

Histological and immunohistochemical features of atherosclerotic plaques retrieved from patients with restenosis after carotid endarterectomy

Histologiczne i immunohistochemiczne cechy blaszek miażdżycowych u chorych z restenozą po endarterektomii tętnic szyjnych

Monika Prochorec-Sobieszek¹, Grzegorz Madycki², Walerian Staszkiwicz², Teresa Wagner¹

¹Department of Pathomorphology, Institute of Rheumatology, Warsaw, Poland (Zakład Patomorfologii, Instytut Reumatologiczny, Warszawa)

²Department of Vascular Surgery and Angiology, Centre for Postgraduate Medical Studies, Warsaw, Poland (Klinika Chirurgii Naczyniowej i Angiologii CMKP, Szpital Bielański, Warszawa)

Abstract

Background. Restenosis is an important issue after classic and endovascular revascularization of atherosclerotic carotid arteries. Pathogenesis of this phenomenon remains unclear and unsolved. The aim of this study was to evaluate the histopathological and immunohistochemical features of atherosclerotic plaques retrieved at carotid endarterectomy in patients who developed restenosis at ultrasound follow-up.

Material and methods. One hundred thirty patients operated because of atherosclerotic carotid artery stenosis were evaluated. On the base of postoperative ultrasound examinations 52 patients were qualified for this study. Atherosclerotic plaques were investigated histopathologically and with immunohistochemical methods with monoclonal and polyclonal antibodies (DAKO) to define the phenotype of inflammatory, smooth muscle and endothelial cells as well as fibrinogen deposits and HLADPQR antigens.

Results. By means of the ultrasonography, in a period of 6–18 months following the surgery, patients were classified into two, significantly different groups: group I with an evident restenosis and group II without restenosis nor intimal hyperplasia. Advanced and fibrocellular atherosclerotic plaques with thrombosis, intra-plaque haemorrhages, fibrous cap rupture, intimal hyperplasia, necrosis, calcium and cholesterol deposits were found more often in patients of group I. Moreover, the percentage of vascular smooth muscle cells (SMA+) and fibrinogen (Fbg+) deposits was significantly higher in this group ($p < 0.005$). Atherosclerotic plaques from group II patients were more frequently fibrosclerotic and were rich in macrophages (Mac 387+) ($p = 0.007$). Inflammatory infiltrates consisting mainly of lymphocytes T (CD3+, OPD 4+) and mast cells (mast cells tryptase +), lymphocytes T (CD8+), lymphocytes B (CD20+) were more frequent in group I.

Conclusion. Although classic risk factors of atherosclerosis do not play a role in the development of restenosis, histological and immunohistochemical (SMA, Fbg, Mac 387) studies of primary atherosclerotic plaques may be useful to selected the patients at risk of carotid postendarterectomy restenosis.

Key words: carotid arteries, atherosclerosis, endarterectomy, restenosis, histology, immunohistochemistry

Address for correspondence (Adres do korespondencji):

Dr med. Monika Prochorec-Sobieszek, Department of Pathomorphology Institute of Rheumatology

ul. Spartańska 1, 02–637 Warsaw

Tel./fax: (+48 22) 844 30 94

e-mail: monika.prochorec@interia.pl

Streszczenie

Wstęp. Restenoza stanowi istotny problem u chorych po operacjach miażdżycowego zwężenia tętnic szyjnych, przeprowadzonych zarówno metodą klasyczną, jak i wewnątrznaczyniową. Pomimo licznych badań patogeneza zjawiska pozostaje nadal niejasna. Celem pracy było określenie histopatologicznych i immunohistochemicznych cech pierwotnej blaszki miażdżycowej pobranej podczas endarterektomii tętnic szyjnych u pacjentów z następową restenozą w kontrolnych badaniach ultrasonograficznych.

Materiał i metody. Oceniono 130 chorych operowanych z powodu miażdżycowego zwężenia tętnic szyjnych. Na podstawie wyników pooperacyjnych badań ultrasonograficznych wyodrębniono 52 chorych. Blaszki miażdżycowe oceniano histopatologicznie i barwiono metodą immunohistochemiczną przy użyciu przeciwciał mono- i poliklonalnych (DAKO) w celu określenia fenotypu komórek zapalenia, komórek mięśni gładkich i śródbłonnków oraz złogów fibrynogenu i antygenów HLADPQR.

Wyniki. Na podstawie badania ultrasonograficznego wykonanego w okresie 6–18 miesięcy po zabiegu chirurgicznym wyodrębniono dwie grupy chorych: z wyraźną restenozą (grupa I) i bez rozrostu neointymy (grupa II). Blaszki miażdżycowe zaawansowane, typu włóknisto-komórkowego z zakrzepami, wylewami śródbłaskowymi, przerwaniem ciągłości czapeczki, hiperplazją intymy, ogniskami martwicy oraz złogami wapnia i cholesterolu częściej występowały u pacjentów z grupy I. Ponadto w tej grupie stwierdzono statystycznie znamienne większy procentowy udział komórek mięśni gładkich (SMA+) i fibrynogenu (Fbg+) ($p < 0,005$). U chorych z grupy II blaszki miażdżycowe częściej były typu włóknisto-szklanego i charakteryzowały się obecnością liczniejszych makrofagów (Mac 387+) ($p = 0,007$). Nacieki zapalne złożone głównie z limfocytów T (CD3+, OPD4+) oraz komórek tucznych (tryptaza komórek tucznych +), limfocytów T (CD8+) oraz limfocytów B (CD20+) nieco częściej występowały w grupie I.

Wnioski. Chociaż klasyczne czynniki ryzyka miażdżycy nie odgrywają roli w powstawaniu restenozy, badania histopatologiczne i immunohistochemiczne (SMA, Fbg, Mac 387) pierwotnych blaszek miażdżycowych mogą być pomocne w wyodrębnieniu pacjentów, u których występuje ryzyko pooperacyjnej restenozy tętnic szyjnych.

Słowa kluczowe: tętnice szyjne, miażdżycy, endarterektomia, restenoza, histologia, immunohistochemia

Introduction

Endarterectomy is a well-accepted method for the treatment of symptomatic and asymptomatic carotid artery stenosis. It has been estimated that in the USA itself, about 140 000–160 000 operations of this kind are performed annually. Classical endarterectomies (CAE) constitute the vast majority of them (> 96%). Remaining patients are treated with the stenting of the internal carotid artery (CAS). Restenosis is the most frequent post-operative complication (resulting from the operative technique, diagnostic methods and the length of postoperative period), and is estimated for about 1.3–37% [2].

Clinical and experimental studies have proved that revascularization was followed by modelling of all arterial wall layers: intima, media and adventitia [3]. Local factors that participate in the pathogenesis of restenosis encompass: infection, inflammation, growth factors, cytokines as well as lymphocytes, macrophages and activated smooth muscle cells derived from the vascular wall [4]. It seems that the risk factors of primary atherosclerosis do not play a decisive role in the evolution of restenosis [5]. Hemodynamically significant carotid ar-

Wstęp

Endarterektomia stanowi metodę z wyboru leczenia objawowego lub bezobjawowego zwężenia tętnic szyjnych. Ocenia się, że tylko w Stanach Zjednoczonych wykonuje się 140 000–160 000 operacji tego typu rocznie. Zdecydowaną większość (> 96%) stanowią endarterektomie klasyczne (CAE), zaś pozostałych chorych operuje się aktualnie metodą stentowania tętnicy szyjnej wewnętrznej (CAS) [1]. Do najczęstszych powikłań pooperacyjnych nadal należy restenoza, której częstość występowania (w zależności od techniki operacyjnej, metody rozpoznawania oraz czasu od zabiegu) ocenia się na 1,3–37% [2].

Po zabiegu rewaskularyzacji może występować modelowanie wszystkich warstw ściany tętnicy: błony wewnętrznej, środkowej i przydanki, co udowodniono w badaniach klinicznych i doświadczalnych [3]. W patogenezie restenozy bierze się pod uwagę takie czynniki miejscowe, jak: infekcja, zapalenie, czynniki wzrostu i cytokiny, a także udział limfocytów, makrofagów i aktywowanych komórek mięśni gładkich naczyń [4]. Wydaje się, że czynniki ryzyka występowania pierwotnej miażdżycy nie odgrywają decydującej roli w powstawaniu restenozy [5].

tery stenosis linked with hyperplasia of the intima following endarterectomy is infrequent. Determination of certain characteristics of the primary atherosclerotic plaque predisposing to restenosis after endarterectomy may be important for predicting the patients at risk of carotid artery stenosis, as well as for the understanding the phenomenon of restenosis. Until now, few reports concerning this problem have appeared in global literature [6]. The aim of this study was to state if there are any distinctive morphological and immunochemical features of primary atherosclerotic plaques retrieved during carotid artery endarterectomy from patients who postoperatively developed hyperplasia of intima layer, as observed in ultrasound examinations.

Material and methods

A total number of 130 patients who underwent a classical carotid artery endarterectomy (CEA) in the Department of Vascular Surgery and Angiology, Warsaw in the period 2002–2003 (20 months) were included in the study. Indications for surgery were classical, concordant with the current ones in North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial (NASCET) and ECST studies. Every patient qualified for CEA was subjected to final ultrasound (US) examination, with registration of atherosclerotic plaques image (digital registration on MO disk station, Fujitsu, 640 SE), basic flow parameters and the degree of internal carotid artery (ICA) stenosis. Precise history was taken, and basic biochemical parameters were analysed. All cases of stroke were documented with the use of computer tomography or nuclear magnetic resonance examination.

Postoperatively, the patients were followed-up by means of US examinations. Randomization criteria were as follows:

- equivalent operation type (classical endarterectomy without patch closure);
- no sign of restenosis in the first 3 months postoperative observation period (US examination);
- no sign of technical error causing development of restenosis;
- diagnosis of restenosis, or its absence, 6 months after the operation.

Patients were randomized for the study after a minimum of 6-months postoperative observation (6–18 months). To make the evaluated group more homogeneous, patients with follow-up periods below 6 and over 18 months, as well as those operated with different surgical techniques (eversio, patch closure), were not assessed. Criteria of ICA stenosis assessment employed in the Department for the last 6 years are based on US criteria established and approved in the NASCET study

Chociaż hemodynamicznie znaczące zwężenie tętnic szyjnych związane z hiperplazją błony wewnętrznej po zabiegu endarterektomii nie występuje często, ustalenie pewnych charakterystycznych cech pierwotnej blaszki miażdżycowej, które usposabiają do rozwoju restenozy po endarterektomii, może mieć znaczenie w wyodrębnieniu grupy pacjentów o większym ryzyku zwężenia tętnic szyjnych oraz może umożliwić lepsze zrozumienie samego procesu restenozy. Dotychczas w piśmiennictwie światowym pojawiły się pojedyncze doniesienia na ten temat [6].

Celem pracy było określenie, czy istnieją charakterystyczne morfologiczne i immunohistochemiczne cechy pierwotnych blaszek miażdżycowych pobranych podczas endarterektomii tętnic szyjnych od chorych, u których obserwowano następnie hiperplazję błony wewnętrznej w badaniach ultrasonograficznych.

Materiał i metody

Badaniem objęto 130 chorych, u których wykonano klasyczną endarterektomię tętnicy szyjnej w Klinice Chirurgii Naczyniowej i Angiologii CMKP w latach 2002–2003 (20 miesięcy). Wskazania do operacji były klasyczne, zgodne z aktualnie obowiązującymi, ustalonymi w badaniach NASCET oraz ECST. U wszystkich chorych kwalifikowanych do zabiegu operacyjnego endarterektomii tętnicy szyjnej przeprowadzono ostateczne badanie ultrasonograficzne (USG), rejestrując obraz blaszki miażdżycowej (zapis cyfrowy na stacji dysków MO, Fujitsu, 640 SE) oraz podstawowe parametry przepływu, a także stopień zwężenia tętnicy szyjnej wewnętrznej. Przeprowadzono również dokładny wywiad kliniczny i wykonywano podstawowe badania biochemiczne. Każdy przebyty udar był udokumentowany badaniem tomografii komputerowej lub rezonansu magnetycznego.

Po operacji chorych obserwowano. Wykonywano okresowe badania USG. Kryteria randomizacji chorych do badania obejmowały:

- jednakowy typ zabiegu (endarterektomia klasyczna, bez naszyca łąty);
- brak cech restenozy w okresie pierwszych 3 miesięcy po operacji (badanie USG);
- brak cech błędu technicznego powodującego restenozę;
- rozpoznanie restenozy/całkowity jej brak w okresie minimum 6 miesięcy po zabiegu.

Chorych losowo przydzielono do badania dopiero po okresie minimum 6 miesięcy od operacji (okres obserwacji 6–18 miesięcy). W celu ujednoczenia grupy nie oceniano pacjentów, u których okres obserwacji był krótszy niż 6 miesięcy lub był dłuższy niż 18 miesięcy, oraz chorych operowanych inną techniką operacyjną

[7, 8], as well as on the degree of stenosis measured from the cross-sectional area of the stenotic artery (own experience). Examinations were performed on Siemens Sonoline Elegra apparatus with the application 7, 5-Mhz linear head in transverse and longitudinal projections. Conventionally, images were registered at minimal depth (4 cm), without any zoom. This allowed acquiring images with constant resolution, maintaining a stable frame per second — 24 fps for images in B presentation and 16 fps for colour Doppler presentation. The power range was 73 dB and 26 dB respectively. The degree of restenosis was evaluated with the use of the above-mentioned velocity criteria, and by assessment of proliferating neointima thickness. This process was accompanied by calculation of stenosis from arteries cross-section area.

Patients were divided into two radically different groups (on the base of US examination):

- group I — very advanced neointima growth with restenosis > 70% (hemodynamically significant, confirmed by the calculation of stenosis from arteries cross-section area method) — 26 patients;
- group II — absolute lack of neointima hyperplasia (absolute lack of restenosis) — 26 patients.

The next step was a comparative analysis of histopathological and immunohistochemical lesions in the previously removed atherosclerotic plaques in both isolated groups. Plaques removed during CEA were fixed in 10% buffered formalin. The lengths of the specimens varied from 1.0 cm to 2.5 cm. Three fragments were taken from their proximal, medial and distal portion. In turn, they were routinely processed into a paraffin block. The latter serially cut into 5 μ m sections and stained with hematoxylin-eosin and PTAH. In order to reveal inflammatory cells, smooth muscle cells, endothelium cells, deposits of fibrinogen and human leukocyte antigens (HLA) paraffin sections were also stained with poly- and monoclonal antibodies (DAKO Company) using the immunohistochemical Envision method. The type and reactivity of antibodies is set in Table I. Positive and negative controls of the used antibodies with the application of positive intrinsic control and avoidance of the first antibody were conducted. The number of inflammatory, smooth muscle and endothelium cells was evaluated semi-quantitatively in 10 nonadjacent fields at 25 \times magnification. We calculated the percentage of the nuclei of mentioned cells with respect to the total number nuclei in each field. The percentage of plaque involvement by fibrinogen was evaluated. Parietal thrombus, intraplaque haemorrhages, fibrous cap rupture, endothelial hyperplasia, foci of necrosis, calcium, cholesterol deposits, fibrosis, hyalinisation and angiogenesis was determined in

(ewersja, nasycie łąty). Kryteria oceny zwężenia tętnicy szyjnej wewnętrznej stosowane w klinice, w której pracują autorzy niniejszej pracy, od 6 lat oparte są na ultrasonograficznych kryteriach ustalonych i zatwierdzonych w badaniu NASCET [7, 8] oraz na ocenie stopnia zwężenia mierzonej z pola przekroju zwężonej tętnicy (doświadczenia własne ośrodka). Badania wykonywano aparatem Siemens Sonoline Elegra za pomocą sondy liniowej 7,5 Mhz w projekcjach podłużnej i poprzecznej. Standardowo obrazy rejestrowano na głębokości minimalnej (4 cm), bez powiększania (zoom). Uzyskiwano w ten sposób stałą rozdzielczość obrazu, zachowując stałą częstość powtarzania (*frame per second*) — 24 fps dla obrazu dla prezentacji B i 16 fps dla prezentacji metodą Dopplera kodowanego kolorem. Zakres mocy wynosił odpowiednio 73 dB i 26 dB.

Stopień restenozy oceniano, stosując wspomniane kryteria prędkości oraz oceniając grubość proliferującej neointimy, a wraz z tym liczono stopień zwężenia z pola przekroju tętnicy.

Chorych podzielono na dwie skrajnie różnice się od siebie grupy (na podstawie badania USG):

- grupa I (26 osób) — charakteryzowała się bardzo zaawansowanym rozrostem neointimy z restenozą powyżej 70% (istotną hemodynamicznie, potwierdzoną oceną według metody liczenia zwężenia z pola przekroju naczynia);
- grupa II (26 pacjentów) — cechowała się absolutnym brakiem przerostu neointimy (całkowity brak restenozy).

Następnym etapem była porównawcza analiza zmian histopatologicznych i immunohistochemicznych w usuniętych wcześniej zmianach miażdżycowych w obu wyodrębnionych grupach. Pobrane w czasie zabiegu blaszki miażdżycowe utrwalano w 10-procentowej zbuforowanej formalinie. Długość badanych materiałów wynosiła 1,0–2,5 cm. Pobierano z nich trzy wycinki z części proksymalnej, środkowej i dystalnej i przeprowadzano w sposób rutynowy do bloczka parafinowego. Następnie skrojone seryjnie skrawki (5 mm) barwiono rutynowo hematoksyliną — eozyną i metodą PTAH. Na skrawkach parafinowych wykonywano barwienia immunohistochemiczne metodą Envisiona przy użyciu monoklonalnych przeciwciał firmy DAKO w celu ujawnienia komórek zapalnych, komórek mięśni gładkich i komórek śródbłonna naczyń oraz złogów fibrynogenu i antygenów zgodności tkankowej HLA klasy II. Rodzaj i reaktywność przeciwciał przedstawiono w tabeli I. Przeprowadzono kontrole pozytywne i negatywne używanych przeciwciał z zastosowaniem pozytywnej kontroli wewnętrznej i ominięciem pierwszego przeciwciała. Liczbę komórek nacieków zapalnych,

Table I. Type and reactivity of monoclonal antibodies used for immunohistochemical study**Tabela I.** Rodzaj i reaktywność przeciwciał monoklonalnych stosowanych do badań immunohistochemicznych

Antygen Antygen	Antibody Przeciwciało	Dilution Rozcieńczenie	Reactivity Reaktywność
CD3	CD3	1:50	T lymphocytes Limfocyty T
CD45RO	OPD4	1:25	Helper/inducer T lymphocytes Limfocyty T <i>helper/inducer</i>
CD8	C8/144B	1:40	Suppressor/cytotoxic T lymphocytes Limfocyty T <i>supressor/cytotoxic</i>
CD20	L26	1:50	B lymphocytes Limfocyty B
Mast cell tryptase Tryptaza z komórek tucznych	AA1	1:50	Mast cells Komórki tuczne
Myeloid/Histiocyte Antigen Antygen mieloidalno/histiocytny	Mac 387	1:50	Granulocytes, monocytes, histiocytes Granulocyty, monocyty, histiocyty
HLA DPDQDR	CR3/43	1:50	β chains of the DPDQDR gene sub regions products Łańcuch β produktów podregionów genu DPDQDR
Actine (smooth Muscle) Aktyna (mięśnie gładkie)	IA4	1:50	Smooth muscle cells Komórki mięśni gładkich
CD34 Class I	BI-3C5	1:50	Endothelium cells Komórki śródbłonna
Fibrinogen Fibrynogen	Ig fraction* Frakcja Ig*	1:40	Fibrinogen, fibrin Fibrynogen, włóknik

*polyclonal antibody (przeciwciało poliklonalne)

0–3 degrees scale, where 0 — no feature, + — small, ++ — average, +++ — large intensity.

Statistical analysis was performed with the use of *t*-Student test (for paired values) and χ^2 test. Values of $p < 0.05$ were considered as statistically significant.

Results

Clinical characteristics

One hundred and thirty patients were checked with US in the period between 6–18 months after CAE. Examined patients were divided into two extremely different groups: I group (26 patients) with an evident restenosis (hemodynamically significant > 70%, with intimal hyperplasia > 2 mm) and II group (26 patients) without intimal hyperplasia (Figures 1 and 2). Clinical data of these patients are demonstrated in Table II. Values of arterial blood pressure, biochemical examinations and atherosclerosis risk factors were similar in both groups.

Results of microscopic and immunohistochemical examinations

Atherosclerotic plaques removed during CAE, consisted of fragments of dense, generally paucicellular fibrous connective tissue with or without the presence of foam cells, lymphocytes, mast cells, cholesterol and calcium deposits as well as foci of necrosis. Histopatho-

komórek mięśni gładkich i komórek śródbłonna oceniano półilościowo w 10 nieprzylegających polach widzenia przy 25-krotnym powiększeniu. Określano odsetek tych komórek w stosunku do ogólnej liczby jąder w analizowanych polach. Oceniano również procent zajęcia blaszki przez złogi fibrynogenu. Zakrzepy przyścienne, wylewy śródbłaskowe, przerwanie ciągłości czapeczki włóknistej, hiperplazję błony wewnętrznej, ogniska martwicy, złogi wapnia i cholesterolu, włóknienie, szkliwienie oraz angiogenezę oceniano w skali 0–3 w zależności od stopienia nasilenia zmian: 0 — brak cechy, + — małe, ++ — średnie, +++ — duże nasilenie.

Analizę statystyczną danych przeprowadzono za pomocą testu *t*-Studenta (dla wartości sparowanych) oraz testu χ^2 . Wartości $p < 0,05$ uznano za znamienne statystycznie.

Wyniki

Charakterystyka kliniczna chorych

U 130 chorych wykonano badania ultrasonograficzne w okresie 6–18 miesięcy po zabiegu endarterektomii. Wyodrębniono dwie skrajne grupy: grupę I (26 osób) z wyraźną restenozą (zwężenie istotne hemodynamicznie > 70% z hiperplazją intymy > 2 mm) i grupę II (26 pacjentów) bez rozrostu błony wewnętrznej (ryc. 1



Figure 1. Ultrasound image of internal carotid artery with advanced restenosis. Neointimal hyperplasia is marked with grey line

Rycina 1. Zdjęcie ultrasonograficzne tętnicy szyjnej wewnętrznej ze znacznego stopnia restenozą. Hiperplazję neointymy zaznaczono szarą kreską



Figure 2. Ultrasound image of internal carotid artery after endarterectomy without intimal hyperplasia and restenosis

Rycina 2. Obraz ultrasonograficzny tętnicy szyjnej wewnętrznej po endarterektomii bez hiperplazji intymy i restenozy

Table II. Clinical data and atherosclerosis risk factors in patients after CAE

Tabela II. Dane kliniczne chorych oraz czynniki ryzyka rozwoju miażdżycy po CAE

	Group I Grupa I (n = 26)	Group II Grupa II (n = 26)	p
Sex, M/F Płeć (mężczyźni/kobiety)	14 M i 12 F	16 M i 10 K	NS
Age (average in years) Średni wiek (lata)	68.3 ± 8.9	66.9 ± 7.8	NS
Risk factors n (%) Czynniki ryzyka n (%)			
Family history Wywiad rodzinny	14 (53.85%)	16 (61.54%)	NS
Myocardial infarction in the past/myocardial ischemia Przebyty zawał serca/czynna choroba wieńcowa	18 (69.23%)	16 (53.85%)	NS
Hypertension * Nadciśnienie tętnicze*	23 (85.18%)	16 (61.54%)	NS
Diabetes ** Cukrzyca**	6 (23.08%)	5 (19.23%)	NS
Dyslipidemia *** Dyslipidemia***	11 (42.31%)	13 (50%)	NS
Smoking Palenie tytoniu	15 (57.7%)	19 (73.08%)	NS
Neurological history Wywiad neurologiczny			
Amaurosis fugax	7 (26.92%)	7 (26.92%)	NS
TIA	7 (26.92%)	9 (34.61%)	NS
RIND/PRIND	0	0	NS
Stroke Udar	8 (30.1%)	2 (7.7%)	< 0.001

*systolic \geq 140 mm Hg, diastolic \geq 90 mm Hg (ciśnienie skurczowe \geq 140 mm Hg, ciśnienie rozkurczowe \geq 90 mm Hg); ** glucose \geq 100 mg/dL (stężenie glukozy \geq 100 mg/dl); *** cholesterol \geq 200 mg% (stężenie cholesterolu \geq 200 mg%), LDL \geq 130 mg% (stężenie cholesterolu frakcji LDL \geq 130 mg%); TIA — transient ischemic attack (przemijające niedokrwienie mózgu)

logical and immunohistochemical changes in atherosclerotic plaques have been set out in Table III and IV. Plaques from both groups were mainly poor in cells and built of dense collagen (Figure 3A). However, those from patients with a symptomatic restenosis consisted of slightly more loose connective tissue, richer in spindle-shaped cells resembling myocytes: myofibroblasts and fibroblasts (41% vs. 12%, $p = 0.02$). Also, plaques of patients from group I were bigger and their atherosclerotic changes more advanced: larger foci of necrosis, calcium, cholesterol deposits, fibrous cap rupture with subsequent ulceration, thrombosis and haemorrhages into the plaque (Figure 3B). Fragments of thrombi and intraplaque haemorrhages were present in plaques from 5 patients from group I and 2 patients from group II. Thrombi showed more or less advanced features of organisation in the form of ingrowth of fibroblasts and capillaries. They sometimes possessed elements of atheromatous material. Aggregates of fibrin with an admixture of erythrocytes and leukocytes, without evidence of organisation, were noted in several plaques but were not qualified as "thrombi" but as resulting from

i 2). Dane kliniczne tych chorych przedstawiono w tabeli II. Wartości ciśnienia tętniczego, badań biochemicznych i czynniki ryzyka rozwoju miażdżycy były podobne w obu grupach.

Wyniki badań mikroskopowych i immunohistochemicznych

Błazki miażdżycowe pobrane w czasie endarterektomii tętnic szyjnych składały się z fragmentów zbitę, głównie ubogokomórkowej tkanki łącznej z obecnością lub bez komórek piankowatych, limfocytów, komórek tucznych, złogów cholesterolu i wapnia oraz ognisk martwicy. Zmiany histopatologiczne i immunohistochemiczne w błazkach miażdżycowych przedstawiono w tabeli III i IV. W obu grupach przeważały błazki miażdżycowe o małej komórkowości zbudowane ze zbitego kolagenu (ryc. 3A). Nie mniej jednak w zmianach z następującą restenozą częściej pojawiały się błazki złożone z luźniejszej tkanki łącznej i wykazujące większą komórkowość, zawierające komórki wrzecionowate przypominające komórki mięśniowe: miofibroblasty i fibroblasty (41% vs. 12%, $p = 0,02$). Ponadto w grupie I

Table III. Histopathological lesions in the material acquired during CAE
Tabela III. Zmiany histopatologiczne w materiale z endarterektomii tętnic szyjnych

Lesion Zmiana	Total Ogółem	Group I Grupa I (n = 26)			Total Ogółem	Group II Grupa II (n = 26)			p
		+	++	+++		+	++	+++	
Parietal thrombi Zakrzepy przyścienne	5 (29.4%)	2	0	2	2 (12%)	1	0	1	0.035
Intraplaque haemorrhages Wylewy śródbłazkowe	8 (47%)	4	3	1	0	0	0	0	0.001
Intimal hyperplasia Hiperplazja intymy	16 (94%)	7	6	3	11 (65%)	6	0	5	0.041
Inflammatory infiltrations Nacieki zapalne	13 (76%)	10	3	0	12 (71%)	12	0	0	NS
Foci of necrosis Ogniska martwicy	12 (71%)	3	3	6	7 (41%)	4	2	1	0.06
Calcium deposits Złogi wapnia	9 (53%)	7	2	0	6 (35%)	6	0	0	NS
Cholesterol deposits Złogi cholesterolu	11 (65%)	5	6	0	7 (41%)	6	1	0	NS
Angiogenesis Angiogeneza	15 (88%)	9	6	0	12 (71%)	10	2	0	NS
Fibro-sclerotic plaque Błazka włóknisto-szklista	10 (59%)				15 (88%)				0.06
Fibro-cellular plaque Błazka włóknisto-komórkowa	7 (41%)				2 (12%)				0.02
Fibrous cap ruptures Przerwanie ciągłości czapeczki	5 (29.4%)				1 (6%)				0.015
Advanced plaque Błazka zawansowana	9 (53%)				4 (24%)				0.032

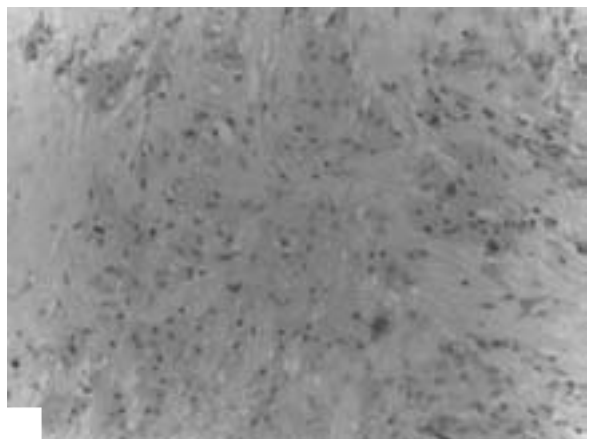
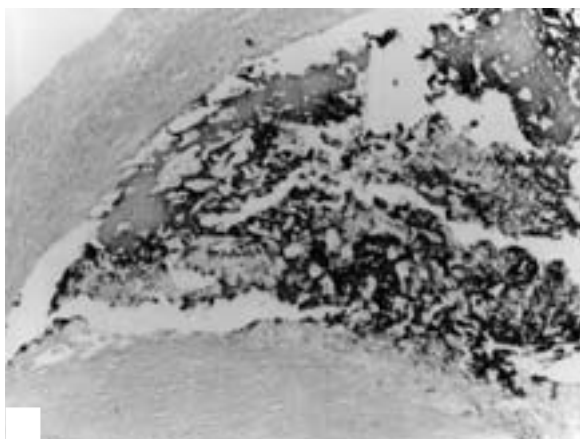
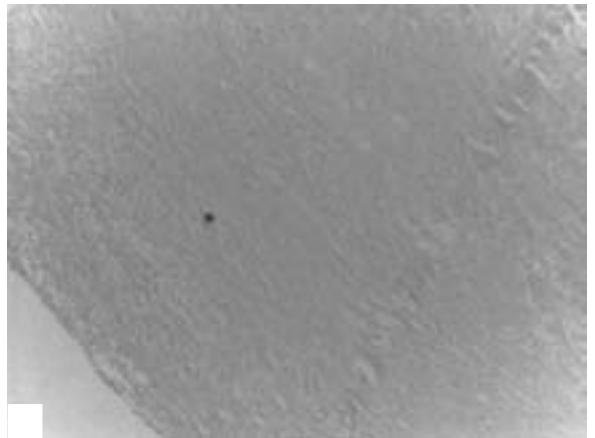
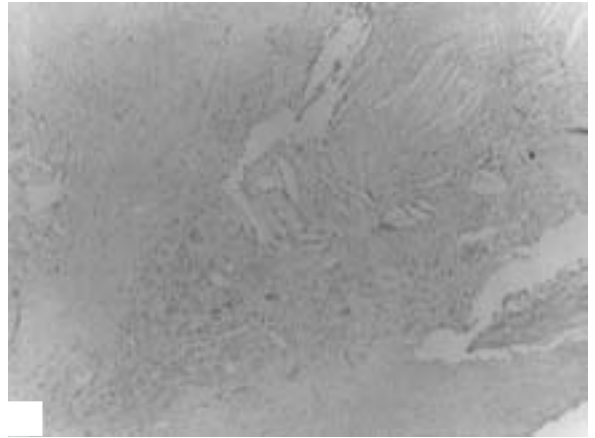
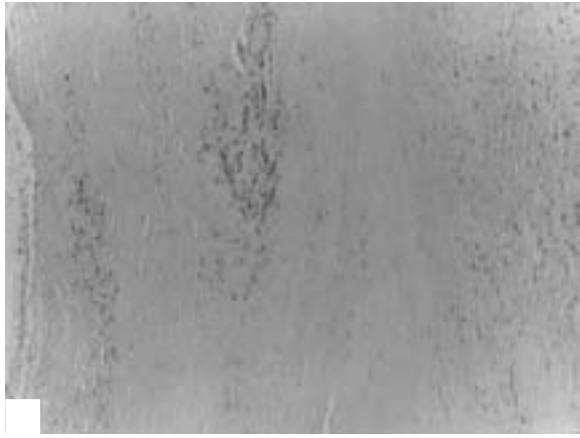
Table IV. Cell composition of atherosclerotic plaques acquired from CAE (% of cells in relation to all cellular nuclei)**Tabela IV.** Skład komórkowy blaszek miażdżycowych z endartrektomii tętnic szyjnych (odsetek komórek w stosunku do wszystkich jąder komórkowych)

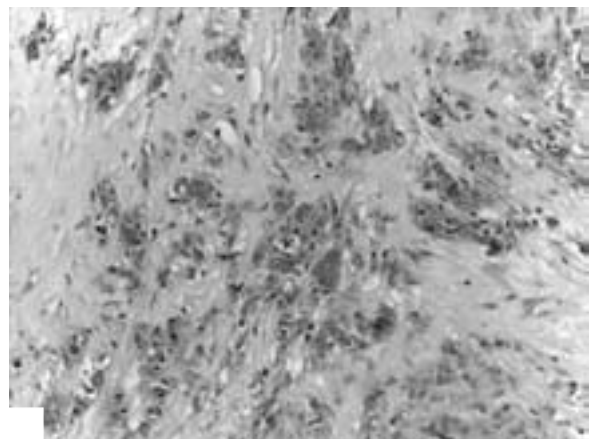
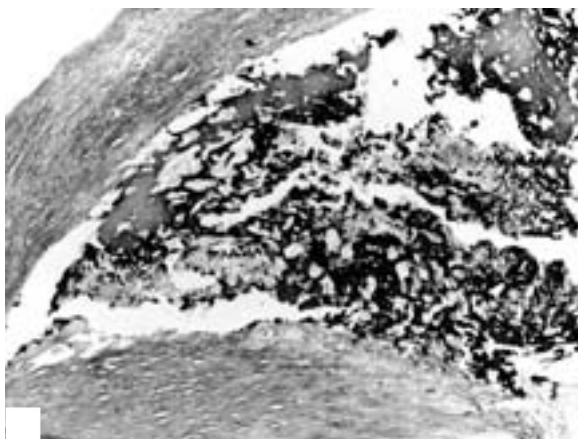
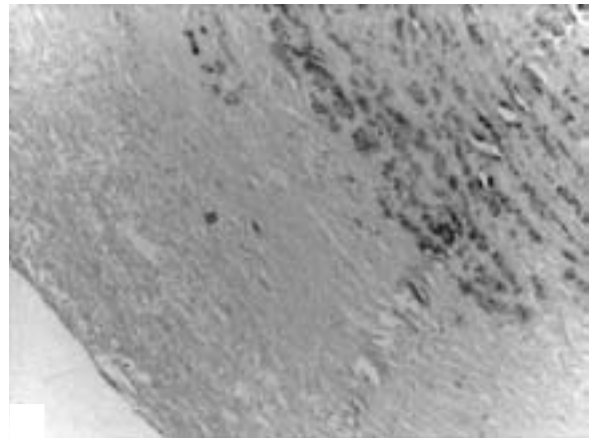
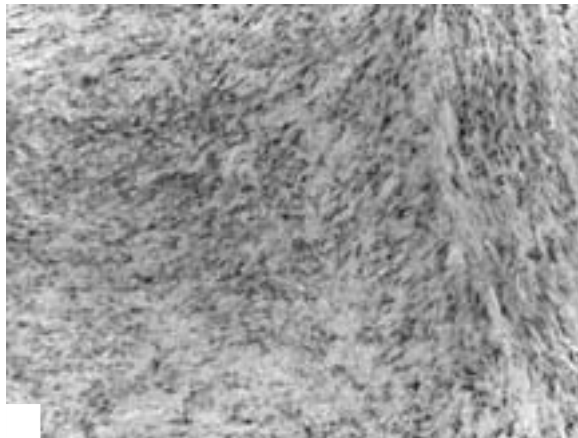
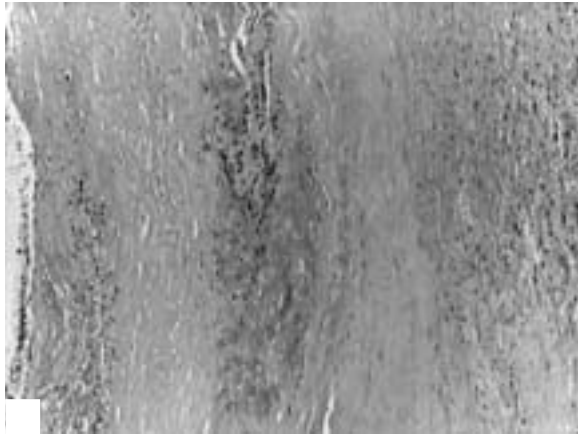
Atherosclerotic plaque Blaszka miażdżycowa	Group I Grupa I (n = 26) (%)	Group II Grupa II (n = 26) (%)	p
Smooth muscle cells (SMA+) Komórki mięśni gładkich	20	9.1	< 0.005
Fibrinogen (Fbg+)* Fibrynogen*	17	6.4	< 0.005
Macrophages (Mac 387+) Makrofagi	6	12.6	0.007
T lymphocytes (CD3+) Limfocyty T	10	7.4	0.055
T helper lymphocytes (OPD4+) Limfocyty T <i>helper</i>	8.2	5.3	0.06
T suppressor lymphocytes (CD8+) Limfocyty T <i>suppressor</i>	1.2	0.8	NS
B lymphocytes (CD20+) Limfocyty B	0.7	0.5	NS
Mast cells (mast cells tryptase +) Komórki tuczne	3.8	3.5	NS
Endothelium cells (CD34 +) Komórki śródbłonka	5.1	4.2	NS
HLA DPDQDR	15.2	16.7	NS

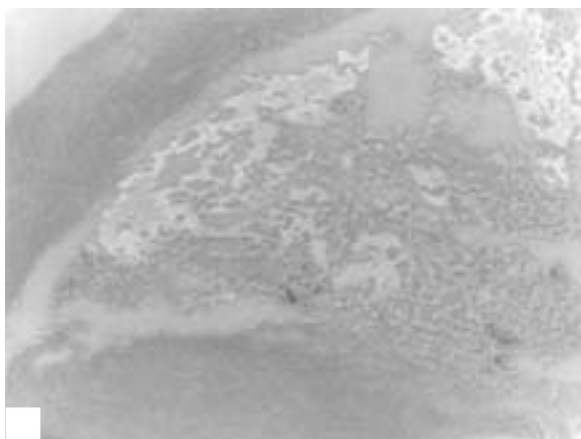
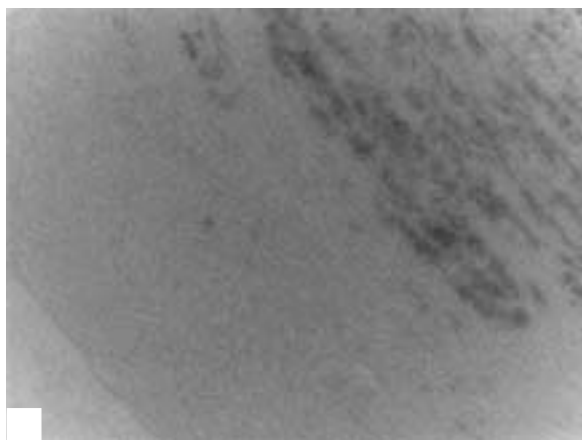
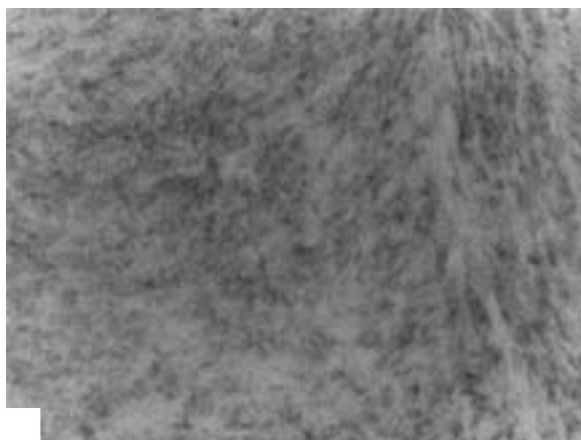
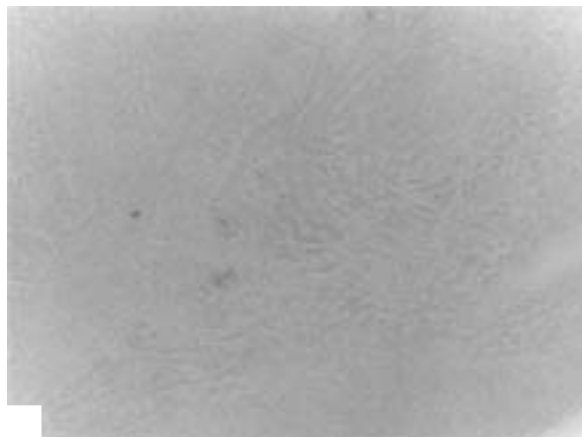
*percentage of plaque involvement by fibrinogen (procentowa zawartość złożeń fibrynogeny w blaszce)

intraoperative damage. Fibrous cap rupture was statistically more frequent in the restenosis group (29.4% vs. 6%, $p = 0.015$). The intimal hyperplasia observed more often in the restenosis group (94% vs. 65%, $p=0.041$) were characterized by proliferation of stellate and spindle-shaped cells of myo- and fibromatous origin in loose, myxoid stroma. These cells dominated in several plaques. Immunohistochemically, the above-mentioned cells showed positive reactions with SMA. This indicates their muscular origin. The percentage of smooth muscle cells was higher in atherosclerotic plaques from restenotic cases (20% vs. 9.1%, $p < 0.005$) (Figures 3C i 3D). Atherosclerotic plaques of patients from group I contained more fibrinogen than those from group II (17% vs. 6.4%, $p < 0.005$). Fibrinogen was seen in all plaque layers, both on the surface, where it was entirely or partially covered by endothelium, and in deeper layers (Figure 3E). Angiogenesis was determined on the base of CD34 expression on the endothelial cells. It was more frequent and intensive in the restenotic group. The newly formed vessels were surrounded by inflammatory infiltrations of lymphocytes, macrophages and mast cells. Inflammatory infiltrations consisting of T lymphocytes (CD3+), mainly with a helper/inducer phenotype (OPD4+) and less abundant B lymphocytes were observed.

częściej obserwowano blaszki o większych rozmiarach i o większym stopniu zaawansowania zmian miażdżycowych z dużymi ogniskami martwicy, złożeń wapnia, cholesterolu, a także z przerwaniem ciągłości czapeczki włóknistej z następowymi owrzodzeniami, zakrzepami i wylewami śródblaszkowymi (ryc. 3B). Fragmenty zakrzepów i wylewy śródblaszkowe stwierdzono u 5 chorych z grupy I i u 2 pacjentów z grupy II. Zakrzepy wykazywały mniej lub bardziej nasilone cechy organizacji w postaci wzrostu fibroblastów i drobnych naczyń oraz czasami zawierały elementy materiału kaszowatego. Złogi włóknika z domieszką erytrocytów i leukocytów bez cech organizacji były obecne w kilku materiałach, ale nie kwalifikowano ich jako właściwych zakrzepów tylko jako zmiany związane z uszkodzeniem w czasie zabiegu. Przerwanie ciągłości czapeczki włóknistej występowało statystycznie częściej w grupie chorych z restenozą (29,4% vs. 6%, $p = 0,015$). Rozrost intymy — częściej notowany w grupie chorych z restenozą (94% vs. 65%, $p = 0,041$) — charakteryzował się proliferacją gwiazdkowatych i wrzecionowatych komórek pochodzenia włóknisto-mięśniowego w luźnym, myksoidnym podścielisku. W niektórych blaszkach zmiany te dominowały. Immunohistochemicznie powyższe komórki wykazywały dodatnie odczyny z SMA, świad-







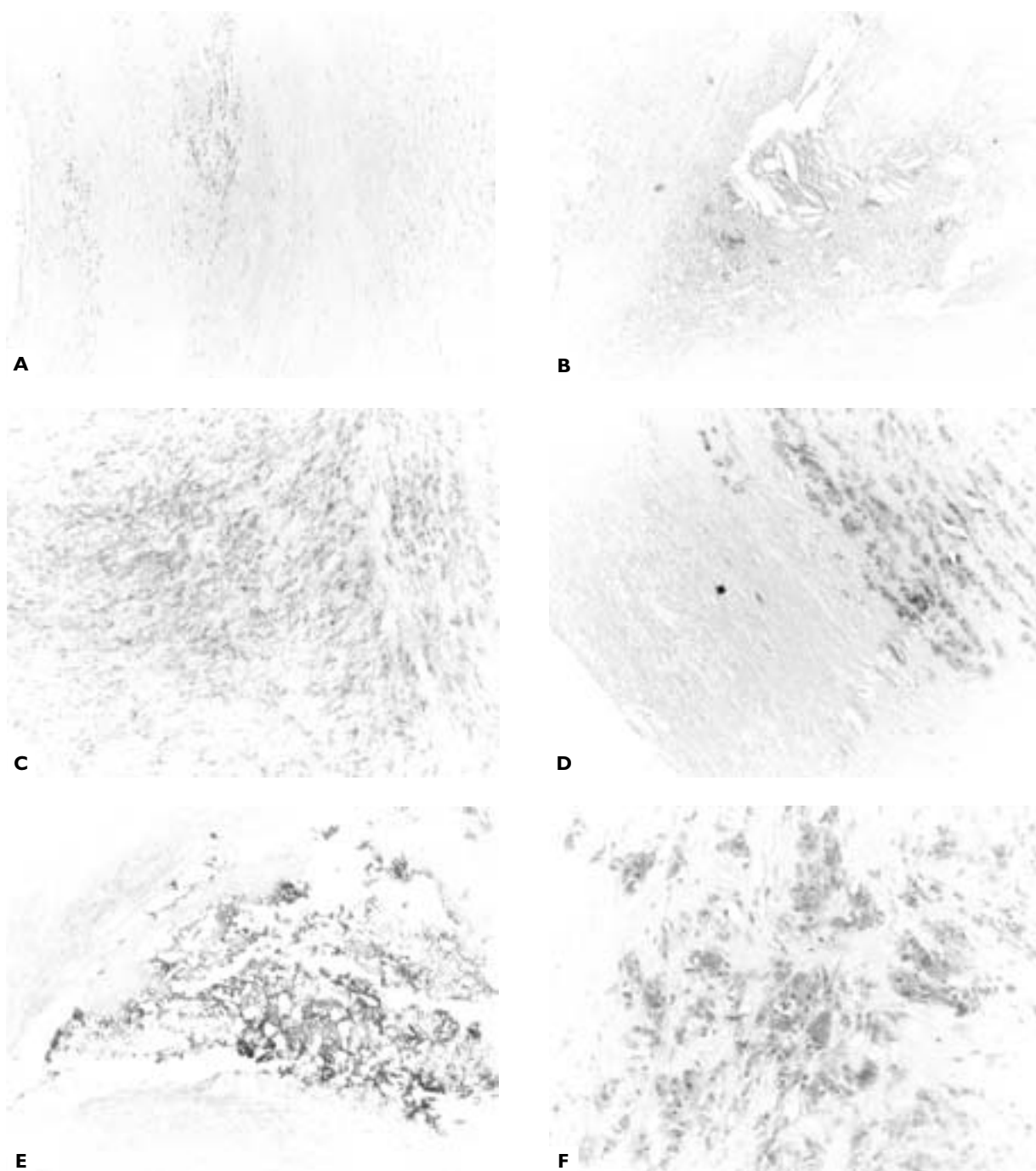


Figure 3. Representative atherosclerotic plaques acquired from group I (A–C) and group II (D–F); **A.** Fibrosclerotic plaque composed of dense fibrous connective tissue with scattered spindle and inflammatory cells. H-E stain. Magn. 100×; **B.** Advanced atherosclerotic plaque rich in cells, rupture of fibrous cap, foci of necrosis and abundant deposits of cholesterol. H-E stain. Magn. 100×; **C.** Intimal hyperplasia. Spindle- and stellate-shaped cells in loose myxoid stroma. Most of these cells are SMA positive. Envision stain. Magn. 200×; **D.** Atherosclerotic plaque containing single SMA positive cells. Note: numerous SMA + cells in media of carotid artery. Envision stain. Magn. 200×; **E.** Profuse fibrinogen deposits localized in the media. PTAH stain. Magn. 100×; **F.** Atherosclerotic plaque rich in (Mac 387+) macrophages. Envision stain. Magn. 100×

Rycina 3. Reprezentatywne blaszki miażdżycowe chorych z grupy I (B, C, E) i grupy II (A, D, F); **A.** Włóknisto-szkliwiejąca blaszka miażdżycowa składająca się ze zbitej tkanki łącznej z nielicznymi komórkami wrzecionowatymi i komórkami zapalnymi. Barw. H-E. Pow. 100×; **B.** Zaawansowana blaszka miażdżycowa. Blaszka bogatokomórkowa z przerwaniem czapeczki włóknistej, ogniskami martwicy i obfitymi złoгами cholesterolu. Barw. H-E. Pow. 100×; **C.** Rozrost błony wewnętrznej. Wrzecionowate i gwiazdkowate komórki w luźnym myksoidnym podścielisku. Większość z tych komórek wykazuje dodatnie odczyn na obecność aktywności mięśni gładkich (SMA+). Barw. Envision. Pow. 200×; **D.** Blaszka miażdżycowa zawierająca nieliczne komórki w błonie środkowej tętnicy szyjnej. Barw. Envision. Pow. 200×; **E.** Obfite złoży fibrynowe zlokalizowane w błonie środkowej. Barw. PTAH. Pow. 100×; **F.** Dość liczne makrofagi (Mac 387+) w blaszce miażdżycowej. Barw. Envision. Pow. 100×

phocytes (CD20+), suppressor/cytotoxic T lymphocytes (CD8+) and mast cells (mast cells tryptase +) were slightly more frequent and intense in group I. Diffuse and circumscribed lymphocytes could be found in the area of intima. Macrophages were found in the connective tissue of plaque, more abundantly in group II ($p = 0.007$) (Figure 3F). Most of them possessed a foamy cytoplasm, and in a few cases, they contained hemosiderin. HLAD-PQR antigen was present on most macrophages and activated lymphocytes. The percentage of inflammatory cells, which show the expression of HLA DR II class antigen, was similar in both groups

Discussion

The problem of diagnosis of restenosis after CAE remains open and controversial. Despite the expectations in the widely applied US technique, the question of defining the restenosis remains unanswered. Still, the majority of vascular departments remain true to the simplified US assessment of stenosis based on flow velocity criteria of the operated artery. It does not include the evaluation of the intima-media complex (IMT). This is probably the fundamental reason for the discordance in the diagnosis of restenosis. Due to this, and depending on the experience and qualifications of the diagnostician, the prevalence of restenosis varies. Analysis of more than 200 leading publications that appeared between 1966 and 1996, allowed Lattimer and Burnand to state that the prevalence of symptomless restenosis varies between 1.3% and 37% [9]. In contrast, the frequency of symptomatic restenosis is between 0% and 8.2% [9]. According to DeGroot et al. the analysis of the frequency of hemodynamically significant restenosis is about 13% and hemodynamically insignificant about 15%. The combined index of restenosis in their work was 28% [10]. Kieny et al. assessed the prevalence of restenosis in their own material as 11.9% [11]. Volteas et al. gave a figure of 18.5% [12], and Liapis et al. 21.6% [13].

To avoid this controversial problem we have decided to isolate and analyze only two undisputable groups: patients with a firm and hemodynamically significant restenosis and those with a complete lack of proliferation of the IMT complex and a regular flow spectrum in the internal carotid artery (ICA).

The progress in the diagnosis of carotid artery lesions did not bring us closer to answering the question - what are the causes of restenosis? Likewise, studies conducted in other directions did not explain which factors actually enhance restenosis following CAE or CAS, and what the real extent of the problem is. New strategies in the treatment of restenosis, based on inhibition of

część o ich mięśniowym pochodzeniu. Odsetek komórek mięśni gładkich w blaszce miażdżycowej był większy w przypadkach z następową restenozą niż bez niej (20% vs. 9,1%, $p < 0,005$) (ryc. 3C i D). W blaszkach miażdżycowych chorych z grupy I wykazano większy udział fibrynogenu niż u chorych z grupy II (17% vs. 6,4%, $p < 0,005$). Fibrynogen zaobserwowano we wszystkich warstwach blaszki zarówno na powierzchni, gdzie był całkowicie lub częściowo pokryty przez śródbłonek, jak i w głębszych warstwach (ryc. 3E). Powstawanie nowych naczyń określane na podstawie ekspresji CD34 na komórkach śródbłonna stwierdzano nieco częściej i w większym nasileniu w grupie chorych z restenozą. Wokół drobnych nowopowstałych naczyń gromadziły się nacieki zapalne z limfocytów, makrofagów i komórek tucznych. Nacieki zapalne złożone z limfocytów T (CD3+), głównie o fenotypie *helper/inducer* (OPD4+) oraz mniej licznych limfocytów B (CD20+), limfocytów T *supressor/cytotoxic* (CD8+) i komórek tucznych (tryptaza komórek tucznych+) nieco częściej i o nieco większym nasileniu występowały w grupie I. Limfocyty gromadziły się w rejonie błony wewnętrznej — rozproszone i w postaci skupień. Makrofagi występowały w tkance łącznej blaszek częściej w grupie II ($p = 0,007$) (ryc. 3F). Większość z nich miała piankową cytoplazmę, w kilku przypadkach stwierdzono obecność złogów hemosyderyny. Antygen HLADPDQDR zaobserwowano na większości makrofagów i aktywowanych limfocytów. Odsetek komórek zapalnych wykazujących ekspresję antygeny HLA DR klasy II był podobny w obu grupach.

Dyskusja

Problem rozpoznawania restenozy po operacjach tętnic szyjnych pozostaje otwarty i kontrowersyjny. Powszechne stosowanie technik ultrasonograficznych wbrew nadziejom nie rozwiązało kwestii ustalenia właściwej definicji restenozy. Nadal większość ośrodków stosuje uproszczoną, ultrasonograficzną ocenę stopnia zwężenia, opartą na kryteriach prędkości przepływu w operowanej tętnicy. Nie uwzględnia to jednak oceny kompleksu *intima-media* (IMT). Przypuszczalnie jest to jedna z zasadniczych przyczyn tak dużej rozbieżności w rozpoznawaniu występowania restenoz. Dlatego też, w zależności od stopnia kwalifikacji oraz metod rozpoznawania, ich występowanie ocenia się różnie. Na podstawie ponad 200 najważniejszych publikacji, które ukażały się w latach 1966–1996, Lattimer i Burnand określili częstość występowania bezobjawowej restenozy na 1,3–37%, zaś objawowej restenozy na 0–8,2% [9]. DeGroot i wsp. zaobserwowali hemodynamicznie istotną restenozę u 13% pacjentów, a hemodynamicznie nieistotną restenozę — u 15% chorych. Łącznie

smooth muscle cells proliferation were successful in the case of animal models, but proved to be ineffective in humans [14].

According to the works of other authors [3, 6], classic atherosclerosis risk factors did not play a role in the development of restenosis. Comparison of the frequency of strokes between both groups gave surprising results. Eight patients from group I (30.1%), and two patients from group II (7.7%) experienced this neurological incident in the preoperative period. It seems to be a potentially valuable observation, especially with respect to the unstable plaque problem, but obviously requires additional studies (e.g. multivariate analysis).

However, histopathological and immunohistochemical examinations of the primary atherosclerotic plaques acquired from patients with and without restenosis showed differences in the constitution of plaques. Those from group I patients were richer in smooth muscle cells (SMA+) and fibrinogen (Fbg+) in comparison with lesions from group II. Restenosis results from excessive healing reaction of the vascular wall in response to CAE. This results from the migration of smooth muscle cells into the intima, and their proliferation followed by excretion of intracellular substance. These processes lead to neointimal formation [15, 16]. The haemorrhages into the plaque, thrombogenesis and other mitogenic factors may elicit the expression of numerous growth factors and secretion of proinflammatory cytokines in this complicated process. This leads to the proliferation and migration of smooth muscle cells from the medial layer [17]. Expression of such growth factors as bFGF, PDGF AA, AB and α br on smooth muscle cells has been demonstrated in the process of restenosis [18]. Pauletto et al. observed not only an increase in the number of smooth muscle cells of fetal type in primary atherosclerotic plaques of restenotic patients, but also a reduction of their quantity in the media underneath the plaque [6]. This observation suggests that the above-mentioned cells possess the ability to migrate and accumulate in the intima after revascularization. Other studies showed that the process of intimal proliferation was associated with a change in the properties of vascular smooth muscle cells, from the contractile (quiescent) phenotype characterized by the presence of α actine and smooth-muscle myosin, to a synthetic or proliferating (activated) one [19]. Simons et al. proved that the expression of the B isoform of nonmuscle myosin heavy chain, the main nonmuscular myosin isoform in activated muscle cells, is more intensive in atherosclerotic plaques from patients with a greater risk of restenosis [20]. The observed migration of smooth muscle cells and proliferative activity in advanced atherosclerotic

wskaźnik restenoz wyniósł 28% [10]. Kieny i wsp. u badanych pacjentów ocenili częstość restenoz na 11,9% [11], Volteas i wsp. na 18,5% [12], a Liapis i wsp. na 21,6% [13].

W niniejszej pracy, by uniknąć tego kontrowersyjnego problemu, zdecydowano się jedynie na wyodrębnienie i analizę dwóch niebudzących wątpliwości grup: chorych ze zdecydowaną, istotną hemodynamicznie restenozą oraz pacjentów, u których stwierdzono całkowity brak proliferacji kompleksu IMT i oczywiście prawidłowe spektrum przepływu w tętnicy szyjnej wewnętrznej.

Należy sądzić, że postępy w diagnostyce zmian w tętnicach szyjnych nie umożliwiły ustalenia przyczyny występowania restenoz. Również wyniki badań prowadzonych w innych kierunkach nie wyjaśniły, jakie czynniki rzeczywiście sprzyjają rozwojowi restenozy po zabiegach CAE czy CAS oraz jaka jest rzeczywista skala problemu. Nowe metody leczenia restenozy, przeprowadzone na modelach zwierzęcych, polegające na zahamowaniu proliferacji mięśni gładkich zakończone powodzeniem nie są skuteczne u ludzi [14].

Podobnie jak w pracach innych autorów [3, 6] klasyczne czynniki ryzyka miażdżycy nie miały znaczenia w powstawaniu restenozy. Zaskakującym spostrzeżeniem jest porównanie częstości wystąpienia udarów — w grupie I przeżyło go 8 (30,1%) chorych, podczas gdy w grupie II zaledwie 2 (7,7%) osoby przed zabiegiem operacyjnym. Wydaje się że jest to cenne spostrzeżenie, szczególnie w kontekście badań dotyczących blaszki niestabilnej, ale wymaga ono oddzielnych badań weryfikujących (m.in. analizy wieloczynnikowej).

Natomiast badania histopatologiczne i immunohistochemiczne pierwotnych blaszek miażdżycowych chorych z restenozą i bez niej wykazały, że istnieją różnice w ich budowie. Blaszki miażdżycowe pacjentów z grupy I charakteryzowały się liczniejszymi komórkami mięśni gładkich (SMA+) i większym udziałem fibrynogenu (Fbg+) w porównaniu z blaszkami chorych z grupy II. Restenoza jest wynikiem nadmiernej reakcji gojenia się ściany naczynia po zabiegu rewaskularyzacji, polegającym na migracji i proliferacji komórek mięśni gładkich do błony wewnętrznej i wydzielaniu przez nie substancji międzykomórkowej, co prowadzi do powstania neointymy [15, 16]. Jest to skomplikowany proces, w którym wylewy śródbłaskowe, zakrzepy i inne czynniki mitogenne mogą prowadzić do ekspresji licznych czynników wzrostu i wydzielania cytokin prozapalnych, co powoduje proliferację mięśni gładkich i ich migrację z błony środkowej [17]. Wykazano ekspresję czynników wzrostu: bFGF, PDGF AA, AB i α br na komórkach mięśni gładkich w resteno-

plaques could have been stimulated by the increased amount of fibrinogen [21, 22]. According to Naito et al. [23], fibrinogen gel may induce migration of vascular smooth muscle cells even in the absence of other chemotactic and chemokinetic substances. This suggests an important role of fibrinogen in the process of genesis and progression of both atherosclerosis and restenosis after angioplasty. This study was the first one to demonstrate the greater share of fibrinogen in atherosclerotic plaques in patients with restenosis than in the free of latter. This correlated with a higher number of smooth muscle cells. Plaques from patients of group II contained numerous macrophages. This observation is concordant with the data from the literature [6]. It suggests that macrophages and lipids play a role in the pathogenesis of atherosclerotic plaques but do not influence the genesis of neointima, namely the proliferation and migration of smooth muscle cells. Their depletion in the macrophage-rich regions has also been demonstrated [24]. It is probable that the low cellularity of plaques acquired from group II patients may be due to the slowing down of the passage of smooth muscle cells from the media to intima. This process may be connected with the direct influence of cytokines secreted by macrophages and lipids on differentiation of muscle cells [25, 26]. Opinions about the influence of macrophages on the process of restenosis are not concordant. There were studies that demonstrated an increased level of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in patients with restenosis; MCP-1 regulates macrophage migration [27].

Conclusion

We have shown that although classic risk factors of atherosclerosis do not play a role in the development of restenosis, the histopathological and immunohistochemical assessment of primary atherosclerotic plaques may be helpful to identify patients with an increased risk of restenosis after CAE. Our results require confirmation using a higher number of patients.

References

1. Hobson SW (2004) Carotid revascularisation endarterectomy vs. Stent Trial (CREST) update. ACS Clin Congress, USA: 153–154.
2. Moore WS, Kempczinski RF, Nelson JJ, Toole JF (1998) Recurrent carotid stenosis: results of the asymptomatic carotid atherosclerosis study. *Stroke*, 29: 20218–20225.
3. Lafont A, Guzman LA, Whitlow PL, Goormastic M, Cornhill Jf, Chisolm GM (1995) Restenosis after experimental angioplasty: intimal, medial, and adventitial changes associated with constrictive remodeling. *Circ Res*, 76: 996–1002.

zie [18]. Pauletto i wsp. zaobserwowali nie tylko zwiększenie liczby komórek mięśni gładkich (głównie o płodowym fenotypie) w pierwotnych blaszkach miażdżycowych u chorych z restenozą, ale i zmniejszenie liczby tych komórek w błonie środkowej tętnic w okolicy blaszek [6]. Sugeruje to, że te komórki mają zdolność migracji i gromadzenia się w błonie wewnętrznej po zabiegu rewaskularyzacji. W innych pracach również wykazano, że proces proliferacji intymy wiąże się ze zmianą właściwości komórek mięśni gładkich ze skurczowej, zawierających α aktynę i miozynę mięśni gładkich, do aktywnej, związanej z proliferacją i syntezą [19]. Simons i wsp. udowodnili, że ekspresja łańcuchów ciężkich B izoformu niemięśniowej miozyny (głównego niemięśniowego izoformu miozyny w aktywowanych komórkach mięśniowych) jest większa w blaszkach miażdżycowych u chorych, u których ryzyko restenozy jest zwiększone [20]. Przyczyną obserwowanej przez autorów niniejszej pracy migracji i aktywności proliferacyjnej mięśni gładkich w zaawansowanych blaszkach miażdżycowych mogła być stymulacja tych komórek przez zwiększone ilości fibrynogenu w blaszkach [21, 22]. Według Naito i wsp. [23] żel fibrynogenowy może powodować migrację komórek mięśni gładkich naczyń, nawet jeśli nie stwierdza się obecności innych substancji chemotaktycznych i chemokinetycznych, co sugeruje dużą rolę fibrynogenu w powstawaniu i progresji zarówno miażdżycy, jak i restenozy po angioplastyce. W niniejszej pracy po raz pierwszy zauważono większy udział fibrynogenu w blaszkach miażdżycowych u chorych z następową restenozą niż u pacjentów bez niej. Korelowało to ze zwiększoną liczbą komórek mięśni gładkich. W blaszkach miażdżycowych chorych z grupy II obserwowano zwiększoną liczbę makrofagów, co jest zgodne z danymi z piśmiennictwa [6]. Sugeruje to, że makrofagi i lipidy odgrywają rolę w patogenezie blaszek miażdżycowych, natomiast nie wpływają na powstawanie neointymy, czyli na proliferację i migrację komórek mięśni gładkich. Wykazano również brak występowania komórek mięśni gładkich w rejonach bogatych w makrofagi [24]. Być może obniżona komórkowość blaszek miażdżycowych u chorych z grupy II wiązała się ze zmniejszonym tempem przechodzenia komórek mięśni gładkich z błony środkowej do wewnętrznej. Proces ten może być związany z bezpośrednim wpływem cytokin wydzielanych przez makrofagi i lipidy na różnicowanie komórek mięśniowych [25, 26]. Zdania na temat wpływu makrofagów na proces restenozy są podzielone, ponieważ istnieją doniesienia, w których u chorych z restenozą wykazano podwyższone stężenie MCP-1, regulującej migrację makrofagów [27].

4. Pauletto P, Sartore S, Pessina AC (1994) Smooth-muscle-cell proliferation and differentiation in neointima formation and vascular restenosis. *Clin Sci*, 87: 467–479.
5. Rensing BJ, Hermans WR, Vos J et al (1993) Luminal narrowing after percutaneous transluminal coronary angioplasty: a study of clinical, procedural, and lesional factors related to long-term angiographic outcome: CARPORT Study Group. *Circulation*, 88: 975–985.
6. Pauletto P, Puato M, Faggini E et al (2000) Specific cellular features of atheroma associated with development of neointima after carotid endarterectomy. *Circulation*, 102: 771–778.
7. Carpenter JP, Lexa FJ, Davis JT (1994) Determination of duplex ultrasound criteria appropriate to the North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial. *Stroke*, 27: 695–699.
8. Faught WE, Mattos MA, Bemmelen PS, Sumner DS et al (1994) Color-flow duplex scanning of carotid arteries: new velocity criteria based on ROC analysis for threshold stenoses used in symptomatic and asymptomatic carotid trials. *J Vasc Surg*, 19: 818–828.
9. Lattimer CR, Burnand KG (1997) Recurrent carotid stenosis after carotid endarterectomy. *Br J Surg*, 84: 1206–1219.
10. DeGroot RD, Lynch TG, Jamil Z, Hobson RW (1987) Carotid restenosis: long-term noninvasive follow-up after carotid endarterectomy. *Stroke*, 18: 1603–16036.
11. Kieny R, Seiller C, Petit H (1994) Evolution of carotid restenosis after endarterectomy. *Cardiovasc Surg*, 2: 555–560.
12. Volteas N, Labropoulos N, Leon M, Kalodiki E, Chan P, Nicolaidis AN (1994) Risk factors associated with recurrent carotid stenosis. *Int Angiol*, 13: 143–147.
13. Liapis CD, Kakisis JD, Kostakis AG (2001) Recurrent carotid artery stenosis: natural history and predisposing factors. A long-term follow-up study. *Int Angiol*, 20: 330–336.
14. Lafont A, Durand E, Rahal S et al (1995) Restenosis: pathophysiology, treatment and prevention. *Ann Cardiol Angiol*, 44: 349–353.
15. MacLeod DC, Strauss BH, De Jong M et al (1994) Proliferation and extracellular matrix synthesis of smooth muscle cells cultured from human coronary atherosclerotic and restenotic lesion. *J Am Coll Cardiol*, 23: 59–65.
16. Nobuyoshi M, Kimura T, Ohishi H et al (1991) Restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty: pathologic observation in 20 patients. *J Am Coll Cardiol*, 17: 433–439.
17. Flugelman MY, Virmani R, Correa R et al (1993) Smooth muscle cell abundance and fibroblast growth factors in coronary lesions of patients with nonfatal unstable angina. *Circulation*, 88: 2493–2500.
18. Arbustini E, De Servi S, Bramucci E (1995) Comparison of coronary lesions obtained by directional coronary atherectomy in unstable angina, stable angina, and restenosis after either atherectomy or angioplasty. *Am J Cardiol*, 75: 675–682.

Wnioski

W niniejszej pracy wykazano, że chociaż klasyczne czynniki ryzyka miażdżycy nie odgrywają roli w powstawaniu restenozy, ocena histopatologiczna i immunohistochemiczna pierwotnych blaszek miażdżycowych może pomóc w identyfikowaniu pacjentów ze zwiększonym ryzykiem restenozy po endarterektomii tętnic szyjnych. Obserwacje te wymagają jednak potwierdzenia w badaniach obejmujących większą liczbę chorych.

19. Kocher O, Gabbiani F, Gabbiani G et al (1991) Phenotypic features of smooth muscle cells during the evolution of experimental carotid artery intimal thickening: biochemical and morphological studies. *Lab Invest*, 65: 459–470.
20. Simons M, Leclerc G, Safian RD, Isner JM, Weir L, Baim DS (1993) Relation between activated smooth-muscle cells in coronary-artery lesions and restenosis after atherectomy. *N Engl J Med*, 328: 608–613.
21. Bini A, Fenoglio JJ Jr, Mes-Tejada R, Kudryk B, Kaplan K (1989) Identification and distribution of fibrinogen, fibrin, and fibrin(ogen) degradation products in atherosclerosis. *Arteriosclerosis*, 9: 109–121.
22. Naito M, Hayashi T, Kuzuya M et al (1990) Effects of fibrinogen and fibrin on the migration of vascular smooth muscle cells in vitro. *Arteriosclerosis*, 83: 9–14.
23. Naito M, Nomura H, Iguchi T (1996) Migration of cultured vascular smooth muscle cells into cross-linked fibrin gels. *Thromb Res*, 84: 129–136.
24. Han DKM, Haudenschild CC, Hong MK, Tinkle BT, Leon MB, Liao G (1995) Evidence for apoptosis in human atherogenesis and in a rat vascular injury model. *Am J Pathol*, 147: 267–277.
25. Fukumoto Y, Shimokawa H, Ito A et al (1997) Inflammatory cytokines cause coronary arteriosclerotic-like changes and alterations in the smooth-muscle phenotypes in pigs. *J Cardiovasc Pharmacol*, 29: 222–231.
26. Aikawa M, Rabkin E, Voglic SJ et al (1998) Lipid lowering promotes accumulation of mature smooth muscle cells expressing smooth muscle myosin heavy chain isoforms in rabbit atheroma. *Circ Res*, 83: 1015–1026.
27. Cipollone F, Marini M, Fazio M et al (2001) Elevated circulating levels of monocyte chemoattractant protein-1 in patients with restenosis after coronary angioplasty. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21: 327–334.