

Inflammatory reaction and angiogenesis intensity in aortic wall according to clinical manifestation of abdominal aortic aneurysm

Ocena nasilenia procesu zapalnego i angiogenezy w ścianie aorty w zależności od obrazu klinicznego tętniaka aorty brzusznej

Marek Kunecki¹, Miłosz Andrzejewski¹, Agnieszka Nawrocka²

¹Department of General and Vascular Surgery, Medical University, Łódź, Poland, ²Department of Pathomorphology, Medical University, Łódź, Poland (¹Klinika Chirurgii Ogólnej i Naczyniowej AM w Łodzi,

²Katedra i Zakład Patomorfologii AM w Łodzi)

Abstract

Background. The aim of the study was the estimation of histological parameters in association with the clinical manifestation of aortic aneurysm, mainly the intensity of angiogenesis and inflammatory infiltration.

Material and methods. Material was obtained from patients operated on in the Department of General and Vascular Surgery at the Medical University of Łódź in 1998–2000. The samples of aortic wall were fixed in formalin. 98 cases were selected for the study and divided into 5 groups: 1. Patients with aneurysms undergoing elective surgery ($n = 50$); 2. Patients with aneurysms symptomatic and ruptured ($n = 18$); 3. Patients with aneurysms coexisting with aorto-iliac occlusion ($n = 9$); 4. Patients with aorto-iliac occlusion without aneurysm ($n = 14$); 5. Control group with normal aorta obtained from organ donors ($n = 7$). Slides were stained with $h + e$, the presence of inflammatory reaction was estimated according to conditions described in Histologic Inflammatory Scale Aneurysm. The numbers of T-cells, B-cells and macrophages were calculated after immunohistochemistry. The number of blood vessels was described semi-quantitatively, using the 3-degree scale.

Results. The intensity of angiogenesis in the second group was significantly higher than in the other groups. In this group we found the highest number of macrophages in adventitia ($M = 47$ vs. $M = 37$ in the first group; $p < 0.01$), T-cells in media ($M = 447$ vs. 292 ; $p < 0.01$), B-cells in adventitia ($M = 633$ vs. $M = 431$; $p < 0.01$) and neutrophils ($M = 26$ vs. $M = 7$; $p < 0.01$). The symptomatic group also had the biggest intensity of inflammatory reaction estimated in HISA.

Conclusions. We show the correlation between angiogenesis and inflammatory intensity and clinical manifestation of aneurysm.

Key words: abdominal aortic aneurysm, angiogenesis, macrophages, lymphocytes

Streszczenie

Wstęp. Celem pracy jest ocena parametrów histologicznych w zależności od obrazu klinicznego tętniaka ze szczególnym uwzględnieniem obecności i jakości procesu zapalnego oraz nasilenia angiogenezy.

Materiał i metody. Materiał pobierano od chorych operowanych w Klinice Chirurgii Ogólnej i Naczyniowej AM w Łodzi w latach 1998–2000. Fragmenty ściany aorty utrwalano w 9-procentowym formaldehydzie. Do badań zakwalifikowano 98 przypadków. Wyróżniono 5 grup badawczych: 1. Chorzy z tętniakami operowanymi planowo ($n = 50$); 2. Osoby z tętniakami objawowymi i pękniętymi ($n = 18$); 3. Pacjenci z tętniakami aorty współistniejącymi z niedrożnością aortalno-biodrową ($n = 9$); 4. Chorzy z niedrożnością aortalno-

Address for correspondence (Adres do korespondencji):

Dr med. Marek Kunecki, Klinika Chirurgii Ogólnej i Naczyniowej AM, ul. Wólczańska 195, 90–531 Łódź, Poland
tel./fax: +48 (0 42) 636 86 51, e-mail: mkunik@poczta.onet.pl

-biodrową bez tętniaka ($n = 14$); 5. Grupa kontrolna — osoby z prawidłową aortą pobraną od dawców narządów ($n = 7$). Preparaty barwione h + e oceniano pod względem obecności i/lub nasilenia procesu zapalnego, stosując skalę HISA, określano liczbę limfocytów T, limfocytów B, makrofagów oraz liczbę naczyń krwionośnych. W badaniach półilościowych oceniano liczbę naczyń w skali 1–3. Wyniki poddano analizie statystycznej z użyciem testu Manna-Whitneya.

Wyniki. Nasilenie angiogenezy w grupie 2 było znamienne statystycznie wyższe niż w pozostałych grupach. W grupie tej stwierdzono także największą liczbę makrofagów w błonie zewnętrznej ($M = 47$ vs. $M = 34$ w grupie 1; $p < 0,01$), limfocytów T w błonie środkowej ($M = 447$ vs. $M = 292$; $p < 0,01$), limfocytów B w błonie zewnętrznej ($M = 633$ vs. $M = 431$; $p < 0,01$), a także granulocytów ($M = 26$ vs. $M = 7$; $p < 0,01$). Grupę chorych z tętniakami objawowymi charakteryzowało także największe nasilenie procesu zapalnego w ścianie aorty oceniane w skali HISA.

Wnioski. Wykazano korelację pomiędzy nasileniem procesu zapalnego i angiogenezy w ścianie aorty a klinicznymi objawami tętniaka.

Słowa kluczowe: tętniak aorty brzusznej, angiogeneza, makrofagi, limfocyty

Introduction

Today, the majority of authors consider that an abdominal aortic aneurysm of a diameter below 50–55 mm should be observed and periodically controlled with sonography or CT. The surgery should be performed when the diameter crosses beyond the limit and the risk of rupture is higher than the risk of operation [1]. But following these rules demands an acceptance of the fact that some small aneurysms may rupture earlier. The clinical management of patients with high surgery risk (mainly because of heart diseases) remains unresolved. These patients are often refused elective surgery, which may condemn these people to emergency operation.

The search for any parameter to estimate more precisely the risk of rupture may be important to improve the results of treatment of AAA. Precise analysis of geometric data based on imaging techniques and evaluation of the changes indicating the risk of rupture are now the field of interest. However the latest investigations showed that aneurysm formation and its development is rather more dependent on aorta wall remodelling than on strictly haemodynamic changes. It seems to be reasonable to study the processes of aorta wall destruction and to look for their biochemical indicators.

The aim of this study is an estimation of histological parameters and their correlation with clinical history of abdominal aortic aneurysm, mainly an evaluation of the presence and composition of inflammatory infiltration and intensity of angiogenesis.

Material and methods

Material was obtained from 147 patients operated on in the Department of General and Vascular surgery

Wstęp

Obecnie większość autorów uważa, że tętniaki poniżej 50–55 mm wymagają obserwacji klinicznej oraz okresowej kontroli ultrasonograficznej, a decyzję o planowej operacji należy podjąć, kiedy ich poprzeczny wymiar przekroczy powyższą wartość graniczną, przy której ryzyko pęknięcia tętniaka jest większe niż ryzyko zabiegu [1]. Takie postępowanie wymaga zaakceptowania faktu, że u pewnej liczby chorych wcześniej rozpoznany i obserwowany mały tętniak aorty pęknie przed osiągnięciem granicznej wielkości. Problem kliniczny stanowi dotychczas sposób postępowania u chorych z tętniakiem aorty należących do grupy wysokiego ryzyka operacyjnego (zwykle spowodowanego obciążeniami kardiologicznymi). U takich chorych często nie przeprowadza się planowej operacji, co wobec braku możliwości dokładnej oceny ryzyka pęknięcia, „skazuje” ich na ewentualną operację w trybie nagłym.

Dlatego poszukiwania parametrów określających ryzyko pęknięcia tętniaka dokładniej niż jego poprzeczny wymiar prawdopodobnie ma istotne znaczenie dla poprawy wyników leczenia tętniaków aorty brzusznej. Obecnie poszukiwania te głównie prowadzi się, korzystając z coraz doskonalszych badań obrazowych tętniaków, które umożliwiły bardzo precyzyjną ocenę ich geometrii oraz zmian w ścianie świadczących o zwiększonym ryzyku pęknięcia. Jednak badania przeprowadzone w ciągu ostatnich 20 lat wykazały, że powstanie i rozwój tętniaka aorty bardziej wiąże się ze zmianami w ścianie naczyń niż z czysto mechanicznym rozkładem sił w aorcie. Dlatego celowe wydaje się badanie zjawisk i procesów prowadzących do destrukcji ściany aorty

in 1998–2000, because of abdominal aortic aneurysm (AAA) or aorto-iliac occlusion (AIO). We collected:

1. Clinical data (age, sex, clinical symptoms, aneurysm size, estimated sonography, computer tomography).
2. The specimen fragments of aorta wall were taken during surgery and were fixed in 9% formalin.

After the initial histological analysis we took 98 cases for study. Patients were divided into 5 groups, as presented in Table I.

Tissue specimens were fixed in formalin and embedded in paraffin, later cut and stained with haematoxylin and eosine (h + e). The quality of the specimen was examined, and 98 cases were accepted for the study. The presence and intensity of the inflammatory process was classified in the 4-degree Histologic Inflammatory Scale of Aneurysm (0–3) [2].

With immunohistochemistry we estimated the number of T, B cell and macrophages, using antibodies anti-CD3, anti-CD20 and anti-CD68, respectively, with the LSAB visualisation system from DAKO. Morphometric analysis was done in 4 μ m thick slides. We counted positive cells in 10 fields in every layer of the aorta wall (intima, media, adventitia). In the same way we counted the number of neutrophils stained h + e. For statistical analysis we used the Mann-Whitney test with Bonferroni inequality (p index was lowered to $p < 0.01$).

Immunohistochemistry was performed with anti-von Willebrand factor to show vascular walls. For vascular counting we used the semiquantitative method with the 3-degree scale: +, ++, ++++. The results were analysed with the statistical Mann-Whitney test.

oraz poszukiwanie parametrów biochemicznych odzwierciedlających ich intensywność.

Celem niniejszej pracy jest ocena parametrów histologicznych w zależności od klinicznego przebiegu tętniaka ze szczególnym uwzględnieniem obecności i jakości procesu zapalnego i nasilenia angiogenezy.

Materiał i metody

Zebrano materiał od 147 pacjentów operowanych w Klinice Chirurgii Ogólnej i Naczyniowej w latach 1998–2000 z powodu tętniaka aorty brzusznej (AAA, *abdominal aortic aneurysm*) lub niedrożności aortalno-biodrowej (AIO, *aorto-iliac occlusion*). Materiał obejmował:

1. Dane kliniczne (wiek, płeć, wystąpienie objawów klinicznych tętniaka, wielkość tętniaka w ocenie ultrasonograficznej i/lub tomografii komputerowej, tryb operacji).
2. Fragmenty ściany aorty pobrane w czasie operacji, utrwalane w 9-procentowym formaldehydzie.

Po wstępnej analizie histologicznej, do badań zakwalifikowano 98 przypadków. W tabeli I przedstawiono charakterystykę chorych podzielonych na 5 grup.

Materiał utrwalany w formalinie przeprowadzono do blozków parafinowych, skrawano i barwiono hematoksyliną i eozyną (h + e). Następnie oceniano jakość pobranego wycinka i jego przydatność do badań immunohistochemicznych. Preparaty zakwalifikowane do dalszych badań ($n = 98$) oceniano pod względem obecności i/lub nasilenia procesu zapalnego, stosując 4-stopniową skalę HISA (*Histologic Inflammatory Scale Aneurysm 0–3*) [2].

Table I. Patients and procedure characteristics

Tabela I. Charakterystyka chorych i postępowanie

Group (abbrev.) Grupa (skrót)	Diagnosis Rozpoznanie	Procedure mode Tryb operacji	Number of patients Liczba pacjentów	Aneurysm diameter: extremal values/(modal) Wielkość tętniaka: wartości skrajne/(modalna) [mm]
Group 1 (elective AAA) Grupa 1 (AAA planowe)	Asymptomatic aneurysms Tętniaki bezobjawowe	Elective Planowy	50	42–120/(61)
Group 2 (symptomatic AAA) Grupa 2 (AAA objawowe)	Symptomatic and ruptured aneurysms Tętniaki objawowe i pęknięte	Emergency Pilny	18	48–120/(95)
Group 3 (AAA + AIO) Grupa 3	Abdominal aortic aneurysms and aorto-iliac occlusion Tętniaki aorty współistniejące z niedrożnością aortalno-biodrową	Elective Planowy	9	34–70
Group 4 (AIO) Grupa 4	Aorto-iliac occlusion Niedrożność aortalno-biodrowa	Elective Planowy	14	
Group 5 (control) Grupa 5 (kontrolna)	Normal aorta obtained from organ donors Prawidłowa aorta pobrana od dawców narządów	—	7	

Results

We revealed that the intensity of the inflammatory process was especially high in the group of symptomatic AAA (group 2) (III degree — 61%; $n = 11$), high intensity was sometimes observed in electively operated AAA (group 1) (III degree — 32%; $n = 16$). Low intensity was typical in AIO (group 4) (I degree — 64.3%; $n = 9$). Almost no inflammatory cells were found in control group (grade 0 — 86%; $n = 6$). Results are presented in Table II.

Statistical differences were seen in macrophage numbers between studied groups. The highest macrophage number in adventitia and media was found in group 2 ($M_{mp} = 47$ and 29). The macrophage number was lower in group 1 ($M_{mp} = 34$ and 22; $p < 0.01$). Differences of statistical significance were observed also between patients from group 2 and 1 versus others one (group 3 — AAA + AIO: $M_{mp} = 15$ and 14; $p < 0.01$; group 4 — AIO: $M_{mp} = 8$ and 10; $p < 0.01$; control group — $M_{mp} = 0$ and 0; $p < 0.01$). Macrophages were most abundant in intima in the group 3 and in the group 4 (respectively $M_{mp} = 49$ and $M_{mp} = 36$). These cells were significantly more numerous in intima than in adventitia (respectively $M_{mp} = 15$ and $M_{mp} = 10$; $p < 0.01$). A lower number of macrophages in intima was found in group 2 than in other groups, excluding control ($M_{mp} = 20$; $p < 0.01$) (Table III).

Significant differences were shown in T-cell numbers, especially clearly between groups 2 and 1 but in media only ($M_{IT} = 447$ vs. $M_{IT} = 292$; $p < 0.01$). We revealed significant differences in the numbers of T-cells in adventitia between group 1 ($M_{IT} = 337$) and group 3 ($M_{IT} = 64$; $p < 0.01$), group 4 ($M_{IT} = 11$; $p < 0.01$) and control ($M_{IT} = 7$; $p < 0.01$). Differences in T-cell numbers between groups 1 and 2 versus others were significant too (Table IV).

Za pomocą badań immunohistochemicznych oceniono liczbę limfocytów T, limfocytów B oraz makrofagów, stosując odpowiednio przeciwciała anty-CD3, anty-CD20, i anty CD-68 z systemem wizualizacji LSAB firmy DAKO. Badania wykonywano w preparatach o stałej grubości 4 μm . Analizy morfometrycznej dokonywano, zliczając liczbę komórek dodatnich w 10 polach widzenia, osobno w każdej warstwie ściany naczynia (wewnętrznej, środkowej i zewnętrznej). W podobny sposób obliczano liczbę granulocytów barwionych h + e. Analizę statystyczną przeprowadzono, stosując test Manna-Whitneya z korektą Bonferroniego (poziom istotności zmniejszono do $p < 0,01$)

Wykonywano także odczyny immunohistochemiczne z przeciwciałami przeciw czynnikowi VIII (*anti-von Willebrand factor*) na obecność naczyń krwionośnych. Oceny liczby naczyń dokonano na podstawie badania półilościowego w skali +, ++, +++. Wyniki poddano analizie statystycznej z użyciem testu Manna-Whitneya.

Wyniki

W przebadanym materiale stwierdzono, że nasilenie procesu zapalnego było szczególnie wysokie w grupie 2 (AAA objawowe) (stopień III — 61%; $n = 11$), wysokie odnotowano także w grupie 1 (AAA planowe) (stopień III — 32%; $n = 16$). Niewielkie nasilenie zapalenia występowało w grupie 4 (z AIO) (stopień I — 64,3%; $n = 9$). W grupie kontrolnej (grupa 5) prawie nie obserwowano nacieku zapalnego (stopień 0 — 86%; $n = 6$). Wyniki przedstawiono w tabeli II.

W badaniach morfometrycznych stwierdzono istotne różnice w liczbie makrofagów pomiędzy badanymi grupami. Największą średnią liczbę makrofagów w błonie zewnętrznej i środkowej zaobserwowano w grupie 2 ($M_{mp} = 47$ i 29). W grupie 1 stwierdzano ich znacznie mniej ($M_{mp} = 34$ i 22; $p < 0,01$). Istotnie statystycznie

Table II. Evaluation of inflammatory infiltration intensity in HISA scale

Tabela II. Ocena intensywności nacieku zapalnego w ścianie aorty według skali HISA

	Grade 0 Stopień 0	Grade I Stopień I	Grade II Stopień II	Grade III Stopień III	Neutrophiles occurrence (A) Obecność granulocytów (A)
Group 1 (n = 50) Grupa 1	0	8 (16%)	26 (52%)	16 (32%)	18 (36%)
Group 2 (n = 18) Grupa 2	0	0	7 (39%)	11 (61%)	14 (77.8)
Group 3 (n = 9) Grupa 3	1 (11%)	2 (22%)	5 (56%)	1 (11%)	0
Group 4 (n = 14) Grupa 4	2 (14.3%)	9 (64.3%)	3 (21.4%)	0	0
Control (n = 7) Grupa kontrolna	6 (86%)	1 (14%)	0	0	0

Group 1/Grupa 1 — elective AAA/AAA planowe; Group 2/Grupa 2 — symptomatic AAA/AAA objawowe; Group 3/Grupa 3 — AAA+AIO; Group 4/Grupa 4 — AIO; AAA — abdominal aortic aneurysm/tętniak aorty brzusznej; AIO — aorto-iliac occlusion/niedrożność aortalno-biodrowa

Table III. Average number of macrophages (M_{mp}) in 10 fields of vision**Tabela III.** Średnia liczba makrofagów (M_{mp}) na 10 pól widzenia

	<i>Intima</i>	<i>Media</i>	<i>Adventitia</i>
Group 1 Grupa 1	34*#	22*#	34*#
Group 2 Grupa 2	20*	29*	47*
Group 3 Grupa 3	49*#	14*#	15*#
Group 4 Grupa 4	36*#	10*#	10*#
Control Grupa kontrolna	0#	0#	0#

*Statistically significant differences in comparison with control group/różnice istotne statystycznie w porównaniu z grupą kontrolną; #Statistically significant differences in comparison with symptomatic aneurysms group ($p < 0,01$)/istotne różnice statystyczne w porównaniu z grupą chorych z tętniakami objawowymi ($p < 0,01$); Group 1/Grupa 1 — elective AAA/AAA planowe; Group 2/Grupa 2 — Symptomatic AAA/AAA objawowe; Group 3/Grupa 3 — AAA+AIO; Group 4/Grupa 4 — AIO; AAA — abdominal aortic aneurysm/tętniak aorty brzusznej; AIO — aorto-iliac occlusion/niedrożność aortalno-biodrowa

Table IV. Average number of T-cells (M_{IT}) in 10 fields of vision**Tabela IV.** Średnia liczba limfocytów T (M_{IT}) w 10 polach widzenia

	<i>Intima</i>	<i>Media</i>	<i>Adventitia</i>
Group 1 Grupa 1	17	292*#	337*
Group 2 Grupa 2	13	447*	381*
Group 3 Grupa 3	10	52*#	64*#
Group 4 Grupa 4	< 10	23*#	11#
Control Grupa kontrolna	0	< 10#	< 10#

*Statistically significant differences in comparison with control group/różnice istotne statystycznie w porównaniu z grupą kontrolną; #Statistically significant differences in comparison with symptomatic aneurysms group ($p < 0,01$)/istotne różnice statystyczne w porównaniu z grupą chorych z tętniakami objawowymi ($p < 0,01$); Group 1/Grupa 1 — elective AAA/AAA planowe; Group 2/Grupa 2 — Symptomatic AAA/AAA objawowe; Group 3/Grupa 3 — AAA+AIO; Group 4/Grupa 4 — AIO; AAA — abdominal aortic aneurysm/tętniak aorty brzusznej; AIO — aorto-iliac occlusion/niedrożność aortalno-biodrowa

B-cells in adventitia were most numerous in symptomatic AAA (group 2) ($M_{IB} = 633$), less numerous in elective AAA (group 1) ($M_{IB} = 431$; $p < 0,01$). Lymphocyte B number in group 3 ($M_{IB} = 198$; $p < 0,01$) was significantly lower than in these two mentioned above, but higher than in group 4 ($M_{IB} = 21$; $p < 0,01$) and than in control ($M_{IB} = 6$; $p < 0,01$).

B-cells in media were less abundant than in adventitia, but followed similar differences to those in adventi-

różnice odnotowano także pomiędzy grupami 1 i 2 a pozostałymi grupami (grupa 3 — AAA + AIO: $M_{mp} = 15$ i 14, $p < 0,01$; grupa 4 — AIO: $M_{mp} = 8$ i 10, $p < 0,01$; grupa 5 — kontrolna: $M_{mp} = 0$ i 0, $p < 0,01$). W błonie wewnętrznej makrofagi były najliczniejsze w grupie 3 i 4 (odpowiednio $M_{mp} = 49$ i $M_{mp} = 36$). W grupach tych makrofagi w błonie wewnętrznej występowały znacznie częściej niż w zewnętrznej (odpowiednio $M_{mp} = 15$ i $M_{mp} = 10$; $p < 0,01$). W grupie 2 obserwowano istotnie niższą liczbę makrofagów w błonie wewnętrznej niż w pozostałych grupach, oprócz grupy kontrolnej ($M_{mp} = 20$; $p < 0,01$) (tab. III).

Stwierdzono także znamienne różnice w średniej liczbie limfocytów T. Różnice te były szczególnie wyraźne pomiędzy grupami 2 i 1, ale tylko w błonie środkowej ($M_{IT} = 447$ vs. $M_{IT} = 292$; $p < 0,01$). Istotnie statystycznie różnice wykazano w liczbach limfocytów T w błonie zewnętrznej pomiędzy grupą 1 ($M_{IT} = 337$) a grupą 3 ($M_{IT} = 64$; $p < 0,01$), grupą 4 ($M_{IT} = 11$; $p < 0,01$) oraz grupą kontrolną ($M_{IT} = 7$, $p < 0,01$). Różnice w liczbie komórek T pomiędzy grupą 1 i 2 a pozostałymi także były znamienne statystycznie (tab. IV).

Najwięcej limfocytów B w błonie zewnętrznej odnotowano w grupie 2 ($M_{IB} = 633$), a mniej — w grupie 1 ($M_{IB} = 431$, $p < 0,01$). Liczba limfocytów B w grupie 3 była istotnie mniejsza ($M_{IB} = 198$; $p < 0,01$) niż w powyższych grupach, ale wyższa niż w grupie 4 ($M_{IB} = 21$; $p < 0,01$) i w grupie kontrolnej ($M_{IB} = 6$; $p < 0,01$).

Zaobserwowano nieco mniejszą liczbę komórek B w błonie środkowej niż w zewnętrznej, ale stwierdzono podobne, istotne statystycznie różnice pomiędzy grupami (tab. V). Nie wykazano różnic w liczbie limfocytów B w błonie wewnętrznej między badanymi grupami.

Najwięcej granulocytów występowało w grupie 2 w błonie zewnętrznej pobranych tętniaków ($M_{Neutr} = 26$), mniej licznie w grupie 1 ($M_{Neutr} = 7$; $p < 0,01$). W pozostałych grupach granulocyty obserwowano sporadycznie (tab. VI).

Angiogenezę w ścianie aorty oceniano po wykonaniu odczynów z przeciwciałami przeciw czynnikowi VIII. Liczbę naczyń oceniano półilościowo w trójstopniowej skali (+, ++, +++). Największe nasilenie angiogenezy obserwowano w grupie 2 (+++: 77,8%), mniejsze — w grupie 1 (+++: 56%; $p < 0,01$). W pozostałych grupach nasilenie tworzenia naczyń było istotnie mniejsze: w grupie 3 dominowało średnie nasilenie (++: 66,7%), w grupie 4 słabe nasilenie odnotowano w 85,7% przypadków (tab. VII).

Dyskusja

Tworzenie się tętniaka aorty wiąże się z przebudową ściany naczyń. Dochodzi do niszczenia elementów sprę-

tia between the groups (Table V). There were no significant differences between groups in intima.

Neutrophils were most abundant in adventitia of group 2 ($M_{\text{Neutr}} = 26$), less abundant in group 1 ($M_{\text{Neutr}} = 7$; $p < 0.01$). Granulocytes were rare in the other groups (Table VI).

To estimate the angiogenesis, we performed immunohistochemistry with antibodies against the von Wille-

Table V. Average number of B-cells (M_{IFB}) in 10 fields of vision

Tabela V. Średnia liczba limfocytów B (M_{IFB}) na 10 pól widzenia

	<i>Intima</i>	<i>Media</i>	<i>Adventitia</i>
Group 1 Grupa 1	22	263*#	491**
Group 2 Grupa 2	25	429*	633*
Group 3 Grupa 3	15	137*#	198*#
Group 4 Grupa 4	< 10	48*#	21*#
Control Grupa kontrolna	0	< 10#	< 10#

*Statistically significant differences in comparison with control group/różnice istotne statystycznie w porównaniu z grupą kontrolną; #Statistically significant differences in comparison with symptomatic aneurysms group ($p < 0.01$)/istotne różnice statystyczne w porównaniu z grupą chorych z tętniakami objawowymi ($p < 0,01$); Group 1/Grupa 1 — elective AAA/AAA planowe; Group 2/Grupa 2 — symptomatic AAA/AAA objawowe; Group 3/Grupa 3 — AAA+AIO; Group 4/Grupa 4 — AIO; AAA — abdominal aortic aneurysm/tętniak aorty brzusznej; AIO — aorto-iliac occlusion/niedrożność aortalno-biodrowa

Table VI. Average number of neutrophils (M_{Neutr}) in 10 fields of vision

Tabela VI. Średnia liczba neutrofilów (M_{Neutr}) na 10 pól widzenia

	<i>Intima</i>	<i>Media</i>	<i>Adventitia</i>
Group 1 Grupa 1	2	5#	7*#
Group 2 Grupa 2	6*	12*	26*
Group 3 Grupa 3	2	1#	< 1#
Group 4 Grupa 4	< 1#	< 1#	< 1#
Control Grupa kontrolna	< 1#	< 1#	< 1#

*Statistically significant differences in comparison with control group/różnice istotne statystycznie w porównaniu z grupą kontrolną; #Statistically significant differences in comparison with symptomatic aneurysms group ($p < 0.01$)/istotne różnice statystyczne w porównaniu z grupą chorych z tętniakami objawowymi ($p < 0,01$); Group 1/Grupa 1 — elective AAA/AAA planowe; Group 2/Grupa 2 — symptomatic AAA/AAA objawowe; Group 3/Grupa 3 — AAA+AIO; Group 4/Grupa 4 — AIO; AAA — abdominal aortic aneurysm/tętniak aorty brzusznej; AIO — aorto-iliac occlusion/niedrożność aortalno-biodrowa

zystych, napływu komórek zapalnych, rozplemu młodych naczyń, a także znacznego osłabienia wytrzymałości ściany, co może prowadzić do jej pęknięcia. Niektórzy autorzy podkreślają rolę angiogenezy jako procesu umożliwiającego napływ komórek zapalnych do głębszych warstw ściany aorty, a tym samym prowadzącego do zwiększonego rozpadu elastyny i upośledzenia wytrzymałości ściany zmienionej tętniakowato [3–5].

Angiogeneza to zjawisko o fundamentalnym znaczeniu w procesach przebudowy tkanek, takich jak gojenie się ran, rozrost nowotworowy, embriogeneza czy organizacja zawałów i zakrzepów. Przebieg tego procesu wiąże się z proliferacją i migracją komórek śródbłonna, tworzących następnie nowe naczynia kapilarne. Angiogeneza podlega regulacji przez wiele czynników, takich jak naczyniowy czynnik wzrostu śródbłonna (VEGF, *vascular endothelial growth factor*) czy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF, *basic fibroblast growth factor*) [6]. Tworzenie nowych naczyń ściśle wiąże się ze zwiększoną produkcją enzymów o aktywności proteolitycznej rozkładających tkankę łączną, np. metaloproteinazy czy aktywator plazminogenu typu urokinazy [7].

Uważa się, że wiele chorób naczyń krwionośnych, w tym miażdżyca, wiąże się z tworzeniem nowych naczyń w ścianie zmienionej tętnicy [8].

W tętniakach aorty liczba naczyń krwionośnych wzrasta we wszystkich warstwach ściany, a głównie — w błonie środkowej [9]. Holmes przypuszcza, że proces miażdżycowy może upośledzać utlenowanie komó-

Table VII. Semiquantitative evaluation of angiogenesis intensity (grades: +, ++, +++)

Tabela VII. Ocena nasilenia angiogenezy w ścianie aorty oceniona pół ilościowo, w stopniach od + do +++

	+ N (%)	++ N (%)	+++ N (%)
Group 1 Grupa 1	3 (6)*	19 (38)*#	28 (56)*#
Group 2 Grupa 2	1 (5.5)*	3 (16.7)*	14 (77.8)*
Group 3 Grupa 3	2 (22.3)*#	6 (66.7)*#	0#
Group 4 Grupa 4	12 (85.7)*#	2 (14.3)*#	0#
Control Grupa kontrolna	7 (100)#	0#	0#

*Statistically significant differences in comparison with control group/istotne różnice statystyczne w porównaniu z grupą kontrolną; #Statistically significant differences in comparison with symptomatic aneurysms group ($p < 0.01$)/istotne różnice statystyczne w porównaniu z grupą chorych z tętniakami objawowymi ($p < 0,01$); Group 1/Grupa 1 — elective AAA/AAA planowe; Group 2/Grupa 2 — symptomatic AAA/AAA objawowe; Group 3/Grupa 3 — AAA+AIO; Group 4/Grupa 4 — AIO; AAA — abdominal aortic aneurysm/tętniak aorty brzusznej; AIO — aorto-iliac occlusion/niedrożność aortalno-biodrowa

brand factor. The number of vessels was evaluated semiquantitatively in the three-degree scale (+, ++, +++). The highest intensity of angiogenesis was observed in group 2 (+++: 77.8%), lower in group 1 (+++: 56%). In the other groups angiogenesis intensity was significantly lower. In the group 3 we observed predominantly grade ++ (66.7%). In group 4 low intensity was predominant (+: 85.7%) (Table VII).

Discussion

Aneurysm formation is due to aortic wall remodeling. Degradation of elastic fibres, inflammatory cells infiltration and neovascularisation lead to a marked attenuation of aortic wall strength. Some authors emphasised the role of angiogenesis as a process enabling the influx of inflammatory cells into the aortic wall and in this way leading to elastin degradation [3–5].

Angiogenesis is a fundamental process in wound healing, neoplasm infiltration, embryogenesis, infarct and thrombus organisation. It consists of the migration and proliferation of endothelium and new capillaries formation. Angiogenesis is controlled by many humoral factors, such as VEGF or bFGF [6]. Neovascularisation is also due to the increased production of proteolytic enzymes degrading connective tissue, especially matrix proteins, such as metalloenzymes or uPA [7].

The widely accepted opinion is that many vascular diseases, including atherosclerosis, are due to the neovascularisation of the vascular wall [8].

In the aortic aneurysm wall the quantity of blood vessels increases in all layers, especially in media [9]. Holmes suggests that atheromatic plaque formation may diminish oxygenation of the cells in the deeper layer of the aortic wall. These conditions are fulfilled in the abdominal aorta, below the renal arteries. Some factors stimulating angiogenesis may be generated due to anoxia [9].

There is some evidence that angiogenesis in the aortic wall may be induced by the biologically active low molecular weight peptides which are released by elastin degradation such as VGVAPG. In the animal experimental aneurysm infusion of VGVAPG evoked neovascularisation in the aortic wall and inflammatory cell influx [10].

In our material we have shown that the intensity of neovascularisation was mostly intense in symptomatic and ruptured aneurysms. This indicates that angiogenesis may be of essential importance in aortic wall destruction. The intensity of neovascularisation was lower in aneurysms submitted to elective surgery, but in these cases significantly higher than in atherosclerotic groups. Many authors emphasised the role of angiogenesis in atherosclerosis as the factor responsible for the development and evolution of atheromatic plaque as well as for some

rek w głębszych warstwach ściany aorty poniżej tętnic nerkowych, które czerpią tlen z krwi przepływającej przez naczynie. Niedotlenienie może stymulować produkcję czynników inicjujących angiogenezę [9].

Prawdopodobnie w stymulacji angiogenezy pewną rolę mogą odgrywać fragmenty białkowe pochodzące z rozłożonych enzymatycznie włókien elastyny (produkty degradacji elastyny). Jednym z takich peptydów jest fragment o sekwencji VGVAPG. W eksperymentalnym modelu tętniaka u zwierząt infuzja VGVAPG powodowała rozwój naczyń krwionośnych w ścianie aorty oraz napływ komórek zapalnych [10].

W materiale zebrany przez autorów niniejszego artykułu wykazano, że nasilenie procesu angiogenezy było największe w grupie chorych z tętniakami objawowymi i pękniętymi, co wskazuje, że proces ten może mieć zasadnicze znaczenie w destrukcji ściany aorty. Nasilenie procesu było nieco mniejsze w grupie osób z tętniakami operowanymi planowo, ale znamienne większe niż w grupach chorych z miażdżycą bez tętniaka. Coraz bardziej podkreśla się rolę angiotensyny w miażdżycy, jako czynnika odpowiedzialnego za rozwój ogniska miażdżycowego i wielu związanych z tym powikłań, takich jak wylew do blaszki miażdżycowej, będący częstą przyczyną zawałów, czy zakrzepica przyścienna [8]. W preparatach pobranych od pacjentów z grupy kontrolnej naczynia krwionośne występowały tylko w błonie zewnętrznej i było ich znacznie mniej niż w pozostałych grupach.

Zaobserwowano także, że nasilenie nacieku zapalnego jest znamienne większe w grupie tętniaków objawowych niż w pozostałych. Jednocześnie stwierdzono, że rodzaj i rozkład komórek w ścianie naczynia różni się pomiędzy grupami chorych z tętniakami a pozostałymi. Makrofagi w tętniakach częściej pojawiały się w zewnętrznych warstwach ściany w przeciwieństwie do grup z miażdżycą, w przypadku których dominowały w błonie wewnętrznej. Najprawdopodobniej ich obecność w aorcie miażdżycowej wiąże się raczej z gromadzeniem estrów cholesterolu, natomiast w tętniakach mogą spełniać inne funkcje.

W materiale zebrany przez autorów niniejszej pracy makrofagi były widoczne głównie w okolicy młodych naczyń, wśród skupisk tkanki chłonnej, co zgadza się z obserwacjami Kocha [11]. Komórki te odgrywają bardzo istotną rolę we wszystkich etapach angiogenezy. Makrofagi uwalniają aktywator plazminogenu i urokinazę, stymulując konwersję plazminogenu do plazminy, która katalizuje konwersję nieaktywnych form metaloproteinaz do aktywnych postaci enzymatycznych [12, 13]. Ponadto aktywowane makrofagi produkują wiele czynników wzrostu wywołujących migrację

complications such as haemorrhage into a plaque or parietal thrombosis [8]. In control slides blood vessels were present only in adventitia and were significantly less numerous than in other groups.

We have also observed that the intensity of inflammatory infiltration is significantly higher in the symptomatic aneurysms group than in others. We have noticed that the composition of cells in the vascular wall differs between groups. In aneurysms macrophages were seen in media, in contrast to the atherosclerotic group, where they occurred in intima. Most likely in atherosclerosis macrophages are involved in cholesterol esters accumulation, and in aneurysms they have another function.

In our material, macrophages were seen mainly surrounding new blood vessels and in lymphatic tissue concentration. This was also observed by Koch [11]. These cells play an important role in all stages of angiogenesis. Macrophages release a plasminogen activator, urokinase, stimulating conversion to plasmin, which activates metalloproteinases [12, 13]. Furthermore, activated macrophages produce many growth factors, such as VEGF, bFGF, TGF- α , inducing the migration and proliferation of endothelial cells [14].

The highest number of all evaluated inflammatory cells was found in the group of symptomatic and ruptured aneurysms. Very intensive inflammatory reaction was seen in adventitia and media. Moreover, lymphatic follicles were seen mainly on the border between adventitia and media, i.e. on the site of degraded elastic lamina. We observed numerous tiny blood vessels among lymphocytes and macrophages demonstrating MMP12 activity (non-published data).

Probably intensive inflammatory infiltration in aneurysm wall is due to elastin degradation as well as to angiogenesis. Neovascularisation may be stimulated by direct binding of CD40 ligand on activated lymphocytes surface with CD40 on endothelial cells surface [15]. Recombinant human CD40 ligand or CD40 on activated T lymphocytes stimulates expression or increases activity of metalloproteinases of endothelial cells. Furthermore, CD40 ligand stimulates the tubular structure formation of endothelial cells [15].

Besides T-lymphocytes, we have noticed numerous B-lymphocytes concentrated very often in lymphatic follicles. This may be due to the reaction of CD40 on lymphocytes B and CD40 ligand on lymphocytes T in cytokines attendance [16].

Granulocytes were observed mainly in symptomatic and ruptured aneurysms and they may occur in response to microruptures of the aortic wall and may be the sign of a performing rupture of the aneurysm.

i proliferację komórek śródbłonka, takich jak VEGF, bFGF, TGF α [14].

Liczba wszystkich ocenianych komórek nacieku zapalnego była najwyższa w grupie chorych z tętniakami objawowymi i pękniętymi. W preparatach mikroskopowych zwracało uwagę ogromne nasilenie reakcji zapalnej w błonie zewnętrznej i środkowej, a także tworzenie grudek chłonnych, głównie na granicy błony środkowej i zewnętrznej, czyli w miejscu niszczonej blaszki sprężystej wewnętrznej. Pomiedzy limfocytami były widoczne drobne naczynia o najmniejszych przekrojach (dane niepublikowane) oraz liczne makrofagi często wykazujące aktywność metaloproteinazy 12 (dane niepublikowane).

Prawdopodobnie obecność tak obfitego nacieku zapalnego wiąże się zarówno z degradacją elastyny, jak i z procesem angiogenezy. Nowotworzenie naczyń może być stymulowane przez bezpośredni kontakt pomiędzy ligandem CD40 na powierzchni aktywowanych limfocytów T i CD40 na powierzchni komórek śródbłonka [15]. Rekombinowany ludzki ligand CD40 lub CD40 na aktywowanych limfocytach T stymuluje komórki śródbłonka do ekspresji lub wzrostu aktywności metaloproteinaz. Ligand CD40 stymuluje także formowanie struktur rurkowatych z komórek śródbłonka [15].

Oprócz licznych limfocytów T stwierdzono także dużą liczbę komórek B tworzących często grudki chłonne. Formowanie grudek może zależeć od reakcji pomiędzy CD40 na limfocytach B a CD40L na limfocytach T w obecności cytokin [16].

Granulocyty obserwowano głównie w tętniakach pękniętych i objawowych. Być może ich obecność wiąże się z reakcją na mikropęknięcia znacznie zmienionej ściany aorty i jest oznaką dokonującego się pęknięcia tętniaka.

Zaobserwowane w zebranych materiale zjawiska potwierdzają spostrzeżenia innych autorów, że angiogeneza oraz proces zapalny stanowią stałą cechę tętniaka aorty. Wykazano również, że nasilenie nowotworzenia naczyń oraz nacieku zapalnego, zwłaszcza w błonie środkowej, koreluje z dynamiką procesów destrukcji ściany aorty prowadzących do jej pęknięcia. Zależność ta jest wyraźna, niezależnie od wielkości tętniaka. Czynniki stymulujące rozwój młodych naczyń oraz napływ komórek zapalnych nie są dokładnie poznane, ale wydaje się, że farmakologiczne hamowanie angiogenezy może spowolnić procesy destrukcji ściany aorty i zmniejszyć ryzyko pęknięcia tętniaka.

Wnioski

1. Nasilenie angiogenezy jest znamienne większe w ścianie tętniaków w porównaniu ze ścianą aorty zmienionej miażdżycowo i prawidłowej.

The results of our study support the observations of other authors, suggesting that angiogenesis and inflammation represent the constant feature of aortic aneurysm wall. Moreover, we have demonstrated that the intensity of neovascularisation and inflammation, especially in media, correlate with progression of aortic wall destruction leading to rupture. This correlation was found as very distinct, independently of aneurysm diameter. The factors stimulating neovascularisation and inflammatory cells infiltration to the aortic wall are not sufficiently recognised but it seems possible that the pharmacological inhibition of angiogenesis may slow down destructive processes in the aortic wall and diminish the risk of rupture.

Conclusions

1. The intensity of angiogenesis is significantly higher in patients with aortic aneurysm wall than in atherosclerotic and healthy aorta.
2. The intensity of angiogenesis is significantly higher in symptomatic and ruptured abdominal aortic aneurysm than in asymptomatic aneurysm wall.
3. The degree of inflammatory infiltration intensity is significantly higher in aortic abdominal aneurysm wall than in atherosclerotic and healthy aorta.
4. The degree of inflammatory infiltration intensity is significantly higher in symptomatic and ruptured abdominal aortic aneurysm wall than in asymptomatic aneurysm.
5. The composition of inflammatory infiltration significantly differs between symptomatic and asymptomatic abdominal aortic aneurysm wall. The number of neutrophils, B-cells in intima and media, T-cells in media and macrophages in adventitia is significantly higher in symptomatic and ruptured aneurysm wall.

References

1. Greenhalgh R, and UK small aneurysm trial participants (1998) Mortality results of randomised controlled trial for early selective surgery or ultrasonographic surveillance for small abdominal aortic aneurysms. *Lancet*, 352: 1649–1652.
2. Rijbroek A, Moll FL, Van Dijk HA, Meijer R, Jansen JW (1994) Inflammation of the aortic abdominal aneurysm wall. *Eur J Vasc Surg*, 8: 41–46.
3. Thompson MM, Jones L, Nasim A, Sayers RD, Bell PRF (1996) Angiogenesis in aortic abdominal aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 11: 464–469.
4. Palombo D, Maione M, Cifiello BI, Udini M, Maggio D, Lupo M (1999) Matrix metalloproteinases. Their role in degenerative chronic diseases of abdominal aorta. *J Cardiovasc Surg*, 40: 257–260.
5. Satta J, Soini Y, Mosorin M, Juvonen T (1998) Angiogenesis is associated with mononuclear inflammatory cells in abdominal aortic aneurysms. *Ann Chir Gin*, 87: 40–42.
6. Klagsbrun M, D'Amore PA (1991) Regulators of angiogenesis. *Ann Rev Physiol*, 53: 217–239.

2. Nasilenie angiogenezy jest istotnie większe u chorych z tętniakami objawowymi i pękniętymi w porównaniu z osobami z tętniakami bezobjawowymi.
3. Stopień nasilenia nacieku zapalnego jest znamienne większy w ścianie tętniaków aorty niż w ścianie aorty zdrowej i zmienionej miażdżycowo.
4. Stopień nasilenia nacieku zapalnego jest istotnie większy w ścianie tętniaków objawowych i pękniętych niż w ścianie tętniaków bezobjawowych.
5. Skład nacieku zapalnego różni się znamienne między tętniakami objawowymi a bezobjawowymi. W ścianie tętniaków objawowych i pękniętych zaobserwowano istotnie więcej granulocytów we wszystkich warstwach naczynia, limfocytów B w błonie wewnętrznej i środkowej, limfocytów T głównie w błonie środkowej, a makrofagów w błonie zewnętrznej.

7. Herron GS, Werb Z, Dwyer K, Banda MJ (1986) Secretion of metalloproteinases by stimulated capillary endothelial cells: I-production of procollagenase and prostromelysin exceeds expression of proteolytic activity. *J Biol Chem*, 261: 2810–2813.
8. Isner JM (1996) The role of angiogenetic cytokines in cardiovascular disease. *Clin Immunol Immunopathol*, 80: S82–S91.
9. Holmes DR, Liao S, Parks W, Thompson R (1995) Medial neovascularisation in abdominal aortic aneurysms: A histopathologic marker of aneurysmal degradation with pathophysiologic implications. *J Vasc Surg*, 21: 761–72.
10. Nackman GB, Karkowski FJ, Halpern VJ, Gaetz HP, Tilson MD (1997) Elastin degradation products induce adventitial angiogenesis in the Anigjar/Dobrin rat aneurysm model. *Surgery*, 122: 39–44.
11. Koch AE, Haines GK, Rizzo RJ, Radosevich RM, pope RM, Robinson PG, Pearce WH (1990) Human abdominal aortic aneurysms. Immunophenotypic analysis suggesting an immune-mediated response. *Am J Pathol*, 137: 1199–1213.
12. Curci JA, Liao S, Huffman MD, Shapiro SD, Thompson RW (1998) Expression and localisation of macrophage elastase (matrix metalloproteinase 12) in abdominal aortic aneurysms. *J Clin Invest*, 102: 1900–1910.
13. Carmeliet P, Moons L, Lijnen R, Baes M, Lemaître V, Tipping P, et al. (1997) Urokinase-generated plasmin activates matrix metalloproteinases during aneurysm formation. *Nat Genet*, 17: 439–444.
14. Sunderkotter C, Steinbrink K, Goebeler M, Bhardwaj R, Sorg C (1994) Macrophages and angiogenesis *Cell Mol Biol Res*, 40: 81–85.
15. Mach F, Schonbeck U, Fabunmi RP, Murphy C, Atkinson E, Bonnefoy JY, et al. (1999) T lymphocytes induce endothelial cell matrix metalloproteinase expression by a CD40L-dependent mechanism-implications for tubule formation. *Am J Pathol*, 154: 229–238.
16. VanKooten C, Banchereau J (1997) Functions of CD40 on B cells, dendritic cells and other cells. *Current Opinion in Immunology*, 9: 330–337.