

Intimal hyperplasia in vascular anastomosis

Zmiany przerostowe neointimy w zespoleniach naczyniowych

Jan Skóra, Piotr Barć, Dariusz Janczak, Krzysztof Korta, Artur Ruciński,
Stanisław Pawłowski, Artur Pupka, Grzegorz Kałuża, Piotr Szyber

Chair and Department of Vascular, General and Transplantation Surgery, Medical University of Wrocław
(Katedra i Klinika Chirurgii Naczyniowej, Ogólnej i Transplantacyjnej Akademii Medycznej we Wrocławiu)

Abstract

Background. The study was performed to examine the healing process of a vascular prosthesis implanted into the arterial system and the formation of neointima.

Materials and methods. The study was conducted on 16 dogs in which PTFE prostheses of 6 mm diameter had been implanted in the aortofemoral region. The animals underwent autopsy after 6 months. The prosthesis together with the aorta and the femoral artery was explanted in order to perform tests of the proximal and distal anastomosis area under the light and the transmission electron microscopes.

Results. It was confirmed that the inner membrane (intima) of the distal anastomosis was thicker. The results were highly statistically significant ($p = 0.000000002824$). Contrary to the proximal anastomosis, the area of the distal anastomosis revealed the presence of macrophages and granulocytes, being the markers of the active inflammatory reaction. Additionally, there were more myofibroblasts in this area and collagen deposits were bigger.

Conclusions. The differences between the proximal and distal anastomosis are the result of haemodynamic processes. Tangential stress, appearing parallel to the blood flow, is much more prominent in the distal anastomosis area as opposed to the shear stress, appearing perpendicular to the vessel. Therefore, neointimal thickening in the area of distal anastomosis is caused by haemodynamic factors and the biological incompatibility of the prosthesis and the artery (compliance mismatch). Prolonged stimulation of the inflammatory process causes the formation of neointima as well as the increased collagen production, hypertrophy and thickening of the inner membrane. All of these result in haemodynamic disturbances, the increase of the vascular resistance and the turbulent blood flow. They, in turn, may become the cause of clinical complications such as thrombosis of the prosthesis, late prosthesis infection and formation of the aneurysm in the area of anastomosis.

Key words: neointima, vascular anastomosis, vascular prosthesis, shear stress, tangential stress

Streszczenie

Wstęp. Celem pracy była próba lepszego poznania procesów wgajania się protezy naczyniowej w układ tętniczy i powstawania neointimy.

Materiał i metody. Badania prowadzono na 16 psach, którym wszczepiono protezę z PTFE w odcinku aortalno-udowym o średnicy 6 mm. Po upływie 6 miesięcy zwierzęta sekcjonowano, a protezę wraz z aortą i tętnicą udową pobierano i wykonywano badania okolicy zespolenia naczyniowego proksymalnego i dystalnego w mikroskopie świetlnym i transmisyjnym mikroskopie elektronowym.

Wyniki. Stwierdzano, że błona wewnętrzna zespolenia dystalnego była grubsza. Wyniki były wysoce znamienne statystycznie ($p = 0,000000002824$). W obrębie zespolenia dystalnego w porównaniu z proksymalnym stwierdzano makrofagi i granulocyty — wykazano cechy czynnej reakcji zapalnej. Liczniejsze były miofibroblasty i większe złogi kolagenu.

Address for correspondence (Adres do korespondencji):

Dr hab. med. Jan Skóra, Katedra i Klinika Chirurgii Naczyniowej, Ogólnej i Transplantacyjnej AM, ul. Poniatowskiego 2, 50–326 Wrocław, Poland
tel./faks: +48 (0 71) 322 32 12

Wnioski. Różnice w zespoleniu proksymalnym i dystalnym są wynikiem oddziaływań hemodynamicznych, bardziej nasilonych w zespoleniu dystalnym naprężeń stycznych (tangential stress), działających równolegle do prądu krwi wobec słabszych naprężeń stycznych (shear stress) działających prostopadle do naczynia. Przerost neointimy w obrębie zespolenia dystalnego jest więc spowodowany przez czynniki hemodynamiczne, biologiczną niezgodność protezy i tętnicy (compliance mismatch). Wydłużenie pobudzenia procesów zapalnych wywołuje powstanie neointimy, ale także wzmożoną produkcję kolagenu, przerost, pogrubienie błony wewnętrznej. Wywołuje to zaburzenia hemodynamiczne, wzrost oporu naczyniowego, turbulentny przepływ, co może powodować powikłania kliniczne — zakrzepicę protezy, infekcję protezy późną, tętniak zespolenia.

Słowa kluczowe: neointima, zespolenie naczyniowe, proteza naczyniowa, shear stress, tangential stress

Introduction

Despite the adequate surgical technique employed, many early attempts of blood vessel reconstruction were unsuccessful due to lack of the appropriate materials for production of the vascular prosthesis [1–3].

In 1952 Voorhees with Blakemore and Jaretzki published the preliminary report concerning the assessment of functioning of the artificial vascular graft implanted into the aorta in 30 dogs. Six months later Blakemore and Voorhees performed the pioneer operation of replacing the ruptured abdominal aortal aneurysm in man with the synthetic vascular graft. From then on, papers published by Blakemore and Voorhees became the source of inspiration for other researchers to perform experiments on employing various synthetic fibre materials in vascular surgery [3, 4].

In 1961 Wesolowski published the results of his study on the role of porosity in artificial vascular prostheses. In his paper he proved that the bigger porosity of the artificial prosthesis wall, the sooner it is infiltrated with connective tissue cells, which improves the healing process [5].

In the first stage of healing, the parietal thrombus is formed due to activation of the coagulation cascade and thrombocytes. The thrombus covers the internal surface of the vascular prosthesis [6, 7].

Then, with the activation of granulocytes, macrophages and myofibroblasts, the parietal thrombus undergoes reconstruction and the internal layer, called neointima, is formed. Neointima contains few cells and numerous collagen fibres, located in extracellular matrix [8, 9].

First studies on neointima in polyester prostheses were performed and reported by Florey in 1962 [10]. Then, thanks to the paper published by Clowes in 1985, analogous process in ePTFE prostheses was explained [11].

Neointima in artificial vascular grafts, despite its great morphological similarity, does not exert all the functions of the native vascular intima [12, 13].

Wstęp

Wiele wczesnych prób rekonstrukcji naczyń tętniczych, pomimo poprawnej techniki operacyjnej, było skazanych na niepowodzenie z powodu braku odpowiednich materiałów do protezowania dużych naczyń tętniczych [1–3].

W 1952 roku Voorhees, Blakemore i Jaretzki opublikowali wstępną ocenę funkcjonowania syntetycznej protezy naczyniowej wszczepionej w aortę u 30 psów. Następnie pół roku później Blakemore i Voorhees odważyli się jako pierwsi wszczepić syntetyczną protezę naczyniową choremu w miejsce pękniętego tętniaka aorty brzusznej. Publikacje Blakemore'a i Voorheesa zainspirowały innych badaczy do przeprowadzenia badań dotyczących wykorzystania materiałów z włókien syntetycznych w chirurgii naczyniowej [3, 4].

W 1961 roku Wesolowski opublikował wyniki badań nad znaczeniem porowatości syntetycznych protez naczyniowych. W swojej publikacji wykazał, że im większa porowatość ściany syntetycznej protezy, tym szybciej dochodzi do jej infiltracji przez komórki tkanki łącznej, a proces wgajania się przebiega sprawniej [5].

W pierwszym etapie wgajania w wyniku aktywacji układu krzepnięcia i trombocytów powstaje przyścienne skrzeplina pokrywająca wewnętrzną powierzchnię protezy naczyniowej [6, 7].

Następnie na skutek aktywacji granulocytów, makrofagów, miofibroblastów dochodzi do przebudowy przyściennego zakrzepu i powstania warstwy wewnętrznej: ubogokomórkowej błony z licznymi włóknami kolagenu w macierzy pozakomórkowej — neointimy [8, 9].

Pierwsze prace nad tak powstałą błoną w obrębie protez poliesterowych przeprowadził i opisał w 1962 roku Florey [10]. Następnie dzięki publikacji Clowesa z 1985 roku poznano analogiczny proces dotyczący protez z ePTFE [11].

Błony wewnętrzne — neointimy — syntetycznych protez naczyniowych, pomimo znacznego podobieństwa mor-

In experimental studies, the sustained activation of the immunological response cells, such as granulocytes, monocytes, macrophages and endothelial cells, was proved to take place within neointima [14, 15]. As a result, collagen production is being increased by myofibroblasts, which causes thickening of the neointima. The overall process of neointimal hyperplasia, marked particularly in the areas of anastomoses, comprises activation of endothelial cells and macrophages as well as increased collagen production. Morphological changes taking place within neointima disturb severely the normal function of the graft [12, 16, 17]. Constant thickening of neointima in the areas of prosthesis and artery anastomoses due to the phenomenon of hyperplasia results in shortening of the graft patency period [13, 18]. Therefore, crucial is the understanding of problems concerning etiopathogenesis of neointimal hyperplasia occurring in implanted vascular grafts.

Morphological changes taking place within the wall of artificial vascular prostheses during the healing period were studied by means of light and electron microscopic assessment [19–21]. Results of the morphological studies enable the complete understanding of the role of factors attributing to clinical complications in human being [15, 22–24].

The impact of the inflammatory cells on the processes of reparation and destruction within the implanted artificial vascular graft becomes clearer with the aid of the obtained study results [9, 25, 26].

The following problems on neointimal etiopathogenesis were brought under investigation based on the experimental model:

1. Are there any structural differences between the neointima in the regions of proximal and distal graft anastomosis with the artery?
2. Does the thickness of neointima in proximal and distal anastomoses differ?
3. How compatible are the results of the morphological studies on reparatory and regressive changes in regions of anastomoses and the results of neointimal thickness measuring in analogous sites?

Material and methods

Studies were performed on laboratory animals — 16 non-pedigree dogs, weighing from 20 kg to 26 kg, aged from 2 yrs to 4 yrs. In each animal unilateral straight aortofemoral ePTFE graft was implanted in the right groin by transperitoneal approach under general anaesthesia. The graft diameter was 6 mm, length varied from 8 to 12 cm.

After 6 months all the dogs were put to sleep and underwent autopsy, during which the prostheses with the host vessels were explanted. The following mor-

fologicznego do błon wewnętrznych naturalnych naczyń, nie spełniają ich funkcji w pełnym zakresie [12, 13].

Badania doświadczalne udowodniły utrwalone pobudzenie komórek odpowiedzi immunologicznej: granulocytów, monocytów, makrofagów i komórek śródbłonka w obrębie neointimy [14, 15]. Efektem tego jest wzmożona produkcja kolagenu przez miofibroblasty i znaczne pogrubienie neointimy. Pobudzenie komórek śródbłonka makrofagów oraz wzmożona produkcja kolagenu przez miofibroblasty składają się na obraz hiperplazji neointimy, szczególnie w miejscu zespoleń protezy z tętnicą. Powstające zmiany w strukturze neointimy zagrażają prawidłowemu funkcjonowaniu sztucznego przeszczepu [12, 16, 17]. Stałe zwiększanie rozmiarów neointimy z powodu hiperplazji w miejscu zespoleń protezy z tętnicą skraca czas drożności protez naczyniowych [13, 18]. Dlatego też tak ważne jest poznanie zagadnień związanych z etiopatogenezą hiperplazji neointimy w miejscu wszczepienia syntetycznych protez naczyniowych.

Na podstawie wyników badań uzyskanych za pomocą mikroskopu świetlnego i mikroskopu elektronowego można poznać zmiany strukturalne w obrębie ściany syntetycznej protezy naczyniowej w trakcie procesu wgajania [19–21]. Uzyskane dane badań morfologicznych umożliwią dokładne poznanie czynników powodujących powikłania kliniczne [15, 22–24].

Na podstawie uzyskanych wyników badań można coraz dokładniej określić rolę komórek zapalnych w procesach naprawczych i destrukcyjnych powstających w miejscu wszczepienia sztucznego naczynia [9, 25, 26].

Na podstawie modelu doświadczalnego podjęto próbę odpowiedzi na następujące pytania z zakresu etiopatogenezy neointimy:

1. Czy istnieją różnice w budowie neointimy pomiędzy zespoleniem proksymalnym a dystalnym syntetycznej protezy naczyniowej?
2. Czy istnieją różnice w grubości neointimy pomiędzy proksymalnym a dystalnym zespoleniem syntetycznej protezy naczyniowej z tętnicą?
3. W jakim stopniu procesy naprawcze i wsteczne w badaniach morfologicznych z miejsc zespoleń syntetycznej protezy naczyniowej z tętnicą są zgodne z wynikami pomiarów grubości neointimy?

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na zwierzętach doświadczalnych — 16 psach nierasowych, o masie ciała 20–26 kg, w wieku 2–4 lat. W znieczuleniu ogólnym dotchawiczym z dostępu przezotrzewnowego oraz w prawej pachwinie wszywano jednostronne przeszło aortalno-udowe z prostej protezy z ePTFE o średnicy 6 mm długości 8–12 cm.

phological studies were performed on specimens from the region of proximal and distal anastomosis:

1. Histological studies in light microscope.
2. Electron transmission studies.

Results

All the 16 animals survived the operation and the 6-month period of clinical observation. In each case, the postoperative period was free of any complications.

Statistical analysis of the results of the morphological and morphometric assessments (neointimal thickness in proximal and distal anastomosis region) was performed using Student's t-test. The level of significance was estimated using the Student's t-test for independent samples, assuming that the outlined differences are significant for the p value lower than 0.05.

The calculated p value was 0.00000002824.

Histological studies in light microscope

Light microscope studies were performed on samples taken from the region of the proximal and distal anastomosis of the ePTFE graft and the artery. 4 μm thick samples were haematoxylin-eosin stained and assessed under Olympus BX50 light microscope. In paraffin-embedded slides neointima, the newly formed vascular inner membrane in the proximal and distal anastomosis region was found. Figure 1 illustrates the proximal and distal anastomoses.

Thickness of the intima was measured using the picture analysis programme MultiScanBase version 08.98. Obtained results are presented in Table 1 and Figure 1.

Average intimal thickness was 0.23 mm in the proximal and 0.52 mm in the distal anastomosis region. Statistical analysis of the intimal thickness measurements revealed that the neointima in the proximal anastomosis were twice as thick as in the proximal one. The difference was 0.29 mm and was highly significant statistically.

Electron microscope studies

Electron transmission microscope studies were performed on samples taken from the region of the proximal and distal anastomosis, assessed under the JEM 100B microscope.

Proximal anastomosis

In the area of the proximal anastomosis, fibroblasts and fibrocytes were observed, being the cellular elements of the connective tissue. Single mast cells were also observed. Numerous bundles of collagen fibres, principal components of the extracellular matrix, were found between cells. Absence of macrophages, lymphocytes and granulocytes proves that the inflammatory reaction was not pathognomonic and was being ex-

Po upływie 6 miesięcy wszystkie zwierzęta usypiano i sekcjonowano, pobierając wszczepioną protezę naczyniową wraz z marginesem naczyń. Na materiale pobranym z okolic zespolenia proksymalnego (aorta) i zespolenia dystalnego (tętnica udowa wspólna) wykonywano następujące badanie morfologiczne:

1. Badania histologiczne w mikroskopie świetlnym.
2. Badania w mikroskopie elektronowym transmisyjnym.

Wyniki

Wszystkie zwierzęta z badanej grupy 16 psów przeżyły zabieg operacyjny oraz zaplanowany 6-miesięczny okres obserwacji klinicznej. W każdym przypadku przebieg pooperacyjny był niepowikłany.

Do analizy statystycznej otrzymanych wyników badań, różnicy grubości neointimy w zespoleniu proksymalnym i dystalnym, wykorzystano test t-Studenta.

Istotność określano, wykonując test t-Studenta dla prób zależnych przy stwierdzeniu, że zaznaczone różnice są istotne dla $p < 0,05$.

Wykazano, że $p = 0,00000002824$.

Badania histologiczne w mikroskopie świetlnym

Do badań w mikroskopie świetlnym wykorzystano wycinki pobrane z okolicy zespolenia proksymalnego i dystalnego protezy ePTFE z tętnicą. Wycinki grubości 4 μm barwiono hematoksyliną i eozyną. Wszystkie wycinki oceniono w mikroskopie świetlnym Olympus BX50. W wykonanych preparatach parafinowych stwierdzono nowo powstałą błonę wewnętrzną w obrębie zespolenia proksymalnego i zespolenia dystalnego. Zespolenie proksymalne i dystalne przedstawiono na rycinie 1.

Do pomiaru grubości neointimy wykorzystano komputerowy program analizy obrazu MultiScanBase 08.98.

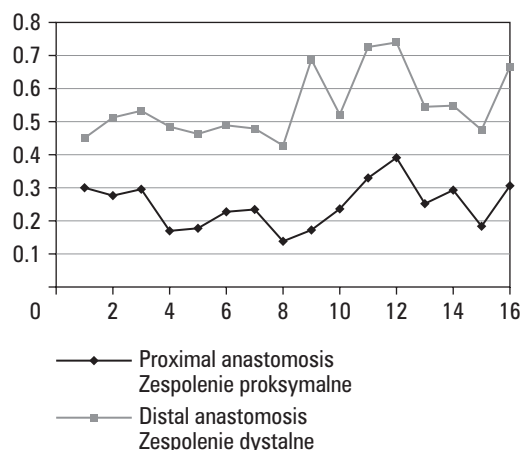


Figure 1. Thickness of neointima in proximal and distal anastomosis [mm]

Rycina 1. Grubość neointimy zespolenia proksymalnego i dystalnego [mm]

Table I. Thickness of neointima in proximal and distal anastomosis**Tabela I.** Grubość neointimy w zespoleniu proksymalnym i dystalnym

No. Nr	Proximal anastomosis [mm] Zespolenie proksymalne	Distal anastomosis [mm] Zespolenie dystalne
1	0.300495	0.449631
2	0.275808	0.511485
3	0.295464	0.531648
4	0.169884	0.484185
5	0.177372	0.461448
6	0.226902	0.487929
7	0.234039	0.47675
8	0.138372	0.427518
9	0.172107	0.685659
10	0.236379	0.520299
11	0.328302	0.724269
12	0.39042	0.737334
13	0.252018	0.543972
14	0.292321	0.547556
15	0.182477	0.473301
16	0.306072	0.665475
Average Średnio	0.229871	0.517427
Difference between both anastomosis Różnica między zespoleniami	0.287556	
p	0.000000002824	

tinguished gradually during the process of the proximal anastomosis healing.

Distal anastomosis

Similar to the proximal anastomosis, in samples from the distal anastomosis region fibroblasts were found. Furthermore, there were areas of myofibroblastic domination, some of them actively secreting collagen. In the extracellular matrix big numbers of collagen fibres, tightly packed in bundles, were found. Foci of aggregates of numerous macrophages, plasma cells and fragments of breaking down cells were also observed.

Myofibroblasts take part in the process of the chronic healing of tissue defects. They are present in the first phase and disappear in the final stages of scar formation.

Simultaneous presence of macrophages, plasma cells and myofibroblasts may be the marker of the parallel inflammatory and healing processes occurring in the distal anastomosis area. This phenomenon marks the prolonged inflammatory response within the distal anastomosis during the process of the vascular prosthesis healing.

Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli I oraz na rycinie I.

Grubość błony wewnętrznej w zespoleniu proksymalnym wynosiła średnio 0,23 mm, w zespoleniu dystalnym — 0,52 mm. Na podstawie analizy statystycznej uzyskanych wyników badań grubości błony wewnętrznej należy stwierdzić fakt, że błona wewnętrzna w zespoleniu dystalnym była ponad dwukrotnie grubsza od błony wewnętrznej w zespoleniu proksymalnym. Wykazana różnica była wysoce znamieną statystycznie i wynosiła 0,29 mm.

Badania w mikroskopie elektronowym

Ocenię w transmisyjnym mikroskopie elektronowym JEM 100B poddano wycinki z miejsca zespolenia proksymalnego i dystalnego.

Zespolenie proksymalne

W zespoleniu proksymalnym obserwowano występowanie następujących elementów komórkowych tkanki łącznej: fibroblastów i fibrocytów. Stwierdzono także pojedyncze mastocyty. Między komórkami występują liczne pęczki włókien kolagenowych, które są głównym składnikiem macierz pozakomórkowej. Brak makrofagów, limfocytów i granulocytów świadczy o tym, że procesy zapalne nie miały patognomicznego znaczenia i uległy wygaszeniu w trakcie wgajania się zespolenia proksymalnego.

Zespolenie dystalne

W miejscu zespolenia dystalnego, podobnie jak w zespoleniu proksymalnym, stwierdzono fibroblasty. Dodatkowo obserwowano obszary, w których dominowały miofibroblasty, niektóre w trakcie aktywnego wydzielania kolagenu. W macierzy pozakomórkowej wykazano istnienie dużej liczby włókien kolagenowych w postaci gęsto pakowanych pęczków. Znajdowano również ogniska z licznymi makrofagami, komórkami plazmatycznymi i fragmentami rozpadających się komórek.

Miofibroblasty są komórkami, które pojawiają się w przebiegu przewlekłego gojenia się ubytków tkankowych. Komórki te są obecne w początkowej fazie gojenia, natomiast zanikają w końcowym procesie tworzenia się blizny.

Występowanie makrofagów i plazmocytów równocześnie z miofibroblastami może świadczyć o współistnieniu procesów zapalnych z procesami naprawczymi w obrębie zespolenia dystalnego. Zjawisko to obrazuje długotrwałą reakcję zapalną w obrębie zespolenia dystalnego w trakcie wgajania się protezy naczyniowej.

Discussion

Artery reconstruction procedures are marked with a big number of late thrombotic complications, which lead to the secondary vessel occlusion. According to the data published so far, 15–49% of artificial vascular prostheses in the femoropopliteal region remain patent 10 years after surgery [23, 27].

Thrombotic complications of the synthetic vascular grafts implantation should be linked with the arterial intimal hyperplasia in the area of anastomosis with the graft [15, 24].

Intimal thickening in various papers described as neointimal hyperplasia, remains the subject of many experimental studies in vascular surgery [6].

Arterial reconstruction is accompanied by trauma to the vessel wall. Additionally, in cases of synthetic vascular graft implantation, there appears the problem of permanent presence of an artificial material in the arterial system [11, 28, 29].

In course of the targeted humoral and cellular response, accompanied by the above-mentioned phenomena, at the site of anastomosis with the graft there begins the process of reconstruction of the entire arterial wall, called vascular remodelling [30, 31].

The phenomenon of vascular remodelling comprises processes of myofibroblasts migration to the anastomotic site and proliferation. In the next phase, myofibroblastic cells actively produce collagen, which results in thickening of the arterial intima and internal layer of the graft [12, 16, 30].

Number of local agents stimulating the immunologic response gradually falls as time from the vascular prosthesis implantation progresses. Hindrance of the intimal thickening within the area of the prosthesis and artery anastomosis is one of the beneficiary results of this phenomenon [32, 33].

Decreasing the pace of neointimal hyperplasia and regressive changes in sites of anastomoses is an inevitable condition to be fulfilled in order to prolong the period of the implanted prosthesis functioning [23, 24].

In cases of sustained haemodynamic disturbances and prolonged cells inflammatory activation, constant dynamic progression of intimal thickening and regressive changes can be observed [11, 16, 34]. Due to them, no stabilisation of the biological immunologic response is achieved at the site of the synthetic graft implantation [32, 33, 35].

Results of histological examinations performed in this study reveal the existence of the statistically significant differences of the neointimal thickness in the areas of proximal and distal anastomoses.

Neointima covering the proximal anastomosis was thin and comprised of few cells, whereas in the distal anastomosis the newly formed internal layer was nota-

Dyskusja

Zabiegi rekonstrukcyjne tętnic obarczone są dużą liczbą późnych powikłań zakrzepowych, które powodują wtórną niedrożność naczyń. Według danych z piśmiennictwa, po 10 latach od zabiegu operacyjnego prawidłową drożność wykazuje 15–49% syntetycznych protez naczyniowych wszczepionych w odcinku udowo-podkolanowym [23, 27].

Wystąpienie powikłań zakrzepowych po zabiegach wszczepienia syntetycznej protezy naczyniowej należy wiązać z faktem przerostu błony wewnętrznej tętnicy w miejscu jej zespolenia z protezą [15, 24].

Przerost błony wewnętrznej tętnicy określane w publikacjach jako hiperplazja neointymy jest tematem badawczym wielu prac doświadczanych z chirurgii naczyniowej [6].

Zabiegom rekonstrukcyjnym tętnic towarzyszy uraz ściany naczynia. Dodatkowym zjawiskiem w przypadku wszczepienia syntetycznej protezy naczyniowej jest trwała obecność sztucznego naczynia w układzie tętniczym [11, 28, 29].

W wyniku ukierunkowania odpowiedzi humoralnej i komórkowej przez powyższe zjawiska dochodzi do przebudowy wszystkich warstw tętnicy *vascular remodeling* w miejscu jej zespolenia protezą [30, 31].

Przebudowa ściany *vascular remodeling* polega na migracji i proliferacji miofibroblastów do miejsca zespolenia tętnicy z protezą. Następnie dochodzi do wzmożonej produkcji przez miofibroblasty kolagenu, co powoduje pogrubienie błony wewnętrznej tętnicy i warstwy wewnętrznej protezy [12, 16, 30].

Wraz z upływającym czasem od wszczepienia syntetycznej protezy naczyniowej dochodzi do stopniowego zmniejszenia liczby lokalnych czynników stymulujących odpowiedź immunologiczną. Korzystnym efektem tego jest ograniczenie przerostu błony wewnętrznej w obrębie zespolenia syntetycznej protezy z tętnicą [32, 33].

Spowolnienie hiperplazji neointymy oraz zmian wstecznych w obrębie zespolenia jest koniecznym warunkiem dla długotrwałego funkcjonowania wszczepionej protezy [23, 24].

W przypadku utrzymywania się zaburzeń hemodynamicznych oraz utrwalonej aktywacji komórek zapalnych obserwuje się stały dynamiczny postęp zmian przerostowych i wstecznych [11, 16, 34]. W efekcie nie ma biologicznej stabilizacji odpowiedzi immunologicznej w miejscu wszczepienia sztucznego naczynia [32, 33, 35].

W przedstawionym materiale z badań histologicznych wykazano istotne statystycznie różnice w grubości neointymy pomiędzy zespoleniem proksymalnym a dystalnym.

W zespoleniu proksymalnym stwierdzono ubogokomórkową cienkościenną neointymę pokrywającą miejsce

bly thicker and built up of numerous inflammatory cells. The observed morphological differences are the result of haemodynamic disturbances, which are more prominent within the distal anastomotic area compared to the proximal one [35–37]. This causes the increase of the tangential stress (forces acting perpendicular to the graft and arterial wall) and the decrease of the shear stress (acting parallel to blood flow). The described distribution of stress forces is the direct causative agent of endothelial, macrophageal and myofibroblastic activation [38, 39, 40], which altogether lead to neointimal thickening within the distal anastomosis.

The transmission electron microscope studies revealed the existence aggregates containing macrophages, plasma cells and collagen-producing myofibroblasts in the distal anastomosis connective tissue. No such cell aggregates were observed within the area of proximal anastomosis.

The increased quantity of collagen deposits in the distal anastomosis site (compared to the proximal one) should also be emphasised.

The differences in the amount of collagen produced and in the proteolytic activity of inflammatory cells observed between the two anastomotic sites can be explained by the turbulent blood flow as well as by the compliance mismatch between the prosthesis and the artery, occurring in the process of the artificial vascular grafts healing [41]. This finding is consistent with the results of experimental studies published by Clowes and Sottiurai [16, 42].

The analysis of the data obtained in the course of the entire study justifies the following observations that concern the inflammatory cells' activity in regions of implanted artificial vascular grafts.

The fact that at the site of proximal anastomosis fibrocytes and fibroblasts are present, whereas within the distal anastomosis area macrophages and myofibroblasts are observed, can be explained by the inflammatory cells' crucial role both in the process of normal artificial graft healing as well as in case of destructive processes of unfavourable course. However, the formation of the new internal vessel wall layer, called neointima, is the beneficiary consequence of prolonged activation of the above-mentioned cells. This newly formed layer enables long-term functioning of the artificial vascular implant [9, 24, 43].

On the other hand, the negative result of the sustained inflammatory (in particular — macrophageal) response is the activation of proteolytic and collagen production phenomena, observed in myofibroblasts present in the neointimal extracellular matrix of the distal anastomosis [12, 35, 38, 44–47].

zespoleń. Natomiast w zespoleniu dystalnym neointima była znacznie grubsza z licznymi komórkami zapalnymi. Obserwowane różnice histologiczne powstają w wyniku oddziaływania zaburzeń hemodynamicznych, które w obrębie zespolenia dystalnego są znacznie bardziej nasilone w stosunku do analogicznych zmian w zespoleniu proksymalnym [35–37]. Objawem tego jest wzrost siły naprężeń stycznych (*tangential stress*) działających prostopadle do ściany protezy i tętnicy oraz spadek siły naprężeń stycznych (*shear stress*) działających równoległe do przepływu krwi. Taki rozkład naprężeń stycznych bezpośrednio przyczynia się do stymulacji komórek śródbłonna, makrofagów i miofibroblastów [38–40]. Efektem jest przerost neointimy w zespoleniu dystalnym.

Na podstawie badania w transmisyjnym mikroskopie elektronowym stwierdzono istnienie skupisk makrofagów, plazmocytoów i produkujących kolagen miofibroblastów w obrębie tkanki łącznej zespolenia dystalnego. Nie wykazano wyżej wymienionych komórek zapalnych w miejscu zespolenia proksymalnego.

Należy przy tym podkreślić fakt znacznie większej ilości złogów kolagenu w miejscu zespolenia dystalnego w porównaniu z analogicznymi zmianami w zespoleniu proksymalnym.

Istniejące różnice pomiędzy zespoleniami w produkcji kolagenu i aktywności proteolitycznej komórek zapalnych świadczą o dominującej roli turbulentnego przepływu krwi oraz biologicznej niezgodności (*compliance mismatch*) protezy z tętnicą na przebieg procesu wgajania się syntetycznych protez naczyniowych [41]. Stwierdzenie to jest zgodne z danymi opublikowanymi w pracach doświadczalnych Clowesa i Sottiurai [16, 42].

Analiza danych uzyskanych w przebiegu całego schematu badań upoważnia do następujących wniosków, które dotyczą zachowania się komórek zapalnych po wszczepieniu syntetycznej protezy naczyniowej.

Obecność fibrocytoów i fibroblastów w zespoleniu proksymalnym, a makrofagów i miofibroblastów w zespoleniu dystalnym jest wyrazem centralnej roli komórek zapalnych zarówno w prawidłowym wgajaniu się syntetycznej protezy naczyniowej, jak i w procesach destrukcyjnych o niepomyślnym przebiegu. Pozytywnym efektem długotrwałego pobudzenia wyżej wymienionych komórek jest powstanie nowej błony wewnętrznej — neointimy, która zapewnia długotrwałe funkcjonowanie wszczepionego sztucznego naczynia [9, 24, 43].

Natomiast negatywną stroną przedłużonej aktywności komórek zapalnych w tym szczególnie makrofagów jest promocja procesów proteolizy i wzmożonej produkcji kolagenu przez miofibroblasty w macierzy pozakomórkowej nowej błony wewnętrznej — neointimy w zespoleniu dystalnym [12, 35, 38, 44–47].

These phenomena may lead to dangerous clinical complications such as thrombosis, late prosthesis infections and aneurysms at the anastomotic areas. They shorten the period of the implanted graft functioning and are the most frequently observed causes of reoperations in vascular surgery [11, 22, 23, 27].

Conclusions

1. Significant quantitative and qualitative morphological differences between the neointima of the proximal and distal anastomosis area were observed.
2. In the proximal anastomosis the neointima is significantly thicker than in the proximal anastomosis.
3. Chronic inflammatory response within the distal anastomosis region was observed as a hallmark of the neointimal thickening at this site.

References

1. Bahnson HT (1954) Treatment of abdominal aortic aneurysms by excision and replacement by homograft. *Circulation*, 9: 494–503.
2. Brooks B (1924) Intra-arterial injection of sodium iodide. Preliminary report. *JAMA*, 82: 1016–1019.
3. Voorhees AB Jr. (1985) The development of arterial prostheses. *Arch Surg* 120: 289–295.
4. Blakemore AH, Voorhees AB Jr. (1954) Aneurysm of the aorta: a review of 365 cases. *Angiology*, 5: 209–231.
5. Wesolowski SA, Fies CC, Karlson KE (1961) Porosity: primary determinant of ultimate fate of synthetic vascular grafts. *Surgery*, 50: 91–105.
6. Lundell A, Berquist D, Lindblad B (1993) The uptake of platelets, fibrinogen and leucocytes in ePTFE vascular grafts in relation to blood flow — an experimental study in sheep. *Eur J Vasc Surg*, 7: 698–703.
7. Pankowsky DA, Ziatas NP, Topham NS, Oscar BS, Ratnoff D, Andreson JM (1990) Morphologic characteristics of adsorbed human plasma proteins on vascular grafts and biomaterials. *J Vasc Surg*, 11: 599–606.
8. Emerick S, Herring M, Arnold M, Baughman S, Reilly K, Glover J (1987) Leukocyte depletion enhances cultured endothelial retention on vascular prostheses. *J Vasc Surg*, 5: 342–347.
9. Scott SM, Barth MG, Gaddy LR, Ahl ET Jr. (1994) The role of circulating cells in the healing of vascular prostheses. *J Vasc Surg*, 19: 585–593.
10. Florey HW, Greer SJ, Kiser J, Poole JCF, Telander R, Werthersen NT (1962) The development of the pseudointima lining fabric grafts of the aorta. *Br J Exp Pathol*, 43: 655–660.
11. Clowes AW, Gown AM, Hanson SR, Reidy MA (1985) Mechanisms of arterial graft failure. I. Role of cellular proliferation in early healing of PTFE prostheses. *Am J Pathol*, 118: 43–54.
12. Clowes AW, Kirkman TR, Clowes MM (1986) Mechanisms of arterial graft failure. II. Chronic endothelial and smooth muscle cell proliferation in healing polytetrafluoroethylene prostheses. *J Vasc Surg*, 3: 877–884.

Procesy te mogą spowodować niebezpieczne powikłania kliniczne: zakrzepicę, późne infekcje protezy, tętniaki zespoleniowe, które skracają czas prawidłowego funkcjonowania wszczepionej protezy naczyniowej. Stanowią także najczęstszą przyczynę reoperacji w chirurgii naczyniowej [11, 22, 23, 27].

Wnioski

1. Stwierdzono istotne różnice ilościowe i jakościowe w budowie błony wewnętrznej — neointimy pomiędzy zespoleniem proksymalnym a dystalnym.
2. W zespoleniu dystalnym błona wewnętrzna — neointima — jest znamienne statystycznie grubsza od błony wewnętrznej w zespoleniu proksymalnym.
3. Wykazano przewlekłą reakcję zapalną w zespoleniu dystalnym, która odpowiada za przerost błony wewnętrznej — neointimy — w tym zespoleniu.

13. Imparato AM, Bracco A, Kim GE, Zeff R (1972) Intimal and neointimal fibrous proliferation causing failure of arterial reconstructions. *Surgery*, 72: 1007–1017.
14. Carlos TM, Harlan JM (1994) Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood*, 84: 2068–2101.
15. Deutsch M, Meinhard J, Vesely M, Fischlein T, Groscurthy P, von Oppell U, Zilla P (1997) In vitro endothelialization of expanded polytetrafluoroethylene graft. A clinical case report after 41 months of implantation. *J Vasc Surg*, 25: 757–763.
16. Clowes AW, Reidy MA (1991) Prevention of stenosis after vascular reconstruction: pharmacologic control of intimal hyperplasia — areview. *J Vasc Surg*, 13: 885–891.
17. Shigematsu K, Yasuhara H, Shigematsu H (2001) Topical application of antiangiogenic agent AGM-1470 suppresses anastomotic intimal hyperplasia after ePTFE grafting in a rabbit model. *Surgery*, 129: 220–223.
18. Schwartz S, deBlois D, O'Brien E (1995) The intima. Soil for atherosclerosis and restenosis. *Circ Res*, 77: 445–465.
19. Parsson H, Nassberger L, Thorne J, Norgren L (1993) Acute thrombogenicity and 4 weeks healing properties of a new stretch-ePTFE graft. *Eur J Vasc Surg*, 7: 63–70.
20. Stark VK, Warner TF, Hoch JR (1997) An ultrastructural study of progressive intimal hyperplasia in rat vein grafts. *J Vasc Surg*, 26: 94–103.
21. Westerband A, Mills JL, Marek JM, Heimark RL, Hunter GC, Williams SK (1977) Immunocytochemical determination of cell type and proliferation rate in human vein graft stenoses. *J Vasc Surg*, 25: 64–73.
22. Abbott WM, Callow A, Moore W, Rutherford R, Veith F, Weinberg S (1993) Evaluation and performance standards for arterial prostheses. *J Vasc Surg*, 17: 746–756.
23. Abbott WM, Creen RM, Matsumoto T, Wheeler JR, Miller N, Veith FJ et al. (1997) Prosthetic above-knee femoropopliteal bypass grafting. Results of a multicenter randomized prospective trial. *J Vasc Surg*, 25: 19–28.
24. Guidoin R, Chafke N, Maurel S, How T, Batt M, Marois M, Gosselin C (1993) Expanded polytetrafluoroethylene arterial prostheses in humans: histopathological study of 298 surgically excised grafts. *Biomaterials*, 14: 678–693.

25. Parsson HN, Nassberger L, Norgren L (1997) Inflammatory response to aorto-bifemoral graft surgery. *Int Angiol*, 16: 55–64.
26. Rubin BG, Santoro SA, Sicard GA (1993) Platelet interactions with the vessel wall and prosthetic grafts. *Ann Vasc Surg*, 7: 200–207.
27. Stonebridge PA, Prescott RJ, Ruckley CV (1997) Randomized trial comparing infringuinal polytetrafluoroethylene bypass grafting with and without vein interposition cuff at the distal anastomosis. *J Vasc Surg*, 26: 543–550.
28. Benbrahim A, L'Italien GJ, Milinazzo BB, Warnock DF, Dhara S, Gertler JP (1972) Healing of arterial prostheses in man: its incompleteness. *Ann Surg*, 175: 118–127.
29. Clowes AW (1996) Improving the interface between biomaterials and the blood. The gene therapy approach. *Circulation*, 93: 1319–1320.
30. Allaire E, Clowes AW (1997) The intimal hyperplastic response. *Ann Thor Surg*, 64 (Suppl.): S38–S46.
31. Gibbons GH, Dzau VJ (1994) The emerging concept of vascular remodeling. *N Engl J Med*, 330: 1431–1438.
32. Langille L, Ojha M (1997) Blood flow dynamics, atherosclerosis and bypass graft failure trends. *Cardiovascular Medicine*, 4: 111–118.
33. Liu SQ (1998) Prevention of focal intimal hyperplasia in rat vein grafts by using a tissue engineering approach. *Atherosclerosis*, 140: 365–377.
34. Boerboom LE, Olinger GN, Tie-Zhu L, Rodriguez ER, Ferrens VJ, Kissebah AH (1990) Histologic, morphometric and biochemical evolution of vein bypass grafts in nonhuman primate model. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 99: 97–106.
35. Geary RL, Kohler TR, Vergel S, Kirkman TR, Clowes AW (1994) Time course of flow-induced smooth muscle cell proliferation and intimal thickening in endothelialized baboon vascular grafts. *Circ Res*, 74: 14–23.
36. Binns RL, Ku DN, Stewart MT, Ainsley JP, Coyle KA (1989) Optimal graft diameter: effect of wall shear stress on vascular healing. *J Vasc Surg*, 10: 326–337.
37. Fisher RK, How TV, Toonder IM, Hoedt MT, Brennan JA, Gilling-Smith GL, Harris PL (2001) Harnessing haemodynamic forces for the suppression of anastomotic intimal hyperplasia: the rationale for precuffed grafts. *Eur J Vasc Surg*, 21: 520–528.
38. Cordero JA Jr, Quist WC, Hamdan AD, Phaneuf MD, Contreras MA, LoGerfo FW (1998) Identification of multiple genes with altered expression at the distal anastomosis of healing polytetrafluoroethylene grafts. *J Vasc Surg*, 28: 157–166.
39. Kissin M, Kansal N, Pappas PJ, DeFouw DO, Duran WN, Hobson RW (2000) Vein interposition cuffs decrease the intimal hyperplastic response of polytetrafluoroethylene bypass grafts. *J Vasc Surg*, 31: 69–83.
40. Sapienza P, diMarzo L, Cucina A, Corvino V, Mingoli A, Giustiniani Q et al. (1998) Release of PDGF-BB and bFGF by human endothelial cells seeded on expanded polytetrafluoroethylene vascular grafts. *J Surg Res*, 15: 24–29.
41. Weston MW, Rhee K, Tarbell JM (1996) Compliance and diameter mismatch affect the wall shear rate distribution near an end-to-end anastomosis. *J Biomech*, 29: 187–198.
42. Sottirai VS (1990) Biogenesis and etiology of distal anastomotic intimal hyperplasia. *Int Angiol*, 9: 59–69.
43. Chen C, Lumsden AB, Hanson SR (2000) Local infusion of heparin reduces anastomotic neointimal hyperplasia in aortoiliac expanded polytetrafluoroethylene bypass grafts in baboons. *J Vasc Surg*, 31: 354–363.
44. Dardik A, Liu A, Ballermann BJ (1999) Chronic *in vitro* shear stress stimulates endothelial cell retention on prosthetic vascular grafts and reduces subsequent *in vivo* neointimal thickness. *J Vasc Surg*, 29: 157–167.
45. Golden MA, Au YPT, Kenagy RD, Clowes AW (1990) Growth factor gene expression by intimal cells in healing polytetrafluoroethylene grafts. *J Vasc Surg*, 11: 580–585.
46. Kalman PG, Rotstein OD, Niven J, Glynn MF, Romaschin AD (1993) Differential stimulation of macrophage procoagulant activity by vascular grafts. *J Vasc Surg*, 17: 531–537.
47. Noishiki Y, Tomizawa Y, Yamane Y, Matsumoto A (1995) The vicious cycle of nonhealing neointima in fabric vascular prostheses. *Artif Organs*, 19: 7–16.