

Značaj inflamacije u destabilizaciji i rupturi arteriosklerotičnog plaka

Vujadin Tatić*, Vladimir Kanjuh[†], Sašo Rafajlovski[‡], Kristina Kostić[§],
Dušan Šuščević^{||}

Vojnomedicinska akademija, *Zavod za patologiju i sudsku medicinu, [‡]Klinika za
urgentnu internu medicinu, [§]Klinika za kožne i polne bolesti, Beograd; [†]Srpska
akademija nauka i umetnosti, Beograd; ^{||}Medicinski fakultet, Banja Luka

Uvod. Iako je Rudolf Virchow još 1858. godine u svojoj knjizi „Celularna patologija“ arteriosklerozu smatrao za zapaljensko oboljenje arterija, ipak je kasnije preovladalo mišljenje da je u pitanju degenerativno oboljenje arterija kao bolest civilizacije. Danas se ponovo veliki značaj pridaje procesu zapaljenja u etiopatogenezi arterioskleroze, a posebno u destabilizaciji i rupturi arteriosklerotičnog plaka. **Cilj** rada bio je da ispitamo da li su i u kom broju u rupturisanom arteriosklerotičnom plaku koronarnih arterija prisutni T i B limfociti, lipidni makrofagi, vaskularne glatke mišićne ćelije i mastociti kao faktori destabilizacije i rupture plaka. **Metode.** Ukupno je histohemijski i imunohistohemijski analizovano 68 rupturisanih arteriosklerotičnih plakova koronarnih arterija kod kojih je mikroskopskim pregledom nađeno da postoje elementi inflamacije. Isečki su tretirani sledećim histohemijskim i imunohistohemijskim metodama: Masson trichrom, aktin, vimentin, CD3, CD43, CD68, CD20, CD45 i hloroacetil esterazom. Kao kontrola služilo nam je 10 arteriosklerotičnih plakova koronarnih arterija sa stabilnom fibroznom kapom i bez ćelija zapaljenja u plaku. **Rezultati.** Kod svih 68 arteriosklerotičnih plakova nađena je ruptura fibrozne kape arteriosklerotičnog plaka sa istanjenim i iskidanim kolagenim vlaknima. Kod 57 od 68 analizovanih plakova u iskidanoj fibroznoj kapi nađeno je u povećanom broju prisustvo T-limfocita, lipidnih makrofaga, vaskularnih glatkih mišićnih ćelija i mast-ćelija, posebno na mestu rupture plaka. Kod ostalih 11 slučajeva mastociti su bili prisutni u nešto smanjenom broju. U kontrolnoj grupi sa stabilnim plakom nije nađeno prisustvo ćelija inflamacije. **Zaključak.** Naši rezultati ukazuju da su u rupturisanom arteriosklerotičnom plaku prisutni elementi inflamacije koji bi mogli uticati na destabilizaciju i rupturu arteriosklerotičnog plaka.

К л ј у ч н е р е č и : aa. coronariae; zapaljenje, medijatori; ruptura;
arterioskleroza, obliterantna; imunohistohemija.

Uvod

Iako je Rudolf Virchow još 1858. godine u svojoj knjizi „Celularna patologija“ arteriosklerozu smatrao za zapaljensko oboljenje arterija, ipak je kasnije preovladalo mišljenje da je u pitanju degenerativno oboljenje arterija, kao bolest civilizacije (1). Međutim, danas, 146 godina od iznošenja Virchowljevog mišljenja, došlo se do zaključka da u koronarnoj arteriosklerози nije od primarnog značaja stepen suženja lumena, već ruptura arteriosklerotične ploče sa sekundarnom opstrukcijskom trombozom i često po život smrtonosnim komplikacijama (2–4). U destabilizaciji arteriosklerotične ploče i njenoj rupturi danas se veliki značaj

ponovo pridaje upravo procesu zapaljenja i smatra se da ono igra fundamentalnu ulogu u procesu aterogeneze (5–9).

Cilj rada bio je da ispitamo da li su i u kom broju u rupturisanom arteriosklerotičnom plaku koronarnih arterija prisutni T i B limfociti, lipofagi, vaskularne glatke mišićne ćelije i mastociti koji, kako se pretpostavlja, učestvuju u destabilizaciji i rupturi arteriosklerotičnog plaka.

Metode

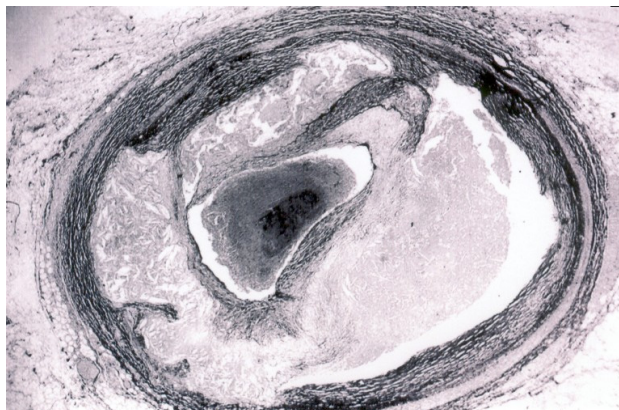
Ukupno je histohemijski i imunohistohemijski analizovano 68 rupturisanih arteriosklerotičnih plakova koronarnih arterija kod kojih je mikroskopskim pregledom nađeno

da postoje elementi inflamacije. Isečci uzeti iz predela arteriosklerotičnog plaka fiksirani su u 10% puferisanog formalina, kalupljeni u parafin, mikrotomom sečeni na 5 do 10 mikrona i tretirani sledećim histohemijskim i imunohistohemijskim metodama: *Masson trichrom*, bojenjem aktinom, vimentinom, CD3, CD43, CD68, CD20, CD45 i hloroacetal esterazom.

Kao kontrola služilo nam je 10 arteriosklerotičnih plakova na koronarnim arterijama sa stabilnom fibroznom kapom i bez ćelijske inflamacije u plaku.

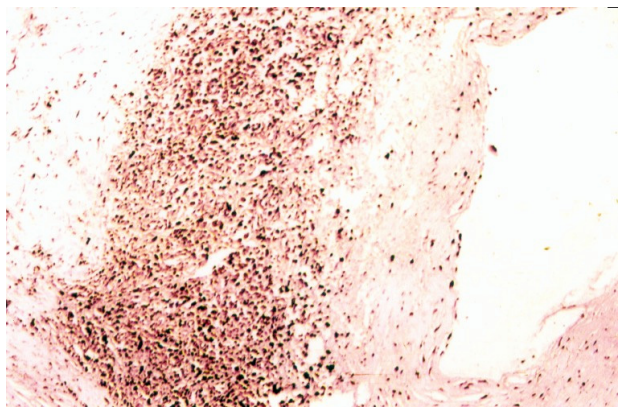
Rezultati

Od 68 arteriosklerotičnih plakova kod 57 nađena je ruptura fibrozne kape sa istanjenim i iskidanim kolagenim vlaknima (slika 1).

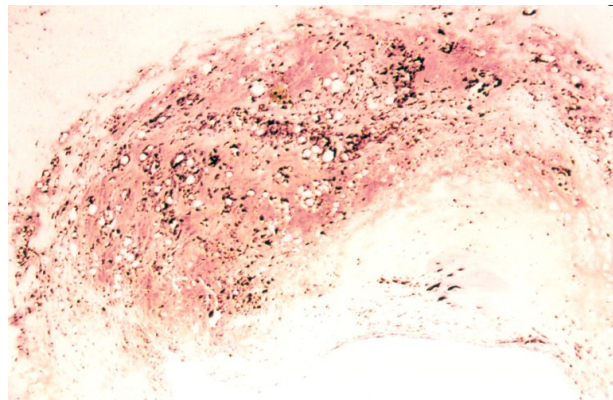


Sl. 1 – Ruptura fibrozne kape arteriosklerotičnog plaka sa sledstvenom opstrukcijskom trombozom lumena koronarne arterije; He $\times$ 40.

U arteriosklerotičnom plaku i iskidanoj fibroznoj kapi nađeno je u povećanom broju prisustvo T-limfocita, lipidnih makrofaga, vaskularnih glatkih mišićnih ćelija i mastocita (slike 2 i 3).



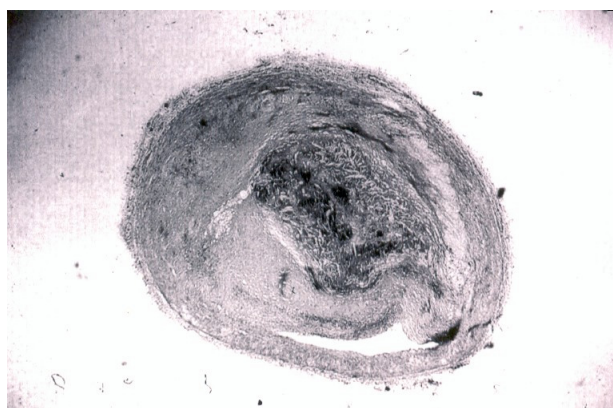
Sl. 2 – Bogata infiltracija fibrozne kape arteriosklerotičnog plaka T-limfocitima; CD3 $\times$ 100



Sl. 3 – Bogato prisustvo lipidnih makrofaga u arteriosklerotičnom plaku i fibroznoj kapi; CD68 $\times$ 100

Naročito bogate nakupine ovih ćelija nađene su na mestu rupture plaka. U ostalih 11 slučajeva postojala je ruptura fibrozne kape, arteriosklerotičnog plaka, sa oskudnim i istanjenim kolagenim vlaknima. U arteriosklerotičnom plaku i fibroznoj kapi, posebno na mestu rupture, nađeno je u povećanom broju prisustvo vaskularnih glatkih mišićnih ćelija, T-limfocita i lipidnih makrofaga, ali je prisustvo mastocita bilo znatno manje nego u prethodnih 57 slučajeva. Prisustvo B-limfocita u povećanom broju nađeno je u spoljašnjoj trećini zida krvnog suda, kao i u perivaskularnom vezivnom i masnom tkivu, ali su retki i pojedinačni nađeni u rupturisanom arteriosklerotičnom plaku.

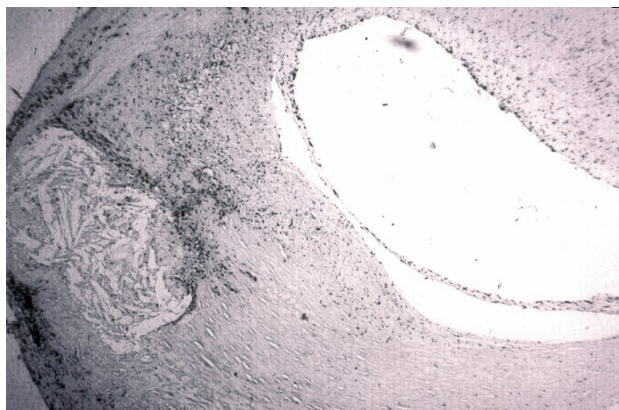
U kontrolnoj grupi sa stabilnim plakom, čija je fibrozna kapa bila debela i sa očuvanim kolagenim vlaknima, nismo našli prisustvo T-limfocita i mast-ćelija, ali smo našli prisustvo lipidnih makrofaga i vaskularnih glatkih mišićnih ćelija, ali ne u tako velikom broju, kao u grupi sa rupturom plaka (slike 4 i 5).



Sl. 4 – Arteriosklerotični plak koronarne arterije sa debelom i očuvanom fibroznom kapom; HE $\times$ 40

Diskusija

Arterioskleroza je dugo smatrana degenerativnim procesom koji je praćen nagomilavanjem lipida u zidu krvnog suda (10). Danas se na osnovu novih saznanja arterioskleroza definiše kao hronična inflamacija sa prisustvom i aktiv-



Sl. 5 – „Lipidni bazen“ arteriosklerotičnog plaka sa bogatom infiltracijom fibrozne kape ćelijama zapaljenja. Vidi se raspadanje kolagenih vlakana fibrozne kape; HE $\times$ 100.

nom ulogom makrofaga i limfocita, izmenjenim brojem i funkcijom vaskularnih glatkih mišićnih ćelija i ekstracelularnim i intracelularnim nagomilavanjem lipida (11–13). Nažalost, ove histopatološke karakteristike arterioskleroze ne mogu nam ukazati na etiološki faktor, niti rasvetliti sam tok patogenetskog procesa (5, 14). Rezultati mnogobrojnih ispitivanja govore da humoralne ćelije i ćelijske imunske reakcije aktivno učestvuju u svim stadijumima nastanka arterioskleroze (15–17). U prilog tome govore i sledeće činjenice: prisustvo T-limfocita i makrofaga u ateromu, modulacija fenotipa vaskularnih glatkih mišićnih ćelija, njihova proliferacija i sinteza ekstracelularnog matriksa i nagomilavanje lipida ekstracelularno i intracelularno u makrofagima i vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama (18).

Prihvatanjem teze o ulozi inflamacijske reakcije u nastanku arterioskleroze nameće se pitanje da li se radi o nespecifičnoj inflamaciji kao reakciji na neki oblik hronične iritacije ili se radi o specifičnom zapaljenju prema tačno određenom antigenu. Zatim, nejasno je da li je inflamacija kod arterioskleroze primarna ili sekundarna promena (2, 5, 8). Patološko-anatomska ispitivanja intaktnog i rupturisanog arteriosklerotičnog plaka pokazuju da stabilnost fibrozne kape zavisi od sledećih faktora: veličine i konzistencije lipidnog bazena, debljine i kvaliteta kolagenih vlakana fibrozne kape koja odvaja lipidni bazen od lumena arterije, inflamacijskog procesa unutar fibrozne kape (2, 7, 19).

Prisustvo limfocita u ateromu pobuđuje posebno interesovanje s obzirom na to da su oni najčešći pokazatelji antigenom pokrenute inflamacije. Uglavnom se radi o T-limfocitima, dok su B-limfociti ređi i oni su uglavnom prisutni u spoljašnjoj trećini zida krvnog suda, kao i u perivaskularnom vezivnom i masnom tkivu (16).

Ruptura arteriosklerotičnog plaka sa posledičnom trombozom glavni je uzrok akutne koronarne smrti i više zavisi od osetljivosti fibrozne kape nego od njegove veličine, odnosno stepena stenoze (20, 21). Akumulacija lipida, hronična inflamacija, aktivnost makrofaga i vaskularnih glatkih mišićnih ćelija vode razvoju nestabilnosti plaka i njegovoj rupturi. Aktivisani makrofagi, vaskularne glatke

mišićne ćelije, T-limfociti i mast-ćelije prisutni su u arteriosklerotičnom plaku, što dovodi do inflamacijskog odgovora (8, 22). Prisustvo inflamacijskih ćelija, makrofaga, vaskularnih glatkih mišićnih ćelija i mastocita, najizraženije je na mestu rupture plaka. Mi smo kod svih 68 analizovanih isečaka našli obimno prisustvo ovih ćelijskih elemenata upravo oko mesta rupture plaka. Posmatrajući arteriosklerozu uopšte i koronarnu bolest posebno, kao inflamacijsku bolest, postavlja se osnova za razvoj novog pogleda na patogenezu nestabilne angine pectoris i akutnog infarkta miokarda. Sa tog stanovišta nije važno pitanje zašto se arterioskleroza razvija, već zašto se posle niza godina postepenog razvoja iznenada komplikuje rupturom arteriosklerotičnog plaka i opturacijskom trombozom koja ugrožava život (2, 14, 19). Za nastanak arterioskleroze neophodno je oštećenje endotela ili njegova disfunkcija, što olakšava ulazak lipoproteina male gustine u subendotelni prostor zida krvnog suda, gde se ovi lipoproteini nakupljaju i oksidišu. Na mestu oštećenog endotela dolazi do adhezije trombocita koji luče trombogeni faktor rasta. On je mitogen za vaskularne glatke mišićne ćelije koje proliferišu i migriraju iz medije u intimu. Vaskularne glatke mišićne ćelije fagocituju lipidne kapljice i postaju penaste ćelije. Kada dođe do migracije vaskularnih glatkih mišićnih ćelija i poremećaja njihove funkcije, one postaju faktori koji aktivno učestvuju u pogoršanju i destabilizaciji plaka (1, 6, 8, 14).

Monociti su prve ćelije koje se nalaze uz endotel i posle njegove disfunkcije migriraju u subendotelni prostor gde fagocituju oksidisani holesterol i pretvaraju se u penaste ćelije. Makrofagi, odnosno penaste ćelije, putem apoptoze ubijaju vaskularne glatke mišićne ćelije i degradiraju ekstracelularni matriks u fibrozne kapi. To postižu direktnom fagocitozom ekstracelularnog matriksa ili sekrecijom proteolitičkih enzima i time destabilizuju fibroznoj kapu (5, 6). Pored toga što su makrofagi glavni izvor penastih ćelija, oni učestvuju u progresiji arterioskleroze, produkujući niz proinflamacijskih citokina, kao i metaloproteinaza koje učestvuju u razgradnji kolagena fibrozne kape (16). Unutar lezije raspadnute penaste ćelije oslobađaju sadržaj i stvarajući visokotrombogeni, lipidima i holesterolskim kristalima bogat „lipidni bazen“ arteriosklerotične ploče u vidu bestrukturne eozinofilne mase. Ovaj „lipidni bazen“ arteriosklerotičnog plaka odvaja od lumena krvnog suda fibrozna kapa sastavljena od kolagenih vlakana (10).

Prisustvo limfocita u arteriosklerotičnom plaku pobuđuje veliko interesovanje s obzirom na to da su oni najčešće pokazatelji, antigenom pokrenute, specifične inflamacije. S obzirom na to da su B limfociti retki (oko 1%), limfocite u ateromu praktično čine T-limfociti (10, 13).

T-limfociti stimulišu makrofage da produkuju metaloproteinaze koje doprinose liziranju matriksa fibrozne kape i time destabilizuju arteriosklerotični plak. B-limfociti se uglavnom nalaze u periarterijskom vezivnom i masnom tkivu.

Mastociti sekretuju više moćnih proteolitičkih enzima koji razgrađuju kolagen fibrozne kape i time destabilizuju ili dovode do rupture arteriosklerotičnog plaka. Najviše ma-

stocita je nađeno na mestu fisure ili rupture fibrozne kape, gde se nalazi i najviše makrofaga i T-limfocita (22). Kod svih 68 analizovanih rupturisanih arteriosklerotičnih plakova u koronarnim arterijama mi smo našli povećano prisustvo makrofaga, T-limfocita, vaskularnih glatkih mišićnih ćelija i mastocita, posebno na mestu rupture plaka. Fibrozna kapa bila je razorena i infiltrovana ćelijama zapaljenja, sa sledstvenom opturacijskom trombozom lumena krvnog suda. Kod arteriosklerotičnih plakova sa očuvanom fibroznom kapom i njenim intaktnim kolagenim vlaknima nismo ni u jednom od 10 analizovanih plakova našli prisustvo T-

limfocita i mast-ćelija. Lipidni makrofagi bili su prisutni samo u „lipidnom bazenu“ arteriosklerotičnog plaka.

Zaključak

U svim našim slučajevima u rupturisanom arteriosklerotičnom plaku koronarnih arterija nađeni su u velikom broju T-limfociti, vaskularne glatke mišićne ćelije, lipidni makrofagi i mast-ćelije za koje se danas smatra da igraju važnu ulogu u destabilizaciji i rupturi arteriosklerotičnog plaka.

L I T E R A T U R A

1. *Kanjuh V, Ostojić M, Bojić M, Đurić O, Gojković-Bukarica Lj, Tasić N, et al.* Atherosclerosis on the threshold of the 3rd millenium (morphological-clinical correlation of atherosclerotic lesions and relevant clinical syndromes). In: *Nedeljković S, Kanjuh V, Vukotić M*, editors. *Cardiology*. Vol 2. Beograd: Izdavačko preduzeće Beograd; 2000. p. 2393–423. (Serbian)
2. *Falk E, Shah PK, Fuster V.* Coronary plaque disruption. *Circulation* 1995; 92(3): 657–71.
3. *Tatić V.* Pathology of blood vessels. 1st ed. Beograd: Vojnoizdavački zavod; 2000. (Serbian)
4. *Kanjuh V, Ostojić M, Gojković-Bukarica Lj, Teofilovski-Parapid G, Macura N, Durlević Z.* Novelty in pathologic morphology and etiopathogenesis of atherosclerosis. *Arh Farm* 2000; 50(2): 1–11. (Serbian)
5. *Ross R.* The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362(6423): 801–9.
6. *Ross R.* Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340(2): 115–26.
7. *Fuster V, Stein B, Ambrose JA, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH.* Atherosclerotic plaque rupture and thrombosis. Evolving concepts. *Circulation* 1990; 82(3 Suppl): II47–59.
8. *Popović P, Dinčić D, Popović-Milatović A, Banović T, Drašković-Pavlović B.* Immunologic and inflammatory aspects of atherosclerosis. *Vojnosanit Pregl* 2000; 57(1): 89–98. (Serbian)
9. *Popović P, Drašković-Pavlović B, Dinčić D, Obradović S.* Importance of chronic bacterial infections for the onset and development of atherosclerosis. *Vojnosanit Pregl* 2001; 58(4): 407–13. (Serbian)
10. *Libby P.* Atheroma: more than mush. *Lancet* 1996; 348 Suppl 1: s4–7.
11. *Rekhter MD, Hicks GW, Brammer DW, Hallak H, Kindt E, Chen J, et al.* Hypercholesterolemia causes mechanical weakening of rabbit atheroma : local collagen loss as a prerequisite of plaque rupture. *Circ Res* 2000; 86(1): 101–8.
12. *Leinonen M, Saikku P.* Infections and atherosclerosis. *Scand Cardiovasc J* 2000; 34(1): 12–20.
13. *Bhakdi S.* Pathogenesis of atherosclerosis: infectious versus immune pathogenesis. A new concept. *Herz* 2000; 25(2): 84–6.
14. *Aikawa M, Libby P.* Vascular inflammation and activation: new targets for lipid lowering. *Eur Heart J* 2001; 3(Suppl B): B3–B11.
15. *Wick G, Schett G, Amberger A, Kleindienst R, Xu Q.* Is atherosclerosis an immunologically mediated disease? *Immunol Today* 1995; 16(1): 27–33.
16. *Tedgui A, Bernard C.* Cytokines, immuno-inflammatory response and atherosclerosis. *Eur Cytokine Netw* 1994; 5(3): 263–70.
17. *Sinisaalo J, Paronen J, Mattila KJ, Syrjala M, Alfthan G, Palosuo T, et al.* Relation of inflammation to vascular function in patients with coronary heart disease. *Atherosclerosis* 2000; 149(2): 403–11.
18. *Pearson JD.* Normal endothelial cell function. *Lupus* 2000; 9(3): 183–8.
19. *Zaman AG, Helft G, Worthley SG, Badimon JJ.* The role of plaque rupture and thrombosis in coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2000; 149(2): 251–66.
20. *Stary HC.* Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20(5): 1177–8.
21. *Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM.* Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20(5): 1262–75.
22. *Leskinen M, Wang W, Leszczynski D, Lindstedt K, Kovanen P.* Mast Cell Chymase Induces Apoptosis of Vascular Smooth Muscle Cell. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 516–22.

Rad je primljen 21. II 2005. god.

A b s t r a c t

Tatić V, Kanjuh V, Rafajlovski S, Kostić K, Šuščević D. Vojnosanit Pregl 2005; 62(9): 649–653.

**IMPORTANCE OF INFLAMMATION IN ARTERIOSCLEROTIC PLAQUE
DESTABILIZATION AND RUPTURE**

Introduction. Although Rudolf Virchow considered arteriosclerosis an inflammatory disease in his book Cellular Pathology published in 1858, the opinion that it was a degenerative arterial disease as a civilization disease prevailed. Nowadays, a great attention has been paid to the inflammatory process in the patogenesis of arteriosclerosis and particularly in the destabilization and rupture of plaque. **Aim.** To find out whether T and B lymphocytes, lipid macrophages, vascular smooth muscle and mast cells as well as plaque destabilization and rupture are present in ruptured arteriosclerotic plaque in the coronary arteries. **Methods.** Histochemical and immunochemical analyses of 68 ruptured arteriosclerotic plaques from the coronary arteries were performed. Microscopic examination revealed the presence of inflammation elements in all of them. The following histochemical and immunochemical methods were applied: Masson's trichrome, actins, vimentin, CD3, CD43, CD68, CD20, CD45 and chlorine acetyl esterase. The control group included 10 arteriosclerotic plaques from the coronary arteries with fibrous cap, but without inflammation cells. **Results.** Rupture of the arteriosclerotic plaque fibrous cap, with thinned and torn collagen fibers, was found in all of the 68 arteriosclerotic plaques. In 57 out of 68 analysed plaques, the increased number of T-lymphocytes, lipid macrophages, vascular smooth muscle and mast cells particularly on the plaque rupture site were found. In the remaining 11 specimens, mast cells were present in a somewhat smaller number. In the control group with the stable plaque, inflammation cells were not observed. **Conclusion.** Our results pointed out that the inflammatory elements, which might exert an effect upon the arteriosclerotic plaque destabilization, and rupture had been present in the ruptured arteriosclerotic plaque.

Key words : coronary vessels; inflammation mediators; rupture; arteriosclerosis obliterans; immunohistochemistry.