

ARTICOL DE CERCETARE

## Particularități histopatologice și imunohistochimice ale venelor varicoase ale membrului inferior

Anastasia Bendelic<sup>1\*</sup>, Marius Raica<sup>2†</sup>

<sup>1</sup>*Catedra de anatomie a omului, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova;*

<sup>2</sup>*Departamentul de Morfologie Microscopică, Disciplina de Histologie, Centrul de Cercetări în Angiogenează, Universitatea de Medicină și Farmacie „Victor Babeș” din Timișoara, România.*

Data primirii manuscrisului: 05.06.2018

Data acceptării spre publicare: 20.09.2018

### Autor corespondent:

Anastasia Bendelic, doctorand

Catedra de anatomie a omului

Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”

bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, Chișinău, Republica Moldova, MD-2004

e-mail: anastasia.bendelic@usmf.md

### Ce nu este cunoscut, deocamdată, la subiectul abordat

La momentul actual, nu este clar care din modificările histopatologice ale peretelui venos sunt primare și/sau secundare, și care dintre aceste modificări ar putea fi definite ca factori declanșatori ce conduc la apariția varicelor.

### Ipoteza de cercetare

Studierea modificărilor histopatologice și imunohistochimice ale peretelui venos prezente de-a lungul unei singure vene safene dilatate varicos și/sau la diferite etape evolutive ale bolii ar putea aduce contribuții la înțelegerea patogeniei bolii venoase cronice.

### Noutatea adusă literaturii științifice din domeniu

La etapele inițiale ale bolii varicoase modificările histopatologice includ hipertrofia și hiperplazia celulelor musculare netede ale tunicii medii, precum și îngroșarea peretelui venos din contul hiperplaziei intinale. Se pare că un rol primordial în patogenia bolii îi revine celulei musculare netede vasculare, prezentă sub formă de două fenotipuri: (1) contractil, cu citoplasmă bogată în miofilamente și (2) secretor de colagen, elastină, proteoglicani.

### Rezumat

**Introducere.** Boala varicoasă sau boala venoasă cronică poate afecta toate segmentele sistemului venos, dar interesează cu precădere sistemul venei cave inferioare. Mai frecvent, leziunile afectează venele superficiale ale membrului inferior. Deși, au fost publicate numeroase lucrări asupra modificărilor morfologice ale venelor afectate de boala varicoasă, este încă

RESEARCH ARTICLE

## Histopathological and immunohistochemical peculiarities of varicose veins of the lower limbs

Anastasia Bendelic<sup>1\*</sup>, Marius Raica<sup>2†</sup>

<sup>1</sup>*Chair of human anatomy, Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy, Chisinau, Republic of Moldova;*

<sup>2</sup>*Department of Microscopic Morphology, Discipline of Histology, Angiogenesis Research Center, Victor Babes University of Medicine and Pharmacy, Timisoara, Romania.*

Manuscript received on: 05.06.2018

Accepted for publication on: 20.09.2018

### Corresponding author:

Anastasia Bendelic, PhD fellow

Chair of human anatomy

Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy

165, Ștefan cel Mare și Sfânt ave, Chisinau, Republic of Moldova, MD-2004

e-mail: anastasia.bendelic@usmf.md

### What is not known yet, about the topic

At the current moment, it is not clear which histopathological changes of the venous wall are primary and/or secondary, and which of these changes could be defined as trigger factors that lead to varicose veins.

### Research hypothesis

Study of the histopathological and immunohistochemical changes of the venous wall present along a single varicose saphenous vein and/or at various evolutionary stages of the disease could contribute to understanding the pathogenesis of the chronic venous disease.

### Article's added novelty on this scientific topic

At the initial stages of varicose disease the histopathological changes include hypertrophy and hyperplasia of smooth muscle cells of the media, as well as thickening of the venous wall due to intimal hyperplasia. It appears that primordial role in the pathogenesis of the disease lies on the vascular smooth muscle cell present in the form of two phenotypes: (1) contractile, with cytoplasm rich in myofilaments and (2) synthetic, that secrete collagen, elastin, and proteoglycans.

### Abstract

**Introduction.** Varicose disease or chronic venous disease may affect all segments of the venous system but particularly affects the system of the inferior vena cava. More frequently, the lesions affect superficial veins of the lower limb. Although there were published numerous works about morphological modifications of veins affected by the varicose disease it is still

neclar care este succesiunea acestor leziuni și cum contribuie la apariția varicelor. Scopul acestui studiu a fost de a clarifica schimbările histopatologice și imunohistochimice prezente de-a lungul unei vene safene dilatate varicos și în venele safene la diferite etape evolutive ale bolii venoase.

**Material și metode.** Drept obiect de studiu au servit venele safene dilatate varicos, înlăturate chirurgical în cadrul safenectomiilor. Materialul postoperator a fost colectat de la 8 pacienți cu vârsta cuprinsă între 19 și 68 de ani, internați pentru tratament chirurgical în secția de chirurgie vasculară a SCR „Timofei Moșneaga” din Chișinău. Conform clasificării CEAP a bolii venoase cronice, lotul de pacienți a fost divizat în două grupuri: sublotul 1 – 5 pacienți în stadiile clinice CEAP<sub>2,3</sub>, sublotul 2 – 3 pacienți în stadiile clinice CEAP<sub>4-6</sub>. Venele varicoase au fost fixate în formalină neutră, incluse în parafină și colorate prin metode de colorare uzuale, specifice și imunohistochimice.

**Rezultate.** Modificările histopatologice ale peretelui venos (sublot 1) au cuprins îngroșarea mediei și intimei din contul hipertrofiei și hiperplaziei celulelor musculare netede, atât la nivel subendotelial, cât și în tunica medie. Creșterea componentei fibrilare colagenice a fost asociată cu creșterea componentei fibrilare elastice. Venele sublotului 2 aveau intima și media îngroșate datorită prezenței colagenului în cantități mari. Fasciculele de miocite ale mediei au fost fragmentate și înlocuite de fibrele de colagen în exces. Sublotul 2 a prezentat, de asemenea, detașarea endotelului și înlocuirea stratului endotelial cu fibre de colagen. Adventicea, la rândul său, a prezentat un număr impunător de vase ale microcirculației (*vasa vasorum*).

**Concluzii.** În stadiile clinice incipiente ale bolii venoase cronice (sublot 1) predomină hiperplazia și hipertrofia celulelor musculare netede ale mediei. În stadiile clinice avansate (sublot 2) se declanșează un proces de fibrozare a mediei și intimei (fleboscleroză); denudarea endotelului conduce, de obicei, la formarea trombilor în lumenul venei (tromboflebită), iar densitatea microcirculației la nivelul adventiceei crește odată cu avansarea bolii.

**Cuvinte cheie:** boală venoasă cronică, vene varicoase, vene safene, microcirculație.

## Introducere

Bolile venoase au o incidență de 20-50% în rândurile populației adulte, reprezentând una dintre cele mai frecvente probleme de sănătate la nivel mondial [1-3]. Conform tratatelor de chirurgie [4, 5], boala venoasă cronică (l. engl. *chronic venous disease*) este un termen care cuprinde modificările funcționale și/sau morfologice ale sistemului venos, de la modificări fără impact fiziopatologic (teleangiectazii sau vene „în pânză de păianjen”) până la modificări severe (ulcer venos).

Între afecțiunile vasculare periferice, boala venoasă cronică este o afecțiune a cărei severitate a fost mult timp și încă este subestimată. Boala venoasă cronică este definită diferit: unii autori [4] o definesc ca o afecțiune cronică, caracterizată printr-un proces de degenerare a peretelui venos, alții [6, 7] – ca o boală inflamatorie cronică, determinată de acțiunea persistentă și constantă a hipertensiunii venoase, cu impact

unclear what is the succession of lesions and how they contribute to the development of varicose veins. The purpose of the current research was to clarify histopathological and immunohistochemical modifications present along a single saphenous vein or in the saphenous veins at various evolutionary stages of the venous disease.

**Material and methods.** As object of studying served the varicose saphenous veins surgically removed during saphenectomy. Postoperative material was collected from eight patients aged from 19 to 68 years and admitted for surgical treatment at the Department of vascular surgery of “Timofei Mosneaga” Republican Clinical Hospital, Chisinau, Republic of Moldova. According to CEAP classification of the chronic venous disease, the patients were divided in two subgroups: subgroup 1 – five patients at clinical stages CEAP<sub>2,3</sub> and subgroup 2 – three patients at clinical stages CEAP<sub>4-6</sub>. The varicose veins were fixed in formalin, embedded in paraffin and stained using routine, special and immunohistochemical staining methods.

**Results.** Histopathological modifications of venous wall (subgroup 1) comprise thickening of media and intima due to the hypertrophy and hyperplasia of smooth muscle cells both of subendothelium layer and media. Increasing fibrillar collagen components was associated with increasing fibrillar elastic components. Veins of subgroup 2 had thick media and intima because of presence of large amount of collagen. Subgroup 2 showed detachment of endothelium and it replacement with fibres of collagen. Adventitia, in turn, presented a large number of microcirculatory vessels (*vasa vasorum*).

**Conclusions.** At the incipient clinical stages of the chronic venous disease predominate the hypertrophy and hyperplasia of smooth muscle cells of the media. At the advanced stages a process of sclerosis of media and intima starts (phlebosclerosis). Endothelium detachment leads to the thrombus formation in the venous lumen (thrombophlebitis), but the intensity of microcirculation at the level of adventitia increases together with the evolution of the disease.

**Key words:** chronic venous disease, varicose veins, saphenous veins, microcirculation.

## Introduction

Venous diseases have an incidence of 20-50% among adult population, representing one of the most common health problems in the world [1-3]. According to surgical tractates [4, 5], chronic venous disease is a term that includes functional and/or morphological modifications of the venous system, from modifications without pathophysiological impact (telangiectasias or spider veins) to severe modifications (venous ulcer).

Among peripheral vascular affections, chronic venous disease is a condition which severity was for a long time and is still underestimated. The chronic venous disease is defined differently: some authors [4] define it as a chronic condition characterized as a process of degeneration of the venous wall, others [6, 7] – as a chronic inflammatory disease caused by persistent and constant venous hypertension, with a direct impact on the morphological formations of the venous wall.

direct asupra formațiunilor morfologice din componența peretelui venos.

Procesul degenerativ sau inflamator al peretelui venos ar explica apariția dilatațiilor venoase permanente la nivelul venelor superficiale (epifasciale) ale membrelor inferioare, cu un traiect caracteristic sinuos și/sau ampular, numite în literatura de specialitate *varice*. Aceste dilatații venoase sunt însoțite de alterări parietale și de tulburări de hemodinamică venoasă [8-11]. Din punct de vedere clinic, există patru stadii ale afectării venoase, caracterizate de elemente clinice particulare (de la minore și tranzitorii, la severe și permanente):

- *Stadiul I*, numit prevaricos, însoțit de picioare grele ca de plumb, crampe predominant nocturne, furnicături, senzația de arsură la picioare sau senzația de picior obosit;
- *Stadiul II* – apar varice pe traiectul venelor (vene varicoase), asociate cu edem în regiunea gleznei;
- *Stadiul III* este însoțit de modificări la nivelul pielii (pigmentare, eczeme);
- *Stadiul IV* se asociază cu lipodermatoscleroză, atrofie albă și ulcere venoase.

Conform clasificării CEAP (Clinică, Etiologică, Anatomică și Patologică) [12-14], clasificare larg răspândită a bolii venoase cronice, clinicii bolii în cauză i se disting următoarele stadii:  $C_0$  – fără modificări vizibile sau palpabile de boală venoasă,  $C_1$  – telangiectazii (<1mm) și/sau vene reticulare (1-3 mm),  $C_2$  – vene varicoase (>3mm),  $C_3$  – edem,  $C_4$  – modificări cutanate și subcutanate ( $C_{4a}$  – pigmentare sau exemă;  $C_{4b}$  – lipodermatoscleroză sau atrofie albă),  $C_5$  – ulcer venos vindecat,  $C_6$  – ulcer venos acut. Clasificarea etiologică a bolii venoase cuprinde:  $E_c$  – congenitală,  $E_p$  – primară,  $E_s$  – secundară (posttrombotică),  $E_n$  – fără cauză venoasă identificată. Clasificarea anatomică include:  $A_s$  – vene superficiale,  $A_p$  – vene perforante,  $A_d$  – vene profunde (l. engl. *deep veins*),  $A_n$  – fără identificarea sediului venos. Și, în cele din urmă, clasificarea patologică înglobează:  $P_r$  – reflux,  $P_o$  – obstrucție,  $P_{r,o}$  – reflux și obstrucție,  $P_n$  – fără modificări fiziopatologice stabilite.

Sub aspect histopatologic, modificări morfologice microscopice în cazul bolii venoase cronice [6, 15-27] sunt localizate la nivelul celor trei tunici ale peretelui venos (intimă, medie, adventice) și interesează, mai frecvent, vena safenă mare. Deși, au fost publicate numeroase lucrări asupra modificărilor morfologice ale venelor afectate de boala varicoasă, este încă neclar care este succesiunea acestor leziuni și cum contribuie la dezvoltarea insuficienței venoase cronice. De asemenea, particularitățile moleculare ale venelor varicoase au fost foarte puțin studiate, iar cunoștințele în domeniu sunt lacunare.

Scopul acestui studiu a fost de a clarifica schimbările histopatologice și imunohistochimice prezente de-a lungul unei vene safene dilatate varicos și în venele safene la diferite etape evolutive ale bolii venoase, precum și modificările microcirculației peretelui venos (*vasa vasorum*) în cazul bolii venoase cronice. Din informațiile pe care le avem, studii prin biopsii multiple etajate din venele varicoase sunt foarte puține și cu concluzii încă în dezbatere.

### Material și metode

Drept obiect de studiu au servit venele safene dilatate varicos, înlăturate chirurgical în cadrul safenectomiilor (prin

The degenerative or inflammatory process of the venous wall would explain the occurrence of permanent venous dilations in the superficial (epifascial) veins of lower limb with a characteristic sinuous and/or ampullary trajectory called in the specialized literature *varices*. These venous dilations are accompanied by parietal alterations and venous hemodynamic disorders [8-11]. From a clinical point of view, there are four stages of venous disease characterized by particular clinical features (from minor and transient to severe and permanent):

- *Stage I*, called prevaricos, is accompanied by heavy legs, predominant nocturnal leg cramps, tingling, burning sensation or tired legs feeling;
- *Stage II* – varices appear along the veins (varicose veins) associated with edema in the ankle region;
- *Stage III* is accompanied by skin changes (pigmentation, eczema);
- *Stage IV* is associated with lipodermatosclerosis, white atrophy and venous ulcers.

According to CEAP classification (Clinical, Etiological, Anatomical and Pathological) [12-14], a widespread classification of the chronic venous disease, the following clinical stages are distinguished:  $C_0$  – no visible or palpable changes of the venous disease,  $C_1$  – telangiectasia (<1 mm) and/or reticular veins (1-3 mm),  $C_2$  – varicose veins (>3 mm),  $C_3$  – edema,  $C_4$  – skin and subcutaneous changes ( $C_{4a}$  – pigmentation or eczema,  $C_{4b}$  – lipodermatosclerosis or white atrophy)  $C_5$  – healed venous ulcer,  $C_6$  – acute venous ulcer. Etiological classification of venous disease comprises:  $E_c$  – congenital,  $E_p$  – primary,  $E_s$  – secondary (post-thrombotic),  $E_n$  – no identified venous cause. Anatomical classification includes:  $A_s$  – superficial veins,  $A_p$  – perforator veins,  $A_d$  – deep veins,  $A_n$  – without venous site identification. And finally, the pathological classification comprises:  $P_r$  – reflux,  $P_o$  – obstruction,  $P_{r,o}$  – reflux and obstruction,  $P_n$  – without established pathophysiological changes.

In histopathological terms, microscopic morphological changes in the chronic venous disease [6, 15-27] are localized at the level of the three venous (intima, media, adventitia) tunics and more frequently concern with great saphenous vein. Although, many works have been published on the morphological changes of varicose veins, it is still unclear what the succession of these lesions is, and how they contribute to the development of chronic venous insufficiency. Also, the molecular particularities of the varicose veins have been very little studied and the knowledge in the field is incomplete.

The purpose of this study was to clarify the histopathological and immunohistochemical changes present along a single varicose saphenous vein and in the saphenous veins at various evolutionary stages of venous disease, as well as changes of microcirculation (*vasa vasorum*) in chronic venous disease. From the information we have, multiple patch biopsy studies in the varicose veins are very few and with conclusions yet under discussion.

### Material and methods

As an object of studying served the varicose saphenous veins, surgically removed during the stripping saphenectomy.

stripping). Materialul postoperator a fost colectat de la 8 pacienți cu vârsta cuprinsă între 19 și 68 de ani, internați pentru tratament chirurgical în secția de chirurgie vasculară a SCR „Timofei Moșneaga” în lunile martie-aprilie 2017. Pacienții au fost familiarizați cu investigațiile ce urmează și au semnat acordul informat. Studiul a fost avizat de Comitetul de Etică a Cercetării al USMF „Nicolae Testemițanu”, nr. 30/32 din 29.05.2014.

Materialul biologic a fost fixat în formalină neutră de 10% pentru 24 de ore. Fiecare venă safenă înlăturată prin stripping a fost secționată în segmente a câte 1 cm lungime care, ulterior, au fost incluse în parafină. Din fiecare bloc de parafină s-au realizat secțiuni de 3 μm grosime, care s-au montat pe lame histologice uzuale și pe lame silanate, ce asigură o adeziune superioară în cazul colorațiilor imunohistochimice. Pentru studierea structurii microscopice a venelor safene și modificărilor histopatologice în caz de boală varicoasă s-au folosit metode histologice de colorare uzuală (hematoxilina-eozină), colorații speciale și colorații imunohistochimice. Secțiunile inițiale ale fiecărui bloc de parafină au fost colorate cu hematoxilina-eozină, cele de mijloc – cu colorații speciale (tricromă Masson, orceină și impregnație argentică Gömöri), iar cele adiționale au fost colorate imunohistochimic cu anti-CD34 și anti-αSMA (*Qbend10* și respectiv, *1A4*, *Dako*, *Glostrup*, *Danemarca*). Studiul histopatologic și imunohistochimic a fost realizat în cadrul Centrului de Cercetări în Angiogeneză a Universității de Medicină și Farmacie „Victor Babeș” din Timișoara, România.

Examinarea microscopică și obținerea imaginilor a fost efectuată cu microscopul Nikon Eclipse E800, folosind ocularul de 4× și obiectivele de 4×, 10×, 20× și 40×. Cele mai semnificative imagini au fost preluate cu ajutorul unei camere digitale.

Numărul total de obiecte confecționate și studiate (preparate microscopice și imunohistochimice) a fost de 282.

## Rezultate

Lotul de studiu a fost constituit din 8 pacienți cu boala venoasă cronică: 5 pacienți – în stadiul clinic II sau CEAP<sub>2,3</sub> (sublot 1), 3 pacienți – în stadiile clinice III-IV sau CEAP<sub>4,6</sub> (sublot 2).

Imaginea morfologică a peretelui venos al venei safene mari în cazul stadiului clinic II sau CEAP<sub>2,3</sub> (sublot 1) în colorația standart HE a pus în evidență media îngroșată (Figura 1a), a cărei grosime a devenit predominantă comparativ cu celelalte tunici ale peretelui venos. Pe circumferința vasului îngroșarea mediei a fost, de cele mai dese ori, uniformă, fiind, în unele cazuri, îngroșată neuniform.

Colorațiile tricromă Masson, orceină și impregnația argentică Gömöri au permis evaluarea țesutului conjunctiv. Hipertrofia mediei, dar și a intimei au fost însoțite de o creștere minimă sau moderată a matricei conjunctive fibrilare și nefibrilare. Fibrele de colagen, interpușe între celulele musculare netede ale mediei, au format cordoane și fascicule (Figura 1d). Creșterea componentei fibrilare colagenice a fost asociată cu creșterea componentei fibrilare elastice. Numărul mare de fibre elastice hiperplaziate au format lamele (cu aspect de limitantă) la limita dintre medie și adventice, iar în grosimea tunicii medii fibrele elastice hiperplaziate au avut un aspect

The postoperative material was collected from eight patients aged from 19 to 68 years admitted for surgical treatment at the Department of vascular surgery of “Timofei Moșneaga” Republican Clinical Hospital, Chisinau, Republic of Moldova, during March-April 2017. Patients were familiar with the followed investigations and signed the informed consent. The study has been approved by the Ethics Committee of *Nicolae Testemitanu* State University of Medicine and Pharmacy, no. 30/32 of 29.05.2014.

The biological material was fixed in 10% neutral formalin for 24 hours. Each saphenous vein removed by stripping was cut into segments of 1 cm long and subsequently embedded in paraffin. From each paraffin block there were sectioned slices ranging 3 μm in thickness, which were mounted on usual histological slides, and also on silanized slides providing superior adhesion for immunohistochemical stains. To study the microscopic structure of the saphenous veins and histopathological changes in case of varicose disease, the routine (hematoxylin-eosin), special and immunohistochemical staining methods were used. The initial sections of each paraffin block were stained with hematoxylin-eosin, the middle ones – with special stains (Masson’s trichrome, orcein staining and Gömöri’s silver impregnation), and the additional ones were immunohistochemically stained with anti-CD34 and anti-αSMA (*Qbend10* and *1A4*, respectively, *Dako*, *Glostrup*, Denmark). The histopathological and immunohistochemical study was conducted at the Angiogenesis Research Center of “Victor Babeș” University of Medicine and Pharmacy, Timisoara, Romania.

Microscopic examination and image acquisition was performed with the Nikon Eclipse E800 microscope, using the 4x eyepiece and 4x, 10x, 20x, and 40x lenses. The most significant images were taken with a digital camera.

The total number of objects made and studied (microscopic and immunohistochemical preparations) was 282.

## Results

The study group consisted of 8 patients with chronic venous disease: 5 patients in clinical stage II or CEAP<sub>2,3</sub> (subgroup 1), 3 patients – in clinical stages III-IV or CEAP<sub>4,6</sub> (subgroup 2).

The morphological image of the venous wall of the great saphenous vein in the clinical stage II or CEAP<sub>2,3</sub> (subgroup 1) in HE standard staining revealed the thickened media (Figure 1a), the thickness of which became predominant compared to the other venous wall tunics. On the circumference of the vessel the thickening of the media was most often uniform, being sometimes thickened unevenly. Masson’s trichrome, orcein staining and Gömöri’s silver impregnation allowed for connective tissue evaluation. Hypertrophy of both media and intima were accompanied by a minimal or moderate increasing of fibrillar and non-fibrillar connective tissue matrix. Collagen fibers interposed between the smooth muscle cells of the media formed cords and bundles (Figure 1d). The increased fibrillar collagen component was associated with the increased fibrillar elastic component. The large number of hyperplastic elastic fibers formed lamellae (with limiting aspect) at the border between the media and adventitia, and in the thickness of the media the hyperplastic elastic fibers had

fragmentat (Figura 1e). Fibrele reticulare (colagenul tip III), cu distribuție diferită, au fost depistate în membrana bazală subendotelială și în tunica medie, în jurul celulelor musculare netede (Figura 1f).

Folosind marker-ul celulelor mioepiteliale, actina specifică mușchiului neted, a fost posibilă evaluarea celulelor musculare netede din grosimea peretelui venos. Sublotul 1 a prezentat hiperplazia și hipertrofia celulelor musculare netede la nivel subendotelial și la nivelul mediei. La nivel subendotelial actina avea o distribuție heterogenă, perpendicular pe medie, în timp ce la nivelul mediei prezenta o dispoziție concentrică în jurul lumenului (Figura 1b).

Endoteliul vascular a fost evidențiat imunohistochimic cu anticorpi monoclonali CD34, care au reliefat endoteliul intact al intimei și endoteliul vaselor (Figura 1c) din adventice (*vasa vasorum*).

Imaginea morfologică a peretelui venos în cazul stadiilor clinice III-IV sau CEAP<sub>4-6</sub> (sublot 2) a atestat atât media, cât și intima îngroșate (Figura 2a), îngroșare datorată prezenței colagenului în cantități mari (Figura 2d). Fasciculele de miocite ale mediei au fost subțiate și fragmentate în insule (Figurile 2b și 2c) sau înlocuite de fibrele de colagen în exces. Alături de fibrele de colagen în exces au fost depistate și fibre elastice hiperplaziate.

În același timp, în sublotul 2 a fost observată detașarea endoteliului intimei (Figura 2f) și înlocuirea stratului endo-

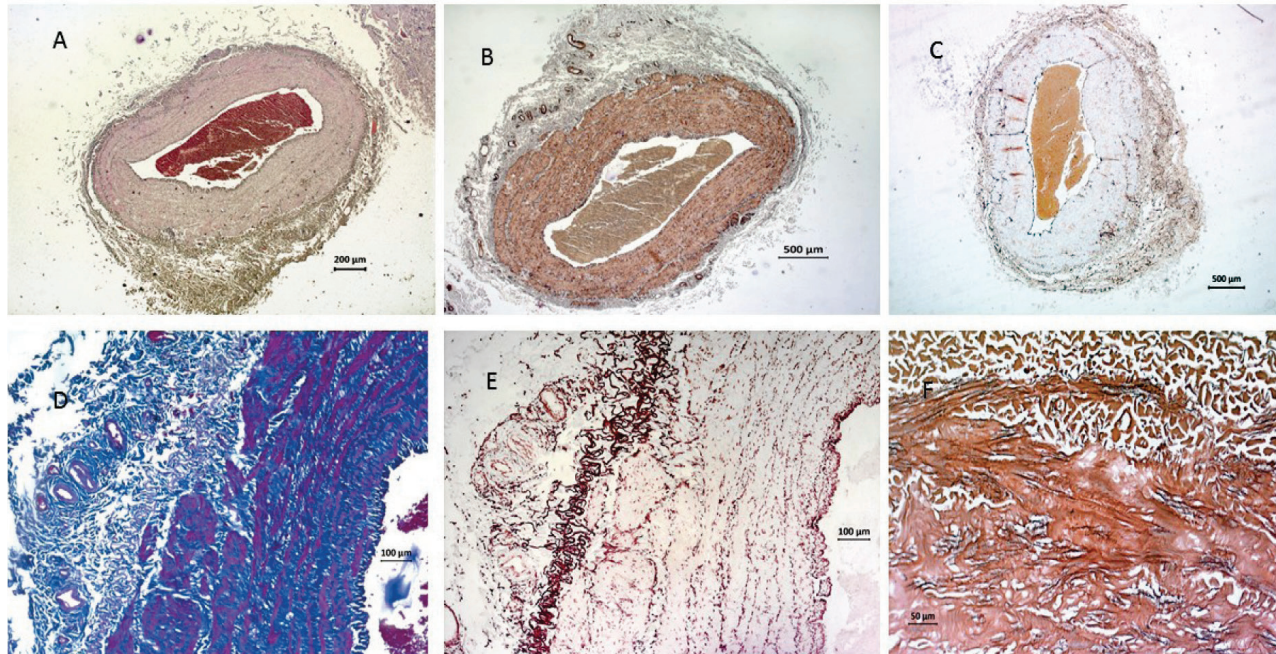
a fragmentary appearance (Figure 1e). Reticular fibers (type III collagen) with different distribution were detected in the subendothelial basal membrane and in the media around the smooth muscle cells (Figure 1f).

Using actin smooth muscle antibody, a myoepithelial cells marker, it was possible to evaluate the smooth muscle cells from the venous wall thickness. Subgroup 1 showed hypertrophy and hyperplasia of smooth muscle cells at the subendothelial layer and media. At the subendothelial layer, the actin had a heterogeneous distribution, perpendicular to the media, while at the media there was a concentric disposition around the lumen (Figure 1b).

The vascular endothelium was stained immunohistochemically with CD34 monoclonal antibodies, which revealed the intact endothelium of the intima and the endothelium of the vessels (Figure 1c) of the adventitia (*vasa vasorum*).

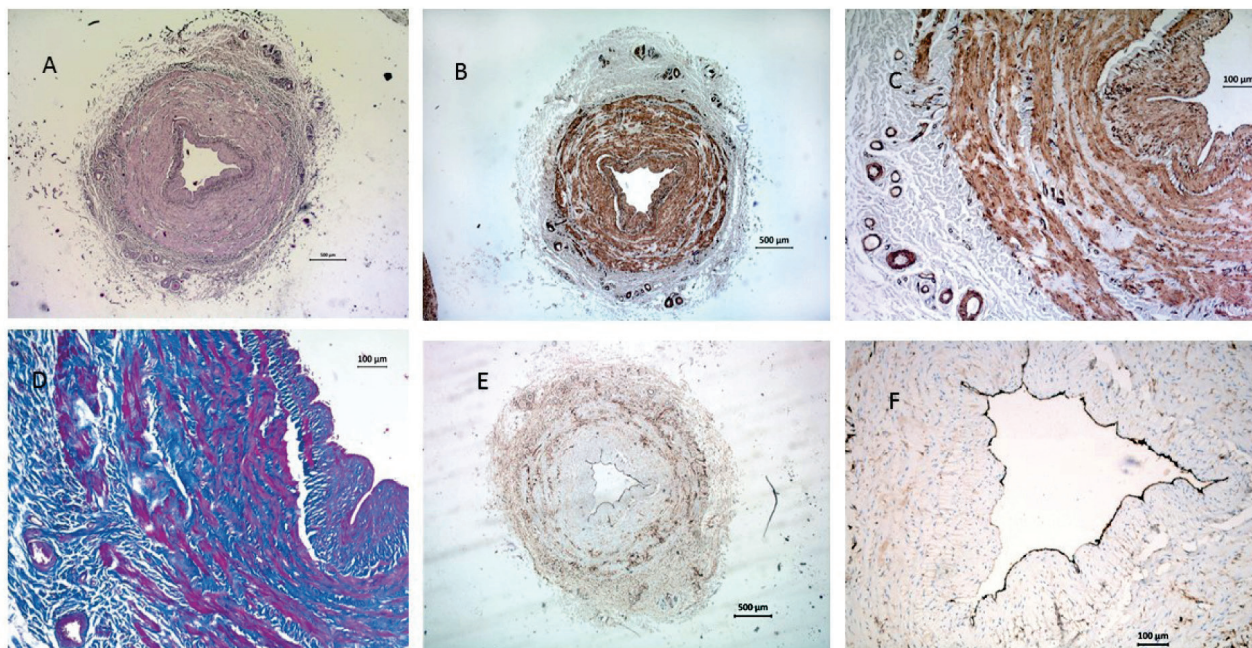
The morphological image of the venous wall in the clinical stages III-IV or CEAP<sub>4-6</sub> (subgroup 2) attested both media and intima thickened (Figure 2a), thickening due to the presence of large amounts of collagen (Figure 2d). Fascicles of myocytes of the media were thinned and fragmented into islands (Figures 2b and 2c) or replaced by excess collagen fibers. Along with excess collagen fibers the hyperplastic elastic fibers were also detected.

At the same time, in the subgroup 2 the endothelial desquamation was observed (Figure 2f) and replacement of the en-



**Fig. 1** Imaginea morfologică a peretelui venos al venei safene mari în stadiul clinic II sau CEAP<sub>2-3</sub>. (a) hiperplazia mediei (HE,  $\times 2,5$ ); (b) hiperplazie musculară cu colagenizare minimă (Anti- $\alpha$ SMC,  $\times 2,5$ ); (c) Numeroase vasa vasorum în adventice (Anti-CD34,  $\times 2,5$ ); (d) hiperplazia fibrelor de colagen ale mediei, detaliu (Tricromă Masson,  $\times 10$ ); (e) hiperplazie de fibre elastice, detaliu (Orceină,  $\times 10$ ); (f) fibre reticulare în tunica medie, detaliu (Impregnație argentică Gömöri,  $\times 20$ ).

**Fig. 1** The morphological image of the venous wall of the great saphenous vein in the clinical stage II or CEAP<sub>2-3</sub> (subgroup 1): (a) hyperplasia of media (HE,  $\times 2.5$ ); (b) muscle hyperplasia with minimal fibrosis (Anti- $\alpha$ SMC,  $\times 2.5$ ); (c) numerous vasa vasorum in the adventitia (Anti-CD34,  $\times 2.5$ ); (d) hyperplasia of collagen fibres of the media, detail (Masson's trichrom,  $\times 10$ ); (e) hyperplasia of elastic fibres, detail (Orcein staining,  $\times 10$ ); (f) reticular fibres in the media, detail (Gömöri's silver impregnation,  $\times 20$ ).



**Fig. 2** Imaginea morfologică a peretelui venos al venei safene mari în stadiul clinic III-IV sau CEAP<sub>4-6</sub>: (a) hiperplazia intimei și mediei (HE,  $\times 2,5$ ); (b) miocite fragmentate (Anti- $\alpha$ SMC,  $\times 2,5$ ); (c) miocite fragmentate, detaliu (Anti- $\alpha$ SMC,  $\times 10$ ); (d) intimă îngroșată, marcată collagenizare în intimă și tunica medie, detaliu (Tricromă Masson,  $\times 10$ ); (e) numeroase vasa vasorum în adventice (Anti-CD34,  $\times 2,5$ ); (f) descuamare endotelială, detaliu (Anti-CD34,  $\times 20$ ).

**Fig. 2** The morphological image of the venous wall in the clinical stages III-IV or CEAP<sub>4-6</sub>: (a) hyperplasia of intima and media (HE,  $\times 2.5$ ); (b) fragmented myocytes (Anti- $\alpha$ SMC,  $\times 2.5$ ); (c) fragmented myocytes, detail (Anti- $\alpha$ SMC,  $\times 10$ ); (d) thickened intima, marked intimal and media fibrosis, detail (Masson's trichrom,  $\times 10$ ); (e) numerous vasa vasorum in the adventitia (Anti-CD34,  $\times 2.5$ ); (f) endothelial desquamation, detail (Anti-CD34,  $\times 20$ ).

telial cu fibre de collagen. Denudarea endotelială a condus la formarea trombilor în lumenul vasului (tromboflebită). Multiple segmente de venă safenă au prezentat trombi în lumenul venos, unii dintre ei având vase nou formate. Adventicea a prezentat un număr impunător de vase ale microcirculației (*vasa vasorum*) (Figura 2e).

## Discuții

Studiul patogeniei bolii varicoase prezintă numeroase lacune, deși de-a lungul timpului au fost emise numeroase ipoteze sau teorii: parietală, valvulară și anastomotică [4, 5]. Teoria inflamatorie nu a găsit confirmare în studiile recent efectuate [28].

Actualmente, în raport fiziopatologic, este unanim recunoscut rolul insuficienței valvulare și a creșterii presiunii intravenoase, discuțiile fiind axate, mai ales, pe stabilirea factorului primordial în declanșarea dilatării venoase.

Modificările histopatologice și imunohistochimice la nivelul venelor safene dilatate varicos pot fi rezumate la următoarele:

- 1) hipertrofie musculară tranzitorie la nivelul tunicii medii, urmată de atrofie și înlocuirea progresivă a celulelor musculare netede cu fibre de collagen;
- 2) îngroșarea peretelui venos din contul hiperplaziei intimale;
- 3) descuamarea endotelială;
- 4) formarea fibrelor elastice groase sub formă de limitantă la hotarul dintre medie și adventice;

dothelium with collagen fibers. Endothelial denudation led to the thrombus formation in the lumen of the vessel (thromboflebitis). Several saphenous vein segments showed thrombi in the venous lumen, some of them having newly formed vessels. Adventitia has presented an impressive number of vessels of microcirculation (*vasa vasorum*) (Figure 2e).

## Discussion

The study of the pathogenesis of varicose disease has many gaps, although many hypotheses or theories have been issued over time: parietal, valvular and anastomotic [4, 5]. Inflammatory theory did not find confirmation in recent studies [28].

Currently, with reference to the pathophysiology, the role of valvular insufficiency and increased intravenous pressure is unanimously recognized, the discussions being mainly focused on establishing the primary trigger factor of the venous dilation.

Histopathological and immunohistochemical changes in the varicose saphenous veins can be summarized as follows:

- 1) transient muscular hypertrophy of the media, followed by atrophy and progressive replacement of venous smooth muscle cells with collagen fibers;
- 2) thickening of the venous wall due to the intimal hyperplasia;
- 3) desquamation of the endothelial layer;
- 4) formation of thick elastic fibers at the border between media and adventitia;

5) creșterea numărului de vase ale microcirculației în adventice.

Modificări similare au fost depistate în grefele venelor safene folosite pentru by-pass-ul coronarian [20, 29]. Hiperplazia intimală pare a fi rezultatul unui proces de proliferare a fibroblastelor și celulelor musculare netede ale mediei. Hiperplazia intimei demonstrează deviații însemnate nu numai în diferite vene dar și de-a lungul unei singure vene safene [21, 29]. Fleboscleroza sau fibroza intimală reprezintă o îngroșare fibroasă a intimei și a stratului intern al tunicii medii, în care separarea clară dintre intimă și medie dispăre. După unii autori, fleboscleroza este un fenomen obișnuit, mai ales la nivelul venelor safene, care poate fi explicată prin presiunea hidrostatică înaltă [21].

Ca răspuns la creșterea hipertensiunii venoase, tunica medie reacționează, la început, prin hiperplazia celulelor musculare netede (mai ales, ale stratului circular), care, mai apoi, sunt supuse unui proces de sclerozare. Celulele musculare netede își schimbă fenotipul din contractil în unul de sinteză, această schimbare ar putea declanșa un proces de fibrozare la nivelul intimei și mediei [16, 17, 20, 26, 27].

Adventicea, tunica externă a vasului, a primit o atenție considerabilă în ultimii ani [15, 30]. Ea conține o populație heterogenă de celule, un sistem nervos adrenergic, o rețea limfatică și *vasa vasorum*, o microcirculație specializată, ce joacă un rol major în biologia și patologia peretelui vasului. Dacă perețele vasului se îngroașă, *vasa vasorum* se extind mai adânc în media [30]. Există o corelație strânsă între extinderea vaselor adventiceale și extinderea formării neointimei. Întregul proces pare a fi compus din 2 etape: (1) creșterea intimei independent de angiogenază (*angiogenesis-independent growth of neointima*), probabil condusă de proliferarea miocitelor netede ale mediei și (2) o creștere dependentă de angiogenază (*angiogenesis-dependent growth of neointima*). A doua etapă se caracterizează prin extinderea vaselor din adventice în tunica medie și intima vaselor.

### Concluzii

1) În stadiile clinice incipiente ale bolii venoase cronice predomină hiperplazia și hipertrofia celulelor musculare netede ale mediei, mai ales, ale stratului circular.

2) În stadiile clinice avansate procesul de fibrozare a mediei declanșează și un proces de fibroză intimală (fleboscleroză).

3) Modificările histopatologice ale mediei se extind, mai târziu, asupra intimei și adventiceei.

4) Denudarea endoteliului conduce la formarea trombilor în lumenul venei (tromboflebită).

5) Densitatea microcirculației la nivelul adventiceei crește odată cu avansarea bolii venoase cronice.

### Declarația conflictului de interes

Nimic de declarat.

### Contribuția autorilor

Ambii autori au contribuit în mod egal la elaborarea și scrierea manuscrisului. Autorii au citit și aprobat versiunea finală a manuscrisului.

5) increasing number of microcirculatory vessels in the adventitia.

Similar changes have been detected in the saphenous vein grafts used for coronary bypass [20, 29]. Intimal hyperplasia appears to be the result of a proliferation process of fibroblasts and smooth muscle cells of the media. Intimate hyperplasia demonstrates significant deviations not only in different veins, but also across a single saphenous vein [21, 29]. Flebosclerosis or intimal fibrosis is a fibrous thickening of the intima and inner layer of the media, in which clear separation between the intima and media disappears. According to some authors, phlebosclerosis is a common phenomenon, especially in the saphenous veins, which can be explained by the high hydrostatic pressure [21].

As a result of increasing venous hypertension, the media reacts initially with hyperplasia of smooth muscle cells (especially of the circular layer), which then are subjected to a process of sclerosis. Smooth muscle cells switch from contractile to synthetic phenotype, this change could trigger a process of fibrosis in the intima and media [16, 17, 20, 26, 27].

Adventitia, the outer tunic of the vessel, has received a considerable attention in the last years [15, 30]. It contains a heterogeneous cell population, an adrenergic nervous system, a lymphatic network and *vasa vasorum*, a specialized microcirculation, which plays a major role in the biology and pathology of the vessel wall. If the vessel wall thickens, the *vasa vasorum* extend deeper into the media [30]. There is a close correlation between the expansion of the vessels of the adventitia and the extension of neointima formation. The whole process appears to be composed of two stages: (1) angiogenesis-independent growth of neointima, probably driven by the proliferation of smooth myocytes of media and (2) angiogenesis-dependent growth of neointima. The second stage is characterized by the expansion of the vessels from the adventitia into the media and intima.

### Conclusions

1) At the initial clinical stages of chronic venous disease predominate the hypertrophy and hyperplasia of smooth muscle cells, especially of the circular layer.

2) At the advanced clinical stages the process of fibrosis of the media triggers an intimal fibrosis (phlebosclerosis).

3) The histopathological changes of the media later extend to intima and adventitia.

4) The endothelial desquamation leads to thrombus formation in the vein lumen (thrombophlebitis).

5) The density of microcirculation at the level of the adventitia increases with the advancement of the chronic venous disease.

### Declaration of conflict of interests

Nothing to declare.

### Contribution of authors

Both authors have equally contributed to preparation and writing of the manuscript. The authors read and approved the final version of the manuscript.

## Referințe / references

- Hanciuța T, Hanciuța C, Hanciuța T. Insuficiența venoasă cronică – dificultăți de diagnostic și tratament. *Revista Română de Anatomie funcțională și clinică, macro- și microscopică și de Antropologie*, 2009; 8 (4): 538-542.
- Lee A, Evans C, Allan P, Ruckley C, Fowkes F. Lifestyle factors and the risk of varicose veins: Edinburgh Vein Study. *J. Clin. Epidemiol.*, 2003; 56 (2): 171-179. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12654412> (accesat 12/06/2017).
- Lee A, Robertson L, Boghossian S, Allan P, Ruckley C, Fowkes F, Evans C. Progression of varicose veins and chronic venous insufficiency in the general population in the Edinburgh Vein Study. *J. Vasc. Surg. Venous Lymphat. Disord.*, 2015; 3 (1): 18-26. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26993676> (accesat 12/06/2017).
- Jecu A. Bolile venoase (pp. 2224-2242). În: *Tratat de patologie chirurgicală*. Sub redacția lui Angelescu N. Editura medicală, București, 2003.
- Bergan J, Bunke-Paquette N. *The Vein Book*. 2<sup>nd</sup> edition. Oxford University Press, 2014, 218p. <https://www.amazon.com/Vein-Book-John-J-Bergan/dp/0195399633>
- Badier-Commander C, Couvelard A, Henin D, Verbeuren T, Michel JB, Jacob M. Smooth muscle cell modulation and cytokine overproduction in varicose veins. An *in situ* study. *J. Pathol.*, 2001; 193 (3): 398-407. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11241422> (accesat 17/06/2017).
- Ibegbuna V, Delis K, Nicolaidis A. Hemodynamic and clinical impact of superficial, deep and perforator vein incompetence. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*, 2006; 31 (5): 535-541. [https://www.ejves.com/article/S1078-5884\(05\)00657-X/fulltext](https://www.ejves.com/article/S1078-5884(05)00657-X/fulltext) (accesat 22/09/2018).
- Bergan J, Pascarella L. Venous anatomy, physiology and pathophysiology (pp. 39-46). In: Bergan J. (ed.) *The vein book*. Burlington, San Diego, London, Elsevier Academic Press, 2007. <https://www.amazon.com/Vein-Book-John-J-Bergan/dp/0195399633> (accesat 05/06/2017).
- Elsharawy M, Naim M, Abdelmaguid E, Al-Mulhim A. Role of saphenous vein wall in the pathogenesis of primary varicose veins. *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.*, 2007; 6 (2): 219-224. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17669815> (accesat 12/06/2017).
- Jacobs B, Andraska E, Obi A, Wakefield T. Pathophysiology of varicose veins. *J. Vasc. Surg. Venous Lymphat. Disord.*, 2017; 5 (3): 460-467. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28411716> (accesat 22/09/2018).
- Lim C, Davies A. Pathogenesis of primary varicose veins. *Br. J. Surg.*, 2009; 96 (11): 1231-1242. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19847861> (accesat 12/06/2017).
- Beebe H, Bergan J, Bergqvist D, Eklof B, Eriksson I, Greenfield L. *et al.* Classification and grading of chronic venous disease in the lower limbs: a consensus statement. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*, 1996; 12 (4): 487-492. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8980442>.
- Eklöf B, Rutherford R, Bergan J, Carpentier P, Gloviczki P, Kistner R. *et al.* American Venous Forum International Ad Hoc Committee for Revision of the CEAP Classification. Revision of the CEAP classification for chronic venous disorders: consensus statement. *J. Vasc. Surg.*, 2004; 40 (6): 1248-1252. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15622385> (accesat 22/09/2018).
- Kasperczak J, Ropacka-Lesiak M, Breborowicz H. [Definition, classification and diagnosis of chronic venous insufficiency – part II]. *Ginek. Pol.*, 2013; 84 (1): 51-55. [Article in Polish] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23488310> (accesat 22/09/2018).
- Casian D. Fenomenul de neovasularizare – un nou aspect al problemei maladiei varicoase recurente. *Arta Medica*, 2008; 4 (31): 21-24.
- Comșa F. Cercetări histologice, histochimice și electronomicroscopice în venele varicoase. Teză de doctorat. Iași, 2010. [http://www.umfiasi.ro/ScoalaDoctorala/TezeDoctorat/Teze%20Doctorat/Rezumat\\_Florin\\_Comsa.pdf](http://www.umfiasi.ro/ScoalaDoctorala/TezeDoctorat/Teze%20Doctorat/Rezumat_Florin_Comsa.pdf)
- Comșa F, Ardelean C, Amălinei C, Giușca S, Căruntu I-D. Semnificația profilului morfologic al venelor varicoase în etiopatogenia bolii varicoase. *Jurnalul de Chirurgie*, Iași, 2010; 6 (4): 481-492. [http://jurnaluldechirurgie.ro/jurnal/docs/jurnal410/art%2012\\_vol%206\\_2010\\_nr%204.pdf](http://jurnaluldechirurgie.ro/jurnal/docs/jurnal410/art%2012_vol%206_2010_nr%204.pdf)
- Kirsch D, Schreiber J, Dienes H, Bottger T, Junginger T. Alterations of the extracellular matrix of venous walls in varicose veins. *Vasa*, 1999; 28 (2): 95-99. <https://europepmc.org/abstract/med/10409919> (accesat 22/09/2018).
- Kirsch D, Wahl W, Bottger T, Junginger T. [Primary varicose veins – changes in the venous wall and elastic behavior]. *Der Chirurg*, 2000; 71 (3): 300-305. <https://europepmc.org/abstract/med/10789047> (accesat 22/09/2018).
- Kockx M, Cambier B, Bortier H, De Meyer G, Van Cauwelaert P. The modulation of smooth muscle cell phenotype is an early event in human aorto-coronary saphenous vein grafts. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.*, 1992; 420: 155-162. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1549904>
- Langes K, Hort W. Intimal fibrosis (phlebosclerosis) in the saphenous vein of the lower limb: a quantitative analysis. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.*, 1992; 421: 127-131. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1514244> (accesat 22/09/2018).
- Somers P, Knaapen M. The histopathology of varicose vein disease. *Angiology*, 2006; 57 (5): 546-555. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17067976> (accesat 12/06/2017).
- Wali M, Dewan M, Eid R. Histopathological changes in the wall of varicose veins. *Int. Angiol.* 2003; 22 (2): 188-193. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12865886> (accesat 12/06/2017).
- Wali M, Eid R. Changes of elastic and collagen fibers in varicose veins. *Int. Angiol.*, 2002; 21 (4): 337-343. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12518113> (accesat 12/06/2017).
- Wali M, Eid R. Intimal changes in varicose veins: an ultrastructural study. *J. Smooth Muscle Res.*, 2002; 38 (3): 63-74. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12596886>
- Wali M, Eid R. Smooth muscle changes in varicose veins: an ultrastructural study. *J. Smooth Muscle Res.*, 2001; 37 (5-6): 123-135. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12126039> (accesat 12/06/2017).
- Xiao Y, Huang Z, Yin H, Lin Y, Wang S. *In vitro* differences between smooth muscle cells derived from varicose veins and normal veins. *J. Vasc. Surg.*, 2009; 50 (5): 1149-1154. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19703751> (accesat 12/06/2017).
- Gomez I, Benyahia C, Le Dall J, Payré C, Louedec L. *et al.* Absence of inflammatory conditions in human varicose saphenous veins. *Inflamm. Res.*, 2013; 62 (3): 299-308. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23238795>
- Marti M.-C., Bouchardy B., Cox J. Aorto-coronary by-pass with autogenous saphenous vein grafts: histopathological aspects. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.*, 1971; 352: 255-266. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00600675>
- Mulligan-Kehoe M., Simons M. *Vasa vasorum* in normal and diseased arteries. *Circulation*, 2014; 129 (24): 2557-2566. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24934463> (accesat 22/09/2018).