

Sukupuolen vaikutus aivovaltimoaneurysman seinämän rappeutumiseen

– vertaileva kliinispatologinen tutkimus naisten ja miesten aneurysmien seinämänrakenteesta

Sini Sammalkorpi LK

Neurokirurgian klinikka, Kliininen laitos

25.5.2011 Helsinki

Tutkielma

sini.sammalkorpi@helsinki.fi

Ohjaaja: Juhana Frösen ja Riikka Tulamo

HELSINGIN YLIOPISTO

Lääketieteellinen tiedekunta

HELSINGIN YLIOPISTO – HELSINGFORS UNIVERSITET

Tiedekunta/Osasto – Fakultet/Sektion – Faculty Lääketieteellinen tiedekunta		Laitos – Institution – Department kliininen laitos	
Tekijä – Författare – Author Sini Sammalkorpi			
Työn nimi – Arbetets titel – Title Sukupuolen vaikutus aivovaltimoaneurysman seinämän rappeutumiseen -vertaileva kliinispatologinen tutkimus naisten ja miesten aneurysmien seinämänrakenteesta			
Oppiaine – Läroämne – Subject			
Työn laji – Arbetets art – Level Tutkielma	Aika – Datum – Month and year 25.5.2011	Sivumäärä - Sidoantal - Number of pages 33	
Tiivistelmä – Referat – Abstract			
<p>Aivovaltimoaneurysma (AA) on pullistuma aivovaltimon haarautumassa kallonpohjassa. AA:n puhkeaminen aiheuttaa lukinkalvonalaisen vuodon (SAV), joka on Suomessa yleisempi kuin muualla maailmassa. Naissukupuolen tiedetään olevan yksi SAV:n riskitekijöistä.</p> <p>Tässä tutkimuksessa etsitään yhteyttä AA:n seinämään kertyvän rasvan ja tämän hapettumisen sekä seinämän rappeutumisen välillä, kartoitetaan rasvan kertymiseen liittyvän seinämän rappeutumisen yhteyttä sukupuoleen sekä tutkitaan sukupuolen vaikutusta seinämän tulehdusreaktioon.</p> <p>Näytteisiin kertyneet rasvat värjättiin Oil-O-red värjäyksellä, oksidoituja LDL partikkeleita värjättiin anti-Ox-LDL vasta-aineella ja tulehdussolut tunnistettiin CD45 vasta-aineella.</p> <p>Aineistossamme seinämään kertyvällä rasvalla on yhteys seinämän rappeutumiseen. Vuotaneet ja vuotamattomat AA:t reagoivat eri tavalla hapettuneen LDL:n (Ox-LDL) kertymiseen. Naisten ja miesten ryhmät eroavat Ox-LDL:n kertymisen ja solutiheyden korrelaatioiden suhteen. Sukupuolten välillä on myös eroa Ox-LDL:n aiheuttamassa solutuhossa vuotaneissa aneurysmissa. Myös naisten vuotaneiden ja vuotamattomien aneurysmien välillä on ero Ox-LDL:n seinämää rappeuttavassa vaikutuksessa. Näyttäisi siis, että vuotoherkillä naisten aneurysmilla on jokin Ox-LDL:n aiheuttamalle seinämätuholle altistava tekijä ja miehillä puhkeamiselle olisi muu syy.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords Aivovaltimoaneurysma, estrogeeni, oksidoitu LDL			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited			

Sisällysluettelo

JOHDANTO	1
1. AINEISTO.....	3
1.1 AIVOVALTIMOANEURYSMA JA LUKINKALVONALAINEN VERENVUOTO.....	3
1.1.1 Aivovaltimoaneurysman patologinen määritelmä	3
1.1.2 Aivovaltimoaneurysman aiheuttama lukinkalvonalainen verenvuoto	4
1.1.3 Aivovaltimoaneurysmien insidenssi ja prevalenssi	4
1.2 AIVOVALTIMOANEURYSMIEN JA ANEURYSMAATTISEN SAVN TUNNETUT RISKITEKIJÄT.....	5
1.2.1 Vahvimmat riskitekijät – Tupakointi, Hypertonia, naissukupuoli	5
1.2.2 Muita riskitekijöitä	5
1.2.3 Yleiset verisuonitautien riskitekijät.....	6
1.3 AIVOVALTIMOANEURYSMAN BIOLOGIA – MITEN RISKITEKIJÄT VAIKUTTAVAT SIIHEN?	6
1.3.1 Aivovaltimoaneurysman seinämän rakenne.....	6
1.3.2 Mitä tiedetään SAVn riskitekijöiden ja aneurysman seinämän biologian yhteydestä?.....	7
1.3.3 Miksi aivovaltimoaneurysma muuttuu vuotoalttiiksi?.....	10
1.4 BIOLOGIA SAV:N SUKUPUOLIEROJEN TAUSTALLA.....	11
1.4.1 Sukupuolisisidonnaiset erot riskitekijöissä	11
1.4.2 Estrogeenien paikallisvaikutukset verisuonen seinämässä	12
2 HYPOTEESIT	13
3 MATERIAALI JA MENETELMÄT	13
3.1 KUDOSNÄYTTEET.....	13
3.2 HISTOLOGISET VÄRJÄYKSET	13
3.3 IMMUNOHISTOKEMIA	14
3.3.1 Ox-LDL värjäys	14
3.3.2 Tulehdussolujen (CD45) värjäys.....	15
3.3.3 Estrogeenireseptorien värjäys	16
3.4 HISTOLOGIAN KVANTITAATIO	16
3.5 TILASTOANALYYSIT	17
4 TULOKSET	17
4.1 TUTKITTU POTILASAINESTO	17
4.2 RASVAN JA HAPETTUNEEN RASVAN KERTYMINEN ANEURYSMAN SEINÄMÄÄN.....	18
4.2.1 Rasvojen kertyminen ja seinämän rakenne	18
4.2.2 Hapettuneiden rasvojen kertyminen ja seinämän rakenne	19
4.3 TULEHDUSSOLUT AIVOVALTIMOANEURYSMAN SEINÄMÄSSÄ.....	21
4.3.1 Aineiston demografia	21
4.3.2 Tulehdussolujen yhteys vuotostatukseen	22
4.3.3 Tulehdussolujen yhteys sukupuoleen.....	22
4.3.4 Tulehdussolukertymän yhteys seinämään.....	22
4.4 ESTROGEENIRESEPTORIT AIVOVALTIMOANEURYSMAN SEINÄMÄSSÄ	23

5 POHDINTA.....	24
5.1 RASVAN KERTYMINEN JA ANEURYSMAN SEINÄMÄN RAPPEUTUMINEN	24
5.1.1 Aneurysman koko, muoto, sijainti, sekä ikä - Yhteys rasvan kertymiseen....	24
5.1.2 Rasvan kertyminen ja solukuolema aivoaltimoaneurysman seinämässä	24
5.1.3 Rasvan kertyminen ja tulehdusreaktio aivoaltimoaneurysman seinämässä .	24
5.2 SUKUPUOLEN VAIKUTUS AIVOALTIMOANEURYSMAN SEINÄMÄÄN.....	25
5.2.1 Sukupuolen vaikutus rasvojen kertymiseen	25
5.2.2 Sukupuolen vaikutus solukuolemaan	25
5.2.3 Sukupuolen vaikutus tulehdusreaktioon.....	26
5.3 ESTROGEENIRESEPTORIT AIVOALTIMOANEURYSMAN SEINÄMÄSSÄ	26
5.3.1 Estrogeenien vaikutus sileälihassoluihin.....	26
5.3.2 Estrogeenien vaikutus tulehdussoluihin	26
5.4 YHTEENVETO	27
6 OMA ROOLI TUTKIMUKSESSA	27
LÄHTEET.....	28

Johdanto

Aivovaltimoaneurysma (AA) on pullistuma aivovaltimon haarautumassa circulus Willisin tuntumassa kallonpohjassa. AA:n puhkeaminen aiheuttaa lukinkalvonalaisen vuodon (subaraknoidaalivuoto, SAV), joka on Suomessa yleisempi kuin muualla maailmassa (n.20/100 000). Vaikka SAV:n todennäköisyys kasvaa iän myötä, kohdistuvat sen vaarat ennen kaikkea työssäkävään väestöön (keski-ikä 57v.). SAV potilaista 50 % kuolee heti, 30 % vammautuu ja vain 20 % toipuu hyvin. (1)

Useimmat AA:t eivät koskaan puhkea ja valtaosa on oireettomia ennen puhkeamista(1). Riskitekijöitä AA:n puhkeamiseen ovat korkea verenpaine, tupakointi, naissukupuoli, alkoholin ja huumeiden väärinkäyttö ja aneurysmaattisen SAV:n esiintyminen perheessä. Myös AA:n koko ja sijainti, sekä potilaan ikä ja geeniperimä vaikuttavat puhkeamisriskiin. (1). Vielä ei tiedetä, miksi naissukupuoli on riskitekijä.

Naisten kuolleisuus sydän- ja verisuonitauteihin on miehiä pienempi ennen menopaussia ja menopaussin jälkeen tämä ero häviää. Tämän on ajateltu johtuvan estrogeenin positiivisesta vaikutuksesta verisuonen seinämän hyvinvointiin. Monet tutkimukset ovat osoittaneet menopaussin jälkeisen hormonikorvaushoidon sekavan, mutta suurelta osin hyödyllisen vaikutuksen sydän- ja verisuonisairauksien yksittäisiin patofysiologisiin tekijöihin. Näitä tekijöitä ovat vasodilataatio, endoteelivaurio ja ateroomaplakkin muodostuminen, rasvametabolia, hyperkoagulaatio ja inflammatoriset prosessit.(2)

Estrogeenireseptorit ovat myös tärkeitä verisuoniseinämän muuntelijoita. Verisuonivammassa estrogeeni toimii tulehdusreaktiota estävänä aineena, koska se estää paikallisesti tulehdusreaktiota lisäävien aineiden ja adheesiomolekyylien ilmaantumista, valkosoluaktivaatiota, -tunkeutumista ja -kerääntymistä, adventitian aktivaatiota ja paikallista sytokiinien vapautumista, sekä soluväliaineen proteiinien uudelleenmuodostumista.(3) Estrogeenireseptoreita on sekä sileälihassoluissa että endoteelissa ja tulehdussoluissa(4). Estrogeeni aiheuttaa vasodilataatiota, osaksi

stimuloimalla prostasykliinituotantoa ja typpioksidin vapautumista. Lisäksi se vähentää sileälihassolujen jakautumista (4).

AA:n seinämistä on löydetty useita histopatologisia sekä biokemiallisia piirteitä, jotka vaikuttavat ateroskleroosiplakkien puhkeamiseen. Yksi piirre on krooninen inflammaatio.(5-8) Ateroskleroosiplakeissa hapettunut LDL (Ox-LDL) on yksi inflammaatioreaktion aiheuttajista (9). Myös AA:n seinämään kertyy LDL:ää, joka hapettuu seinämässä (10).

Naissukupuoli SAV:n riskitekijänä liittyy mahdollisesti estrogeenien paikallisiin vaikutuksiin AA:n seinämässä. Tässä tutkimuksessa verrataan naisten ja miesten AA:n seinämän rakennetta ja patobiologiaa, kartoitetaan seinämän rappeutumisen, Ox-LDL:n kertymisen, sekä seinämän tulehdusreaktion yhteyttä sukupuoleen. Lisäksi tutkitaan estrogeenireseptorien ilmenemistä AA:n seinämässä.

1. Aineisto

1.1 Aivovaltimoaneurysma ja lukinkalvonalainen verenvuoto

1.1.1 Aivovaltimoaneurysman patologinen määritelmä

Aivovaltimoaneurysma on valtimoseinämän pullistuma, joka tyypillisimmin sijaitsee aivovaltimon haarautumassa kallonpohjassa. Aneurysmat jaetaan ryhmiin muotonsa perusteella.

<i>Ryhmä</i>	<i>luonnehdinta</i>
Sakkulaariset	pussimainen uloke verisuonen seinämässä, yleisimmin aivovaltimoiden haarautumakohdassa
Sukkulamaiset	valtimoseinämän laajentuma, joka ei muodosta erillistä pussimaista uloketta
Pitkulamaiset	pidentyneitä, kiemuraisia ja joskus laajentuneita valtimosegmenttejä

Tämä tutkimus rajoittuu sakkulaarisiin aneurysmiin, joiden tyypillisimpiä sijainteja ovat keskimmäisen aivovaltimon haarautuma Sylvin uurteessa sekä etumaisen yhdysvaltimon (ACoM) ja takimmaisen yhdysvaltimon (PCoM) haarautumiskohdat.

1.1.2 Aivovaltimoaneurysman aiheuttama lukinkalvonalainen verenvuoto

Suurin osa AA:sta on täysin oireettomia, kunnes ne puhkeavat. Koska AA:t sijaitsevat aivojen ulkopintaa seurailevissa suurissa valtimoissa, niiden revetessä työntyy verta lukinkalvonalaiseen tilaan. AA:t voivat puhjeta myös suoraan aivokudokseen aiheuttaen aivojen sisäisen verenvuodon tai aivokudoksen läpi lateraaliseen kammioon aiheuttaen kammionsisäisen vuodon. Lukinkalvonalaisen vuodon (SAV) tyypillinen oire on äkillinen, erittäin voimakas päänsärky johon liittyy pahoinvointia, oksentelua, sekä niskajäykkyyttä. Osa potilaista menettää vuodon seurauksena tajuntansa, ja osalla ensimmäisenä oireena on äkkikuolema. SAV diagnosoidaan tietokonetomografialla, magneettitutkimuksella, tai aivoselkäydinnestenäytteellä.(1) SAV:n aiheuttanut AA tai vuotamaton AA todetaan aivoverisuonten angiografialla, joka voidaan toteuttaa tietokonetomografiassa, magneettikuvauksena, tai ruiskuttamalla röntgen läpivalaisussa varjoainetta katetroituihin aivovaltimoihin. (1)

1.1.3 Aivovaltimoaneurysmien insidenssi ja prevalenssi

Radiologisen kuvantamisen sekä patologisen tutkimuksen perusteella arvioidaan, että 2.3 % (0.4-6.0 %) väestöstä kantaa AA:a(12). AA:n puhkeaminen on syynä 85 %:in SAV:ista(1). Euroopassa ja Pohjois-Amerikassa SAV:n insidenssi on 9.1/100 000 elinvuotta, Etelä- ja Keski-Amerikassa puolet siitä (4.2/100 000 elinvuotta), ja insidenssi on kaksi kertaa korkeampi Suomessa (19.7/100 000) ja Japanissa (22.7/100 000)(13). Syytä Suomen ja Japanin korkeampaan prevalenssiin ei tunneta.

Monikansallisessa suuressa seurantatutkimuksessa AA:ien vuosittainen puhkeamisriski vaihteli 0.05 %:n ja 2.3 %:n välillä riippuen seuratusta potilasryhmästä(12). Suomalaisessa väestössä AA:n vuotuinen puhkeamisriski on noin 1 % (14)

1.2 Aivovaltimoaneurysmien ja aneurysmaattisen SAV:n tunnetut riskitekijät

1.2.1 Vahvimmat aneurysmaattisen SAV:n riskitekijät – tupakointi, hypertonia, naissukupuoli

Tupakointia on pidetty vahvana riskitekijänä AA:n puhkeamiselle. Nykyinen tupakointi verrattuna entiseen ja tupakoimattomiin nostaa SAV:n riskiä 2.2–3.1 kertaiseksi. Korkea verenpaine nostaa SAV:n riskiä 2.5 kertaiseksi.(15)

55 ikävuoden jälkeen naisilla AA:t ovat yleisempiä kuin miehillä(13) ja naisilla on yleisestikin suurempi riski AA:n puhkeamiseen(12). Naisilla on myös suurempi riski AA:n kasvuun(16) sekä useamman aneurysman esiintymiseen(17). Riski SAV:on kasvaa menopaussin jälkeen, mutta riskiä voidaan vähentää hormonikorvaushoidolla(18).

1.2.2 Muita aneurysmaattisen SAV:n riskitekijöitä

Alkoholin suurkulutus (yli 150g/viikko) lisää SAV:n riskin n. kaksinkertaiseksi ja vaikutus on voimakkaampi naisilla(15). Aneurysmaan liittyviä riskitekijöitä ovat sijainti, koko, morfologia sekä monilukuisuus. Posteriorisen verenkierron alueella sijaitsevat AA:t puhkeavat useammin kuin anteriorisen tai mediaalisen verenkierron alueella sijaitsevat. AA:n suuri koko on puhkeamisen riskitekijä, vaikka myös pienet AA:t voivat puhjeta. (12,19,20)

Potilaan ikä vaikuttaa myös AA:n riskiin. AA:n prevalenssi on hyvin matala ensimmäisten 20 ikävuoden aikana, mutta nousee tasaisesti 30 ikävuoden jälkeen(12). SAV potilaan keski-ikä on 57 vuotta(21). Potilaan vanhetessa AA:n puhkeamisriski kasvaa(22). Myös perimä vaikuttaa SAV riskiin. N. viidesosalla SAV potilaista on suvussa esiintyviä AA:ia(23). Suvuttain esiintyvät AA:t ovat löytyessään pienempiä, useammin monilukuisia ja tulevat hieman nuoremmille potilaille, kuin periytymättömät AA:t(24).

1.2.3 Yleiset verisuonitautien riskitekijät

Yleisimmät sydän- ja verisuonitaudit aiheutuvat verisuonen ahtautumisesta seinämän paksuuntuessa ateroskleroosin eli valtimokovettumataudin seurauksena. Vahvimmat ateroskleroosin riskitekijät ovat suuri LDL-kolesterolipitoisuus, korkea verenpaine, tupakointi ja diabetes(25). Veren LDL-kolesterolipitoisuudella on ateroskleroosin synnyssä keskeinen merkitys. Korkean verenpaineen ja tupakoinnin tiedetään kiihdyttävän ateroskleroosia. (25). Ateroskleroosiin vaikuttava tupakansavun komponentti ja vaikutusmekanismi ovat edelleen jossain määrin epäselviä. Diabetesta sairastavan valtimomuutoksissa avainasemassa on pitkään vallinnut korkea verensokeripitoisuus. Korkea verenpaine sekä dyslipidemia ovat usein myötävaikuttamassa muutoksien synnyssä. (25)

Lisäksi miessukupuolella, korkealla iällä, kohonneella verenpaineella, tulehdusmarkkereilla, hyperviskositeetilla, hyytymishäiriöillä, trombofilioilla sekä munuaisten vajaatoiminnalla on yhteys oireiseen valtimotautiin etenkin sen esiintyessä alaraajoissa.(25)

Tupakoinnilla ja korkealla verenpaineella on selvä yhteys AA:iin ja SAV:on, sillä nämä ovat tärkeitä riskitekijöitä myös aneurysman puhkeamiselle ja SAV:lle. Hyperkolesterolemialla tai diabeteksellä ei ole varmaa yhteyttä aneurysman muodostumiseen tai puhkeamiseen. Nämä saattavat jopa suojata puhkeamiselta.(26)

1.3 Aivovaltimoaneurysman biologia – miten riskitekijät vaikuttavat siihen?

1.3.1 Aivovaltimoaneurysman seinämän rakenne

Aivovaltimon seinämä poikkeaa rakenteeltaan muista valtimoista siten että sen seinämästä puuttuu ulompi elastinen lamina (external elastic lamina, EEL). AA:n seinämä poikkeaa aivovaltimoseinämän normaalista rakenteesta. AA:n seinämälle on

tyypillistä EEL:n puuttumisen lisäksi myös sisemmän elastisen laminan (internal elastic lamina, IEL) puuttuminen. Elastiset laminat ovat tärkeitä valtimon seinämän mekaaniselle kestävyydelle.

Myös vuotaneiden ja vuotamattomien aneurysmien seinämissä on eroavaisuuksia. Vuotaneiden AA:ien seinämille on luonteenomaista endoteelin puuttuminen ja seinämän sisäpintaa verhoava verihyytymä, seinämän solujen vähäinen määrä, soluväliaineen rappeutuminen, sekä seinämän tulehdusvaste (makrofagit ja T-solut sekä aktivoitunut komplementti). Vuotamattomien AA:ien seinämät muistuttavat rakenteeltaan mekaanisen, kemiallisen tai biologisen vaurion valtimon seinämässä normaalisti aiheuttamaa paranemisreaktiota (myointimaalista hyperplasia / neointimaa). (5,7,8)

1.3.2 Mitä tiedetään SAV:n riskitekijöiden ja aneurysman seinämän biologian yhteydestä?

Selkeitä yhteyksiä AA:n seinämän patologisten muutosten ja SAV:n riskitekijöiden välillä ei ole vielä pystytty osoittamaan. Syynä ovat osittain AA:n patologian vähäinen tutkimus ja harvat kliinispatologiset sarjat. Näin ollen tunnettujen SAV:n riskitekijöiden yhteys AA:n seinämän solukuolemaan, soluväliaineen rappeutumiseen, tulehdusreaktioon, ja lopulta vuotoon on edelleen epäselvää.

1.3.2.1 Tupakointi ja AA:n seinämä

Tupakointi on tunnettu ateroskleroosin riskitekijä ja oksidatiivisen stressin aiheuttaja. Tupakansavu aiheuttaa endoteelisolujen sekä monosyyttien solukuoleman apoptoosin tai nekroosin kautta. Oksidatiivisen stressin aiheuttama stressireaktio lisää monosyyttien tuottaman reaktiivisten happiradikaalien (reactive oxygen species, ROS) määrää, joka aiheuttaa LDL:n hapettumista ja edistää rasvojen peroksidaatiota.(27) Hapettunut LDL edistää tulehdusreaktion syntyä ja johtaa myös tämän kautta solutuhoon(28).

Tupakointi (myös passiivinen) saa aikaan tulehdusvaurioita lisäämällä tulehdussoluja houkuttelevien molekyylien ilmentymistä valtimon seinämässä(29). Se myös lisää

metalloproteinaasiaktiivisuutta rotan plasmassa ja ihmisen fibroblasteissa(30,31) ja vähentää kollageeni I ja II:n synteesiä(31). Ainakin osa tupakansavun vaikutuksista solujen toimintaan voi johtua tupakansavun vaikutuksesta sileälihassoluja stimuloiviin kasvutekijöihin(32). Tupakansavun aiheuttamat muutokset kollageenissa ja rasvojen peroksidaatio houkuttelevat makrofageja ja lisäävät makrofagien aiheuttamaa oksidatiivista stressiä(33).

1.3.2.2 Korkea verenpaine ja AA:n seinämä

Kroonisesti korkean verenpaineen on ehdotettu vaikuttavan kolmella tapaa AA:n seinämään: käynnistämällä endoteelivaurion, edistämällä vasa vasorin (suonenseinämänsuonet) tukkeutumista ja häiritsemällä elastiinin ja kollageenin synteesiä(34). Nämä seinämämuutokset voisivat aiheuttaa aneurysman pullistumiseen johtavaa seinämän heikkenemistä.(34)

Virtausolosuhteet AA:n sisällä vaikuttavat AA:n seinämän biologiaan. Endoteeli tarvitsee tasaiset virtausolosuhteet pysyäkseen ehjänä. Erityisen kova tai matala seinämään kohdistuva paine vaikuttaa endoteeliin ja aiheuttaa tämän toimintahäiriöitä. Tämän vuoksi haarautumiskohdat ja muut monimutkaiset alueet valtimopuustossa ovat alttiita endoteelivaurioille. (35) Myös sileälihassolut ovat alttiita suoralle venytykselle ja kuormitukselle(36).

1.3.2.3 Naissukupuoli ja AA:n seinämä

Verenkierrossa olevan estrogeenimäärän vähenemisen sekä mahdollisesti estrogeenireseptorien vähäisyyden on ajateltu edistävän AA:n pullistumista naisilla(37). Estrogeenireseptorit ovat tärkeitä verisuoniseinämän muuntelijoita. Verisuonen seinämän vaurion jälkeisessä suonin seinämän paksuuntumisessa estrogeeni toimii tulehdusreaktiota vähentävänä tekijänä. Estrogeeni estää paikallisesti tulehdusreaktiota lisäävien aineiden ja adheesiomolekyylin ilmaantumista. Se estää myös valkosoluaktivaatiota, -tunkeutumista ja -kerääntymistä, adventitian aktivaatiota ja paikallista sytokiinien vapautumista. Estrogeeni vähentää myös soluväliaineen proteiinien uudelleenmuodostumista ja sileälihassolujen lisääntymistä(3).

1.3.2.4 Muut SAV:n tunnetut riskitekijät ja AA:n seinämä

Ikääntyminen aiheuttaa monia muutoksia kudusrakenteissa ja solutoiminnassa. Myös aivovaltimoihin tulee muutoksia iän myötä. Erilaisten säikeiden osuus elastisessa laminassa muuttuu. Kollageenisäikeiden määrä kasvaa ja ilmestyy tyypin 3 pseudoelastisia säikeitä, jolloin valtimon seinämä menettää kimmoisuuttaan(38). Rasvan määrä kokonaisuudessaan, sekä kolesterolin ja triglyseridien määrä nousee ja eri glykosaminoglykaanien keskinäiset pitoisuudet vaihtuvat iän myötä(39).

Tarkkaa solutason tietoa liiallisen alkoholinkäytön vaikutuksista valtimoiden tasapainoon ei ole.

1.3.2.5 Muut verisuonitautien riskitekijät ja AA:n seinämä

Hyperkolesterolemia ja etenkin suuri LDL-kolesterolin määrä altistavat ateroskleroosille. Ateroskleroosi alkaa verisuoniseinämän endoteelivaurion muuttumisella pysyväksi. Tämä johtaa endoteelin läpäisevyyden kasvuun, lipoproteiinien, monosyyttien, sileälihassolujen sekä verihiutaleiden kerääntymiseen ja aktivoitumiseen seinämässä. Rasvan kertyminen aiheuttaa ensin rasvajuovien ja myöhemmin sidekudoksisten valtimohaurastumapesäkkeiden syntymisen verisuonen seinämään.(40)

Myös korkea verensokeripitoisuus on ateroskleroosin riskitekijä. Diabetesta sairastavilla ateroskleroosi alkaa nuoremmalla iällä ja on pitemmälle kehittynyttä kuin terveillä ihmisillä. Suurien ja keskisuurten valtimoiden ateroskleroosi ei eroa diabeetikoiden ja ei-diabeetikoiden välillä, mutta diabeetikoille kehittyy myös hiussuonten muutoksia. Diabeetikoiden hiussuonien tyvikalvo paksuuntuu, mutta suonien läpäisevyys plasman proteiineille nousee. Tämä johtaa diabeettiseen munuaissairauteen, verkkokalvosairauteen ja tiettyihin ääreishermostautien muotoihin.(40) Korkean verensokeripitoisuuden ja AA:n puhkeamisen välillä ei ole vielä osoitettu olevan yhteyttä.

1.3.3 Miksi aivovaltimoaneurysma muuttuu vuotoalttiiksi?

On edelleen epäselvää, miten SAV:n riskitekijät vaikuttavat aivovaltimon tai AA:n seinämään aikaansaaden AA:n muodostumisen ja puhkeamisen. Histopatologisten tutkimusten pohjalta vaikuttaa selvältä, että AA:n seinämän muuttuminen vuotoherkäksi liittyy seinämän solukuolemaan, soluväliaineen rappeutumiseen, sekä seinämän tulehdusreaktioon(7,41,42). Vuotamaton AA:n seinämä muistuttaa rakenteeltaan myointimaalista hyperplasiaa tai verisuonen seinämän vauriolle vasteena syntyvää neointimaa. Tämän vuoksi on todennäköistä, että samat mekanismit, jotka aiheuttavat solukuolemaa, soluväliaineen rappeutumista, sekä tulehdusta myointimaalisessa hyperplasiassa tai neointimassa, aiheuttaisivat myös vuotamattoman AA:n seinämän rappeutumista(41).

1.3.3.1 Hapettuneet rasvat solukuoleman aiheuttajana verisuonen seinämässä

Ateroskleroottisissa leesioissa Ox-LDL käynnistää soluja tuhoavien makrofagien ja T-solujen kertymisen kudokseen. Nämä tuottavat sytokiineja ja kasvutekijöitä, jotka muuntelevat seinämän sileälihassolujen määrää ja ulkonäköä.(9) Lisäksi luonnolliset IgM luokan vasta-aineet sitoutuvat Ox-LDL:ään, aktivoivat komplementtisysteemiä ja opsonoiden seinämän komponentteja tulehdussolujen fagosytoosia varten(30, (43). Ox-LDL:ää fagosytoineet makrofagit toimivat antigeenia esittelevinä soluina ja aktivoivat edelleen immuunijärjestelmää myöhäisemmällä IgG luokan vasta-aineiden tuotannolla ja tappaja T-solujen lisähokuttelulla (30, 31, 28). IgM tai IgG luokan vasta-aineiden sitoutuminen Ox-LDL:ää nielaisseiden seinämäsolujen pinnalle johtaa solujen hajoamiseen tai apoptoosin käynnistymiseen komplementtisysteemin kautta, tai solun joutumiseen tulehdussolujen soluja tuhoavan toiminnan kohteeksi(43,44).

1.3.3.2 Hapettuneet rasvat tulehdusvasteen aiheuttajana verisuonen seinämässä

Ateroskleroottisissa kertymissä on havaittu kroonista tulehdusta, joka liittyy plakin puhkeamiseen(9). Ateroskleroosissa rasvojen, erityisesti LDL:n kertymistä valtimon

seinämään ja näiden hapettumista tai entsyymaattista muuntautumista, on pidetty tulehdusreaktion päälaukaisijana(28). Biokemiallisesti muuttuneet rasvat ja LDL:ään liittyvät muuttuneet proteiinit muodostavat immuunijärjestelmän tunnistamia antigeenimolekyylin osia. Nämä sitovat luonnollisia vasta-aineita, aktivoivat komplementtijärjestelmää ja ovat fagosytoivien solujen tunnistettavissa. Tämä johtaa solukuolemaan, kudostuhoon ja tulehdusreaktioon(9,44).

1.3.3.3 Muut ateroskleroosin aiheuttajat ja AA:n seinämä

AA:n seinämässä on todettu ateroskleroottisia kertymiä.(45)

Rautaylimäärän on todettu edistävän ateroskleroottisten kertymien syntyä. Rauta lisää systeemistä ja verisuonten sisäistä happiradikaalien tuotantoa ja vähentää endoteelista riippuvaista verisuonten relaksaatiota.(46) Happiradikaalit aiheuttavat LDL:n hapettumista ja sitä kautta ateroskleroosiplakkien syntyä(47).

Chlamydia pneumoniae on havaittu jopa 70 %:ssa ateroskleroottisista kertymistä. Tutkimuksessa ei kuitenkaan havaittu C pneumoniaen DNA:ta AA seinämänäytteistä PCR tekniikalla.(48) Toisessa tutkimuksessa löytyi SAV potilailta suuria pitoisuuksia IgG ja/tai IgA Chlamydia pneumoniae vasta-aineita seerumista(49).

1.4 Biologia SAV:n sukupuolierojen taustalla

1.4.1 Sukupuolisidonnaiset erot riskitekijöissä

Miesten korkeampaa sydän- ja verisuonitautiesiintyvyyttä verrattuna premenopausaaliin naisiin on selitetty eroilla kehon rasvajakaumassa, plasman lipoproteiinitasoissa ja plasman glukoosi-insuliini tasapainossa(50). Naisilla on yleisesti korkeammat HDL(High-density lipoprotein) pitoisuudet, matalammat plasman insuliini, apolipoproteiini B ja triglyseridipitoisuudet(50). Naishormonit, erityisesti estrogeenit suojaavat ateroskleroosilta monin tavoin. Ne suurentavat HDL:n määrää, vähentävät

LDL:n määrää, vapauttavat verisuonia laajentavia aineita, kuten typpioksidia (NO) ja prostasykliiniä (PG2) suonten seinämästä(50). Tämä vähentää verisuonten supistumista, laskee verenpainetta ja vähentää verihutaleiden kasautumista. Miehillä on saman ikäisiin premenopausaalisiiin naisiin nähden korkeampi verenpaine, mutta menopausin jälkeen naisten verenpaine ylittää miesten verenpaineen. Myös muiden ateroskleroosin riskitekijöiden esiintyvyyserot vähenevät tai häviävät miesten ja naisten välillä menopausin jälkeen. (50)

Tutkimuksissa on tullut esille naisten ja miesten välillä eroa tupakoinnin ja verenpaineen aiheuttamaan SAV:n riskiin. Naisilla tupakointi on suurempi riski kuin miehillä, kun taas miehillä korkea verenpaine on naisia suurempi riskitekijä. Suurimmassa SAV:n riskissä on potilas, jolla on korkea verenpaine, joka tupakoi ja on nainen.(51)

1.4.2 Estrogeenien paikallisvaikutukset verisuonen seinämässä

Estrogeenin on todettu vähentävän LDL:n määrää sekä sen hapettumista ja näin suojaavan ateroskleroosilta(52). Estrogeenin suojaava vaikutus saattaa ilmentyä myös sen suorilla vaikutuksilla verisuonien seinämän soluihin, kuten endoteeli- ja sileälihassoluihin. Tätä käsitystä tukien sekä endoteeli- että sileälihassoluissa on havaittu estrogeenireseptoreita.(37) Estrogeenin on todettu myötävaikuttavan endoteeliriippuvaiseen valtimoseinämän relaksaatioon monissa eläimissä. Typpioksidin (nitric oxide, NO) tuotto aiheuttaa suurimman osan endoteeliriippuvaisesta valtimoseinämän relaksaatiosta ja estrogeenin on todettu lisäävän NO:n tuotantoa. (37,53) Estrogeeni lisää NO:n lisäksi myös prostasykliinin tuotantoa ja tämä vähentää veren hyytymistäipumusta(53). Se myös lisää endoteelivaurioiden paranemista valtimoseinämässä.(53) Estrogeeni vähentää oksidatiivista stressiä laskemalla mitokondrioiden tuottaman ROS:n määrää aivoverisuonten veri- ja endoteelisoluissa (54). Estrogeeni vähentää tulehdusmediaattorien esiintymistä ja neutrofiilien kerääntymistä vahingoittuneeseen verisuoneen.(55)

2 Hypoteesit

2.1 Rasvan kertyminen ja oksidoituminen aneurysman seinämässä liittyvät aivovaltimoaneurysman seinämän rappeutumiseen.

2.2 Sukupuoli vaikuttaa rasvan kertymiseen liittyvään aivovaltimoaneurysman seinämän rappeutumiseen.

2.3 Sukupuoli vaikuttaa tulehdusreaktioon aivovaltimoaneurysman seinämässä

2.4 Estrogeenit vaikuttavat suoraan aivovaltimoaneurysman seinämän soluihin, mikä voi osaltaan selittää sukupuolisidonnaisia eroja seinämän solukuolemassa ja tulehdusreaktiossa.

3 Materiaali ja menetelmät

3.1 Kudosnäytteet

AA näytteet saatiin HYKS:n neurokirurgian klinikalta. Näytteet jäädettiin heti nestetypellä ja säilytettiin -80 asteessa. Näytteiden käytölle ja tutkimusprotokolalle on eettisen toimikunnan lupa (Dnro 177/E9/05). Potilaiden kliiniset tiedot kerättiin potilaiden sairaskertomuksista.

3.2 Histologiset värjäykset

Histologisia tutkimuksia varten syväjäädetyt näytteet upotettiin OCT Tissue Tek aineeseen (Sakura, Zoeterwoude, Alankomaat) ja leikattiin 2-4µm paksuiksi leikkeiksi kryotomilla.

Yleistä morfologian arviota varten näytteet värjättiin asetoni (5min -20C) fiksaation jälkeen 5-7 min ajan Gillin hematoksyliiniliuoksella (Vector, Burlingame, Kalifornia, USA).

Näytteisiin kertyneet rasvat värjättiin Oil-red-O (ORO) värjäyksellä. Fiksaamattomat leikkeet huuhdeltiin ensin aquassa, sitten 5 min absoluuttisessa propyleeniglykolissa, jonka jälkeen ne kastettiin 7 min ajaksi ORO liuokseen (HUSLAB, liuoslaboratorio). Tämän jälkeen näytteet huuhdeltiin kahteen otteeseen 5 min ajan 85 %:ssa propyleeniglykoli vesiliuoksessa, ja lopulta aquassa. Taustavärjäystä varten näytteet kastettiin vielä 10 min ajaksi Gillin hematoksyliiniliuokseen, jonka jälkeen ne huuhdeltiin aqualla sekä hanavedellä ja päällystettiin Aquamountilla (Merck KGaA, Darmstadt, Saksa) kiinnitetyllä peitinlasilla.

AA:n seinämän solujen endogeenista peroksidaasiaktiiviteettia värjättiin inkuboimalla fiksaamattomia leikkeitä diaminobentsidiini (DAB) reagenssilla (Vector), josta peroksidaasientsyymi muodostaa ruskean värisakan. Näytteet tausta värjättiin Mayerin hematoksyliinillä (10 min huoneen lämmössä). Näytteet päällystettiin Aquamountilla kiinnitetyllä peitinlasilla

3.3 Immunohistokemia

3.3.1 Ox-LDL värjäys

Hapettuneita LDL partikkeleita värjättiin käyttämällä kuparioksidoidulla LDL:lla immunisoiduista marsuista eristettyä polyklonaalista anti-ox-LDL vasta-ainetta (Rosenfeld et al.). Leikkeet fiksoitiin ensin 4 %:lla paraformaldehydillä (10 min huoneen lämmössä), jonka jälkeen leikkeet pestiin 3 kertaa fosfaattipuskuroidussa keittosuolassa (PBS). Tämän jälkeen endogeeninen peroksidaasiaktiiviteetti estettiin inkuboimalla leikkeitä 0.3 %:ssa vetyperoksidi- ja metanoliliuoksessa.

Leikkeet pestiin uudelleen PBS:llä 3 kertaa, jonka jälkeen näytteitä inkuboititiin 30 min 3 %:n vuohen seerumiliuoksen kanssa taustasitoutumisen estämiseksi. Tämän jälkeen

näytteitä inkuboitiin 1 tunti 1:500 laimennetun YE vasta-aineen kanssa, jonka jälkeen sitoutumatta jäänyt vasta-aine pestiin pois (3xPBS) ja leikkeeseen sitoutunut YE vasta-aine tunnistettiin 1:200 laimennetulla marsun IgG vasta-aineen tunnistavalla biotinyloidulla sekundaarivasta-aineella (Vector). PBS pesujen jälkeen näytteeseen sitoutuneeseen YE vasta-aineeseen sitoutunut biotinyloitu sekundaari vasta-aine tunnistettiin inkuboimalla leikkeitä peroksidaasikonjugoitua avidiini-biotiinikompleksia sisältävässä liuoksessa (Vector).

PBS pesujen jälkeen muodostuneet vasta-aine- ja peroksidaasikompleksit visualisoitiin DAB:lla. Näytteet taustavärjättiin Mayerin hematoksyliinillä (10 min huoneen lämmössä), dehydroitiin nousevassa alkoholisarjassa sekä päällystettiin ksyleenipohjaisella liimalla, jolla kiinnitettiin peitinlasit.

3.3.2 Tulehdussolujen (CD45) värjäys

Tulehdussolut tunnistettiin käyttämällä CD45 pintaproteiiniin sitoutuvaa hiirestä eristettyä monoklonaalista vasta-ainetta (klooni 2B11+PD7/26, DAKO, Glostrup, Tanska). Leikkeet fiksoitiin -20 asteisella asetonilla 5 min ajan, ilmakeivattiin, ja pestiin PBS:llä kolme kertaa. Tämän jälkeen näytteet olivat 60 min ajan huoneenlämmössä 3 %:ssa hevosen seerumiliuoksessa taustasitoutumisen vähentämiseksi. Seerumiblokkia seurasi yön yli inkubaatio primaarivasta-aineen 1:200 liuoksessa. PBS pesujen jälkeen sitoutunut primaarivasta-aine tunnistettiin hiiren IgG vasta-aineita tunnistavalla biotinyloidulla sekundaari vasta-aineella (Vector). Leikkeet pestiin seuraavaksi 3 kertaa PBS:llä, jonka jälkeen estettiin endogeenisen peroksidaasin toiminta inkuboimalla laseja huoneenlämmössä 3 %:ssa vetyperoksidissa 20 min. Tämän jälkeen näytteet pestiin PBS:llä ja sitoutuneet vasta-ainekompleksit tunnistettiin peroksidaasikonjugoiduilla avidiini-biotiinikomplekseilla sekä DAB reagenssilla kuten yllä kuvatun YE-värjäyksen osalta. Leikkeet taustavärjättiin Gillin hematoksyliinillä (Vector) (5-7 min) ja päällystettiin Aquamount (Vector) liimalla ja peitinlaseilla.

3.3.3 Estrogeenireseptorien värjäys

Estrogeenireseptorit alpha, beta1, sekä beta2 värjättiin kudokset käyttämällä näitä reseptoreita spesifisti tunnistavia hiirestä eristettyjä monoklonaalisia vasta-aineita (kloonit PPG5/10, 57/3 ja 6F11, Serotec, Oxford, Iso-Britannia). Estrogeenireseptoreiden värjäyksissä leikkeet käsiteltiin kuten CD45 värjäyksissä, mutta ennen inkubointia 3 %:ssa hevosen seerumiliuoksessa, leikkeitä inkuboitiin 10 min huoneen lämmössä 0,1 %:ssa Triton X-100 liuoksessa (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), jotta tumakalvojen läpäisevyyttä lisättäisiin. DAB ja peroksidaasireaktion jälkeen leikkeet huuhdeltiin aquassa ja tumat taustavärjättiin inkuboimalla leikkeitä 5min huoneenlämmössä Nuclear Fast Red liuoksessa (Vector). Tämän jälkeen leikkeet dehydroitiin ja päällystettiin ksyleenipohjaisella liimalla sekä peitinlasilla.

3.4 Histologian kvantitaatio

Värjätty leikkeet mikroskoipoitiin, kuvattiin ja kuvat yhdistettiin tietokoneella rekonstruktio kuviksi. Rekonstruktio kuvat kvantitoitiin ImageJ ohjelmalla. Näytteiden positiivisesti värjäytyneen alueen ja kokonaispinta-alan suhde mitattiin, sekä laskettiin tumatiheys tai CD45+ solujen tiheys rasva- tai hapettuneen LDL:n värjäyksissä positiivisilla ja negatiivisilla alueilla. Lisäksi värjäyksistä määritettiin seinämän rakenne käyttämällä aiemmin julkaistua histopatologista luokitusta (seinämätyypit A-D(8)). Lasketut pinta-alat sekä solujen lukumäärät ja seinämätyypit kerättiin taulukkoon yhdessä potilaan tietojen kanssa.

3.5 Tilastoanalyysit

Luokkamuuttujien vertailussa käytettiin Fisherin exactia testiä ja jatkuvien muuttujien vertailussa nonparametrisia Mann-Whitney U sekä Kruskal-Wallis testejä, koska jatkuvien muuttujien jakauma oli kaukana normaalijakaumasta. Korrelaatioita jatkuvien muuttujien kesken tutkittiin käyttäen non-parametrista Spearmanin testiä. Tilastot laskettiin SPSS 15.0 tilastoohjelmalla. Merkitsevyyden rajana pidettiin P-arvoa alle 0.05.

4 Tulokset

4.1 Tutkittu potilasaineisto

Tutkitun sarjan vuotaneista AA:sta 22/27 oli naisilla ja vuotamattomista 9/14. Vuotaneiden ja vuotamattomien AA:iden sukupuolijakaumissa ei ollut merkittävää eroa ($p=0,267$, Fisher Exact). Potilaan ikä AA:n toteamishetkellä ja AA:n koko eivät korreloineet vuotaneiden tai vuotamattomien aneurysmien ryhmissä. Ikä ja koko eivät myöskään korreloineet naisten ja miesten alaryhmissä. Vuotostatuksen tai sukupuolen mukaan jaetuissa alaryhmissä ei ilmennyt merkittäviä eroja vuotostatuksen tai sukupuolen ja ikä- ja kokojakauman välillä.

Lisäksi verrattiin multippeleiden aneurysmien esiintyvyyttä vuotaneiden ja vuotamattomien AA:den kantajilla sekä eri sukupuolilla. Vuotaneiden AA:ien kantajista multippeleja AA:ia oli 10/27:llä ja vuotamattomien AA:ien kantajista 6/14 ($p= 0,031$, Fisher Exact). Naisten ryhmässä multippeleiden AA:ien kantajia oli 14/31 ja miesten ryhmässä 2/10 ($p= 0,321$, Fisher Exact).

4.2 Rasvan ja hapettuneen rasvan kertyminen aneurysman seinämään

Kaikkiin AA:n seinämiin kertyi rasvaa ja hapettunutta rasvaa riippumatta vuotostatuksesta tai sukupuolesta. Normaaliin lipidien (ORO-värjäys) ja hapettuneen LDL:n (Ox-LDL, YE-värjäys) kertyminen positiivisen pinta-alan suhteellisenä osuutena mitattuna ei eronnut vuotaneissa ja vuotamattomissa aneurysmissa ($p=0,856$, $p=0,933$, Mann-Whitney U).

Rasvan kertyminen AA:n seinämään ei liittynyt sukupuoleen Rasvan (ORO) tai hapettuneen Ox-LDL:n (YE) kertyminen eivät myöskään korreloineet AA:n kokoon tai potilaan ikään. Sen sijaan rasvakertymä (ORO) kertymä korreloi hapettuneen Ox-LDL:n (YE) kertymään (korrelaatiokerroin: 0,711, $p=0,003$, Spearman).

4.2.1 Rasvojen kertyminen ja seinämän rakenne

Rasvan kertyminen AA:n seinämään liittyi merkitsevästi sekä seinämän solutiheyteen että seinämän rakenteeseen sekä vuotaneissa että vuotamattomissa aneurysmissa ($p<0,001$ Kruskal-Wallis, Taulukko 1).

Taulukko 1. Rasvan kertymisen ja seinämän solutiheyden sekä rakenteen yhteys.

<i>Rasvan määrä</i>	<i>Seinämän solutiheys</i>
Ei rasvaa	51,0 (17-86)
Vähän rasvaa seinämän sidekudoksessa	84,1 (4-31)
Rasvaa solujen sisällä / vahtosoluja	48,6 (12-26)
Paljon rasvaa seinämän sidekudoksessa	21,7 (2-21)
Erittäin paljon rasvaa seinämän sidekudoksessa	20,0 (0-18)

$p<0,001$, Kruskal-Wallis

<i>Seinämän rakenne</i>	<i>Rasvaa seinämässä</i>	<i>Ei rasvaa seinämässä</i>
B	38/53	15/53
C	11/90	79/90

$p < 0,001$, Fischer-exact 2-sided

Rasvan kertymisen ja seinämän solutiheyden välinen yhteys ei ollut sukupuoleen liittyvää. Sekä miesten että naisten ryhmässä rasvan kertyminen korreloi solutiheyteen ($p < 0,001$, Kruskal-Wallis) ja seinämätyyppiin ($p < 0,001$, Fisher Exact).

Vaikka AA:n koko ja muoto eivät merkitsevästi liittyneet rasvan kertymiseen AA:n seinämään, AA:n muoto liittyi aneurysman seinämän solutiheyteen sukupuolisidonnaisesti. Naisten vuotamattomissa AA:issa leveämpi kanta, suurempi leveys ja pituus liittyivät pienempään solutiheyteen (korrelaatiokerroin: -0,5, $p = 0,012$, Spearman). Naisten vuotaneissa AA:issa aneurysman muodolla ja solutiheydellä ei ollut merkitsevää yhteyttä. Miesten AA:issa ainoastaan suurempi pituus liittyi merkitsevästi pienempään solutiheyteen AA:n vuotostatuksesta riippumatta (vuotamattomissa: -0,5, $p = 0,021$, vuotaneissa: -0,8, $p = 0,042$, Spearman).

4.2.2 Hapettuneiden rasvojen kertyminen ja seinämän rakenne

Ox-LDL:n kertyminen korreloi seinämän rappeutumiseen. Mitä rappeutuneempi seinämän rakenne sitä enemmän Ox-LDL:ää on keräytyneenä soluihin tai soluvälitilaan

Taulukko 2. Seinämän rakenteen ja Ox-LDL:n kertymisen yhteys

<i>Seinämän rakenne</i>	<i>neg</i>	<i>Ox-LDL + soluja</i>	<i>Ox-LDL heikosti matrixissa</i>	<i>Ox-LDL voimakkaasti matrixissa</i>
A	4/5			
B	11/33	11/33	9/33	
C	16/34	1/10		15/34

$p < 0,001$, Chi-Square

Seinämän solutiheys korreloi vuotaneissa aneurysmissa Ox-LDL:n kertymiseen. Alueilla, joissa soluvälitilassa on paljon Ox-LDL:ää, on vähemmän- soluja kuin alueilla, joissa Ox-LDL on solujen sisässä tai alue on kokonaan negatiivinen (mediaani solutiheys: 76,4; vaihteluväli: 0-21 versus mediaani solutiheys: 13,5-17,5; vaihteluväli: 0-69, $p=0,02$, Mann-Whitney U).

Vuotaneissa AA:issa Ox-LDL:n kertymisen ja solutiheyden vähenemisen välinen korrelaatio oli selvä naisten aneurysmissa ($p=0,016$, Kruskal-Wallis), mutta miesten aneurysmissa päinvastainen trendi oli havaittavissa ($p=0,915$, Kruskal-Wallis). Naisten vuotamattomissa aneurysmissa yhteyttä ei havaittu ja miesten vuotamattomia aneurysmia ei ollut mukana aineistossa.

Taulukko 3. Ox-LDL:n kertymisen ja solutiheyden korrelaatiot naisten ja miesten ryhmissä

<i>Seinämän rakenne</i>	<i>Naisten vuotaneet AA:t</i>	<i>Miesten vuotaneet AA:t</i>
pos soluvälitila	6,6 (2-18)	8,2 (0-21)
Ox-LDL + soluja tai neg näyte	13,5–17,7 (3-70)	13,5-12,8 (0-20)

Kruskall-Wallis

4.3 Tulehdussolut aivovaltimoaneurysman seinämässä

Tulehdussolulinfiltraation yhteyttä sukupuoleen tutkittiin eri näytesarjasta kuin rasvojen kertymistä aneurysman seinämään. Sarjat olivat kuitenkin osittain päällekkäiset.

4.3.1 Aineiston demografia

Aineiston AA:ista oli 32 naisilla ja 7 miehillä, näistä 26 oli vuotaneita ja 13 vuotamattomia. Merkitseviä eroja sukupuolijakaumassa ja ikäjakaumassa ei ollut ($p=1$). Ks taulukko 4. ja 5.

Taulukko 4. Sukupuolen vaikutus vuotostatukseen sekä ikään

<i>Sukupuoli</i>	<i>Vuotaneet aneurysmat</i>	<i>Keski-ikä</i>		
Nainen	21/32	54,	mediaani	54,
		vaihteluväli 29-71		
Mies	5/7	63,	mediaani	57,
		vaihteluväli 51-84		

($p=1$, Fisherin testi, $p=0,164$, Mann-Whitney)

Taulukko 5. Vuotostatuksen ja sukupuoleen sekä ikään

<i>Vuotostatus</i>	<i>naiset</i>	<i>Keski-ikä</i>		
Vuotaneet	21/26	57,	mediaani	58,
		vaihteluväli 29-84		
Vuotamattomat	11/13	52,	mediaani	53,
		vaihteluväli 34-77		

($p=1$, Fisherin testi, $p=0,194$, Mann-Whitney)

4.3.2 Tulehdussolujen yhteys vuotostatukseen

Seinämän tulehdussoluinfiltraatio oli yhteydessä AA:n seinämän vuotoon.

AA:n seinämän tulehdussolujen tiheyden keskiarvo oli vuotaneissa AA:issa 107, mediaani 79; vaihteluväli: 0-378 ja vuotamattomissa AA:issa 17, mediaani 3; vaihteluväli: 0-80 ($p=0,005$, Mann-Whitney U).

4.3.3 Tulehdussolujen yhteys sukupuoleen

AA:n seinämän tulehdussolutiheydessä ei havaittu sukupuoleen liittyvää eroa. Naisten AA:ien seinämän tulehdussolutiheyden keskiarvo oli 72, mediaani 50; vaihteluväli: 0-357 ja miesten 90, mediaani 0; vaihteluväli: 0-378 ($p=0,411$, Mann-Whitney U).

Sukupuolien välistä eroa AA:n seinämän tulehdussolutiheydessä ei havaittu myöskään pelkästään vuotaneita AA:n seinämiä vertailtaessa. Miesten ($n=5$) keskiarvo oli 126, mediaani 121; vaihteluväli: 0-357 ja naisten ($n=21$) keskiarvo 102, mediaani 75; vaihteluväli: 0-357 ($p=0,845$, Mann-Whitney U). Vuotamattomien AA:iden kantajista vain kaksi oli miehiä, joten tässä alaryhmässä tulehdussolutiheyden vertailua sukupuolten välillä ei voitu järkevästi tehdä.

4.3.4 Tulehdussolukertymän yhteys seinämään

Vuotamattomissa aneurysmissa tulehdussolukertymä ei korreloinut rasvan kertymiseen (ORO), hapettuneen LDL:n (YE) kertymiseen, tai endogeeniseen peroksidaasiaktiivisuuteen, mutta vuotaneissa aneurysmissa tulehdussolujen lukumäärä korreloi peroksidaasiposiitiviseen suhteelliseen pinta-alaan (korrelaatiokerroin: 0,647, $p=0,003$, Spearman). Peroksidaasin ja tulehdussolujen välinen yhteys oli riippumaton sukupuolesta. Vuotaneissakaan aneurysmissa ei kuitenkaan havaittu yhteyttä tulehdussoluinfiltraatin ja rasvojen tai hapettuneiden rasvojen kertymisen välillä.

4.4 Estrogeenireseptorit aivoaltimoaneurysman seinämässä

Estrogeenireseptoreita on AA:n seinämässä sekä sileälihassoluissa että tulehdussoluissa, sekä vuotaneissa että vuotamattomissa AA:issa, kuten myös sekä naisten että miesten AA:issa. Estrogeenireseptoreita värjättiin 18:sta AA:n seinämästä, näistä vain 2 oli miespotilaasta, 4 oli vuotamattomia ja 14 vuotaneita AA:ia. Estrogeenireseptori alfaa todettiin 10/18 (56 %) värjätyistä AA:n seinämistä, estrogeenireseptori beeta 1:stä 12/18 (67 %) AA:n seinämistä ja beeta 2 reseptoria 9/16 (56 %). Estrogeenireseptoriposiitivisten tumien määrää värjätyissä AA:ien seinämissä arvioitiin semi-kvantitatiivisesti luokittelemalla näytteet tumien määrän suhteen (luokat: negatiivinen, muutama positiivinen tuma, useita positiivisia tumia, runsaasti positiivisia tumia). Minkään estrogeenireseptorin esiintyminen ei merkittävästi eronnut vuotaneissa tai vuotamattomissa AA:n seinämissä, joskin sarjan sisältäessä vain 4 vuotamatonta näytettä, oli sarjan tilastollinen voima varsin heikko. AA:n kantajan sukupuolen suhteen vertailua estrogeenireseptoreiden esiintymisessä ei voitu tehdä, koska sarjassa oli miespotilaita vain 2 kpl. Tehtyjen immunohistokemiallisten yksöisvärjäysten morfologisen arvion perusteella vaikuttaa siltä että kaikkia kolmea tutkittua estrogeenireseptoria ilmennetään sekä AA:n seinämän sileälihassoluissa että tulehdussoluissa.

5 Pohdinta

5.1 Rasvan kertyminen ja aneurysman seinämän rappeutuminen

5.1.1 Aneurysman koko, muoto, sijainti, sekä ikä - Yhteys rasvan kertymiseen

Rasvaa kertyy aineurysman seinämään riippumatta sukupuolesta, iästä, sijainnista, koosta tai vuotostatuksesta.

5.1.2 Rasvan kertyminen ja solukuolema aivovaltimoaneurysman seinämässä

Seinämään kertyvällä rasvalla on yhteys seinämän solujen lukumäärän pienenemiseen. Adipofiliinivärjäykset sekä solunsisäiset ORO ja Ox-LDL kertymät osoittavat, että seinämän solut syövät seinämään kertynyttä ja siellä hapettunutta rasvaa. Yhteys voisi mahdollisesti johtua siitä, että seinämään kertynyt rasva muuttuu hapettuessaan soluille myrkylliseksi aiheuttaen näin solukuolemaa seinämässä.

Vuotaneissa ja vuotamattomissa aneurysmissa on ero tumatiheyden ja Ox-LDL:n kertymisen korrelaatioiden välillä. Vuotaneissa on samanlainen korrelaatio kuin koko aineistossa kun taas vuotamattomissa selvää korrelaatiota ei löytynyt. Tämä saattaa johtua ryhmän pienestä koosta (n=9). Voisi myös olla mahdollista, että vuotamattomissa AA:issa olisi jokin suojausmekanismi seinämään kertyvän rasvan aiheuttamalle solutuholle.

5.1.3 Rasvan kertyminen ja tulehdusreaktio aivovaltimoaneurysman seinämässä

Voimakkaalla sisäsyntyisellä peroksidaasiaktiiviteetilla on yhteys tulehdussolukertymään vain vuotaneissa aneurysmissa. Tämä voisi tarkoittaa tulehdusvasteen olevan erilainen vuotaneissa kuin vuotamattomissa aneurysmissa. Vuotaneissa aneurysmissa voisi olla jokin tulehdukselle altistava tekijä tai vuotamattomissa jokin siltä suojaava tekijä. Vuotaneissa aneurysmissa tulehdussoluvasteeseen liittyvä peroksidaasiaktiiviteetti voisi olla merkittävä tekijä

rasvojen hapettumisessa. Tämä puolestaan liittyy seinämän rappeutumiseen, kuten aiemmin todettu.

5.2 Sukupuolen vaikutus aivovaltimoaneurysman seinämään

5.2.1 Sukupuolen vaikutus rasvojen kertymiseen

Rasvoja kertyy aneurysman seinämään sukupuolesta riippumatta.

5.2.2 Sukupuolen vaikutus solukuolemaan

Naisten ja miesten ryhmissä on eroa Ox-LDL:n kertymisen ja solutiheyden korrelaatioiden välillä. Naisten ryhmässä on selvä korrelaatio, kun taas miesten ryhmässä ei ole korrelaatiota. Eli naisten aneurysmien seinämä reagoi eri tavalla Ox-LDL:n kertymiseen, kuin miesten seinämä. Tämä voisi viitata siihen, että naisilla Ox-LDL:n kertyminen rappeuttaa seinämää miehiä enemmän ja tämä voisi olla yksi syy naissukupuolen suurempaan aneurysman puhkeamisriskiin.

Naisten vuotaneiden aneurysmien seinämissä, joissa soluväliaine on Ox-LDL positiivista, tumia on vähemmän kuin Ox-LDL negatiivisissa seinämissä. Tätä eroa ei ole naisten vuotamattomissa aneurysmissa. Eli naisten vuotaneiden ja vuotamattomien aneurysmien välillä on ero Ox-LDL:n seinämää rappeuttavassa vaikutuksessa. Jokin tekijä altistaa vuotaneet aneurysmat Ox-LDL:n aiheuttamalle solutuholle tai jokin toinen tekijä suojaa vuotamattomia aneurysmia tältä tuholta.

Vuotaneiden naisten ryhmässä on ero soluväliaineeltaan Ox-LDL positiivisen ja negatiivisen tumatiheyden välillä, mutta vuotaneiden miesten ryhmässä ei tätä eroa ole. Sukupuolten välillä on siis ero Ox-LDL:n aiheuttamalle solutuholle vuotaneissa aneurysmissa. Ehkä siis naisilla Ox-LDL altistaa solutuholle ja tätä kautta puhkeamiselle ja miehillä puhkeaminen johtuu osittain jostain muusta.

5.2.3 Sukupuolen vaikutus tulehdusreaktioon

Sukupuoli ei näytä aineistomme perusteella vaikuttavan tulehdusreaktion syntyyn. Muissa tutkimuksissa on estrogeenilla todettu kuitenkin olevan tulehdusreaktiota vaimentava vaikutus(3,55). Estrogeenin on mm. todettu estävän paikallisesti tulehdusreaktiota edistävien aineiden ja adheesiomolekyylien ilmaantumista, valkosoluaktivaatiota, -tunkeutumista ja -kerääntymistä sekä adventitian aktivaatiota ja paikallista sytokiinien vapautumista(3).

5.3 Estrogeenireseptorit aivovaltimoaneurysman seinämässä

5.3.1 Estrogeenien vaikutus sileälihassoluihin

Estrogeeni vähentää sileälihassolujen lisääntymistä ja kulkeutumista verisuonen seinämässä. Se myös vähentää verisuoniseinämän vauriosta aiheutuvaa tulehdusreaktiota ja haitallista verisuoniseinämän muokkausta vähentämällä TNF-alpha välitteisten tulehdusvälittäjäaineiden ilmenemistä sileälihassoluissa.(3).

5.3.2 Estrogeenien vaikutus tulehdussoluihin

Estrogeeni vähentää tulehdussolujen, erityisesti neutrofiilien kerääntymistä vahingoittuneeseen verisuoneen(55). Se myös vaimentaa tulehdusvälittäjäaineiden, esiintymistä sileälihassoluissa(55). Koska tulehdus on mukana rappeuttamassa aneurysman seinämää ja altistamassa näin AA:n puhkeamiselle, voisi ajatella estrogeenin suojaavan AA:a puhkeamiselta.

5.4 Yhteenveto

Aineistossamme seinämään kertyvällä rasvalla on yhteys seinämän solujen lukumäärän pienenemiseen. Vuotaneet ja vuotamattomat aneurysmat reagoivat eri tavalla Ox-LDL:n kertymiseen.

Rasvoja kertyy aneurysman seinämään sukupuolesta riippumatta. Naisten ja miesten ryhmät kuitenkin eroavat Ox-LDL:n kertymisen ja solutiheyden korrelaatioiden suhteen. Naisilla esiintyvä ja miehiltä puuttuva korrelaatio voisi viitata Ox-LDL:n suurempaan seinämää tuhoavaan vaikutukseen naisten aneurysmissa. Myös naisten vuotaneiden ja vuotamattomien aneurysmien välillä on ero Ox-LDL:n seinämää rappeuttavassa vaikutuksessa. Aivan kuin vuotaneiden aneurysmien seinämät olisivat herkempiä Ox-LDL:n rappeuttavalle vaikutukselle. Sukupuolten välillä on myös ero Ox-LDL:n aiheuttamalle solutuholle vuotaneissa aneurysmissa. Ehkä siis naisilla Ox-LDL altistaa solutuholle ja tätä kautta puhkeamiselle ja miehillä puhkeaminen johtuu osittain jostain muusta.

Voimakkaalla sisäsyntyisellä peroksidaasiaktiiviteetilla on yhteys tulehdussolukertymään vain vuotaneissa aneurysmissa. Vuotaneissa aneurysmissa tulehdussoluvasteeseen liittyvä peroksidaasiaktiiviteetti voisi olla merkittävä tekijä rasvojen hapettumisessa.

6 Oma rooli tutkimuksessa

Ohjaajinani toimivat Juhana Frösen sekä Riikka Tulamo. Projektiin osallistuivat myös tutkimusryhmäni kaksi muuta henkilöä Henrik Bygglin, LL ja Arto Liiman, LK. Juhana Frösen sekä Riikka Tulamo tekivät immunohistokemiallisista värjäyksistä Oro- ja YE-värjäykset ja näiden lasien kvantitoinnin tein itse. Juhana Frösen sekä Henrik Bygglin tekivät estrogeenireseptorivärjäykset ja lasien kuvauksen tekivät Riikka Tulamo, Juhana Frösen, Henrik Bygglin ja minä itse. Minä sekä Arto Liiman teimme CD45 värjäykset ja Arto Liiman teki kvantitoinnin. Juhana Frösen sekä minä teimme tilastot.

Lähteet

- Rosenfeld ME, Palinski W, Ylä-Herttuala S, Butler S, Witztum JL. Arteriosclerosis 1990, 10:336-349.(1) van Gijn J, Kerr RS, Rinkel GJ. Subarachnoid haemorrhage. Lancet 2007 Jan 27;369(9558):306-318.
- (2) Mattar CN, Harharah L, Su LL, Agarwal AA, Wong PC, Choolani M. Menopause, hormone therapy and cardiovascular and cerebrovascular disease. Ann Acad Med Singapore 2008 Jan;37(1):54-62.
- (3) Xing D, Nozell S, Chen YF, Hage F, Oparil S. Estrogen and mechanisms of vascular protection. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2009 Mar;29(3):289-295.
- (4) Farhat MY, Lavigne MC, Ramwell PW. The vascular protective effects of estrogen. FASEB J 1996 Apr;10(5):615-624.
- (5) Kataoka K, Taneda M, Asai T, Kinoshita A, Ito M, Kuroda R. Structural fragility and inflammatory response of ruptured cerebral aneurysms. A comparative study between ruptured and unruptured cerebral aneurysms. Stroke 1999 Jul;30(7):1396-1401.
- (6) Chyatte D, Bruno G, Desai S, Todor DR. Inflammation and intracranial aneurysms. Neurosurgery 1999 Nov;45(5):1137-46; discussion 1146-7.
- (7) Tulamo R, Frosen J, Junnikkala S, Paetau A, Pitkaniemi J, Kangasniemi M, et al. Complement activation associates with saccular cerebral artery aneurysm wall degeneration and rupture. Neurosurgery 2006 Nov;59(5):1069-76; discussion 1076-7.
- (8) Frosen J, Piippo A, Paetau A, Kangasniemi M, Niemela M, Hernesniemi J, et al. Remodeling of saccular cerebral artery aneurysm wall is associated with rupture: histological analysis of 24 unruptured and 42 ruptured cases. Stroke 2004 Oct;35(10):2287-2293.
- (9) Hansson GK, Libby P, Schonbeck U, Yan ZQ. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. Circ Res 2002 Aug 23;91(4):281-291.
- (10) Tulamo R, Frosen J, Junnikkala S, Paetau A, Kangasniemi M, Pelaez J, et al. Complement system becomes activated by the classical pathway in intracranial aneurysm walls. Lab Invest 2010 Feb;90(2):168-179.
- (11) Frosen J. The Pathobiology of Saccular Cerebral Artery Aneurysm Rupture and Repair. p. 12-13.
- (12) Rinkel GJ, Djibuti M, Algra A, van Gijn J. Prevalence and risk of rupture of intracranial aneurysms: a systematic review. Stroke 1998 Jan;29(1):251-256.
- (13) de Rooij NK, Linn FH, van der Plas JA, Algra A, Rinkel GJ. Incidence of subarachnoid haemorrhage: a systematic review with emphasis on region, age, gender and time trends. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2007 Dec;78(12):1365-1372.

- (14) Juvela S. Prevalence of and risk factors for intracranial aneurysms. *Lancet Neurol* 2011 Jul;10(7):595-597.
- (15) Feigin VL, Rinkel GJ, Lawes CM, Algra A, Bennett DA, van Gijn J, et al. Risk factors for subarachnoid hemorrhage: an updated systematic review of epidemiological studies. *Stroke* 2005 Dec;36(12):2773-2780.
- (16) Juvela S, Poussa K, Porras M. Factors affecting formation and growth of intracranial aneurysms: a long-term follow-up study. *Stroke* 2001 Feb;32(2):485-491.
- (17) Kongable GL, Lanzino G, Germanson TP, Truskowski LL, Alves WM, Torner JC, et al. Gender-related differences in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* 1996 Jan;84(1):43-48.
- (18) Longstreth WT, Nelson LM, Koepsell TD, van Belle G. Subarachnoid hemorrhage and hormonal factors in women. A population-based case-control study. *Ann Intern Med* 1994 Aug 1;121(3):168-173.
- (19) Morita A, Fujiwara S, Hashi K, Ohtsu H, Kirino T. Risk of rupture associated with intact cerebral aneurysms in the Japanese population: a systematic review of the literature from Japan. *J Neurosurg* 2005 Apr;102(4):601-606.
- (20) Ishibashi T, Murayama Y, Urashima M, Saguchi T, Ebara M, Arakawa H, et al. Unruptured intracranial aneurysms: incidence of rupture and risk factors. *Stroke* 2009 Jan;40(1):313-316.
- (21) Epidemiology of aneurysmal subarachnoid hemorrhage in Australia and New Zealand: incidence and case fatality from the Australasian Cooperative Research on Subarachnoid Hemorrhage Study (ACROSS). *Stroke* 2000 Aug;31(8):1843-1850.
- (22) Juvela S, Porras M, Poussa K. Natural history of unruptured intracranial aneurysms: probability of and risk factors for aneurysm rupture. *J Neurosurg* 2008 May;108(5):1052-1060.
- (23) Ruigrok YM, Buskens E, Rinkel GJ. Attributable risk of common and rare determinants of subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 2001 May;32(5):1173-1175.
- (24) Ronkainen A, Hernesniemi J, Tromp G. Special features of familial intracranial aneurysms: report of 215 familial aneurysms. *Neurosurgery* 1995 Jul;37(1):43-6; discussion 46-7.
- (25) "Heikkilä, Kupari, Airaksinen, Huikuri, Nieminen, Peuhkurinen editors. *Kardiologia*. 2.th ed.: Duodecim; 2008.
- (26) Inagawa T. Risk factors for the formation and rupture of intracranial saccular aneurysms in Shimane, Japan. *World Neurosurg* 2010 Mar;73(3):155-64; discussion e23.
- (27) Vayssier-Taussat M, Camilli T, Aron Y, Meplan C, Hainaut P, Polla BS, et al. Effects of tobacco smoke and benzo[a]pyrene on human endothelial cell and monocyte stress responses. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001 Mar;280(3):H1293-300.

- (28) Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell* 2001 Feb 23;104(4):503-516.
- (29) Zou N, Hong J, Dai QY. Passive cigarette smoking induces inflammatory injury in human arterial walls. *Chin Med J (Engl)* 2009 Feb 20;122(4):444-448.
- (30) Machida T, Kubota M, Saeki N, Takiguchi M, Yamaura A, Hiwasa T. Increase in metalloproteinase activity in the plasma of smoke-extract-injected rats. *Int J Mol Med* 2004 Oct;14(4):659-662.
- (31) Yin L, Morita A, Tsuji T. Alterations of extracellular matrix induced by tobacco smoke extract. *Arch Dermatol Res* 2000 Apr;292(4):188-194.
- (32) Yin L, Morita A, Tsuji T. Tobacco smoke extract induces age-related changes due to modulation of TGF-beta. *Exp Dermatol* 2003;12 Suppl 2:51-56.
- (33) Kirkham PA, Spooner G, Ffoulkes-Jones C, Calvez R. Cigarette smoke triggers macrophage adhesion and activation: role of lipid peroxidation products and scavenger receptor. *Free Radic Biol Med* 2003 Oct 1;35(7):697-710.
- (34) Inci S, Spetzler RF. Intracranial aneurysms and arterial hypertension: a review and hypothesis. *Surg Neurol* 2000 Jun;53(6):530-40; discussion 540-2.
- (35) Chien S. Effects of disturbed flow on endothelial cells. *Ann Biomed Eng* 2008 Apr;36(4):554-562.
- (36) Zou Y, Hu Y, Metzler B, Xu Q. Signal transduction in arteriosclerosis: mechanical stress-activated MAP kinases in vascular smooth muscle cells (review). *Int J Mol Med* 1998 May;1(5):827-834.
- (37) Harrod CG, Batjer HH, Bendok BR. Deficiencies in estrogen-mediated regulation of cerebrovascular homeostasis may contribute to an increased risk of cerebral aneurysm pathogenesis and rupture in menopausal and postmenopausal women. *Med Hypotheses* 2006;66(4):736-756.
- (38) Hegedus K, Molnar P. Age-related changes in reticulin fibers and other connective tissue elements in the intima of the major intracranial arteries. *Clin Neuropathol* 1989 Mar-Apr;8(2):92-97.
- (39) Murata K. Distribution of acidic glycosaminoglycans, lipids and water in normal human cerebral arteries at various ages. *Stroke* 1985 Jul-Aug;16(4):687-694.
- (40) Kumar V, Abbas A, Fausto N, Mitchell R. Atherosclerosis, Morphology of Diabetes and Its Late Complications. *Robbins Basic Pathology*. 8th ed.; 2007. p. 343-781.
- (41) Frosen J. *The Pathobiology of Saccular Cerebral Artery Aneurysm Rupture and Repair*. 1st ed. Helsinki: Helsinki University Press; 2006.
- (42) Tulamo, Frösen, Niemelä, Hernesniemi. Inflammatory changes in the aneurysm wall: a review *J NeuroIntervent Surg* 2010;2:120-130. 2010.

- (43) Binder CJ, Chang MK, Shaw PX, Miller YI, Hartvigsen K, Dewan A, et al. Innate and acquired immunity in atherogenesis. *Nat Med* 2002 Nov;8(11):1218-1226.
- (44) Binder CJ, Shaw PX, Chang MK, Boullier A, Hartvigsen K, Horkko S, et al. The role of natural antibodies in atherogenesis. *J Lipid Res* 2005 Jul;46(7):1353-1363.
- (45) Kosierkiewicz TA, Factor SM, Dickson DW. Immunocytochemical studies of atherosclerotic lesions of cerebral berry aneurysms. *J Neuropathol Exp Neurol* 1994 Jul;53(4):399-406.
- (46) Day SM, Duquaine D, Mundada LV, Menon RG, Khan BV, Rajagopalan S, et al. Chronic iron administration increases vascular oxidative stress and accelerates arterial thrombosis. *Circulation* 2003 May 27;107(20):2601-2606.
- (47) You SA, Wang Q. Ferritin in atherosclerosis. *Clin Chim Acta* 2005 Jul 1;357(1):1-16.
- (48) Cagli S, Oktar N, Dalbasti T, Erensoy S, Ozdamar N, Goksel S, et al. Failure to detect *Chlamydia pneumoniae* DNA in cerebral aneurysmal sac tissue with two different polymerase chain reaction methods. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003 Jun;74(6):756-759.
- (49) Yoneda H, Ouchi K, Ogawa A, Kunitsugu I, Fujisawa H, Akimura T, et al. *Chlamydia pneumoniae* infection as a risk factor for subarachnoid hemorrhage. *Cerebrovasc Dis* 2005;19(4):209-213.
- (50) Perez-Lopez FR, Larrad-Mur L, Kallen A, Chedraui P, Taylor HS. Gender differences in cardiovascular disease: hormonal and biochemical influences. *Reprod Sci* 2010 Jun;17(6):511-531.
- (51) Okamoto K, Horisawa R, Ohno Y. The relationships of gender, cigarette smoking, and hypertension with the risk of aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a case-control study in Nagoya, Japan. *Ann Epidemiol* 2005 Nov;15(10):744-748.
- (52) Wakatsuki A, Ikenoue N, Sagara Y. Effects of estrogen on susceptibility to oxidation of low-density and high-density lipoprotein in postmenopausal women. *Maturitas* 1998 Jan 12;28(3):229-234.
- (53) Arnal JF, Douin-Echinard V, Brouchet L, Tremollieres F, Laurell H, Lenfant F, et al. Understanding the oestrogen action in experimental and clinical atherosclerosis. *Fundam Clin Pharmacol* 2006 Dec;20(6):539-548.
- (54) Duckles SP, Krause DN. Mechanisms of cerebrovascular protection: oestrogen, inflammation and mitochondria. *Acta Physiol (Oxf)* 2010 Sep 6.
- (55) Xing D, Feng W, Miller AP, Weathington NM, Chen YF, Novak L, et al. Estrogen modulates TNF-alpha-induced inflammatory responses in rat aortic smooth muscle cells through estrogen receptor-beta activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007 Jun;292(6):H2607-12.