

The role of virus infection in abdominal aortic aneurysm aetiology

Rola zakażenia wirusowego w etiologii tętniaka aorty brzusznej

Grzegorz Oszkinis, Marek Winckiewicz, Fryderyk Pukacki, Zbigniew Krasiński, Marcin Gabriel, Przemysław Nowak, Jacek Brzeziński, Robert Juszkat, Magdalena Snoch, Wacław Majewski
Department of General and Vascular Surgery, Poznan University of Medical Sciences (Klinika Chirurgii Ogólnej i Naczyń Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu)

Abstract

Background. Contemporary studies on aneurysm formation in the course of inflammatory changes led to trials on the role of virus infection in its pathology. Some data in literature indicate infections of the aneurysm wall with such viruses as cytomegalovirus (CMV) and herpes simplex virus type 1, 2 (HSV 1/2). These microorganisms, causing subclinical, chronic or recurrent infections, may have a long-lasting, damaging influence on the aortic wall.

The study objective was to solve the following problems: 1. Can the presence of viruses be a factor that causes abdominal aortic aneurysm formation? 2. Does the division of aneurysms into two groups (non-specific and inflammatory) have a clinical nature, or does it result from their different aetiology?

Material and methods. Polymerase chain reaction (PCR) tests on DNA presence of CMV, HSV 1/2 and human papilloma virus type 6, 11 (HPV 6/11) were carried out on 34 patients with recognized abdominal aortic aneurysms (AAA), 30 patients with artery atherosclerosis (AA) and at 20 volunteers from a control group.

Results. DNA of CMV was detected in none of the tested groups of aortas; HSV 1/2 was detected in one control issue. DNA presence of HPV 6/11 was detected in 100% of tissues taken from aneurysmatic walls, as well as in 14 samples (46.7%) received from atherosclerotic aortas and in 17 tissues (85%) from control aortas.

Conclusions. The results suggest that the presence of HPV 6/11 is not a causative factor of AAA. However, the presence of these viruses, even in latent form, may lead to aortic wall weakness and increased susceptibility to secondary infection of *C. pneumoniae* bacteria, the presence of which was confirmed in previously demonstrated test results.

Key words: aortic aneurysm, inflammatory aneurysm, viral infection

Streszczenie

Wstęp. Wyniki współczesnych badań dotyczących powstawania tętniaków w przebiegu zmian zapalnych zapoczątkowały doświadczenia nad znaczeniem zakażeń wirusowych w ich patologii. W piśmiennictwie znajdują się dane, które wskazują na zakażenie ściany tętniaka wirusami, takimi jak cytomegalowirus (CMV) i wirus opryszczki pospolitej typu 1, 2 (HSV). Drobnoustroje te wywołując subkliniczne, przewlekłe lub nawracające zakażenia, mogą wywierać długotrwały uszkodzający wpływ na ścianę aorty.

Celem niniejszej pracy było ustalenie: 1. Czy obecność wirusów może być czynnikiem wywołującym powstanie tętniaka aorty brzusznej (AAA)? 2. Czy podział tętniaków na tętniaki niespecyficzne i zapalne ma charakter kliniczny czy też wynika z ich różnej etiologii?

Address for correspondence (Adres do korespondencji):

Prof. dr hab. med. Grzegorz Oszkinis, Klinika Chirurgii Ogólnej i Naczyń
ul. Długa 1/2, 61–848 Poznań
tel: +48 (61) 854 91 41
e-mail: goszkinis@gamed.poznan.pl

Material i metody. Badania reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) na obecność DNA CMV, HSV 1/2 i wirusa brodawczaka ludzkiego typu 6, 11 (HPV 6/11) wykonano u 34 osób z rozpoznanym AAA, u 30 chorych z miażdżycą aorty (AA) i u 20 osób z grupy kontrolnej.

Wyniki. W żadnej badanej grupie aort nie wykryto występowania DNA CMV, natomiast HSV 1/2 wykryto w jednej tkance kontrolnej. Obecność DNA HPV 6/11 stwierdzono w 100% tkanek pobranych ze ściany tętniaków, jak również w 14 próbach (46,7%) pochodzących z aort zmienionych miażdżycowo i 17 tkankach (85%) aort kontrolnych.

Wnioski. Wynik sugeruje, że obecność wirusa HPV 6/11 nie jest czynnikiem sprawczym powstania AAA. Obecność tych wirusów, nawet w formie utajonej, może jednak spowodować osłabienie ściany aorty i zwiększoną podatność na wtórne zakażenie — na przykład bakterii *C. pneumoniae*, której obecność potwierdzono we wcześniej prezentowanych wynikach badań.

Słowa kluczowe: tętniak aorty, tętniak zapalny, zakażenie wirusowe

Introduction

There are still doubts regarding the pathophysiological mechanisms that lead to abdominal aortic aneurysm (AAA) formation. Therefore, it seems that further studies will provide even more convincing proof of the existence of aortic "aneurysmatic disease" as an independent pathomorphological unit.

It was proved that vessel wall structural changes in AAA as well as in artery atherosclerosis (AA) may be caused by different nociceptive factors. Ross and Glomset created a theory of so-called homogenous reaction to trauma. According to this theory, endothelium or internal membrane damage done by mechanical, metabolic or immunological factors becomes a starting point of the pathological reconstruction of the vessel wall [1, 2].

In recent years there have been some reports about the significance of infection as one of the factors in compound etiopathogenesis of atherosclerosis. The pathological role of such viruses as *Coxsackie C*, herpes simplex type 1, 2 (HSV 1/2) and cytomegalovirus (CMV) have been described [3–5]. There is also a possibility of developing experimental atherosclerosis in chicks (Marek's disease) with a bird virus of the herpes type [1, 2, 6]. Confirmation for the coexistence of infection and atherosclerosis in humans came in the form of data from seroepidemiological research that indicated the increase of antibody titers (IgM and/or IgG class) with simultaneous confirmation of the presence of specific antigens and DNA of these micro-organisms in diseased arteries [3, 7].

Contemporary studies on aneurysm formation in the course of inflammatory changes have not shown such unequivocal results as in the case of atherosclerosis and have resulted in further research on the role of viral infections in its pathology. Some data in the literature indicate infections on the aneurysmatic wall with such viruses as CMV and HSV 1/2 [1, 4, 8]. These micro-organ-

Wstęp

Obecnie nadal istnieją wątpliwości dotyczące mechanizmów patofizjologicznych prowadzących do powstania tętniaka aorty brzusznej (AAA). Wydaje się więc, że dalsze badania pozwolą dostarczyć jeszcze bardziej przekonujących dowodów na istnienie „choroby tętniakowej” aorty jako samodzielnej jednostki patomorfologicznej.

Udowodniono, iż zmiany strukturalne, ściany naczyń zarówno w AAA, jak i miażdżycy tętnic (AA) można wywołać za pomocą różnych czynników uszkodzających. Ross i Glomset opracowali teorię tak zwanej jednolitej reakcji na uraz, według której uszkodzenie śródbłonna lub błony wewnętrznej przez czynnik mechaniczny, metaboliczny lub immunologiczny staje się początkiem patologicznej przebudowy ściany naczynia [1, 2].

Ostatnio pojawiły się doniesienia wskazujące na znaczenie zakażenia jako jednego z czynników w złożonej etiopatogenezie miażdżycy. Opisano patologiczną rolę wirusów, takich jak *Coxsackie C*, wirus opryszczki ludzkiej typu 1, 2 (HSV 1/2) oraz cytomegalowirus (CMV) [3–5]. Istnieje także możliwość wywołania doświadczalnej miażdżycy u kurcząt (choroba Mareka) wirusem należącym do ptasich wirusów z rodzaju *herpes* [1–2, 6]. Potwierdzeniem współistnienia zakażenia i miażdżycy tętnic u ludzi były dane z badań seroepidemiologicznych, wykazujące na wzrost miana przeciwciał (klasy IgM i/lub IgG) z jednoczesnym potwierdzeniem obecności swoistych antygenów i DNA tych drobnoustrojów w chorych tętnicach [3, 7].

Wyniki współczesnych badań dotyczących powstania tętniaków w przebiegu zmian zapalnych nie były tak jednoznaczne jak w przypadku miażdżycy i spowodowały, że podjęto dalsze doświadczenia nad znaczeniem zakażeń wirusowych w ich patologii. W piśmiennictwie znajdują się dane, które wskazują na zakażenie ściany tętniaka wirusami CMV i HSV [1, 4, 8]. Wymie-

sms, causing subclinical, chronic or recurrent infections, may have a long-lasting, damaging influence on the aortic wall. [9].

However, the data regarding aortic wall infection concerns different types of aneurysms. In Tanaka and Yonemitsu's studies concerning aortic wall infection with CMV and HSV 1/2, tissues taken only from inflammatory aneurysms were used as research material [4, 8].

There is not much research on this issue, especially in Polish literature; therefore, this topic requires further studies due to the prevalence of abdominal aortic aneurysms in our country [10].

The leading motive of this study was to extend the knowledge of abdominal aortic aneurysm pathogenesis — paying particular attention to the inflammatory factor. The study was carried out to answer the following questions:

1. Can the presence of viruses be a factor that causes abdominal aortic aneurysm formation?
2. Does the division of aneurysms into two groups (non-specific and inflammatory) have a clinical nature, or does it result from their different aetiology?

In order to determine the significance of infection in the course of aneurysm development, the coexistence of other viruses (apart from CMV and HPV) in the AAA wall was examined. Papilloma's viruses — *human papilloma virus type 6, 11* (HPV 6/11) were chosen for the evaluation. They cause changes in the form of larynx papillomatosis in the respiratory system and may have some connection with vascular diseases [11–13].

Material and methods

The material used in the study on the presence of DNA sequence of HPV 6/11, HSV 1/2 and CMV were specimens of abdominal aortic wall, taken from below the renal arteries, which were aneurysmatically changed or which had extensive atherosclerotic changes, that caused closure of the aortic lumen or its haemodynamically significant stenosis. The specimens were taken from 34 patients operated on at the PUMS Department of General and Vascular Surgery in Poznań due to abdominal aortic aneurysm (AAA) and from 30 patients who were given a bifurcated aortic-double-thigh prosthesis due to extensive atherosclerosis of the final aortic section and iliac arteries. The control material consisted of the abdominal aortas taken from 20 transplant organ donors.

The group of 34 people with AAA consisted of 23 men and 11 women. The age of the patients was between 54 and 83, with an average of 65.0 ± 7.9 years. In this group, 28 patients (82.4%) were diagnosed with non-specific aneurysms, and 6 patients (17.6%) were diagnosed with inflammatory aneurysms (confirmed by routine

nione drobnoustroje, wywołując subkliniczne, przewlekłe lub nawracające zakażenia, mogą wywierać długotrwały uszkadzający wpływ na ścianę aorty [9].

Dane o istnieniu zakażenia ściany aorty obejmowały jednak różne rodzaje tętniaków. W pracach Tanaki i Yonemitsu dotyczących zakażenia ściany aorty wirusami CMV i HSV materiałem badawczym były tkanki pobrane tylko z tętniaków zapalnych [4, 8].

Zwłaszcza w polskim piśmiennictwie istnieje niewiele badań omawiających to zagadnienie, co przy powszechnym występowaniu AAA wymagało podjęcia tego tematu [10].

Najważniejszym celem przeprowadzenia badań było pogłębienie wiedzy o patogenezie AAA ze szczególnym uwzględnieniem czynnika zapalnego. Celem przeprowadzonych badań było ustalenie:

1. Czy obecność wirusów może być czynnikiem wywołującym powstanie AAA?
2. Czy podział tętniaków na tętniaki niespecyficzne i zapalne ma charakter kliniczny czy też wynika z ich różnej etiologii?

Aby określić znaczenie zakażenia w rozwoju tętniaków, badano współistnienie w ścianie AAA jeszcze innych, oprócz CMV i HSV, rodzajów wirusów. Do oceny wybrano wirusy brodawczaka ludzkiego typu 6, 11 (HPV 6/11), powodującego w układzie oddechowym zmiany w postaci brodawczakowatości krtani i być może mającego związek z chorobami naczyń [11–13].

Material i metody

Materiałem do badań na obecność sekwencji DNA HPV 6/11, HSV 1/2 i CMV były wycinki ściany aort brzusznych, pobrane poniżej tętnic nerkowych, ze zmianami tętniakowymi lub z rozległymi zmianami miażdżycowymi, które spowodowały zamknięcie światła aorty lub jej hemodynamicznie istotne zwężenie. Wycinki pochodziły od 34 chorych operowanych w Klinice Chirurgii Ogólnej i Naczyń Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu z powodu AAA i od 30 chorych, którym wszyci protezę rozwidloną aortalno-dwuodową z powodu rozległej miażdżycy końcowego odcinka aorty i tętnic biodrowych (AA). Próbę kontrolną stanowiły aorty brzuszne pobrane od 20 dawców narządów do transplantacji.

W grupie 34 osób z AAA było 23 mężczyzn i 11 kobiet. Wiek chorych wynosił 54–83 lat (śr. $65,0 \pm 7,9$ roku). W grupie tej u 28 chorych (82,4%) stwierdzono tętniaki niespecyficzne i u 6 osób (17,6%) tętniaki zapalne (potwierdzone w rutynowych badaniach histopatologicznych). Wszystkich pacjentów operowano w trybie planowym i u żadnego badanego śródoperacyjnie nie stwierdzono objawów pęknięcia. Średnica operowanych tętniaków wynosiła 5–10 cm (śr. $6,95 \pm 1,4$).

histopathological examination). All patients were operated on according to schedule, and none of them was noted with burst symptoms during the operation. The diameters of the operated aneurysms were between 5 and 10 cm, with an average of 6.95 ± 1.4 cm. Among these patients there were: 29 patients (85.3%) who smoked, 19 patients (55.9%) who were diagnosed with arterial hypertension and 20 patients (58.8%) who had symptoms of heart muscle ischaemic disease. Five patients (14.7%) had had an earlier operation of coronary artery bypass grafting. Twelve patients (35.3%) were diagnosed with extensive atherosclerotic changes in bifurcations of the iliac arteries, four of them (11.8%) were diagnosed with diabetes and seven patients (20.6%) with AAA had cholesterol levels above 5.7 mmol/l.

In the group of 30 patients with artery atherosclerosis (AA) there were 21 men and 9 women aged from 41 to 72 with an average age of 55.2 ± 7.3 years. All patients from this group were operated on according to schedule, and none of them was diagnosed with aneurysmatic widening of the aorta (i.e. more than 30 mm) during operation. In this group, 76.7% of patients were smokers, 53.3% were diagnosed with arterial hypertension, 46.7% had symptoms of heart muscle ischaemic disease and 13.3% were earlier operated with coronary artery bypass grafting. 26.7% of operated patients had diabetes and 30.0% of patients had increased cholesterol levels (more than 5.7 mmol/l).

The patients with arterial hypertension were in the course of hypotensive therapy and had normalized pressure (according to ISH/WHO, RR < 140/90 mm Hg). The morning glycaemia level (and in some cases twenty-four-hour profile of glycaemia) of patients with diabetes indicated that diabetes was at the stage of compensation.

The age of the people in the control group ranged from 26 to 41, with an average of 34.3 ± 5.8 years. In this group, there were no detailed epidemiological data apart from sex and age. The only criteria set for these people to include them in the control studies was the fact that they were healthy and that their organs were qualified for transplantation. A surgeon assessed their aortic diameter and its macroscopic image while taking tissues. Only aortas with a diameter up to 30 mm and without macroscopic symptoms of atherosclerosis were qualified for the studies. The data regarding smoking among this group of patients were not obtained.

Identification of DNA sequence of HPV 6/11, HSV 1/2 and CMV in clinical material by PCR method

The positive controls in DNA tests done by polymerase chain relation (PCR) method were:

Wśród tych chorych 29 osób (85,3%) paliło tytoń, u 19 (55,9%) rozpoznawano nadciśnienie tętnicze i u 20 (58,8%) pacjentów stwierdzono objawy choroby niedokrwiennej serca. U 5 chorych (14,7%) wcześniej wykonano operację pomostowania tętnic wieńcowych. Rozległe zmiany miażdżycowe, zwłaszcza w rozwidleniach tętnic biodrowych stwierdzono u 12 chorych (35,3%), cukrzycę u 4 (11,8%), natomiast stężenie cholesterolu powyżej 5,7 mmol/l odnotowano u 7 osób (20,6%) z AAA.

W grupie 30 osób z AA było 21 mężczyzn i 9 kobiet, wiek chorych wynosił 41–72 lat (śr. $55,2 \pm 7,3$ roku). Wszystkich chorych z tej grupy operowano w trybie planowym i u żadnego badanego śródoperacyjnie nie stwierdzono tętniakowatego poszerzenia aorty (tj. > 30 mm). Wśród tych pacjentów 76,7% osób paliło tytoń, u 53,3% rozpoznano nadciśnienie tętnicze, u 46,7% chorych odnotowano objawy choroby niedokrwiennej serca, a u 13,3% osób wcześniej wykonano operację pomostowania tętnic wieńcowych. Cukrzycę rozpoznano u 26,7% operowanych, natomiast podwyższone stężenie cholesterolu (> 5,7 mmol/l) u 30,0% osób.

Chorzy z nadciśnieniem tętniczym byli w trakcie terapii hipotensyjnej i wartości ciśnienia były u nich prawidłowe (wg ISH/WHO, RR < 140/90 mm Hg). U chorych na cukrzycę poranne wartości glikemii, a w niektórych przypadkach profil dobowy glikemii wskazywały, że cukrzyca była w stadium kompensacji.

Wiek chorych w grupie kontrolnej wynosił 26–41 lat (śr. $34,3 \pm 5,8$ roku). W tej grupie oprócz płci i wieku nie było szczegółowych danych epidemiologicznych. Jedynym kryterium włączenia tych osób do badań kontrolnych było uznanie ich za zdrowe, a ich narządy za nadające się do przeszczepów. W tej grupie podczas pobierania tkanek chirurg ocenił średnicę aorty i jej obraz makroskopowy. Do badań kwalifikowano tylko aorty o średnicy do 30 mm, bez makroskopowych objawów miażdżycy. Nie udało się uzyskać informacji na temat palenia tytoniu w tej grupie badanych.

Identyfikacja sekwencji DNA HPV 6/11, HSV 1/2 i CMV w materiale klinicznym metodą PCR

Kontrolę pozytywną w badaniach DNA za pomocą metody reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) stanowiły:

- DNA izolowane z krwi osoby zdrowej, w którym identyfikowano sekwens kodujący *c-fos*;
- dla CMV — DNA izolowane z tkanki pobranej od dzieci zmarłych z powodu zakażenia CMV;
- dla HSV 1/2 — DNA izolowane z materiału klinicznego zakażonego wirusem opryszczki;
- dla HPV 6/11 — DNA izolowane z brodawczaka krtani.

- DNA isolated from the blood of a healthy person, which was identified with *c-fos* coding sequence;
- for CMV — DNA isolated from tissues taken from children who died of CMV infection;
- for HSV 1/2 — DNA isolated from clinical material infected with the herpes virus;
- for HPV 6/11 — DNA isolated from laryngeal papilloma.

In patients with AAA, samples for PCR tests were taken from the frontal surface of the aneurismal sac at the point of its greatest diameter. For people with artery atherosclerosis and people from the control group, tissues were also taken from the frontal surface of the aorta below the renal arteries. Originally, the material covered the full thickness of the aorta. Then, observing the rules of asepsis, the fragments of resected tissue were delaminated and the muscular coat and adventitia were left out for further tests. They were then placed in liquid nitrogen and stored in a freezer at -80°C until further tests were carried out.

The operatively obtained tissues were cut into smaller fragments and were poured with 1 ml of buffer for DNA isolation, which contained K proteinase at 50 mg/ml concentration. After the full procedure was carried out, the DNA was isolated defining its amount and cleanliness through 1% agar gel electrophoresis and measuring spectrophotometrically on a BECKMANN DU 7500 spectrophotometer by Wartburg-Christian method by test absorbance measurement at a wavelength of 260 nm. DNA prepared in such a way was a matrix in PCR.

Electrophoretic separation of DNA isolated from tissues was done in 1% agar gel that contained 0.5% $\mu\text{g/ml}$ ethidium bromide, in $1 \times \text{TAE}$ buffer at a voltage of 4 V/cm for 1 hour. The products received by duplication reaction of PCR method were analyzed in 2% agar gel that contained 0.5% $\mu\text{g/ml}$ ethidium bromide, in $1 \times \text{TAE}$ buffer at a voltage of 4 V/cm for 1 hour.

In order to identify viral DNA in the DNA isolated from aortic walls, PCR with starters specific for DNA of the HPV 6 and HPV 11 viruses was conducted. The matrix cleanliness level of the entire human DNA isolated from the aortic walls was checked using starters for the *c-fos* genes: FOS4-1 and FOS4-2. The DNA was exposed to preliminary denaturation for 5 minutes at 94°C , and then 31 duplication cycles were carried out. After duplication, the PCR products were analyzed, dividing them in 2% agar gel with the presence of a DNA fragment size marker, which was pUC19 DNA digested with MspI enzyme (Hpall, Fermantes, Lithuania).

In order to identify DNA of the HSV in the DNA isolated from aortic walls, PCR with starters specific for DNA of HSV 1 and HSV 2 was conducted. The matrix

Próbki do badań PCR u chorych z AAA pobierano z przedniej powierzchni worka tętniaka w miejscu jego największej średnicy. U osób z AA oraz u osób z grupy kontrolnej tkanki pobierano również z przedniej powierzchni aorty poniżej tętnic nerkowych. Pierwotnie materiał obejmował pełną grubość aorty. Następnie, zachowując zasady aseptyki, fragmenty wyciętej tkanki rozwarstwiano i do badań pozostawiano mięśniówkę i przydanekę. Umieszczano je w płynnym azocie i przechowywano w zamrażarce w temperaturze -80°C do momentu przeprowadzenia dalszych doświadczeń.

Pobrane operacyjnie tkanki pocięto na mniejsze fragmenty i zalano 1 ml buforu do izolacji DNA, zawierającego proteinazę K w stężeniu 50 mg/ml. Po przeprowadzeniu pełnej procedury wyizolowano DNA, określając jego ilość i czystość, stosując elektroforezę w 1-procentowym żelu agarozowym, oraz mierzono spektrofotometrycznie na spektrofotometrze BECKMANN DU 7500 metodą Wartburga-Christian za pomocą pomiaru absorbancji próby przy długości fali 260 nm. Tak przygotowany DNA stanowił matrycę w PCR.

Rozdział elektroforetyczny DNA wyizolowanego z tkanek przeprowadzano w 1-procentowym żelu agarozowym zawierającym bromek etydyny w stężeniu 0,5% $\mu\text{g/ml}$, w buforze $1 \times \text{TAE}$ przy napięciu 4 V/cm przez godzinę. Produkty otrzymane w reakcji powielania metodą PCR analizowano w 2-procentowym żelu agarozowym zawierającym bromek etydyny w stężeniu 0,5% $\mu\text{g/ml}$, w buforze $1 \times \text{TAE}$ przy napięciu 4 V/cm przez godzinę.

W celu identyfikacji wirusowego DNA w DNA izolowanym ze ścian aort przeprowadzano PCR ze starterami specyficznymi dla DNA wirusa HPV 6 i HPV 11. Stopień czystości matrycy całkowitego DNA ludzkiego izolowanego ze ścian aort sprawdzano, stosując startery dla genu *c-fos*: FOS4-1 i FOS4-2. DNA podawano wstępnej denaturacji przez 5 minut w temperaturze 94°C , a następnie wykonywano 31 cykli powielania. Po zakończeniu powielania produkty PCR analizowano, rozdzielając je w 2-procentowym żelu agarozowym w obecności markera wielkości fragmentów DNA, który stanowił DNA pUC19 trawiony enzymem MspI (Hpall, Fermantes, Litwa).

W celu identyfikacji DNA wirusa *herpes simplex* w DNA izolowanym ze ścian aort przeprowadzano PCR ze starterami specyficznymi dla DNA HSV 1 i HSV 2. Stopień czystości matrycy całkowitego DNA ludzkiego izolowanego ze ścian aort sprawdzano, stosując startery dla genu *c-fos*: FOS4-1 i FOS4-2. Próbki DNA podawano wstępnej denaturacji przez 5 minut w temperaturze 94°C , a następnie wykonywano 30 cykli amplifikacji. Po reakcji produkty PCR analizowano, rozdziela-

cleanliness level of the entire human DNA isolated from the aortic walls was checked using starters for the *c-fos* genes: FOS4-1 and FOS4-2. DNA samples were denatured for 5 minutes at 94°C, and then 30 amplification cycles were carried out. After reaction, the PCR products were analyzed, dividing them in 2% agar gel with the presence of a DNA size marker, which was bBluescript DNA digested with Avall/Hinfl enzyme (Ark Scientific, Germany).

In order to identify DNA of CMV in the DNA isolated from aortic walls, PCR with starters specific for DNA of CMV CMVIE-1 and CMVIE-2 was conducted. The matrix cleanliness level of the entire human DNA isolated from the aortic walls was checked using starters for the *c-fos* genes: FOS4-1 and FOS4-2 (Ark Scientific, Germany). The samples were denatured for 5 minutes at 94°C and then 50 amplification cycles were carried out. After reaction, the PCR products were analyzed, dividing them in 2% agar gel with the presence of a DNA size marker, which was pUC19 DNA digested with MspI enzyme (HpaII, Fermantes, Lithuania).

The studies were approved by the Poznan University of Medical Sciences Ethical Commission for Scientific Research.

The patients' data were statistically analyzed by counting the arithmetical mean (\bar{X}) and standard deviation (SD) for variables that did not deviate from normal distribution. At the same time, these data were exposed to variance analysis in single classification; Scheffe's test for multiple comparisons was also used [14]. Due to the lack of symmetry of the results obtained in identification studies of DNA of viruses, it was the median and average deviation that were used as measurements of position and dispersion.

The relevance of median differences for variables that are not connected was measured by a non-parametric Mann-Whitney test.

Statistical calculations were done using a STATISTICA statistics package. Statistically significant values were $p < 0.05$.

Results

The three groups of patients that were analyzed were statistically significantly different only when it came to the issue of age.

The presence of DNA of HPV 6/11 was found in 34 specimens (100%) taken from the aneurysmatic wall (Figure 1). At the same time, the DNA of this virus was found in 14 specimens (46.7%) taken from atherosclerotically changed aortas (Figure 2) and in 17 specimens (85%) of control aortas (Table 1), ($p < 0.00001$). In the test of DNA of HPV 6/11 there

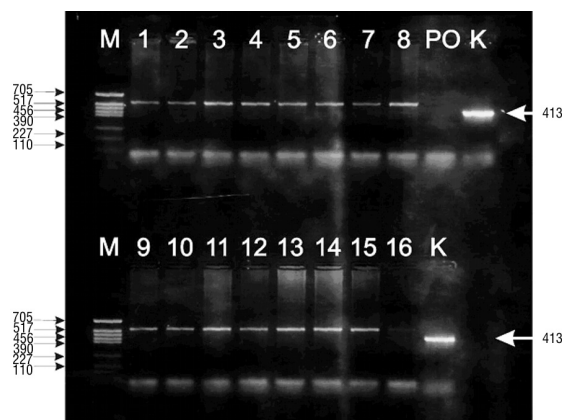


Figure 1. The division of DNA amplification products received in PCR reaction using HPV 11/6a, HPV 11/6b starters in DNA isolated from abdominal aortic aneurysm walls. DNA weight M — marker (pBluescript Avall/Hinfl), tracks 1–15 — positive result of DNA in PCR reaction in the presence of HPV 11/6 DNA sequence in DNA isolated from abdominal aortic aneurysm walls; PO — reagent test; K+ — positive control — DNA isolated from laryngeal papillomas

Rycina 1. Rozdział produktów amplifikacji DNA otrzymanych w reakcji PCR z zastosowaniem starterów HPV 11/6a, HPV 11/6b w DNA izolowanym ze ścian tętniaków aorty brzusznej (AAA). M — marker masy DNA (pBluescript Avall/Hinfl); ścieżki 1–15 — wynik pozytywny DNA w reakcji PCR na obecność sekwencji DNA HPV 11/6 w DNA izolowanym ze ścian tętniaków aorty brzusznej; PO — próba odczynnikowa; K+ — kontrolna pozytywna — DNA izolowane z brodawczaków krtani

jąc je w 2-procentowym żelu agarowym w obecności markera wielkości DNA, który stanowił DNA pBluescript trawiony enzymem Avall/Hinfl (Ark Scientific, Niemcy).

W celu identyfikacji DNA CMV w DNA izolowanym ze ścian aort przeprowadzono PCR ze starterami specyficznymi dla DNA CMV CMVIE-1 i CMVIE-2. Stopień czystości matrycy całkowitego DNA ludzkiego izolowanego ze ścian aort sprawdzano, używając starterów dla genu *c-fos*: FOS4-1 i FOS4-2 (Ark Scientific, Niemcy). Próbkę podawano wstępnej denaturacji przez 5 minut w temperaturze 94°C, a następnie wykonywano 50 cykli amplifikacji. Po zakończeniu reakcji produkty PCR analizowano, rozdzielając je w 2-procentowym żelu agarowym w obecności markera wielkości DNA, który stanowił DNA pUC19 trawiony enzymem MspI (HpaII, Fermantes, Litwa).

Badania zatwierdziła Komisja Etyczna ds. Badań Naukowych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Dane charakteryzujące chorych poddano analizie statystycznej, obliczając dla zmiennych nieodbiegających od rozkładu normalnego średnią arytmetyczną (\bar{X}) oraz odchylenie standardowe (SD). Jednocześnie dane te

were some products that were slightly larger than the standard ones, which may suggest mutations.

DNA of HSV 1/2 was found only in one case, in tissue taken from a control aorta (Table I).

However, DNA typical for CMV (Table I) was not found in any of the tested groups.

Table II presents the results of HPV 6/11 DNA tests in material taken from the walls of abdominal aortic aneurysms (non-specific and inflammatory). There is no proof for any dependence between the clinical nature of the aneurysm and the presence of HPV 6/11 DNA in the tested material.

Discussion

The reason for undertaking research on the role of bacteria and viruses in the pathology of abdominal aortic aneurysms was the fact that there are still doubts regarding the original reasons for inflammatory infiltration formation in aneurysms. In the literature one can come across opinions that this factor may be due to CMV and HSV 1/2 [1, 3, 4, 9].

On the one hand, we have to accept the direct influence of infection on AAA formation. The confirmation of these kinds of changes are ascending aorta aneurysms caused by *Treponema pallidum* infection, as well as incidence of infectious aneurysms, so-called mycotic aneurysms that originate from different bacteria activity [15, 16]. The pathogenesis of these kinds of aneurysms may be explained by the presence of the following four mechanisms:

- impairment of aortic wall perfusion caused by septic microembolisms to *vasa vasorum*;
- spread of infection through continuity;
- aortic wall infection through the circulatory system with the coexistence of bacteraemia;

Table I. Human papilloma virus type 6 and 11 (HPV 6/11), herpes simplex virus type 1 and 2 (HSV 1/2), cytomegalovirus (CMV) DNA sequence identification in material taken from abdominal aortic aneurysm walls, atherosclerotically changed aortas and healthy aortas, using PCR (* $p < 0.0001$)

Tabela I. Identyfikacja sekwencji DNA wirusa brodawczaka ludzkiego typu 6 i 11 (HPV 6/11), wirusa opryszczki pospolitej typu 1 i 2 (HSV 1/2) i cytomegalowirusa (CMV) w materiale pochodzącym ze ścian tętniaków aorty brzusznej, aort zmienionych miażdżycowo i aort zdrowych metoda PCR (* $p < 0,0001$)

	DNA HPV 6/11	DNA HSV 1/2	DNA CMV
AAA (n = 34)	34* (100%)	0	0
AA (n = 30)	14* (46.7%)	0	0
Control group Grupa kontrolna (n = 20)	17* (85.0%)	1 (5%)	

AAA — abdominal aortic aneurysm (tętniak aorty brzusznej); AA — artery atherosclerosis (miażdżycza aorty); PCR — polymerase chain reaction (reakcja łańcuchowa polimerazy)

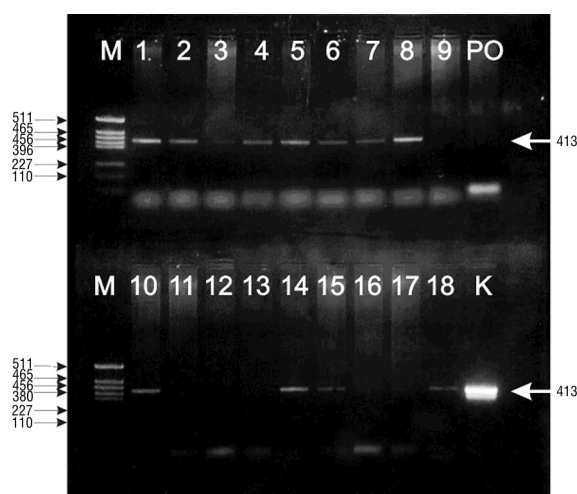


Figure 2. The division of DNA amplification products received in PCR reaction using HPV11/6a, HPV11/6b starters in DNA isolated from atherosclerotically changed aortic walls. DNA weight M — marker (pBluescript Avall/Hinfl); tracks 1, 2, 4–8, 10, 14–15, 18 — positive result of DNA in PCR reaction in the presence of HPV11/6 virus DNA sequence in DNA isolated from atherosclerotically changed aortic walls; tracks 3, 9, 11–13, 16–17 — negative result of DNA in PCR reaction in the presence of HPV 11/6 virus DNA sequence in DNA isolated from atherosclerotically changed aortic walls; PO — reagent test; K+ — positive control — DNA isolated from laryngeal papillomas

Rycina 2. Rozdział produktów amplifikacji DNA otrzymanych w reakcji PCR z zastosowaniem starterów HPV 11/6a, HPV 11/6b, w DNA izolowanym ze ścian aort zmienionych miażdżycowo. M — marker masy DNA (pBluescript Avall/Hinfl); ścieżki 1, 2, 4–8, 10, 14–15, 18 — wynik pozytywny DNA w reakcji PCR na obecność sekwencji DNA wirusa HPV 11/6 w DNA izolowanym ze ścian aort zmienionych miażdżycowo; ścieżki 3, 9, 11–13, 16–17 — wynik negatywny DNA w reakcji PCR na obecność sekwencji DNA wirusa HPV 11/6 w DNA izolowanym ze ścian aort zmienionych miażdżycowo; PO — próba odczynnikowa; K+ — kontrolna pozytywna — DNA izolowane z brodawczaków krtani

Table II. Human papilloma virus type 6 and 11 (HPV 6/11) DNA sequence identification in material taken from abdominal aortic aneurysm (AAA) walls (non-specific and inflammatory) by PCR method (p — NS)

Tabela II. Identyfikacja sekwencji DNA wirusa brodawczaka ludzkiego typu 6 i 11 (HPV 6/11), w materiale pochodzącym ze ścian tętniaków aorty brzusznej (AAA), niespecyficznych i zapalnych metodą PCR (p — NS)

AAA	HPV 6/11
Non-specific Niespecyficzne (n = 28)	28 (100%)
Inflammatory Zapalne (n = 6)	6 (100%)

— consequence of trauma with simultaneous local contamination of the aortic wall.

This kind of aortic aneurysm formation is, however, uncommon, but it indicates the possibility of the direct influence of infection on the impairment of vessel wall integrity.

In the formation of aneurysms, one can take into account autoimmunological reactions [17–19]. Research aimed at determining presumed autoantibodies revealed the existence of a sequence of amino acids homologous to 36 kDa glycoprotein originating from bovine aortic micro-fibrils (MAGP-36). They belong to the extracellular aortic structure and react with IgG originating from the aortic wall [20, 21]. This autoantibody described by Tilson et al. is homologous (similar) to the micro-organism protein connected with the existence of aneurysms in humans, caused by *Treponema pallidum*, HSV and CMV [22]. This phenomenon is called mimicry, which means molecular similarity.

Incidence of molecular mimicry allows the assumption that there are common epitopes for micro-organism proteins and aortic matrix proteins. In other words, immunological response against micro-organism infection may at the same time lead to protein destruction of the aortic matrix of the aorta.

It seems that the above mechanism may explain DePalma's observations describing ruptures of aneurysms in a colony of Capuchin monkeys which were experimentally infected by HSV many years ago [23].

In our own trials, we were unable to provide evidence for the presence of DNA of CMV and HSV 1/2 in the aneurysmatic wall. This result is different from the data obtained by other authors [4, 8, 24–27]. In Yonemitsu and Tanaka's research, the presence of DNA of these viruses was confirmed in aneurysmatically changed aortic walls, but only those that were recognized as

poddano analizie wariancji w klasyfikacji pojedynczej i zastosowano test wielokrotnych porównań Scheffego [14]. Z powodu braku symetrii wyników uzyskanych w badaniach identyfikacji DNA wirusów jako miarę położenia i dyspersji wykorzystano medianę i odchylenie przeciętne.

Istotność różnic median dla zmiennych niepołączonych oceniano za pomocą nieparametrycznego testu Manna-Whitneya.

Obliczenia statystyczne wykonano za pomocą pakietu statystycznego STATISTICA. Jako istotne statystycznie przyjęto wartości $p < 0,05$.

Wyniki

Analizowane trzy grupy chorych różniły się znamienne statystycznie tylko pod względem wieku.

Obecność DNA HPV 6/11 stwierdzono w 34 wycinkach (100%) pobranych ze ściany tętniaków (ryc. 1). Równocześnie DNA tego wirusa wykazano w 14 wycinkach (46,7%) pochodzących z aort zmienionych miażdżycowo (ryc. 2) i 17 wycinkach (85%) aort kontrolnych (tab. I) ($p < 0,00001$). W badaniu DNA HPV 6/11 pojawiły się produkty nieznacznie większe od normy, co może sugerować istnienie postaci zmutowanej.

DNA HSV 1/2 stwierdzono tylko w jednym przypadku w tkance pobranej z aorty kontrolnej (tab. I).

Natomiast w żadnej badanej grupie aort nie wykryto DNA charakterystycznego dla CMV (tab. I).

Wyniki badań DNA HPV 6/11 w materiale pochodzącym ze ścian AAA niespecyficznych i zapalnych przedstawiono w tabeli II. W badanym materiale nie wykazano zależności pomiędzy charakterem klinicznym tętniaka a obecnością DNA HPV 6/11.

Dyskusja

Przyczyną podjęcia badań nad udziałem bakterii i wirusów w patologii tętniaków odcinka brzusznej aorty był fakt, że nadal istnieją wątpliwości dotyczące pierwotnych przyczyn powstania nacieku zapalnego występującego w tętniakach. W piśmiennictwie pojawiają się opinie, że czynnikiem tym mogą być wirusy CMV i HSV 1/2 [1, 3, 4, 9].

Z jednej strony należy przyjąć bezpośredni wpływ zakażenia na powstanie AAA. Potwierdzeniem tego rodzaju zmian jest tętniak aorty wstępującej wywołany zakażeniem *Treponema pallidum*, jak również występowanie tętniaków zakaźnych, tak zwanych tętniaków mykocytycznych powstałych w wyniku działania różnych bakterii [15, 16]. Patogenezę tego typu tętniaków można wyjaśnić istnieniem następujących czterech mechanizmów: — upośledzeniem ukrwienia ściany aorty wywołanym przez septyczne mikrozatory do *vasa vasorum*;

inflammatory. Their presence in tested specimens amounted to 71% [4].

There is a suspicion that aneurysm formation with the participation of CMV and HSV depends on the activation of plasminogen activator by those viruses [28]. Plasmin (obtained in this reaction) affects the activation of transforming factor β (TGF β) [29]. This factor is responsible for processes of fibrillation, activation and escalation of inflammatory processes in the aortic wall and activation of matrix metalloprotease [30–35].

Our own research also indicated that in all groups the percentage of confirmed DNA of HPV was high. The presence of DNA of HPV 6/11 was confirmed in all (100%) tissues taken from aortic walls, in 46.7% of specimens taken from atherosclerotically changed aortas, and in 85% of specimens taken from control aorta tissues.

Conclusions

The results suggest that the presence of the virus is not a causative factor of abdominal aortic aneurysm formation. We can assume that the presence of the virus in the aortic wall is accidental after overcoming, very often asymptotically, HPV 6/11 infection. However, it is possible that the presence of these viruses (even in latent form) leads to aortic wall weakness. In the case of secondary infection of other micro-organisms, such as *C. pneumoniae*, there is a possibility of increased inflammatory process activation and abdominal aortic aneurysm formation.

References

- Ross R (1999) Atherosclerosis — an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 340: 115–126.
- Ross R, Glomset J, Harker L (1977) Response to injury and atherogenesis. *Am J Pathol*, 86: 675–684.
- Visser MR, Vercellotti GM (1993) Herpes simplex virus and atherosclerosis. *Eur Heart J*, 14 (Suppl K): 39–42.
- Tanaka S, Komori K, Okedome K, Sugimachi K, Mori R (1994) Detection of active cytomegalovirus infection in inflammatory aortic aneurysms with RNA polymerase chain reaction. *J Vasc Surg*, 20: 235–243.
- Nikoskelainen J, Kalliomäki JL, Lapinleimu K, Stevnik M, Halonen PE (1983) Coxsackie B virus antibodies in myocardial infarction. *Acta Med Scand*, 214: 29–32.
- Benditt EP, Barrett T, McDougall JK (1983) Viruses in the etiology of atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80: 6386–6389.
- Kuo CC, Gown AM, Benditt EP, Grayston JT (1993) Detection of Chlamydia pneumoniae in aortic lesions of atherosclerosis by immunocytochemical stain. *Arterioscler Thromb*, 13: 1501–1504.
- Yonemitsu Y, Nakagawa K, Tanaka S, Mori R, Sugimachi K, Sueishi K (1996) In situ detection of frequent and active infection of human cytomegalovirus in inflammatory

- rozprzestrzenianiem się zakażenia przez ciągłość;
- zakażeniem ściany aorty drogą krwionośną podczas współistnienia bakteriemii;
- wskutek urazu z jednoczesnym miejscowym skażeniem ściany aorty — ten sposób tworzenia się tętniaków aorty jest co prawda rzadki, jednak wskazuje na możliwość bezpośredniego wpływu zakażenia na upośledzenie integralności ściany naczynia.

W powstaniu tętniaków można również brać pod uwagę istnienie reakcji autoimmunologicznych [17–19]. W badaniach, których celem było określenie domnianego autoprzeciwciała ujawniono istnienie sekwencji aminokwasów homologicznych do glikoproteiny o wadze 36 kDa, pochodzącej z wołowych aortalnych mikrowłókien (36 kDa — MAGP-36). Należą one do pozakomórkowej struktury aorty i reagują z IgG pochodzącą ze ściany aorty [20, 21]. To autoprzeciwciało opisane przez Tilsona i wsp. posiada homologię (podobieństwo) z białkiem mikroorganizmów związanych z istnieniem tętniaków u ludzi, wywołanych przez *Treponema pallidum*, HSV i CMV [22]. Zjawisko to nazwa się mimikrą, czyli molekularnym podobieństwem.

Występowanie molekularnej mimikry pozwala przypuszczać, że istnieją wspólne epitopy dla białek mikroorganizmów i białek aortalnych macierzy. Innymi słowy immunologiczna odpowiedź przeciwko zakażeniu mikroorganizmami może jednocześnie prowadzić do niszczenia w aorcie białek aortalnej macierzy.

Wydaje się, że powyższy mechanizm działania może tłumaczyć obserwacje DePalmy, który opisał pęknięcia tętniaków w kolonii małp kapucynek, które wiele lat wcześniej w celach doświadczalnych zakażono wirusem HSV [23].

W doświadczeniach własnych nie udało się wykazać w ścianie tętniaków obecności DNA wirusów z gatunku CMV i HSV 1/2. Wynik ten różni się od danych uzyskanych przez innych autorów [4, 8, 24–27]. W pracach Yonemitsu i Tanaki potwierdzono obecność DNA tych wirusów w ścianie aort ze zmianami tętniakowymi, ale tylko tych, które uznano jako zapalne. Odsetek obecności w badanych wycinkach wynosił 71% [4].

Podjezwia się, że powstanie tętniaków przy udziale CMV i HSV polega na aktywowaniu przez te wirusy aktywatora plazminogenu [28]. Powstała w tej reakcji plazmina wpływa na aktywację transformującego czynnika β (TGF β) [29]. Czynniki ten jest odpowiedzialny za procesy włóknienia, aktywacji i nasilania procesów zapalnych w ścianie aorty oraz aktywacji metaloproteaz macierzy [30–35].

W badaniach własnych wykazano również, że we wszystkich grupach odsetek stwierdzanego DNA wirusa HPV był duży. Obecność DNA *Human papilloma virus*

- abdominal aortic aneurysms: possible pathogenic role in sustained chronic inflammatory reaction. *Lab Invest*, 74: 723–736.
9. Lindholt JS, Shi GP (2006) Chronic inflammation, immune response and infection in abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Surg*, 31: 453–463.
 10. Pupka A, Skóra J, Kałuża G (2004) The detection of *Chlamydia pneumoniae* in aneurysm of abdominal aorta and in normal aortic wall of organ donors. *Folia Mikrobiol*, 49: 79–82.
 11. Fife KH, Rogers RE, Zwicky BW (1987) Symptomatic and asymptomatic cervical infection with human papillomavirus. *J Infect Dis*, 156: 904–911.
 12. Galloway DA (1994) Human Papillomavirus vaccines: a warty problem. *Infect Agents Dis*, 3: 187–193.
 13. Schneider A (1990) Stellenwert morphologischer Verfahren für die HPV-Diagnostik. *Gynäkologie*, 23: 341–348.
 14. Mathews DE, Forewell V (1985) Using and understanding medical statistics. S Karger, Basel, München, Paris, London, New York, Tokyo, Sydney: 85.
 15. Ruhlmann C, Wittig K, Kokschi M, Müller J (1996) Aneurysm of the ascending aorta in tertiary syphilis. *Dtsch Med Wochenschr*, 121: 550–555.
 16. Brown SL, Busuttill RW, Baker JD, Machleder HI, Moore WS, Barker WF (1984) Bacteriologic and surgical determinants of survival in patients with mycotic aneurysms. *J Vasc Surg*, 1: 541–547.
 17. Koch AE, Haines GK, Rizzo RJ et al (1990) Human abdominal aortic aneurysm. Immunophenotypic analysis suggesting an immune-mediated response. *Am J Pathol*, 137: 1199–1213.
 18. Brophy CM, Reilly JM, Smith GJ, Tilson MD (1991) The role of inflammation nonspecific abdominal aortic aneurysm disease. *Ann Vasc Surg*, 5: 229–233.
 19. Gregory AK, Yin NX, Capella J, Xia S, Newman KM, Tilson MD (1996) Features of autoimmunity in the abdominal aortic aneurysm. *Arch Surg*, 131: 85–88.
 20. Tilson MD (1995) Similarities of an autoantigen in aneurysmal disease of the human abdominal aorta to a 36-kDa microfibril-associated bovine aortic glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun*, 213: 40–43.
 21. Kobayashi R, Mizutani A, Hidaka H (1994) Isolation and characterization of a 36-kDa microfibril-associated glycoprotein by the newly synthesized isoquinoline-sulfonamide affinity chromatography. *Biochem Biophys Res Commun*, 198: 1262–1266.
 22. Ozsvath KJ, Hirose H, Xia S, Tilson MD (1996) Molecular mimicry in human aortic aneurysmal diseases. *Ann NY Acad Sci*, 800: 288–293.
 23. De Palma RG (1990) The Cause and Management of Aneurysms. W.B. Saunders Company: 97–106.
 24. Satta J, Mosorin M, Pääkkö P, Juvonen T (1998) Regarding "Detection of active cytomegalovirus infection in inflammatory aortic aneurysms with RNA polymerase chain reaction". *J Vasc Surg*, 27: 587–588.
 25. Walker DI, Bloor K, Williams G, Gillie I (1972) Inflammatory aneurysms of the abdominal aorta. *Br J Surg*, 59: 609–614.
 26. Yonemitsu Y (1998) Viruses and vascular disease. *Nat Med*, 4: 253–254.
 27. Kondo K, Xu J, Mocarski E (1996) Human cytomegalovirus latent gene expression in granulocyte-macrophage progenitors in culture and in healthy seropositive individuals. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 11137–11142.
 28. Yamanishi K, Rapp F (1979) Production of plasminogen activator by human and hamster cells infected with human cytomegalovirus. *J Virol*, 31: 415–419.
 29. Lyons RM, Keski-Oja J, Moses HL (1988) Proteolytic activation of latent transforming growth factor- β from fibroblast-conditioned medium. *J Cell Biol*, 106: 1659–1665.
 30. Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK et al (1986). Transforming growth factor type β : rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83: 4167–4171.
 31. Wahl SM, Hunt DA, Wakefield LM et al (1987). Transformation growth factor type α induces chemotaxis and growth factor production. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84: 5788–5792.
 32. Fava R, Olsen N, Postlethwaite AE et al (1991) Transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) induced neutrophil recruitment to synovial tissues: Implication for TGF- β 1-driven synovial inflammation and hyperplasia. *J Exp Med*, 173: 1121–1132.
 33. Jean-Claude J, Newman KM, Li H, Gregory AK, Tilson MD (1994) Possible key role for plasmin in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms. *Surgery*, 116: 472–478.
 34. Lin PH, Bush RL, Yao Q et al (2004) Abdominal aortic surgery in patients with human immunodeficiency virus infection. *Am J Surgery*, 188: 690–697.
 35. Numano F (2000) Vasa vasorum, vasculitis and atherosclerosis. *Int J Cardiol*, 75 (suppl 1): S1–S8.

Wnioski

Wynik sugeruje, że obecność tego wirusa nie jest czynnikiem sprawczym powstania AAA. Można sądzić, że jest to przypadkowa obecność wirusa w ścianie aorty po przebytych, często bezobjawowym, zakażeniu wirusem HPV 6/11. Istnieje jednak możliwość, że obecność tych wirusów nawet w formie utajonej powoduje osłabienie ściany aorty. W przypadku wtórnego zakażenia innym drobnoustrojem, jak na przykład *C. pneumoniae*, może wystąpić wzmożona aktywacja procesów zapalnych i tworzenie się AAA.