Tolba, R. H., Stoffel-Wagner, B., Kabir, K., Burger, C., Stehle, P., & Ellinger, S. Time to wound closure in trauma patients with disorders in wound healing is shortened by supplements containing antioxidant micronutrients and glutamine: a PRCT. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*. 2012, 31(4), 469–475.
69. Peterkofsky B. Ascorbate requirement for hydroxylation and secretion of procollagen: relationship to inhibition of collagen synthesis in scurvy. *The American journal of clinical nutrition*. 1991, 54(6 Suppl), 1135S–1140S.

70. Agren, M. S., Andersen, L., Heegaard, A. M., & Jorgensen, L. N. Effect of parenteral zinc sulfate on colon anastomosis repair in the rat. *International journal of colorectal disease*. 2008, 23(9), 857–861.
71. Luomala T., Pihlman M. Anatomy of the fascia from the clinical point of view. In: Stecco L., Stecco C., Hammer W., editors. *A Practical Guide to Fascial Manipulation*. Elsevier; Alpharetta, GA, USA. 2016, pp. 19–59.
72. Chowdhury S.R., Busra M.F., Lokanathan Y., Ng M.H., Law J.X., Cletus U.C., Haji Idrus R.B. Collagen type I: A versatile biomaterial. In: Chun H.J., editor. *Novel Biomaterials for Regenerative Medicine, Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer; Singapore. 2018, 1077, pp. 389–414.
73. Barnes, A.M.; Ashok, A.; Makareeva, E.N.; Brusel, M.; Cabral, W.A.; Weis, M.; Moali, C.; Bettler, E.; Eyre, D.R.; Cassella, J.P.; et al. COL1A1 C-Propeptide Mutations Cause ER Mislocalization of Procollagen and Impair C-Terminal Procollagen Processing. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis*. 2019, 1865, 2210–2223.
74. Cabral, W.A.; Fratzi-Zelman, N.; Weis, M.; Perosky, J.E.; Alimasa, A.; Harris, R.; Kang, H.; Makareeva, E.; Barnes, A.M.; Roschger, P.; et al. Substitution of Murine Type I Collagen A1 3-Hydroxylation Site Alters Matrix Structure but Does Not Recapitulate Osteogenesis Imperfecta Bone Dysplasia. *Matrix Biol*. 2020, 90, 20–39.
75. Devos H, Zoidakis J, Roubelakis MG, Latosinska A, Vlahou A. Reviewing the Regulators of COL1A1. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023, 24(12):10004.
76. Kuivaniemi, H., & Tromp, G. Type III collagen (COL3A1): Gene and protein structure, tissue distribution, and associated diseases. *Gene*. 2019, 707, 151–171.
77. Välikkilä, M., Melkonniemi, M., Kvist, L., Kuivaniemi, H., Tromp, G., & Ala-Kokko, L. Genomic organization of the human COL3A1 and COL5A2 genes: COL5A2 has evolved differently than the other minor fibrillar collagen genes. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 2001, 20(5-6), 357–366.
78. Boute, N., Exposito, J. Y., Boury-Esnault, N., Vacelet, J., Noro, N., Miyazaki, K., Yoshizato, K., & Garrone, R. Type IV collagen in sponges, the missing link in basement membrane ubiquity. *Biology of the cel*. 1996, 88(1-2), 37–44.

79. Abreu-Velez, A. M., & Howard, M. S. Collagen IV in Normal Skin and in Pathological Processes. *North American journal of medical sciences*. 2012, 4(1), 1–8.
80. Öhlund, D., Franklin, O., Lundberg, E., Lundin, C., & Sund, M. Type IV collagen stimulates pancreatic cancer cell proliferation, migration, and inhibits apoptosis through an autocrine loop. *BMC cancer*. 2013, 13, 154.
81. Mak, K. M., Png, C. Y., & Lee, D. J. Type V Collagen in Health, Disease, and Fibrosis. *Anatomical record (Hoboken, N.J. : 2007)*. 2016, 299(5), 613–629.
82. Fu, Y., Therkildsen, M., Aluko, R. E., & Lametsch, R. Exploration of collagen recovered from animal by-products as a precursor of bioactive peptides: Successes and challenges. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2019, 59(13), 2011–2027.
83. Park, A. C., Phan, N., Massoudi, D., Liu, Z., Kernien, J. F., Adams, S. M., Davidson, J. M., Birk, D. E., Liu, B., & Greenspan, D. S. Deficits in Col5a2 Expression Result in Novel Skin and Adipose Abnormalities and Predisposition to Aortic Aneurysms and Dissections. *The American journal of pathology*. 2017, 187(10), 2300–2311.
84. Casanova, A. B., Trindade, E. N., & Trindade, M. R. Collagen in the transversalis fascia of patients with indirect inguinal hernia: a case-control study. *American journal of surgery*. 2009, 198(1), 1–5.
85. White, B., Osier, C., Gletsu, N., Jeansonne, L., Baghai, M., Sherman, M., Smith, C.D., Ramshaw, B., Lin, E. Abnormal primary tissue collagen composition in the skin of recurrent incisional hernia patients. *American Surgeon*. 2007, 73(12):1254-1258.
86. Jansen, P. L., Mertens Pr, P.r, Klinge, U., & Schumpelick, V. The biology of hernia formation. *Surgery*. 2004, 136(1), 1–4.
87. Klinge U, Zheng H, Si ZY, Schumpelick V, Bhardwaj R, Klosterhalfen B.. Synthesis of type I and III collagen, expression of fibronectin and matrix metalloproteinases-1 and -13 in hernial sac of patients with inguinal hernia. *International Journal of Surgical Investigation*. 1999, 1(3):219-227.

88. Klinge U, Si ZY, Zheng H, Schumpelick V, Bhardwaj RS, Klosterhalfen B. Abnormal collagen I to III distribution in the skin of patients with incisional hernia. *Eur Surg Res.* 2000, 32:43–48.
89. Nagase, H., Visse, R., & Murphy, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular research.* 2006, 69(3), 562–573.
90. Kucharz EJ. Budowa i metabolizm kolagenu oraz jego udział w chorobach kości. *Terapia.* 1999; 10(81): 32-5.
91. Pans, A., Albert, A., Lapière, C. M., & Nusgens, B. Biochemical study of collagen in adult groin hernias. *The Journal of surgical research.* 2001, 95(2), 107–113.
92. Pans, A., Pierard, G. E., Albert, A., & Desaive, C. Biomechanical assessment of the transversalis fascia and rectus abdominis aponeurosis in inguinal herniation-Preliminary results. *Hernia.* 1997, 1, 27-30.
93. Pans A. Nouvelles perspectives dans l'étiologie des hernies de l'aîne [New prospects in the etiology of groin hernias]. *Chirurgie; memoires de l'Academie de chirurgie.* 1999, 124(3), 288–297.
94. Pans, A., Pierard, G. E., Albert, A., & Desaive, C. Adult groin hernias: new insight into their biomechanical characteristics. *European journal of clinical investigation.* 1997, 27(10), 863–868.
95. Rosch, R., Klinge, U., Si, Z., Junge, K., Klosterhalfen, B., & Schumpelick, V. (2002). A role for the collagen I/III and MMP-1/-13 genes in primary inguinal hernia?. *BMC medical genetics.* 2002, 3(2).
96. Friedman, D. W., Boyd, C. D., P., Greco, R. S., Boyarsky, A. H., Mackenzie, J. W., & Deak, S. B. Increases in type III collagen gene expression and protein synthesis in patients with inguinal hernias. *Annals of surgery.* 1993, 218(6), 754–760.
97. Lipka, D., & Boratyński, J. Metaloproteinazy MMP. Struktura i funkcja. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej.* 2008, 62.

98. Visse, R., & Nagase, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation research*. 2003, 92(8), 827–839.
99. Ala-aho, R., & Kähäri, V. M. Collagenases in cancer. *Biochimie*. 2005, 87(3-4), 273–286.
100. Handsley, M. M., & Edwards, D. R. Metalloproteinases and their inhibitors in tumor angiogenesis. *International journal of cancer*. 2005, 115(6), 849–860.
101. Allan, J. A., Docherty, A. J., Barker, P. J., Huskisson, N. S., Reynolds, J. J., & Murphy, G. Binding of gelatinases A and B to type-I collagen and other matrix components. *The Biochemical journal*. 1995, 309 (Pt 1), 299–306.
102. Aimes, R. T., & Quigley, J. P. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments. *The Journal of biological chemistry*. 1995, 270(11), 5872–5876.
103. Mazzoni A, Mannello F, Tay FR, et al. Zymographic Analysis and Characterization of MMP-2 and -9 Forms in Human Sound Dentin. *Journal of Dental Research*. 2007, 86(5):436-440.
104. Maskos K. Crystal structures of MMPs in complex with physiological and pharmacological inhibitors. *Biochimie*. 2005, 87(3-4), 249–263.
105. Murphy, G., Allan, J. A., Willenbrock, F., Cockett, M. I., O'Connell, J. P., & Docherty, A. J. The role of the C-terminal domain in collagenase and stromelysin specificity. *The Journal of biological chemistry*. 1992, 267(14), 9612–9618.
106. Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biological chemistry*. 1997, 378(3-4), 151–160.
107. Egeblad, M., & Werb, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature reviews. Cancer*. 2002, 2(3), 161–174.

108. Hrabec E., Naduk J., Stręk M., Hrabec Z.: Kolagenazy typu IV (MMP-2 i MMP-9) i ich substraty – białka macierzy pozakomórkowej, hormony, cytokiny, hemokiny i ich receptory. *Post. Biochem.* 2007, 53:37–4.
109. Chakrabarti, S., & Patel, K. D. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 in pulmonary pathology. *Experimental lung research.* 2005, 31(6), 599–621.
110. Nagase H. Cell surface activation of progelatinase A (proMMP-2) and cell migration. *Cell research.* 1998, 8(3), 179–186.
111. Manuel, J. A., & Gawronska-Kozak, B. Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) is upregulated during scarless wound healing in athymic nude mice. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology.* 2006, 25(8), 505–514.
112. Ardi, V. C., Kupriyanova, T. A., Deryugina, E. I., & Quigley, J. P. Human neutrophils uniquely release TIMP-free MMP-9 to provide a potent catalytic stimulator of angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2007, 104(51), 20262–20267.
113. Perez-Illarbe, M., Agbulut, O., Pelacho, B., Ciorba, C., San Jose-Eneriz, E., Desnos, M., Hagege, A. A., Aranda, P., Andreu, E. J., Menasché, P., & Prósper, F. Characterization of the paracrine effects of human skeletal myoblasts transplanted in infarcted myocardium. *European journal of heart failure.* 2008, 10(11), 1065–1072.
114. Bergers, G., Brekken, R., McMahon, G., Vu, T. H., Itoh, T., Tamaki, K., Tanzawa, K., Thorpe, P., Itohara, S., Werb, Z., & Hanahan, D. (2000). Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nature cell biology.* 2000, 2(10), 737–744.
115. Ezhilarasan, R., Jadhav, U., Mohanam, I., Rao, J. S., Gujrati, M., & Mohanam, S. The hemopexin domain of MMP-9 inhibits angiogenesis and retards the growth of intracranial glioblastoma xenograft in nude mice. *International journal of cancer.* 2009, 124(2), 306–315.

116. Bellón, J. M., Bajo, A., Ga-Honduvilla, N., Gimeno, M. J., Pascual, G., Guerrero, A., & Buján, J. Fibroblasts from the transversalis fascia of young patients with direct inguinal hernias show constitutive MMP-2 overexpression. *Annals of surgery*. 2001, 233(2), 287–291.
117. Antoniou GA, Tentes IK, Antoniou SA, Simopoulos C, Lazarides MK. Matrix metalloproteinase imbalance in inguinal hernia formation. *J Invest Surg*. 2011, 24(4):145-50.
118. Tabatabaei MS, Ahmed M. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Methods Mol Biol*. 2022, 2508:115-134.
119. Engvall E. The ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Chem*. 2010, 56(2):319-20.
120. Kohl TO, Ascoli CA. Immunometric Double-Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Cold Spring Harb Protoc*. 2017, (6):pdb.prot093724.
121. Shah K, Maghsoudlou P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics. *Br J Hosp Med (Lond)*. 2016, 77(7):C98-101.
122. Liu J, Ruan G, Ma W, Sun Y, Yu H, Xu Z, Yu C, Li H, Zhang CW, Li L. Horseradish peroxidase-triggered direct in situ fluorescent immunoassay platform for sensing cardiac troponin I and SARS-CoV-2 nucleocapsid protein in serum. *Biosens Bioelectron*. 2022, 198:113823.
123. Guo L, Xu S, Ma X, Qiu B, Lin Z, Chen G. Dual-color plasmonic enzyme-linked immunosorbent assay based on enzyme-mediated etching of Au nanoparticles. *Sci Rep*. 2016, 6:32755.
124. Thiha A, Ibrahim F. A Colorimetric Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Detection Platform for a Point-of-Care Dengue Detection System on a Lab-on-Compact-Disc. *Sensors (Basel)*. 2015, 15(5):11431-41.
125. Marek Ręklewski. *Statystyka opisowa. Teoria i przykłady*. Włocławek, 2020.
126. <https://zpe.gov.pl/a/przeczytaj/DxtPfl1Iq> (dostęp: 02.09.2024).

127. Hollander, M., Wolfe, D. A., & Chicken, E. Nonparametric statistical methods. John Wiley & Sons, 2013.
128. Marascuilo L.A. and McSweeney M. Nonparametric and distribution-free method for the social sciences. Monterey, CA: Brooks/Cole Publishing Company, 1977.
129. Mann, H.B. and Whitney, D.R. On a Test of Whether One of Two Random Variables Is Stochastically Larger than the Other. *Annals of Mathematical Statistics*. 1947, 18, 50-60.
130. Spearman, C. The Proof and Measurement of Association between Two Things. *America Journal of Psychology*. 1904, 15, 72-101.
131. Sperandei S. Understanding logistic regression analysis. *Biochem Med (Zagreb)*. 2014, 24(1):12-8.
132. Nahm FS. Receiver operating characteristic curve: overview and practical use for clinicians. *Korean J Anesthesiol*. 2022, 75(1):25-36.
133. Henriksen NA. Systematic and local collagen turnover in hernia patients. *Danmarks Medicinske Journal*. 2016, 63(7).
134. Udén A, Lindhagen T. Inguinal hernia in patients with congenital dislocation of the hip. A sign of general connective tissue disorder. *Acta Orthop Scand*. 1988, 59(6):667-8.
135. Liem MS, van der Graaf Y, Beemer FA, van Vroonhoven TJ. Increased risk for inguinal hernia in patients with Ehlers-Danlos syndrome. *Surgery*. 1997, 122(1):114-5.
136. Girotto JA, Malaisrie SC, Bulkely G, Manson PN. Recurrent ventral herniation in Ehlers-Danlos syndrome. *Plast Reconstr Surg*. 2000, 106(7):1520-6.
137. Stevick CA, Long JB, Jamasbi B, Nash M. Ventral hernia following abdominal aortic reconstruction. *Am Surg*. 1988, 54(5):287-9.
138. Lehnert B, Wadouh F. High coincidence of inguinal hernias and abdominal aortic aneurysms. *Ann Vasc Surg*. 1992, 6(2):134-7.

139. Hall KA, Peters B, Smyth SH, Warneke JA, Rappaport WD, Putnam CW, Hunter GC. Abdominal wall hernias in patients with abdominal aortic aneurysmal versus aortoiliac occlusive disease. *Am J Surg*. 1995,170(6):572-5; discussion 575-6.
140. Henkel W, Glanville RW. Covalent crosslinking between molecules of type I and type III collagen. The involvement of the N-terminal, nonhelical regions of the alpha 1 (I) and alpha 1 (III) chains in the formation of intermolecular crosslinks. *Eur J Biochem*. 1982, 122(1):205-13.
141. Fleischmajer R, Perlish JS, Burgeson RE, Shaikh-Bahai F, Timpl R. Type I and type III collagen interactions during fibrillogenesis. *Ann N Y Acad Sci*. 1990, 580:161-75.
142. Uitto J, Perejda AJ, Abergel RP, Chu ML, Ramirez F. Altered steady-state ratio of type I/III procollagen mRNAs correlates with selectively increased type I procollagen biosynthesis in cultured keloid fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985, 82(17):5935-9.
143. Friedman DW, Boyd CD, Mackenzie JW, Norton P, Olson RM, Deak SB. Regulation of collagen gene expression in keloids and hypertrophic scars. *J Surg Res*. 1993, 55(2):214-22.
144. Antoniou SA, Antoniou GA, Granderath FA, Simopoulos C. The role of matrix metalloproteinases in the pathogenesis of abdominal wall hernias. *Eur J Clin Invest*. 2009, 39(11):953-9.
145. Schäffer M, Becker HD. Immunregulation der Wundheilung [Immune regulation of wound healing]. *Chirurg*. 1999, 70(8):897-908. German.
146. Shoulders MD, Raines RT. Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem*. 2009, 78:929-58.
147. Romanic AM, Adachi E, Kadler KE, Hojima Y, Prockop DJ. Copolymerization of pNcollagen III and collagen I. pNcollagen III decreases the rate of incorporation of collagen I into fibrils, the amount of collagen I incorporated, and the diameter of the fibrils formed. *J Biol Chem*. 1991, 266(19):12703-9.
148. Zheng H, Si Z, Kasperk R, Bhardwaj RS, Schumpelick V, Klinge U, Klosterhalfen B. Recurrent inguinal hernia: disease of the collagen matrix? *World J Surg*. 2002, 26(4):401-8.

149. Si Z, Bhardwaj R, Rosch R, Mertens PR, Klosterhalfen B, Klinge U. Impaired balance of type I and type III procollagen mRNA in cultured fibroblasts of patients with incisional hernia. *Surgery*. 2002, 131(3):324-31. Erratum in: *Surgery* 2002;131(5):501. Rhanjit, Bhardwaj [corrected to Bhardwaj, Rhanjit]; Rene, Peter Merten [corrected to Mertens, Peter Rene].
150. Salameh JR, Talbott LM, May W, Gosheh B, Vig PJ, McDaniel DO. Role of biomarkers in incisional hernias. *Am Surg*. 2007;73(6):561-7; discussion 567-8.
151. Peacock EE Jr, Madden JW. Studies on the biology and treatment of recurrent inguinal hernia. II. Morphological changes. *Ann Surg*. 1974;179(5):567-71.
152. Klinge U, Zheng H, Si Z, Schumpelick V, Bhardwaj RS, Muys L, Klosterhalfen B. Expression of the extracellular matrix proteins collagen I, collagen III and fibronectin and matrix metalloproteinase-1 and -13 in the skin of patients with inguinal hernia. *Eur Surg Res*. 1999, 31(6):480-90.
153. Zhao F, Chen F, Yuan X, Liu Y, Chen J. Decreased collagen type III synthesis in skin fibroblasts is associated with parastomal hernia following colostomy. *Int J Mol Med*. 2019, 44(5):1609-1618.
154. Henriksen NA, Mortensen JH, Lorentzen L, Ågren MS, Bay-Jensen AC, Jorgensen LN, Karsdal MA. Abdominal wall hernias-A local manifestation of systemically impaired quality of the extracellular matrix. *Surgery*. 2016, 160(1):220-227.
155. Basson MD. Invited research review: Cell-matrix interactions in the gut epithelium. *Surgery*. 2003, 133(3):263-7.
156. Jabłońska-Trypuć A, Matejczyk M, Rosochacki S. Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2016, 31(sup1):177-183.
157. Henriksen NA, Mortensen JH, Sorensen LT, Bay-Jensen AC, Ågren MS, Jorgensen LN, Karsdal MA. The collagen turnover profile is altered in patients with inguinal and incisional hernia. *Surgery*. 2015, 157(2):312-21.

158. Peeters E, De Hertogh G, Junge K, Klinge U, Miserez M. Skin as marker for collagen type I/III ratio in abdominal wall fascia. *Hernia*. 2014, 18(4):519-25.
159. Somerville RP, Oblander SA, Apte SS. Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. *Genome Biol*. 2003, 4(6):216.
160. Bellón JM, Buján J, Honduvilla NG, Jurado F, Gimeno MJ, Turnay J, Olmo N, Lizarbe MA. Study of biochemical substrate and role of metalloproteinases in fascia transversalis from hernial processes. *Eur J Clin Invest*. 1997, 27(6):510-6.
161. Aren A, Gökçe AH, Gökçe FS, Dursun N. Roles of matrix metalloproteinases in the etiology of inguinal hernia. *Hernia*. 2011, 15(6):667-71.
162. Smigielski J, Kołomecki K, Ziemniak P, Drozda R, Amsolik M, Kuzdak K. Degradation of collagen by metalloproteinase 2 in patients with abdominal hernias. *Eur Surg Res*. 2009, 42(2):118-21.
163. Pascual G, Rodríguez M, Gómez-Gil V, Trejo C, Buján J, Bellón JM. Active matrix metalloproteinase-2 upregulation in the abdominal skin of patients with direct inguinal hernia. *Eur J Clin Invest*. 2010, 40(12):1113-21.
164. Smigielski J, Brocki M, Kuzdak K, Kołomecki K. Serum MMP 2 and TIMP 2 in patients with inguinal hernias. *Eur J Clin Invest*. 2011, 41(6):584-8.
165. Jain, V.; Srivastava, R.; Rawat, N.S.; Misra, S.; Jha, S.; Amla, D.V. Matrix Metalloproteinase-2 and its Relation with Incisional & Inguinal Hernia. *JIMSA*. 2011, 24, 4.
166. Jain V, Srivastava R, Jha S, Misra S, Rawat NS, Amla DV. Study of matrix metalloproteinase-2 in inguinal hernia. *J Clin Med Res*. 2009, 1(5):285-9.
167. Antoniou GA, Tentes IK, Antoniou SA, Georgiadis GS, Giannoukas AD, Simopoulos C, Lazarides MK. Circulating matrix metalloproteinases and their inhibitors in inguinal hernia and abdominal aortic aneurysm. *Int Angiol*. 2011, 30(2):123-9.

168. Strohalmová S, Levová K, Kuběna AA, Krška Z, Hoskovec D, Zima T, Kalousová M. The effect of surgery on the levels of matrix metalloproteinases in patients with inguinal hernia. *Physiol Res.* 2021, 70(4):627-634.

169. Serra R, Buffone G, Costanzo G, Montemurro R, Scarcello E, Stillitano DM, Damiano R, de Franciscis S. Altered metalloproteinase-9 expression as least common denominator between varicocele, inguinal hernia, and chronic venous disorders. *Ann Vasc Surg.* 2014, 28(3):705-9.