

**„ŠTRUKTURÁLNE ZMENY ŽILOVEJ STENY U PACIENTOV S PRIMÁRNOU  
FORMOU CHRONICKEJ VÉNOVEJ CHOROBY DOLNÝCH KONČATÍN.“**

**habilitačný spis**

**Odbor: 51 – 01 – 09 normálna anatómia, histológia a embryológia**

**MUDr. Zora Haviarová PhD.**

**Lekárska fakulta Univerzity Komenského  
Anatomický ústav**

**Bratislava, 2011.**

## **SÚHRN.**

Chronická vénová choroba dolných končatín je častou príčinou pracovnej neschopnosti, postihujúcou vo vyspelých krajinách 40- 60% žien a 15-30% mužov v produktívnom veku, spotrebúvajúc nemalé finančné prostriedky zdravotnej starostlivosti na liečbu jej symptómov. Etiopatogenéza jej primárnej formy nie je dosiaľ jednoznačne objasnená a preto aj jej liečba je prevažne symptomatická a často nie veľmi úspešná.

Predkladaná práca sa detailnejšie zaoberá rozborom štyroch najdôležitejších predpokladaných, už dlhšie skúmaných, etiologických faktorov: a) slabosť žilovej steny spojená s poruchou buniek hladkej svaloviny a extracelulárnej matrix (ECM) žilovej steny, b) poškodenie žilových chlopní, c) poruchami mikrocirkulácie, d) dysfunkciou žilového endotelu. Súčasne popisuje aj novšie skúmané príčiny: e) zmeny citlivosti na hormonálne podnety, f) genetickú predispozíciu slabosti zložiek ECM, g) porušenú výživu žilovej steny, pričom je dokumentovaná niekoľkými prácami autorky z danej oblasti.

Napriek popísanému pretrvávajúcemu záujmu autorov mnohých oblastí medicíny a krajín sveta kauzálna príčina primárnej formy chronickej vénovej choroby ostáva stále neznáma a môže byť užitočným predmetom spolupráce mnohých odborníkov.

## **ABSTRACT.**

Chronic venous disease is a frequent cause of the working disability affecting the lower limbs of 40-60% of women and 15-30% of men of productive age in the developed countries and consumes a considerable amount of health care resources for the therapy of its symptoms. Etiopathogenetics of its primary form is nowadays still not clearly understood yet, hence its therapy is mainly symptomatic and usually not very effective.

The submitted work deals in details with the analysis of the four most important presumed (longer analysed) etiologic factors: a) the weakness of the vein wall associated with the impairment of its smooth muscle cells and extracellular matrix (ECM), b) dysfunction of the venous valves, c) dysfunction of microcirculation, d) dysfunction of the venous endothel. Furthermore this work gives the description of newer analysed causes: e) changes in the sensitivity to the hormonal stimuli, f) genetic conditions of the weakness ECM components, g) impaired vein wall nourishment. The analysis is supported with several similar works of the author.

Despite the described continuing effort and interest of many authors working in many medical fields and in various countries, the exact cause of the primary form of this disease remain unknown and that's why it should be the subject of cooperation of many experts.

## OBSAH.

SÚHRN.....	2
ABSTRACT.....	2
<b>ÚVOD.....</b>	<b>4</b>
1. 1. ŽILOVÉ OCHORENIA.....	4
1. 2. VÝZNAM CHRONICKEJ VÉNOVEJ CHOROBY DOLNÝCH KONČATÍN (A VÝDAVKY NA LIEČBU JEJ SYMPTÓMOV).....	5
1. 2. 1. VO SVETE.....	5
1. 2. 2. V EURÓPE.....	5
1. 2. 3. V SLOVENSKEJ REPUBLIKE.....	6
1. 3. PRIMÁRNA FORMA CHRONICKEJ VÉNOVEJ CHOROBY DOLNÝCH KONČATÍN.....	7
<b>2. SÚČASNÝ STAV UVEDENEJ PROBLEMATIKY DOMA AJ V ZAHRANIČÍ.....</b>	<b>9</b>
2. 1. EMBRYOLÓGIA ŽILOVÉHO SYSTÉMU.....	9
2. 1. 1. PRIMITÍVNY KARDIOVASKULÁRNY SYSTÉM.....	9
2. 1. 2. VÝVOJ VÉN.....	11
2. 2. ANATÓMIA ŽILOVÉHO SYSTÉMU.....	12
2. 2. 1. ANATÓMIA ŽILOVÉHO SYSTÉMU DOLNÝCH KONČATÍN.....	12
2. 3. HISTOLÓGIA ŽILOVEJ STENY.....	16
2. 4. CHRONICKÁ VÉNOVÁ CHOROBA DOLNÝCH KONČATÍN.....	20
2. 4. 1. PRIMÁRNA FORMA CHRONICKEJ VÉNOVEJ CHOROBY DOLNÝCH KONČATÍN.....	23
2. 4. 1. 1. SLABOSŤ ŽILOVEJ STENY SPOJENÁ S PORUCHOU BUNIEK HLADKEJ SVALOVINY A EXTRACELULÁRNEJ MATRIX ŽILOVEJ STENY.....	24
2. 4. 1. 1. 1. PORUCHY HLADKEJ SVALOVINY ŽILOVEJ STENY.....	25
2. 4. 1. 1. 1. 1. SUBCELULÁRNA REGULÁCIA PREMENY HLADKEJ SVALOVEJ BUNKY VO VÝVOJI VARIKÓZNYCH ŽÍL.....	30
2. 4. 1. 1. 2. PORUCHY EXTRACELULÁRNEJ MATRIX ŽILOVEJ STENY.....	32
2. 4. 1. 1. 2. 1. PORUCHY ELASTÍNU ŽILOVEJ STENY VARIKÓZNYCH ŽÍL.....	32
2. 4. 1. 1. 2. 2. PORUCHY KOLAGÉNU ŽILOVEJ STENY VARIKÓZNYCH ŽÍL.....	35
2. 4. 1. 1. 2. 2. 1. SUBTYPIZÁCIA KOLAGÉNOV V STENE VARIKÓZNYCH ŽÍL.....	45
2. 4. 1. 1. 2. 3. ZMENY V ŠTRUKTÚRE OSTATNÝCH PROTEÍNOV A SÚČASTÍ EXTRACELULÁRNEJ MATRIX.....	53
2. 4. 1. 1. 3. HRÚBKA (IMT) ŽILOVEJ STENY U PACIENTOV S PRIMÁRNOU VARIKOZITOU DK.....	58
2. 4. 1. 2. GENETICKÉ PREDISPOZÍCIE VZNIKU PRIMÁRNE VARIKÓZNYCH ŽÍL.....	64
2. 4. 1. 3. POŠKODENIE ŽILOVÝCH CHLOPNÍ.....	66
2. 4. 1. 4. PORUCHY MIKROCIRKULÁCIE A ICH VÝZNAM PRI VZNIKU A VÝVOJI VARIKÓZNYCH ŽÍL.....	69
2. 4. 1. 4. 1. MECHANIZMUS ADHÉZIE A MIGRÁCIE LEUKOCYTOV CEZ CIEVNY ENDOTEL.....	70
2. 4. 1. 4. 2. DYSFUNKCIA ŽILOVÉHO ENDOTELU.....	72
2. 4. 1. 5. PORUCHY VÝŽIVY CIEVNEJ STENY.....	80
2. 4. 1. 6. PATOLOGICKÁ BUNKOVÁ INFILTRÁCIA ŽILOVEJ STENY PRI VZNIKU A VÝVOJI VARIKÓZNYCH ŽÍL.....	82
2. 4. 1. 7. HORMONÁLNE PODMIENKY VZNIKU A ROZVOJA VARIKÓZNYCH ŽÍL.....	88
<b>3. ZÁVER.....</b>	<b>90</b>
<b>4. ZOZNAMY.....</b>	<b>91</b>
4. 1. ZOZNAM GRAFOV.....	91
4. 2. ZOZNAM OBRÁZKOV.....	91
4. 3. ZOZNAM TABULIEK.....	91
4. 4. ZOZNAM V LOŽENEJ LITERATÚRY AUTORKY:.....	91
4. 5. ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY:.....	92

## ÚVOD.

### 1. 1. ŽILOVÉ OCHORENIA.

Choroby žíl (vén) sú v skupine chorôb obehového systému spolu s artériovou hypertenziou veľmi častou príčinou pracovnej neschopnosti, v angiologických ambulanciách tvoria asi 65% pacientov. Klasifikácia žilových chorôb je nejednotná. Staršie rozdelenie na obštrukčné a neobštrukčné choroby nemá podľa súčasných poznatkov žiadne opodstatnenie. Z praktického hľadiska ide okrem vzácnejších chorôb najmä o tromboflebitídy, flebotrombózy a chronickú vénovú chorobu dolných končatín [41].

Ochorenia žíl dolných končatín zahŕňajú široké spektrum klinickej závažnosti od asymptomatickej venózne insuficiencie, cez teleangiektázie, retikulárne vény, veľké kmeňové varixy, venózne kožné zmeny až po chronické venózne ulcerácie. Podľa štatistických údajov z dostupnej literatúry výdavky rezortov zdravotníctva vo Veľkej Británii, Francúzsku a Nemecku na liečbu žilových ochorení a ich sprievodných komplikácií dosahujú výšku až 1,5- 2% celkových výdavkov na zdravotnú starostlivosť v týchto krajinách. Žilové ochorenia okrem toho spôsobujú výdavky aj v období práceneschopnosti a nie zriedkavo sú aj príčinou invalidizácie postihnutého pacienta. Sociálne dávky v období invalidity z príčiny venózných diagnóz boli koncom 80-tych rokov minulého storočia vo Veľkej Británii a Nemecku vyčíslené na 0,4- 1,2% celkového objemu sociálnych dávok [10]. Sprievodné komplikácie žilových ochorení (chronický opuch, vred predkolenia, pocit ťažkých nôh a pod.) spôsobujú bolesť, dyskomfort, depresiu, obmedzenie v každodenných činnostiach, znížený záujem o spoločenské aktivity a vedú často k sociálnej izolácii pacientov. Žilové ochorenia, obzvlášť venózna - cerácia sú chorobné jednotky, ktorých počet sa významne zvyšuje so zvyšujúcim sa vekom a teda aj efekt starnutia populácie je výrazný. Chronická vénová choroba dolných končatín je najčastejším periférnym cievny ochorením, etiopatogenéza hlavne jej primárnej formy je len čiastočne zrejmá a preto aj jej liečba môže byť zväčša len symptomatická, často nie veľmi efektívna [41, 42, 102].

Z vyššie uvedeného vyplýva, prečo je liečba žilových ochorení oblasťou intenzívneho bádania a snáh o nájdenie lepšej a efektívnejšej liečby a rovnako môže byť oblasťou zahŕňajúcou spoluprácu medzi krajinami EÚ.

## **1. 2. VÝZNAM CHRONICKEJ VÉNOVEJ CHOROBY DOLNÝCH KONČATÍN (A VÝDAVKY NA LIEČBU JEJ SYMPTÓMOV).**

### **1. 2. 1 VO SVETE.**

Chronická vénová choroba je dosť častá, hoci odhady jej prevalencie varírujú. White (2005) uvádza, že v USA približne 25 miliónov ľudí trpí varikóznymi žilami, 2-6 miliónov ľudí má pokročilejšie formy chronickej venózneho insuficiencie (opuchy, kožné zmeny) a takmer 500 000 ľudí trpí bolestivými vredmi predkolenia [113].

V populačnej štúdií zo San Diega (USA) chronická vénová choroba bola častejšia v populáciách európskeho pôvodu na rozdiel od černošskej alebo ázijskej populácie. Rizikové faktory chronickej vénovej choroby zahŕňajú: dedičnosť, vek, ženské pohlavie, obezitu (hlavne u žien), graviditu, dlhodobé státie a vyššiu telesnú výšku. Odhadom sa zistilo, že vredy predkolenia žilovej etiológie spôsobujú v USA stratu približne 2 miliónov pracovných dní a vyžadujú liečebné náklady približne 3 miliárd USD (\$) ročne. Navyše sa odhadlo, že liečba symptómov chronickej vénovej choroby v krajinách s vyvinutým systémom zdravotnej starostlivosti spotrebovala 1- 3% celkového rozpočtu zdravotnej starostlivosti [26].

### **1. 2. 2. V EURÓPE.**

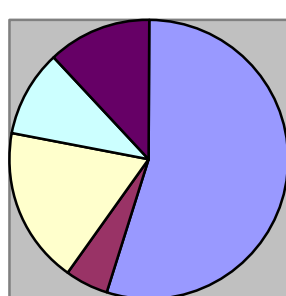
Prierezová štúdia na náhodnej vzorke 1566 osôb vo veku 18- 64 rokov veku bežnej populácie škótskeho Edinburgu odhalila, že napr. teleangiektázie a retikulárne vény boli prítomné asi u 80% mužov a u 85% žien, varikózne žily boli prítomné u 40% mužov a 16% žien, pričom tzv. opuch v oblasti členka (perimaleolárny edém) bol prítomný u 7% mužov a u 16% žien, aktívny alebo liečený vred predkolenia vénovej etiológie sa objavil u približne 1% všeobecnej populácie

Prevalencia chronickej vénovej choroby, obzvlášť vrodu predkolenia, sa zvyšuje hlavne vekom. Mnohé štúdie poukázali, že chronická vénová choroba je častejšia u žien, aj keď v posledných štúdiách rozdiel medzi pohlaviami bol malý. Vo Framinghamskej štúdií, ročný výskyt varikózných žíl bol 2,6% u žien a 1,9% u mužov na rozdiel od výsledkov vénovej štúdie z Edinburgu, kde prevalencia varikózných žíl bola vyššia u mužov. Vysoká prevalencia varikózných žíl a chronicita vredov predkolenia znamená, že chronická vénová choroba má značný dopad na zdroje zdravotnej starostlivosti. V populačnej štúdií vo Veľkej Británii

medián trvania ulcerácie bol 9 mesiacov, 20% vredov sa nevyliečilo do 2 rokov a 66% pacientov malo epizódu ulcerácií trvajúcu viac ako 5 rokov [8].

### 1. 2. 3. V SLOVENSKEJ REPUBLIKE.

Cievne choroby sú hlavnou príčinou smrti v Európskej únii, na ktorú zomrie ročne 1,9 milióna osôb. V krajinách strednej a východnej Európy (nové členské štáty EÚ po roku 2004) sa zaznamenáva najvyššia úmrtnosť na choroby obehovej sústavy oproti krajinám severnej, južnej a západnej Európy. Podľa údajov Národného centra zdravotníckych informácií (NCZI) sa Slovensko nachádza medzi krajinami s najvyššou mortalitou na choroby obehovej sústavy. Pred ním sú Pobaltské štáty, Ukrajina, Bulharsko, Rumunsko. Údaje NCZI z roku 2006 uvádzajú, že choroby obehovej sústavy vtedy na Slovensku predstavovali 54,1% zo všetkých príčin smrti v celej populácii. Zo všetkých mužov zomrelo na choroby obehovej sústavy 13 505 (47,8%) a zo všetkých žien zomrelo 15 784 (61,6%). V roku 2007 na Slovensku na choroby obehovej sústavy zomrelo 29 289 osôb, čo predstavuje z celkovej úmrtnosti viac ako polovicu všetkých úmrtí a radíme ich na prvé miesto v úmrtnosti a chorobnosti. Príčinu viac ako polovice z týchto úmrtí predstavuje koronárna choroba srdca (55%) a približne pre 1/3 z ostatných prípadov úmrtí bola príčinou cievna mozgová príhoda (18%) (graf. 1) [ 84].



■ I20-I25 KCHS
■ I10 AH
■ I60- I69 CMP
■ I70 ChPc
■ ostatné choroby

#### Legenda ku Grafu 1.:

KCHS= koronárna choroba srdca

AH= arteriálna hypertenzia

CMP= cievna mozgová príhoda

ChPc= choroby peiriférnych ciev

**Graf. 1.** Príčiny smrti na choroby obehovej sústavy (Pišková, 2009), [84].

Podľa Národného programu prevencie ochorení srdca a ciev u dospelých (Národný program prevencie nadváhy a obezity, 2008) choroby obehovej sústavy predstavujú v SR dlhodobo v priemere okolo 14 – 16 % podiel zo všetkých hospitalizácií pacientov. Objektívne charakterizovať príčinu hospitalizácie na základe jednej diagnózy je ťažké (zvlášť u polymorbidných pacientov), týka sa to najmä chorôb tepien (I70-I79) a žíl (I80-I89). V roku 2006 sa evidovalo niečo vyše 23 000 hospitalizácií pacientov (vrátane prekladov do iných zdravotníckych zariadení) pre **choroby tepien a žíl** v pomere 1:1. V porovnaní s rokom 2002 nedošlo

k poklesu indikovaných hospitalizácií. Z ochorení tepien išlo v roku 2006 v 75 % o diagnózu ateroskleróza (I70). Väčšina pacientov s diagnostikovanou chorobou artérií alebo žíl je liečená ambulantne, mnohí pacienti nie sú podchytení, nemajú vedomosť o závažnosti týchto chorôb, pričom až 40 % obyvateľstva má akútne alebo chronické žilové ochorenie (napríklad varixy 20 – 25 %, žilovú insuficienciu 5 – 11 %, ročný výskyt akútnej žilovej trombózy je asi 1,6 %, ročný výskyt život ohrozujúcej tromboembolickej choroby je 0,7 %, t. j. 7 na 1000 osôb). Tieto ochorenia sa výrazne podieľajú na práceneschopnosti, invalidizácii a len priame náklady spojené s ich liečbou dosahujú 5 – 10 % výdavkov zdravotných poisťovní [84].

### **1. 3. PRIMÁRNA FORMA CHRONICKEJ VENÓVEJ CHOROBY DOLNÝCH KONČATÍN.**

Chronická vénová choroba dolných končatín je častou príčinou dočasnej pracovnej neschopnosti postihujúcou osoby v produktívnom veku, vyradujúc ich z aktívneho života. Z hľadiska etiológie sa rozoznávajú 3 kategórie žilovej dysfunkcie tohto ochorenia:

**A. vrodená forma-** vyskytuje sa pri poruchách vývoja ciev, žilových chlopní, ako súčasť niektorých systémových chorôb.

**B. primárna forma-** vzniká bez dokázateľnej príčiny, na jej vznik pôsobí vnútorný faktor a viacero vonkajších faktorov.

**C. sekundárna forma-** vzniká po poranení žíl, po prekonanej flebotrombóze, po povrchovej tromboflebitíde, či po iných známych príčinách poškodzujúcich žilový systém dolných končatín [41].

Etiopatogenéza práve primárnej formy tohto častého chronického žilového ochorenia v ľudskej populácii je stále len čiastočne objasnená a preto aj jeho liečba je vo veľkej miere len symptomatická, väčšinou veľmi zdĺhavá a často nie celkom úspešná [29, 39, 46, 63, 102, 103, 104]. Je predmetom výskumu mnohých autorov z rôznych končín sveta už od druhej polovice 20. storočia. Z československých autorov možno spomenúť už Švejcara a kol. (1964), zo súčasných českých autorov sú to Kachlík, Kural, Prokopová, po stránke názvoslovia Riedlová, zo slovenských autorov Danaj, Gavorník, Haviarová, Labaš, Štvrtinová. Z ďalších európskych možno spomenúť Andreotti, Aunapuu, Caggiati, Cario-Toumaniantz, Corcos, Crotty, Jacob M.P., Janowski, Jeanneret, Kirsch, Knaapen, Kowalewski, Lim, Lengyel, Michiel, Sansilvestri-Morel, Somers, Urbanek a ďalší. Zo severoamerických Bergan, Gillespie, Goldman, Jacob Teresa, Naoum, Pascarella, Raffaetto, White a mnohí iní. Z juhoamerických

je to napr. Porto, z ázijských Elsharawy, Gandhi, Guo, Ishikawa, Khan, Kim, Lee, Renno, Yamada, Wali a ďalší. Z afrických autorov je to napr. Ndayie.

Záverov prác spomenutých autorov nasvedčujú, že v patofyziológii vzniku a rozvoja chronického poškodenia žíl dolných končatín hrá významnú úlohu aj mikrocirkulácia. Medzi štyri najdôležitejšie etiologické faktory sa radili:

**a)** slabosť žilovej steny spojená s poruchou buniek hladkej svaloviny a extracelulárnej matrix žilovej steny,

**b)** poškodenie žilových chlopní,

**c)** poruchy mikrocirkulácie,

**d)** dysfunkcia žilového endotelu.

V súčasnosti sa k nim pridávajú ďalšie predpokladané príčiny:

**e)** genetická predispozícia,

**f)** hormonálne faktory,

**g)** narušená výživa žilovej steny.

Skúmajú a hľadajú sa ďalšie možné príčiny.



## 2. SÚČASNÝ STAV UVEDENEJ PROBLEMATIKY DOMA AJ V ZAHRANIČÍ.

### 2. 1. EMBRYOLÓGIA ŽILOVÉHO SYSTÉMU.

#### 2. 1. 1. PRIMITÍVNY KARDIOVASKULÁRNY SYSTÉM.

Cievny systém sa začína vyvíjať v stene žltkového vaku počas 3. týždňa gestácie (18. deň) vytváraním krvných ostrovčekov. V tomto čase embryo dosahuje príliš veľkú veľkosť na to, aby všetky tkanivá boli zásobené kyslíkom len difúziou, čo vytvára potrebu skorého vývinu srdca a ciev. Zakladajúce bunky krvných ostrovčekov (hemangioblasty) majú bipotencionálnu vývojovú schopnosť, môžu sa z nich vyvinúť endoteliálne bunky alebo hematopoetické bunky. Ak sa už vývoj začne jedným z dvoch spomínaných smerov, dcérske bunky hemangioblastov stratia schopnosť formovať sa na iný druh buniek.

U embrya v ranom štádiu sa nenachádzajú krvné cievy. Aj keď sa krvné ostrovčeky objavujú v stene žltkového vaku a extraembryonálne cievne kanály vznikajú v spojitosti s nimi, väčšina ciev embrya pochádza z intraembryonálnych zdrojov. Spleť malých ciev sa rýchlo objavuje vo viacerých oblastiach embrya už v skorom období vzniku somitov.

Vznik krvných ciev embrya sa skladá z niekoľkých fáz: najprv nastane špecifikácia populácie vaskulárnych prekursorov (*angioblastov*), ktoré sa organizujú do *primárneho kapilárneho plexu* procesom, ktorý sa nazýva *vaskulogenéza*. Aby udržal krok s rýchlym rastom embrya, primárny kapilárny plexus rýchlo podstupuje reorganizáciu, pozostávajúcu z resorbcie jestvujúcich ciev a vytvorenia nových vetiev na podporu rozširujúcej sa cievnej siete v procese označovanom ako *angiogenéza*. Angiogenéza potom pokračuje nielen v prenatálnom období, ale aj počas života v dospelosti, keďže tkanivá a orgány sa kontinuálne prispôbujú meniacim sa podmienkam života (či už normálnych alebo patologických).

Detailné deskriptívne štúdie a transplantačné experimenty poukázali na to, že angioblasty vznikajú z mnohých mezodermálnych tkanív tela, okrem notochordálneho a prechordálneho mezodermu. Embryonálne krvné cievy vznikajú z angioblastov tromi mechanizmami:

- mnohé z veľkých ciev (napr. dorzálna aorta) vznikajú spojením angioblastov na mieste,
- iné taktiež rovnako veľké kanály vznikajú (ako napr. endokard) z angioblastov vcestovaných do oblasti z iných krajín tela,
- iné cievy (hlavne intersegmentálne cievy osového trupu a cievy centrálného nervového systému) vznikajú ako cievne výbežky existujúcich veľkých ciev.

Mnohé angioblasty trupu pôvodne pochádzajú zo splachnického mesodermu. Všetky fázy vývoja cievneho systému sú pod vplyvom silných rastových faktorov a ich receptorov.

Počiatočná fáza zhlukovania sa populácie angioblastov z mesodermu je charakterizovaná prítomnosťou transmembránového **receptora cievneho endoteliálneho rastového faktora VEGFR-2 (vascular endothelial growth factor receptor)** na svojom povrchu. Následne ako odpoveď na tvorbu cievneho endoteliálneho rastového faktora **VEGF- A (vascular endothelial growth factor)** okolitým mesenchýmom, sa objavuje fáza vaskulogenézy a angioblasty začínajú vytvárať bunkové trubice, ktoré sa stávajú základom primárne kapilárnej siete. Vytvorenie cievnych endoteliálnych výbežkov (bunkový základ pre angiogénu) sa objavuje na pozadí interakcie VEGF/VEGFR-1 a VEGF/VEGFR-2. faktor cievnych výbežkov (**angiopoietin-1**) vstupuje do interakcie so svojim receptorom (**Tie-2**) na endoteliálnych bunkách, na strane kde sa objavia budúce endoteliálne výbežky. Signálna dráha **Notch<sup>1</sup>** (spoločný denominátor s inými orgánovými systémami vykazujúcimi vetviacu sa morfogénu) je rovnako silno spätá so vznikom cievnych výbežkov, avšak jej spojenie s angiopoietinom-1/Tie-2 ostáva nejasné.

Ďalším krokom vo vývoji krvných ciev je vytvorenie cievnej steny, ktorá na trupe a končatinách pochádza z lokálneho mesodermu. Na hlave a mnohých oblastiach systému aortálneho oblúka, mezenchým pochádzajúci z ektodermu neurálnej lišty je hlavným prispievateľom spojivového tkaniva a hladkej svaloviny cievnej steny. Do stavby cievnej steny je zapojená dvojcestná molekulárna signálna dráha: ako odpoveď na interakciu angiopoietin-1/Tie-2 objavujúcu sa počas angiogézy, endoteliálne bunky produkujú ich vlastnú signálnu molekulu **doštičkový rastový faktor (platelet- derived growth factor)**, stimulujúci migráciu mezenchymálnych buniek k cievnemu endotelu. Tvorba ďalších rastových faktorov endoteliálnymi bunkami (**transformujúceho rastového faktora- $\beta$**  [transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ] a **myokardínu-** hlavného regulátora tvorby hladkej svaloviny) stimuluje diferenciáciu mezenchymálnych buniek na hladkú svalovinu ciev alebo pericyty.

Výsledky nedávneho výskumu dokumentovali, že arteriálna a venózna identita endoteliálnych buniek sa zakladá veľmi skoro vo vývoji- pred angiogézou a pred začiatkom cirkulácie. Endoteliálne bunky vyvíjajúcich sa tepien exprimujú na membrány naviazaný ligand- **Ephrin-B2**, pričom endoteliálne bunky vyvíjajúcich sa žíl exprimujú receptor **Ephrin-B4** na svojich povrchových membránach. Tieto charakteristické fenotypy sa zdajú byť výsledkom

---

<sup>1</sup> **Notch**- povrchový receptor majúci mnoho významných úloh v embryonálnom vývoji

skoršej signalizácie cestou *Notch* systému. Notch systém a jeho ligandy *Delta* a *Jagged* sú exprimované arteriálnym endotelom a experimentálne dôkazy predpokladajú, že *Notch* signálna dráha vo vyvíjajúcich sa tepnách môže účinkovať pri potlačení venózne identity endoteliálnych buniek. V ďalšej diferenciácii krvných ciev hrajú úlohu fyziologické a lokálne faktory. Ak je krvný tok v žltkovom vaku významne redukovaný, cievy predurčené na tepny nadobúdajú vlastnosti žíl a podobne vyvíjajúce sa žily vystavené vysokému tlaku krvi sa premenia na tepny.

Zdá sa, že angioblasty reagujú s lokálnymi faktormi prostredia, určujúcimi špecifickú morfológickú štruktúru krvnej cievy. „Stopovacie“ štúdie transplantovaných angioblastov ukázali, že niektoré môžu migrovať na dlhú vzdialenosť. Angioblasty, ktoré migrovali ďaleko od miesta, do ktorého boli vštepované, sa vintegrovali do morfológicky normálnych ciev v oblasti, v ktorej sa usadili.

Lokálne činitele tiež ovplyvňujú začiatok vaskulogenézy. V niektorých orgánoch (napr. pečeň) alebo v častiach orgánov (napr. priedušky), zásobujúce krvné cievy oblasti pochádzajú z lokálneho mesodermu, pričom iné orgány (napr. metanefrické obličky) alebo časti orgánov (napr. alveoly pľúc) sú zásobované z krvných ciev, ktoré vyrástli do mezenchýmu z iných tkanív. Pribúdajú dôkazy, že pri druhom spomínanom type vaskularizácie tieto primordiálne orgány produkujú svoje vlastné angiogenetické faktory stimulujúce rast vaskulárnych výbežkov (podporujú mitózy endoteliálnych buniek) do žľazového mezenchýmu. Naopak, krvné cievy ovplyvňujú morfogenézu a diferenciáciu mnohých štruktúr (napr. pankreas, glomerulus, pečeň), s ktorými sú spojené [18].

Na konci 3. týždňa embryonálneho vývoja je už vytvorený primitívny kardio-vaskulárny systém, v ktorom cirkuluje krv. Je to prvý orgánový systém, ktorý začína plniť svoju funkciu.

## **2. 1. 2. VÝVOJ VÉN.**

Žily sledujú morfológicky komplexný vzorec vývoja charakterizovaný vznikom vysoko nepravidelných sietí kapilár a zakončený rozšírením sa určitých kanálov do definitívnych žíl. Vzhľadom na multikanálové začiatky a početné možnosti, žilový systém dospelého človeka je charakterizovaný vyšším výskytom anatomických variácií ako tepnový systém [18].

## 2. 2. ANATÓMIA ŽILOVÉHO SYSTÉMU.

Žily telového krvného obehu zbierajú krv z orgánov a tkanív tela, postupne sa spájajú až do *vena cava superior* a *vena cava inferior*, ktoré vstupujú do pravej predsene srdca. Žily horných aj dolných končatín sú dvojaké: *povrchové* - ktoré majú samostatný, od tepien nezávislý priebeh a *hlboké* žily sprevádzajúce rovnomenné tepny. Povrchové aj hlboké žily dolnej končatiny majú vo svojom priebehu v porovnaní so žilami horných končatín početnejšie chlopne.

### 2. 2. 1. ANATÓMIA ŽILOVÉHO SYSTÉMU DOLNÝCH KONČATÍN

Všeobecný anatomický priebeh povrchových a hlbokých žíl dolnej končatiny je známy z mnohých anatomických učebníc, je uvádzaný v rádiologických, cievno- chirurgických, príp. kardiochirurgických odborných publikáciách. Ako však uvádza Riedlová (2008) predstava nových poznatkov anatomii žíl dolných končatín je mnohými ťažko pripúšťaná, avšak aj tak sa v posledných 10 rokoch objavilo niekoľko zásadných prác (talianskych, rakúskych, českých) posúvajúcich naše anatomické znalosti v tejto oblasti ďalej. Tento makroskopický výskum si vynútil značný vývoj nových diagnostických metód (duplexná sonografia), ako aj nových terapeutických techník (rádiofrekvenčná ablácia, vnútrožilová laserová liečba trombov, transkatéťrová trombolýza, mechanická trombektómia, aplikácia žilových stentov, endovenózna liečba varixov). Anatomické štúdie sa zameriavajú na podrobnejší popis veľmi variabilného riečišťa povrchového žilového systému dolnej končatiny, čo úzko súvisí s úspešnosťou chirurgickej liečby primárnej formy chronickej vénovej choroby DK a tiež v súvislosti so zavedením a rozšírením CEAP klasifikácie [92].

V súvislosti s poslednou revíziou medzinárodnej latinskej anatomickej terminológie v r. 1998 a v tejto súvislosti poslednou revíziou anatomickej angiologickej nomenklatúry, ktorá vzišla z 21. kongresu International Union of Angiology pod názvom: “International Interdisciplinary Consensus Committee on Venous Anatomical Terminology: Nomenclature of the veins of the lower limb: extensions, re-finements and clinical application” [16] došlo k zmenám názvov niektorých žíl a ďalšie do toho času nepomenované, získali svoje nové názvy.

Bol vypustený termín *fascia superficialis* a miesto neho zavedený termín *compartmentum saphenum* (popísaný prvýkrát Caggiatim na základe ultrazvukových vyšetrení) [15]. Tento priestor zvrchu ohraničuje fascia saphena (hyperechogénne zosilnenie stratum membra-

nosum telae subcutaneae) a zospodu vlastné fascie svalov (napr. na stehne fascia lata), obsahuje tzv. **interfasciálne žily**, medzi ktoré patrí vena saphena magna et parva, sprevádzané povrchovými nervami (nervus saphenus, nervus suralis). Povrchovo sa nachádzajú tzv. **epifasciálne žily** (napr. vena saphena accessoria superficialis a ďalšie prítoky vena saphena magna). **Subfasciálne žily** potom predstavujú hlboký systém žíl dolnej končatiny. Termín venae communicantes sa týka žíl, spájajúcich medzi sebou rôzne žily toho istého systému (t.j. nepre-**r**ážajú fasciu na rozdiel od perforátorov, venae perforantes). Povrchový žilový systém sa potom ešte ďalej delí na 3 relatívne nezávislé riečišťa: povodie vena saphena magna, povodie vena saphena parva a tzv. systema venosum laterale.

Vena saphena magna prijíma na predkolení *vena saphena magna accessoria posterior (cruris) et anterior (cruris)*. Uvádzané zdvojenie (t.j. 2 kmene vena saphena magna obsiahnuté v compartimentum saphenum) udávajú niektorí autori len v počte menej ako 1% [92], avšak Donnelly M. (2005) uvádza až 18,1% [32]. Na samom konci žily sa potom nachádza **confluens venosus subinguinalis** oddelený chlopňou (**valvula preterminalis**) a prijímajúci žily z okolia (vena epigastrica superficialis, vena circumflexa ilium superficialis, vena pudenda externa superficialis- v rôznom pomere, vena saphena magna accessoria anterior a posterior, vena circumflexa femoris anterior). Ďalšia chlopňa (**valvula terminalis**) sa nachádza v samotnom vústení do vena femoralis (junctio saphenofemoralis).

Vena saphena parva prebieha taktiež v compartimentum saphenum, zanára sa do hĺbky a v 62% ústí do samotnej vena poplitea v oblasti fossa poplitea (junctio saphenopoplitea s chlopňou- valvula terminalis) alebo do venae gastrocnemii, v 14% ústí na zadnej strane stehna do hlbokého systému a v ostávajúcich 24% pokračuje ako **extensio cranialis venae saphenae parvae** (bývalá vena femoropoplitea). Táto potom končí v 15% prípadov ako **Giacominiho žila** v riečišti vena saphena magna a v 5% prípadov cez perforátor v hlbokom systéme [16]. Ako však Kachlík (2008) namieta, tento termín nie je anatomicky správny (smery na končatinách sa označujú proximalis↔ distalis, termíny cranialis↔caudalis sú rezervované pre smery na trupe), napriek tomuto je však termín extensio cranialis venae saphenae parvae platným termínom [54]. Obe riečišťa sú potom prepojené prostredníctvom venae communicantes, tu nazývané **venae intersaphenae**.

Schadeck popísal malú tepnu (small saphenous artery) sprevádzajúcu vena saphena parva, ktorej klinický význam spočíva v možnosti nebezpečnej zámene tejto tepny za žilu

(napr. pri aplikácii sklerotizačného roztoku, následkom takéhoto omylu bývajú kožné nekrózy na lýtku) [99].

Tretím riečišťom povrchového systému je relatívne nezávislé povodie *systema venosum laterale membri inferioris* (v anglickej literatúre často označované aj ako Albanese vein alebo Albanese venous system) na bočnej ploche stehna a lýtku ako vývojový zbytok vena marginalis lateralis. Klinicky sa tento systém môže prejavovať napr. pri syndrómoch Parkes-Weber alebo Klippel-Trenaunay. V prípade varikózneho postihnutia tohto systému sa objaví reflux kolennými perforátormi z hlbokého systému.

Pre hlboký venózný systém bola zavedený termín *vena femoralis communis* pre krátku žilu od sútoku vena femoralis a vena profunda femoris až po ligamentum inguinale, dorzálne od ktorého potom pokračuje do vena iliaca externa. Pre žily sprevádzajúce arteriae perforantes (vetvy arteria profunda femoris) bol vytvorený nový termín *venae commitantes arteriarum perforantium*. Termín “perforantes” je pri žilách vyhradený výlučne žilám spájajúcim povrchový a hlboký žilový systém dolnej končatiny.

Objavil sa aj nový názov: *vena ischiadica*, ktorý označuje zbytok po embryonálnej vena axialis. Vena ischiadica prebieha pozdĺž nervus ischiadicus a môže zohrať dôležitú úlohu kolaterály.

Žily lýtku (venae surales) boli rozdelené na *venae soleales* a *venae gastrocnemii* (medialis, lateralis, intergemmellaris). Nový termín *plexus venosus genicularis* nahrádza staršie označenie venae geniculares, keďže žily vo fossa poplitea nezodpovedajú svojim usporiadaním tepnám.

Aj v oblasti panvy boli spresnené niektoré názvy, týkajúce sa žíl, klinicky významných pri vzniku a rozvoji varixov. *Plexus pudendus (Santorini)* je žilová spleť umiestnená v spatium retropubicum (Retzii) za lonovou kosťou. *Venae ligamenti lati uteri* sú drobné žily prebiehajúce pozdĺž rovnomenného väzu k maternici. Na zadnej strane os pubis spájajú *venae pubicae* riečište vena obturatoria a vena iliaca externa. *Venae suprapubicae* sú systémom povrchových žíl prepájajúcich cez stred riečišťa venae epigastricae inferiores oboch strán.

Poslednou oblasťou zmien sú venae perforantes. Tieto spojky povrchového a hlbokého systému prebiehajú štrbinou vo fascii, sprevádzané malou tepnou a kožným nervom a vytvárajú spolu tzv. *Staubesandovu triádu* [101]. Možno ich rozčleniť do 5 skupín: *perforátory nohy, členka, predkolenia, kolena a stehna*. Nemožno nespomenúť latinské názvy perforátorov, dosiaľ zväčša označovaných eponymami:

- *vena perforans cruris paratibialis inferior* = Shermannov perforátor (“24cm perforátor”),
- *vena perforans cruris paratibialis superior* = Boydov perforátor,
- *venae perforantes cruris posteriores* = Cockettove perforátory (3 žily),
- *vena perforans paraachillaris inferior* = Bassiho perforátor,
- *vena perforans paraachillaris superior* = “12cm perforátor”,
- *vena perforans canalis adductorii* = Doddov perforátor [92].

Ndiaye A. a kol. po preskúmaní 54 inguino- femorálnych oblastí na 27 čerstvých kadáveroch afrických černochoch poukázali na početné prítoky veľkej skrytej žily a značnú variabilitu ich sútoku. Správna vedomosť o týchto variabilitách a nepodceňovanie ich prítomnosti pri chirurgickom riešení varikozity dolnej končatiny môže pomôcť obmedziť rekurenciu a neúspech chirurgickej liečby [77].

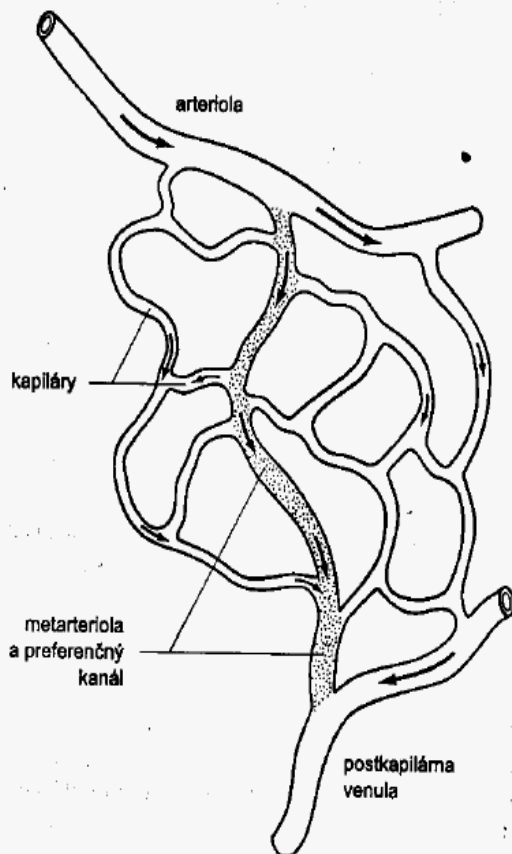
Zamboni P. a spol. (2004) popísali 7% prítomnosť nekonštatného prítoku vena saphena magna u 218 duplexnou sonografiou vyšetrených pacientov s primárnymi varixami. Začínala v safenóznom kompartmente mediálnej prednej strany hornej tretiny predkolenia, ďalej prebiehala v interfasciálnom kompartmente k laterálnej strane predkolenia, konštantne sa plnila refluxom z klinicky viditeľných varikózných žíl v paratibiálnej oblasti a/alebo na laterálnej strane predkolenia. Pre zvláštnosť svojho anatomického priebehu (a pre svoj obraz v duplexnej sonografii) ju pomenovali „T“ žilou [116].

Donnelly so spolupracovníkmi zdokumentovali chirurgickú anatómiu variability safe-nofemorálneho sútoku (safe-nofemorálnej junkcie, SFJ) na 2089 zoperovaných slabínových oblastiach (pri liečbe primárnej varikozity). Zistili rozštiepenie vena saphena magna na dolnej končatine v 18,1%, počet prítokov SFJ varíroval v rozmedzí 1-10, v 33,4% jeden alebo viac „junkčných prítokov“ vtekal do vena saphena magna alebo do vena femoralis communis pod hlbokou fasciou, arteria pudenda externa križovala vena saphena magna spredu v 16,8%, v 4,6% prechádzala za väčším prítokom alebo kmeňom rozdvojenej vena saphena magna a pred druhým kmeňom (čo robilo identifikáciu druhého kmeňa značne obtiažnym) [32].

# 69 Histomorfológia žilovej steny

Zora Haviarová

Žily (vény) sa po histologickej stránke schematicky rozdeľujú na žilky (venuly), žily (vény) malého a stredného kalibru a veľké žily (vény veľkého kalibru). Podliehajú väčším individuálnym a regionálnym rozdielom ako tepny (artérie). Žilový systém má podstatne väčšiu kapacitu ako tepnový systém. Objem žil je asi trikrát väčší ako objem tepien. Žily spravidla sledujú priebeh tepien a majú väčšinou menší kaliber a tenšiu stenu ako prislúchajúce tepny.



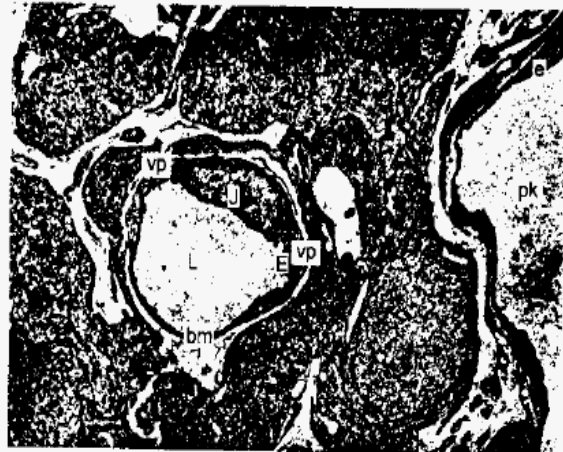
Obr. 69.1. Schéma začiatku venózneho riečiska.

## Žilky (venuly)

Kapiláry a preferenčné kanály na svojom žilovom konci pokračujú do postkapilárnych venúl (priemeru 8–30 μm), ktoré sú charakterizované zvyšujúcim sa počtom pericytov so zvyšujúcim sa priemerom cievy (obr. 69.1).

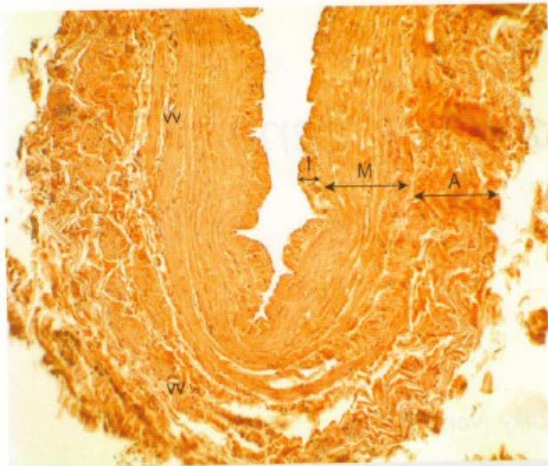
Pericyty (perivaskulárne bunky) sú roztrúsené pozdĺž kapilár a malých krvných ciev. Pri raste nových krvných ciev sa pericyty môžu diferencovať na bunky hladkého svalstva. V ich normálnom nediferencovanom stave sa od buniek hladkého svalstva odlišujú dlhými cytoplazmatickými výbežkami odstupujúcimi z tela bunky; difúznejšou distribúciou organel, ako aj menším množstvom filamentov a tuhých častíc v cytoplazme.

Postkapilárne venuly pokračujú do zberných venúl (priemeru 30–50 μm), ktoré okrem pericytov majú aj adventíciu obsahujúcu fibroblasty a kolagénové vlákna. Zberné venuly ústia do svalových venúl (priemeru 50–100 μm) s 1–2 vrstvami hladkého svalstva v tunica media a veľmi tenkou lamina

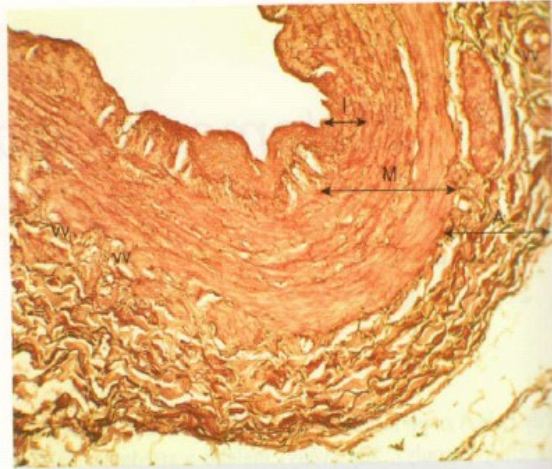


Obr. 69.2. Kapilára a postkapilárna venula v ganglion mesentericum inus ferius mačky. Elektronogram (foto prof. MUDr. P. Mráz, DrSc.): L – lúmen kapiláry, E – endotelová bunka, J – jadro endotelovej bunky, vp – výbežky pericytu obklopujúce kapiláru, bm – spoločná bazálna membrána, pk – postkapilárna venula, e – cytoplazma endotelovej bunky postkapilárnej venuly.

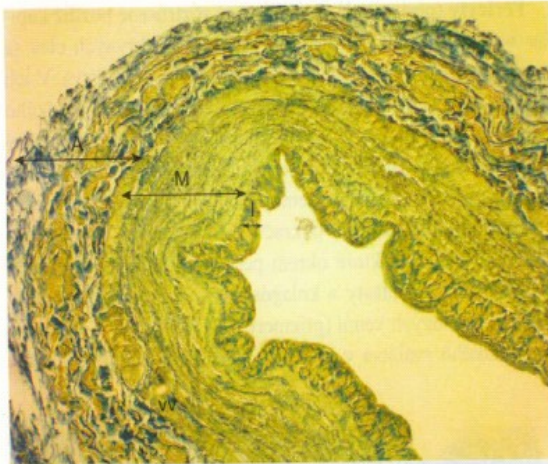




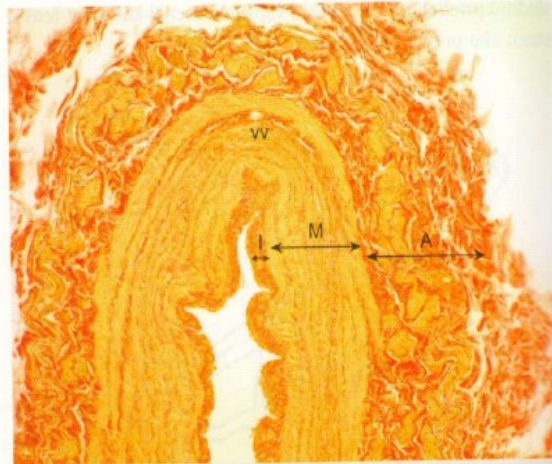
Obr. 69.3. Vena saphena magna (žila stredného kalibru). Hematoxylín-eozín (jadrá buniek – fialovo), zväčšenie 25-krát. I – tunica intima, M – tunica media, A – tunica adventitia, vv – vasa vasorum.



Obr. 69.5. Vena saphena magna (žila stredného kalibru), farbenie Weigert (elastín – fialovočierno), zväčšenie 25-krát. I – tunica intima, M – tunica media, A – tunica adventitia, vv – vasa vasorum.



Obr. 69.4. Vena saphena magna (žila stredného kalibru), farbenie Unna-Tanzer (kolagén – tmavozeleno), zväčšenie 25-krát. I – tunica intima, M – tunica media, A – tunica adventitia, vv – vasa vasorum.



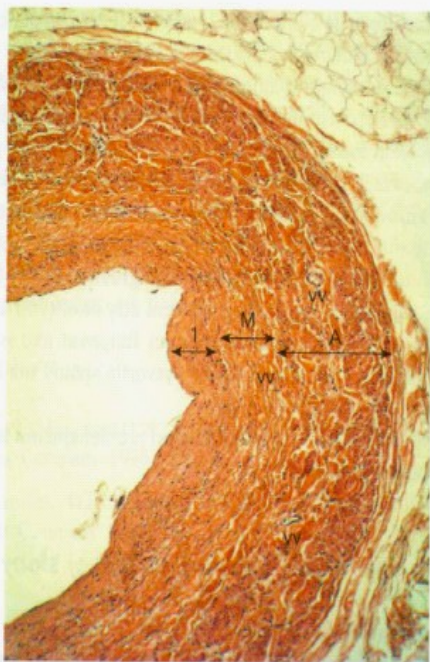
Obr. 69.6. Vena saphena magna (žila stredného kalibru), farbenie Van Gieson (hladké svalstvo – žltá, kolagén – červená), zväčšenie 25-krát. I – tunica intima, M – tunica media, A – tunica adventitia, vv – vasa vasorum.

elastica interna. Ich tunica adventitia je relatívne dobre vyvinutá.

Venuly zbierajú krv z mikrocirkulácie ústia do malých zberných žíl (priemeru 100–300  $\mu\text{m}$ ), ktorých tunica media pozostáva už z niekoľkých vrstiev hladkých svalových buniek.

**Venuly** majú významnú úlohu pri zápalových procesoch. V súvislosti s akútnou zápalovou reakciou cez steny venúl prebieha migrácia leukocytov a prestup plazmy z cievy do interstícia. Venuly sú podobne ako iné cievy vystlané endotelovými bunkami, utvárajú medzi sebou priestor – medzibunkovú štrbinu (šírky 10–20 nm), cez ktorú už aj za fyziologických podmienok dochádza k výmene vody a menších molekúl medzi krvnou plazmou a intersticiálnou tekutinou. Leukocyty migrujúce cez steny ciev vytvárajú oddialenie (separáciu) okrajov kontaktujúcich sa buniek a cez takto vytvorené otvory opúšťajú cievu. Endotelové bunky sú bohaté na mikrofilamenty obsahujúce aktín, čo predpokladá ich schopnosť zmeny tvaru a takéto pohyby v podmienkach zápalu môžu napomáhať pre-stupu leukocytov a tekutiny von z cievy.

Endotelovú výstelku kapilár a venúl obklopuje bazálna membrána, hrubá približne 50 nm a predpokladá sa, že hrubne s pribúdajúcim vekom. Aj pericyty a ich výbežky obklopujúce endotelové bunky sú uzatvorené bazálnou membránou splyvajúcou s bazálnou membránou obklopujúcou endotelovú výstelku (obr. 69.2). Z vonkajšej strany spoločnej bazálnej membrány sa vyskytuje malé množstvo podporného kolagénu vo



Obr. 69.7. Vena jugularis (žila veľkého kalibru), hematoxylin-eozín, zväčšenie 25-krát. I – tunica intima, M – tunica media, A – tunica adventitia, vv – vasa vasorum (zo zbierky preparátov Ústavu histológie a embryológie LFUK, Bratislava).



Obr. 69.8. Vena jugularis (žila veľkého kalibru), farbenie Azan (hladké svalstvo – červená, kolagén – modročierne). I – tunica intima, M – tunica media, A – tunica adventitia, vv – vasa vasorum (zo zbierky preparátov Ústavu histológie a embryológie LFUK, Bratislava).

forme fibril. Pri zbiehaní venúl do malých vén sa mení charakter pericytov – nahrádzajú sa úplne diferencovanými svalovými bunkami.

### Žily (vény) malého a stredného kalibru

Žily (vény) malého a stredného kalibru majú priemer 1–9 mm. Ich štruktúra značne varíruje. Patria k nim napríklad hĺbkové žily predlaktia a predkolenia, žily hlavy, trupu a vnútorných orgánov (okrem hlavných žilových kmeňov). Vo všeobecnosti je už ich stena zložená z 3 vrstiev. **Tunica intima** pozostáva z endotelu priamo nasadajúceho na slabou vyvinutú membrana elastica interna, alebo je od nej oddelená len slabým množstvom subendotelového spojivového tkaniva. **Tunica media** je vo všeobecnosti omnoho tenšia ako pri artérii zodpovedajúceho kalibru. Skladá sa hlavne z cirkulárne usporiadaných buniek hladkého svalstva. V porovnaní s artériami je v tejto vrstve zastúpených viac kolagénových a menej elastických vlákien. Niektorí autori opisujú túto vrstvu ako zloženú z 3 vrstiev svalových zväzkov (3). Vnútrovná vrstva obsahuje malé zväzky longitudinálne usporiadaných svalových vlákien oddelených riedkym spojivovým tkanivom a krátkymi elastickými fibrilami. V strednej vrstve sa nachádzajú široké zväzky hladkého svalstva usporiadané cirkulárne. Jednotlivé svalové zväzky môžu

byť oddelené tenšou alebo hrubšou vrstvou elastických fibril. Vonkajšia vrstva je značne variabilná: obsahuje pozdĺžne svalové zväzky roztrúsené v hrubom fibróznom tkanive. Táto vrstva je najlepšie vyvinutá v žilách končatín, hlavne distálnych. Tunica media zvyčajne obsahuje menej hladkého svalstva, a teda je omnoho tenšia v žilách, ktoré nie sú chránené, napríklad svalmi alebo tlakom abdominálnych orgánov, ako v žilách, ktoré sú viac exponované. Mozgové a meningeálne žily vo svojich stenách neobsahujú takmer žiadnu svalovinu. Hladké svalstvo v tunica media je dobre vyvinutá v žilách končatín, obzvlášť dolných. Napríklad **venae saphenae** (magna et parva) (veľká a malá skrytá žila), keďže sú povrchové žily (nie sú podporené tlakom okolitých štruktúr natoľko ako hĺbkové žily) a pri vzpriamenom postoji ich steny musia odolávať hydrostatickému tlaku dlhého stĺpca krvi, **majú stenu hrubšiu ako iné žily**. Preto je ich tunica media veľmi podstatná. Jej najvnútornejšia časť obsahuje hlavne pozdĺžne orientované hladké svalové vlákna spojené s elastickými vláknami a vonkajšia hrubšia časť je zložená z cirkulárne usporiadaných hladkých svalových vlákien (obr. 69.3, 4, 5, 6).

**Tunica adventitia žil** stredného kalibru je často najhrubšou vrstvou. Zvyčajne sa skladá prevažne z kolagénového spojivového tkaniva, v ktorom sa smerom k tunica media často objavujú skupiny longitudinálne usporiadaných svalových buniek. Vonkajšia elastická vrstva vlákien (lamina elastica externa), či

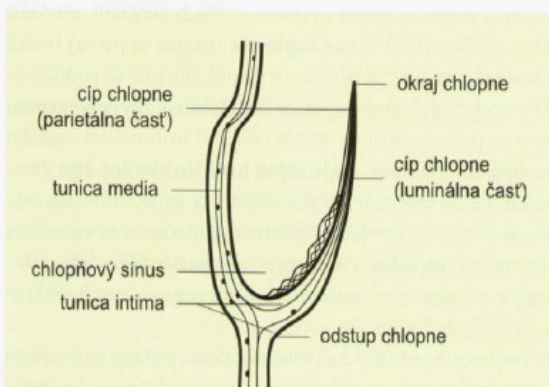
membrána väčšinou nebyva vytvorená. Obsahuje vasa vasorum a adrenergické nervové vlákna.

### Žily (vény) veľkého kalibru

Štruktúra rôznych veľkých žíl nie je rovnaká. Do tejto skupiny patrí vena cava superior, vena cava inferior, hlavné prítokové vetvy týchto žíl a vena portae (obr. 69.7, 69.8). Všeobecne je tunica intima podobná ako pri predchádzajúcom type, ale subendotelová vrstva spojiva je hrubšia. Môžu v nej byť zastúpené skupiny rozptýlených, longitudinálne usporiadaných buniek hladkého svalstva. Niekedy je prítomná membrána elastica interna, ale býva pomerne slabá. Tunica media je tenká, jej hladké svalstvo je podstatne redukované a môže napríklad vo vena cava aj chýbať. Tunica adventitia je výrazne najhrubšia zo všetkých 3 vrstiev, obsahuje kolagénové a elastické vlákna. V mnohých prípadoch, napríklad vo vena cava inferior, obsahuje najvnútornejšia vrstva tunica adventitia silné zväzky pozdĺžne orientovaných hladkých svalových vlákien. Membrána elastica externa nebyva vytvorená.

### Žilové chlopne

Žilové chlopne sú väčšinou párové štruktúry žilovej steny, ktoré sa k sebe prikladajú z protiahlych strán priesvitu žily. Ich voľné konce smerujú k srdcu. Medzi chlopňou a stenou žily je tzv. chlopňový sinus (obr. 69.9). Žilová chlopňa je duplikatúrou tunica intima; zložená z tenkej väzivovej elastickej platničky pokrytej endotelom z lumenálnej aj parietálnej strany cípu. Elastické vlákna sú usporiadané na lumenálnej strane cípu chlopne. V oblasti chlopňového sinusu je stena žily stenčená a distendovaná; tunica intima a tunica media v tejto oblasti obsahujú len pozdĺžne svalové vlákna, ktoré neprechádzajú do štruktúry chlopne (1). Endotelová výstelka lumenálneho povr-



Obr. 69.9. Žilová chlopňa – schematicky.

chu cípu chlopne je elongovaná v smere osi žily, na parietálnej strane cípu je elongovaná priečne.

Chlopne zabraňujú spätnému toku krvi. Rozdelením žily na uzavreté oddiely napomáhajú toku krvi k srdcu obzvlášť tam, kde žily ležia medzi kontrahujúcimi sa svalmi. Bývajú početnejšie obzvlášť v žilách končatin, ale takmer úplne chýbajú v žilách hrudníka a brucha. Obyčajne sú umiestnené hned distálne pod miestom vtoku prítoku žily. Chlopne majú aj niekoľko ďalších úloh: pomáhajú prekonávať gravitačné sily zabraňujúce spätnému toku krvi; pri stlačení žily okolitými kontrahujúcimi sa svalmi pomáhajú svalom fungovať ako pumpa; zabraňujú, aby svalová kontrakcia vytvorila spätný tok do kapilárnej siete, ktorú žily drénujú.

Žilové chlopne sa často poškodia pri prebiehajúcom zápalovom procese vo vnútri žily.

### Cievne zásobenie a inervácia žilovej steny

#### Vasa vasorum žíl

Žily sú omnoho bohatšie zásobené prostredníctvom vasa vasorum ako artérie. Pretože žilami preteká krv s nižším obsahom kyslíka, bunky žilových stien pravdepodobne potrebujú viac kyslíka, ako dostávajú difúziou z priesvitu žily. Keďže žilová krv prúdi pod nižším tlakom, vasa vasorum dosahujú až do tunica intima zásobovanej žilovej steny bez kolabovania vlastných stien vplyvom krvného tlaku vo vnútri žily. Preto vasa vasorum môžu penetrovať aj hlbšie k tunica intima ako v príslušných artériách. Bohatšie sú zastúpené aj v hrubých stenách skrytých žíl (vv. saphenae).

#### Lymfatická drenáž žíl

Keďže žilová stena odoláva nižšiemu tlaku krvi v porovnaní s artériami, lymfatické cievy žilovej steny sú v prechodnom stave a majú rovnako bohaté zastúpenie ako v artériovej stene. Toto môže byť pravdepodobnou príčinou šírenia tumorov lymfatickou cestou do žilových a nie do artériových stien. Lymfatické kapiláry môžu dosahovať až k vnútornému povrchu žily tak blízko, že tkanivová tekutina vstupujúca do nich môže byť filtrátom alebo dialyzátom krvnej plazmy z priesvitu vlastnej žily.

#### Inervácia žilovej steny

Hladké svalstvo krvných ciev inervujú nemyelinizované nervové vlákna autonómneho nervového systému prebiehajúce hlavne v adventícii (vazomotorické vlákna). Sympatikové vlákna sú funkčne väčšinou vazokonstrikčné, parasympatikové, skôr vazodilatačné (na srdci je však účinok autonómnych nervových vlákien opačný). Na bunkách hladkého svalstva sú aj aferentné, receptorické zakončenia monitorujúce stupeň napätia vrstiev cievnej steny. Tieto centripetálne, t.j. senzitivné vlákna s myelinovou pošvou vedú vzruch do vazomotorického centra v medulla oblongata, z ktorého sa reflektoricky reguluje krvný tlak.

**Zmeny žilovej steny vplyvom veku**

So zvyšujúcim sa vekom tunica intima hrubne spolu so zvyšujúcim sa obsahom a dezorientáciou elastických vlákien. Usporiadanie svalových zväzkov v tunica media je disorganizovanejšie a vonkajšia svalová vrstva hypertrofuje. Elastické vlákna sa stávajú nepravidelnejšími a dystrofickými. Lamina elastica býva fragmentovaná, atrofická, tenká a nepravidelná. Tunica adventitia sa stáva fibróznejšou. Tento nedostatok organizovanej elastickej podpory umožňuje žilovej stene skôr podľahnúť distenzii podmienenej tlakom.

**Literatúra**

1. Bloom, Fawcett, D.W.: A Textbook of Histology. W.B. Saunders Company 1986, 1017 s.
2. Cormack, D.H.: Ham's Histology. Philadelphia, J.B. Lippincott Company 1983, 1089 s.
3. Goldman, M.P., Fronck, A.: Anatomy and pathophysiology of Varicose Veins. J. Dermatol. Surg. Oncol., 15, 1989, č. 2, s. 138-145.
4. Ham, A.W., Cormack, D.H.: Histology. Philadelphia, J.B. Lippincott Company 1979, 966 s.
5. Holomáňová, A., Brucknerová, I.: Srdcovocievna sústava (Anatomické názvy). Latinsko-anglicko-slovenský slovník. Bratislava, Elán 2000, 70 s.
6. Maršala, J.: Tkanivá a orgány človeka. Bratislava, Veda 1983, 605 s.
7. Petrovický, P. a spol.: Anatomie s topografií a klinickými aplikacemi. Martin, Osveta 2001, 560 s.
8. Wolf, J.: Histologie. Praha, Státní zdravotnické nakladatelství 1966, 900 s.

**2. 4. CHRONICKÁ VÉNOVÁ CHOROBA DOLNÝCH KONČATÍN (symptómy, klasifikácia).**

Chronická vénová choroba dolných končatín (starší názov: chronická venózna insuficiencia alebo chronická žilová nedostatočnosť dolných končatín) je veľmi častou, celosvetovo rozšírenou chorobou periférnych ciev so závažnými zdravotnými, ekonomickými aj sociálnymi dôsledkami. Postihuje asi 1/3 až 1/2 populácie [42]. Podľa havajskej **C E A P klasifikácie** z r.1994 má určité klinické znaky a príznaky, určitú etiológiu, anatomickú distribúciu a je podmienená nejakou patofyziologickou dysfunkciou.

Klinická **klasifikácia (C)** je založená na objektívnych znakoch chronickej vénovej choroby (C 0-6), doplnená písmenom A pre asymptomatické končatiny a písmenom S pre symptomatické končatiny [Tab.1.].

**Teleangiektázie** sú podľa uvedenej klasifikácie definované ako rozšírené intradermálne (intrakutánne) venuly s priemerom do 1mm. **Retikulárne vény** sú nehmateľné rozšírené subkutánne vény s priemerom do 4mm. **Varikózne vény (varixy)** sú palpovateľné dilatované subkutánne vény s priemerom obvykle väčším ako 4mm. Teleangiektázie a retikulárne vény nespôsobujú (na rozdiel od varikózných vén) venóznou ulceráciu, ale všetky môžu spôsobovať pacientovi ťažkosti. Niektorí pacienti nemajú nijaké subjektívne príznaky (*asymptomatická forma*). Väčšina chorých však má pocit zvýšenej únavy dolných končatín, pocit bolestivého

napätia až kŕčovitú bolesť v nohách a lýtkach, z čoho je odvodený slovenský názov "kŕčové žily" (*symptomatická forma*). Ak sa spontánne alebo pri liečbe menia príznaky a znaky, nález na končatinách musí byť reklasifikovaný.

<b>Tab. 1. Klinická klasifikácia chronickej vénovej choroby dolných končatín.</b>	
<b>Trieda</b>	<b>Opis.</b>
<b>C0</b>	Žiadne viditeľné alebo palpovateľné znaky vénovej choroby dolných končatín
<b>C1</b>	Teleangiektázie a retikulárne vény
<b>C2</b>	Varikózne vény
<b>C3</b>	Edém
<b>C4</b>	Kožné zmeny vyvolané vénovou chorobou (hyperpigmentácie, venózne ekzém, lipodermatoskleróza atď.)
<b>C5</b>	Kožné zmeny ako v predchádzajúcich triedach a zhojená ulcerácia
<b>C6</b>	Kožné zmeny ako v predchádzajúcich triedach a prítomná floridná ulcerácia

**Etiologická klasifikácia (E)** rozoznáva 3 kategórie žilovej dysfunkcie:

1. *Vrodená forma (E C)* sa vyskytuje pri poruchách vývoja ciev (angiodyspláziách), napr. vrodené chýbanie žilových chlopní, hypoplázia alebo zmenšený počet chlopní žilového systému. Zo systémových angiodysplázií je to napr. Klippelov-Trénaunayov syndróm (varixy, naevus flammeus, hypertrofia končatiny) alebo Weberov syndróm (varixy, arteriovénové fistuly a hypertrofia končatiny).

2. *Primárna forma (E P)* vznikajúca bez dokázateľnej príčiny. Na jej vznik pôsobí viacero faktorov, najviac genetický faktor, prejavujúci sa menejcennosťou spojivového tkaniva žilovej steny. Z vonkajších faktorov je to gravidita, státie, ťažká telesná práca, atď.

3. *Sekundárna forma (E S)* vzniká po traume žíl (*posttraumatická forma*), po flebotrombóze (*posttrombotická forma*), po povrchovej tromboflebitíde (*posttromboflebitická forma*) a po iných známych príčinách, ktoré poškodzujú žilový systém dolných končatín.

**Anatomická klasifikácia (A)** opisuje anatomický rozsah chronickej vénovej choroby, či je v povrchových – (*superficial*) vénach (A S), hĺbkových– (*deep*) vénach (A D) alebo v spojovacích– (*perforating*) vénach (A P). Vénová choroba môže byť v jednom, v dvoch alebo vo všetkých troch vénových systémoch dolných končatín. Rozsah postihnutia môže byť ďalej kategorizovaný na menšie anatomické segmenty [Tab. 2].

**Patofyziologická klasifikácia (P)** objasňuje, či klinické znaky a príznaky vénovej choroby sú výsledkom *refluxu* - opačného smeru prúdenia krvi v žilách (*PR*), *obštrukcie* (*PO*) alebo *obidvoch* (*PR,O*) [41].

<b>Tab. 2. Anatomická klasifikácia chronickej vénovej choroby dolných končatín.</b>	
<b>Segment</b>	
	<b>Povrchové (superficiálne) vény (A S)</b>
<b>1</b>	teleangiektázie (retikulárne vény)
<b>2</b>	vena saphena magna (nad kolenom)
<b>3</b>	vena saphena magna (pod kolenom)
<b>4</b>	vena saphena parva
<b>5</b>	iné povrchové vény dolnej končatiny
	<b>Hĺbkové (deep) vény (A D)</b>
<b>6</b>	vena cava inferior
<b>7</b>	vena iliaca communis
<b>8</b>	vena iliaca interna
<b>9</b>	vena iliaca externa
<b>10</b>	panvové vény: gonadálne, plica lata a i.
<b>11</b>	stehenné vény: vena femoralis
<b>12</b>	vena profunda femoris
<b>13</b>	vena femoralis distálne od odstupu v. profunda femoris
<b>14</b>	vena poplitea
<b>15</b>	vény predkolenia: tib. ant., tib. post., fibul.
<b>16</b>	svalové vény: z m. gastrocnemius, m. soleus
	<b>Spojovacie (perforating) vény (A P)</b>
<b>17</b>	stehnové
<b>18</b>	lýtkové

Vrodené i primárne formy sa môžu komplikovať flebotrombózou alebo povrchovou tromboflebitídou a tak môže vzniknúť nepriaznivý bludný kruh prechodu do sekundárnej formy s ďalším potencionálnym nebezpečenstvom recidív flebotrombóz a tromboflebitíd.

**Liečba** chronickej vénovej choroby dolných končatín zahŕňa:

- a) neinvazívnu liečbu (fyziatrisko- rehabilitačnú, kompresívnu, medikamentóznou),
  - b) invazívnu liečbu (sklerotizácia) a zriedkavejšiu angiochirurgickú liečbu, ktorá sa v súčasnosti sústreďuje skôr na výkony na hlbokom žilovom systéme [29, 46, 63, 103, 104].
- Rozvíjajú sa však aj nové terapeutické techniky: rádiovlnová ablácia, vnútrožilová laserová liečba trombov, transkatérová trombolýza, mechanická trombektómia, aplikácia žilových stentov, endovenózna liečba varixov a iné.

#### 2. 4. 1. PRIMÁRNA FORMA CHRONICKEJ VÉNOVEJ CHOROBY DOLNÝCH KONČATÍN

V patofyziológii chronickej žilovej nedostatočnosti hrá dôležitú úlohu zvýšený tlak krvi v žilovom systéme hlavne dolných končatín. Krvný tlak v žilovom systéme je určovaný systolickým tlakom krvi vytváranom v srdci, energetickými stratami krvného prúdu pred dosiahnutím žilového systému (čo je podmienené periférnym odporom arteriol), hydrostatickými gravitačnými silami v závislosti od polohy tela, krvného objemu, anatomickej kompozície steny žíl, účinnosti jednosmerných chlopní, kontrakcie hladkej svaloviny steny žíl a teplotou okolia. Vo vzpriamenom postoji a za fyziologických okolností je krvný prúd v žilách vďaka chlopňovému systému nasmerovaný z povrchového systému do hlbokého žilového systému cestou tzv. komunikujúcich alebo perforujúcich žilových spojok (krátko "perforátorov"), ktoré rovnako obsahujú jednosmerné chlopne. Pri zvýšení tlaku krvi v hlbokom žilovom systéme dochádza k distenzii hlbokých žíl a ich následnej nedostatočnosti spôsobenej nedovieravosťou ich chlopní. Žilový krvný prúd je potom obrátene nasmerovaný z hlbokého do povrchového žilového systému cestou "perforátorov" s rovnako nedovierajúcimi chlopňami. Povrchové žily reagujú na zvýšený tlak krvi rovnako distenziou svojich stien, čo má za následok nedovieravosť ich chlopní a hromadenie krvi v povrchovom systéme, čo vedie k ich ďalšej dilatácii a vzniku tzv. varikózných žíl [94]. Patofyziológia chronickej žilovej nedostatočnosti môže byť rozdelená do 4 kategórií, ktoré sa môžu vzájomne prekrývať. Kategórie a ich možné príčiny sú uvedené v tabuľke [Tab. 3].

Od druhej polovice dvadsiateho storočia sa už mnohí autori zaoberali skúmaním etiológie vzniku a rozvoja primárnej formy chronickej vénovej choroby dolných končatín [7, 9, 19, 21, 22, 23, 24, 27, 28, 33, 35, 38, 44, 45, 57, 60, 65, 66, 105, 112].

V patofyziológii vzniku a rozvoja chronického poškodenia žíl dolných končatín hrá významnú úlohu okrem makrocirkulácie aj mikrocirkulácia. Medzi štyri najdôležitejšie etiologické faktory patria:

- a) slabosť žilovej steny spojená s poruchou buniek hladkej svaloviny a extracelulárnej matrix žilovej steny,
- b) poškodenie žilových chlopní,
- c) poruchy mikrocirkulácie,
- d) dysfunkcia žilového endotelu.

<b>Tab. 3. Patofyziológia chronickej žilovej nedostatočnosti.</b>	
<b>zvýšený tlak v hlbokom žilovom systéme</b>	
<b>proximálne:</b>	panvová obštrukcia (nepriama žilová obštrukcia) safenofemorálna inkompetencia venózna obštrukcia
<b>distálne:</b>	nedovieravosť chlopní v perforujúcich žilách arteriovenózne anastomózy venózna obštrukcia
<b>primárna chlopňová nedostatočnosť</b>	venózna obštrukcia tromboflebitída s deštrukciou žilových chlopní kongenitálna absencia žilových chlopní (agenéza)
<b>sekundárna chlopňová nedostatočnosť</b>	zvýšená rozťažiteľnosť žilovej steny hormonálna príčina hlboká venózna obštrukcia
<b>fasciálna slabosť</b>	vrodená nedostatočnosť kolagénu žilovej steny

V posledných piatich rokoch sa výskum prvej príčiny primárnej formy varikozity žíl dolných končatín sústreďuje viac na príčinu poruchy extracelulárnej matrix (ECM) žilovej steny [2, 37, 47, 51, 59, 61, 62, 76, 89, 90, 91, 97, 98, 108,], zmeny citlivosti na hormonálne podnety [100], na výskum genetickej predispozície podmieňujúci slabosť zložiek ECM [17, 64] vzhľadom na často pozorovanú genetickú predispozíciu a aj na porušenú výživu žilovej steny [54].

#### **2. 4. 1. 1. SLABOSŤ ŽILOVEJ STENY SPOJENÁ S PORUCHOU BUNIEK HLADKEJ SVALOVINY A EXTRACELULÁRNEJ MATRIX ŽILOVEJ STENY**

V názoroch na príčiny primárnej formy varikozity dolných končatín bolo možno vysloviť niekoľko tzv. smerov, z ktorých každý vychádzal z určitej hypotézy o vzniku varikozity ako hlavného symptómu tohto ochorenia. Jednou z nich bola aj hypotéza o "slabosti resp. menejcennosti žilovej steny". Táto hypotéza predpokladala určitú vrodenú „menejcennosť“ zložiek a funkcie žilovej steny ako primárnu príčinu ochorenia. Takto postihnutá žila potom ľahšie podľahne distenzii pri zvýšení intraluminálneho tlaku krvi v povrchových žilách. Týmto smerom sa uberal výskum niekoľko desaťročí minulého storočia. Už v roku 1963 československý autor Švejcar a kol. skúmali a porovnávali obsah kolagénu, elastínu a hexó-



zamínov v stene primárne varikózných žíl na 3 súboroch žíl: varikózne, "potenciálne" varikózne a zdravé normálne žily. Zistili, že primárne varikózne žily a "potenciálne" varikózne žily majú vo svojich stenách nižší obsah kolagénu oproti normálnym zdravým žilám, avšak obsahujú relatívne viac svaloviny. Rozdiel v obsahu elastínu nebol signifikantný. Obsah hexózamínov v súbore varikózných a "potenciálne" varikózných žíl bol taktiež signifikantne vyšší než v súbore zdravých žíl. Na základe svojich výsledkov predpokladali, že primárna príčina varikózných žíl tkvie pravdepodobne v kongenitálnej poruche metabolizmu kolagénu [105]. Týmto smerom sa vo svojom výskume zamerali Andreotti a kol. (1978), Rose a Ahmed (1986), Psaila a Melhuis a kol. (1989), Lengyel a kol. (1990), Maurel a kol. (1990), Lethias a kol. (1996), Porto a kol. (1998, 2002), Travers a kol. (1996), Venturi a kol. (1996), Waksman a kol. (1997), Kockx a kol. (1998), Ishikawa a kol. (2000) a ďalší.

Avšak aj v tomto bádateľskom smere možno urobiť určité vnútorné podrozdelenie. Časť spomínaných autorov sa totiž zamerala na bližšiu charakterizáciu a špecifikáciu buniek hladkej svaloviny v stene varikózných žíl a ich porovnanie s hladkými svalovými bunkami normálnej žilovej steny. Ďalšia skupina autorov sledovala a porovnávala obsah a kvalitu elastínu v stene varikózných žíl. Iná skupina autorov zamerala svoje úsilie na porovnanie a bližšiu špecifikáciu obsahu kolagénu vo varikózných žilách, niektorí z nich išli ešte ďalej a pokúsili sa o stanovovanie a porovnanie obsahu jednotlivých subtypov kolagénu v stenách varikózne zmenených žíl. V nasledujúcom prehľade sú bližšie opísané spomínané jednotlivé "podsmery".

#### **2. 4. 1. 1. 1. PORUCHY HLADKEJ SVALOVINY ŽILOVEJ STENY**

Fakt, že fyziologickou odpoveďou na chronicky zvýšený tlak krvi v normálnej žile je hypertrofia žilovej steny a nie jej dilatácia, je známy od obdobia prenosu autológnych žilových štepov povrchových žíl dolných končatín (vena saphena magna, vena saphena parva) pri cievnych operáciách ako náhrada za poškodené artérie. Morfológickým substrátom prispôsobenia sa žilového štepu arteriálnym podmienkam - tzv. arterializácie štepu- je zhrubnutie vnútornej a strednej vrstvy (tunica intima a tunica media) žilovej steny spôsobené zhrubnutím hladkej svaloviny. Táto reakcia žily po dlhšom čase (niekoľko rokov) býva premrštená až do tej miery, že sa nahradená cieva stane nepriechodnou a musí byť opäť nahradená ďalším štepom. Na experimentálnych modeloch bolo dokázané, že ak by bola poškodená tepna nahradená žilovým štepom z varikóznej žily, nedošlo by k zhrubnutiu jej steny, ale naopak, k jej

ďalšej dilatácii. Preto istá skupina autorov došla k záveru, že primárnou poruchou je narušený svalový tonus žilovej steny, napomáhajúci návratu žilovej krvi do pravého srdca [60, 70, 91, 108].

V minulosti sa žily pokladali prevažne len za akési pasívne "trubice" opatrené chlopňami, cez ktoré prúdi krv späť do srdca a hoci boli popísané morfológické rozdiely vyskytujúce sa v stenách varikózných žíl, málo pozornosti sa venovalo "svalovému plášťu" žilových stien a jeho funkcii, ktorú by mohol zastávať pri napomáhaní venóznemu návratu. Kontraktilita normálnej povrchovej žily dolnej končatiny bola známa a bolo zrejmé, že závisí od funkcie svalových vrstiev. Za distenzibilitu a elasticitu sa zas pripisovala zodpovednosť funkcii kolagénových a elastických vlákien. Bolo dokázané, že aj stena varikóznej žily je schopná určitej obmedzenej kontrakcie, pretože vždy tu môžu byť zachované určité nepostihnuté úseky.

Stena normálnej žily dolnej končatiny v svetelno-mikroskopickom obraze obsahuje 3 svalové vrstvy: vnútornú longitudinálnu vrstvu usporiadanú v zväzkoch, dobre definovanú cirkulárnu vrstvu pozostávajúcu z buniek usporiadaných v pravidelných zhlukoch obklopených jemným spojivovým tkanivom a vonkajšiu slabo definovanú longitudinálnu vrstvu taktiež usporiadanú v zväzkoch uložených prevažne v adventícii. Uvádza sa, že najperiférnejšie bunky cirkulárnej vrstvy svojimi prstovitými bunkovými výbežkami súvisia s podobnými výbežkami najvnútornejšej bunkovej vrstvy vonkajšej longitudinálnej vrstvy a týmto mechanizmom zlepšujú kontraktilnú efektivitu. Svalové vrstvy sú podporené matrix obsahujúcu kolagénové a elastické vlákna, ktoré fungujú ako skelet pre svalové bunky, zabraňujú nadmernej roztážitelnosti a poskytujú určitý elastický odpor. Vrstva spojivového tkaniva býva zoskupená prevažne subintimálne, pod intaktnou lamina elastica interna a ďalej sa stáva predominantnou vo vonkajšej vrstve- adventícii obsahujúcej vasa vasorum. V transmisnom elektrón- mikroskopickom obraze majú svalové bunky dobre vyznačené jadrá s jasne definovanou chromatinovou sieťou. Bunky sa nachádzajú vo vzájomnej blízkosti obklopené jemnou vrstvou amorfného fibrózneho tkaniva a miestami odelených pravidelne vertikálne aj horizontálne usporiadanými zväzkami kolagénových vlákien. Cytoplazma svalových buniek nevykazovala žiadne atypie. Bunková membrána obsahovala dobre vyznačené hemidesmozómy- viditeľné ako lokalizované kondenzácie pozdĺž svojej dĺžky. Predpokladá sa, že vytvárajú "kotviace" platničky pre fibronektínové vlákna spájajúce svalové bunky vzájomne medzi sebou a k matrix. Alternatívna teória tvrdí, že sú to malé lakúny bunkovej membrány, cez ktoré môže cytoplazma vysielat' výbežok, takže v prípade

vzájomnej blízkosti svalových buniek ich cytoplazmy môžu byť spojené do podobných výbežkov jemnou sieťou myoprotoplazmatických filament podobne ako myoendoteliálne filamentá spájajúce svalovú bunku a endotel. Treťou možnosťou je prítomnosť myotransmiterových substancií, ale v každom prípade je rovnako možné, že môžu existovať všetky tri spôsoby komunikácie, pričom metóda prenosu je rozdielna za rozdielnych okolností. Vždy však medzi bunkami ostáva dostatočná vzdialenosť pre koordinovanú akciu.

Vo varikózných žilách bolo najzreteľnejšie výrazné zvýšenie fibrózneho tkaniva invadujúceho hlavne svalové vrstvy a spôsobujúce prerušenie pravidelného bunkového usporiadania s oddelením a prerušením svalových zväzkov. Tunica intima bola intaktná, bez príznakov zápalovej patológie. Subintimálne sa nachádzali depozity kolagénu, pripomínajúce arteriosklerotické plaky. V oblastiach postihnutých vydutím žilová stena často obsahovala len stenčený kolagén pokrytý endoteliálnym a subendoteliálnym tkanivom. Oblasti fibróznej infiltrácie neboli jednotne rozmiestnené a v mnohých oblastiach zahŕňali len časť žilovej steny. Aj v prípade výrazne varikóznej žily sa často našli nepostihnuté úseky. V elektrónovomikroskopickom obraze mala varikózna žilová stena úplne rozdielny obraz: svalové bunky boli vzájomne výrazne oddelené zvýšeným množstvom fibrózneho tkaniva, v ktorom mnoho kolagénových vlákien stratilo svoje zväzkovité usporiadanie, pričom niekoľko pravidelne usporiadaných zväzkov bolo vždy prítomných. V najviac postihnutých oblastiach bolo porušené pravidelné usporiadanie kolagénových aj elastických vlákien. Niekoľko kolagénových vlákien sa zdalo byť pohltých svalovou bunkou, dedukujúc, že svalová bunka na seba prezala fagocytárne vlastnosti, čo pozorovali v minulosti aj iní autori. Toto pozorovanie viedlo k záveru, že normálna svalová bunka samotná je schopná sa transformovať na akúkoľvek bunku spojivového tkaniva. Výraznou črtou zvýšenej fibróznej infiltrácie bolo zhrubnutie pericelulárnej vrstvy amorfného fibrózneho tkaniva akoby secernovaného samotnou svalovou bunkou, čo sa zdá byť pravdepodobným vzhľadom k známej schopnosti svalovej bunky produkovať elastín. Vo vydutínach varikóznej žilovej steny svalové bunky vymizli úplne a stena bola formovaná len kolagénom lemovaným intimou a pokrytým atrofovanou adventíciou, z ktorej vymizli vasa vasorum [72].

Zahrňujúc vyššie uvedené najnápadnejším nálezom v stene varikózných žíl bolo oddelenie jednotlivých svalových buniek od seba kolagénovou infiltráciou, ktorá im pravdepodobne bránila fungovať ako celku. Na dosiahnutie určitého svalového tonusu v stene cievy je však potrebné nielen to, aby boli svalové bunky v kontakte navzájom, ale aj aby boli napojené

na „ukotvujúcu kostru“ spojivového tkaniva. V prípade žilovej steny je to podporná matrix z kolagénu a elastínu. Bolo dokázané, že fibronektín (proteoglykán vysokej molekulovej hmotnosti) je prítomný v pericelulárnej aj intercelulárnej matrix, pericelulárne vytvára filamentá pripojené na jednom konci k receptorom svalových buniek a druhým koncom ku kolagénovým a elastickým vláknam. Použitím imunofluorescenčných techník možno identifikovať i ďalšie glykoproteíny (ako elastonektín), vzájomnou väzbou umožňujúce koordinovanú kontrakciu žilovej steny. Iniciácia a inhibícia kontrakcie je pravdepodobne sprostredkovaná cez adrenergné nervové zakončenia a to priamou akciou svalovej bunky v závislosti od vyvolávajúceho stimulu (napr. chlad a teplo spôsobujúce spazmus alebo dilatáciu). Z farmakologických stimulov noradrenalín, angiotenzín, prostacyklín spôsobujú kontrakciu, naopak histamín, serotonín, adenosín, prostaglandín E kontrakciu inhibujú. Zdá sa, že udržanie optimálnej vzdialenosti medzi kontaktujúcimi sa bunkami je vhodné nielen pre prenos vzruchu z nervu na svalovú bunku, ale aj pre prenos vzruchu medzi svalovými bunkami navzájom. Otázkou ostáva, či svalové bunky sú oddelené z dôvodu vnútornej abnormality stimulujúcej kolagénovú infiltráciu alebo bunky sú separované vrastaním abnormálnych kolagénových vlákien. Ingescia kolagénových vlákien svalovými bunkami by mohla predpokladať pokus o obmedzenie kolagénovej invázie. Prívrženci "valvulárnej teórie" argumentujú, že tieto zmeny sú len dôsledkom napínania steny žily samotným zvýšeným hydrostatickým tlakom. Avšak oponenti dôvodí, že v tom prípade by mal byť postihnutý celý obvod žily a rovnako to nevysvetľuje sakulárne alebo fuziformné vydutie žily laterálne pod suficientnými chlopňami. Autori navrhujú preskúmanie intracelulárnej aj extracelulárnej kolagenázovej aktivity fluorescenčnými metodikami v miestach prechodu normálneho a patologického tkaniva za účelom dedukcie začiatku lézií a identifikácie úlohy kolagénu v etiológii varikozity [40]. Rovnako sa uvažuje o preskúmaní biochemickej aktivity rôznych buniek žilovej steny. Niektorí autori poukázali aj na redukcii tkanivovej fibrinolytickej aktivity v svalových bunkách žilovej steny varikózných žíl- dosiaľ pripisovanej len samotnému žilovému endotelu, dokázanej aj v svalových bunkách žilovej steny; za normálnych okolností je táto aktivita vyššia v žilách dolných končatín, než kdekoľvek inde v organizme. Naviac bunky hladkej svaloviny aj endoteliálne bunky steny žily sú extrémne senzitivne k lytickej aktivite aktivovaných žírnych buniek a autori vzhľadom na ich prítomnosť a aktivitu v svalových vrstvách steny normálnych aj varikózných žíl doporučujú ich ďalšie preskúmanie. Vo vývoji varikózných žíl na celulárnej úrovni teda dochádza k poruche rovnováhy medzi svalovou

bunkou, kolagénovými a elastickými vláknami na pravdepodobne genetickom avšak neidentifikovanom podklade, majú za následok stratu kontraktility žilovej steny [45]. Odpoveďou na zvýšený hydrostatický tlak v žile teda nie je hypertrofia, pretože základná abnormalita je pravdepodobne v samotnej svalovej bunke, ale naopak dilatácia, keďže stena žily je slabá a insuficiencia žilových chlopní je skôr jej sekundárnym dôsledkom ako primárnou príčinou. Táto teória vysvetľuje:

- vývoj laterálnych "vydutín" cievnej steny pri alebo bez prítomnosti nedovieravých proximálnych žilových chlopní, keďže tu môžu byť prítomné lokalizované oblasti svalovej slabosti,
- vývoj fuziformných alebo serpiginózných dilatácií medzi dovieravými chlopňami,
- prečo sa normálne žily nestanú varikóznymi pri ich obrátení a použití ako arteriálneho bypassu (nie je tu vrodená svalová menejcennosť),
- prečo sa žilový bypass nestane varikóznym ani v prípade, keď sú všetky jeho chlopne nedovieravé,
- prečo varikózne žily, ktoré sa objavia v tehotenstve, miznú po prekonaní tehotenstva,
- objavenie sa lokalizovaných varikózných vydutín bez spojitosti k hlbokým perforátorom alebo k hlavnému kmeňu vena saphena magna,
- prečo odstraňujúca operácia samotného hlavného kmeňa vena saphena magna býva neúspešná,
- prečo akákoľvek operácia, ktorá sa nesnaží o odstránenie samotných varikózit bude mať len obmedzenú úspešnosť bez ohľadu na to, či sa podviažu nedovieravé perforátory.

Rose a Ahmed (1986) dokumentovali zvýšený obsah hladkých svalových buniek [93], hoci ich počet vo varikózných žilách bol znížený [68]. Na základe zníženého počtu hladkých svalových buniek na plochu sa teda predpokladá, že remodelácia varikóznej žilovej steny je spojená s hypertrofiou buniek hladkej svaloviny [60]. Zistilo sa, že hypertrofické oblasti safenóznej žily boli spojené so zvýšenou apoptózou, obzvlášť v proximálnych úsekoch žily [13]. Keďže hypertrofia srdcového svalu je modulovaná receptormi steroidných hormónov (ako napr. skupina estrogénových receptorov) a dokumentovala sa zvýšená expresia estrogénového receptoru  $\beta$  (ER $\beta$ ) v krvných cievach po takej cievnej traume (ako napr. dilatácia). Estrogénový receptor  $\beta$  je členom superskupiny jadrových receptorov a pozostáva z ligand-viažúcej domény, DNA viažúcej domény a z dvoch domén s funkciou transkripčnej aktívácie. Aktivácia receptora estrogénovej skupiny (aj ER $\beta$ ) môže viesť k aktivizácii extracelulárnej

regulačnej kinázy (ERK)  $\frac{1}{2}$ , JNK a p38 aktiváciou a komplexnou formáciou s proximálnymi kinázami. Na základe týchto predpokladov Knaapen a spol. (2005) porovnávali expresiu ER $\beta$  výhradne na varikózných a kontrolných vzorkách odobratých od mužov. Zistili, že hoci objemová hustota buniek hladkej svaloviny bola rovnaká v oboch porovnávaných súborov, avšak priemer buniek hladkej svaloviny v oboch vrstvách (longitudinálnej aj cirkulárnej) média bol vyšší u varikózných žíl. Jednoznačne dokumentovali hypertrofiu buniek hladkej svaloviny v cirkulárnej vrstve média varikózných žíl asociovanú so zvýšenou expresiou ER $\beta$  v tejto vrstve v porovnaní s nevarikóznymi, avšak nie v longitudinálnej vrstve média. Nezistili známky proliferácie či apoptózy buniek hladkej svaloviny ani v jednej svalovinovej vrstve varikóznej žilovej steny, avšak pozorovali zvýšenú apoptózu v endoteliálnych bunkách a bunkách adventície varikózných žíl. Predpokladá sa, že bunky hladkej svaloviny cirkulárnej vrstvy média sú viac vnímavéjšie k hormonálnym zmenám a objemovému tlaku ako hladké svalové bunky longitudinálnej vrstvy média varikózných žíl [59].

#### **2. 4. 1. 1. 1. SUBCELULÁRNA REGULÁCIA PREMENY HLADKEJ SVALOVEJ BUNKY VO VÝVOJI VARIKÓZNYCH ŽÍL**

Histologicky je chronická venózna nedostatočnosť (a teda vytvorenie varixov) charakterizovaná premenou buniek hladkej svaloviny žilovej steny z kontraktilného fenotypu na sekrečný a zároveň intenzívnou kolagénovou infiltráciou. V elektrónovo-mikroskopickom obraze steny normálnej zdravej povrchovej žily dolnej končatiny sú bunky hladkej svaloviny vretenovitého tvaru usporiadané paralelne prevažne v tunica media. Ich ultraštruktúra zodpovedá kontraktilnej funkcii vaskulárnej hladkej svaloviny s pozdĺžnou orientáciou jej súčastí (prevažne kontraktilných proteínov). Extracelulárna matrix je charakterizovaná štruktúrovanou distribúciou kolagénu s organizovaným architektonickým usporiadaním. Vo varikóznej povrchovej žile dolnej končatiny tunica media obsahovala hladké svalové bunky elipsovitého tvaru s početnými vakuolami, obsahujúcim i elektrón-denzný materiál. Vakuolizácia a strata vretenovitého tvaru poukazovala na to, že bunky hladkej svaloviny prešli transformačným procesom zo svojho typicky kontraktilného tvaru. Prítomnosť veľkých vakuol naznačuje sekrečnú alebo fagocytárnu schopnosť. Navyše stena varikózných žíl vykazovala nepravidelné depozity kolagénu a difúznou fibrózu média, čo malo za následok roztrúsenie buniek hladkej svaloviny a stratu ich organizovaného, paralelného bunkového usporiadania.

Štúdie regulácií bunkového cyklu predpokladajú, že dediferenciácia hladkých svalových buniek žilovej steny by mohla byť modulovaná retinoblastómovým proteínom. *Retinoblastómový proteín (pRb)* bol prvotne pozorovaný v tumorózných bunkových líniiach retinoblastómu (zhubný nádor zárodočných buniek sietnice) a objavený ako inhibítor celulárnej proliferácie. Vyskytuje sa v 2 stavoch:

A) v aktívnom *nefosforylovanom stave* (molekulovej hmotnosti 110 kDa) zabraňuje bunkovej proliferácii alebo diferenciácii naviazaním transkripčných faktorov zodpovedných za reguláciu týchto procesov,

B) vo *fosforylovanom*, deaktivovanom stave (molekulovej hmotnosti 114 kDa), do ktorého sa dostáva celulárnou stimuláciou rôznymi cytokínmi a spôsobuje uvoľnenie týchto transkripčných faktorov s následnou proliferáciou a dediferenciáciou buniek.

Výsledky imunocytochemickej štúdie s monoklonálnymi protilátkami proti retinoblastómovému proteínu (pRb) demonštrovali spojitosť transformácie hladkých svalových buniek varikózne zmenených žíl s prítomnosťou fosforylovaného pRb, na základe čoho sa predpokladá, že dediferenciácia hladkých svalových buniek je regulovaná retinoblastómovým proteínom a jeho disinhibícia (fosforylácia) môže byť významným faktorom pri vzniku varikozity dolných končatín [80]. Možná súvislosť medzi zvýšenou fosforyláciou pRb a varikóznymi žilami je významná v tom, že sústreďuje pozornosť na pravdepodobný význam poruchy proliferácie a diferenciácie regulačných proteínov pri vzniku varixov. Retinoblastómový proteín sa dnes považuje za ubikvitárny komplex proteínov, ktorých funkcia je determinovaná stavom fosforylácie. Fosforylácia pRb je kontrolovaná proteínmi s názvom cyklíny a ich cyklín-dependentnými kinázami. Fosforylácia pRb spôsobuje uvoľnenie nukleárných transkripčných faktorov alebo konformačnú zmenu proteínového komplexu, čo má za následok bunkovú proliferáciu a diferenciáciu, pričom bazálny nefosforylovaný stav proteínu (pRb) zabraňuje týmto procesom. Komplex retinoblastómového proteínu je asociovaný s početnými transkripčnými faktormi. Najznámejšími sú: E2F, c-Ab1, Elf-1, Myo-D a ATF-2. E2F a c-Ab1 sa zúčastňujú cellulárnej proliferácie a ostatné 3 bunkovej diferenciácie (napr. Myo-D spôsobuje zastavenie proliferácie myoblastov a začiatok ich diferenciácie na svalové bunky). Argument, že môže ísť o bunkovú proliferáciu a nie dediferenciáciu, bol odmietnutý na základe výsledkov morfometrického skúmania, ktoré ukázalo, že hoci celkový počet hladkých svalových buniek je vyšší vo varikóznej žilovej stene v porovnaní s normálnymi žilami vďaka celkovému zväčšeniu plochy, v normálnej žile sa nachádza viac svalových buniek na jednotku

plochy ako vo varikóznej žile. Mechanizmus podmieňujúci bunkovú proliferáciu versus diferenciáciu s retinoblastómovým proteínom nie je známy.

#### **2. 4. 1. 1. 2. PORUCHY EXTRACELULÁRNEJ MATRIX ŽILOVEJ STENY**

Extracelulárna matrix spojivového tkaniva je tvorená prevažne molekulami 4 skupín proteínov: kolagénov, proteoglykánov, glykoproteínov a elastínu. Každá skupina je zložená z niekoľkých geneticky odlišných zložiek, od relatívneho zloženia ktorých závisí rozmanitosť a tým aj vlastnosti spojivového tkaniva rôznych orgánov (koža, kosť, chrupavka, šľacha, cievna stena). Extracelulárna matrix spojivového tkaniva žilovej steny pozostáva prevažne z kolagénov, proteoglykánov a elastínu syntetizovaných bunkami hladkej svaloviny cievnej steny. Kolagén a elastín cievnej (a teda aj žilovej) steny má vlákniťú štruktúru, vytvárajúc podpornú matrix cievnej steny pre bunky hladkej svaloviny. Na základe elektrónovo-mikroskopických pozorovaní v normálnej zdravej žile má kolagén pravidelné vlákniťé horizontálne aj vertikálne usporiadanie, s tendenciou svojej koncentrácie subintimálne, hneď pod lamina elastica interna a potom opäť v tunica adventitia obsahujúcej aj vasa vasorum. Elastické vlákna normálnej žilovej steny sa v elektrónovo-mikroskopických obrazoch javia roztrúsené v celej hrúbke žilovej steny s naznačenou koncentráciou na rozhraní tunica intima a tunica media, vytvárajúc často slabo rozlíšiteľnú fenestrovanú lamina elastica interna. Obdobnú lamina elastica externa na rozhraní tunica media a tunica adventitia možno pozorovať len vo veľkých žilách [56].

Elastínu a kolagénu sa pripisuje významná úloha v udržiavaní štrukturálnej integrity cievnej steny. Elastín sa podieľa na pružnosti (elasticite) žilovej steny a kolagén na jej rozťažiteľnosti. Obe zložky spojivového tkaniva cievnej steny vytvárajú určitú "kostru" pre svalové bunky, umožňujú ich uchytenie a kontrakciu a zabraňujú nadmernému rozťahnutiu cievnej steny, poskytujúc určitý stupeň možnosti elastického sťahu [36, 37, 49, 58, 69, 86, 93, 94, 111].

#### **2. 4. 1. 1. 2. 1. PORUCHY ELASTÍNU ŽILOVEJ STENY VARIKÓZNYCH ŽÍL**

Elastín je taktiež proteínom extracelulárnej matrix. Od kolagénu sa líši vysokým obsahom valínu a dezmosínu. Môže mať formu dlhých tenkých silne dvojlomných vlákien alebo plochých pásov, hrubých 0,2- 0,4  $\mu\text{m}$ . V svetelnom mikroskope majú homogénnu štruktúru. Elastické vlákna sú veľmi pretiahnuteľné, trhajú sa pri natiahnutí o 50% pôvodnej dĺžky,



vydržia až ťah 20-30kg na 1cm<sup>2</sup>. Ak ťah prestane pôsobiť, elastické vlákna nadobúdajú takmer pôvodnú dĺžku. Elastín je rezistentný na teplo a chlad, odolný voči zriedeným kyselinám a zásadám. Ultraštruktúra elastických vlákien sa skladá z periférnych zväzkov tenkých tubulárnych subfibríl hrubých 10 nm a z centrálne uloženej amorfnej substancie. Predpokladá sa, že amorfná zložka je elastín a 10 nm hrubé fibrily predstavujú dosiaľ neidentifikovaný proteín. Elastín je natrávitelný elastázou.

V cievnej stene žily elastín tvorí jednu z komponent extracelulárnej matrix. Pripisuje sa mu zodpovednosť za pružnosť (elasticitu) žilovej steny. Hrá dôležitú úlohu v štruktúrálnej integrite cievnej steny. Pri natiahnutí žilovej steny vytvára "skraccujúcu silu", ktorá oponuje ťahu vytváranému postrannými vetvami a perivaskulárnym spojivovým tkanivom a predlžujúcej sile vytváranej tlakom v lumene žily [79].

Zástancovia teórie tzv. "vrodenej slabosti žilovej steny" ako príčiny vzniku primárnej varikozity sústredili svoju pozornosť aj na analýzu tejto komponenty žilovej steny, keďže poruchy elastínu by viedli k poruche pružnosti žilovej steny s následnou zvýšenou poddajnosťou voči zvýšenému hydrostatickému tlaku v priesvite žily [86]. Hydrostatický tlak krvného stĺpca v cieve sa prenáša na samotný endotel cievy a ak endotel je z vonkajšej strany podporený nižším množstvom spojivového tkaniva (kolagénu a elastínu), je zrejme, že cievna stena má zníženú rezistenciu. V nasledujúcej tabuľke [Tab.4] sú prehľadne uvedené práce zaoberajúce sa touto problematikou.

Z uvedeného prehľadu sú zrejme nie celkom jednoznačné výsledky rôznych prác, ale dá sa povedať, že prevažujú výsledky poukazujúce na znížený obsah elastínu v žilových stenách varikózných žíl.

Niektorí autori pozorovali znížený obsah elastínu v dilatovaných úsekoch varikózných žíl v porovnaní s ich nedilatovanými úsekmi a s nedilatovanými zdravými žilami [109]. V nedilatovaných úsekoch varikózných žíl a v zdravých žilách nenašli štatisticky významný rozdiel v obsahu elastínu cievnej steny. Vo varikózne postihnutých úsekoch žíl pozorovali hrubšie a tortuóznejšie elastické vlákna. V zdravých žilách dolných končatín vytváral elastín viac-menej vytvorenú a fenestrovanú lamina elastica interna na rozhraní tunica intima a tunica media. Niekoľko vlákien bolo prítomných aj v tunica media, avšak bez podstatnejšej kontinuity. V dilatovaných úsekoch varikózných žíl bolo pozorované nahromadenie elastínu prevažne v tunica intima, v oblasti tunica media bol pozorovaný úbytok elastických vlákien. V

priamej spojitosti s predĺžením cievnej steny v oblasti intimy a media bola pozorovaná zvýšená fragmentácia elastických vláken.

Niektorí autori podávajú možné vysvetlenie týchto nejednoznačných výsledkov: prepokladajú, že varikózne žily sa vyvíjajú cez rozličné štádiá. V počiatocnom štádiu neosyntéza (alebo redukovaný katabolizmus) kolagénu čiastočne nahrádza redukciiu elastínu bez zmeny primárnej štruktúry žilovej steny. Neskôr, keď žila dilatuje nastupuje významný pokles oboch zložiek - kolagénu aj elastínu- s následnou stratou elasticity [30].

V sledovaných prácach stupeň narušenia elastických vláken nevykazoval priamu úmernosť v korelácii so stupňom postihnutia žilovej steny. Zvýšený výskyt elastických vláken bol prítomný v žilách s miernym stupňom postihnutia, čo mohlo byť výsledkom kompenzačného mechanizmu proti začínajúcej dilatácii cievnej steny. A naopak, pri zvýraznenom postihnutí cievnej steny bol pozorovaný znížený výskyt fragmentovaných elastických vláken. Znížené množstvo elastických vláken môže byť dôsledkom zvýšenej prítomnosti ostatných proteínov extracelulárnej matrix.

Je tiež možné, že zvýšená dezorganizácia extracelulárnej matrix vedie k "demontáži" elastických vláken, čo by bolo v súlade s nálezmi autorov Lengyela a Gandhiho, ktorí pozorovali zvýšenú koncentráciu plazmatickej elastázy [40, 66].

Metabolizmus elastínu závisí od rovnováhy medzi elastázami a inhibítormi elastáz. Znížené množstvo elastínu v cievnej stene teda môže závisieť od množstva elastáz, poruchy antielastázových faktorov, alebo od oboch. Najdôležitejšími inhibítormi elastáz sú alfa-1-anti-trypsín a alfa-2-makroglobulín. U žiadneho z pacientov v publikovaných prácach sa nenašiel systémový defekt týchto faktorov. Rovnako bolo možné vylúčiť účasť leukocytárnych elastáz na vývoji varixov z 2 príčin: vo varikózných žilách sa nenašiel zápalový infiltrát a niektoré údaje naznačujú, že aktivita myeloperoxidázy (dôležitého leukocytárneho enzýmu) bola takmer rovnaká vo vzorkách zdravých aj varikózných žíl (dilatovaných aj nedilatovaných úsekoch).

Ďalšie zdroje elastáz sú makrofágy, monocyty, trombocyty, fibroblasty a navyše dosť veľké množstvo enzýmu voľne cirkuluje v plazme. Zaujímavý je poznatok, že bunky hladkej svaloviny tiež majú elastolytickú aktivitu [93]. Prvotný defekt pri rozvoji varikózných žíl by teda mohol byť v svalových bunkách žilovej steny, zodpovedných za syntézu a katabolizmus oboch zložiek spojivového tkaniva - kolagénu aj elastínu. Na záver, dilatované úseky varikózných žíl so zníženým obsahom elastínu sa striedajú s nedilatovanými úsekmi s normálnym

obsahom kolagénu aj elastínu pozdĺž dĺžky varikózne postihnutej žily bez spojitosti k lokalizácii alebo funkcii chlopní. Zdá sa preto, že dilatácia žilovej steny súvisí so zníženou syntézou alebo akcelerovaným katabolizmom elastínu a zmeneným pomerom elastín/kolagén.

<b>Tab. 4. Práce porovnávajúce obsah elastínu v stene varikózných žíl.</b>					
rok	prvý autor	metodika	cieľ porovnávania	výsledky	
				varixy	zdravé žily
1963	Švejcar J. a kol.	biochemická	elastín	rovnako	rovnako
1979	Andreotti L. a kol.	biochemická	elastín	menej	viac
1993	Gandhi R. H. a kol.	imunohistochemická	elastín	menej	viac
1994	Chello M. a kol.	histologická	elastín	menej	viac
1996	Travers J. P. a kol.	histologická, stereologická analýza	elastín	rovnako	rovnako
1996	Venturi M. a kol.	biochemická	elastín	menej	viac
1999	Kirsch D. a kol.	imunohistochemická	elastické vlákna	rovnako	rovnako
2002	Porto L. C. a kol.	histologická	elastín	viac v intíme, menej v médií	menej v intíme, viac v médií
2005	Ducasse E. a kol.	imunohistochemická	elastické vlákna	menej	viac
2007	Elsharawy M. A. a kol.	histologická, morfometrická	elastín	menej	viac
2009	Lim C. S. a Davies A. H.	prehľad literatúry z databáz PubMed a Ovid	elastín	menej	viac

#### **2. 4. 1. 1. 2. PORUCHY KOLAGÉNU ŽILOVEJ STENY VARIKÓZNYCH ŽÍL.**

Keďže väčšina mechanických vlastností žilovej steny je závislá od povahy a štruktúrneho zloženia kolagénovej siete v rôznych jej vrstvách, mnoho autorov sa začalo systematicky venovať štúdiu kolagénu v cievnom tkanive a jeho vývoja z hľadiska venózneho patológie [1, 11, 20, 36, 37, 48, 49, 67, 69, 73, 107, 111].

Kolagény sú štruktúrne proteíny extracelulárnej matrix s jednou alebo niekoľkými trojitými špirálovitými doménami. Táto pôvodná štruktúra je výsledkom spojenia 3 polypeptidických reťazcov s charakteristickým sledom aminokyselín. Každý reťazec je sformovaný

na úrovni trojitej špirálovitej domény opakovaním tripletu (GLY- Xaa- Yaa), pričom X a Y bývajú obvykle prolín a hydroxyprolín. Vďaka prítomnosti cyklických aminokyselín reťazce majú pravotočivú špirálovitú štruktúru typu polyprolínu II. Spojenie s dvoma ďalšími reťazcami vedie k vytvoreniu pravotočivej superzávitnice. Takýto štrukturálny vzor však nie špecifický len pre molekuly kolagénov, keďže trojité špirálovité domény boli popísané aj pri iných typoch proteínov (napr. C1q zložka komplementu, acetylcholinesteráza, lektín s vysokou afinitou k mannóze, pľúcny surfaktant, scavenger -receptor makrofágov).

Hypotéza tzv. "vrodenej slabosti žilovej steny" viedla mnohých autorov ku štúdiám zameraným na porovnávanie kolagénu v cievnej stene zdravých a varikózných žíl. Táto hypotéza bola založená na úvahe, že zvýšenú poddajnosť žilovej steny voči hydrostatickému tlaku krvného stĺpca v žile spôsobuje v prípade tzv. primárnych varikózných žíl (pravdepodobne vrodená) menejcennosť spojivového tkaniva cievnej steny takto postihnutých žíl, hlavne jeho 2 hlavných zložiek : kolagénu a elastínu. Prvé práce s touto problematikou sa objavili už začiatkom 60-tych rokov 20. storočia a to u českých autorov [105], neskôr nasledovali ďalšie práce s použitím rôznych metodík a s rôznymi výsledkami. Prehľadne sú jednotlivé štúdie uvedené v tabuľke [Tab.5]. Z uvedeného prehľadu, hoci nie je celkom kompletný, je zrejmé, že výsledky jednotlivých prác sú dosť nejednoznačné aj keď sa nedá uprieť, že prevažujú výsledky dokazujúce vyšší obsah kolagénu vo varikózných žilách v porovnaní so zdravými žilami.

Nejednoznačné výsledky spomínaných prác viedli viacerých autorov k bližšej špecifikácii a porovnávaniu obsahu jednotlivých typov kolagénov v stene varikózných žíl, čo spomeniem neskôr, ale aj k názoru, že extracelulárna matrix stien varikózných žíl môže byť dynamickým štrukturálnym prvkom a teda meniť sa v závislosti od stupňa a dĺžky trvania ochorenia. Vaskulárna remodelácia steny žily je výsledkom migrácie a proliferácie hladkých svalových buniek a metabolizmu extracelulárnej matrix, pričom bunky hladkej svaloviny cievnej steny produkujú väčšinu komponentov extracelulárnej matrix (ECM) cievnej steny, ako napr. kolagén (typy I, III, IV a V), proteoglykány, elastín; tiež syntetizujú a secernujú metaloproteinázy ECM (MMPs) ale aj tkanivové inhibítory týchto metaloproteináz (TIMPs) podobne ako cievne endoteliálne bunky.

Zo skupiny rôznych metaloproteináz: MMP-1 (intersticiálna kolagenáza) odbúrava prirodzené kolagény typov I, II a III; MMP-2 (gelatináza A) a MMP-9 (gelatináza B) majú

špecifickú schopnosť degradácie denaturovaných fibrilárnych kolagénov a prírodného kolagénu typu IV. Degradácia vaskulárnych kolagénov metaloproteinázami ovplyvňuje proliferáciu

**Tab. 5. Práce porovnávajúce obsah kolagénu v stene varikózných žíl.**

rok	prvý autor	metodika	cieľ porovnávania	výsledky	
				varixy	zdravé žily
1963	Švejcar J. a kol.	biochemická	kolagén, hexóزامíny, voda, hl. svalovina	menej viac viac viac	viac menej menej menej
1979	Andreotti L. a kol.	biochemická	kolagén, celk. cukor, solubil. nonskleroproteíny	menej viac viac	viac menej menej
1989	Psaila J. V. a kol.	biofyzikálna	kolagén, počet chlopní	menej menej	viac viac
1990	Maurel E. a kol.	biochemická	kolagén	viac	menej
1992	Rose S. a kol.	histologická	kolagén	viac	menej
1994	Chello M. a kol.	histologická, biochemická	kolagén	viac	menej
1996	Travers J. P. a kol.	histologická, stereologická analýza	kolagén, hl. svalovina, hrúbka steny, celk. plocha steny	viac viac rovnako viac	menej menej rovnako menej
1996	Venturi M. a kol.	biochemická	kolagén	viac	menej
2002	Wali M. A. a Eid R. A.	histologická	kolagén	viac	menej
2005	Ducasse E. a kol.	histologická, imunohistochemická	kolagén	viac	menej
2007	Elsharawy M. A. a kol.	histologická, morfometrická	kolagén (intima, média)	viac	menej
2009	Lim C. S. a Davies A. H.	prehľad literatúry z databáz PubMed a Ovid	kolagén	rovnako	rovnako

a migráciu buniek hladkej svaloviny z tunica media do tunica intima. Na druhej strane, TIMP-1 a TIMP-2 (prírodné inhibítory MMPs) majú významnú úlohu v udržiavaní proteolyticko/antiproteolytickej rovnováhy. Nadmerná expresia TIMP-1 inhibuje proliferáciu a migráciu buniek hladkej svaloviny cievnej steny, vyúsťujúc do následnej inhibície hyperplázie intimy. Tieto nálezy nezávislých úloh MMPs a TIMPs naznačujú, že remodelácia cievnej steny a hlavne remodelácia intimy v zmysle hyperplázie je vysoko závislá od funkcie buniek hladkého svaloviny a endoteliálnych buniek [43, 48].

Špirálovitý kolagén, špecifická forma upraveného kolagénu vykazujúca špiralovité zhrubnutia s periodickým pruhovaním, bol dokázaný v cievnom tkanive za rozličných podmienok. Vo zvýšenom množstve sa nachádzal aj v normálnych žilách, kde boli prítomné vysoké hladiny MMP-1. Spoločné nálezy distribúcie špirálovitého kolagénu a expresie MMP-1 aj v niektorých typoch artérií indikovali, že špirálovitý kolagén by mohol byť prednostne vytváraný za podmienok fyziologickej degradácie normálnych kolagénových fibríl zdravých ciev. Toto viedlo k záveru, že hemodynamické zmeny vyvíjajúce tlak na cievnu intimu môžu mať priamy alebo nepriamy vplyv na metabolizmus kolagénu cievnej steny. V práci autorov Ishikawa Y. a kol. (2000) sledovali a porovnávali expresiu MMP-1, prolyl-4-hydroxylázy (marker syntézy kolagénu v cievnej stene) a distribúciu špirálovitého kolagénu (SC) v rôznych typoch patologických ciev (medzi nimi aj varikózných žíl) a v ich "zdravých" kontrolách. Pri porovnávaní varikózných povrchových žíl versus zdravé povrchové žily dolných končatín našli zvýšenú expresiu prolyl-4-hydroxylázy, zníženú expresiu MMP-1 a zníženú distribúciu špirálovitého kolagénu vo varikózných žilách. Tento nález ich viedol k záveru, že vo varikózných žilách je prítomná zvýšená syntéza kolagénu spolu s jeho zníženou degradáciou na rozdiel od zdravých žíl, čo je pravdepodobne dôsledok venózne hypertenzie.

Sansilvestri-Morel so spolupracovníkmi [97] skúmala príčinu zníženej produkcie kolagénu III (proteínu) v bunkách hladkej svaloviny varikózných žíl napriek jeho normálnej mRNA expresii [95, 96], cesty jeho intracelulárnej a extracelulárnej degradácie v kultúrach hladkých svalových buniek z normálnych a varikózných žíl vena saphena magna. Okrem zvýšeného obsahu a produkcie kolagénu III vo varikózných žilách ako aj v kultúrach hladkých svalových buniek z varikózných žíl zistila:

- A) stabilita a funkčnosť mRNA kolagénu III nie je narušená,
- B) kolagén III nie je degradovaný vo vnútri buniek mechanizmom zahŕňajúcim proteázy,
- C) kolagén III normálne vyzrieva a je secernovaný mimo bunky,
- D) kolagén III je degradovaný v extracelulárnom priestore mechanizmom zahŕňajúcim MMPs a MMP3 je zvýšene exprimovaná,
- E) produkcia niektorých rastových faktorov (bFGF, IL-1 $\beta$ , PDGF-AB, TGF- $\beta$ 1) nie je zmenená okrem zvýšenej VEGF (vascular endothelial growth factor) syntézy, avšak celková produkcia PAI-1 je zvýšená ako aj produkcia a aktivita t-PA a

F) množstvo fibronektínu je znížené v peri- a extracelulárnom kompartmente. Z uvedených výsledkov vyplýva niekoľko predpokladov:

1) redukcia množstva kolagénu III je výsledkom jeho degradácie mimo bunky vo varikózných žilách,

2) jeho degradácia je výsledkom zvýšenej aktivity proteáz,

3) zvýšená degradácia kolagénu III v extracelulárnom priestore môže byť následkom hyperaktivity a nadprodukcie MMPs vo varikózných žilách,

4) kolagenázy a gelatinázy sa pravdepodobne nezúčastňujú degradácie kolagénu III v hladkých svalových bunkách varikózných žíl, avšak pravdepodobne sa ho aspoň sčasti zúčastňuje stromelyzín,

5) mRNA expresia a produkcia stromelyzínu MMP3 bola zvýšená v bunkách varikózných žíl,

6) substrátom MMP3 je kolagén III (a nie kolagén I) a inhibícia aktivity MMP3 čiastočne zvyšuje produkciu kolagénu III. Stromelyzín MMP3 je kľúčový člen MMP skupiny so širokou substrátovou špecificitou: má úlohu v aktivácii ďalších MMPs a tak sa javí ako silným kandidátskym génom pri ovplyvňovaní cievnej remodelácie, ruptúre aterosklerotického plaku a rizika choroby koronárnych artérií. Navyše, MMP3 sa nedávno ukázala ako zvýšene exprimovaná pri chronickom žilovom vrede predkolenia a popísala sa ako potenciálny terapeutický cieľ pri liečbe chronických vredov predkolenia žilovej etiológie. Jedným z najčastejších substrátov MMP3 je fibronektín, jeho intracelulárne množstvo v oboch sledovaných súboroch bolo rovnaké, avšak jeho množstvo v peri- a extracelulárnom priestore bolo znížené. Fibronektín pravdepodobne (tak ako kolagén III) je degradovaný mimo hladkých svalových buniek varikózných žíl rovnakým MMP závislým mechanizmom, čo môže byť MMP3. Účasť MMP3 na degradácii kolagénu III by mohla byť nepriama, prostredníctvom aktivácie iných proMMP. Navyše, interakcia medzi kolagénom I, III a fibronektínom je dôležitá pre polymerizáciu kolagénových heterofibríl. Avšak, kolagénové depozity závisia od interakcií medzi fibronektínom, kolagénom I a III prostredníctvom bunkových integrínov. Rôzne štúdie dokumentovali schopnosť fibronektínových vlákien vystierania a kontrakcie prispôsobujúcej sa pohybu buniek, indikujúcej tak svoju elasticnosť a účasť v rozťažiteľnosti tkanív. Degradácia kolagénu III a fibronektínu by mohla mať súslednosť pri polymerizácii kolagénových heterofibríl a tak ovplyvňuje ultraštruktúru a elasticitu tkaniva. Na porozumenie nadprodukcie MMP3 v bunkách varikózných žíl rôzne faktory, regulujúce indukciu

proMMP3 expresie boli kvantifikované v kultúrach hladkých svalových buniek TGF- $\beta$ 1, PDGF, IL-1 $\beta$  a bFGF (známe svojou aktiváciou produkcie proteínov matrix, ako kolagénu a elastínu, tiež popísané ako aktivátory proMMP3 expresie). Ich expresia bola štatisticky rovnaká v porovnaní s kontrolným súborom, avšak bola zistená zvýšená koncentrácia VEGF v bunkovom supernatante z varikózných žíl. VEGF sa pripisuje indukcia proMMP3 expresie, rovnako bol popísaný ako aktivátor u-PA a t-PA expresií aktiváciou plazminogénu a tak aktivátorom proMMPs. Z regulátorov aktivácie MMP (t-PA, uPA, PAI-1) boli pozorované zvýšené koncentrácie t-PA v kultúrach z varikózných žíl, avšak hladiny u-PA boli bez zmeny, rovnako hodnoty celkového PAI-1 (inhibítora t-PA, u-PA) boli zvýšené v kultúrach z varikózných žíl, avšak množstvo aktívnej formy PAI-1 (voľná forma) nebolo zmenené. Z týchto zistení možno predpokladať, že zvýšená produkcia t-PA môže mať funkčné dôsledky na aktiváciu MMP. Rovnako zvýšené hodnoty t-PA a PAI-1 boli zistené u pacientov s venóznou insuficienciou s defektným fibrinolytickým systémom a narušenou remodeláciou matrix. Výsledky práce tak podporujú hypotézu, že v bunkách hladkej svaloviny varikózných žíl môže byť prítomná zvýšená aktivita MMP a táto zvýšená aktivita môže vysvetľovať redukcii syntézy kolagénu III v extracelulárnej matrix týchto buniek. V predošlých prácach, pri kvantifikácii rôznych MMPs v hladkých svalových bunkách varikózných žíl, nenašla Sansilvestri-Morel štatisticky významné rozdiely v koncentráciách proMMP1, proMMP2, MMP1-TIMP1 komplexu, proMMP9, ako ani u ich inhibítorov TIMP1 a TIMP2 [94], ani pre proMMP7, proMMP8 a proMMP13. Tento zistený fakt však nevyklučuje, že hladiny aktívnych MMPs sú tiež nezmenené. Navyše, MMP3 sa zúčastňuje aktivácie iných MMPs a preto účasť MMP3 v degradácii kolagénu III by mohla byť nepriama. Niektoré štúdie demonštrovali zvýšenie produkcie proMMP1, proMMP2 a proMMP3 vo vzorkách varikózných žíl [13, 43, 61]. Príčom iné štúdie popísali zníženú produkciu proMMP2 a zvýšené množstvo TIMP1 v týchto tkanivách. [3, 81]. Tieto výsledky sa zdajú byť vzájomne protirečiace, avšak treba vziať do úvahy nedostatok štandardizácie vzoriek použitých v spomínaných štúdiách s ohľadom na zdroj žíl, lokalizáciu a vek subjektov. Spomínaná štúdia demonštrovala, že v kultúrach hladkých svalových buniek varikózných žíl sú kolagén III a pravdepodobne aj fibronektín degradované mechanizmom zahŕňajúcim MMPs s pravdepodobnou účasťou MMP3. Tieto dysregulácie sú zodpovedné za zníženú akumuláciu kolagénu III bez zmeny jeho mRNA expresie a môžu mať funkčné dôsledky v zníženej elasticite varikózných žíl. Tieto zmeny môžu byť generalizované v spojivovom tkanive rôznych lokalizácií, keďže nerovnováha v syntéze kola-



génu bola pozorovaná aj v kultúrach kožných fibroblastov derivovaných z kože pacientov s varikóznymi žilami [95]. Takže primárny defekt varikózných žíl môže byť vo zvýšenej a abnormálnej remodelácii vedúcej k narušenej distenzibilite žíl a ich zníženej elasticite [97].

V našej práci z roku 1999, porovnávajúcej obsah oboch hlavných zložiek spojivového tkaniva, sme zistili štatisticky signifikantne nižší obsah kolagénu vo varikózných žilách, rozdiel v obsahu elastínu nebol štatisticky významný.

### The Determination of the Collagen and Elastin Amount in the Human Varicose Vein by the Computer Morphometric Method

Z. HAVIAROVÁ<sup>1</sup>, P. WEISMANN<sup>1</sup>, V. ŠTVRTINOVÁ<sup>2</sup>, J. BEŇUŠKA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Comenius University, Sasinkova 2, 813 72 Bratislava

<sup>2</sup> II. Clinic of the Internal Medicine, Faculty of Medicine, Mickiewiczova 13, 813 69 Bratislava

**Abstract.** The results of the works dealing with alterations of the connective tissue in varicose vein wall are not ambiguous, so the exact cause of the vein dilatation has still not been established. We were determining the collagen and elastin amounts in human varicose vein wall in comparison with non-dilated long saphenous vein by the light microscopy and computer morphometric method. We have found the lesser amount of collagen in varicose veins than in non-dilated veins, the amounts of the elastin in both the varicose and non-varicose veins were without the statistical significance.

**Key words:** Collagen — Elastin — Varicosis — Computer morphometry.

#### Introduction

Chronic venous insufficiency of the lower extremities is a world-spread disease especially in its Western part. It affects about 30–40% of the human population (Durdík *et al.* 1997). One of its main signs is varicosis – abnormal dilated, tortuous and elongated veins. The cause of the primary form of varicosis is still the subject of interest of several investigators in the world (Yamada *et al.* 1996). Some hypothesis suppose and some investigators have noted the alterations of the connective tissue in venous wall to be responsible for the onset of the varicosis, but the exact cause of the vein dilatation has still not been established. The alterations of the connective tissue in varicose vein wall – especially its two components: collagen and elastin, have been investigated by several workers and by various methods but they still have not come to the clear conclusion (Psaila *et al.* 1989, de Carvalho *et al.* 1990, Maurel *et al.* 1990, Travers *et al.* 1996, Venturi *et al.* 1996). The aim of this study was to determine the collagen and elastin amounts in varicose vein wall by the computer morphometric method.

Correspondence address: P. Weismann, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Comenius University, Sasinkova 2, 813 72 Bratislava, Slovakia.  
E-mail: weismann@fmed.uniba.sk

### Materials and Methods

6 varicose vein samples were collected from patients undergoing stripping surgery of the long saphenous vein, 6 control samples of the non-dilated long saphenous vein were taken from the pathologic material (with no previous history of varicosis). Samples were immediately fixed in 10% buffered formalin, processed, wax-embedded, sectioned and mounted on the glass microslides. Picroindigocarmin and Weigert (orcein) staining were used for differential staining of collagen and elastin (picroindigocarmin staining collagen deeply green and orcein in Weigert staining elastin black). For measuring 45 sections of each sample were used. Microslides were scanned with (black-white) CCD camera (Sony - Japan) connected with inverted microscope Olympus (Japan) IMT-4 with magnification 25 $\times$ . Scanned microslides were analyzed with the morphometric programme CUE-2 (Galai - Israel) using PC 486 and magneto-optic recording apparatus Maxupix TMT3-1300 (USA).

### Results

At Picroindigocarmin staining we have observed the lesser occurrence of the collagen in a thin tunica intima of the varicose vein wall with relatively a lot of smooth muscle cells. The collagen was mainly concentrated in the subintimal region of the thick tunica media and the minimum of concentration was found in tunica adventitia. In the non-dilated samples of vein we have observed nearly equal arrangement of the collagen in all 3 layers of the vein wall. A little more was found in tunica adventitia with a less of muscle cells whereas in tunica intima and tunica media the fibers of collagen were intertwined with smooth muscle cells longitudinally and circularly arranged (Fig. 1).

At Weigert staining (orcein) we have observed the elastin occurrence in varicose vein samples in all 3 layers of the vein wall, a little more was found in tunica intima and with the rare accumulations in tunica media. In the non-dilated vein samples we observed the minimum of elastin in tunica media, a little more of it arranged in tunica intima and the maximum of it arranged in tunica adventitia (Fig. 2).

But the exact determination of the collagen and elastin contents for each vessel wall layer was not performed. For more exact distinguishing of the followed subjects - the

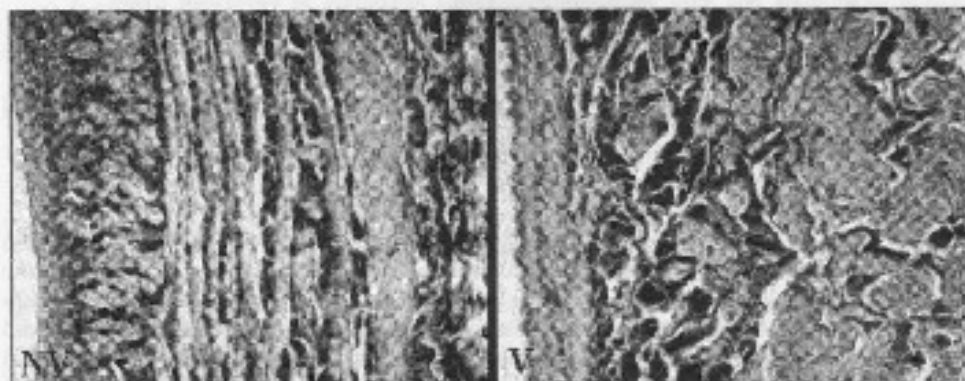


Figure 1. Collagen localisation (black colour) in human non-varicose (NV) and varicose (V) veins.

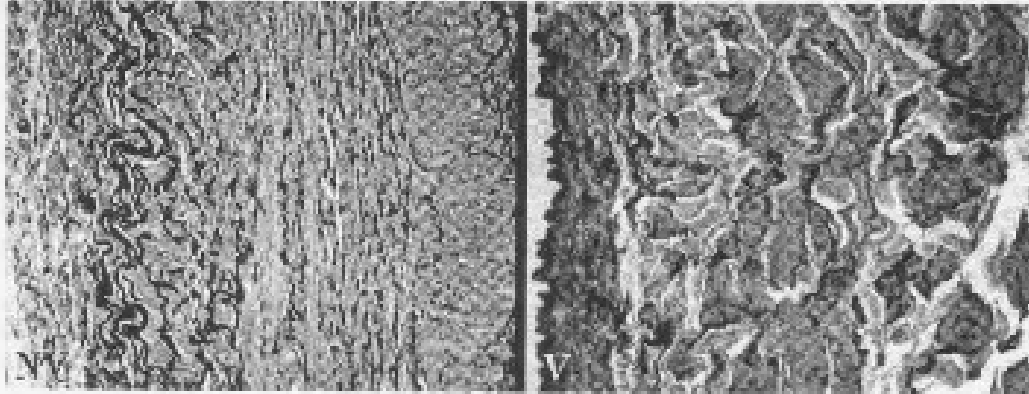


Figure 2. Elastin localisation (black colour) in human non-varicose (NV) and varicose (V) veins.

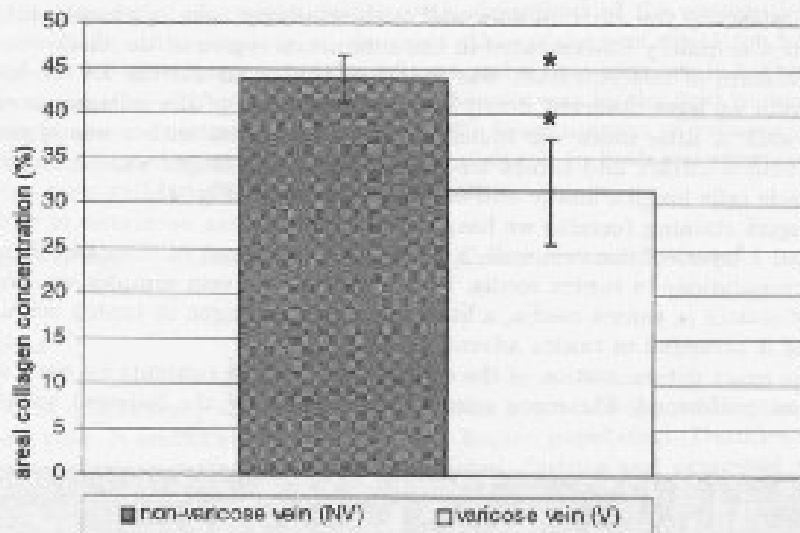


Figure 3. Comparison of the collagen content in varicose and non-varicose veins in the percentage of areal concentration ( $\mu\text{m}^2$ ). \*\*  $P < 0.01$ .

collagen and the elastin, we have equally divided the microscopic section of the vein into the relevant number of the square subareas which have been scanned separately. By the method of thresholding we determined the areal concentration of the collagen and elastin for the each microslide. By comparing the varicose and control samples (Fig. 3) we found that the varicose vein contents percentually lesser amount of the collagen ( $31.41 \pm 5.82$ ) than the control non-dilated vein ( $43.89 \pm 2.64$ ) ( $P < 0.01$ ), the amounts of the elastin in the varicose and the non-varicose veins were nearly the same (with no statistical difference between them).

### Discussion

The results of our work as for the collagen are in good correlation with the general opinion: the varicose vein should contain the lesser amount of the elastin and collagen – responsible for the elasticity, the firmness and the resistance of the vein wall against the hydrostatic pressure, than the non-varicose vein. Our results as for the elastin are not in a good correlation with the general opinion, but Travers et al. (1996) found the same in his histological work (with the stereological analysis). The works of various investigators by using of various methods for the determining the collagen and the elastin amounts in the varicose vein wall have not led to the unambiguous conclusion, so the general opinion remains unconfirmed and unrefuted. For the future we are thinking about the use of the color CCD camera which enables the more precise – coloured distinguishing of the individual components of vein wall. It will be also interesting to visualize each collagen subtype with the immunofluorescent antibodies (Galbavý et al. 1996, Waksman et al. 1997).

### Conclusion

The method of determining the concentration of the collagen and the elastin in the bioptic material processed with the classic histological procedures and analyzed by the computer morphometric method seems to be relatively easy, quick and precise in the case of using the experienced necessary staining technologies.

**Acknowledgements.** Thanks to Mrs. Hamcova Ludmila for the help with the histological processing. This work was realized with the support of the Comenius University Grant No. UK/5790/99.

### References

- De Carvalho J., Apfel M., Pereira C.G., Panico M., Da Silveira P., De Madeiros A. (1990): Histochemical study of elastic system fibers of the walls of normal and pathological saphenous vein. *Phlebologie* **44**, 733–744
- Durdík Š., Matis P., Skultěty J., Vician M., Penjak J. (1997): Clivarine in clinical praxis. *Lek. listy* **26**, 11
- Galbavý Š., Ruzičková M., Surmíková E., Danihel L., Pucubský J., Papinčák J., Holata S., Trnka J. (1996): Reactivity of antibodies against collagen I–IV type and antibodies against chondroitinsulfate in spleen. *Cs. Patol.* **32**, 19–23
- Maurel E., Azema C., Deloly J., Bouissou H. (1990): Collagen of the normal and the varicose human saphenous vein: a biochemical study. *Clin. Chim. Acta.* **193**, 27–38
- Psaila J.V., Meunier J. (1989): Viscoelastic properties and collagen content of the long saphenous vein in normal and varicose veins. *Brit. J. Surg.* **76**, 37–40
- Travers J.P., Brookes G.E., Evans J., Baker D.M., Kent C., Makin G.S., Mayhew T.M. (1996): Assessment of wall structure and composition of varicose vein with reference to collagen, elastin and smooth muscle content. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **11**, 230–237
- Venturi M., Bonavina L., Annoni P., Colombo L., Butera C., Peracchia A., Mussini E. (1996): Biochemical assay of collagen and elastin in the normal and varicose vein wall. *J. Surg. Res.* **60**, 245–248
- Yamada T., Tomita Sh., Mori M., Sasatomi E., Suenaga E., Itoh T. (1996): Increased mast cell infiltration in varicose vein of the lower limbs: A possible role in the development of varices. *Surgery* **119**, 494–497
- Waksman Y., Mashiah A., Hod I., Rose S.S., Friedman A. (1997): Collagen subtype pattern in normal and varicose saphenous veins in humans. *Isr. J. Med. Sci.* **33**, 81–86

#### 2. 4. 1. 1. 2. 2. 1. SUBTYPIZÁCIA KOLAGÉNOV V STENE VARIKÓZNYCH ŽÍL

Ako už bolo spomenuté vyššie, nejednoznačnosť výsledkov prác, porovnávajúcich obsah kolagénu v stene varikózných a nevarikózných (zdravých) žíl viedla autorov k sledovaniu bližšej špecifikácie distribúcie jednotlivých subtypov kolagénu v žilovej stene za normálnych aj patologických okolností.

##### **Klasifikácia kolagénov**

Doposiaľ bolo popísaných 19 typov kolagénov a sú snahy o charakterizáciu ďalších typov. Všetky typy kolagénov majú trojitú špirálovitú doménu, ale v rozličných proporciách. Štruktúra a funkcia molekuly extracelulárnej matrix teda závisí od počtu a veľkosti týchto rozličných špirálovitých domén, ale aj od veľkosti globulárnych domén, ktoré ich oddeľujú. Kolagény môžu byť rozdelené na 2 podskupiny: fibrilárne a nefibrilárne kolagény.

**Fibrilárne kolagény** sú kolagény vytvárajúce pruhované fibrily. Sú zložené z dlhej trojitej závitnice a táto lineárna štruktúra umožňuje laterálnu agregáciu molekúl a vytvorenie fibríl. V tejto triede sú zastúpené kvantitatívne početnejšie kolagény typu I a typu II, ktoré sú esenciálnymi komponentami kože, kostí, šliach a hyalínnej chrupavky ale aj kvantitatívne menej početnejšie, napr. typ III, V, XI.

typ	reťazce	distribúcia v tkanivách
I	alfa1(I), alfa2(I)	koža, kosť, šľacha, dentín....
III	alfa1(III)	koža, cievy
V	alfa1(V), alfa2(V), alfa3(V)	kultúry pľúcnych buniek škrečka, fetálne membrány, koža, kosť, placenta, synoviálna membrána
II	alfa1(II)	hyalínna chrupka, sklovec
XI	alfa1(XI), alfa2(XI), alfa3(XI)	hyalínna chrupka, sklovec

Jednotlivé typy kolagénov tejto skupiny a ich tkanivová distribúcia je prehľadne zobrazená vo vyššie uvedenej tabuľke [Tab.6] spracovanej podľa autorov Lethiasa a kol. (1996) [67].

**Nefibrilárne kolagény** majú nodulárnu štruktúru, t.j. molekula je zložená z trojitých špirálovitých domén odelených globulárnymi doménami. Vlastnosti trojitých závitníc v spojení s vlastnosťami globulárnych domén umožňujú vytváranie originálnych a rozmanitých štruktúr. Non-fibrilárne kolagény a ich výskyt sú prehľadne znázornené v tabuľke [Tab.7], spracované podľa Lethiasa a kol. (1996) [67].

V stene žíl bola dosiaľ dokumentovaná prítomnosť týchto subtypov kolagénu: I, III, IV, V, VI, XII, XIV. Práce porovnávajúce obsah a distribúciu jednotlivých subtypov kolagénu v stenách varikózných a "zdravých" žíl sú pre lepšiu prehľadnosť znázornené v tabuľke [Tab.8].

<b>Tab. 7. Nefibrilárne kolagény a ich výskyt v rôznych tkanivách.</b>		
<b>typ</b>	<b>reťazce</b>	<b>distribúcia v tkanivách</b>
IV	alfa1(IV), alfa2(IV), alfa3(IV), alfa4(IV), alfa5(IV), alfa6(IV)	bazálne membrány, bazálne membrány glomerulov
VI	alfa1(VI), alfa2(VI), alfa3(VI)	cievy, koža, medzistavcová platnička
VII	alfa1(VII)	dermoepidermálna junkcia
VIII	alfa1(VIII), alfa2(VIII)	Descementova membrána rohovky, endoteliálne bunky
IX	alfa1(IX), alfa2(IX), alfa3(IX)	hyalínna chrupka, sklovec
X	alfa1(X)	rastová platnička
XII	alfa1(XII)	šľacha, koža, periodontálne tkanivo
XIII	alfa1(XIII)	endoteliálne bunky
XIV	alfa1(XIV)	koža, šľacha
XV	alfa1(XV)	fibroblasty, bunky hl. svalstva
XVI	alfa1(XVI)	placenta, fibroblasty, bunky hl. svalov
XVII	alfa1(XVII)	antigén bulózneho pemfigoidu (BP180)
XVIII	alfa1(XVIII)	pečeň, obličky, placenta
XIX	alfa1(XIX)	?

Predpokladá sa, že kolagén I udeľuje pevnosť v ťahu, kolagén III je pravdepodobne zapojený do rozťažnosti a pružnosti cievnej steny. Kolagén IV (nefibrilárny kolagén, vyskytujúci sa v bazálnych membránach) sa vyskytoval prevažne subendoteliálne- v tzv. subendoteliálnom prázdnom priestore pre kolagén IV, vo varikózných žilách sa nachádzal vo zvýšenom množstve tiež prevažne subendoteliálne, niekedy s prídavným zhrubnutím endotelu a stratou cirkulárneho usporiadania vlákien, s vývojom uzlov a plakov. Kolagén V (fibrilárny typ kolagénu) s dokumentovaným výskytom v cievnych stenách sa pri biochemickej extrakcii zvyčajne extrahuje spoločne s kolagénom III; predpokladá sa jeho úloha pri udržovaní štrukturálnej integrity a elasticity cievnej steny. Kolagén VI (nefibrilárny kolagén s dokumentovaným výskytom v cievach) v zdravých žilách sa vyskytoval v extracelulárnej matrix okolo cirkulárnej vrstvy hladkej svaloviny a ako tenká membrána subendoteliálne, s menej intenzívnym výskytom na hranici tunica media a tunica adventitia. Vo varikózných žilách sa na základe práce Lethiasa (1996) dokázal taktiež v subendoteliálnej lokalizácii, avšak v reduko-

vanej miere a prerušovane aj v tunica media. Kolagén XII a kolagén IV sú taktiež nefibrilárne kolagény s dokumentovanou prítomnosťou v cievnych stenách avšak v odlišných lokalizáciách napriek podobnej molekulovej štruktúre. Kolagén XII bol prítomný v zhlukoch v subendotelii a zasahoval hlboko do tunica intima, pričom rozdiely v lokalizácii medzi zdravými a varikóznymi žilami boli malé. Kolagén IV sa nachádzal výlučne v tunica media, na úrovni cirkulárnej vrstvy hladkej svaloviny; značenie protilátkami vytváralo spojité obkruženie v cievnej stene zdravých žíl, vo varikózných žilách boli pozorované prerušenia [74].

<b>Tab. 8. Práce porovnávajúce distribúciu jednotlivých subtypov kolagénu v žilovej stene varikózných a "zdravých" žíl.</b>					
rok	prvý autor	metodika	cieľ porovnávania	výsledky	
				varixy	zdravé žily
1990	Maurel E. a kol.	biochemická	kolagén I, kolagén III, kolagén IV, kolagén V	viac viac viac* viac	menej menej menej menej
1994	Chello M. a kol.	biochemická	kolagén I., kolagén III	viac viac	menej menej
1996	Lethias C. a kol.	imunofluorescenčná	kolagén VI, kolagén XII, kolagén IV, laminín	menej menej menej menej	viac viac viac viac
1997	Waksman Y. a kol.	biochemická	kolagén I., kolagén III+V, voda, pomer I/III+V	viac menej viac viac	menej viac menej menej
1998	Porto L. C. a kol.	imunohistochemická	kolagén IV., laminín, ASMA <sup>°</sup>	rovnako rovnako rovnako	rovnako rovnako rovnako
1999	Kirsch D. a kol.	imunohistochemická	kolagén IV., fibronektín, laminín, tenascín, undulín	viac viac viac	menej menej menej
* v nedilatovaných úsekoch varikózných žíl					
° alfa aktín hladkých svalových buniek					

Ďalšie proteíny extracelulárnej matrix sú aj laminín, fibronektín, tenascín, undulín. Za biologickú funkciu laminínu (syntetizovaného endoteliálnymi bunkami a bunkami hladkej svaloviny) sa považuje viazanie, diferenciácia, migrácia a proliferácia buniek. Laminín sa podobne ako kolagén IV považuje za základnú komponentu bazálnych membrán. Jeho označením špecifickými protilátkami je možné lokalizovať bazálnu membránu v tkanivových vzor-

kách. Výskyt laminínu v zdravých žilách bol vyšší- s nižším výskytom v tunica intima než v tunica media. Vo varikózných žilách sa popisuje jeho výskyt nejednoznačne- raz redukovaný, inokedy zvýšený- avšak s nepravidelným usporiadaním.

Za biologickú úlohu fibronektínu sa považuje viazanie, diferenciácia a proliferácia buniek, migrácia buniek vo vývojovej fáze a význam pri hojení rán. Pri imunohistochemickom značení sa v zdravých žilách hojne vyskytoval v tzv. subendoteliálnom prázdnom priestore, v tunica media s cirkulárne orientovaným vláknitým usporiadaním a s malým obsahom aj v tunica adventitia. Vo varikózných žilách sa našiel jeho zvýšený výskyt hlavne v tunica intima a tunica media, s difúzne nepravidelným usporiadaním od jemných vláknitých zhlukov až po úplnú deštrukciu cievnej steny, niekedy aj s prítomnosťou plakov, avšak bez patologickej alterácie tunica adventitia.

Tenascínu sa pripisuje antiadhezívna funkcia a význam pri diferenciácii, proliferácii a migrácii buniek. Zvýšená expresia sa pozorovala v stróme rozličných tumorov. Jeho výskyt v cievnej stene zdravých žíl bol podobný výskytu laminínu. Vo varikózných žilových stenách sa popísal zvýšený výskyt a akumulácia tenascínu v tunica intima a tunica media, v prípadoch silnejšieho poškodenia steny cievy s nepravidelným usporiadaním vlákien a prítomnosťou plakov v tunica media.

Undulín je pravdepodobne dôležitý pre organizáciu kolagénových vlákien. V zdravých žilách bola dokázaná jeho zvýšená expresia v oblasti tunica adventitia v porovnaní s ostatnými proteínmi extracelulárnej matrix a s vlnitou orientáciou vlákien. Vo varikózných žilách bola tiež pozorovaná jeho zvýšená expresia v tunica intima a tunica media s nepravidelným usporiadaním vlákien, podobne ako u tenascínu a laminínu.

Extracelulárna matrix hrá aktívnu úlohu v správaní sa buniek, s ktorými je v kontakte. Možno zhrnúť, že expresia a organizácia extracelulárnej matrix predstavuje dynamický proces medzi bunkovým systémom a extracelulárnymi makromolekulami. Nájdené a opísané zmeny v štruktúre extracelulárnej matrix sa prevažne týkali subintimálneho priestoru, tunica intima a tunica media, pravdepodobne pre priamy kontakt endotelu a tunica intima s krvným prúdom. Preto bola vyslovená ďalšia hypotéza, podľa ktorej zmeny cievnej steny prebiehajú v určitom chronologickom poradí: iníciaľna akumulácia vlákien v tzv. subendoteliálnom prázdnom priestore, následná zvýšená modifikácia tunica intima pokračujúca ďalším postihnutím tunica media [67, 74, 86].



V našej práci sledujúcej pomer subtypov kolagénu I a III: vo varikózných žilách, sme zistili štatisticky významné znížený pomer kolagén I/III v porovnaní so zdravými žilami.

MORPHOLOGICAL STUDY

## Comparison of collagen subtype I and III presence in varicose and non-varicose vein walls

Haviarova Z<sup>1,6</sup>, Janega P<sup>2</sup>, Durdik S<sup>4</sup>, Kovac P<sup>3</sup>, Mraz P<sup>1</sup>, Stvrtinova V<sup>5</sup>

*Institute of Anatomy, Faculty of Medicine, Comenius University, Bratislava, Slovakia.  
zora.haviarova@fmed.uniba.sk*

**Abstract:** *Study objectives:* The connective tissue alterations in varicose vein wall are supposed to be one of the main causes of primary varicose vein (main sign of human lower limbs chronic venous insufficiency).

*Methods:* 5 varicose vein samples from 5 patients undergoing stripping surgery of long saphenous vein were compared with 5 control samples of healthy (non-dilated) long saphenous veins from necrotic material (with no history of varicosis). They were fixed in a Baker solution, processed by use of light microscopic method, cut to ultra-thin sections (4–5 µm) and stained with PicroSirius Red for collagen. Sections were scanned with light microscope (Leica, Germany) and camera Canon S50 (Germany) and analysed by morphometric programme Image J v.1.38g (National Institute of Health, USA).

*Results:* In the group of healthy (non-dilated) veins the mean collagen I/III ratio value was 31.40 and in the group of varicose veins the mean collagen I/III ratio was 12.35; the difference is statistically significant: healthy veins contain significantly more of collagen subtype I and varicose veins contain significantly more of collagen subtype III in their walls.

*Conclusion:* The statistically significant difference in the collagen I/III ratio between the groups of healthy (non-dilated) and varicose (dilated) vein walls is worthy of further following (Tab. 2, Fig. 7, Ref. 12). Full Text (Free, PDF) [www.bmj.sk](http://www.bmj.sk).

**Key words:** varicose veins, collagen subtype I and III, collagen subtype ratio I/III.

Chronic venous disease is a relatively frequent vascular disease of the lower limbs affecting mainly the persons of productive age. After statistical data from literature the incidence of this disease in the developed countries of Europe and USA is about 40–60 % in females and 15–30 % in males (1). Beside the postthrombotic syndrome and crural ulcer, varicose veins represent only one of the symptoms of the chronic venous disease. It is characterized by abnormal dilatation, tortuous course and elongation of veins (2). According to its etiology we distinguish its primary form (cause unknown) and secondary form (occurring usually as a consequence of the surviving deep lower limb phlebothrombosis). As the exact cause of the primary form has not been yet revealed, the therapy of this form still resides mainly in reducing the symptoms. The cause of the primary form of varicosis remains to be the subject of interest of several investigators in the world. There is etiopathogenetic association between a) weakness of venous wall associated with alterations in the connective tissue and smooth muscle cells (3, 4, 5), b) altered

<sup>1</sup>Institute of Anatomy, <sup>2</sup>Institute of Pathology, <sup>3</sup>Institute of Forensic Medicine, <sup>4</sup>1st Department of Surgery, <sup>5</sup>2nd Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Comenius University, and <sup>6</sup>Department of Anatomy, Slovak Medical University, Bratislava, Slovakia

**Address for correspondence:** Haviarova Z, MD, PhD, Institute of Anatomy, Faculty of Medicine, Comenius University, Sasinkova 2, SK-813 72 Bratislava, Slovakia  
Phone: +421.2.59357359

Tab. 1. Fibrillar collagens and their distribution in various tissues.

Type	Chains	Distribution in tissues
I	alfa1(I), alfa2(I)	Skin, bone, tendon, dentin
III	alfa1(III)	skin, vessels
V	alfa1(V), alfa2(V), alfa3(V)	Hamster lung cells culture, fetal Membranes, skin, bone, placenta, synovial membranes
II	alfa1(II)	hyaline cartilage, vitreous humor
XI	alfa1(XI), alfa2(XI), alfa3(XI)	Hyaline cartilage

function of venous endothelium, c) venous valve damage, d) alterations in microcirculation and venous wall nourishment (6, 7).

Some hypotheses in accord with some investigators suggest the alterations in the connective tissue of venous wall to be responsible for the onset of varicosis, yet the exact cause of venous dilatation has not been established. The alterations in the connective tissue in varicose vein wall – especially its two components: collagen and elastin, have been investigated by several workers and by various methods but they still have not come to a clear conclusion (3, 5, 8, 9, 10, 11, 12).

The extracellular matrix of connective tissues is composed of molecules belonging to four protein groups: collagens, proteoglycans, glycoproteins and elastin. Collagens are structural proteins with one or several triple-helix domains. This struc-

ture results from the association of three polypeptidic chains presenting characteristic amino acid sequences. Every chain is built up at the level of triple-helix domains by the repetition of triplets (Gly-Xaa-Yaa), where X and Y are very often proline and hydroxyproline respectively. Because of the presence of cyclo amino acids, the chains take a left-handed helix structure of type poly-proline II. The association with two other chains leads to the formation of a right-handed super helix. Till nowadays 19 types of collagens have been described and new types are currently under characterization. All of these collagens have triple-helix domains, but in variable proportions. The structure and the function of the molecule in the extracellular matrix depend thus on the number, the size of these different helicoidal domains but also on the size of globular domains that separate them. Collagens can be divided into two sub-families: fibrillar and non-fibrillar collagens (8). Their compositions and tissue localizations are displayed in Tab I and Tab II (Lethias et al, 1996).

So far it has been documented that collagen in venous wall is present in subtypes I, III, IV, V, VI, XII, and XIV. It is supposed that collagen I provides traction firmness and collagen III is probably responsible for dilatibility and elasticity of the vascular wall (3, 9, 12). The aim of our work was to compare the presence of I and III collagen subtypes in the walls of human varicose and non-varicose (healthy, non-dilated) veins of lower limbs, while in both groups we compared the mutual ratios of these two collagen subtypes (I/III ratio).

Tab. 2. Non fibrillar collagens and their distribution in various tissues

Type	Chains	Distribution in tissues
IV	alfa1(IV),alfa2(IV) alfa3(IV),alfa4(IV),alfa5(IV) alfa6(IV)	basement membranes, glomerular basement membranes
VI	alfa1(VI),alfa2(VI),alfa1(VI)	vessels, skin, intervertebral discs
VII	alfa1(VII)	dermoepidermal junction
VIII	alfa1(VIII),alfa2(VIII)	Descemet's membrane, endothelial cells
IX	alfa1(IX),alfa2(IX),alfa3(IX)	hyaline cartilage, vitreous humor
X	alfa1(X)	growth plate
XII	alfa1(XII)	tendon, skin, periodontal ligaments
XIII	alfa1(XIII)	endothelial cells
XIV	alfa1(XIV)	skin, tendon
XV	alfa1(XV)	fibroblasts, smooth muscle cells
XVI	alfa1(XVI)	placenta, fibroblasts, smooth muscle cells
XVII	alfa1(XVII)	bullous pemphigoid antigen (BP180)
XVIII	alfa1(XVIII)	liver, kidney, placenta
XIX	alfa1(XIX)	?

collagen I/III ratio

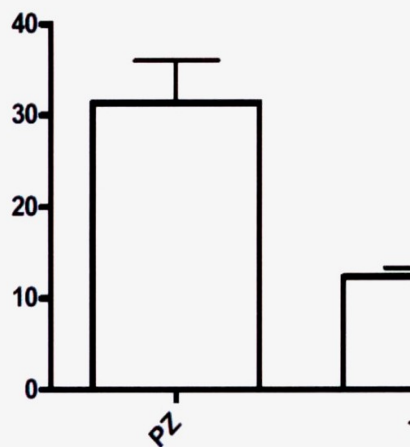


Table Analyzed	Data 1
Column A	PZ
vs	vs
Column B	V
Unpaired t test	
P value	0.0010
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=3.351 df=142
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column A	31.40 ± 4.615 N=86
Mean ± SEM of column B	12.35 ± 0.9983 N=58
Difference between means	19.05 ± 5.886
95% confidence interval	7.908 to 30.20
R squared	0.07328
F test to compare variances	
F,DFn, Dfd	31.66, 85, 57
P value	P<0.0001
P value summary	***
Are variances significantly different?	Yes

	PZ	V
Number of values	86	58
25% Percentile	9.012	6.919
Median	10.61	10.96
75% Percentile	48.94	14.21
Mean	31.40	12.35
Std. Deviation	42.80	7.803
Std. Error	4.615	0.9983
Lower 95% CI of mean	22.22	10.35
Upper 95% CI of mean	40.57	14.34
Sum	2700	716.1

Fig. 1. Graph and table of results for the compared collagen I/III ratio of both sample groups.

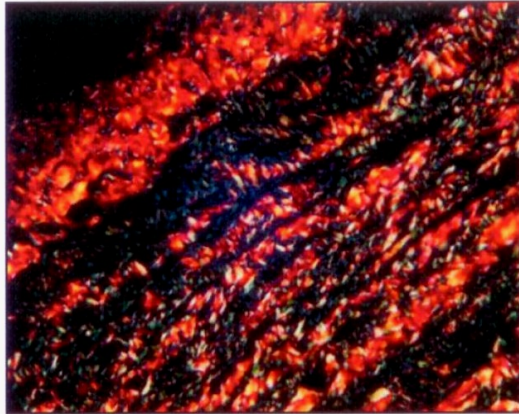


Fig. 2. Healthy (non-dilated) venous subarea, summary digital image.



Fig. 4. Healthy (non-dilated) venous subarea, polarized light-digital subtraction, collagen 3 (green).

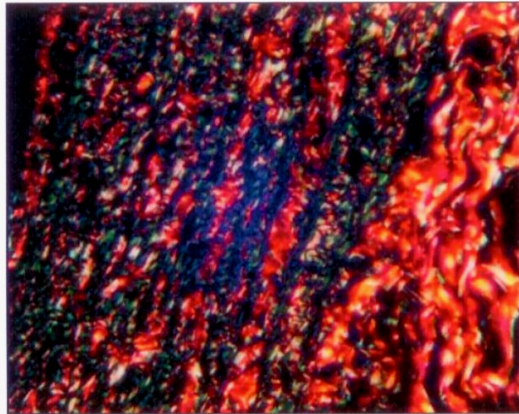


Fig. 3. Varicose (dilated) venous subarea, summary digital image.

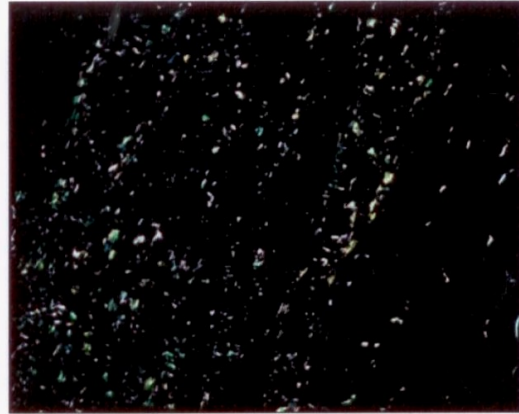


Fig. 5. Varicose (dilated) venous subarea, polarized light-digital subtraction, collagen 3 (green).

#### Material and methods

The followed group was composed of 5 varicose vein samples taken from the patients undergoing the stripping surgery of the long saphenous vein (5 males, age range 26–50 yrs, average age 40.8 yrs, median 43 yrs). They were compared with the control group composed of 5 samples of healthy (non-dilated) long saphenous vein taken from necroptic material (with no history of varicosis, 1 female, 4 males, age range 20–35 yrs, average age 25.6 yrs, median 24 yrs). The samples were fixed in Baker solution (24–48 hours) and further processed by the light microscopic method into paraffine tissue blocks, then cut to ultra-thin sections (4–5  $\mu\text{m}$ ), stained with PicroSirius Red for collagen presence. The sections were scanned in polarized light of the light microscope (Leica, Germany) and camera Canon S50 (Germany). In the polarized light the different collagen subtypes of fibrils show different colour according to their thickness: collagen I red to yellow, collagen III green. Each colour density was morpho-

metrically analysed with the morphometric software Image J v.1.38g (National Institute of Health, USA) and the results were processed with Excel (Microsoft, USA) (Fig. 1).

#### Results

In the group of healthy (non-dilated) human superficial lower limb veins the mean collagen I/III ratio value was 31.40 and in the group of varicose veins the mean collagen I/III ratio was 12.35, while  $p < 0.0001$ . The difference is statistically significant: healthy veins contain significantly more of collagen I subtype and varicose veins contain significantly more of collagen III subtype in their walls. Both group results and more statistical details are shown in Figure 1.

#### Discussion

In the group of healthy (non-dilated) human superficial veins

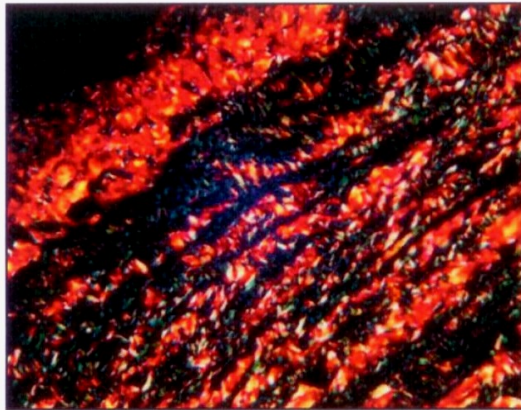


Fig. 6. Healthy (non-dilated) venous subarea, polarized light-digital subtraction, collagen I (red-yellow).

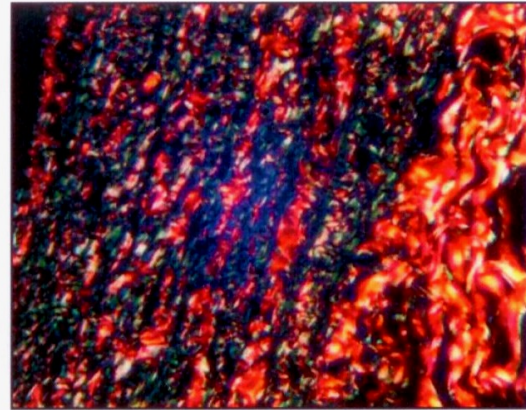


Fig. 7. Varicose (dilated) venous subarea, polarized light-digital subtraction, collagen I (red-yellow).

of the lower limbs the collagen I/III ratio was significantly higher than in the group of varicose (dilated) human superficial veins of lower limbs. This means that in the group of non-dilated veins prevailed the presence of collagen I and in the group of dilated (varicose) veins prevailed the presence of collagen 3. Distribution of both collagen subtypes was approximately similar. This means that we did not observe any noticeable differences as to the presence of collagen subtypes among individual vascular layers.

#### Conclusion

The results of our preliminary study helped to reveal the fact that varicose venous walls really show different collagen subtype patterns compared to the healthy venous wall as well as that the collagen subtype pattern (and contents) are worthy of further following. It will be also worthy of repeating this study in more numerous sample groups.

#### References

- Štvrtinová V, Kolesár J, Wimmer G. Prevalence of varicose veins of the lower limbs in the women working at the department store. *Inter Angio* 10; 1991: 2—5.
- Bergan JJ. Development of primary varicose veins. *Phlebolympology* 1997; 18: 3—8.
- Chello M, Mastroberto P, Zofrea S, Marchese AR. Analysis of collagen and elastin content in primary varicose veins. *J Vasc Surg* 1994; 20 (3): 490.
- Kural T Jr, Maštálková K, Tomanová V, Tonar Z, Kočová J, Horáková MA, Krížková V. Quantitative assesment of smooth muscle in small and great saphenous vein. *Morphology* 2007 (congress of the

Slovak Anatomical Society with an international participation), Bratislava, Slovak republic, Book of Abstracts pp. 60.

- Kirsch D, Schreiber J, Dienes HP, Bottger T, Junginger T. Alterations of the extracellular matrix of venous walls in varicose veins. *Vasa* 1999; 28 (2): 95—99.
- Kachlík D, Báča V, Fára P, Lametschwandtner A, Minnich B, Sosna B, Stingl J, Straka Z, Šetina M. Cévní zásobení stěny normální a varikózní vena saphena magna. *Prakt Flebol* 2006; 15 (4): 90—94.
- Kachlík D, Stingl J, Fára P, Lametschwandtner A, Minich B, Straka Z, Šetina M, Sosna B. Srovnání vasa vasorum normální a varikózne změněné lidské vena saphena magna. S. 189—193. In: Polák Š, Pospíšilová V, Varga I (Eds). *Morfologie v současnosti*. Bratislava: Univerzita Komenského, 2007, 508s.
- Lethias, C, Labourdette, L, Willems, R, Comte, J, Herbage, D. Composition and organisation of the extracellular matrix of vein walls: Collagen networks. *Inter Angio* 1996; 15 (2): 104—113.
- Maurel E et al. Collagen of the normal and the varicose human saphenous vein: a biochemical study. *Clin Chim Acta* 1990; 193 (1—2): 27—37.
- Mazzucato M, Spesosotto P, Pradella P, Cozzi MR, De Apollonia L, Perris R, De Marco L, Colombatti A. Involvement of subendothelial collagen type VI in venular thrombotic mechanisms.
- Porto LC, Ferreira MA, Costa AM, da Silveira PR. Immunolabeling of type IV collagen, laminin and alpha-smooth-muscle-actin cells in the intima of normal and varicose saphenous veins. *Angiology* 1998; 49 (5): 391—398.
- Waksmann Y, Mashiah A, Hod I. Collagen subtype pattern in normal and varicose saphenous veins in humans. *Int Med* 1997; 19 (6): 217.

Received January 18, 2008.  
Accepted February 4, 2008.

#### **2. 4. 1. 1. 2. 3. ZMENY V ŠTRUKTÚRE OSTATNÝCH PROTEÍNOV A SÚČASTÍ EXTRACELULÁRNEJ MATRIX.**

Predpokladá sa, že dysfunkcia bunkového cyklu a deregulovaný obrat buniek žilovej steny prispievajú k patologickej remodelácii primárne varikóznej žilovej steny. Stupeň bunečnosti žilovej steny je podmienený rovnováhou medzi migráciou a proliferáciou buniek, v závislosti od rýchlosti ich úniku a apoptózy. Jacob T. (2005) a spolupracovníci pozorovali štatisticky významné rozdiely v expresii a subcelulárnej lokalizácii cyklínu D, regulačného proteínu bunkového cyklu. V ďalšej svojej práci poukázali na zvýšenú fokálnu aj pantropickú expresiu transformujúceho rastového faktora  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ) vo všetkých vrstvách varikóznej žilovej steny, jeho zvýšenú génovú transkripciu, ako aj zvýšenú fokálnu expresiu indukovateľnej NO-syntázy (iNOS) v primárne varikózných žilách. Prítomnosť TGF- $\beta 1$  a iNOS pozitívnych buniek bola vysoká nielen vo varikóznom tkanive v porovnaní s tkanivom kontrolného súboru, ale tieto molekuly boli zvýšene exprimované v tortuózných úsekoch oproti netortuóznym segmentom varikózných žíl [50]. Expresia TGF- $\beta 1$  a iNOS bola tiež pozorovaná v bunkách pozitívnych na  $\alpha$ -aktín hladkej svaloviny a CD68 [56].

TGF- $\beta 1$ , izoforma fibrogénneho cytokínu TGF- $\beta$ , je multifunkčný polypeptid, regulujúci rôzne bunkové funkcie ako proliferáciu, migráciu, diferenciáciu a produkciu extracelulárnej matrix (ECM). TGF- $\beta 1$  môže účinkovať aj ako mohutný antiproliferatívny a apoptotický faktor pre proliferujúce cievne bunky. Bola dokázaná jeho stimulácia expresie  $\alpha$ -smooth muscle aktínu (ASMA) vo fibroblastoch metódami in vivo aj in vitro a tiež podporuje tvorbu štrukturálnych elementov dôležitých pre vytvorenie kontraktilnej sily. Pri cievnej chorobe je známe, že TGF- $\beta 1$  má dualistickú úlohu a účinkuje ako bi-funkčný regulátor proliferácie, migrácie a fenotypu buniek hladkej svaloviny ciev. Preto predpokladajú, že táto pleiotropná molekula môže regulovať aj remodeláciu pozorovanú pri vývoji varikozity.

Oxid dusnatý (NO), mohutný intercelulárny posol (messenger), nielen že reguluje cievny tonus, ale má tiež rôzne patofyziologické funkcie, ako inhibícia agregácie/adhézie krvných doštičiek, mediácia zápalovej kaskády, neurotransmisia, cytotoxicita a iné. Navyše, NO je tiež pleiotropným činiteľom v sprostredkovaní a výkone apoptotickej kaskády. Taktiež účinkuje vo vnútri endotelu, v ktorom je produkovaný hlavne endoteliálnou NO syntázou (eNOS) alebo preniká cez endoteliálnu vrstvu postihujúc hladké svalové bunky, ktoré tiež môžu vytvárať NO prostredníctvom indukovateľnej NO syntázy (iNOS). Pokým eNOS a nNOS sú kalcium-dependentné a vytvárajú malé množstvá NO po stimulácii, iNOS je cytokínom-

indukovateľným, kalcium- independentným enzýmom s vysokým výdajom, ktorý môže byť vytváraný takmer každou jadrovou bunkou po vhodnom zápalovom stimule [50].

V našej práci, kde sme porovnávali expresiu iNOS, sme zistili signifikantne nižšiu expresiu iNOS v stene varikózných žíl v porovnaní so stenou zdravých žíl.

## Expresia indukívnej izoformy syntázy oxidu dusnatého v stene varikózných žíl

Zora Haviarová<sup>1</sup>, Andrea Janegová<sup>2</sup>, Pavel Janega<sup>2</sup>, Štefan Durdík<sup>4</sup>, Peter Kováč<sup>3</sup>, Viera Štvrtinová<sup>5</sup>, Peter Mráz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Anatomický ústav, <sup>2</sup>Ústav patologickej anatómie, <sup>3</sup>Ústav súdneho lekárstva, Lekárska fakulta Univerzity Komenského, Sasinkova 2-4, 813 72 Bratislava, SR,

<sup>4</sup>I. chirurgická klinika, <sup>5</sup>II. Interná klinika Lekárskej fakulty Univerzity Komenského a Fakultnej nemocnice, Mickiewiczova 13, 813 69 Bratislava, SR

*Pravdepodobnou príčinou primárnej formy varikozity je slabosť žilovej steny. V literatúre nachádzame kontroverzné údaje o jej štrukturálnych zmenách. Vazodilatačný efekt NO je spôsobený relaxáciou hladkej svaloviny, je syntetizovaný enzýmom NOS. V ľudskom tele sú známe 3 izoformy NOS: iNOS (induktívna NOS) je exprimovaná rozličnými bunkami prevažne na zápalové podnety, pravdepodobne má aj účasť v patofyziológii autoimunitných chorôb.*

**Materiál a metódy.** Vzorky varikózných a zdravých žíl spracované metódou svetelnej mikroskopie, a štandardnou imunohistochemickou metódou s použitím králičích polyklonálnych protilátok proti indukívnej NOS izoforme. Expresia protilátok bola vyhodnotená semikvantitatívne a preverená morfometricky 2D obrazovou analýzou. Celková plocha pozitivity danej NOsyntázy bola izolovaná digitálnou farebnou substrakciou a farebnou analýzou bol určený jej podiel voči celkovej ploche tunica media. Na štatistickú analýzu bol použitý nepárový t-test.

**Výsledky.** Histomorfologické a semikvantitatívne vyhodnotenie iNOS izoformy poukázalo na diskontinuálnu a signifikantne nižšiu expresiu iNOS izoformy v tunica media varikózných žíl oproti kontrolnej skupine.

**Záver.** Naše výsledky poukazujú na možnú nižšiu hladinu NO vo varikózných žilách, dedukujúc že dilatácia varikózných žíl je dôsledkom iného patofyziologického mechanizmu. Výsledky našej práce protirečia výsledkom publikovaných prác podobného zamerania.

**Kľúčové slová:** varikózne žily, oxid dusnatý (NO), iNOS

**Key words:** varicose veins, nitric oxide (NO), iNOS

### Úvod

Chronická vėnová choroba dolných končatín (CHVCH DK) je relatívne častým cievnym ochorením žíl dolných končatín postihujúcim osoby prevažne v produktívnom veku. Podľa štatistických údajov z literatúry vo vyspelých krajinách Európy a USA sa toto chronické ochorenie žíl vyskytuje u 40-60 % žien a 15 - 30 % mužov [8, 9]. Varikózne (krčové) žily sú popri posttrombotickom syndróme a vrede predkolenia len jedným zo symptómov CHVCH DK. Sú charakterizované abnormálnym rozšírením, tortuóznym vinutím a elongáciou vlastnej dĺžky. Varixy môžu byť primárne (ich príčina nie je známa) alebo sekundárne, vznikajúce najčastejšie ako dôsledok prekonanej hlbkej flebotrombózy. Jednoznačná príčina primárnej formy spomínaného ochorenia stále nie je úplne zrejmá a preto aj jej liečba je vo veľkej miere len symptomatická [2, 3]. Do etiopatogenetickej súvislosti sa dáva hlavne slabosť žilovej steny spojená s poruchou spojivového tkaniva (kolagénu a elastínu) a hladkého svalstva [11, 12], ale aj porucha funkcie žilového endotelu, poškodenie žilových chlopní a poruchy mikrocirkulácie [7, 9, 10]. Doposiaľ zistené histologické zmeny cievnej steny zahŕňajú flebosklerózu, zhrubnutie intimy, fibrózu média, úbytok hladkej svaloviny a formovanie trombov. Do príčinnej

súvislosti sa dávajú aj vazoaktívne látky: prostacyklín, tromboxan A2, noradrenalín [7].

Oxid dusnatý (NO) je dôležitá medzibunková signálna molekula, významný vazodilatačný činiteľ vďaka schopnosti relaxácie hladkej svaloviny ciev. NO má v ľudskom organizme mnoho vazoprotektívnych funkcií: inhibuje adhérenciu a agregáciu krvných doštičiek, redukuje adhérenciu leukocytov k endotelu, potláča proliferáciu hladkej svaloviny ciev [13]. Zníženie jeho produkcie alebo účinku predisponuje krvné cievy k poškodeniu. V ľudskom organizme je syntetizovaný syntázou oxidu dusnatého (NOS), enzýmom ktorý sa v ľudskom tele vyskytuje v 3 izoformách: endotelálna NOS (eNOS), neuronálna NOS (nNOS) a indukívna NOS (iNOS). Boli pomenované podľa tkaniva, z ktorého boli prvýkrát separované a charakterizované a ich gény sa nachádzajú na chromozómoch 7, 12 a 17. Z biochemického hľadiska sú syntázy oxidu dusnatého skupinou komplexných enzýmov, katalyzujúcich oxidáciu L-arginínu na oxid dusnatý (NO) a L-citrulín [12]. Vaskuloprotektívny účinok jednotlivých izoform v ľudskom organizme ešte nie je dostatočne objasnený [14]. Howlader a Smith kolorimetrickou metódou pozorovali zvýšené hodnoty celkového NO u pacientov so závažným stupňom venózneho postihnutia (štádium C4- 5) [5].

Expresia iNOS je indukovaná v mnohých rozličných bunkách (makrofágy, endotelálne bunky, bunky hladkej svaloviny ciev, kardiomyocyty, a i.) po stimulácii lipopolysacharidmi (LPS), cytokínmi (ako IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6) a i., t. j. hrá dôležitú úlohu v antimikrobiálnej, antiparazitckej a antineoplastickej aktivite. Táto izoforma nie je regulovaná Ca<sup>2+</sup>. Produkuje veľké množstvá NO s cytostatickým efektom na parazitické cieľové bunky inhibíciou Fe-obsahujúcich enzýmov a spôsobujúc fragmentáciu DNA. Indukcia iNOS je súčasťou patofyziológie autoimunitných chorôb a septického šoku [13]. Induktívna izoforma NOS (na rozdiel od konštitutívnych NOS izoformami, ktoré sú exprimované kontinuálne) je exprimovaná po stimulácii zápalovým podnetom, syntetizujú veľké množstvo NO v prechodnom stave [14]. V experimente na myšiach NO syntetizovaný iNOS potláčal rozvoj konstriktívnej remodelácie ľavej arteria carotis communis [14]. Jacob so spoluautormi imunohistochemickou metódou zistili nesignifikantný rozdiel v expresii endotelovej izoformy NOS v skupinách normálnych žíl a tortuózných a netortuózných úsekov varikózných žíl. Avšak obe skupiny varikózných žíl vykazovali zvýšenú expresiu iNOS a TGF-beta1 (transforming growth factor-beta1), pričom rozdiel bol výraznejší v prospech tortuózných varikózných úsekov žíl [6].

Zmeny v expresii iNOS v stene varikózných žíl by mohli napomôcť poodhaliť príčinu štrukturálnych zmien cievnej steny pri tomto ochorení.

## Materiál a metódy

Prezentované výsledky boli vyhodnotené na 10 vzorkách varikózných žíl (prevažne vena saphena magna, priemerný vek v čase odberu: 31,3 rokov, vekové rozpätie: 22-42 rokov, medián: 30 rokov) odobraných pri tzv. "strippingových" operáciách varikózných žíl dolných končatín a porovnávaný s kontrolným súborom, ktorý pozostával rovnako z 10 vzoriek povrchových žíl dolných končatín (prevažne vena saphena magna, priemerný vek v čase odberu: 27,4 rokov, vekové rozpätie: 19-40 rokov, medián: 26,5 rokov) odobraných z nekroptického materiálu Ústavu súdneho lekárstva LFUK Bratislava v rokoch 1998- 2003 od jedincov bez anamnézy akéhokoľvek cievneho postihnutia.

Varikózný súbor obsahoval vzorky od 5 mužov (priemerný vek v čase odberu: 29,8 rokov, vekové rozpätie: 22-37 rokov, medián: 30 rokov) a 5 žien (priemerný vek v čase odberu: 32,8 rokov, vekové rozpätie: 24- 42 rokov, medián: 30 rokov). Kontrolný súbor pozostával zo vzoriek od 7 mužov (priemerný vek v čase odberu: 26,1 rokov, vekové rozpätie: 19- 40 rokov, medián: 26 rokov) a 3 žien (priemerný vek v čase odberu: 30,3 rokov, vekové rozpätie: 20-39 rokov, medián: 32 rokov).

Formalínom fixované a v parafíne zaliate biotické vzorky boli narezané na 5  $\mu$ m hrubé rezy. Po deparafinizácii rezov štandardným postupom a vyblokování endogénnej peroxidázovej aktivity, boli rezy premyté vo fosfátmi pufovanom fyziologickom

roztoku (50 mM PBS, 150 mM NaCl, 0,005% Tween, pH 7,4) 3x5 minút. Nasledovne sa rezy inkubovali s primárnou protilátkou riedenou 1:1000 cez noc pri 6 °C. Na detekciu induktívnej NO syntázy (iNOS) bola použitá polyklonálna králičia protilátka proti iNOS (klon N20, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA). Po inkubácii boli vzorky opäť premyté v pufovanom roztoku 3x5 minút. Na detekciu primárnej protilátky bola použitý protikráličí polymér konjugovaný s peroxidázou Envision<sup>+</sup> (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark). Rezy sa inkubovali so sekundárnou protilátkou 30 minút pri izbovej teplote, následne boli premyté v PBS 3x5 minút. Na vizualizáciu reakcie bol použitý 3,3'-diaminobenzidín (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark). Rezy boli nakoniec krátko dofarbené hematoxylinom, zaliate do akrylového média a prikryté krycím sklíčkom. Expresia iNOS bola hodnotená semikvantitatívne optickým mikroskopom (Leica DM 2000, Wetzlar, Germany). Na morfometrické hodnotenie bolo digitalizovaných 10 náhodne vybraných zorných polí pri zväčšení 400x digitálnym fotoaparátom (Canon Powershot S50, Japan).

Pri semikvantitatívnom hodnotení sme sa sústredili na histologické charakteristicky nálezu, lokalizáciu pozitivity vzhľadom na anatomicke vrstvy žilovej steny a intenzitu pozitivity (- negatívny nález, +/- nepravidelná pozitivita, + slabá pozitivita, ++ stredne silná pozitivita, +++ silná pozitivita).

Morfometrická analýza sa realizovala pomocou dvojrozmerného obrazového analyzátoru (ImageJ 1.34n, National Institute of Health, USA) [1]. Vymedzením určitého farebného spektra, jas a kontrastu obrazu sme izolovali celkovú plochu pozitivity iNOS (hnedá farba) v médiu cievy. Percento pozitivity iNOS sme vypočítali ako podiel na celkovú plochu obrazu. V štatistickej analýze sme použili nepárový t-test. Ako štatisticky významné sme hodnotili nálezy s  $p < 0.01$ .

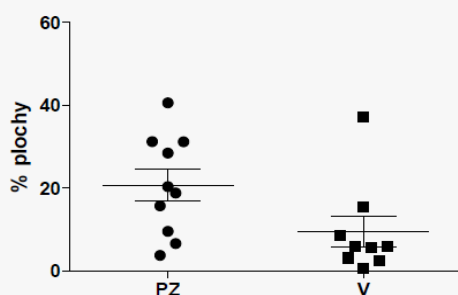
## Výsledky

Histomorfologické a semikvantitatívne hodnotenie poukázalo na zníženie expresie induktívnej izoformy NOS v tunica media varikózných žíl pri porovnaní so zdravými kontrolami (obr. 1) V kontrolných vzorkách média vykazovala kontinuálnu, difúznú expresiu induktívnej NOS, kým vo varikózných cievach bola jej pozitivita diskontinuálna (obr. 2). Sledovaný marker sme hodnotili aj v tunica intima, kde jeho expresia kopirovala jeho pozitívitu v tunica media s výnimkou dvoch varikózných vzoriek (V54, V55) (obr. 3). V týchto preparátoch bola expresia iNOS výrazne vyššia v tunica intima v porovnaní s tunica media. Z technických príčin nebolo možné hodnotiť jednu vzorku varikózneho súboru (V32).

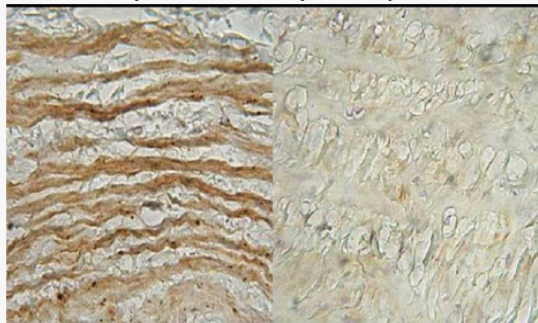
Induktívna izoforma NOS vykazovala cytoplazmovú expresiu v bunkách hladkej svaloviny. Endotel a spojivové tkanivo cievnej steny iNOS neexprimovalo. V tunica media kontrolných vzoriek vykazovali bunky hladkej svaloviny kontinuálnu, difúznú expresiu iNOS po celej hrúbke média. Vo varikózných žilách bola ex-

presia iNOS diskontinuálna. Len ojedinelé svalové bunky boli pozitívne. Osem z 10 kontrolných vzoriek vykazovalo stredne silnú až silnú intenzitu (++ - +++) pozitIVITY iNOS. V tunica media varikózných žil bola intenzita expresie iNOS slabá a nepravidelná. Morfometrická analýza potvrdila signifikantne zníženú expresiu indukčivnej NO syntazy v tunica media varikózných žil ( $9,492 \pm 1,18\%$ ) v porovnaní s kontrolnými vzorkami ( $20,69 \pm 1,37\%$ ).

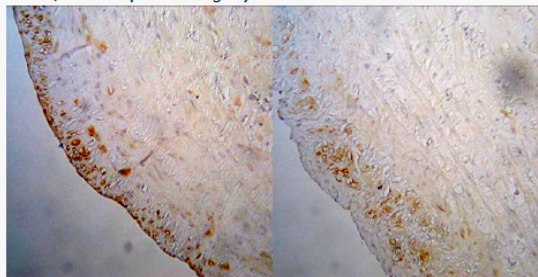
**Obr. 1. Percento pozitIVITY expresie iNOS voči celkovej ploche zorného poľa.** V = varikózne zmenené vzorky a PZ = kontrolné vzorky, \*  $p < 0.001$ .



**Obr. 2. Expresia indukčivnej izoformy NOS (hnedá farba) v tunica media vzorky kontrolného súboru (zdravé žily) - vľavo a vzorky súboru varikózných žil - vpravo.**



**Obr. 3. Výrazná pozitIVITA iNOS (hnedá farba) v tunica intima, minimálna v tunica media (20x, DAB).** Vľavo: V55 (muž, 32 rokov, vena saphena magna). Vpravo: V54 (muž, 30 rokov, vena saphena magna).



Štatisticky signifikantné výsledky morfometrickej analýzy potvrdili semikvantitatívne stanovenú zníženú expresiu indukčivnej NO-syntazy v tunica media varikózných žil.

## Diskusia

Howlader a Smith dokumentovali zvýšené hodnoty celkového NO u pacientov so závažným stupňom venózneho postihnutia (štádium C4- 5) [5]. Jacob so spolupracovníkmi pozorovali výraznejšiu iNOS expresiu v primárne varikózných žilách, obzvlášť v ich tortuózných úsekoch [6]. Výsledky našej práce svedčia skôr pre nižšie hodnoty NO (produkované iNOS) v stene varikózných žil, aj keď my sme v našej práci nezohľadňovali stupeň závažnosti žilového postihnutia. V našich dvoch predošlých prácach sme pozorovali nižšiu a diskontinuálnu expresiu eNOS pravdepodobne poškodeným endotelom v súbore varikózných žil, ako aj nižšiu expresiu nNOS v oboch sledovaných žilových vrstvách (tunica intima aj tunica media) varikózných žil v porovnaní s kontrolným súborom (zatiaľ nepublikované výsledky). Vo dvoch vzorkách varikózných žil (V54, V55) však expresia iNOS (podobne ako pri nNOS) pri semikvantitatívnom hodnotení vykazovala vyššiu pozitIVITU v tunica intima ako v tunica media (avšak nebola porovnaná morfometricky) (obr. 3). Obe spomenuté varikózne vzorky pochádzali z vena saphena magna relatívne mladých mužov (30 rokov a 32 rokov), ich histologické spracovanie sa neodlišovalo od spracovania ostatných vzoriek, a bohužiaľ ani nemáme iné údaje o ich možnom sprievodnom postihnutí.

Varikózne žilové vzorky boli odobrané pri strippingových operáciách v rokoch 2004 a 2005, avšak štádium CEAP žilového postihnutia nebolo zaznamenané. Predpokladáme, že nakoľko sa jednalo o stripping kmeňových varixov vena saphena magna, mohlo sa jednať pravdepodobne o štádium C2 (t. j. C2-EP- AS- PR podľa CEAP). V práci spomínaných autorov Howlader a Smith (2002) bola intenzita expresie NO dávaná do súvisu so závažnosťou venózneho ochorenia (podľa CEAP klasifikácie). Najvyššie hodnoty NO boli zistené pre štádium C4-C5 venózneho postihnutia [5]. V našej práci rozdiely v expresii sledovaného markera boli zjavné už pri semikvantitatívnom hodnotení, keďže okrem nižšej expresie bolo badať aj jeho diskontinuálnu expresiu v tunica intima aj tunica media varikózneho súboru, čo naznačuje predpoklad určitého poškodenia varikózneho žilového steny.

## Záver

Výsledky našej práce nepotvrdili predpokladanú vyššiu intenzitu expresie iNOS v súbore varikózných žil a do určitej miery protirečia výsledkom spomínaných prác Howladera a Smitha [5] a Jacoba a spol. [6]. V našej práci sme však nezohľadňovali štádium venózneho postihnutia. Hypotézu, že by hladina expresie prechádzala rovnako určitými štádiami podobne ako štádium venózneho postihnutia by bolo potrebné overiť na početnejšom súbore vzoriek s dokumentovaným štádiom žilového ochorenia pre každú vzorku sledovaného súboru.



Keďže iNOS je exprimovaná prevažne na zápalové podnety, predpokladáme že na patofyziológii vývoja primárnych varikózných žil sa zápalové podnety nepodieľajú významnou mierou na štrukturálnej poruche žilovej steny. Na potvrdenie výsledkov našej práce navrhujeme porovnanie expresie vybraných zápalových mediátorov (známych stimuláciou expresie iNOS, napr. IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  a pod.) na početnejšom súbore varikózných žil so zohľadnením štádia závažnosti venózneho postihnutia.

## Summary

Primary varicosis is probably due to vein wall weakness. Literature gives conflicting reports about its structural changes. Nitric oxide (NO)-potent vasodilator due to smooth muscle relaxation, is synthesised by nitric oxide synthase (NOS). Till nowadays are known 3 human isoforms - inducible NOS (iNOS) is expressed by various human cells, mostly on inflammatory stimuli.

**Material and methods.** Samples of varicose and healthy veins were processed with light microscopy and standard immunohistochemical methods by using the rabbit polyclonal antibodies against iNOS isoform. Antibodies expression was evaluated semiquantitatively and proved by morphometric 2D image analysis. Total iNOS positivity area was isolated by digital color subtraction and then color analysis determined its share of tunica media total area. Unpaired t-test was used for statistical analysis.

**Results.** Histomorphologic and semiquantitative iNOS evaluation showed discontinual and significantly lower iNOS expression in tunica media of varicose veins compared to healthy controls. **Conclusions.** Results of our study point to certainly lower NO levels in varicose veins, deducing that varicose venodilatation is due to other pathophysiologic mechanism. Our results differ from results of similar studies.

## Literatúra

1. Abramoff, M. D., Magelhaes, P. J., Ram, S. J.: "Image Processing with ImageJ". *Biophotonics International*, Vol. 11 (7), 2004, s. 36-42.

2. Bergan, J. J.: Development of primary varicose veins. *Phlebology*, 18, 1997, s. 3-8.
3. Corcos, L., Peruzzi, G., Romeo, V., Procacci, T., Dini, S.: Peripheral venous biopsy: significance, limitations, indications and clinical applications. *Phlebology*, 4, 1989, s. 271-274.
4. Donald J. A., Broughton B. R. S.: Nitric oxide control of lower vertebrate blood vessels by vasomotor nerves. In: *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 142. Elsevier, 2005, s. 188 - 197.
5. Howlader M. H., Smith P. D.: Increased plasma total nitric oxide among patients with severe chronic venous disease. *Inter Angiol.*, 21 (2), 2002, s. 180-6.
6. Jacob T, Hingorani A, Ascher E: Overexpression of transforming growth factor-beta1 correlates with increased synthesis of nitric oxide synthase in varicose veins. *J Vasc Surg.*, 41 (3), 2005, s. 523-30.
7. Ono T., Bergan J. J., Schmid-Schonbein G. W.: Infiltrace žilních chlopní monocytů. *J Vasc Surg.* 27, 1998, s. 158-66.
8. Štvrtinová, V., Kolesár, J., Wimmer, G.: Prevalence of varicose veins of the lower limbs in the women working at the department store. *Inter Angiol.*, 10, 1991, s. 2-5.
9. Štvrtinová, V.: Pentoxifylín v liečbe chronickej žilovej insuficiencie. *Praktická flebológia* 3, 1999, s. 131 - 134.
10. Thulesius, O.: The venous wall and valvular function in chronic venous insufficiency. *Inter Angiol.*, 15, 1996, s. 114-118.
11. Travers J. P., Brookes C. E., Evans J., Baker D. M., Kent C., Makin G. S., Mayhew T. M.: Assessment of wall structure and composition of varicose vein with reference to collagen, elastin and smooth muscle content. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 11, 1996, s. 230-237.
12. Venturi M., Bonavina L., Annoni f., Colombo L., Butera C., Peracchia A., Mussini E. (1996): Biochemical assay of collagen and elastin in the normal and varicose vein wall. *J. Surg. Res.* 60, 1996, s. 245-248.
13. Viaro F. et al.: Expression of Nitric Oxide Synthases in the Pathophysiology of Cardiovascular Diseases. *Arq Bras Cardiol.*, 74 (4), 2000. s. 380-393.
14. Yogo K. et al: Different Vasculoprotective Roles of NOS Isoforms in Vascular Lesion Formation in Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 20, 2000, s. 96-100.

#### **2. 4. 1. 1. 3. HRÚBKA (IMT) ŽILOVEJ STENY U PACIENTOV S PRIMÁRNOU VARIKOZITOU DK.**

Analýza štruktúry žilovej steny postihnutej primárnou varikozitou (a jej hrúbky) začala nadobúdať význam aj v súvislosti s rozvojom nových terapeutických metód: vnútrožilová laserová liečba trombov (endovenózna laser-terapia, EVLT), rádiovlnová ablácia.

Hrúbka patologicky zmenenej žilovej steny je potenciálne veľmi dôležitá pre chirurga, zvažujúceho možnosť chirurgickej liečby varikozity dolných končatín. Napr. chirurgická excízia varikózných úsekov charakterizovaných parietálnou hypopláziou môže byť veľmi obtiažna, vzhľadom na jej fragilitu a naopak: hrubá „svalovinová“ stena robí EVLT inefektívnou a zvyšuje riziko rekrecíí. Informácia o hrúbke steny umožňuje chirurgovi modulovať tok endolazera s frekvenciou zacielenou na liečenú žilu. Rozvoj digitálnej sonografie vniesol mnoho významných výhod do klinickej praxe, kvalita výsledného sonografického obrazu je lepšia ako pri konvenčnom ultrazvuku, umožňujúca vyhodnotenie aj submilimetrových štruktúr, ako napr. žilovej steny. Pri varikóznom postihnutí žil DK patologická remodelácia postihuje intimu a muscularis žilovej steny, pričom za fyziologických okolností tieto 2 vrstvy dosahujú hrúbku 460- 690µm. Tento ultraštruktúrne normálny obraz koreluje s 3-vrstvovým sonografickým obrazom: adventícia sa javí ako hyperechoická, media ako hypoechoická, intima opäť hyperechoická. Bruschi (2006) so spolupracovníkmi demonštrovali schopnosť vysokorozlišovacej sonografie merať hrúbku varikózne zmenenej žilovej steny (odlišujúc medzi hypertrofickými a atrofickými úsekmi) a porovnávali ju s „in vitro“ metódou (hrúbka steny na klasických histologických 5µm rezoch ofarbených HE a Massonovým tri-chrómom). V spomínanej štúdií na 28 vzorkách vena saphena magna sa vysokorozlišovacia ultrasonografia ukázala ako relatívne vhodná diagnostická metóda na odhalenie hypotrofickej steny, o niečo slabšia v odhalení hypertrofickej steny a slabšia v diagnostikovaní normotrofickej steny, vzhľadom na fakt že predchirurgická histologická analýza hrúbky steny cestou perkutánnej biopsie je pravdepodobne príliš invazívnou metódou pri tak nízkorozlišovacej chorobe [12].

V rámci našich štúdií o morfológii steny varikózne žily sme okrem zložiek ECM porovnávali aj hrúbku žilovej steny, pričom na našom pracovisku bola vypracovaná jednoduchá metóda merania priemernej hrúbky žilovej (cievnej) steny: rozdiel v hrúbke intimy a média vo varikózných a zdravých žilách nebol štatisticky významný.

## **Collagen and elastin contents and average vein wall thickness in varicose vein wall**

Z. Haviarová, P. Weismann, V. Štvrtinová, S. Durdík, P. Kováč, P. Mráz

### **Introduction**

Chronic venous insufficiency of the lower extremities is a world-spread disease especially in its Western part. It affects about 30-40% of the human population. One of its main signs is varicosis. Varicose veins are abnormally dilated, tortuous and elongated veins of the lower extremities. The cause of the primary form of varicosis is still the subject of interest of several investigators in the world. Some hypothesis suppose and some investigators have noted, the alterations of the connective tissue to be responsible for the onset of varicosis, but the exact cause of the vein dilatation has still not been established. The alterations of the connective tissue in varicose vein wall – especially its two components: collagen and elastin, have been investigated by several workers and by various methods but they still have not come to the clear conclusion. The aim of this work was to compare the total amounts of collagen and elastin in human varicose and non-varicose vein walls and further to compare the average vein wall thickness in varicose and non-varicose vein walls by the computer morphometric method. The results of the average vein wall thickness comparison can support or contradict the hypothesis of the “weak (and thin) venous wall”.

### **Material and methods**

12 varicose vein samples were collected from patients undergoing stripping surgery of the long saphenous vein (ranging the age from 24 to 60 years, the mean age value 43,25; 6 males and 6 females). 12 control samples of the “healthy” non-dilated long saphenous veins were dissected from the pathologic material (with no previous history of varicosis) of the Department of the Forensic Medicine (ranging the age from 20 to 83 years; the mean age value 44,42; 10 males and 2 females). Samples were immediately fixed in 5% buffered formalin, processed, wax-embedded, sectioned and mounted on glass microslides. The histologic staining Unna-Tanzer was used for the differential staining of the collagen and elastin. Histological sections were scanned with the colour CCD camera (JAY, Japan) connected with inverted microscope Olympus (Japan) IMT-4 with

magnification 37,5 x. Scanned histological sections were analysed with the morphometric software Analysis (Soft Imaging Systems, GmbH, Germany) by using PC Pentium 150. The areal concentrations of the collagen and elastin for each microslide were determined by the method of thresholding. Such being the case that the outer part of venous wall (tunica adventitia) was often saved unequally by collecting and processing - this layer of venous wall was not analysed. Scanned histologic sections were divided into equally placed sectors (subareas) (figure 1). 208 sectors of the varicose and non-varicose venous wall histologic sections were analysed as a whole. Each scanned picture was decomposed by the morphometric software into 3 colour (cyan, magenta, yellow) and one black-white components (figure 2). After this the areal concentrations of collagen (analysed on "cyan" part of the picture, figure 3) and elastin (analysed on "magenta" part of the picture, figure 4) were measured by the thresholding of the grey colour brightness range indicating the allocation of the measured component. Measured picture was simultaneously compared with the fully coloured original picture.

Average vein wall thickness was analysed with the morphometric software CUE-2 (Galai, Israel) from the scanned pictures of the whole venous wall circumference (magnification 2,5x). By processing the venous samples into paraffin blocks we emphasised the necessity of obtaining the sections perpendicular to the venous axis. Only the thickness of the tunica intima and tunica media was measured (IMT = intima-media thickness). The area of each measured section was divided by the length of its computer determined skeleton.

## Results

Totally 208 sectors (subareas) of the varicose and non-varicose venous samples were analysed. The areal concentration of collagen was 27,74% in varicose vein samples and 17,49% for elastin (percentual areal ratio of collagen or elastin to the whole intima and media area). The areal concentrations of control non-varicose vein samples were 24,31% for collagen and 12,52% for elastin (figure 5). The difference in areal concentrations of collagen between varicose and non-varicose control samples was not significant ( $P > 0.1$ ). The difference in areal concentrations of elastin between varicose and non-varicose vein wall was significant ( $P < 0.01$ ).

Such being the case of significant dispersion in intima and media thickness values of our varicose vein samples there was no significant difference between the IMT values of varicose and non-varicose vein wall despite the fact of broad distinction seen in microscope.

## Discussion

The total magnification of the microscope was chosen that one enabled to evaluate the maximal possible part of the histologic section by the clear distinction between the evaluated components. The areas of the lower concentrations of collagen and elastin showed to be the limiting factor by the analysing the venous histologic sections on basis of staining intensity by the thresholding of measured component (the matter staining the collagen and the matter staining the elastin). By the comparison between the "harder"

and “softer” thresholdings (including the very light tones of the followed colour) of each samples we have found the differences in areal concentration results ranging from 2 to 7%.

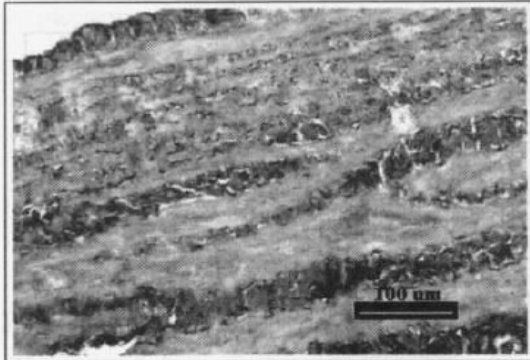


Figure 1: Scanned histologic section

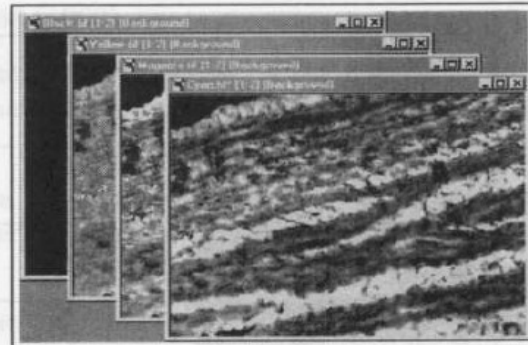


Figure 2: Scanned picture decomposed by the morphometric software into 3 colour (cyan, magenta, yellow) and one black-white component

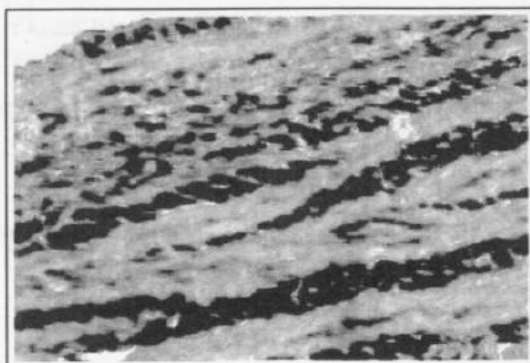


Figure 3: Areal concentrations of collagen was analysed on “cyan” part of the picture

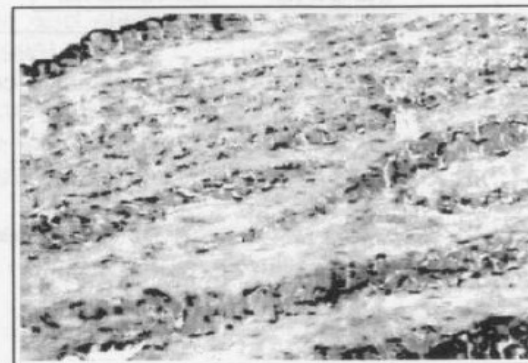


Figure 4: Areal concentrations of elastin was analysed on “magenta” part of the picture

The above mentioned method of measurement the areal concentrations of collagen and elastin on basis of staining intensity of each followed components on one histologic section seemed to be relatively quick. But there are still enough limiting factors influencing the exactness of measurement (the staining evenness of the histologic sections, the setting up the parameters by scanning the samples, the subjective setting up of the values by thresholding).

Exclusively automatic measurements of the followed parameters still seem to be not exact and the corrections made by the observer are due to his subjective approach.

Despite this fact we consider the use of morphometric computer software by the collagen and elastin areal concentration measurements as the more precise method for above mentioned measurements.

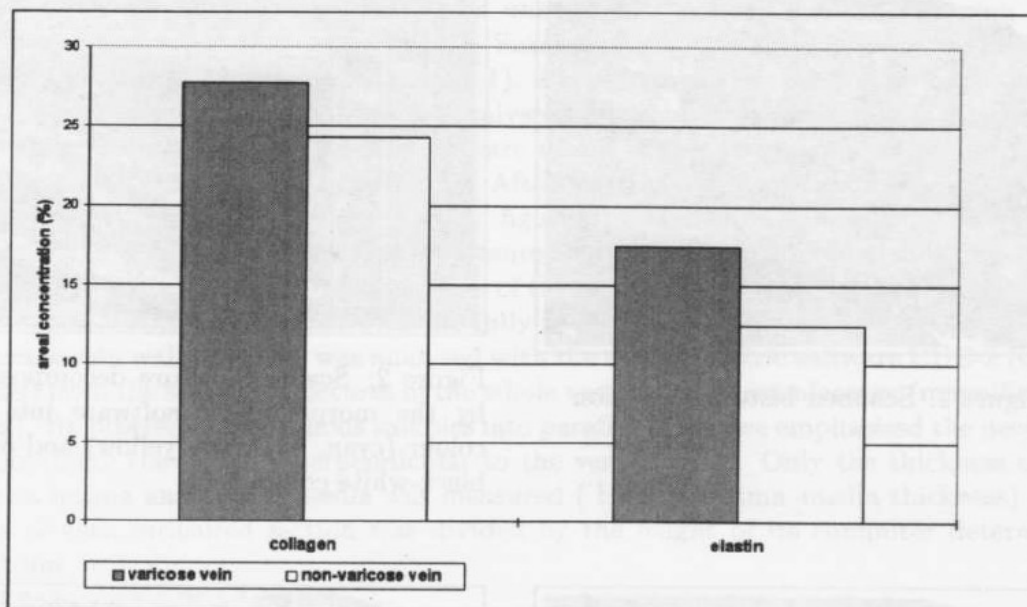


Figure 5: Areal collagen and elastin concentration in varicose and non-varicose vein

## Conclusion

In this our work we have obtained different results in comparison with our previous measurements (realised with black and white CCD camera). We consider that these differences are due to collagen and elastin areal concentrations evaluated now only in tunica intima and media against the previous measurements analysing the whole three venous layers together.

## Acknowledgement

Thanks to Mrs. Haraslinova Viera for the help with the histological staining method. This work was realised with the support of the Comenius University Grant No. UK/3790/99 and VGA grant No. 1/5154/98.

## References

- [1] De Carvalho, J., Apfel, M., Pereira, C.G., Panico, M., Da Silveira, P., De Madeiros, A.: Histochemical study of elastic system fibers of the walls of normal and pathological saphenous vein. *Phlebologie*, 44, pp. 733-744 (1990)
- [2] Maurel, E., Azema, C., Deloly, J., Bouissou, H.: Collagen of the normal and the varicose human saphenous vein: a biochemical study. *Clin. Chim. Acta*, 193, pp. 27-38 (1990)
- [3] Ortiz, P.P., Whyte, J., Daniel Lamaziere, J.M., Torres, A., Diaz, P., Sarrat, R.: Quantitative study of elastin in human arteries with high level of tortuosness. *Eur. J. Anat.*, 3, pp. 7-11 (1999)
- [4] Psaila, J.V., Melhuish, J.: Viscoelastic properties and collagen content of the long saphenous vein in normal and varicose veins. *Brit. J. Surg.*, 76, pp. 3740 (1989)
- [5] Travers, J.P., Brookes, C.E., Evans, J., Baker, D.M., Kent, C., Makin, G.S., Mayhew, T.M.: Assesment of wall structure and composition of varicose vein with reference to collagen, elastin and smooth muscle content. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*, 11, pp. 230-237 (1996)
- [6] Venturi, M., Bonavina, L., Annoni, F., Colombo, L., Butera, C., Peracchia, A., Mussini, E.: Biochemical assay of collagen and elastin in the normal and varicose vein wall. *J. Surg. Res.*, 60, pp. 245-248 (1996)
- [7] Yamada, T., Tomita, Sh., Mori, M., Sasatomi, E., Suenaga, E., Itoh, T.: Increased mast cell infiltration in varicose vein of the lower limbs: A possible role in the development of varices. *Surgery*, 119, pp. 494-497 (1996)
- [8] Waksman, Y., Mashiah, A., Hod, I., Rose, S.S., Friedman, A.: Collagen subtype pattern in normal and varicose saphenous veins in humans. *Isr. J. Med. Sci.*, 33, pp. 81-86 (1997)

## Address:

Zora Haviarová  
Department of Anatomy,  
Faculty of Medicine, Comenius University  
Sasinkova 2  
813 72 Bratislava, Slovak Republic

E-mail: haviarova@fmed.uniba.sk

#### 2. 4. 1. 2. GENETICKÉ PREDISPOZÍCIE VZNIKU PRIMÁRNE VARIKÓZNYCH ŽÍL.

Covas a spol. (2005) uvádza, že génová expresia mezenchymálnych buniek zo žily dospelého človeka je veľmi podobná expresii mezenchymálnych buniek napr. z kostnej drene alebo pupočníkovej žily. Zaujímavosťou bola zistená zvýšená expresia 3 génov zo (zdravej) saphenóznej žily: interleukín-8 (IL8), matrix- metaloproteináza 2 (MMP2, gelatináza A), asociovaných s angiogenezou a EGR1 (early growth response 1). Vzhľadom na prítomnosť expresie IL8 a MMP2 aj v endoteliálnych bunkách pupočníkovej krvi, sa predpokladá ich význam pri vzniku a fyziológii ciev. EGR1 je pravdepodobne zodpovedný za aktiváciu PPAR $\gamma$ 1 (peroxisome proliferator-activated receptors  $\gamma$  1) v bunkách hladkej svaloviny ciev. Na základe svojich zistení Covas a spol. (2005) predpokladá určitú plasticitu mesenchymálnych buniek získaných zo safenóznej žily, čo by bolo možné využiť pri aplikácii bunkovej terapie [25].

Pri vzniku varikózných žíl bola často pozorovaná dedičná predispozícia, ku ktorej sa pridružovali rôzne vonkajšie činitele, spolupôsobiacie pri vzniku varikózných žíl. Predpokladaná vrodená menejcennosť steny varikózných žíl viedla niektorých autorov k bližšiemu skúmaniu genetického profilu postihnutých osôb. Lee so spolupracovníkmi (2005) sa pokúsil pomocou komplementárnej cDNA určiť mRNA genetický profil v 4 pároch primárne varikózných a kontrolných vzoriek odobraných z vena saphena magna (všetko ženy). Vo varikózných vzorkách identifikoval 86 diferenciálne exprimovaných génov, z ktorých 82 bolo zvýšene exprimovaných a 4 boli s nižšou expresiou. V podskupine zvýšene exprimovaných génov bola u 38 z nich ich funkcia známa a boli klasifikované podľa svojej biochemickej funkcie (pozri Tab.9), ostávajúcich 44 zvýšene exprimovaných génov bola ich funkcia neznáma. 16 zo spomenutých známych génov je asociovaných so štruktúrou a motilitou bunky, zahŕňajúc transformujúcim-rastovým-faktorom- $\beta$ -indukovaný gén (BIGH3), versican, tubulín, lumican, aktinín, kolagén typ I, aktín a tropomyozín, patriace medzi molekuly extracelulárnej matrix a cytoskeletálne proteíny. Tieto gény charakterizujú myofibroblasty, o ktorých sa predpokladá, že sú špecializované „rany-hojace bunky“ a zúčastňujú sa udržiavania homeostázy extracelulárnej matrix tkaniva, opravy a regenerácie vrátane fibrózy. Lee (2005) predpokladá, že zvýšená expresia génov asociovaných s myofibroblastami a cytoskeletom v tkanive varikózných žíl je dôsledkom odpovede na poškodenie, známkou následnej opravy a obnovy tkaniva, progresie fibrózy. Tieto črty sú zodpovedné za zmeny v zložení ECM vo varikózných žilách a ich zníženú kontraktilitu. Takže zvýšená expresia génov by skôr mohli byť následkom na



**Tab. 9. Zvýšene exprimované gény vo varikózných žilách (podľa Lee S.a spol., 2005)[63].**

názov génu

**Bunková signalizácia/komunikácia**

guanín nukleotid viažúci proteín  
transformujúci rastový faktor,  $\beta$  indukovaný, 68 kD (BIGH3)  
integrín-spojená kináza (ILK)  
poliovírus receptor- príbuzný proteín (PRR2)

**Gén/proteín expresia**

nadväzujúci faktor, arginín/serín-bohatý 2-interacting proteín 1

**DEAD/H** (Asp-Glu-Ala-Asp/His)

krabicový polypeptid 1  
proteazóm (prosóm, makropain) 265 podjednotiek  
ribozomálny proteín L13a (RPL 13A)  
proteáza, serín, 23 (SPUVE)  
ubiquitín carboxyl-terminal esteráza L1

**Bunkové delenie/DNA syntéza**

karyopherín (importín)  $\beta$ 1 (KPNB 1)

**Bunková štruktúra/motilita**

aktín  $\gamma$ 1 (ACTG 1)  
transgelín 2 (TAGLN2)  
lamín A/C (LMNA)  
kolagén, typ 1,  $\alpha$ 1 (COL1 A1)  
transgelín (TAGLN)  
tubulín,  $\alpha$ , mozog-špecifický (TUBA3)  
aktín,  $\alpha$ 1 (ACTN1)  
moesín (MSN)  
tubulín,  $\alpha$ , ubikvitárny (K-ALPHA-1)  
laminín receptor 1 (67 kD, ribozomálny proteín SA) (LAMR1)  
Rattus norvegicus myozín ťažký reťazec 11  
myozín, ľahká polypeptidová kináza (MYLK)  
lumica (keratan sulfát proteoglykán)  
tropomyozín,  $\beta$ , kostrový sval  
MYL6 (myosín, ľahký polypeptid 6)  
versican

**Bunková/orgánová obrana a homeostáza**

tepelný šok 90 kD proteín 1,  $\alpha$  (HPSCA)  
PRO0470 proteín (PRO0470)/feritín, ľahký polypeptid  
hlavný histokompatibilný komplex, trieda I, A (HLA-A)  
Mus musculus tepelný šok 70 kD proteín 5

**Metabolizmus**

ATP syntáza  $\beta$   
ATPáza,  $H^+$  prenášajúca, lyzozomálna (vakuolárna protónová pumpa)  
glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza  
vakuolárna protónová pumpa delta polypeptid  
kalumenín  
fosfoglycerát dehydrogenáza (PHDGH)  
peroxizomálna acyl-CoA tioesteráza

Skratky: ATP- adenosín 3fosfát, CoA koenzýmA, DNA kys. deoxyribonukleová

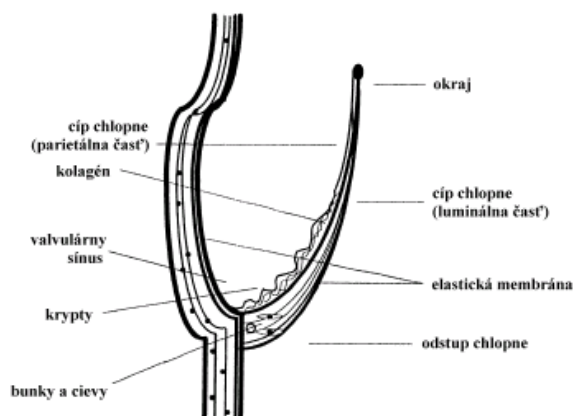
zmeny v stene varikózných žíl ako ich primárnym vyvolávajúcim faktorom. Avšak nevylučuje, že niektorý z nich by mohol hrať významnú úlohu v etiológii primárne varikózných žíl [64].

Cario-Toumaniantz a spol. (2007) sa úspešne pokúsila identifikovať všeobecný vzorec odlišne exprimovaných génov v ľudských varikózných žilách použitím cDNA subtrakčnej hybridizácie. Z 34 určených odlišne exprimovaných génov spojených s chronickým vénovým ochorením (u 28 so zvýšenou expresiou a u 6 so zníženou expresiou) zahŕňalo 9 génov metabolizmu, 6 génov spojených s organizáciou alebo reguláciou ECM, 6 génov zodpovedných za odpoveď na vonkajšie stimuly, 5 génov asociovaných s organizáciou bunky, 3 gény zodpovedné za štrukturálnu molekulárnu aktivitu, 2 gény bunkového rastu, 1 gén v spojitosti s väzobnou funkciou, 1 gén bunkovej smrti a 1 gén v spojitosti s transportnou funkciou. Medzi zvýšene exprimovanými génmi zúčastňujúcimi sa organizácie a regulácie ECM bol identifikovaný aj inhibítor kalcifikácie MGP (matrix Gla protein), jeho zvýšená expresia prispieva k vyššiemu pomeru proliferatívnych foriem hladkých svalových buniek a dokumentuje, že v ECM varikózných žíl dochádza k jej nadmiernej mineralizácii pravdepodobne poruchou jej karboxylácie. Zmena v expresii izoformiem  $\beta$ - a  $\gamma$ -aktínu hladkých svalových buniek varikózných žíl a asociovaného tropomyozínu predpokladá ich spoločnosť na štrukturálnych zmenách buniek hladkej svaloviny v stene varikóznej žily. Zvýšená expresia sa našla aj pre ďalšie gény asociované s ECM: cystatín C, dermatopontín, kolagén III, TIMP 1, MGP, tenascín C. Zmena v pomere kolagén I/III pravdepodobne prispieva k slabosti a zníženej elasticite steny varikóznej žily, vyšší pomer TIMP1/MMP je charakteristický pre varikózne žily (zvýšená expresia TIMP1 bola potvrdená aj v tejto práci). Dermatopontín spolupracuje s decorínom pri regulácii fibrilogenézy kolagénu, tenascín C je známy ako regulátor správania sa bunky modulovaním pripojenia bunky a ako induktor MMPs. Zvýšená expresia MGP môže dokumentovať jeho účasť pri remodelácii varikóznej žilovej steny ovplyvnením proliferačných a mineralizačných procesov a pravdepodobne ďalšie štúdie objasnia jeho úlohy v týchto procesoch [17].

#### **2. 4. 1. 3. POŠKODENIE ŽILOVÝCH CHLOPNÍ.**

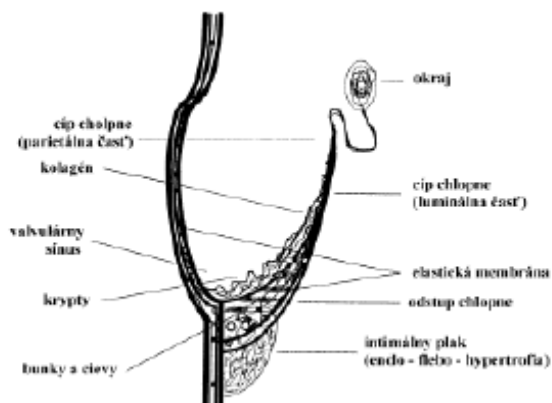
Nezanedbateľné množstvo prác sa venuje aj štúdiu zmien morfologickej štruktúry žilových chlopní dolných končatín, ktoré sa pokladajú za primárnu príčinu vzniku varixov. Autori týchto prác sú prívržencami tzv. "valvulárnej teórie (hypotézy)" vzniku primárne varikózných žíl. Teoretickým podkladom takejto hypotézy bolo klinické (intraoperačné) pozorovanie poš-

kodených žilových chlopni v skorých štádiách venózneho insuficiencie bez predchádzajúceho anamnestického údaju prekonanej tromboflebitídy s následnou miernou dilatáciou venózneho



**Obr. 1.** Schematický príklad proximálnej chlopne vena saphena magna v pozdĺžnom priereze za fyziologických podmienok.

rozoznať tzv. "valvulárny sínus". Chlopňa v mieste odstupu je hrubšia ako na konci cípu s početnými invadovanými bunkami a cievami. Na luminálnom povrchu je cíp chlopne pokrytý elastickou membránou, ktorá je obdobou lamina elastica interna steny cievy.



**Obr. 2.** Príklad poškodenej žilovej chlopne so sumarizáciou hlavných pozorovaných poškodení.

chlopňami predstavovali hlavne fibromuskulárne plaky v oblasti odstupu chlopne spolu so sklerózou a hyperpláziou hladkých svalových buniek, fragmentácia a disociácia vnútornej lamina elastica. V oblasti cípov chlopne bolo možné pozorovať stenčenie a hypotrofiu, menej už zhrubnutie a hypertrofiu svaloviny, v oblasti valvulárneho prstenca prevažne jeho

lumen a valvulárneho prstenca. S úmyslom odhaliť zmeny v štruktúre poškodených žilových chlopni bolo vykonaných niekoľko histopatologických štúdií, v ktorých sa sledovalo spolu približne 107 žilových chlopni z varikózne postihnutých povrchových žíl (venae saphenae magna), odstránených pri tzv. strippingových operáciách [23, 24, 31]. Makroskopický opis oblasti žilovej chlopne a tzv. valvulárneho prstenca je na obr. 1.

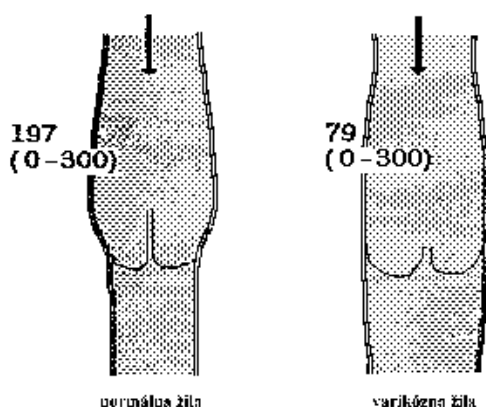
Medzi odstupom cípu chlopne- jeho parietálnou stranou a stenou žily možno

Na obr. 2. je príklad poškodenej chlopne so sumarizáciou hlavných pozorovaných poškodení: stenčenie žilovej steny a distálnej oblasti chlopňového cípu, ktorého okraj je často poprehýbaný a stenčený. V odstupe chlopne je zvýšený počet buniek a ciev, možno pozorovať fragmentáciu a disociáciu elastickej membrány, rozšírenie krýpt, endo-flebo-hypertrofiu pod odstupom chlopne. Ďalšie rozdiely v porovnaní so zdravými žilovými

asymetriu a rozšírenie, zhrubnutie (značný počet cípov a niekoľko valvulárnych prstencov boli aj bez dokázaných histopatologických zmien).

Hypotéza "valvulárnej" hypotrofie sa opiera hlavne o nálezy výskytu stenčenia takých chlopňových častí ako distálna časť listu cípu chlopne, valvulárneho sínu a komisurálnej aneurizmy. Hrúbka chlopňového cípu a prstenca podlieha vo väčšine prípadov rovnakým variáciám, kým distálna časť cípu chlopne môže byť niekedy taká tenká a slabá, že sa môže ohnúť a skrkvat' a vytvorit' tak zhrubnutý okraj. Predpokladá sa, že zmeny okraju cípu chlopne sú hlavne dôsledkom turbulencie spôsobenej refluxom a pohybmi stenčeného cípu. Ukazuje sa, že primárna venózna insuficiencia sa vyvíja v dôsledku 3 faktorov: dilatácie a hypotrofie valvulárneho prstenca, hypotrofie cípu chlopne a hemodynamického mechanického poškodenia prstenca a cípu chlopne.

Takáto patofyziologická interpretácia žilovej nedostatočnosti vyvoláva potrebu detailnejšej diagnostickej procedúry pred akýmkoľvek terapeutickým rozhodnutím pre konzervatívny alebo chirurgický spôsob riešenia žilovej chlopňovej inkompetencie. Najvhodnejšou a najvyhovujúcejšou diagnostickou metódou ohodnotenia anatomických a funkčných podmienok



**Obr. 3.** Hydrostatický tlak v mmHg, pri ktorom sa objaví spätný reflux krvi v normálnej a varikóznej žile (podľa Bauersachs a kol., 1996) [6].

ktorom sa objaví reflux po retrográdnom naplnení izolovanej žily. Normálne žily za fyziologických okolností vydržia značne vysoký retrográdnny tlak krvi až do rozsahu 39,996 kPa (300 mmHg). Pri zaťažení žily hydrostatickým tlakom zhora v oblasti venózneho sínusu sa žila nad uzavretou chlopňou charakteristicky rozšíri, takže nadobudne "hruškovitý" tvar. Porovnávacia štúdia povrchových žíl stehna (venae saphenae) medzi 20 -timi varikóznymi distálnymi žilami a 20-timi "zdravými" kontrolami odhalila, že u varikózných žíl dochádza k

žilovej chlopne sa v súčasnosti zdá byť vyšetrenie vysokorozlišovacím ultrazvukom [71].

Žilová chlopňa, považovaná za kľúčovú štruktúru periférnych žíl, za normálnych podmienok zabraňuje refluxu krvi. Správne fungujúca chlopňa by mala byť schopná vydržať hydrostatické tlakové zaťaženie v stojacej polohe vrátane prídavného zaťaženia vyvolaného napätím a pod. Funkčné ohodnotenie venózných chlopní môže byť realizované určením tlaku krvi, pri

refluxu už pri značne nižšom hydrostatickom tlaku krvi 10,532 kPa (79 mmHg) v porovnaní s normálnymi žilami 26,264 kPa (197 mmHg) [Obr. 3].

Pri zdravých žilách sa však tiež objavilo 5 prípadov s nulovým refluxným hydrostatickým tlakom (reflux nastal ihneď) a v súbore varikózných žíl zasa 3 prípady s normálnym refluxným hydrostatickým tlakom, 26,664 -39,996 kPa (200- 300 mm Hg).

Tieto výsledky nesúhlasia s predstavou generalizovanej tendencie chlopní k refluxu u pacientov s primárnou venóznou insuficienciou ("valvulárna" teória), navyše aj jedinci bez žilového ochorenia môžu mať insuficientné chlopne [6].

#### **2. 4. 1. 4. PORUCHY MIKROCIRKULÁCIE A ICH VÝZNAM PRI VZNIKU A VÝVOJI VARIKÓZNYCH ŽÍL**

V posledných rokoch sa ukazuje, že v patofyziológii vzniku a rozvoja chronického poškodenia žilového systému dolných končatín okrem makrocirkulácie zohráva významnú úlohu aj mikrocirkulácia. Chirurgické spôsoby liečby chronickej žilovej nedostatočnosti ako aj externá kompresia ovplyvňujú makrocirkuláciu. Avšak práve následky venózne hypertenzie v oblasti mikrocirkulácie spôsobujú kožné trofické zmeny a v konečnom dôsledku až ulcus cruris. Farmakologická liečba, ktorá priaznivo ovplyvňuje oblasť mikrocirkulácie má preto plné opodstatnenie v liečbe chronickej venózne insuficiencie, vychádza totiž zo súčasných patofyziologických poznatkov, týkajúcich sa mikrocirkulačných porúch, vznikajúcich pri chronickej venózne insuficiencii [103, 104].

Už v r.1988 bolo poukázané na skutočnosť, že venózna hypertenzia znižuje tlakový gradient v kapilárach, znižuje kapilárny perfúzny tlak a tým aj kapilárny prietok. To je príčinou zachytávania ("trapping") leukocytov a ich následnej aktivácie pri kontakte s cievnym endotelom. Aktivácia leukocytov vedie k ich degranulácii s následným uvoľnením proteolytických enzýmov a reaktívnych intermediátov kyslíka a dusíka. Venózna hypertenzia, ktorej následok je zvýšenie kapilárneho filtračného tlaku naruší rovnováhu medzi hydrostatickým a koloidne osmotickým tlakom a výsledkom je vznik edému. Venózna hypertenzia spôsobí tiež dilatáciu kapilár a venúl s následnou dysfunkciou ich endotelu. Zmenená funkcia endotelu má za následok zvýšenie jeho priepustnosti. V dôsledku zvýšenej permeability endotelu kapilár a venúl dochádza k úniku plazmatických bielkovín, medzi nimi aj fibrinogénu, v dôsledku čoho sa v interstíciu perikapilárne ukladá fibrín. Následkom tohto procesu je tkanivová hypoxia a malnutrícia, ktorá vyústí do vzniku trofických kožných zmien. Na druhej strane tiež dochádza

k hromadeniu leukocytov, čím sa udržuje chronický zápal v oblasti mikrocirkulácie. Súčasne vzniká kapilárna trombóza, ktorá tiež prispieva k vzniku trofických zmien kože.

#### **2. 4. 1. 4. 1. MECHANIZMUS ADHÉZIE A MIGRÁCIE LEUKOCYTOV CEZ CIEVNY ENDOTEL.**

V dôsledku venózneho hypertenzie ako aj v dôsledku dysfunkcie endotelu dochádza ku zvýšenej expresii adhezívnych molekúl na endotelových bunkách aj na leukocytoch, pohyb leukocytov sa spomalí, vzniká tzv. kotúľanie, neskôr aktivácia a adhézia leukocytov na povrch endotelu a nakoniec rozprestieranie a diapedéza. Meranie plazmatických hladín rozpustných častí endotelových adhezívnych molekúl (vascular cell adhesion molecules- VCAM, intercellular cell adhesion molecules- ICAM, E-selektín) ukázalo ich zvýšenie u pacientov s chronickými žilovými ochoreniami. Adherované a migrujúce leukocyty spôsobujú parciálnu obštrukciu kapilárneho lumenu a znižujú prietok krvi a teda v konečnom dôsledku majú za následok ischémiu. Akumulácia a aktivácia leukocytov v interstíciu má za následok uvoľnenie proteolytických lyzozómových enzýmov, ako aj reaktívnych intermediátov kyslíka (superoxid, peroxid vodíka, hydroxylový radikál, singletový kyslík), čím dochádza k udržovaniu chronického zápalu. Akumulácia leukocytov u pacientov s chronickou žilovou nedostatočnosťou sa dokázala jednak izotopovými metódami (označenými leukocytmi) a jednak imunochemicky. U pacientov s chronickou venóznou insuficienciou viacerí autori zistili zvýšené hladiny proteolytických enzýmov neutrofilov [6, 103].

Z dosiaľ uvedených faktov vyplýva, že v etiopatogenéze chronickej venózneho insuficiencie sa podstatným spôsobom uplatňujú nielen aktivované leukocyty, ale aj poškodenie endotelu zvýšeným tlakom ako aj proteolytickými enzýmami a reaktívnymi kyslíkovými intermediátmi uvoľnenými z aktivovaných leukocytov. Interakcia medzi leukocytmi a endotelom zohráva dôležitú úlohu pri mnohých ochoreniach. Dlhú dobu sa predpokladalo, že endotelové bunky tvoria inertnú vrstvu, ktorá pokrýva vnútorný povrch všetkých ciev a tvorí akúsi fyzikálnu prekážku medzi krvou a cievnu stenou. Endotel sa nachádza v strategickej anatomickej lokalite medzi cirkulujúcou krvou a hladkou svalovinou ciev a preto má všetky možnosti na lokálne ovplyvňovanie kardiovaskulárnej funkcie. Za fyziologických podmienok endotelové bunky obsahujú viaceré metabolické a sekrečné systémy, ktoré môžu regulovať cievny tonus, prietok krvi a krvný tlak. Endotel venózneho systému má dve dôležité funkcie- poskytuje optimálny "prúdový resp. tokový" povrch pre prúdiacu krv a oddeľuje intravaskulárny priestor od extravaskulárneho priestoru. Porušenie týchto základných funkcií endotelu môže mať za

následok vznik takých komplikácií žilových ochorení, ako je trombóza, edém, tkanivová ischémia a v konečnom dôsledku ulcus cruris. Patofyziologické prejavy nadobúdajú endotelové bunky následkom poškodenia, ktoré vedie k zmenám ich metabolických, sekrečných a tým aj funkčných aktivít. Tieto zmeny môžu byť pre organizmus prospešné, ako je to pri obrannom zápale, alebo škodlivé- napr. pri poškodzujúcom zápale. Je veľmi pravdepodobné, že endotelová bunka, podobne ako makrofágy, neutrofilý a ďalšie bunky imunitného systému, sa môže nachádzať v 3 funkčne odlišných stavoch- pokojovom, primovanom (predaktivovanom) a aktivovanom stave. Na patofyziologických mechanizmoch sa zúčastňuje najmä aktivovaná endotelová bunka, kým funkčné aktivity pokojových buniek sa uplatňujú v normálnych fyziologických reakciách.

Význam úlohy bielych krviniek pri vzniku a rozvoji mikrocirkulačných zmien pri chronickej žilovej nedostatočnosti je už viac-menej potvrdený. Nerozriešenou ostáva otázka, prečo dochádza k zachytávaniu leukocytov na endotele postkapilárnych venúl a kapilár. V tomto smere sa zdá, že dôležitú úlohu zohráva jednak žilová hypertenzia a jednak hypoxia. Dormandy a kol. (1996) demonštroval, že u pacientov s venóznou hypertenziou až 30% bielych krviniek sa po hodine zachytí vo zvesenej dolnej končatine. Mechanizmus následnej aktivácie leukocytov je pravdepodobne sprostredkovaný lokálnou hypoxiou, prípadne aktivovaným komplementom (C5a). Stáza venózne krvi znižuje dodávku kyslíka a vytvára tak hypoxické podmienky. Pri inkubácii endotelových buniek ľudského pupočníka za hypoxických podmienok sa zistili viaceré zmeny ich metabolickej aktivity- endotelové bunky sa stali aktivovanými, čím okrem iného produkovali vo zvýšenej miere adhezívne molekuly pre neutrofilý [34].

Z pohľadu mikrocirkulačných porúch je zrejmé, že práve zmenami na úrovni mikrocirkulácie sa pravdepodobne dá vysvetliť staré klinické pozorovanie, že subjektívne ťažkosti pacientov nekorelujú vždy so závažnosťou postihnutia venózneho systému. Metličkovité varixy spôsobujú pacientom často výrazné bolesti a naopak pacienti s výraznými kmeňovými varixami sa často nestiažujú na žiadne subjektívne ťažkosti. Subjektívne symptómy pacientov môžu byť podmienené tým, či dochádza k zmenám v oblasti mikrocirkulácie alebo nie. Poruchy mikrocirkulácie u pacientov s chronickou žilovou nedostatočnosťou sa potvrdili kapilarskopicky aj laser- Dopplerovým vyšetrením prietoku krvi.

#### 2. 4. 1. 4. 2. DYSFUNKCIA ŽILOVÉHO ENDOTELU.

Ako už bolo uvedené vyššie, venóznym endotelom plní dve dôležité funkcie:

1. poskytuje optimálny prúdový povrch pre prúdiacu krv a
2. oddeľuje intravaskulárny priestor od extravaskulárneho.

Porucha týchto funkcií vedie ku vzniku komplikácií žilového ochorenia. Žilový endotel plní svoju funkciu prostredníctvom svojich špecifických fyzikálnych a chemických vlastností. Fyzikálne vlastnosti zahŕňujú napr. negatívny zeta potenciál (povrchový dozor), zohrávajúci úlohu v prevencii adhézie formovaných elementov krvi, ktoré takisto nesú negatívny povrchový náboj. V posledných rokoch sa získalo veľa poznatkov o sekrečnej úlohe endotelu, hoci väčšina sa týka arteriálneho endotelu, ktorý sa niekoľkými dôležitými vlastnosťami značne odlišuje od žilového endotelu. Napr. žilový endotel za fyziologických okolností má v porovnaní s arteriálnym endotelom má účinnejšiu fibrinolytickú aktivitu. Najdôležitejšími komponentami tohto fibrinolytického systému sú tkanivová urokináza a tkanivový aktivátor plazminogénu. Ďalším účinným antitrombotickým produktom žilového endotelu je prostacyklín, znižujúci adhéziu, agregáciu a aktiváciu trombocytov.

Z ďalších látok, ktoré sú syntetizované endoteliálnymi bunkami, treba spomenúť bradykinín, angiotenzín a adenonukleotidy, hoci ich presná funkcia v týchto procesoch nie je zrejmá. Aj keď je známe, že bývalý EDRF (Endothelium Derived Relaxing Factor) dnes označovaný jednoducho ako oxid dusnatý (NO), je produkovaný normálnym venóznym endotelom, nie je však objasnená produkcia jeho fyziologického oponenta- endotelínu. Niekoľko autorov porovnávalo vylučovanie tkanivového aktivátora plazminogénu, angiotenzín-konvertujúceho enzýmu a endotelínu žilovým endotelom na horných aj dolných končatinách. Poukázali na rozdiel v hladinách markerov aktivity endoteliálnych buniek medzi hornými a dolnými končatinami u normálnych subjektov [5, 75].

Štúdia Baillarta a spol. (1994) porovnávala hladiny tkanivového aktivátora plazminogénu (tPA), faktora inhibujúceho aktivátor plazminogénu (PAI-1), trombín- antitrombín komplexov (TAT), D-diméru (fibrín-degradačný produkt, D-di) ako indikátorov trombotického procesu a jeho reakcií; ďalej hladiny angiotenzín-konvertujúceho enzýmu (ACE) a endotelínu- 1 (ET1) ako markerov endoteliálnej bunkovej aktivity podieľajúcej sa na regulácii vasculárneho tonusu na štyroch rôznych končatinách 10 zdravých dobrovoľníkov mužského pohlavia po 10 minút trvajúcej venostáze. Celé meranie bolo zopakované so 7-dňovým odstupom pre lepšiu reprodukovateľnosť. Autori zistili rozdiely v hladine aktivity tkanivového



aktivátora plazminogénu. Venostáza zapríčinila signifikantné dvojnásobné zvýšenie jeho hladiny v žilách oboch horných končatín, 1,5-násobné zvýšenie v pravej dolnej končatine a nezmenenú hladinu vo vzorkách z ľavej dolnej končatiny. Rozdiel medzi hornými končatinami a ľavou dolnou končatinou bol štatisticky významný. Hladiny aktivity inhibítora aktivácie plazminogénu (PAI-1), angiotenzín- konvertujúceho enzýmu a endotelínu boli bez štatisticky signifikantného rozdielu medzi hornými a dolnými končatinami. Z markerov aktivácie koagulácie hladiny trombín-antitrombínových komplexov boli bez signifikantných zmien, naopak D-dimér bol signifikantne zvýšený v oboch horných končatinách a pravej dolnej končatine, kým v ľavej dolnej končatine hladina ostala bez signifikantnej zmeny (rozdiel medzi hornými končatinami a ľavou dolnou končatinou bol štatisticky významný). Na základe zmien hematokritu a koncentrácie proteínov sa zistilo, že venostáza indukuje signifikantnú hemokoncentráciu v horných aj dolných končatinách. Meranie bolo zopakované po 7-dňovom intervale, pričom neboli zistené žiadne rozdiely medzi oboma súbormi meraní. Meranie bolo vykonané po venostáze, čo by mohlo vysvetľovať prítomnosť endotelínu v zjavne normálnom žilovom endotele [4].

Celková endoteliálna reaktivita vyvolaná venostázou bola výraznejšia na horných končatinách v porovnaní s dolnými, pričom ľavá dolná končatina sa ukázala byť najmenej reaktívnou. Rovnaký stimul (venostáza) teda vyvoláva rozdielne účinky (hemokocentrácia a endoteliálna reaktivita) v závislosti od anatomickej oblasti jeho pôsobenia. Rozdiel medzi hornými a dolnými končatinami môže odrážať fyziologickú adaptáciu na žilový hydrostatický tlak. O vysvetlenie sa snažia 2 hypotézy: prvá rozdiel vysvetľuje vyčerpaním endoteliálnej bunkovej odpovede na venostázu vďaka permanentnej lokálnej stimulácii, druhá adaptáciou venózne a kapilárnej filtrácie. Permanentná stimulácia endoteliálnych buniek môže zahŕňať vyčerpanie syntetickej kapacity alebo vylučovania ako odpoveď na permanentnú venóznou hypertenziu.

Regionálne rozdiely endoteliálnej reaktivity môžu byť vysvetlené hydrostatickým tlakom aplikovaným na dolné končatiny počas státia. Keďže však hydrostatický tlak účinkuje rovnako na obe dolné končatiny, faktor zodpovedný za rozdiel v endoteliálnej aktivite medzi oboma dolnými končatinami bude pravdepodobne anatomický: kompresia ľavej vena iliaca communis aortou a colon sigmoideum ovplyvňuje venóznou návrat z ľavej dolnej končatiny viac, ako z pravej. Táto štúdia demonštruje rozdiely v endoteliálnej reaktivite žíl horných a dolných končatín a pomáha vysvetliť dôvody prečo žilová trombóza postihuje prevažne žily dolných končatín, častejšie ľavej.

Porucha žilovej endoteliálnej funkcie vedie k trombóze, zvýšenej permeabilite ciev a následnému tkanivovému edému alebo k vylučovaniu škodlivých substancií, čo vedie k extravaskulárnemu zápalu, nožnej ischémii a nekróze. Možné príčiny endoteliálnej dysfunkcie majú rozsah od dlhodobých účinkov venóznei hypertenzie cez distenziu až po aktivitu krvných elementov, hlavne bielych krviniek [4].

Thulesius (1993) prepokladá, že kontrakcia normálnej žily po noradrenalíne je závislá od normálneho žilového endotelu, pričom odstránenie endotelu oslabuje venokonstrikcii. Vyslovil hypotézu, že u varikózných žíl s endotelom poškodeným zvýšeným tlakom a distenziou žily je noradrenalínom indukovaná venokonstrikcia oslabená, čo vedie k vazodilatácii [106]. Spojitosť medzi redukovanou žilovou endoteliálnou fibrinolytickou aktivitou a klinickým trombotickým ochorením bola už niekoľkokrát opísaná. Redukovaná fibrinolytická žilová endoteliálna aktivita bola opísaná u pacientov s rekurentnou trombózou, ako aj u pacientov s ťažkou chronickou žilovou nedostatočnosťou [34].

V našej práci v rámci porovnávania expresie izoforiem syntáz oxidu dusnatého (NOS) sme porovnávali aj expresiu eNOS v stene 10 varikózných a 10 zdravých žíl, pričom sme zistili signifikantne nižšiu a diskontinuálnu expresiu eNOS v skupine varikózných žíl, čo koreluje s faktom že eNOS je exprimovaná intaktným endotelom a teda endotel varikózných žíl je porušený endotel s jeho porušenou funkciou.

## Research Article

# Expression of Constitutive Nitric Oxide Synthase Isoforms in Varicose Vein Wall; Preliminary Results

Zora Haviarová,<sup>1</sup> Andrea Janegová,<sup>2</sup> Pavel Janega,<sup>2,3</sup> Štefan Durdík,<sup>4</sup> Peter Kováč,<sup>5</sup>  
Viera Štvrtinová,<sup>6</sup> and Peter Mráz<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Comenius University, Sasinkova 2-4, 81372 Bratislava, Slovakia

<sup>2</sup> Department of Pathology, Faculty of Medicine, Comenius University, Sasinkova 2-4, 81372 Bratislava, Slovakia

<sup>3</sup> Institute of Normal and Pathological Physiology, Slovak Academy of Sciences, Sienkiewiczova 1, 813 71 Bratislava, Slovakia

<sup>4</sup> 1st Surgical Clinic, University Hospital and Medical Faculty, Comenius University, Mickiewiczova 13, 81369 Bratislava, Slovakia

<sup>5</sup> Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Comenius University, Sasinkova 2-4, 81372 Bratislava, Slovakia

<sup>6</sup> 2nd Internal Clinic, University Hospital and Faculty of Medicine, Comenius University, Mickiewiczova 13, 81369 Bratislava, Slovakia

Correspondence should be addressed to Zora Haviarová, zora.haviarova@fmed.uniba.sk

Received 22 February 2011; Revised 22 March 2011; Accepted 3 April 2011

Academic Editor: John A. Kern

Copyright © 2011 Zora Haviarová et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

There are conflicting findings in literature about the structural changes of the primary varicose veins. NO (a potent vasodilator) is synthesized by nitric oxide synthase (NOS). From 3 known NOS isoforms the two are constitutional: eNOS (endothelial NOS) and nNOS (neuronal NOS). 10 varicose and 10 control vein samples were processed by standard light microscopy and immunohistochemical techniques using rabbit polyclonal antibodies against eNOS and nNOS. Antibodies expression was evaluated semiquantitatively and proved morphometrically by 2D-image analysis. total area of NOS isoforms expressions was determined by color analysis and color digital subtraction. The results showed discontinuous and significantly lower expression of both NOS isoforms in the tunica media of varicose veins compared with the control group. For the statistical analysis the unpaired *t*-test was used. Our results suppose lower NO levels in varicose vein wall, deducing that varicose dilatation is due to other mechanism, and they contradict the results of previously published similar works.

## 1. Introduction

Varicose veins are dilated, tortuous, and elongated veins affecting especially the superficial veins of the lower limbs. Beside the post-thrombotic syndrome and crural ulcer, they represent only one of the symptoms of the chronic venous disease—a relatively frequent vascular disease affecting the lower limbs veins of the persons in productive age [1]. The incidence of the chronic venous disease accounts for about 40–60% in females and 15–30% in males in the developed countries of Europe and USA [2]. According to its etiology we distinguish its primary form (cause unknown) and secondary form (occurring usually as a consequence of the survived deep lower limb phlebothrombosis). As the exact cause of the primary form has not yet been revealed, the therapy of this form still resides mainly in reducing

the symptoms. The cause of the primary form of varicosis remains to be the subject of interest of several investigators in the world. There is etiopathogenetic association between

- (a) venous wall weakness associated with alterations in connective tissue and smooth muscle cells [3, 4],
- (b) altered function of the venous endothelium [5],
- (c) venous valve damage [6, 7],
- (d) alterations in microcirculation and venous wall nourishment [8, 9].

*1.1. Nitric Oxide (NO).* Is an important cellular-signaling molecule, a potent vasodilator due to the smooth muscle relaxation. It also inhibits platelet adherence and aggregation, reduces adherence of leukocytes to the endothelium [10]. Furthermore, NO has been shown to inhibit DNA

synthesis and mitogenesis, and the proliferation of vascular smooth muscle cells. These antiproliferative effects are likely to be mediated by cyclic GMP [11].

**1.2. Nitric Oxide Synthases (NOS).** From the biochemical point of view, are a family of complex enzymes catalyzing the oxidation of L-arginine to form NO and L-citrulline. The three human NOS isoforms identified to date are: eNOS (endothelial NOS), nNOS (neuronal NOS), and iNOS (inducible NOS). Their genes are found on human chromosomes 7, 12, and 17, respectively, and so they were named for the tissue in which they were first cloned and characterized [10]. vasculoprotective effect of individual NOS isoforms in human organism is not sufficiently clarified yet [12]. Endothelial NOS (eNOS) and neuronal NOS (nNOS) are constitutively expressed, mainly in endothelial cells and nitrenergic nerves, respectively, synthesizing a small amount of NO under basal conditions and on stimulation by various agonists. By contrast, inducible NOS (iNOS) is expressed when stimulated by inflammatory stimuli, synthesizing a large amount of NO in a transient manner. The knowledge of nitric oxide synthases (NOSs) is of extreme scientific importance, not only for understanding new pathophysiological mechanisms but also as a target for therapeutic intervention.

**1.3. Endothelial Constitutive Nitric Oxide Synthase (eNOS).** The role of NO in regulating vascular tone and mediating platelet function is attributable to the ongoing activity of eNOS. It is pharmacologically identical with previously isolated EDRF (endothelium-derived releasing factor), exprimed by the intact endothelium [13]. Inactivation of the eNOS pathway limits the contribution of NO to vessel homeostasis and results in increased vascular tone and platelet adhesion and aggregation. The activity of eNOS is regulated by the intracellular free calcium concentration and calcium-calmodulin complexes. Endothelial NOS is a constitutively expressed protein predominantly associated with the particulate subcellular fraction, suggesting that the native enzyme is a membrane-bound protein. A detailed analysis of the membrane association of eNOS showed that this enzyme is localized to the Golgi apparatus as well as to specific structures in the plasmalemmal membrane called caveolae. The association of eNOS with a region of the plasma membrane in which several key signal-transducing complexes are concentrated (such as G-proteins) is likely to have profound repercussions on enzyme activity as well as on its accessibility to intracellular mechanisms of the pathway release, including mechanisms independent of intracellular calcium release [10].

**1.4. Neuronal Constitutive Nitric Oxide Synthase (nNOS).** This isoform is present in central and peripheral neuronal cells and certain epithelial cells. Its activity is also regulated by  $Ca^{2+}$  and calmodulin. Its functions include long-term regulation of synaptic transmission in the central nervous system, central regulation of blood pressure, smooth muscle relaxation, and vasodilation via peripheral nitrenergic nerves. It has also been implicated in neuronal death in

TABLE 1: Varicose vein group of samples.

	Males	Females	Together
Number	5	5	10
Average age (in the time of pickup, in years)	29,8	32,8	31,3
Age range (years)	22–37	24–42	22–42
Median (in years)	30	30	30

TABLE 2: Control group of healthy (non-dilated) samples.

	Males	Females	Together
Number	7	3	10
Average age in the time of pickup (in years)	26,1	30,3	27,4
Age range (years)	19–40	20–39	19–40
Median (in years)	26	32	26,5

cerebrovascular stroke [10]. NO plays also an important role in the pathophysiology of some neurodegenerative diseases. The presence of NO and NOS should be proved indirectly through the histochemic positivity of nicotinamide dinucleotide phosphate diaphorase (NADPHd) [14]. It was proposed that nerve stimulation directly activated the release of NO from nitrenergic nerves and, in fact, NO appears to be the dominant neurotransmitter responsible for the nerve-mediated, endothelium-independent vasodilation [13]. Esteban et al. (1998) documented the nNOS presence in the livers of cat and rat; deducing from this that nitrenergic fibres should be involved in the blood flow regulation and further metabolic functions of this organ [15].

Abd-El-Aleem et al. (2000) reported increased levels of eNOS and iNOS in the chronic venous ulcers compared with normal skin [16]. Howlader and Smith (2002) found an increased levels of total NO in the blood of patients with severe forms of chronic venous disease (healed venous ulcers and lipodermatosclerosis) [17]. Our study was aimed to find a linkage between the NOSs and the venous dilatation of primary varicose veins. The changes in NOSs isoforms expression should help to elucidate the cause of the vessel wall structural changes of the primary varicosis.

## 2. Material and Methods

10 varicose vein samples of great saphenous veins [18] (5 males and 5 females, see Table 1 for the age structure of varicose vein group of samples) taken by the stripping surgery in years 1997–2005 were compared with 10 control samples of the lower limb superficial veins (7 males and 3 females, see Table 2 for the age structure of the control group of samples) taken from the necroptic material of the Institute of Forensic Medicine (faculty of medicine, Comenius University) in years 1999–2004 with no previous history of any venous disease and no histological signs of venous wall alterations, usually described by varicose vein wall (phlebosclerosis, intimal thickening, fibrosis of tunica media, smooth muscle reduction, and clot formation). The

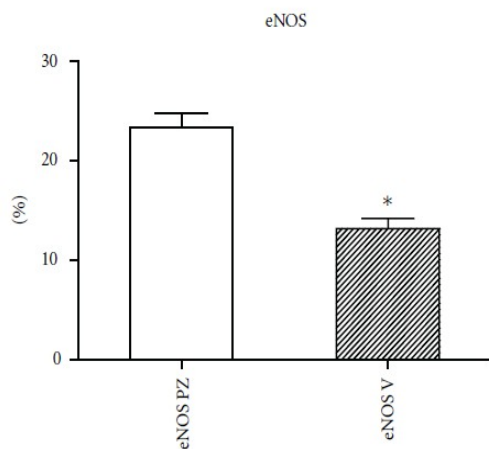


FIGURE 1: The graph of the morphometric analysis results of the expression of eNOS in varicose and control groups of samples ( $P < .0001$ ).

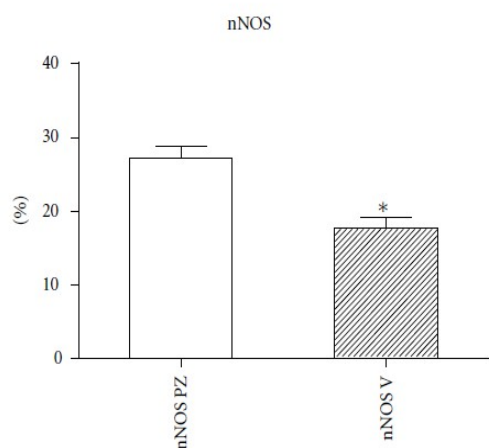


FIGURE 2: The graph of morphometric analysis results of the expression of nNOS in varicose and control groups of samples ( $P < .0001$ ).

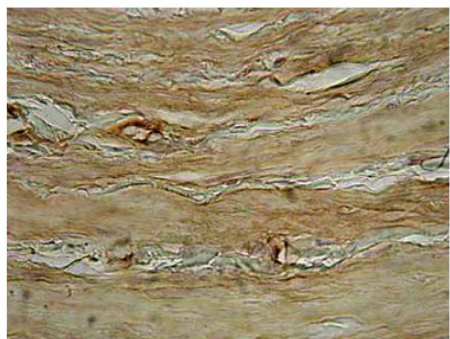


FIGURE 3: Expression of eNOS in the tunica media of control (healthy) vein (magnification 400x, DAB).



FIGURE 4: Expression of eNOS in the tunica media of varicose vein (magnification 400x, DAB).

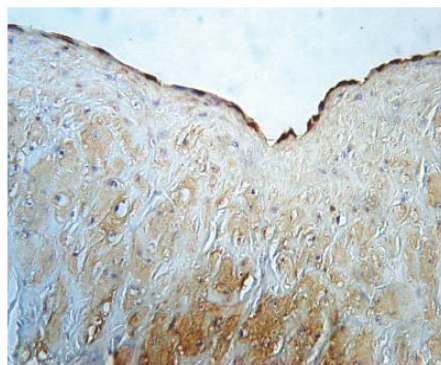


FIGURE 5: Continuous eNOS cytoplasmic expression in the endothelial lining of the control (healthy) vein sample (magnification 400x, DAB).

samples were immediately fixed in the buffered formalin, processed by the standard light microscopy method into the paraffin blocks. The sections were then processed by the standard immunohistochemic technique using the rabbit polyclonal antibodies against both constitutive NOS isoforms (eNOS from SantaCruz, USA and nNOS from BioScience, USA). The expression of the antibodies was evaluated semiquantitatively and also proved morphometrically. By the semi quantitative evaluation, we concentrated on the histologic characteristics of each section and the localization and intensity of marker positivity in the vein wall layers (- negative, +/- irregular positivity, + weak positivity, ++ medium positivity, +++ strong positivity). The semi quantitative analysis was proved morphometrically by the 2D image analysis (ImageJ 1.34n, National Institute of Health, USA). The total area of NOS constitutive isoform expressions in tunica media was then determined by the color analysis (the brown color of NOS expression) and by the color digital subtraction was determined its portion of the total area of tunica media. For the statistical analysis was used unpaired *t*-test.

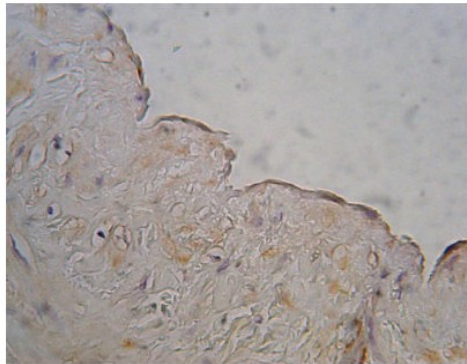


FIGURE 6: Discontinuous, weak eNOS cytoplasmic expression in the endothelial lining of the varicose vein sample (magnification 630x, DAB).

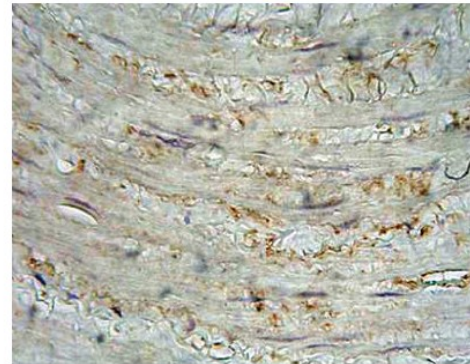


FIGURE 8: Expression of nNOS in the tunica media of varicose vein sample (magnification 400x, DAB).



FIGURE 7: Expression of nNOS in the tunica media of control (healthy) vein sample (magnification 400x, DAB).

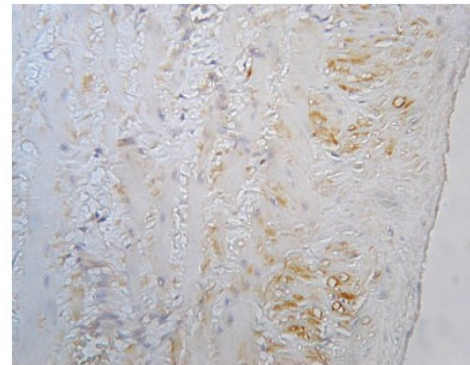


FIGURE 9: Enhanced nNOS positivity in the tunica intima (compared with tunica media) of varicose vein of 30-year-old man (V54), magnification 400x, DAB.

### 3. Results

The histomorphological and semi quantitative evaluation of eNOS and nNOS isoforms showed discontinuous and significantly lower expression of both followed constitutive NOS isoforms in the tunica media of the varicose veins compared with control group, where the expression of both NOS isoforms was continuous (see Figures 1 and 2).

*For the Endothelial Isoform of NOS (eNOS).* We found continuous and diffuse expression of the followed marker in tunica intima and media of the control samples, whereas in the varicose samples, its expression was discontinuous. Enhanced eNOS positivity was observed especially in the endothelial lining of the vessels; in the healthy control samples its expression was continuous over the whole endothelial lining, and in the majority of the varicose samples its positivity showed discontinuity and interruptions in its expression (Figures 3, 4, 5, and 6).

*For the Neuronal NOS Isoform (nNOS).* The histomorphological and semi quantitative evaluation showed lower and

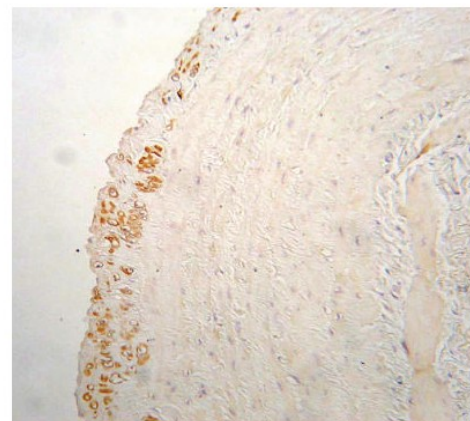


FIGURE 10: Enhanced nNOS positivity in tunica intima (compared with tunica media) of varicose vein of 32-year-old man (V55), magnification 200x, DAB.

discontinuous expression of nNOS in tunica intima and tunica media of the varicose vein samples in comparison with the control samples (Figures 7 and 8). The only exceptions were two varicose samples (V54, V55); in these varicose samples the nNOS expression was higher in tunica intima than in tunica media (Figures 9 and 10). Both samples represent the varicose great saphenous vein samples of relatively young men (30 and 32 years, resp.), taken by the stripping surgery in the years of 2004 and 2005.

#### 4. Discussion

Abd-El-Aleem et al. found increased levels of total NOS, eNOS, iNOS, and arginase in the skin of chronic venous ulcer by using immunocytochemistry, western blotting, and enzyme assays [16]. Howlader and Smith (2002) observed by the colorimetric method raised levels of total NO in the blood plasma of the patients with severe chronic venous disease—healed venous ulceration and lipodermatosclerosis (corresponding to C4 and C5 of CEAP classification). In the less severe CEAP stages of the chronic venous disease (C2 and C3) the difference of total NO levels between diseased and control subject was not statistically significant [17].

In our study, the stage of CEAP of the varicose (dilated) venous samples was not associated (not marked). So retrospectively, deducing from the fact that these varicose great saphenous veins were decided for extraction (performing the stripping surgery); these venous samples belonged to C2–C6 stages (according to CEAP classification.)

For the endothelial NOS (eNOS), we confirmed the enhanced eNOS expression in the endothelial lining in both followed groups: in the healthy (control) samples, the eNOS expression was diffuse and continuous; whereas in the varicose samples the eNOS expression was discontinuous (Figures 5 and 6). This fact confirms that eNOS is expressed by the intact endothel, and that varicose veins are characterized by impaired endothelial function.

The expression of nNOS was also significantly lower and discontinuous in varicose compared with control (healthy) vein samples; deducing that varicose dilatation is due to other mechanisms than potentiated by peripheral nitrergic fibres in the varicose vein wall. The enhanced positivity of nNOS in the tunica intima of two varicose samples (V54 and V55, Figures 9 and 10) is probably due to other unrecognized coincidental disease; by other varicose samples the expression of these two markers in tunica intima copied its expression in tunica media. As was mentioned above, both samples were varicose great saphenous veins of 30 and 32-years-old males (respectively), and there was no difference between the fixation and processing of these two samples compared with the rest of group.

Our summarized results are contradicting the results of the two above-mentioned studies [16, 17], using two other different methods for the total NOS and eNOS evaluation, which should perhaps be also due to supposed earlier CEAP stages of venous samples in our study (not associated). Nevertheless, our results should be confirmed by the measurement on more numerous sample groups with marked associated CEAP stage of venous disease. From our

findings, we can now suppose that enhanced NO is not responsible for varicose dilatation (especially in the earlier CEAP stages), and so the venous wall weakness (the most probable reason of primary varicosity) is a consequence of some other pathophysiological mechanism.

#### 5. Conclusion

Our results of significantly lowered expressions of both constitutive NOS isoforms suppose the lower nitric oxide (NO) levels in varicose vein wall, deducing that the varicose dilatation is due to other mechanism, although the stage of chronic venous disease of the varicose vein samples was undetermined (retrospectively deducing to the C2–C6 stages of CEAP); but we confirmed the impaired function of the varicose vein endothelium. These results shall also suggest that NO level in varicose vein wall should undergo changes depending on the stage of severity of chronic venous disease.

Several possibilities exist for proving the results of our work, we suggest to repeat the method on more numerous groups of samples (with marked CEAP stage of chronic venous disease) to compare Ca<sup>2+</sup> presence in vein walls and to check the NOS and NO presence by the indirect histochemical evidence of NADPHd positivity; the comparisons of iNOS expression and the expressions of selected inflammatory stimuli are known for their potentiation of iNOS expression (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , etc.) As all NOS isoforms utilize L-arginine as the substrate, with molecular oxygen being the co-substrate [11], L-arginine inhibitors together with ischemia should be considered in the prevention of venous dilatation in case that results of our preliminary work fail to be confirmed by further studies.

#### References

- [1] J. J. Bergan, "Development of primary varicose veins," *Phlebology*, no. 18, pp. 3–8, 1998.
- [2] V. Štvrtinová, J. Kolesar, and G. Wimmer, "Prevalence of varicose veins of the lower limbs in the women working at a department store," *International Angiology*, vol. 10, no. 1, pp. 2–5, 1991.
- [3] J. P. Travers, C. E. Brookes, J. Evans et al., "Assessment of wall structure and composition of varicose veins with reference to collagen, elastin and smooth muscle content," *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, vol. 11, no. 2, pp. 230–237, 1996.
- [4] M. Venturi, L. Bonavina, F. Annoni et al., "Biochemical assay of collagen and elastin in the normal and varicose vein wall," *Journal of Surgical Research*, vol. 60, no. 1, pp. 245–248, 1996.
- [5] V. Štvrtinová, "Pentoxifylin v liečbe chronickej žilovej insuficiencie," *Praktická Flebológia*, vol. 3, pp. 131–134, 1999.
- [6] L. Corcos, G. Peruzzi, V. Romeo, T. Procacci, and S. Dini, "Peripheral venous biopsy: significance, limitations, indications and clinical applications," *Phlebology*, vol. 4, no. 4, pp. 271–274, 1989.
- [7] O. Thulesius, "The venous wall and valvular function in chronic venous insufficiency," *International Angiology*, vol. 15, no. 2, pp. 114–118, 1996.
- [8] D. Kachlík, V. Báča, P. Fara et al., "Blood vessels of the normal and pathologically changed wall of the human vena saphena

- magna," *Central European Journal of Medicine*, vol. 3, no. 4, pp. 475–481, 2008.
- [9] T. Ono, J. J. Bergan, and G. W. Schmid-Schonbein, "Infiltrace žilních chlopní monocytů," *Journal of Vascular Surgery*, vol. 27, pp. 158–166, 1998.
- [10] F. Viaro, F. Nobre, and P. R. B. Evora, "Expression of nitric oxide synthases in the pathophysiology of cardiovascular diseases," *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, vol. 74, no. 4, pp. 380–393, 2000.
- [11] H. Li and U. Förstermann, "Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease," *Journal of Pathology*, vol. 190, no. 3, pp. 244–254, 2000.
- [12] K. Yogo, H. Shimokawa, H. Funakoshi et al., "Different vasculoprotective roles of NO synthase isoforms in vascular lesion formation in mice," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 20, no. 11, pp. E96–E100, 2000.
- [13] J. A. Donald and B. R. S. Broughton, "Nitric oxide control of lower vertebrate blood vessels by vasomotor nerves," *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, vol. 142, no. 2, pp. 188–197, 2005.
- [14] J. Kafka, N. Lukáčova, D. Čížková, and J. Maršala, "Zmeny v aktivite syntázy oxidu dusnatého v mieche po ligácii koreňov cauda equina v experimente," *Ceska a Slovenska Neurologie a Neurochirurgie*, vol. 70, no. 5, pp. 505–511, 2007.
- [15] F. J. Esteban, A. Jiménez, J. B. Barroso et al., "The innervation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver: protein gene product 9.5 and neuronal nitric oxide synthase immunoreactivities," *Journal of Anatomy*, vol. 193, no. 2, pp. 241–249, 1998.
- [16] S. A. Abd-El-Aleem, M. W. J. Ferguson, I. Appleton et al., "Expression of nitric oxide synthase isoforms and arginase in normal human skin and chronic venous leg ulcers," *Journal of Pathology*, vol. 191, no. 4, pp. 434–442, 2000.
- [17] M. H. Howlader and P. D. Smith, "Increased plasma total nitric oxide among patients with severe chronic venous disease," *International Angiology*, vol. 21, no. 2, pp. 180–186, 2002.
- [18] D. Kachlík, V. Pechacek, V. Musil, and V. Báča, "Information on the changes in the revised anatomical nomenclature of the lower limb veins," *Biomedical Papers*, vol. 154, no. 1, pp. 93–98, 2010.

#### 2. 4. 1. 5. PORUCHY VÝŽIVY CIEVNEJ STENY.

Cievne zásobenie steny povrchových žíl dolnej končatiny je taktiež predmetom záujmu mnohých bádateľov už niekoľko posledných desaťročí. Jeho bližšie poznanie je dôležité nielen z flebologického hľadiska (chronická vénová choroba dolných končatín, varikozita), ale aj kvôli častému a mnohostrannému využitiu povrchových žíl dolnej končatiny (hlavne vena saphena magna) v cievnej chirurgii (in situ by-passy DK, aorto-koronárne bypassy). V tejto súvislosti stoja za zmienku práce českého autora Kachlíka D. a kol. [52, 53], ktoré kvalitatívne popisujú architektóniku a štruktúru vasa vasorum. Popisuje, že prírodné cievy prichádzajú ku kmeni VSM šikmo alebo kolmo v zväzku obsahujúcom 1 artériu a 1 vénu (priemery oboch ciev cca 100-150  $\mu\text{m}$ ) v intervaloch okolo 15mm, pochádzajú z cievneho rie-



čišťa okolitého tukového väziva a počas svojho priebehu k vlastnému povrchu VSM zvyčajne prerážajú jej jemný väzivový obal (tzv. Caggiatiho kompartment). V miestach, kde sa do kmeňa VSM vlievajú jej nasilnejšie vetvy, ústia niektoré odvodné žily (vena vasorum) samostatne a nezávisle na priebehu artérií do koncových úsekov týchto tributárnych žíl. V adventícii VSM sa prívodné tepny a žily rovnako delia do pozdĺžnych vetiev, ktoré vytvárajú povrchovú anastomotickú sieť vasa vasorum, zloženú z rôzne veľkých ok nepravidelných tvarov. Intramurálne vasa vasorum sú postupne tvorené drobnými arteriolami uloženými tiež v adventícii, ktoré sa do hĺbky média ďalej vetvia do bohatej kapilárnej siete. Početné a štíhle oká kapilárnej siete majú prevažne pozdĺžny pretiahnutý tvar, pričom dlhé osy týchto ok sú rovnobežné s pozdĺžnou osou VSM a vytvárajú tak riedku trojrozmernú sieť, ktorou naprieč prebiehajú jednotlivé hladké svalové bunky média. Kapiláry sa postupne zbierajú do početných postkapilárnych venúl pokračujúcich postupným spájaním do zberných venúl a nadradených žíl. Vo všetkých normálnych žilách VSM bolo zistené, že najhlbšie kapiláry boli uložené v strednej vrstve média žilovej steny, približne 100  $\mu\text{m}$  od lumena a preto vnútorná tretina média a tenká vrstva intimy zostávali vždy avaskulárne. V žiadnom prípade nebola nájdená priama komunikácia medzi systémom vasa vasorum a vlastným lumenom VSM. Dôkazom toho bola skutočnosť, že pri žiadnej z použitých injekčných techník (tuš, Mercox) sa použitý materiál nedostal do lumena žily a naopak po náplni VSM sa nikdy nepodarilo retrográdne nastreknúť žiadnu časť riečišťa vasa vasorum. Intimálna hyperplázia (fleboskleróza) bola vo forme lokálneho alebo difúzneho zhrubnutia intimy bežne nachádzaná vo väčšine prípadov aj u makroskopicky nevarikózných žíl, t.j. u väčšiny pacientov, ktorým boli odobrané časti VSM za účelom aorto-koronárnych by-passov. Vo väčšine týchto prípadov sa zistilo, že vasa vasorum sú často zmnožené a takmer pravidelne prerastajú aj do najhlbších vrstiev média, zatiaľčo celá vrstva hyperplastickej intimy (často až hrúbky 200 $\mu\text{m}$ ) zostávala vždy kompletne avaskulárna. Lymfatické cievy neboli pozorované v žiadnej zo skúmaných vrstiev žilovej steny.

V stene primárne varikózných žíl ľahšieho stupňa neboli nájdené výraznejšie kvalitatívne rozdiely v jej morfológii, okrem flebosklerózy rôzneho stupňa. U ťažších stupňov primárnej varikozity boli difúzne prítomné drobné nepravidelné lokálne dilatácie a tortuozita adventiciálnych venúl, ostatné súčasti riečišťa vasa vasorum si zachovávali normálnu úpravu. V skupine najťažších varikózných zmien boli naopak pravidelne pozorované nápadné a difúzne zmnoženie vasa vasorum a ich vrastanie do zóny hyperplastickej média a intimy, prípadne

až do vnútra organizujúcich sa trombov, väčšinou sprevádzané difúznou degradáciou elastických membrán média [52, 53].

#### **2. 4. 1. 6. PATOLOGICKÁ BUNKOVÁ INFILTRÁCIA ŽILOVEJ STENY PRI VZNIKU A VÝVOJI VARIKÓZNYCH ŽÍL.**

Tunica adventitia krvných ciev sa všeobecne považuje za podporné spojivové tkanivo vďaka bohatej spleti kolagénových zväzkov a niekoľkým celulárnym zložkám. Za určitých okolností (napr. abdominálna aneuryzma aorty, vazospazmus, varikózne žily) bolo možné v tunica adventitia pozorovať príznaky zápalových zmien. Na druhej strane poškodenie tunica adventitia podnecuje fibrózne zhrubnutie tunica intima. Z toho vyplýva, že tunica adventitia by mohla byť patofyziologicky aktívnou zložkou a nielen pasívnou štrukturálnou zložkou cievnej steny, ako sa dosiaľ predpokladalo.

Žirné bunky sú ubikvitárne v spojivovom tkanive v celom ľudskom organizme, cievy nevytvárajú. Pochádzajú z kmeňových buniek kostnej drene. Ich progenitorové bunky vstupujú do krvného prúdu z kostnej drene, migrujú do spojivového tkaniva, kde sa diferencujú na zrelé žirné bunky. Pre dozrievanie a diferenciáciu žirné bunky vyžadujú T-lymfocytárne faktory interleukín 3 a interleukín 4 a priamu interakciu s fibroblastmi. Dospelé žirné bunky sú známe produkciou, ukladaním a uvoľňovaním takých farmakologických substancií ako histamín, tryptáza, deriváty kyseliny arachidónovej, heparín, leukotrién C, prostaglandíny a cytokíny. Nedávno bolo ozrejmene, že žirné bunky sú najväčším zdrojom bazického rastového faktora fibroblastov (*basic fibroblast growth factor - bFGF*). *bFGF* je multifunkčný polypeptid, ktorý kontroluje rast a diferenciáciu rôznych typov buniek vrátane fibroblastov. Predpokladá sa, že *bFGF* hrá významnú úlohu vo fibroproliferatívnych poruchách ako sú napr. Dupuytrenova kontraktúra, pľúcna fibróza a hepatálna fibróza indukovaná chloridom uhličitým (carbon tetrachlorid). V niekoľkých nedávnych štúdiách sa objavili správy o prítomnosti zvýšenej infiltrácie žirných buniek v tunica adventitia krvných ciev, čo sa dávalo do súvislosti so vznikom aterosklerózy a vazospazmu vďaka spomenutým vazoaktívnym substanciám uvoľňovaným zo žirných buniek. Skupina japonských autorov prepokladajú priamu súvislosť ich zvýšenej infiltrácie v žilovej stene so vznikom a vývojom varikózných žíl realizovala dve štúdie so zameraním na porovnanie prítomnosti a ultraštrukturálnych rozdielov žirných buniek v stene varikózných a normálnych žíl [114, 115].

Yamada a spol. (1996) metódami kvantitatívnej svetelno-mikroskopickej analýzy porovnávali kvantitatívnu prítomnosť žírnych buniek v 11 vzorkách varikózných povrchových žíl (venae saphenae magnae) v porovnaní s 11 vzorkami nedilatovaných úsekov varikózných venae saphenae magnae od rovnakých pacientov a 5 vzorkami nevarikózných nedilatovaných povrchových žíl dolných končatín odobratých za účelom koronárnej bypassovej operácie. V 9 z 11 varikózných vzoriek zistili signifikantne vyššiu infiltráciu žírnych buniek vo varikózných úsekoch žíl v porovnaní s nedilatovanými úsekmi, rovnako nedilatované úseky varikózných žíl vykazovali signifikantne vyššiu infiltráciu žírnych buniek v porovnaní so vzorkami bypassových žilových štepov. Čo sa týka lokalizácie, v kontrolných vzorkách boli žirne bunky jednotlivo roztrúsené v okolí vasa vasorum v tunica adventitia. Zvyčajne boli veľké a oválne, malé a zahrotené alebo v tvare hviezdy, nikdy neboli prítomné v tunica media alebo tunica intima. Avšak vo varikózných léziách bolo pozorovaných niekoľko žírnych buniek aj v tunica intima a tunica media. V adventícii žíl tvorili často malé zhluky.

V nasledujúcej elektrónovo-mikroskopickej štúdií Yamada a spol. (1997) porovnával ultraštruktúrne rozdiely žírnych buniek prítomných v žilovej stene varikózných a normálnych povrchových žíl dolných končatín (vena saphena magna a vena saphena parva). Porovnávalo sa medzi 18 vzorkami varikózných povrchových žíl dolnej končatiny a 9 vzorkami povrchových žilových štepov z dolnej končatiny bez prítomnosti varikozít. Ultraštruktúra typických žírnych buniek v zdravých povrchových žilách dolných končatín bola charakterizovaná cytoplazmou s veľkým počtom veľkých heterogénnych granúl. Mnohé z granúl vykazovali pseudokryštalickú štruktúru s lamelami, závitnicami a mriežkovaním. Cytoplazmatické organely zahŕňali dobre vyvinutý Golgiho aparát, voľné ribozómy a vezikuly. Na bunkovom povrchu sa nachádzalo mnoho dlhých, tenkých výbežkov a záhybov. Zvyčajne boli zaliate v tkanive bohatom na kolagén. Vo vzorkách varikózných povrchových žíl dolných končatín žirne bunky mali mikroklky prebiehajúce k fibroblastom a lymfocytom, čo prepokladá úzky kontakt a interakciu medzi bunkami. V bunkách sa nachádzali granule bez kryštalickej štruktúry a so zníženou elektrónovou denzitou spolu s originálnymi kryštalickými granulami, ktoré boli považované za vylučujúce formy. Niekoľko žírnych buniek vykazovalo degranuláciu charakterizovanú početnými cytoplazmatickými degranulačnými kanálmi so zmenenými granulami.

Uvedené pozorovania prepokladajú bunkou sprostredkovaný mechanizmus spôsobujúci premenu granúl žírnych buniek na vylučovací typ. Avšak spúšťací faktor uvoľňovania

mediátorov ostáva zatiaľ neznámy, mechanizmus uvoľňovania sa však zdá byť odlišný od mechanizmu spúšťania mechanizmu náhlej hypersenzitívnej reakcie. Prirodzená anamnéza vývoja varikózných žíl je zvyčajne pomalá, takže sa zdá, že k nemu skôr prispievajú dlhodobé pôsobiace substancie ako krátko účinkujúci histamín. Dokonca sa predpokladá, že fibróza tunica media a tunica adventitia, objavujúca sa u varikózných povrchových žíl dolných končatín by mohla byť spôsobená bázickým rastovým faktorom fibroblastov (bFGF) [114, 115].

Prítomnosť žírnych buniek v tunica adventitia varikózných žíl pozorovala aj Prokopová a spol. (1998), ktorí okrem zmnoženia a rozšírenia vasa vasorum varikózných žíl zasahujúcich až do tunica intima tu nachádzali prítomné vo všetkých troch cievnych vrstvách tzv. Staubesandove degeneratívne formy myocytov s elektrónovo-mikroskopicky pozorovateľnou vakuolizáciou ich cytoplazmy [87].

Ono, Bergan a kol. (1998) zas pozoroval infiltráciu lístkov chlopní a žilovej steny monocytmi a makrofágmi všetkých vzoriek varikózných žíl súboru, pričom v kontrolnom súbore podobná infiltrácia nebola zistená. Autor dospel k záveru, že chronická infiltrácia štruktúr žilovej steny makrofágmi by mohla predstavovať jednu z príčin poškodenia žilových chlopní pri refluxe v safenóznych žilách a dôvodom týchto zmien by mohlo byť zachytávanie leukocytov vo valvulárnych sínusoch žilových chlopní [78].

Naša práca skúmala infiltráciu žírnych buniek v stene varikózných žíl: V stene varikózných žíl sme zistili nesignifikantne nižšiu hustotu mastocytov v porovnaní so stenou zdravých žíl.

## Mast cell infiltration in the wall of varicose veins

Zora Haviarová<sup>1\*</sup>, Peter Weismann<sup>1</sup>, Danica Pavlíková<sup>2</sup>, Štefan Durdík<sup>3</sup>, Peter Kováč<sup>4</sup>, Viera Štvrtinová<sup>5</sup>, and Peter Mráz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Anatomy, <sup>2</sup>Institute of Histology and Embryology, <sup>3</sup>First Surgical Clinic, <sup>4</sup>Institute of Forensic Medicine, and <sup>5</sup>Second Internal Clinic, Medical Faculty, Comenius University, Bratislava, Slovak Republic

Received 19 February 2002 and in revised form 3 June 2002 and 5 July 2002; accepted 5 July 2002

### Summary

Varicose veins of the lower extremities are abnormally dilated, tortuous and elongated. The exact cause of vein dilatation has still not been established. Mast cells produce, store and release various types of vasoactive compounds (histamine, tryptase, prostaglandins, leukotrienes, and cytokines). Histamine enhances local vasopermeability and smooth muscle cell proliferation, leading to thickening of the intima. Tryptase can contribute to local vascular injury and subsequent weakness of the vascular wall causing varix formation. The aim of the present study was the comparison of mast cell infiltration in the wall of varicose and non-varicose veins. The mean mast cell density in the wall of varicose veins was 0.86 mast cell per mm<sup>2</sup> and in healthy non-dilated vein walls, density was 1.23 mast cell per mm<sup>2</sup>. This difference was not statistically significant, therefore we could not confirm our hypothesis. Nevertheless, we suggest that mast cells could play an important role in the development of varices and the factor released by the mast cells should be further examined.

**Key words:** mast cell – infiltration – varicose – veins

### Introduction

Chronic venous insufficiency of lower extremities is a relatively frequent vascular disease affecting mainly the superficial venous system of legs of persons that are active. The incidence of this chronic venous disease ranges from 40–60% in women and 15–30% in men, respectively, in developed countries in Europe and the USA (Thulesius, 1996; Štvrtinová et al., 1991). Besides postthrombotic syndrome and ulcer cruris, varicose veins are a major sign of this chronic venous insufficiency. Varicose veins are characterized by their abnormally dilated, tortuous and elongated character. On the basis of their development, varicose veins are usually divided into primary varicose veins (how they develop is not known yet) and secondary varicose veins (usually

formed as a consequence of deep phlebothrombosis or as a result of obstruction of venous outflow from the lower extremities). Despite many efforts, the exact cause of primary varicose veins (and as a consequence, chronic venous insufficiency) has not been established yet. Therefore, therapy of this disease is usually symptomatic only (Bergan, 1997; Corcos et al., 1989). Weakness of the venous wall in association with smooth muscle and connective tissue disorders (and particularly disorders in collagen or elastin because they are the major components of connective tissue in venous walls), dysfunction of venous endothelium, damage of the venous valves or impaired venous microcirculation are possible etiopathogenetical factors (Štvrtinová, 1999). Histological changes

\*Correspondence to: Dr. Zora Haviarová, Institute of Anatomy, Medical Faculty, Comenius University, Sasinkova 2, 813 72 Bratislava, Slovak Republic; phone: +421 2 59357 359; fax: +421 2 59357 321; e-mail: haviarova@fmed.uniba.sk

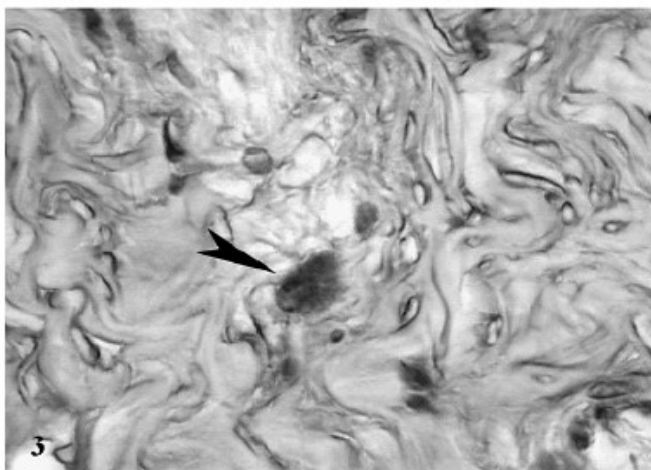
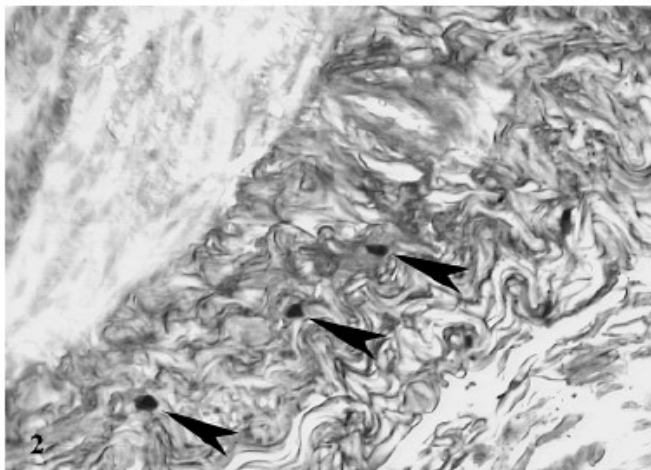
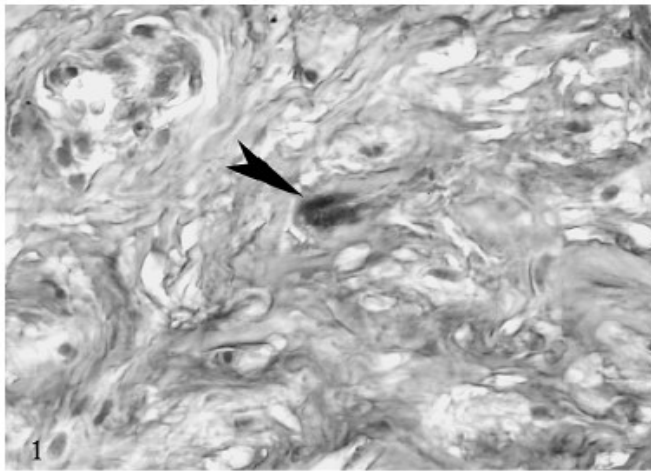


Fig. 1. Localization of a mast cell (arrowhead) in the tunica adventitia near vasa vasorum of a varicose vein. Magnification,  $\times 150$ .

Fig. 2. Localization of mast cells (arrowheads) in the tunica adventitia of a healthy non-dilated vein. Magnification,  $\times 100$ .

Fig. 3. Higher magnification of the wall of a healthy vein containing a mast cell (arrowhead). Magnification,  $\times 225$ .

in the wall of varicose veins include phleboscrosis, thickening of the intima, fibrosis of the media, decrease in the amount of smooth muscle and thrombus formation. Vasoactive compounds such as prostacyclin, thromboxan A2 and noradrenaline may also play a role (Yamada et al., 1996). Mast cells are migratory cells in connective tissue, usually found to be dispersed in the sparse connective tissue compartment along small blood vessels and in large amounts in the fibrous capsule of the liver, in connective tissue of the thyroid gland, intestine and gall bladder. Mast cells are known to produce histamine, serotonin, arachidonic acid derivatives, heparin, leukotrien C, prostaglandins and cytokines. Heparin is an anticoagulant agent, serotonin has vasoconstrictive effects, histamine induces elevation of vascular permeability and affects blood pressure. The aim of our study was to compare the occurrence of mast cells infiltration in varicose and non-varicose (healthy) vein walls.

### Material and methods

Ten samples of human varicose long saphenous veins were collected by stripping surgery (5 males and 5 females; age 24–60 years; mean age 37.0 years) and were compared with 10 samples of nondilated human healthy long saphenous veins collected at necroptomy in the Institute of Forensic Medicine from individuals without any history of vascular disease (8 males and 2 females; age between 20–83 years; mean age 36.6 years). These control samples were collected at 5–12 h after death due to accidents. Samples were immediately fixed in 5% formaldehyde in Baker's solution and processed routinely for light microscopy. Sections (8  $\mu\text{m}$  thick) were stained for orientation with hematoxylin-eosine (Lachema, Brno, Czechoslovakia) and with toluidin blue (Diagnostica Merck, Darmstadt, Germany) for detection of mast cells on the basis of the presence of metachromatic granules in mast cells. Six sections were evaluated from each sample. The number of mast cells was counted manually using a light microscope (Meopta, Prague, Czechoslovakia) at 20–45 $\times$  magnification. Eighteen sections were cut from each sample, but on the basis of the size of mast cell (5–7  $\mu\text{m}$  in diameter) only every third section was evaluated. The area of the vein wall was measured morphometrically. Sections were scanned with a CCD camera (Jay, Copenhagen, Denmark) attached to an inverted microscope IMT-4 (Olympus, Tokyo, Japan) and analysis was performed with morphometric software (Soft Imaging Systems, Munster, Germany). The number of mast cells per  $\text{mm}^2$  for every group of samples was expressed as mean with standard deviation. Statistical analysis was performed with the use of computer software Excel (Microsoft Corporation, Redmond WA, USA) and by manual calculations.

### Results

Mast cells stained with toluidin blue appeared to be deep violet due to presence of metachromatic granules. Cells were mainly localized in the tunica adventitia of vein walls, often in the vicinity of vasa vasorum (Figs. 1–3). They were rarely present in the outer part of the tunica media. For each sample, the mean area of the vein wall was determined on the basis of 6 measurements. The mean density of mast cells was determined in each sample as a ratio of the mean number of mast cells in each section and the mean area of the venous wall in that section. The results are presented in Fig. 4. For varicose veins, the mean mast cell density was  $0.86 \pm 0.45$  mast cell per  $\text{mm}^2$  and for healthy non-dilated veins, the mean mast cell density was  $1.23 \pm 0.92$  mast cell per  $\text{mm}^2$ . The *p* value was  $>0.05$  and, thus differences were not statistically significant.

### Discussion

Pathological infiltration of cells in venous structures have been described by Ono et al. (1998), who for example studied monocyte and macrophage infiltration of venous valves and concluded that chronic macrophage infiltration could be a possible cause of valve damage by venous reflux in the long saphenous vein. Prokopová et al. (1998) described in a similar way the presence of mast cells in the tunica adventitia of varicose vein walls, but differences between varicose veins and healthy veins were not compared quantitatively. We did not find a significant difference between the number of mast cells in the walls of varicose and

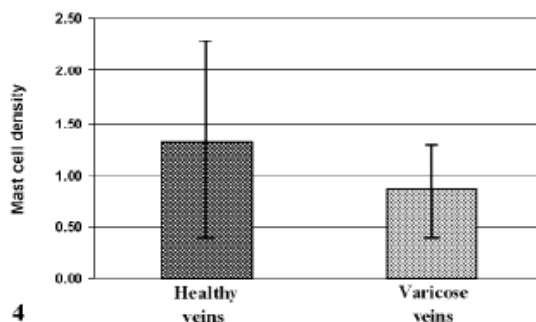


Fig. 4. Density of mast cells per  $\text{mm}^2$  in walls of healthy veins and varicose veins. Differences are not significantly different due to the large standard deviation.

healthy veins. Therefore, we were unable to confirm the previous assumption on the basis of a qualitative analysis and the conclusion of Yamada et al. (1996) that the amount of mast cells is elevated in the wall of varicose veins. Nevertheless, we assume that mast cells and their products may play a role in pathological changes in venous wall structures or venous valves. Therefore, they deserve further attention, but first the number of experimental samples and number of sections from each sample should be increased with respect to the number of mast cells present.

#### Acknowledgments

We express our gratitude to Mrs L'udmila Košíková and to Mrs Viera Haraslinová from the Institute of Histology and Embryology, Medical Faculty, Comenius University, Bratislava for their technical assistance. This work was supported by Comenius University Grant number 39/2001/UK and VGE grant number 2/2064/22.

#### References

- Bergan JJ (1997) Development of primary varicose veins. *Phlebology* **18**: 3–8
- Corcos L, Peruzzi G, Romeo V, Procacci T, and Dini S (1989) Peripheral venous biopsy: significance, limitations, indications and clinical applications. *Phlebology* **4**: 271–274
- Ono T, Bergan JJ, and Schmid-Schonbein GW (1998) Monocyte infiltration of venous valves. *J Vasc Surg* **27**: 158–166
- Prokopová V, Kočová J, Horáková M, and Třeška V (1998) Struktura stěny normální a varikózní vény dolní končetiny. *Prakt flebol* **1**: 34–36
- Štvrtinová V (1999) Pentoxifylin v liečbe chronickej žilovej insuficiencie. *Prakt flebol* **3**: 131–134
- Štvrtinová V, Kolesár J, and Wimmer G (1991) Prevalence of varicose veins of the lower limbs in women working at the department store. *Inter Angio* **10**: 2–5
- Thulesius O (1996) The venous wall and valvular function in chronic venous insufficiency. *Inter Angio* **15**: 114–118
- Yamada IT, Tomita S, Mori M, Sasatomi E, Suenaga E, and Itoh T (1996) Increased mast cell infiltration in varicose veins of the lower limbs – A possible role in the development of varices. *Surgery* **119**: 494–497

### 2. 4. 1. 7. HORMONÁLNE PODMIENKY VZNIKU A ROZVOJA VARIKÓZNYCH ŽÍL

Klinické a experimentálne údaje podporujú predpokladaný význam úlohy ovariálnych steroidov, estradiolu a progesterónu vo fyziológii a patofyziológii krvného obehu, zahŕňajúc zmeny štruktúry arteria uterina, variácie uterinného krvného toku a "estrogénovú" ochranu pred aterosklerózou a kardiovaskulárnymi ochoreniami. Avšak celulárne a molekulárne mechanizmy týchto hormón- dependentných procesov sú zatiaľ z väčšej časti neobjasnené. Nepriamy účinok steroidov sa predpokladal už dávnejšie, zahŕňajúc estrogénom- indukované zmeny hladiny plazmatických lipidov a lipoproteínov, zmeny krvnej zrážanlivosti, zmeny hormónom-indukovanej syntézy a sekrécie vazoaktívnych substancií rôznymi orgánmi. Rovnako sa predpokladal priamy vaskulárny účinok steroidov cez steroidové receptory v cievnej stene.

Nízke koncentrácie estrogénových receptorov (ER), dokázané naviazaním rádioaktívnych ligandov a autorádiografiou, boli opísané v rôznych artériách. Metódy s použitím monoklonálnych protilátok proti rôznym mapovaným receptorovým epitopom a zdokonalenie imunocytochemických techník pre estrogénové (ER) a progesterónové receptory (PR) umožnili detailne sledovať prítomnosť týchto receptorov v rôznych artériách a vénach. V mnohých štúdiách bola opísaná prítomnosť estrogénových receptorov v rôznych častiach kardiovasku-



lárneho systému, prepokladajúc, že kardiovaskulárny systém by mohol byť fyziologickým cieľovým tkanivom pre ovariálne steroidy. Estrogénové aj progesterónové receptory boli dokázané v svalových bunkách tunica media arteria uterina, v artériách vajcovodov (isthmus a ampulla tubae uterinae), v tunica media artérií endometria a myometria, v artériách prsníka (arteria mammaria interna) a v koronárnych artériách človeka [82, 83].

Klinické a epidemiologické pozorovania týkajúce sa varikózných žíl, hlavne ich predominance u žien a výskyt venózneho stázy počas hormonálnej terapie estrogénmi a progesterónmi, počas luteálnej fázy a tehotenstva predpokladajú určitú hormonálnu závislosť aj u tejto žilovej poruchy [55]. V experimentálnej imunocytochemickej štúdii bolo vyšetrených 30 vzoriek vena saphena magna, získaných pri chirurgickom operačnom odstránení varikózných žíl (10 vzoriek od premenopauzálnych žien, 15 vzoriek od postmenopauzálnych žien, 5 vzoriek od mužov). V 90% biopsií sa dokázala prítomnosť progesterónových receptorov (PR) pozorovaných hlavne v jadrách buniek tunica media a subendoteliálnej vrstvy (neointimy). Oproti tomu žiadna alebo extrémne nízka pozitivita prítomnosti estrogénových receptorov (ER) bola pozorovaná v 25 z 30 vzoriek. Len 5 vzoriek vykazovalo nízku hladinu estrogénových receptorov (ER). Väčšina varikózných vzoriek (70%) boli ER-/PR+, pričom len 20% vzoriek bolo ER+/PR+ a 10% vzoriek vykazovalo ER-/PR-. Prítomnosť PR a absencia alebo nízka hladina ER boli ďalej analyzované vo vzťahu k pohlaviu, k menopauze a lokalizácii v rámci vzorky. Prítomnosť PR bola pozorovaná u 92% žien oproti 80% mužov a u 100% premenoauzálnych versus 80% postmenopauzálnych pacientiek. Vo vzorkách od 4 pacientov (3 ženy, 1 muž) bola analyzovaná prítomnosť PR z troch rôznych vzoriek získaných z proximálnej, strednej a distálnej časti odstránenej varikózneho vena saphena magna (všetky vzorky vykazovali ER-/PR+). Žiadna významná variácia nebola pozorovaná v expresii ER alebo PR z troch rozličných oblastí v rámci jednej vzorky vena saphena magna. Podobne, žiadny významný rozdiel v obsahu receptorov nebol pozorovaný pri porovnávaní varikózných a nevarikózných fragmentov vzorky odobranej od jedného pacienta. PR a ER boli tiež analyzované aj v 2 vzorkách normálnych povrchových žíl (vena saphena magna) od pacientov po kardiovaskulárnej operácii. Jeden pacient vykazoval ER-/PR- a druhý ER-/PR+. Vo všetkých testovaných vzorkách žíl (vena saphena magna) prítomnosť PR bola pozorovaná v jadrách buniek tunica media a v subendoteliálnej vrstve (neointima). Vo fibroblastoch tunica adventitia sa PR vyskytovali len príležitostne. Bunky hladkej svaloviny nutritívnych artérií v tunica adventitia sledovaných žilových vzoriek rovnako vykazovali prítomnosť PR [82, 83].

Z uvedených údajov vyplýva, že venae saphenae muža aj ženy vykazujú expresiu progesterónových receptorov (PR) tak ako už bolo v minulosti opísané v arteriálnom krvnom systéme. U oboch pohlaví bola pozorovaná absencia alebo nízka pozitivita expresie estrogénových receptorov (ER). Absencia (alebo nízka pozitivita prítomnosti) ER vo väčšine varikózných žíl by mohla byť špecifická pre žilový systém, alebo by mohla byť dôsledkom straty receptorov počas degeneratívneho procesu. Prítomnosť progesterónových receptorov (PR) v tunica media povrchových žíl dolných končatín (venae saphenae magnae) predpokladá, že progesterón by mohol ovplyvňovať žilovú štruktúru a/alebo funkciu. Prítomnosť PR v bunkách hladkej svaloviny špirálovitých artérií v skorých štádiách tehotenstva je spájaná so značným zvýšením endometriálneho a myometriálneho krvného prietoku na podporu fetálneho rastu a homeostázy. Avšak úloha progesterónu v povrchových žilách dolných končatín ostáva zatiaľ nejasná. Boli už zverejnené údaje z experimentálnych štúdií in vitro na izolovaných ľudských povrchových žilách dolných končatín (vena saphena magna a vena saphena parva) o progesterónom- indukovanom znížení noradrenalínu a kalcium-indukovaných kontrakciách. Rovnako zostáva zatiaľ neobjasneným, či má alebo nemá progesterón účinok na žilovú štruktúru prostredníctvom bunkovej proliferácie [83].

### **3. ZÁVER.**

Vyššie uvedený prehľad výsledkov prác autorov a výskumníkov z mnohých krajín sveta svedčí o pokračujúcom záujme v odhaľovaní príčiny primárnej varikozity dolných končatín. Ich úsilie je motivované snahou o zlepšenie liečby tejto formy chronickej žilovej choroby (účinnjším zásahom v iniciálnom štádiu ochorenia), snahou o účinnejšiu prevenciu, ktorá v súčasnosti pozostáva v obmedzovaní vonkajších vyvolávajúcich činiteľov, prípadne snahou o aktívne vyhľadávanie (depistáž) osôb s genetickou predispozíciou k vzniku varixov.

Nie úplne jednoznačné výsledky rôzne zameraných štúdií nútia bádateľov k úvahám a hľadaniu rôznych ďalších predpokladaných príčin tohto ochorenia. Aj keď je genetická predispozícia pre toto ochorenie nesporná, etiopatogenetický mechanizmus vedúci k objaveniu sa symptómov stále nie je jasný. Preto je potrebná spolupráca medzi bádateľmi rôznych zameraní a určite je to pole ich možnej vzájomnej vedeckej spolupráce. Vyriešenie problému príčiny primárnej formy chronickej vénovej choroby dolných končatín by napomohlo ušetriť nemalé finančné prostriedky zdravotníckej starostlivosti vynakladané v súčasnosti na symptomatickú liečbu pacientov s týmto ochorením.

#### 4. ZOZNAMY.

##### 4. 1. ZOZNAM GRAFOV.

**Graf. 1.** Príčiny smrti na choroby obehovej sústavy (Pišková, 2009).

##### 4. 2. ZOZNAM OBRÁZKOV.

**Obr. 1.** Schematický príklad proximálnej chlopne vena saphena magna v pozdĺžnom priereze za fyziologických podmienok.

**Obr. 2.** Príklad poškodenej žilovej chlopne so sumarizáciou hlavných pozorovaných poškodení.

**Obr. 3.** Hydrostatický tlak v mmHg, pri ktorom sa objaví spätný reflux krvi v normálnej a varikóznej žile (podľa Bauersachs a kol., 1996).

##### 4. 3. ZOZNAM TABULIEK.

**Tab. 1.** Klinická klasifikácia chronickej vénovej choroby.

**Tab. 2.** Anatomická klasifikácia chronickej vénovej choroby dolných končatín.

**Tab. 3.** Patofyziológia chronickej žilovej insuficiencie.

**Tab. 4.** Práce porovnávajúce obsah elastínu v stene varikózných žíl.

**Tab. 5.** Práce porovnávajúce obsah kolagénu v stene varikózných žíl.

**Tab. 6.** Fibrilárne kolagény a ich výskyt v rôznych tkanivách.

**Tab. 7.** Nefibrilárne kolagény a ich výskyt v rôznych tkanivách.

**Tab. 8.** Distribúcia jednotlivých subtypov kolagénu v žilovej stene varikózných a "zdravých" žíl.

**Tab. 9.** Zvýšene exprimované gény vo varikózných žilách (podľa Lee S.a spol., 2005).

##### 4. 4. ZOZNAM V LOŽENEJ LITERATÚRY AUTORKY:

- 1., Haviarová, Z.: Histomorfológia žilového systému. In Štvrtinová et al. *CHOROBY CIEV. SAP* Bratislava, 2008. s. 641-5.....str. 16
- 2., Haviarová, Z., Weismann, P., Štvrtinová, V., Beňuška, J.: The Determination of the Collagen and Elastin Amount in the Human Varicose Vein by the Computer Morphometric Method. *Gen. Physiol. Bioph.* (1999), 18, Suppl. 1, s. 30-33.....str. 41
3. Haviarová, Z., Janega, P., Durdík, Š., Kováč, P., Mráz, P., Štvrtinová, V.: Comparison of collagen subtype I and III presence in varicose and non-varicose vein walls. *Bratisl. Lek. Listy* 2008, 109 (3), s. 102- 105.....str. 49
4. Haviarová, Z., Janegová, A., Janega, P., Durdík, Š., Kováč, P., Štvrtinová, V., Mráz, P.: Expressia indukčnej izoformy syntázy oxidu dusnatého v stene varikózných žíl. *Folia Medica Cassoviensia*, 65 (2), 2010, s. 17-20.....str.54
5. Haviarová, Z., Weismann, P., Štvrtinová, V., Durdík, Š., Kováč, P., Mráz, P.: Collagen and elastin contents and average vein wall thickness in varicose vein wall. In: *Proceedings of the 9th International Symposium CNVD 2000*, January 21- 23, 2000, Bratislava, Slovak republic, s.143- 147 .....str. 59
- 6., Haviarová, Z., Janegová, A., Janega, P., Durdík, Š., Kováč, P., Štvrtinová, V., Mráz, P.: Expression of Constitutive Nitric Oxide Isoforms in Varicose Vein Wall; Preliminary Results. *International Journal of Vascular Medicine*, Vol 2011, article ID 204723, s. 1-6.....str. 70
- 7., Haviarová, Z., Weismann, P., Pavlíková, D., Durdík, Š., Kováč, P., Štvrtinová, V., Mráz, P.: Mast cell infiltration in the wall of varicose veins. *Acta Histochem.* 104 (4), s. 357-360 (2002).....str. 85

#### 4. 5. ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY:

1. Andreotti, L., Cammelli, D., Banchi, G., Guarnieri, M., Serantoni, C.: Collagen, elastin and sugar content in primary varicose veins. *Ric Clin Lab*, 8, 1978, 4, s.273-285.
2. Aunapuu, M, Arend, A.: Histopathological changes and expression of adhesion molecules and laminin in varicose veins. *Vasa*. 2005 Aug; 34 (3):170-5.
3. Badier-Commander, C., Verbeuren, T.J., Lebard, C., Michel, J-B., Jacob, M-P.: Increased TIMP/MMP ratio in varicose veins: a possible explanation for extracellular matrix accumulation. *J Pathol* 2000;192:105-112.
4. Baillart, O., Boudaoud, L., Bounin, Ph. et al.: Differences between upper and lower limbs in venous endothelial reactivity in humans. *Phlebology*, 1994, Suppl., s.10- 14.
5. Barber, D.A., Wang, X.F., Gloviczki, P., Miller, V.M: Characterization of endothelin receptors in human varicose veins. *Journal of Vascular Surgery*, 26, 1997, 1, s.61-69.
6. Bauersachs, J., Fleming, I., Busse, R.: Pathophysiology of chronic venous insufficiency. *Phlebology*, 1996, 11, s.16-22.
7. Bergan, J.J.: Development of primary varicose veins. *Phlebolympology*, 18, 1997, s.3- 8.
8. Bergan, J.J., Schmid-Schönbein, G.W., Coleridge-Smith, P.D., Nicolaides, A.N., Boisseau, M.R., Bo Eklof: Mechanisms of Disease: Chronic Venous Disease. *N Engl J Med* 2006; 355: s. 488- 90.
9. Bigel, P., Taccoen, A.: Morphology and vascularization of the varicose long saphenous vein wall. Comparison with the normal long saphenous vein. *Journal des Maladies Vasculaires*, 21, 1996, Suppl. C, s. 249- 252.
10. Bosanquet, N., Franks, P.: Venous Disease: The New International Challenge. *Phlebology*, 1996, 11, s.6- 9.
11. Bouissou, H., Maurel, E.: Collagen of the internal saphenous vein, normal and varicose, as a function of age. *Bull Acad Natl Med*, 175, 1991, 4, s.603- 6.
12. Bruschi, E., Como, G., Zuiani, C., Segatto, E., Rocco, M., Biasi, G., Bazzochi, M.: Ultrasonographic analysis in vitro of parietal thickness of lower limb varicose veins. *Radiol med* (2006) 111:846-854.
13. Bujan, J.A., Jimenez-Cossio, J.A., Jurado, F., Gimeno, M.J., Pascual, G., Garcia-Honduvilla, N., Dominguez, B., Bellon, J.M.: Evaluation of the smooth muscle component and apoptosis in the varicose vein wall. *Histol Histopathol* 2000:15:745-752.

14. Caggiati, A.: Fascial relationships of the long saphenous vein. *Circulation*, 1999; 100: s. 2547- 2549.
15. Caggiati, A.: Fascial relationships of the short saphenous vein. *J. Vasc. Surg.*, 2001; 34: s. 241- 246.
16. Caggiati, A., Bergan, J., Gloviczki, P. et al.: International Interdisciplinary Consensus Committee on Venous Anatomical Terminology: Nomenclature of the veins of the lower limb: extensions, re-finements and clinical application. *J. Vasc. Surg.*, 2005; 41: s. 719- 724.
17. Cario-Toumaniantz, Ch., Boularan, C., Schugers, L.J., Heymann, M.-F., Le Cunff, M., Léger, J., Loirnad, G., Pacaud, P.: Identification of Differentially Expressed Genes in Human Varicose Veins: Involvement of Matrix GlA Protein in Extracellular matrix Remodeling. *J Vasc Res* 2007; 44: s. 444-459.
18. Carlson, B.M.: *Human Embryology & Developmental Biology*. Mosby 1999. 495 s.
19. Charles, A.K., Gresham, G.A.: Histopathological changes in venous grafts and in varicose and non-varicose veins. *J Clin Pathol*, 46, 1993, 7, s.603- 6.
20. Chello, M., Mastroroberto, P., Zofrea, S., Marchese, A.R.: Analysis of collagen and elastin content in primary varicose veins. *J Vasc Surg.*, 20, 1994, 3, s.490.
21. Corcos, L., Peruzzi, G., Romeo, V., Dini, S.: Further information on subclinical venous pathology in varicose patients. *Phlebology*, 1985, s.45-47.
22. Corcos, L., Procacci, T., Peruzzi, G.P., Dini, M., De Anna, D.: Saphenofemoral Valves: Histopathological Observations and Diagnostic Approach before Surgery. *Dermatol Surg*, 22, 1996, s. 873-880.
23. Corcos, L., De Anna, D., Dini, M., Macchi, C., Ferrari, P.A., Dini, S.: Proximal long saphenous vein valves in primary venous insufficiency (histopathology and pathophysiological implications). *11th Annual Congress of the North American Society of Phlebology*, Nov. 5-9, 1997, Palm Desert Ca, USA.
24. Corcos, L., De Anna, D., Dini, M., Macchi, C., Ferrari, P., Dini, S.: Main histological alterations of venous valves in primary venous insufficiency- pathophysiological and diagnostic implications. *Phlebology'99*, E.Rabe et al.(eds.) Viavital, Koln 1999, s.12- 14.
25. Covas, D. T., Piccinato, C. E., Orellana, M. D., Siufi, J. L., Silva, W. A. Jr., Proto-Siqueira, R., Rizzatti, E. G., Neder, L., Silva, A. R., Rocha, V., Zago, M. A.:

- Mesenchymal stem cells can be obtained from the human saphena vein. *Exp Cell Res.* 2005 Oct 1; 309 (2): s. 340-4.
26. Criqui, M.H., Jamosmos, M., Fronck, A., Denenberg, J.O., Robe: Chronic Venous Disease in an Ethnically Diverse Population. *American Journal of Epidemiology*; Sep 01, 2003; 158, 5; ProQuest Medical Library pg. 448.
  27. Crotty, T.P.: Is circulating noradrenaline the cause of varicose veins? *Med Hypotheses*, 34, 1991, 3, s. 243- 51
  28. Crotty, T.P.: The origin and the progression of varicose veins. *Med Hypotheses*, 37, 1992, 4, s.198-204.
  29. Danaj, M.: *Význam morfológie hlbokých žíl dolných končatín pre chirurgické riešenie venóznei insuficiencie*. Kandidátska dizertačná práca, Trnava, jún 1997.
  30. De Carvalho, J.J., Apfel, M.I., Cotta Pereira, G., Panico, M.D., Mattos da Silveira, P.R., de Medeiros, A.: Histochemical study of elastic system fibers of the walls of normal and pathological saphenous veins (corrected and republished article). *Phlebologie*, 44, 1991, 3, s.733 -744.
  31. de Simone, J.G.: The ostial valve of the junction of the internal saphenous vein and the wall of the femoral vein. *Phlebologie*, 44, 1991, 2, s. 427-59.
  32. Donnelly, M., Tierney, S., Feeley, T.M.: Anatomical variation at the saphenofemoral junction. *Br J Surg.* 2005 Mar; 92 (3): s. 322-5.
  33. Donovan, L.D., Schmidt, S.P., Townshend, S.P., Njus, G.O., Sharp, W.V.: Material and structural characterisation of human saphenous vein. *J Vasc Surg.*, 12, 1990, 5, s. 531-37.
  34. Dormandy, J.A.: Influence of blood cells and blood flow on venous endothelium. *Inter Angio*, 15, 1996, 2, s.119-123.
  35. Drubaix, I., Viljanen- Tarifa, E., Robert, A. M., Robert, L.: Role of glycosamino-glycans in venous disease. Mode of action of some flavonoid drugs. *Pathol Bio Paris*, 43, 1995, 5, s. 461-70.
  36. Ducasse, E., Giannakakis, K., Chevalier, J., Dasnoy, D., Puppinc, P., Speziale, F., Fiorani, P., Faraggiana, T.: Dysregulated apoptosis in primary varicose veins. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2005 Mar; 29(3): s. 316-23.
  37. Elsharawy, M. A., Naim, M. M., Abdelmaguid, E. M., Al-Mulhim, A. A.: Role of saphenous vein wall in the pathogenesis of primary varicose veins. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2007 Apr; 6 (2): s. 219-24.

38. Fischer, R., Leu, H.J., Schneider, J., Liechri, P.M.: Varicose veins combined with mucoid degeneration of the venous wall. *Vasa-Journal of Vascular Diseases*, 25, 1996, 1, s.76-80.
39. Fowkes, F.G.R.: Epidemiology of Chronic Venous Insufficiency. *Phlebology*, 1996, 11, s. 2-5.
40. Gandhi, R.H., et al.: Analysis of the connective tissue matrix and proteolytic activity of primary varicose veins. *J Vasc Surg.*, 18, 1993, 5, s. 814- 20.
41. Gavorník, P.: Chronická vénová choroba dolných končatín- "CEAP" klasifikácia. *Medicínsky monitor*, 1996, 4, s. 36-37.
42. Gavorník, P : *ANGIOLÓGIA*. Univerzita Komenského Bratislava 1998. 147 s.
43. Gillespie, D.L., Patel, A., Fileta, B., Chang, A., Barnes, S., Flagg, A., Kidwell, M., Villavicencio, J. L., Rich, N.M.: Varicose veins possess greater quantities of MMP-1 than normal veins and demonstrate regional variation in MMP-1 and MMP-13. *J Sur Res*. 2002 Aug; 106 (2): s. 233-8.
44. Goldman, M.P., Fronek, A.: Anatomy and Patophysiology of Varicose Veins. *J. Dermatol Surg Oncol*, 15, 1989, 2, s.138- 145.
45. Guo, Q., Guo, C.: Genetic analysis of varicose vein of lower extremities. *Chung-Hua I Hsueh I Chuan Hsueh Tsa Chih.*, 15, 1998, 4, s. 221-3.
46. Houghton, A.D., Panayiotopoulos, Y., Taylor, P.R.: Practical management of primary varicose veins. *British Journal of Clinical Practice*, 50, 1996, 2, s.103-105.
47. Irwin, C., Synn, A., Kraiss, L., Zhang, Q., Griffen, M. M., Hunter, G. C.: Metalloproteinase expression in venous aneurysms. *J Vasc Surg*. 2008 Nov; 48 (5): s. 1278-85.
48. Ishikawa, Y., Asuwa, N., Ishii, T., Ito, K., Akasaka, Y., Masuda, T., Zhang, L., Kiguchi, H.: Collagen alteration in vascular remodeling by hemodynamic factors. *Virchows Arch*, 437, 2000, 2, s.138-48.
49. Jacob, M. P., Badier-Commander, C., Fontaine, V., Benazzoug, Y., Feldman, L., Michel, J. B.: Extracellular matrix remodeling in the vascular wall. *Pathol Biol (Paris)*. 2001 May; 49(4): 326- 32.
50. Jacob, T., Hignorani, A., Ascher, E.: Overexpression of transforming growth factor- $\beta$ 1 correlates with increased synthesis of nitric oxide synthase in varicose veins. *J Vasc Surg.*, March 2005, vol.,41, No 3, s. 523-530.

51. Jeanneret, C., Baldi, T., Hailemariam, S., Koella, C., Gewaltig, J., Biedermann, B. C.: Selective loss of extracellular matrix proteins is linked to biophysical properties of varicose veins assessed by ultrasonography. *Br J Surg.* 2007 Apr;94(4): s. 449-56.
52. Kachlík, D., Lametschwandtner, A., Rejmontová, J., Stingl, J., Vaněk, I.: Vasa vasorum of the human greater saphenous vein. *Surg. Radiol. Anat.* 2003, vol. 24, no. 6, s. 377-381.
53. Kachlík, D., Báča, V., Fára, P., Lametschwandtner, A., Minnich, B., Sosna, B., Stingl, J., Straka, Z., Šetina, M.: Cévní zásobení steny normální a varikózní vena saphena magna. *Prakt. flebol.* 2006; 15; s. 90–94.
54. Kachlík, D., Pecháček, V., Báča, V. et al.: Nové názvosloví povrchových žil dolní končetiny. *Prakt. Flebol.*, 2008; 17: s. 4- 12.
55. Karl, C., Sohn, C.: Effect of parity on the venous system of the leg. *Geburtshilfe Frauenheilk.*, 49, 1989, 1, s. 49-52.
56. Khan, A. A., Eid, R. A., Hamdi, A.: Structural changes in the tunica intima of varicose veins: a histopathological and ultrastructural study. *Pathology* 2000 Nov; 32 (4): s. 253- 7.
57. Kim, D.I., Eo, H.S., Joh, J.H.: Identification of differentially expressed genes in primary varicose veins. *J Surg Res.* 2005 Feb; 123 (2): s. 222-6.
58. Kirsch, D., Schreiber, J., Dienes, H.P., Bottger, T., Junginger, T.: Alterations of the extracellular matrix of venous walls in varicose veins. *Vasa*, 28, 1999, 2, s. 95-9.
59. Knaapen, M.W., Somers, P., Bortier, H., DeMeyer, G.R.Y., Kockx, M.M.: Smooth Muscle Cell Hypertrophy in Varicose veins is Associated with Expression of Estrogen Receptor- $\beta$ . *J Vasc Res* 2005; 42: s. 8-12.
60. Kockx, M.M., Knaapen, M.W., Bottier, H.E., Cromheeke, K.M., Bouterin- Falson, O., Finet M.: Vascular remodeling in varicose veins. *Angiology*, 49, 1998, 11, s. 871-7.
61. Kowalewski, R., Sobolewski, K., Wolanska, M., Gacko, M.: Matrix metalloproteinases in the vein wal. *Int Angiol* 2004; 23: s. 164-169.
62. Kowalewski, R., Sobolewski, K., Malkowski, A., Gacko, M., Rutkowska, I.: Glycosaminoglycans-degrading enzymes in the varicose vein wall. *Int Angiol.* 2008 Dec; 27(6): s. 529-35.
63. Labaš, P., Ohrádka, B., Štvrtinová, V., Gašpar, Ľ., Lukáč, Ľ., Čambal, M.: Patofyziologické princípy v liečbe chronickej žilovej insuficiencie. *Praktická flebológia*, VIII, 1999, 3, s.113-115.



64. Lee, S., Lee, W., Choe, Y., Kim, D., Na, G., Im, S., Kim, J., Kim, M., Kim, J., Cho, J.: Gene Expression Profiles in Varicose Veins Using Complementary DNA Microarray. *Dermatol Surg* 31:4, April 2005. s. 391-5.
65. Lefebvre, D., Lescalie, F.: Blood supply to the superficial venous network. Vasa vasorum anatomy. *Journal des Maladies Vasculaires*, 21, 1996, Suppl. C, s. 245-248.
66. Lengyel, I., Acsady, G.: Histomorphological and pathobiochemical changes of varicose veins. A possible explanation of the development of varicosis. *Acta Morphol Hung*, 38, 1990, 3-4, s.259-67.
67. Lethias, C., Labourdette, L., Willems, R., Comte, J., Herbage, D.: Composition and organisation of the extracellular matrix of vein walls: Collagen networks. *Inter Angio*, 15, 1996, 2, s.104-113.
68. Leu, H.J., Vogt, M., Pfrunder, H: Morphological alterations of non-varicose and varicose veins (a morphological contribution to the discussion on pathogenesis of varicose veins). *Basic Res Cardiol* 1979:74: s. 425-444.
69. Lim, C. S., Davies, A. H.: Pathogenesis of primary varicose veins. *Br J Surg*. 2009 Nov; 96(11): s. 1231-42.
70. Lowell, R.C., Gloviczki, P., Miller, V.M.: In vitro evaluation of endothelial and smooth muscle function of primary varicose veins. *J Vasc Surg*, 16, 1992, 5, s. 679- 686.
71. Lynch, T.G., Dalsing, M.C., Ouriel, K., Ricota, J.J., Wakefield, T.W.: Developments in diagnosis and classification of venous disorders: non invasive diagnosis. *Cardio-vascular Surgery*, 7, 1999, 2, s.160-178.
72. Maurice, G., Wang, X., Lehalle, B., Stoltz, J.F.: Modeling of elastic deformation and vascular resistance of arterial and venous vasa vasorum. *J Mal Vasc.*, 23, 1998, 4, s. 282-8.
73. Maurel, E. et al.: Collagen of the normal and the varicose human saphenous vein: a biochemical study. *Clin Chim Acta.*, 193, 1990, 1-2, s. 27-37.
74. Mazzucato, M., Spesosotto, P., Pradella, P., Cozzi, M.R., De Appollonia, L., Perris, R., De Marco, L., Colombatti, A.: Involvement of subendothelial collagen type VI in venular thrombotic mechanisms. *Book of Abstracts of European Congress of Cell Biology*, Bologna: 110- 111, 1999.

75. Michiels, C., Arnould, T., Thibaut- Vercruyssen, R., Bouaziz, N., Janssens, D.: Perfused human saphenous veins for the study of the origin of varicose veins: role of endothelium and of hypoxia. *Inter Angio*, 16, 1997, 2, s.134-141.
76. Naoum, J. J., Hunter, G. C., Woodside, K. J., Chen, C.: Current advances in the pathogenesis of varicose veins. *J Surg Res*. 2007 Aug; 141 (2): s. 311-6.
77. Ndiaye, Ass, Ndiaye, Abd, Ndoye, J. M., Diarra, O., Diop, M., Di,a A., Ndiay,e N., Sow, L. M.: The arch of the great saphenous vein: anatomical bases for failures and recurrences after surgical treatment of varices in the pelvic limb. About 54 dissections. *Surg Radiol Anat* (2006) 28: s. 18- 24.
78. Ono, T., Bergan, J.J., Schmid-Schonbein, G.W.: Monocyte infiltration into venous valves. *J Vasc Surg.*, 27, 1998, 1, s.158-166.
79. Ortiz, P.P., Whyte, J., Daniel Lamaziere, J.M., Torres, A., Díaz, P., Sarrat, R.: Quantitative study of elastin in human arteries with high level of tortuosness. *Europ. Jour. Of Anat.*, 3, 1999, 1, s.7-11.
80. Pappas, P.J., Gwertzman, G.A., De Fouw, D.O., Padberg, F.T., Jr., Silva, M.B., Jr., Duran, W.N., Hobson, R.W. : Retinoblastoma protein: A molecular regulator of chronic venous insufficiency. *J Surg Res*, 76, 1998, 2, s.149- 53.
81. Parra, J.R., Cambria, R.A., Hower, C.D., Dassow, M.S., Freischlag, J.A., Seabrook, G.R., Towne, J.B.: Tissue inhibitor of metalloproteinase-I is increased in the saphenofemoral junction of patients with varices in the legs. *J Vasc Surg* 1998; 28: s. 669-675.
82. PerrotApplanat, M.: Estrogen receptors in cardiovascular system. *Steroids*, 61, 1996, 4, s.212-215.
83. PerrotApplanat, M., Cohen-Solal, K., Milgrom, E., Finet, M.: Progesterone receptor expression in human saphenous veins. *Circulation*, 92, 1995, 10, s. 2975- 83.
84. Pišková, T, Gavorník, P.: Epidemiológia cievnych chorôb. *Lekárske listy* č. 19/2009, s. 5-6.
85. Porto, L.C., Ferreira, M.A., Costa, A.M.,da Silveira, P.R.: Immunolabeling of type IV collagen, laminin and alpha-smooth-muscle-actin cells in the intima of normal and varicose saphenous veins. *Angiology*, 49, 1998, 5, s. 391-398.
86. Porto, L.C., Azizi, M.A., Pelajo-Machado, M., Matos da, S.P., Lenzi, H.L.: Elastic fibers in saphenous varicose veins. *Angiology*. 2002 Mar-Apr; 53 (2): s. 131- 40.

87. Prokopová, V., Kočová, J., Horáková, M., Třeška, V.: Struktura stěny normální a varikózní vény dolní končetiny. *Praktická flebologie*, VII, 1998, 1, s.34-36.
88. Psaila, J.V., Melhuis, J., et al.: Viscoelastic properties and collagen content of the long saphenous vein in normal and varicose veins. *Br J Surg.*, 76, 1989, 1, s. 37-40.
89. Raffetto, J. D., Khalil, R. A.: Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochem Pharmacol.* 2008 Jan 15; 75 (2): s. 346-59. Epub 2007 Jul 7.
90. Raffetto, J. D., Khalil, R. A.: Mechanisms of varicose vein formation: valve dysfunction and wall dilation. *Phlebology.* 2008; 23 (2): s. 85-98.
91. Renno, W.M., Saleh, F., Wali, M.: A journey across the wall of varicose veins: what physicians do not often see with the naked eye. *Med Princ Pract.* 2006; 15(1): s.9-23.
92. Riedlová, J., Smržová, T.: Novinky v morfologii žil dolní končetiny. *Rozhl. Chir.* 2008, roč. 87, č. 10, s. 549-552
93. Rose, S.S., Ahmed, A.: Some thoughts on the aethiology of varicose veins. *J Cardiovasc Surg Torino*, 27, 1986, 5, s. 534-43.
94. Sansilvestri- Morel, P., Nonotte, I., Fournet- Bourguignon, M.P., Rupin, A., Fabiani, J.N., Verbeuren, T.J., Vanhoutte, P.M.: Abnormal deposition of extracellular matrix proteins by cultured smooth muscle cells from human varicose veins. *J Vasc Res*, 35, 1998, 2, s.115-23.
95. Sansilvestri-Morel, P., Rupin, A., Badier- Commander, C., Kern, P., Fabiani, J.N., Verbeuren, T. J., Vanhoutte, P.M.: Imbalance in synthesis of collagen type I and type III in smooth muscle cells derived from human varicose veins. *J Vasc Res.* 2001 Nov- Dec; 38(6): s. 560-8.
96. Sansilvestri-Morel, P., Rupin, A., Badier- Commander, C., Fabiani, J.N., Verbeuren, T. J.: Chronic venous insufficiency: dysregulation of collagen synthesis. *Angiology* 2003 Jul-Aug; 54 Suppl 1: s. 13-8.
97. Sansilvestri-Morel, P., Rupin, A., Jullien, N.D., Lembrez, N., Mestries-Dubois, P., Fabiani, J.N., Verbeuren, T.J.: Decreased Production of Collagen Type III in Cultured Smooth Muscle Cells from Varicose Vein Patients Is Due to a Degradation by MMPs: Possible Implication of MMP3. *J Vasc Res* 2005; 42: s. 388-398.
98. Sansilvestri-Morel, P., Fioretti, F., Rupin, A., Senni ,K., Fabiani, J.N., Godeau, G., Verbeuren, T.J.: Comparison of extracellular matrix in skin and saphenous veins from

- patients with varicose veins: does the skin reflect venous matrix changes? *Clin Sci (Lond)*. 2007 Feb; 112,(4): s. 229-39.
99. Schadeck, M.: Sclerotherapy of small saphenous vein: how to avoid bad results. *Phlebologie*, 2004; 57: s. 165-169.
100. Somers, P., Knaapen, M.: The histopathology of varicose vein disease. *Angiology* 2006, Oct- Nov; 57 (5): s. 546-55.
101. Staubesand, J., Steel, F.: The official nomenclature of the superficial veins of the lower limb: A case of revision. *Clin.Anat.*, 1995; 8: s. 426-428.
102. Štvrtinová, V., Kolesár, J., Wimmer, G.: Prevalence of varicose veins of the lower limbs in the women working at department store. *Inter Angio*, 1991, 10, s.2-5.
103. Štvrtinová, V.: Pentoxifylín v liečbe chronickej žilovej insuficiencie. *Praktická flebológia*, VIII, 1999, 3, s.131-2.
104. Štvrtinová, V.: Detralex vo svetle RELIEF štúdie. *Medicínsky monitor*, 2000, 4, s. 4-14.
105. Švejcar, J., Přerovský, I., Linhart, J., Krume, J.: Content of collagen, elastin and hexosamine in primary varicose veins. *Clin Sci*, 24, 1963, s.325.
106. Thulesius, O.: Vein wall characteristics and valvular function in chronic venous insufficiency. *Phlebology*, 1993, 8, s. 94-8.
107. Travers, J.P. and others: Assesment of wall structure and composition of varicose veins with reference to collagen, elastin and smooth muscle content. *European Journal Vasc. And Endovasc.Surg.*, 1996, 11, s. 230-237.
108. Urbanek, T., Skop, B., Wiaderkiewicz, R., Wilczok, T., Ziaja, K., Lebda-Wyborny, T., Pawlicki, K.: Smooth muscle cell apoptosis in primary varicose veins. *Eur J Vasc Surg*. 2004 Dec; 28 (6): s.600-11.
109. Venturi, M., et al.: Biochemical assay of collagen and elastin in the normal and varicose vein wall. *J Surg Res.*, 60, 1996, 1, s. 245-8.
110. Waksman, Y., Mashiah, A., Hod, I.: Collagen subtype pattern in normal and varicose saphenous veins in humans. *Int. Medicine*, 19, 1997, 6, s.217.
111. Wali, M.A., Eid, R.A.: Changes of elastic and collagen fibers in varicose veins. *Int. Angiol.* 2002 Dec; 21 (4): s. 337-43.
112. Wali, M.A., Dewan, M., Eid, R.A.: Histopathological changes in the wall of varicose veins. *Int. Angiol.* 2003 Jun; 22 (2): s. 188-93.

113. White, J.V., Ryjevski, C.: Chronic venous insufficiency. *Perspect Vasc Surg Endovasc Ther.* 2005 Dec; 17 (4): s. 319-27.
114. Yamada, T., Tomita, S., Mori, M., Sasatomi, E., Suenaga, E., Itoh, T.: Increased mast cell infiltration in varicose veins of the lower limbs: A possible role in the development of varices. *Surgery*, 119, 1996, s. 494-7.
115. Yamada, T., Yamamoto, H., Ogawa, A., Miyazaki, K., Tokunaga, O., Itoh, T.: Ultrastructural demonstration of mast cells in varicose veins of lower limbs: presence of mast cell-mediated mechanism. *J Cardiovasc Surg (Torino)*, 38, 1997, 5, s. 443-6.
116. Zamboni, P., De Palma, M., Carandina, S., Fogato, L., Fortini, P., Legnaro, A., Mazza, P., Ricci, S.: The "T" vein of the leg. *Dermatol Surg.* 2004 May; 30 (5): s. 750-2; discussion s. 753.