



## Histohemijska i imunohistohemijska analiza rupturisanog zida aneurizme aterosklerotične abdominalne aorte

### Histochemical and immunohistochemical analysis of ruptured atherosclerotic abdominal aortic aneurysm wall

Irena Tanasković\*, Aleksandra Mladenović-Mihailović†, Slavica Ušaj-Knežević‡, Vesna Stanković§, Aleksandar Aleksić||, Tatjana Kastratović¶, Aleksandra Aleksić||, Zorica Lazić\*\*, Zorica Mladenović-Bogdanović††, Aleksandar Živanović¶, Janko Djurić¶, Uglješa Jovičić‡‡, Marija Šorak¶

Medicinski fakultetu Kragujevac, \*Katedra za histologiju i embriologiju, §Katedra za patologiju, ¶Katedra za ginekologiju i akušerstvo, \*\*Katedra za internu medicinu, Kragujevac, Srbija; ‡Medicinski fakultet Novi Sad, Katedra za patologiju, Novi Sad, Srbija; ||Kliničko-bolnički centar Zemun, Odeljenje interne medicine, Beograd, Srbija; ††Klinički centar Srbije, Ginekološko-akušerska klinika, Beograd, Srbija; ‡‡Ministarstvo odbrane Republike Srbije, Uprava za vojno zdravstvo, Beograd, Srbija; †Kliničko-bolnički centar Zvezdara, Odeljenje za ginekologiju i akušerstvo, Beograd, Srbija

#### Apstrakt

**Uvod/Cilj.** Najznačajnija komplikacija aneurizme aterosklerotične abdominalne aorte (AAA) je njena ruptura koja najčešće počinje rascepom intime i rupturom plaka. Cilj ove studije bio je utvrđivanje imunohistohemijskih i morfofunkcijskih karakteristika ćelija u sastavu zida aterosklerotične aneurizme abdominalne aorte sa rupturom. **Metode.** Korišćeno je 20 uzoraka aterosklerotičnih AAA sa rupturom zida, dobijenih tokom autopsija. Uzorci su fiksirani u 4% formalinu i kalupljeni u paraplustu. Rezovi debljine 5 µm bojeni su histohemijski (*Heidenhain azan* i *Periodic acid Schiff* – PAS) i imunohistohemijskom tehnikom DAKO LSAB+/HRP koja je primenjena za identifikaciju sledećih antigena: α-glatkomišićni aktin (α-SMA), vimentin, teški lanci glatkomišićnog miozina (MHC), dezmin, S-100 protein, CD45 i CD68 (DAKO specifikacija). **Rezultati.** Aterosklerotičnu AAA sa rupturom zida karakteriše potpuno odsustvo endotelnih ćelija, disrupcija bazalne membrane i unutrašnje elastične lamine, kao i prisustvo ostataka ekstenzivnih kom-

plikovanih izrazito hipocelularnih plakova u intimi. Na marginama plakova i u mediji bile su prisutne glatke mišićne ćelije imunoreaktivne na α-SMA i vimentin, leukocitna infiltracija i veliki broj penastih ćelija. Jedan broj penastih ćelija pokazao je imunoreaktivnost na CD68, dok su druge pokazale imunoreaktivnost na vimentin i S-100 protein. Medija je bila istanjena sa dezorganizovanim elastičnim lamelama, dok je u adventiciji bila prisutna izrazita leukocitna infiltracija, što ukazuje na zapaljenjski proces. U rupturisanjoj intimi aterosklerotičnih AAA nađeni su ostaci komplikovane aterosklerotične lezije klasifikovane kao tip VI. **Zaključak.** Ruptura aneurizme nastaje iz primarnog rascepa intime, koji se širi u istanjenu mediju i adventiciju. Rupturu uzrokuju nestabilni aterom, hipocelularnost, gubitak kontraktilnih karakteristika glatkih mišićnih ćelija u intimi i mediji, neovaskularizacija medije, kao i aktivnost makrofaga u leziji.

#### Ključne reči:

aorta, abdominalna, aneurizma; ruptura; arterioskleroza; imunohistohemija; histologija.

#### Abstract

**Background/Aim.** The main complication of the atherosclerotic abdominal aortic aneurism (AAA) is her rupture that begins with lesion in intima and rupture. The purpose of this work was to determine immunocytochemical and morphofunctional characteristics of the cells in aortic wall in ruptured atherosclerotic abdominal aortic aneurysm.

**Method.** During the course of this study, 20 samples of atherosclerotic AAA were analyzed, all of them obtained during autopsies. The samples were fixed in 4% formalin and embedded in paraffin. Sections of 5 µm thickness were stained histochemically (of Heidenhain azan stain and Periodic acid Schiff – PAS stain) and immunocytochemically using a DAKO LSAB+/HRP technique to identify α-smooth muscle actin (α-SMA), vimentin, myosin

heavy chains (MHC), desmin, S-100 protein, CD45 and CD68 (DAKO specification). **Results.** The results of our study showed that ruptured atherosclerotic AAA is characterized by a complete absence of endothelial cells, the disruption of basal membrane and internal elastic lamina, as well as a presence of the remains of hypocellular complicated atherosclerotic lesion in intima. On the plaque margins, as well as in the media, smooth muscle cells (SMCs) are present, which express a  $\alpha$ -SMA and vimentin (but without MHC or desmin expression), as well as leukocyte infiltration, and a large number of foam cells. Some of the foam cells show a CD68- immunoreactivity, while the others show vimentin- and S-100 protein-immunore-

activity. Media is thinned out with a disorganized elastic lamellas, while adventitia is characterized by inflammatory infiltrate (infection). **Conclusion.** Rupture of aneurysm occurs from the primary intimal disruption, which spreads into thinned out media and adventitia. Rupture is caused by unstable atherom, hypocellularity, loss of contractile characteristics of smooth muscle cells in intima and media, neovascularization of the media, as well as by the activity of the macrophages in the lesion.

**Key words:**

**aortic aneurysm, abdominal; rupture; arteriosclerosis; immunohistochemistry; histology.**

## Uvod

Aterosklerotične aneurizme abdominalne aorte (AAA) nastaju usled prisustva uznapredovalih aterosklerotičnih lezija tipa IV (aterom) ili V (fibroaterom) u zidu aorte<sup>1,2</sup>. Uznapredovali aterosklerotični plak uzrokuje dilataciju dela zida aorte i često podleže oštećenjima poput disrupcije plaka, hemoragije ili tromboze, što dovodi do nastanka komplikovane aterosklerotične lezije (tipa VI). Prema vrsti oštećenja na površini plaka, kod aterosklerotične AAA mogu da se nađu lezije tipa VIa (plak sa rupturom), VIb (plak sa hemoragijom) ili VIc (plak sa trombozom). Kod aterosklerotične AAA sa rupturom zida u plaku istovremeno mogu da budu prisutne i sve tri vrste komplikacija, što predstavlja leziju tipa VIa, b, c<sup>2</sup>.

Najznačajnija komplikacija aterosklerotične AAA je njena ruptura, koja najčešće počinje primarnim rasepom intime (rupturom plaka) koji se zatim širi u dublje slojeve aortnog zida<sup>3,4</sup>. Povećana aktivnost proteolitičkih enzima u leziji i posledična degradacija ekstracelularnog matriksa, promovišu rupturu aneurizme<sup>4</sup>. Sa aspekta citohistoloških svojstava aortnog zida aterosklerotične AAA koji doprinose rupturi aneurizme, kao najznačajniji činioci koji promovišu rupturu izdvajaju se strukturalna slabost zida koja je uslovljena sastavom lezije<sup>5</sup>, prisustvo makrofaga, penastih ćelija poreklom od makrofaga i proteolitičkih enzima<sup>6</sup>, prisustvo inflamatornih ćelija u leziji<sup>7</sup>, kao i izloženost zida povećanom hemodinamičkom stresu<sup>8</sup>.

U savremenoj literaturi još uvek nisu sasvim razjašnjeni svi faktori koji dovode do nastanka aneurizme, a zatim i do njene rupture, posebno sa aspekta detaljne morfofunkcionalne analize. Veliki broj autora koji se bave istraživanjem aterosklerotične AAA, slaže se u tome da bi razumevanje procesa koji su zastupljeni u razvoju ove lezije i mehanizama njihove regulacije, kao i precizno definisanje fenotipa ćeljskih populacija koja učestvuju u tim procesima, doprinelo razvoju novih terapijskih strategija u lečenju aterosklerotične AAA<sup>3</sup>. Zbog toga je cilj ove studije bio utvrđivanje imunohistochemijskih karakteristika fenotipski heterogenih ćelija u rupturisanom aterosklerotičnom plaku abdominalne aortne aneurizme, odnosno utvrđivanje njihovih morfofunkcionalnih karakteristika, kao i njihove potencijalne uloge u rupturi zida aterosklerotične AAA.

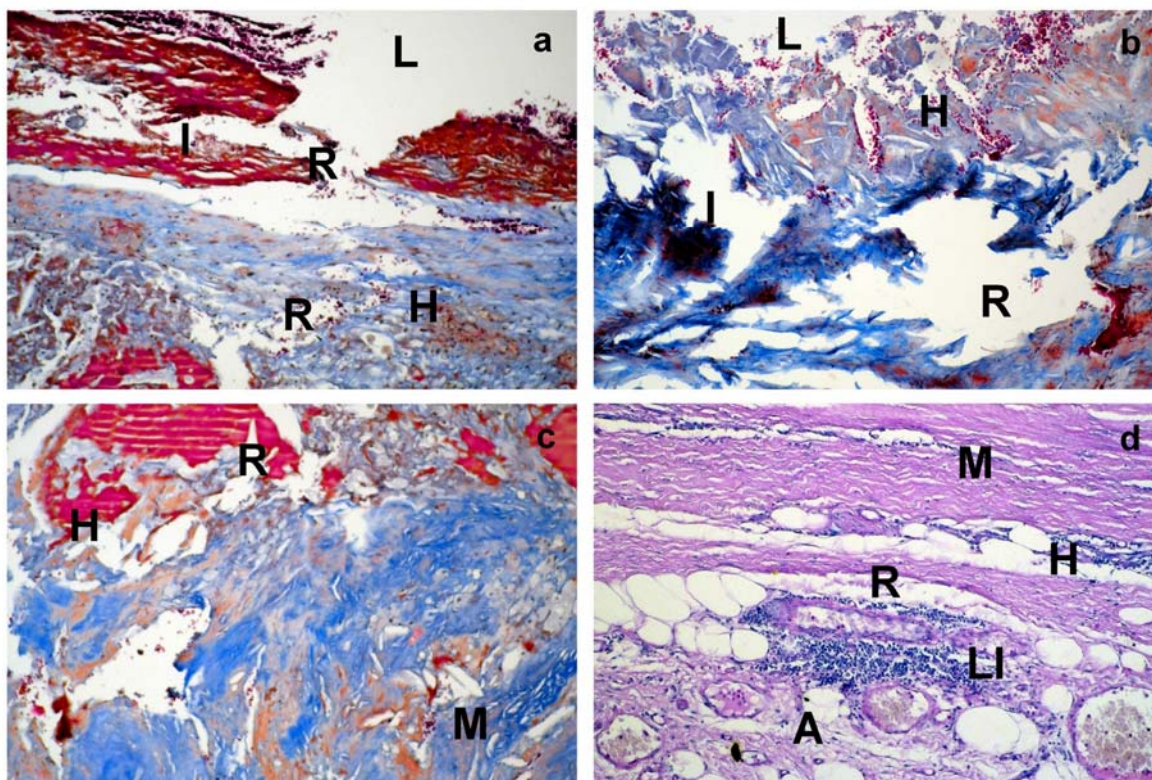
## Metode

Analizirano je 20 uzoraka aterosklerotičnih aneurizmi abdominalne aorte sa rupturom zida dobijenih tokom autopsija osoba oba pola, umrlih od nevascularnih i vaskularnih uzroka, urađenih na Odeljenju patologije Medicinskog fakulteta Univerziteta u Kragujevcu. Za analizu morfoloških promena u zidu aorte i sastava ekstracelularnog matriksa primenjena su selektivna histohemijska bojenja (*Heidenhain azan* i *Periodic acid Schiff* – PAS), prema standardnom protokolu<sup>9</sup>. Za potrebe imunohistochemijskog bojenja, tkivo je fiksirano u 4% neutralnom puferovanom formaldehidu 24 časa i kalupljeno u paraplustu. Rezovi debljine 5  $\mu$ m, montirani su na posebne visokoadherentne pločice *SuperFrost* i sušeni na temperaturi od 56 °C u toku 1 sata. Procedura imunohistochemijskog bojenja podrazumevala je postupke demaskiranja antigena, blokiranja endogene peroksidaze, inkubiranja preparata sa primarnim antiserumom i postupak izvođenja imunohistochemijske metode – LSAB+/HRP, na način koji smo prethodno opisali<sup>10,11</sup>. Tokom imunohistochemijskog bojenja korišćeni su sledeći primarni antiserumi u datim razblaženjima: vimentin (1:100),  $\alpha$ -glatkomišićni aktin ( *$\alpha$ -Smooth Muscle Actin* –  $\alpha$ -SMA) (1:25), teški lanci glatkomišićnog miozina (*Myosin Heavy Chains* – MHC) (1:50), desmin (1:10), S-100 protein (1:200), CD45 (zajednički antigen leukocita – *Leucocyte Common Antigen* – LCA) (1:50) i CD68 (1:50).

## Rezultati

Analizom rezultata dobijenih primenom histohemijskih tehnika, zapaženo je da su aterosklerotične promene na svim uzorcima zahvatale ceo aortni zid. U intimi je zapaženo prisustvo ostataka ekstenzivne aterosklerotične lezije, medija ispod plaka bila je atrofično istanjena, dok je u adventiciji prisutan hronični zapaljenjski infiltrat. Usled rupture aneurizme, bila su prisutna izrazita oštećenja intime, medije i adventicije, i posledična hemoragija u svim slojevima zida (slika 1 a–d).

Na svim analiziranim uzorcima, endotel i bazalna membrana u potpunosti su nedostajali. U subendotelu intime nalazili su se ostaci komplikovanog hipocelularnog aterosklerotičnog plaka koji je zauzimao veoma široko područje i



**Sl. 1 – Histochemijska analiza rupturisane aterosklerotične aneurizme abdominalne aorte**  
 a, b i c – ruptura (R) intime (I) i medije (M). Zapaža se hemoragija (H) u lumenu (L) i delovima zida (Heidenhain azan bojenje,  $\times 64$ ); d – istanjena medija (M) sa rupturom *vasa vasorum* (R) i posledičnom hemoragijom (H); leukocitni infiltrat (LI) u adventiciji (A) (Periodic acid Schiff – PAS bojenje,  $\times 64$ )

bio sastavljen iz većeg broja manjih plakova. Na mestima na kojima su postojali manji plakovi, mogla je da se uoči rekanalizacija, odnosno novoformirani lumen, ruptura *vasa vasorum* i posledična hemoragija u celom subendotelu. Na fibroznoj kapi nekih uzoraka, zapažala se ruptura i ulceracija sa parijetalnim trombom (slika 1 a, b). Unutar plaka, bili su prisutni holesterolski kristali i ćelijski detritus. Na obodima plaka, zapažale su se intenzivna leukocitna infiltracija, glatke mišićne ćelije i penaste ćelije.

Unutrašnja elastična membrana bila je prekinuta rupturom, a u ostalim delovima zida u potpunosti je nedostajala. Na mestima na kojima je bila prisutna, duplirana je, a prostor između te dve membrane popunjavalo je fibrozno vezivo, sastavljeno od debelih kolagenih vlakana. U istanjenoj tunici mediji zapažene su ispravljene, fokalno duplirane, a na pojedinim mestima prekinute elastične lamele, dosta kolagenih vlakana i mala količina osnovne supstance. Na svim analiziranim uzorcima, u istanjenoj mediji, krv disekcijom (iz primarne rupture intime) stvarala je lažni lumen, čiji spoljašnji zid (deo medije i adventicija) je rupturirao, takode. Osim toga, svuda u mediji bili su prisutni i novoformirani krvni sudovi, koji su, takode, podlegali rupturi. Spoljašnja elastična membrana bila je sasvim tanka i teško se zapažala zbog potpune fibroze i rupture medije (slika 1 a–d).

Adventicija je bila sastavljena iz rastresitog vezivnog tkiva sa dosta kolagenih i malo elastičnih vlakana, fibroblasta, limfocita i histiocita. Adventicijalni krvni sudovi

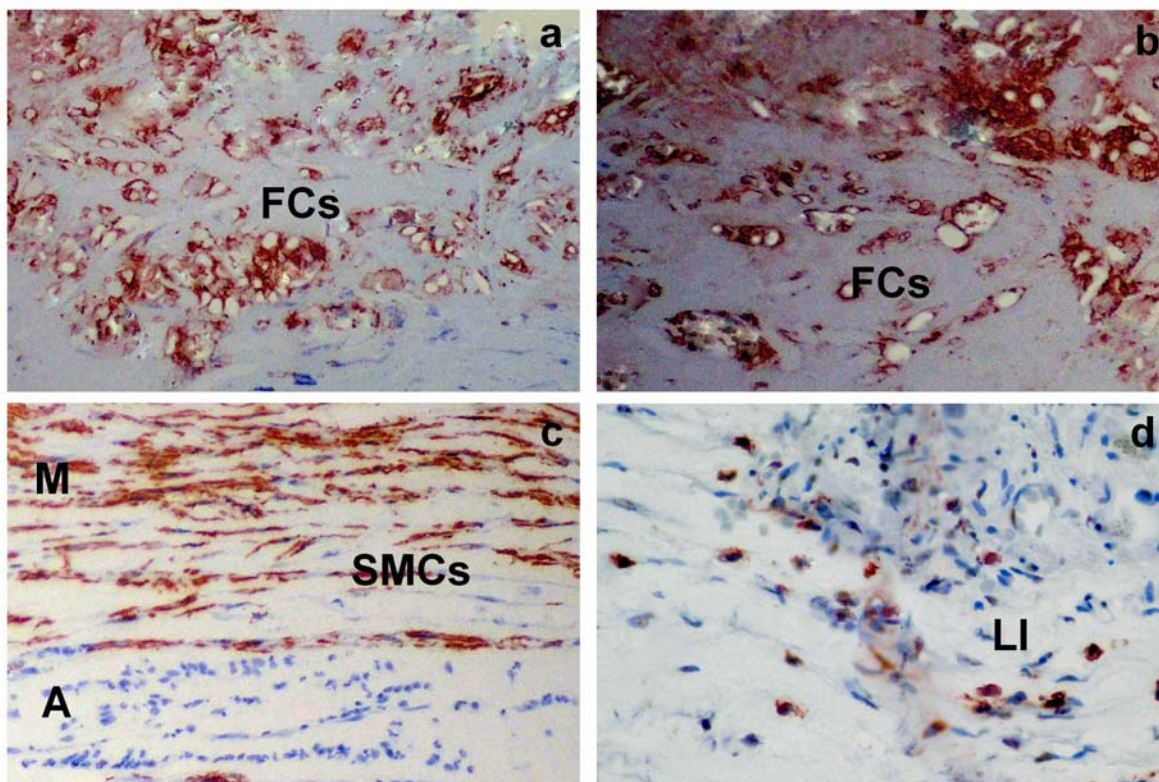
(*vasa vasorum*) bili su zadebljanih zidova, a svuda u adventiciji, bila je prisutna izrazita leukocitna infiltracija (slika 1d).

Na marginama rupturisanih plakova, zapažena je prisustvo heterogene ćelijske populacije i ćelijskog detritusa, dok su ostaci lipidnog jezgra na svim uzorcima bili acelularni i ispunjeni lipidnim kristalima. Ispitivanjem distribucije antigena specifičnih za glatke mišićne ćelije zapaženo je da su u sastavu ove ćelijske populacije na marginama plakova, kao i u mediji bile prisutne glatke mišićne ćelije koje su pokazivale imunoreaktivnost na  $\alpha$ -SMA i vimentin, dok je reakcija na MHC i dezmin izostala. Ispitivanjem distribucije S-100 proteina, utvrđeno je njegovo prisustvo u ćelijama na granici između intime i medije.

U ćelijskoj populaciji na margini plakova utvrđeno je i prisustvo penastih ćelija različitih karakteristika. Jedan broj penastih ćelija pokazivale su CD68-imunoreaktivnost, a druge vimentin-imunoreaktivnost. Vimentin-imunoreaktivne penaste ćelije bile su lokalizovane pretežno u dubljim oblastima intime na njenoj granici sa medijom. U dubljim oblastima intime, zapažalo se i prisustvo penastih ćelija imunoreaktivnih na S-100 protein. Svuda u adventiciji bila je prisutna izrazita leukocitna infiltracija (slika 2 a–d).

Ispitivanjem distribucije CD45 antigena utvrđeno je da se najveći broj ćelija koje ekspiriraju ovaj antigen nalazio na obodu plaka, znatno manji broj na samom mestu rupture, dok je najveći broj bio prisutan u spoljašnjem delu medije i adventicije.





**Sl. 2 – Imunohistohemijska analiza ćelijske populacije rupturisane aterosklerotične aneurizme abdominalne aorte, a – penaste ćelije (FCs) poreklom od monocitno/makrofagne linije (imunohistohemijsko bojenje na CD68,  $\times 256$ ); b – penaste ćelije (FCs) poreklom od glatkih mišićnih ćelija (imunohistohemijsko bojenje na vimentin,  $\times 256$ ); c – glatke mišićne ćelije (SMCs) sintetskog fenotipa u istanjenoj mediji (M) i na granici sa adventicijom (A) (imunohistohemijsko bojenje na vimentin,  $\times 128$ ) i d – leukocitna infiltracija (LI) u adventiciji (imunohistohemijsko bojenje na CD45,  $\times 128$ ).**

### Diskusija

Prema rezultatima dobijenim u ovoj studiji, aterosklerotičnu AAA sa rupturom zida karakteriše prisustvo ostataka rupturisane aterosklerotičnog plaka sa hemoragijom i razvijenim trombnim masama. U sastavu plaka, zapažaju se ostaci manjih, sekundarnih plakova međusobno razdvojenih rekanalisanim lumenima kroz koje se širi disekcija zida i koji predstavljaju predilekciono mesto ruptur. Na svim analiziranim uzorcima u ovoj studiji, na samom mestu ruptur, u sastavu najprominentnijeg plaka, bilo je prisutno ekstenzivno acelularno lipidno jezgro, dok je na njegovom spoljašnjem, fibrozno izmenjenom obodu, u svim uzorcima bila prisutna heterogena ćelijska populacija. Evidentno je da je komplikovani plak aterosklerotične AAA nastao od primarnog ateroma (lezije tipa IV), komplikovanog disrupcijom površine plaka, hemoragijom i trombozom, što je u saglasnosti sa dostupnim literaturnim podacima<sup>1</sup>.

Poređenjem rezultata dobijenih u ovoj studiji sa podacima iz literature o uzrocima ruptur plaka<sup>4,5</sup>, moglo bi da se pretpostavi da je jedan od uzroka ruptur plaka, a zatim i same aneurizme, mogao da bude sastav aterosklerotične lezije, odnosno strukturalna slabost zida uzrokovana prisustvom nestabilnog ateroma. Naime, prema podacima iz dostupne literature, lezije tipa IV (ateromi), posebno su podložne rupturi<sup>5</sup>. Dokazano je da su lezije u kojima dominira veliko lipidno jezgro (ateromi), nestabilne i da lako podležu rupturi i komplikacijama plaka, zato što, za razliku od stabilnijih fibroate-

roma (lezija tipa V) ne poseduju debelu fibroznu kapu koja doprinosi očuvanju njihove strukture<sup>1</sup>.

Analizom populacije glatkih mišićnih ćelija na obodima uzoraka plakova u našoj studiji, utvrđeno je da je ovaj fenotip prisutan u leziji (imunoreaktivnost na  $\alpha$ -SMA), ali da ćelije ne poseduju kontraktilne karakteristike. Imunohistohemijskim bojenjima utvrđeno je da populacija glatkih mišićnih ćelija osim  $\alpha$ -SMA eksprimira i vimentin, dok reakcija na dezmin izostaje. Pored toga, i u mediji uzoraka analiziranih u ovoj studiji, takođe, uočena je potpuna izostanaka dezminske ekspresije uz prisustvo vimentin-imunoreaktivnih ćelija, što sugeriše da medijalne glatke mišićne ćelije, takođe, ekspimiraju samo  $\alpha$ -SMA i vimentin. Prema rezultatima naših prethodnih studija<sup>8,10,11</sup>, kao i studija drugih autora<sup>12-14</sup>, gubitak ekspresije dezmina, kao markera visokodiferenciranog kontraktilnog fenotipa, uz istovremenu ekspresiju vimentina, prvi je znak u procesu modifikacije kontraktilnog u sintetski fenotip. Pošto se ova dva intermedijarna filamena koekspimiraju u vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama, „pomeranje“ ekspresije ka vimentinu svedoči o gubitku kontraktilnih karakteristika glatkih mišićnih ćelija, odnosno, o njihovoj modifikaciji u sintetski fenotip<sup>10,11,13</sup>. Ovako izmenjene, sintetski aktivne glatke mišićne ćelije u plaku aterosklerotične aneurizme, prema rezultatima naših prethodnih istraživanja, kao i istraživanja drugih autora, potiču kako od matične populacije intimalnih glatkih mišićnih ćelija, tako i od ćelija koje migriraju iz medije u intimu i doprinose formiranju plaka u ranim fazama ateroskleroze<sup>8,15,16</sup>. Osim gubit-

ka kontraktilnih svojstava glatkih mišićnih ćelija, rezultati histochemijskih i imunohistochemijskih bojenja pokazali su da su ostaci tankih fibrozni delova na marginama plakova hipocelularni, dok su ostaci lipidnih jezgara u potpunosti acelularni, što dodatno doprinosi nestabilnosti lezije i rupturi plaka. Naime, prema podacima iz literature, prisustvo glatkih mišićnih ćelija na obodima plaka i njihova morfofunkcionalna očuvanost doprinose stabilnosti lezije<sup>12</sup>.

Osim glatkih mišićnih ćelija sintetskog fenotipa, rezultati su pokazali da je u sastavu ćelijske populacije na margini plaka prisutan i jedan broj glatkih mišićnih ćelija koje pokazuju imunoreaktivnost na  $\alpha$ -SMA, vimentin i S-100 protein uz prisutne lipidne kapi u citoplazmi, pa odaju utisak penastih ćelija. Nalaz vimentin-imunoreaktivnih penastih ćelija (koji ukazuje na njihovo glatkomišićno poreklo) u saglasnosti je sa našim prethodnim rezultatima<sup>11</sup>, kao i sa rezultatima drugih autora, po kojima jedan broj glatkih mišićnih ćelija eksprimira *scavenger* receptore i kompetitivno učestvuje sa makrofagima u akumulaciji lipida i stvaranju penastih ćelija, što se dovodi u vezu sa neuroektodermalnim poreklom glatkih mišićnih ćelija u zidu aorte<sup>16,17</sup>. Zbog toga što potiču od nervnog grebena, ove ćelije eksprimiraju S-100 protein, a kako eksprimiraju sintetski fenotip (imunoreaktivnost na vimentin), karakteriše ih i proliferativna aktivnost<sup>11,13</sup>. Na svim analiziranim uzorcima u ovoj studiji, zapažena je ekspresija S-100 proteina na granici intime i medije. Prema literaturnim podacima S-100 protein eksprimira se u ćelijama neuroektodermnog porekla koje se nalaze u procesima diferencijacije, proteinske fosforilacije i proliferacije, kojima poseduje  $Ca^{++}$ <sup>18</sup>. Ekspresija ovog antigena karakteristična je, između ostalih ćelijskih tipova, i za vaskularne glatke mišićne ćelije, kao i za vaskularne dendritske ćelije<sup>19,20</sup>. Uz to, u novijim istraživanjima dokazano je da heterokompleks sastavljen od S-100A8 i S-100A9 kalcijum-vezujućih proteina (*calprotectin*), pokazuje visok afinitet za vezivanje masnih kiselina<sup>21</sup>. Moguće je dakle, da glatke mišićne ćelije koje zbog svog neuroektodermnog porekla i proliferativne aktivnosti eksprimiraju S-100 protein, upravo zahvaljujući ekspresiji ovog antigena poseduju sposobnost za akumulaciju lipida i modifikaciju u penaste ćelije.

Kao što je prethodno pomenuto, ekspresija S-100 proteina karakteristična je i za vaskularne dendritske ćelije<sup>19,20</sup>. Međutim, u uzorcima analiziranim u ovoj studiji, usled masivne nekroze i prisutnog ćelijskog detritusa, na nivou svetlosne mikroskopije nije moguće potvrditi precizne citomorfološke karakteristike vaskularnih dendritskih ćelija. Sigurno je da jedan broj ćelija imunoreaktivnih na S-100 protein čine i vaskularne dendritske ćelije, jer je prema dostupnim podacima iz literature poznato da su ove antigen-prezentujuće ćelije, zastupljene u manjoj meri u normalnoj intimi, dok se u neuporedivo većem broju nalaze u aterosklerotičnim lezijama velikih arterija, da ne akumuliraju lipide, kao i da formiraju kontakte sa limfocitima i učestvuju u razvoju inflamatornih procesa<sup>19,20</sup>.

Na rupturu aneurizme, prema prethodno pomenutim podacima iz literature, osim sastava plaka i morfofunkcionalnih karakteristika glatkih mišićnih ćelija, utiče i prisustvo makrofaga i njihova funkcionalna aktivnost u leziji<sup>4-6</sup>, kao i

prisustvo zapaljenjskog infiltrata<sup>7</sup>. Rezultati ove studije pokazali su da se pored penastih ćelija koje potiču od glatkih mišićnih ćelija, u ćelijskoj populaciji na margini plaka nalaze i CD68-imunoreaktivne penaste ćelije, što sugeriše da ove ćelije potiču od monocitno-makrofagne loze<sup>22</sup>. Prema podacima iz literature, u inicijalnim fazama lezije (u fazi aktivacije endotela i stadijumu masne trake) monociti, odnosno makrofagi predstavljaju glavne prekursore penastih ćelija. Od stadijuma preateroma, najveći deo penastih ćelija nastaje od glatkih mišićnih ćelija<sup>11</sup>. Penaste ćelije u ranim fazama ateroskleroze akumuliraju lipide intracelularno, ali već od stadijuma preateroma količina lipida prevazilazi kapacitete penastih ćelija koje, pri tom, podležu nekrozi i oslobađanju svog sadržaja u ekstracelularni prostor, što uzrokuje stvaranje velike lipidne mase u plaku, koja se u sledećem stadijumu lezije organizuje kao aterom<sup>11</sup>. Na taj način makrofagi direktno utiču na stvaranje nestabilnog ateroma u intimi.

Osim toga, makrofagi sintetišu matriksne metaloproteinaze (MMP) koje razgrađuju komponente ekstracelularnog matriksa intime i medije i utiču na ćelijsku proliferaciju, migraciju, diferencijaciju, angiogenezu, apoptozu i aktivaciju hemokina, čime direktno i posredno doprinose slabljenju vaskularnog zida i promovišu rupturu aneurizme<sup>6</sup>. Utvrđeno je da je za rupturu aneurizme od najvećeg značaja prisustvo MMP1, MMP8 i MMP9 u leziji, kao i da je njihova koncentracija u aneurizmu sa rupturom značajno veća u odnosu na aneurizmu bez rupture zida<sup>23,24</sup>. Dokazano je da je koncentracija ovih MMP najveća na mestima ruptore aneurizme, da je njihova funkcija degradacija kolagenih vlakana (kolagenaze), kao i da ih pored makrofaga, sintetišu i endotelne ćelije kao i glatke mišićne ćelije<sup>6</sup>. Proteolitičkom aktivnošću ovih enzima i razlaganjem kolagenih vlakana zid podleže hemodinamičkom pritisku i rupturira. Osim toga, dokazano je da MMP2 i MMP9 uzrokuju regulaciju nagore genske ekspresije citokina angiogeneze čime doprinose neovaskularizaciji aterosklerotične AAA, a time i njenoj rupturi<sup>3,25</sup>. Izražena neovaskularizacija bila je prisutna na svim uzorcima analiziranim u ovoj studiji. Novoformirani krvni sudovi na analiziranim uzorcima, predstavljali su mesta širenja ruptore, jer su njihovi rupturirani zidovi bili u kontinuitetu sa primarnom rupturom intime. Na taj način, hemoragija iz primarnog intimalnog procepa, širila se putem novoformiranih krvnih sudova u dublje delove zida i uzrokovala procepe u mediji, što je bilo prisutno u svim analiziranim uzorcima.

Ispitivanjem distribucije CD45 antigena, utvrđeno je da je u svim analiziranim uzorcima u svim delovima zida bila prisutna leukocitna infiltracija. Najveći broj leukocita (CD45-imunoreaktivnih ćelija) bio je prisutan na marginama plaka, spoljašnjem delu medije i adventiciji, dok je na samom mestu ruptore, broj leukocita bio znatno manji. Ovakav rezultat u saglasnosti je sa rezultatima novijih studija o uticaju leukocitnog infiltrata na rupturu aneurizme. Naime, uprkos nekadašnjem mišljenju da prisustvo inflamatornih ćelija u leziji doprinosi rupturi plaka, a zatim i zida aterosklerotične AAA<sup>7</sup>, novija istraživanja pokazala su da je broj infiltriranih CD45 imunoreaktivnih ćelija manji na samom mestu ruptore, nego u ostalim delovima zida aterosklerotične AAA<sup>23</sup>. Ovakvi rezultati, iako deluju kontradiktorno, sugeri-

šu da inflamacija tkiva ima mali uticaj na proces rupture aneurizme. Međutim, još uvek nije sasvim poznato na koje načine inflamatorna reakcija utiče na rupturu aterosklerotične AAA, ali se za sada zna da u kontroli i regulaciji inflamatornih procesa značajnu ulogu imaju MMP koje deluju na modifikaciju proinflamatornih citokina, hemokina i membranskih receptora<sup>3</sup>.

### Zaključak

Rezultati analize histohemijskih i imunohistohemijskih karakteristika aterosklerotične AAA, kao i morfofunkcional-

nih karakteristika ćelija u njenom sastavu, sugerišu da se kao najznačajniji faktori koji doprinose rupturi aneurizme mogu izdvojiti: prisustvo nestabilnog, komplikovanog aterosklerotičnog plaka u intimi, prisustvo makrofaga i glatkih mišićnih ćelija sintetskog fenotipa koji sintetišu MMP, hipocelularnost, gubitak elastičnih svojstava medije i kontraktilnih karakteristika njenih glatkih mišićnih ćelija i prisustvo novoforniranih krvnih sudova u mediji, dok manji uticaj na rupturu ima leukocitna infiltracija. Usled opisanih degenerativnih promena zid aterosklerotične AAA gubi sposobnost da se kompenzatornom dilatacijom prilagodi uslovima povišenog pritiska i podleže rupturi.

### L I T E R A T U R A

1. *Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glasgow S, Insull W Jr, et al.* A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis: a report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1995; 92: 1355–74.
2. *MacSweeney ST.* Mechanical properties of abdominal aortic aneurysm and prediction of risk of rupture. *Cardiovasc Surg* 1999; 7(2): 158–9.
3. *Pearce WH, Shively VP.* Abdominal aortic aneurysm as a complex multifactorial disease: interactions of polymorphisms of inflammatory genes, features of autoimmunity, and current status of MMPs. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1085: 117–32.
4. *Falk E.* Why do plaques rupture? *Circulation* 1992; 86(Suppl 3): 30–42.
5. *Richardson PD, Davies MJ, Born GV.* Influence of plaque configuration and stress distribution on fissuring of coronary atherosclerotic plaques. *Lancet* 1989; 2: 941–4.
6. *LeMaire SA, Wang X, Wilks JA, Carter SA, Wen S, Won T, et al.* Matrix metalloproteinases in ascending aortic aneurysms: bicuspid versus trileaflet aortic valves. *J Surg Res* 2005; 123(1): 40–8.
7. *van der Wal AC, Becker AE, van der Loos CM, Das PK.* Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation* 1994; 89(1): 36–44.
8. *Lacković V, Vuković I.* Cytohistological and immunohistochemical characteristics of vascular remodelling in diseases of the blood vessels. *Srp Arh Celok Lek* 2006; 134(1): 9–16. (Serbian)
9. *Bancroft JD, Gamble M.* Theory and practice of histological techniques. 5th ed. London: Churchill Livingstone; 2002.
10. *Vuković I, Lacković V, Todorović V, Kanjub V, Ilic S.* Cytohistologic and immunohistochemical characteristics of the aortic intima and media in coarctation of the aorta of the adult type. *Srp Arh Celok Lek* 2004; 132(1): 66–71. (Serbian)
11. *Vuković I, Arsenović N, Lašković V, Todorović V.* The origin and differentiation potential of smooth muscle cells in coronary atherosclerosis. *Exp Clin Cardiol* 2006; 11: 123–8.
12. *Chan WL, Pejnović N, Hamilton H, Liew TV, Popadić D, Poggi A, et al.* Atherosclerotic abdominal aortic aneurysm and the interaction between autologous human plaque-derived vascular smooth muscle cells, type 1 NKT, and helper T cells. *Circ Res* 2005; 96: 675–83.
13. *Thyberg J, Blomgren K, Hedin U, Drjyski M.* Phenotypic modulation of smooth muscle cells during the formation of neointimal thickenings in the rat carotid artery after balloon injury: an electron-microscopic and stereological study. *Cell Tissue Res* 1995; 281: 421–33.
14. *Gabbiani G, Schmid E and Winter S, Chaponnier C, de Chastonay C, Vandekerckhove J, et al.* Vascular smooth muscle cells differ from other smooth muscle cells: predominance of vimentin filaments and a specific type actin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 298–302.
15. *Xu C, Lee S, Singh T, Sho E, Li X, Sho M, et al.* Molecular mechanisms of aortic wall remodeling in response to hypertension. *J Vasc Surg* 2001; 33: 570–8.
16. *Libby P.* Transplantation-associated arteriosclerosis: Potential mechanisms. In: *Tilney N, Strom T, Paul L, editors.* Transplantation biology. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1996. pp. 577–86.
17. *Murry CE, Gipaya CT, Bartosek T, Benditt EP, Schwartz SM.* Monoclonality of smooth muscle cells in human atherosclerosis. *Am J Pathol* 1997; 151: 697–705.
18. *Donato R.* Functional roles of S-100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. *Biochem Biophys Acta* 1999; 1450(3): 192–231.
19. *Bobryshev YV.* Dendritic cells and their involvement in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2000; 11: 511–7.
20. *Bobryshev YV, Lord RSA.* S-100 positive cells in human arterial intima and media in atherosclerotic lesions. *Cardiovasc Res* 1995; 29: 689–96.
21. *Siegenthaler G, Ronlin K, Chatellard-Gruaz D, Hotz R, Saurat JH, Hellman U, et al.* A heterocomplex formed by the calcium-binding proteins MRP8 (S100A8) and MRP14 (S100A9) binds unsaturated fatty acids with high affinity. *J Biol Chem* 1997; 272(14): 9371–7.
22. *Libby P, Clinton SK.* The role of macrophages in atherogenesis. *Curr Opin Lipidol* 1993; 4: 355–63.
23. *Wilson WR, Anderton M, Schwalbe EC, Jones JL, Furness PN, Bell PR, et al.* Matrix metalloproteinase-8 and -9 are increased at the site of abdominal aortic aneurysm rupture. *Circulation* 2006; 113(3): 438–45.
24. *Wilson WR, Anderton M, Choke EC, Dawson J, Loftus IM, Thompson MM.* Elevated plasma MMP1 and MMP9 are associated with abdominal aortic aneurysm rupture. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2008; 35(5): 580–4.
25. *Choke E, Thompson MM, Dawson J, Wilson WRW, Sayed S, Loftus IM, et al.* Cockerill GW. Abdominal aortic aneurysm rupture is associated with increased medial neovascularization and overexpression of proangiogenic cytokines. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 2077–82.

Primljen 17. VII 2009.

Prihvaćen 18. XI 2009