

Expresia izoforiem syntázy oxidu dusnatého v stene varikózných žíl

MUDr. Zora Haviarová, PhD.¹, MUDr. Andrea Janegová², MUDr. Pavel Janega, PhD.², MUDr. Peter Kováč, PhD.³, doc. MUDr. Štefan Durdík, PhD.⁴, prof. MUDr. Viera Štvrtinová, PhD.⁵, prof. MUDr. Peter Mráz, DrSc.¹

¹Anatomický ústav, Lekárska fakulta Univerzity Komenského, Bratislava

²Ústav patologickej anatómie, Lekárska fakulta Univerzity Komenského, Bratislava

³Ústav súdneho lekárstva, Lekárska fakulta Univerzity Komenského, Bratislava

⁴I. chirurgická klinika Lekárskej fakulty Univerzity Komenského a Univerzitnej nemocnice, Bratislava

⁵II. interná klinika Lekárskej fakulty Univerzity Komenského a Univerzitnej nemocnice, Bratislava

Úvod. V literatúre nachádzame protichodné nálezy dotýkajúce sa štrukturálnych zmien žilovej steny primárne varikózných žíl. Oxid dusnatý (NO) je známy svojím vazodilatačným účinkom. Je syntetizovaný enzýmom syntáza oxidu dusnatého (NOS), ktorý sa vyskytuje v troch známych izoformách: neuronálna NOS (nNOS), indukívna NOS (iNOS), endoteliálna NOS (eNOS).

Materiál a metodika. Vzorky varikózných a zdravých (nedilatovaných) žíl sme spracovali štandardnou svetelno-mikroskopickou a imunohistochemickou technikou s použitím králičích polyklonálnych protilátok proti všetkým trom NOS izoformám: iNOS, eNOS a nNOS. Expresia protilátok bola hodnotená semikvantitatívne a overená morfometricky 2D obrazovou analýzou. Celková plocha expresie NOS izoforiem bola určená farebnou analýzou a farebnou digitálnou subtrakciou.

Výsledky. Zistili sme diskontinuálnu a významne nižšiu expresiu všetkých troch NOS izoforiem v tunica media varikózných žíl v porovnaní s kontrolnou skupinou, kde bola expresia všetkých 3 NOS izoforiem kontinuálna. Na štatistickú analýzu bol použitý nepárový t-test.

Diskusia a záver. Výsledky našej práce predpokladajú nižšie hodnoty NO v stene varikózných žíl, z čoho vyvodzujeme, že varikózna dilatácia je dôsledkom iného patomechanizmu, aj keď štádium postihnutia varikózných vzoriek nebolo zohľadnené. Naše výsledky protirečia publikovaným výsledkom Howladera a Abd-El-Aleema, ktorí pozorovali zvýšené hodnoty NO a NOS izoforiem u pacientov so závažnejším venóznym postihnutím.

Kľúčové slová: varikózne žily, oxid dusnatý (NO), syntáza oxidu dusnatého (NOS).

Expression of nitric oxide synthase isoforms in varicose vein wall

Introduction. There are conflicting findings in literature about structural changes of the primary varicose vein walls. Nitric oxide – a potent vasodilator – is synthesized by nitric oxide synthase (NOS). There are three known isoforms of NOS: nNOS (neuronal NOS), iNOS (inducible NOS), eNOS (endothelial NOS).

Material and methods. Samples of varicose and control (healthy) veins were processed by standard light microscopy method and immunohistochemic technique using rabbit polyclonal antibodies against all three NOS isoforms: iNOS, eNOS and nNOS. Antibodies expression was evaluated semi quantitatively and proved morphometrically by 2D image analysis. Total area of NOS isoforms expressions was determined by color analysis and color digital subtraction.

Results. We observed discontinuous and significantly lower expression of all three NOS isoforms in tunica media of varicose veins compared with control group, where the expression of all three NOS isoforms was continuous. For the statistical analysis was used unpaired t-test.

Discussion and conclusion. Our results suppose lower NO levels in varicose vein wall, deducing that varicose vasodilatation is due to other mechanism, although the stage of chronic venous disease of varicose vein samples was undetermined. Our results are in contradiction with previously published results of Howlader and Abd-El-Aleem, who observed raised total NO levels in patients with severe stages of chronic venous disease.

Key words: varicose veins, nitric oxide (NO), nitric oxide synthase (NOS).

Vask. med., 2011, 3 (2): 80–82

Úvod

Chronické venózne ochorenie dolných končatín (CHVO) je častým ochorením žíl dolných končatín postihujúcim prevažne osoby v produktívnom veku. Vo vyspelých krajinách Európy a USA sa vyskytuje u 40 – 60 % žien a 15 – 30 % mužov (1, 2).

Varikózne (krčové) žily – nadmerne rozšírené, tortuózne vinuté a predĺžené žily – sú len jedným zo symptómov CHVO. Môžu byť primárne (ich príčina nie je známa) alebo sekundárne, vznikajúce najčastejšie ako dôsledok prekonanej hlbokjej flebotrombózy. Jednoznačná príčina primárnej formy

stále nie je úplne zrejímavá, a preto je aj jej liečba vo veľkej miere len symptomatická (3, 4). Do etiopatogenetickej súvislosti sa dáva slabosť žilovej steny spojená s poruchou spojivového tkaniva (kolagénu a elastínu) a hladkého svalstva (5, 6), ale aj porucha funkcie žilového endotelu, poškodenie žilových chlopní a poruchy mikrocirkulácie a výživy žilovej steny (2, 4, 7, 8, 9). Dopusiaľ 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, tromboxán A₂, noradrenalín (8).

Úloha oxidu dusnatého

Oxid dusnatý (NO) – medzibunková signálna molekula, významný vazodilatačný činiteľ vďaka schopnosti relaxácie hladkej svaloviny ciev – má v ľudskom organizme **mnogo vazoprotektívnych funkcií**: inhibuje adhérenciu a agregáciu krvných doštičiek, redukuje adhérenciu leukocytov k endotelu, potláča proliferáciu hladkej svaloviny ciev (10). Zníženie jeho produkcie alebo účinku predisponuje krvné cievy k poškodeniu. V ľudskom organizme je syntetizovaný enzýmom syntáza oxidu dusnatého (NOS), ktorá sa v ľudskom tele vyskytuje

v troch izoformách: endotelálna NOS (eNOS), neuronálna NOS (nNOS), a indukčná NOS (iNOS). Boli pomenované podľa tkaniva, z ktorého boli prvýkrát vyklonované a charakterizované, ich gény sa nachádzajú na chromozómoch 7, 12 a 17. Z biochemického hľadiska sú skupinou komplexných enzýmov, katalyzujúcich oxidáciu L-arginínu na oxid dusnatý (NO) a L-citrulín (10). Vaskuloprotektívny účinok jednotlivých izoformiem ešte nie je dostatočne objasnený (11).

Hlavnou úlohou NO je aktivácia rozpustnej guanylát cyklázy (sGC), produkcia cyklického guanozín monofosfátu (cGMP) a následná aktivácia cGMP závislých procesov. Za niektorých patologických okolností dochádza k zvýšenej aktivácii NOS a zvýšenej produkcii NO. NO hrá dôležitú úlohu aj v patofyziológii niektorých neurodegeneratívnych ochorení. Prítomnosť NO a NOS možno dokázať aj nepriamo histochemickým dôkazom nikotínamidnukleotidfosfát diaforázovej (NADPHd) pozitívity (12).

Izoformy syntázy NO

Endotelálna NOS (eNOS) spolu s neuronálnou NOS patria k tzv. „konštitutívnym“ NOS: t.j. sú exprimované kontinuálne, zároveň sú oba enzýmy aktivované zvýšenou hladinou intracelulárneho kalcia. Endotelálna NOS je farmakologicky totožná so skôr izolovaným EDRF (*endothelium-derived releasing factor*), ktorý exprimuje intaktný endotel (13). Inaktivácia eNOS obmedzuje tvorbu NO, zvyšuje tonus cievnej steny, adhéziu a agregáciu trombocytov. Detailné analýzy poukázali, že enzým je lokalizovaný v Golgiho aparáte ako aj v špecifických štruktúrach plazmalemy – v tzv. kaveolách. Jeho lokalizácia v plazmaleme, kde sa nachádza niekoľko kľúčových signálnych komplexov, má zrejme význam pre jeho aktivitu a dostupnosť intracelulárnymi mechanizmami (10).

Neuronálna NOS (nNOS) je prítomná v nervových bunkách periférneho aj centrálného nervového systému a v niektorých epitelálnych bunkách. Jej aktivita je tiež regulovaná Ca^{2+} a kalmodulínom. Funkcia nNOS zahŕňa reguláciu synaptického prenosu v centrálnom nervovom systéme, centrálnu reguláciu krvného tlaku, relaxáciu hladkej svaloviny a vazodilatáciu prostredníctvom periférnych nitrergických nervov. Tiež je zapojená do neuronálnej smrti pri mozgovom-cievnom infarkte (10). Predpokladá sa, že stimulácia nervu priamo aktivuje uvoľnenie NO z nitrergných nervov a v skutočnosti sa NO javí ako dominantný neurotransmitter zodpovedný za nervom-sprostredkovanú, od endotelu nezávislú vazodilatáciu (13).

Indukčná NOS (iNOS) je prítomná v mnohých rozličných bunkách (makrofágy, endotelálne bunky, bunky hladkej svaloviny ciev, kardiomyocyty a i.) po stimulácii lipopolysacharidmi (LPS), cytokínmi (ako IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-6) a i., t.j. hrá dôležitú úlohu v antimikrobiálnej, antiparazitickej a antineoplastickej aktivite. Táto izoforma nie je regulovaná Ca^{2+} . Produkuje veľké množstvá NO s cytostatickým efektom na parazitické cieľové bunky inhibíciou Fe-sahajúcich enzýmov a spôsobujú fragmentáciu DNA. Indukcia iNOS je súčasťou patofyziológie autoimunitných chorôb a septického šoku (10). Indukčná izoforma NOS (na rozdiel od konštitutívnych NOS izoformiem, ktoré sú exprimované kontinuálne) je exprimovaná po stimulácii zápalovým podnetom, syntetizujú veľké množstvo NO v prechodnom stave (11).

Abd-El-Aleem a spol. (2000) pozorovali zvýšené hladiny eNOS a iNOS v koži chronických vredov predkolenia v porovnaní s so zdravou kožou (14). Howlader a spol. (2002) našiel zvýšené hodnoty celkového NO v krvi pacientov so závažnými formami chronickej vénovej choroby (zhojený vred predkolenia a lipodermatoskleróza) (15).

Cieľ práce, materiál a metódy

Naša práca mala za cieľ **najst spojitost medzi expresiou syntáz NO (NOSs) a dilatáciou žíl u primárnej formy varikózných žíl.**

Porovnávali sme 10 vzoriek varikózných žíl (prevažne vena *saphena magna*) (5 mužov, 5 žien, veková štruktúra pozri tabuľku 1) odobraných pri tzv. „strippingových“ operáciách varikózných žíl dolných končatín s kontrolným súborom, ktorý pozostával rovnako z 10 vzoriek povrchových žíl dolných končatín (prevažne vena *saphena magna*) (7 mužov, 3 ženy, veková štruktúra súboru pozri tabuľku 2) odobraných z nekroptického materiálu Ústavu súdneho lekárstva LFUK Bratislava v rokoch 1998 – 2003 od jedincov bez anamnézy akéhokoľvek cievneho postihnutia. Vzorky boli po odbere fixované neutrálnym formolom a následne spracované metódou svetelnej mikroskopie do parafínových blokov. Rezy boli ďalej podrobené štandardnej imunohistochemickej technike s použitím polyklonálnych králičích protilátok proti všetkým trom izoformám NO-syntáz: eNOS a iNOS (Santa Cruz, USA), nNOS (Bioscience, USA). Pozitívna markerov bola hodnotená semikvantitatívne aj morfologeticky. Pri semikvantitatívnom hodnotení sme sa sústredili na histologické charakteristicky nálezy, lokalizáciu pozitívity vzhľadom na anatomické vrstvy žilovej steny a intenzitu pozitívity (- negatívny nález, +/- nepravidelná pozitívita, + slabá pozitívita, ++ stredne silná pozitívita, +++ silná pozitívita). Expresia skúmaných markerov

Tabuľka 1. Súbor vzoriek varikózných žíl – veková štruktúra.

	muži	ženy	spolu
počet (n)	5	5	10
priemerný vek v čase odberu (roky)	29,8	32,8	31,3
vekové rozpätie (roky)	22 – 37	24 – 42	22 – 42
medián (roky)	30	30	30

Tabuľka 2. Kontrolný súbor vzoriek (zdravé žily) – veková štruktúra.

	muži	ženy	spolu
počet (n)	7	3	10
priemerný vek v čase odberu (roky)	26,143	30,333	27,4
vekové rozpätie (roky)	19 – 40	20 – 39	19 – 40
medián (roky)	26	32	26,5

bola overená aj morfologeticky. Obraz sme analyzovali pomocou dvojrozmerného obrazového analyzátora (ImageJ 1.34n, National Institute of Health, USA). Digitálnou farebnou subtrakciou sme z obrazu izolovali celkovú plochu pozitívity danej NO-syntázy (hnedá farba) v médií ciev a nasledujúcou farebnou analýzou sme určili jej podiel voči celkovej ploche *tunica media*.

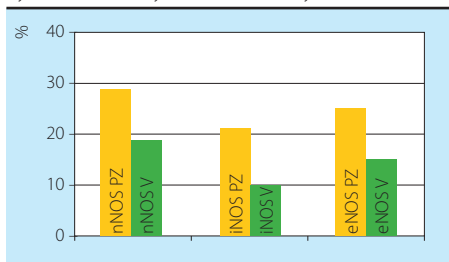
Výsledky

Histomorfologické a semikvantitatívne hodnotenie pri porovnaní varikózných žíl so zdravými kontrolami poukázalo na zníženie expresie všetkých troch izoformiem NO-syntázy (eNOS, nNOS a iNOS) v médií ciev (obrázok 1). V kontrolných vzorkách média vykazovala kontinuálnu, difúznou expresiu NO-syntáz, kým vo varikózných cievach bola pozitívita diskontinuálna (obrázky 2, 3, 4, 5). Skúmané markery sme hodnotili aj v intíme, kde expresia kopírovala pozitívitu média s výnimkou dvoch varikózných vzoriek (V55, V54). V týchto preparátoch bola expresia iNOS a nNOS výrazne vyššia v intíme v porovnaní s médiou. Endotelálna NOS vykazovala pozitívitu aj v endotelových bunkách, pričom v zdravých cievach bola expresia prevažne kontinuálna a vo väčšine varikózných žíl boli výpadky v pozitívite endotelu. Štatisticky významné výsledky morfologetickej analýzy potvrdili semikvantitatívne stanovenú zníženú expresiu všetkých troch izoformiem NO-syntáz v médií varikózných žíl. V štatistickej analýze sme použili nepárový t test.

Diskusia a záver

Výsledky našej práce protirečia výsledkom konfrontovaných prác Abd-El-Aleema (2000)

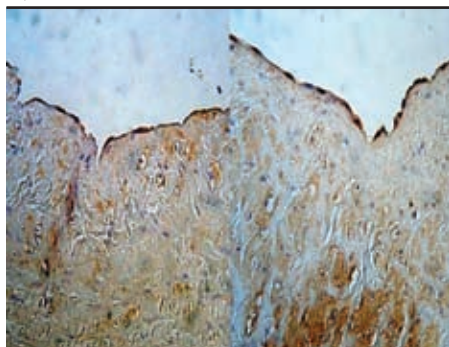
Obrázok 1. Graf porovnania expresie izoformiem syntáz oxidu dusnatého (NOS) v stene varikózných (V) a zdravých, nedilatovaných (PZ) žíl.



Obrázok 2. Expresia endoteliálnej NOS (eNOS) v stene zdravej (vľavo) a varikózne žily (vpravo).



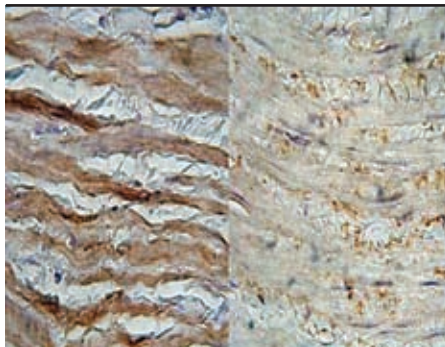
Obrázok 3. Výraznejšia expresia eNOS v endotele tunica intima zdravej (vľavo) a varikózne žily (vpravo).



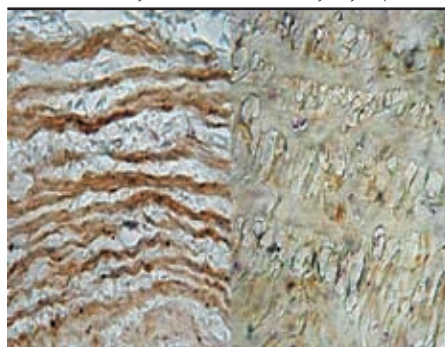
a Howladera a spol. (2002) (14, 15). Abd-El-Aleem a spol. imunocytochemickou metodikou pozoroval zvýšenú celkovú NOSs expresiu, aj zvýšenie expresie eNOS, iNOS a arginázy v koži chronických vredov predkolenia (14). Howlader a spol. kolorimetrickou metódou zistil zvýšené hladiny celkového NO v plazme pacientov so závažným venóznym postihnutím – zhojený vred predkolenia a lipodermatoskleróza, čo zodpovedá štádiu C4 a C5 podľa CEAP klasifikácie. V menej závažných štádiách chronického venózneho ochorenia (C2 a C3) nebol rozdiel v hladinách celkového NO medzi sledovanými a kontrolnými subjektmi štatisticky významný (15). V našej práci sme štádiom venózneho postihnutia podľa CEAP klasifikácie nezaznamenávali, len spätne sa môžeme domnievať, že mohlo ísť o štádium C2 (kmeňové varixy vena saphena magna určené k strippingovej extrakcii, presnejšie C2-EP-AS-PR).

Pre **endoteliálnu izoformu NOS** sme potvrdili jej výraznejšiu expresiu v endotele tunica intima

Obrázok 4. Expresia neuronálnej NOS (nNOS) v stene zdravej (vľavo) a varikózne žily (vpravo).



Obrázok 5. Expresia indukovateľnej NOS (iNOS) v stene zdravej (vľavo) a varikózne žily (vpravo).



oboch sledovaných súborov, pričom v kontrolnom súbore preukazovala difúznú a kontinuálnu expresiu a vo varikóznom súbore bola jej expresia diskontinuálna (obrázky 2, 3). To potvrdzuje fakt, že eNOS je exprimovaná intaktným endotelom a endotel varikózných žíl je charakterizovaný jeho porušenou funkciou.

Expresie nNOS a iNOS taktiež preukazovali nižšiu a diskontinuálnu expresiu vo varikóznom súbore v porovnaní so zdravými vzorkami, z čoho možno dedukovať, že dilatácia varikózných žíl nie je dôsledkom stimulácie periférnych nitrogénových vlákien, ani zápalovej etiológie (obrázky 4, 5). Posledný spomenutý fakt koreluje s výsledkami jednej z našich predošlých prác, pri ktorej sme zistili zníženú hustotu žírnych buniek v stene varikózných žíl (16). Výraznejšia pozitivita nNOS a iNOS v tunica intima dvoch varikózných vzoriek (obe vzorky pochádzali z vena saphena magna mužov vo veku 30 a 32 rokov) bola pravdepodobne zapríčinená iným nerozpoznaným koincidujúcim ochorením. V ostatných varikózných vzorkách kopírovala expresia oboch markerov v tunica intima ich expresiu v tunica media.

Výsledky našej práce predpokladajú nižšie hladiny oxidu dusnatého (NO) v stene varikózných žíl, z čoho vyvodzujeme, že dilatácia varikózných žíl je pravdepodobne dôsledkom iného patomechanizmu – aj keď v našej práci sme nezohľadňovali štádiom venózneho postihnutia, avšak potvrdili sme porušenú funkciu endotelu varikózných žíl. Môžeme sa len domnievať, že ex-

presia NO-syntáz ako aj hladina oxidu dusnatého v stene varikózných žíl sa môže meniť v závislosti od štádia závažnosti žilového postihnutia.

Na overenie výsledkov našej práce existuje niekoľko možností: a) zopakovať metodiku na početnejšom súbore vzoriek so zaznamenaním štádia závažnosti venózneho postihnutia varikózných vzoriek; b) porovnanie koncentrácie Ca^{2+} v stene varikózných žíl; c) porovnanie NOS expresie nepriamym histochemickým dôkazom NADPHd pozitivitu v stene varikózných žíl; d) porovnanie expresie vybraných zápalových stimulov, známych svojou potenciáciou iNOS expresie (IL-1 β , IL-6, TNF- α , a pod.).

Literatúra

- Štvrtinová V, Kolesár J, Wimmer G. Prevalence of varicose veins of the lower limbs in the women working at the department store. *Inter Angio* 1991; 10: 2–5.
- Štvrtinová V. Pentoxifylín v liečbe chronickej žilovej insuficiencie. *Prakt flebol* 1999; 3: 131–134.
- Bergan JJ. Development of primary varicose veins. *Phlebology* 1997; 18: 3–8.
- Corcos L, Peruzzi G, Romeo V, Procacci T, Dini S. Peripheral venous biopsy: significance, limitations, indications and clinical applications. *Phlebology* 1989; 4: 271–274.
- Travers JP, Brookes CE, Evans J, Baker DM, Kent C, Makin GS, Mayhew TM. Assessment of wall structure and composition of varicose vein with reference to collagen, elastin and smooth muscle content. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1996; 11: 230–237.
- 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* 1996; 60: 245–248.
- Thulesius O. The venous wall and valvular function in chronic venous insufficiency. *Inter Angio* 1996; 15: 114–118.
- Ono T, Bergan JJ, Schmid-Schonbein GW. Infiltration of venous intima by monocytes. *J Vasc Med Biol* 1998; 10: 158–166.
- Kachlik D, Báča V, Fara P, Lametschwandner A, Minnick B, Musil V, Sosan B, Stingl J, Straka Z, Setina M. Blood vessels of the normal and pathologically changed wall of the human vena saphena magna. *Central European Journal of Medicine* 2008; 3 (4): 475–481.
- Viaro F et al. Expression of Nitric Oxide Synthases in the Pathophysiology of Cardiovascular Diseases. *Arq Bras Cardiol* 2000; 74(4): 380–393.
- Yogo K et al. Different Vasculoprotective Roles of NOS Isoforms in Vascular Lesion Formation in Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: e96–e100.
- Kafka J, Lukáčová D, Čížková D, Maršala J. Zmeny v aktivite syntázy oxidu dusnatého v mieche po ligácii koreňov cauda equina v experimente. *Cesk Slov Neurol N* 2007; 70/103 (5): 505–511.
- Donald JA, Broughton BRS. Nitric oxide control of lower vertebrate blood vessels by vasomotor nerves. *Comp Biochem Physiol* 2005; A 142: 188–197.
- Abd-El-Aleem SA, Ferguson MWJ, Appleton I et al. Expression of nitric oxide synthase isoforms and arginase in normal human skin and chronic venous leg ulcers. *J Pathol* 2000; 191: 434–442.
- Howlader MH, Smith PD. Increased plasma total nitric oxide among patients with severe chronic venous disease. *Int Angiol* 2002; 21(2): 180–186.
- Haviarová Z, Weismann P, Pavlíková D, Durdík S, Kováč P, Štvrtinová V, Mráz P. Mast cell infiltration in the wall of varicose veins. *Acta Histochem* 2002; 104(4): 357–360.

MUDr. Zora Haviarová, PhD.

Anatomický ústav LF UK
Sasinkova 2, 813 72 Bratislava
zora.haviarova@fmed.uniba.sk

