

## ЦИТОХИСТОЛОШКЕ И ИМУНОХИСТОХЕМИЈСКЕ ОСОБИНЕ ВАСКУЛАРНОГ ЗИДА КОД БОЛЕСТИ КРВНИХ СУДОВА

Весна ЛАЧКОВИЋ<sup>1</sup>, Ирена ВУКОВИЋ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт за хистологију и ембриологију, Медицински факултет, Београд;

<sup>2</sup>Институт за хистологију и ембриологију, Медицински факултет, Крагујевац

### КРАТАК САДРЖАЈ

**Увод** Васкуларно ремоделовање представља комплекс адаптивних процеса који прилагођавају структуру и функцију крвних судова дугорочним променама хемодинамских услова. Оно доводи до морфолошких промена у структури зида код различитих обољења кардиоваскуларног система, као што су хипертензија, атеросклероза и коарктација аорте.

**Циљ рада** У овом истраживању испитане су цитохистолошке и имунохистохемијске особине атеросклерозних коронарних артерија и коарктације аорте адултног типа.

**Метод рада** Анализирани су 21 узорак коронарних артерија који је добијен током аутопсија и 10 узорака коарктационих сегмената тораксне аорте који су добијени током операције. У анализи су примењени хистохемијски (*orcein* и *alcian blue-PAS*) и имунохистохемијски ( $\alpha$ -актин, тешки ланци миозина, виментин, дезмин, *CD3*, *CD45*, *S100* протеин и *PCNA*) методи на нивоу оптичке микроскопије, као и трансмисиона електронска микроскопија (ТЕМ).

**Резултати** Резултати истраживања крвних судова измењених услед атеросклерозе показали су у почетку функционално, а затим, у каснијим стадијумима, и морфолошко оштећење ендотела. Од стадијума преатерома запајају се недиференциране глатке мишићне ћелије које експримирају виментин и  $\alpha$ -актин, уз изостанак реакције на дезмин и тешке ланце миозина. Упоредо с овим променама, уочавају се и пенасте ћелије различитог порекла. Неке од њих су *CD68* имунореактивне, док су остале виментин и *S-100* имунореактивне. У свим анализираним узорцима коарктације аорте запајају се недиференциране глатке мишићне ћелије, као и изразита хипоцелуларност праћена апоптозом глатких мишићних ћелија и изостанком запаљења.

**Закључак** Пенасте ћелије потичу од моноцитно-макрофагне лозе (*CD68* имунореактивне), али и од глатких мишићних ћелија медије и интима коронарних артерија (виментин и *S-100* имунореактивне). Коарктацију одликује неинфламационо смањење броја глатких мишићних ћелија (апоптоза), као и њихова недиференцијација из контрактилног у синтетски фенотип.

**Кључне речи:** атеросклероза; коарктација; глатке мишићне ћелије; задебљање интима

### УВОД

Васкуларно ремоделовање је заједнички детерминатор многих физиолошких и патолошких процеса у кардиоваскуларном систему [1]. Започиње обично као адаптивни процес који прилагођава структуру и функцију крвних судова дугорочним хемодинамским променама, изазивајући структурне промене које обухватају ћелијску пролиферацију, изумирање и миграцију, као и производњу и разградњу ванћелијског матрикса. Динамика и обим васкуларног ремоделовања зависе од интеракције локалних фактора раста вазоактивних супстанција и хемодинамских стимулуса [2]. Васкуларно ремоделовање индуковано механичким силама, вазоактивним супстанцијама и инфламационим медијаторима има главну улогу у настанку широког спектра кардиоваскуларних обољења. Наша истраживања су била усмерена на процесе атеросклерозе и коарктације аорте с аспекта порекла и фенотипских модулација глатких мишићних ћелија, као главних ћелијских компоненти интима, и на проучавање састава васкуларног ванћелијског матрикса чије конституенце производе глатке мишићне ћелије. Ова истраживања су обављена у оквиру наших дугодишњих истраживања кардиоваскуларних структурних компоненти у нормалним и патолошким условима [3-8].

Савремена истраживања су показала да васкуларне глатке мишићне ћелије могу да настану из различитих извора, укључујући глатке мишићне ћелије медије, ендотелне ћелије, адвентицијалне фибробласте, циркулишуће стем ћелије и ћелије нервног гребена [9]. Све оне у интими подлежу фенотипској модулацији у одговору на промене микросредине. Због целуларне хетерогености глатких мишићних и других ћелија у васкуларном зиду, истраживања цитохистолошких и имунохистохемијских особина васкуларних зидова код ових обољења веома су значајна. Атеросклероза је болест веома сложене природе у коју су, осим глатких мишићних ћелија, укључени и лимфоцити, неутрофили, ендотелне ћелије и циркулишуће мултипотентне стем ћелије костне сржи [10]. У процесима атеросклерозе долази до задебљања интима крвног суда и стварања неоинтима. Кључну улогу у овом процесу имају глатке мишићне ћелије. Коарктација тораксне аорте представља конгенитално сужење горњег дела десцендентне аорте, непосредно уз припој дуктуса или лигаментума артериозума, које доводи до разлике у притиску изнад и испод места сужења [11, 12]. На основу узраста болесника, коарктација може да буде инфантилног (неонатусног) и адултног типа [13]. Инфантилни тип коарктације одликује присуство дуктусног слинга (*sling*) и коарктационог шелфа (*shelf*), постављеног проксимално у односу на ушће дуктуса [14]. Код адултног типа ко-

арктације хистолошки налаз показује цистичну медијалну некрозу [15].

### ЦИЉ РАДА

Циљ рада је био да се утврде фенотипски статус глатких мишићних ћелија у васкуларном зиду аорте у коронарним артеријама измењеним услед атеросклерозе и коарктацији адултног типа и састав ванћелијског матрикса, да се испитају *T* лимфоцитне и леукоцитне инфилтрације у патолошки измењеном зиду ових артерија ради утврђивања запаљенске реакције, као и да се утврди порекло пенстих ћелија.

### МЕТОД РАДА

У овом истраживању коришћен је 21 узорак десних коронарних артерија измењених услед атеросклерозе, који су добијени током аутопсија особа оба пола на Институту за патолошку анатомију Медицинског факултета у Крагујевцу, као и 10 узорака ткива коарктационих сегмената тораксне аорте који су узети током операције деце оба пола на Универзитетској дечјој клиници у Београду после ресекције са тзв. *end-to-end* анастомозом.

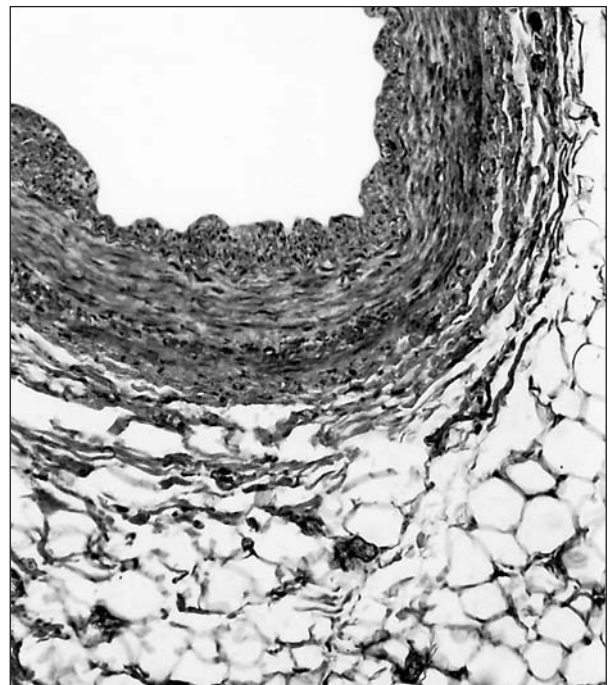
Током рутинске обраде препарата добијени узорци ткива су фиксирани у четворопроцентном неутралном пуферисаном раствору формалина. По завршеној фиксацији узорци су дехидратисани провођењем кроз серију алкохола растуће концентрације, просветљавани у ксилолу и калупљени у парапласту. Попречни пресеци дебљине од 5  $\mu\text{m}$  сечени су микротомом *Leica SM 2000R*. После депарафинисања у ксилолу и хидратације исечци су бојени орцеином за идентификацију еластичних влакана, Азан-Хајденхајновим (*Azzan-Heidenhain*) методом за коллагена влакна и *alcian blue-PAS* реакцијом на две *pH* вредности (*pH*=1,0 и *pH*=2,5) за диференцирање киселих и неутралних мукополисахарида [16].

За имунохистохемијска испитивања исечци су монтирани на посебне високо адхерентне плочице *SuperFrost* и на њима је примењена техника *DAKO LSAB<sup>+</sup>/HRP*. Коришћена су следећа примарна антитела:  $\alpha$ -актин глатких мишићних ћелија, *CD3*, *CD45* или *LCA (Leukocyte Common Antigen)*, дезмин, тешки ланци глаткомишићног миозина, *S-100* протеин, виментин и *PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen)* [16].

За истраживања на нивоу трансмисионе електронске микроскопије (ТЕМ) фиксација је вршена у хладном раствору двоипроцентног глутаралдехида у 0,1 *M* какодилатном пуферу, а постфиксација у једнопроцентном раствору *OsO<sub>4</sub>* у 0,1 *M* какодилатном пуферу. Узорци су после тога остављани у 4,8-процентном уранил-ацетату (засићен раствор) преко ноћи на 4°C. После фиксације уследили су дехидратација и калупљење у епону 812. Сечење узорака је вршено на ултратанком *LKB II*. Полутанки пресеци бојење су толуидин-плавим и сребром, а ултратанки дво-процентним раствором уранил-ацетата и олово-цитрата [16, 17].

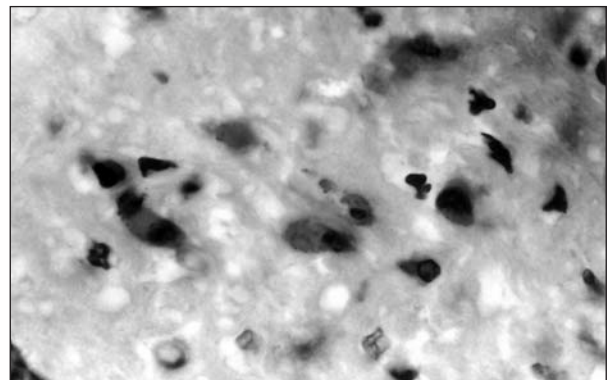
### РЕЗУЛТАТИ

Резултати анализе коронарних артерија измењених услед атеросклерозе су показали да на стадијуму иницијалне лезије нема видљивог морфолошког оштећења ендотела. У субендотелу интима запажају се појединачне пенасте (*CD68* имунореактивне) ћелије, као и појединачни *T* лимфоцити (*CD3* имунореактивни). Глатке мишићне ћелије интима и медије испољавају имунореактивност на показатеље добро диференцираног контрактилног фенотипа ( $\alpha$ -глаткомишићни актин, тешке ланце глаткомишићног миозина и дезмин) (Слика 1). На стадијуму масне траке запажа се повећање броја пенстих ћелија (Слика 2), као и интензивна *T* лимфоцитна инфилтрација. Глатке мишићне ћелије показују имунореактивност на  $\alpha$ -глаткомишићни актин и виментин, уз останак реакције на тешке ланце глаткомишићног



СЛИКА 1. Зид коронарне артерије на стадијуму масне траке (имунохистохемијско бојење на тешке ланце глаткомишићног миозина,  $\times 64$ )

FIGURE 1. Coronary artery wall on the stage of lipid streak (immunocytochemical staining on myosin heavy chains,  $\times 64$ )



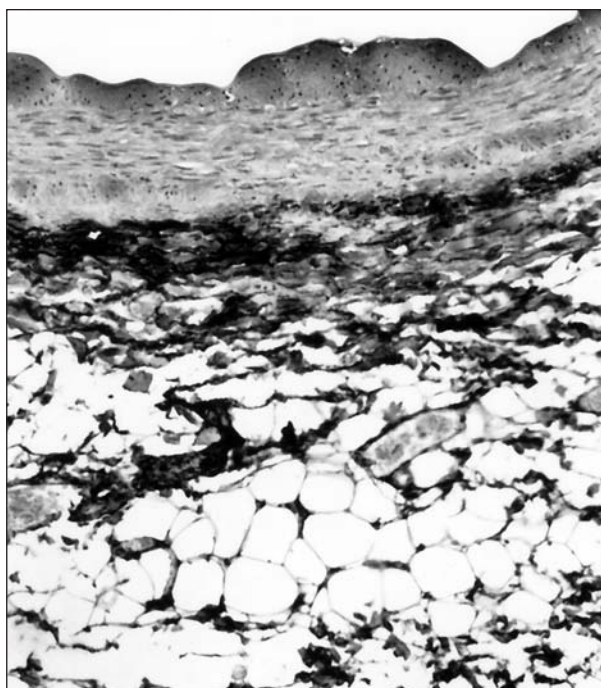
СЛИКА 2. Масна трака – пенасте ћелије (имунохистохемијско бојење на *CD68*,  $\times 256$ ).

FIGURE 2. Lipid streak – foam cells (immunocytochemical staining on *CD68*,  $\times 256$ ).



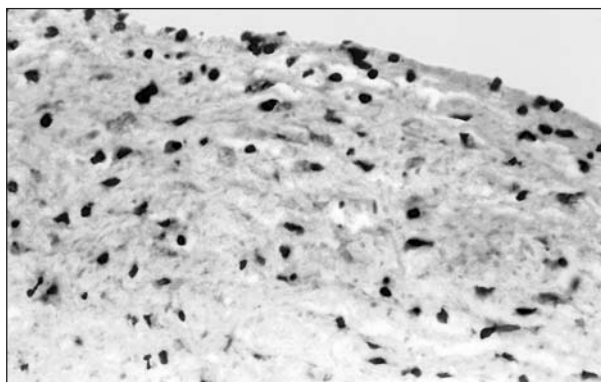
миозина и дезмин, док миофибробласти у адвентицији почињу да експримирају тешке ланце глаткомишићног миозина и дезмина (Слика 3). Запажа се и велики број *S-100* имунореактивних глатких мишићних ћелија (Слика 4). На стадијуму преатерома глатке мишићне ћелије интимае и медије у потпуности губе експресију показатеља контрактилног фенотипа. На стадијуму атерома доминантну промену у интими чини липидно језгро, преко којег се налази танка фиброзна капа. У липидном језгру се налазе недиференциране глатке мишићне ћелије и остаци ћелијске некрозе. На стадијуму фиброзног плака запажа се изразита хипоцелуларност.

На свим узорцима коарктације аорте адултног типа запажа се фокусно задебљање интимае задњег зида аорте праћено задебљањем адвентиције на истом месту (Слика 5). Субендотелни слој интимае на месту задебљања показује изразито смањење броја ћелија.



**СЛИКА 3.** Зид коронарне артерије на стадијуму масне траке (имунохистохемијско бојење на тешке ланце глаткомишићног миозина,  $\times 64$ ).

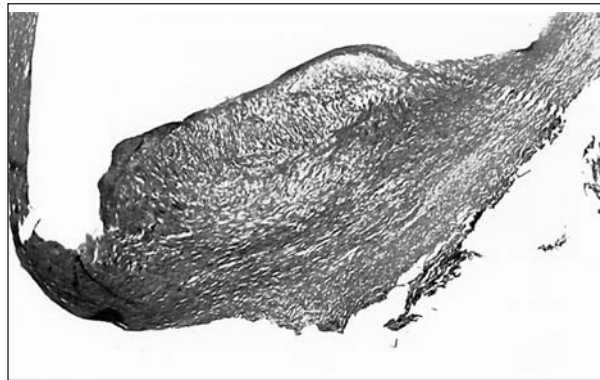
**FIGURE 3.** Coronary artery wall on the stage of lipid streak (immunocytochemical staining on myosin heavy chains,  $\times 64$ ).



**СЛИКА 4.** Зид коронарне артерије на стадијуму масне траке (имунохистохемијско бојење на *S-100* протеин,  $\times 128$ ).

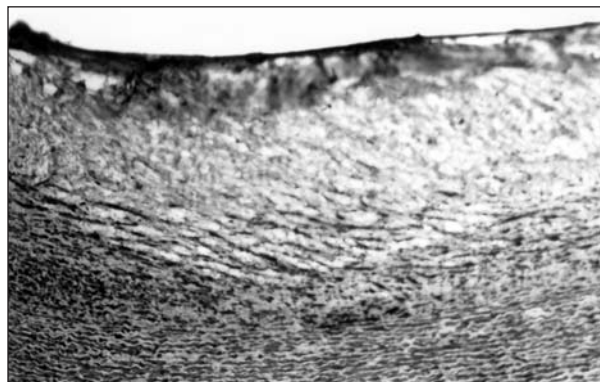
**FIGURE 4.** Coronary artery wall on the stage of lipid streak (immunocytochemical staining on *S-100* protein,  $\times 128$ ).

Ретке ћелије су имунореактивне на  $\alpha$ -глаткомишићни актин и виментин (Слика 6). Најдоминантнија промена ових фокалних задебљања субендотелног слоја интимае је велика количина ванћелијског матрикса. Он се састоји од великог броја коллагених влакана добро обојених Азан-Хајденхајновом техником и мало дезоријентисаних еластичних влакана идентификованих интензивним бојењем орцеином (Слика 7). Основна супстанција показује цистичан изглед због распореда околних влакана. Ове псеудоцисте показивале су изразито бојење *alcian blue-PAS* реакцијом на  $pH=1,0$ , док ова реакција изо-



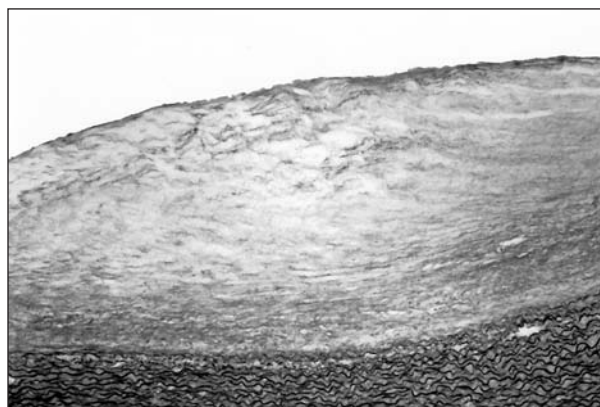
**СЛИКА 5.** Фокално задебљање интимае задњег зида аорте праћено задебљањем адвентиције (*alcian blue-PAS*,  $pH 1,0$ ,  $\times 8$ ).

**FIGURE 5.** Focal intimal thickening on the posterior aortic wall followed by adventitial thickening (*alcian blue-PAS*,  $pH 1.0$ ,  $\times 8$ ).



**СЛИКА 6.** Фокално задебљање интимае на задњем аортном зиду (имунохистохемијско бојење на  $\alpha$ -глаткомишићни актин,  $\times 128$ ).

**FIGURE 6.** Focal intimal thickening on the posterior aortic wall (immunocytochemical staining on  $\alpha$ -SMA,  $\times 128$ ).

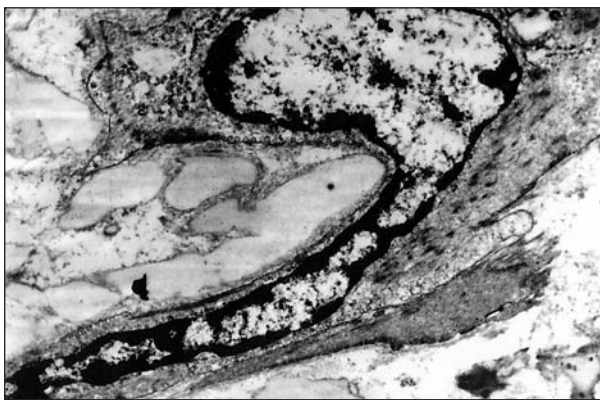


**СЛИКА 7.** Еластична влакна у интими задњег аортног зида (*orcein*,  $\times 128$ ).

**FIGURE 7.** Elastic fibres in intima of posterior aortic wall (*orcein*,  $\times 128$ ).

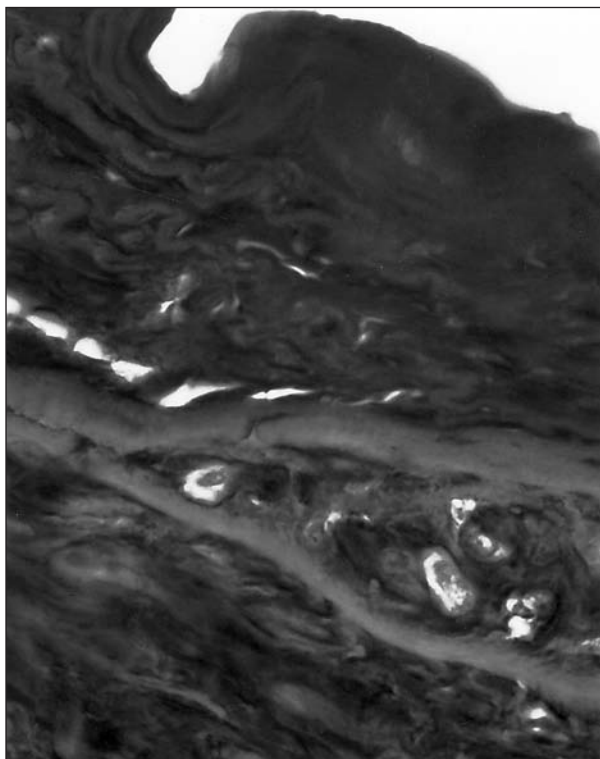
стаје на  $pH=2,5$ . Унутар ових цисти налази се веома мали број хелија које су такође имунореактивне на  $\alpha$ -глаткомишићни актин и виментин, исто као и малобројне хелије које се налазе ван ових цистичних формација (Слика 6). Налази електронске микроскопије су показали да ове хелије имају еухроматско једро, развијен гранулирани ендоплазматски ретикулум (ГЕР), Голџијев комплекс и смањен број миофиламената (Слика 8).

Тунику медију аорте испод субендотелног задебљања (унутрашњи слој медије) одликују исправљање, фрагментација, фенестрација и редупликација еластичних ламина. Уочавају се такође бројне цистичне формације испуњене садржајем који се интензивно боји *alcian blue-PAS* реакцијом на  $pH=1,0$ ,



СЛИКА 8. Недиференцирана глатка мишићна ћелија у интими задњег аортног зида (TEM,  $\times 54000$ ).

FIGURE 8. Dedifferentiated smooth muscle cell in intima on posterior aortic wall (TEM,  $\times 54000$ ).

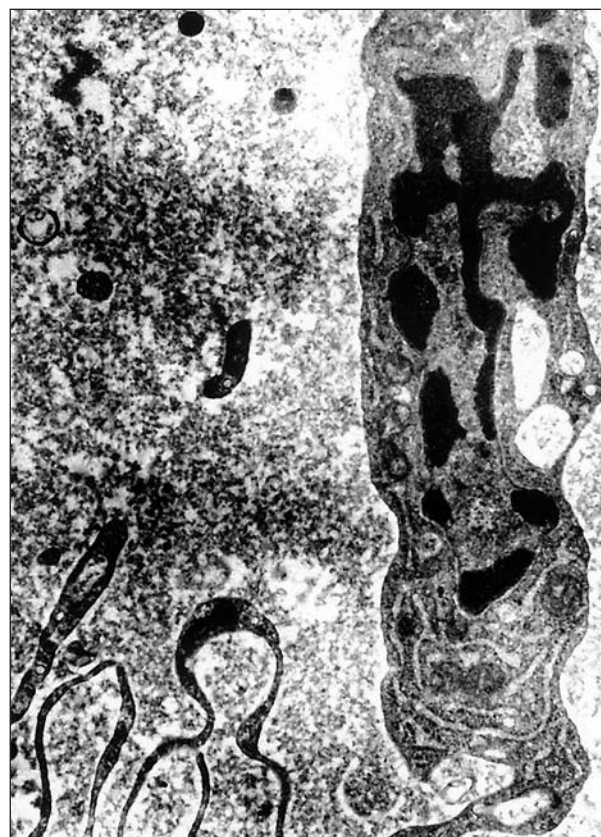


СЛИКА 9. Интима и унутрашњи део медије задњег аортног зида (*alcian blue-PAS*,  $\times 256$ ).

FIGURE 9. Intima and inner media of posterior aortic wall (*alcian blue-PAS*,  $\times 256$ ).

слично као и цисте у субендотелном слоју (Слика 9). На нивоу електронске микроскопије утврђене су хелије у којима су доминантне промене кондензација хроматина и његова маргинализација уз унутрашњу мембрану једра, фрагментација једра, као и евагинације хелијске мембране. Ове хелије поседују очувану плазмамембрану и издужене, танке цитоплазматске продужетке у којима се могу идентификовати фрагменти једра (Слика 10). Спољашњи део медије показује сличне особине, међутим, значајан је налаз бројних хелија имунореактивних на  $\alpha$ -глаткомишићни актин и виментин.

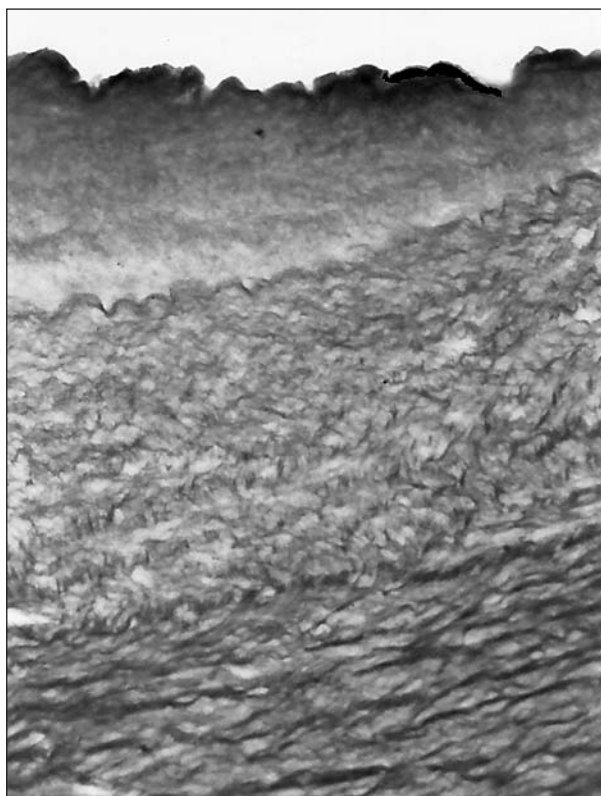
На антеромедијалном зиду аорте, наспрам описаног субендотелног задебљања, запажа се униформно задебљали субендотелни слој интимае, углавном састављен од густо распоређених еластичних влакана са минималном количином основне супстанције и без хелија (Слика 11). У медији се, непосредно испод овог слоја, уочавају многобројне хелије које показују изразиту *PCNA* и *S-100* имунореактивност, као и имунореактивност на  $\alpha$ -глаткомишићни актин и виментин (Слика 12). У спољашњем делу медије хелије показују имунореактивност на тешке ланце глаткомишићног миозина и дезмин (Слика 13). У медији ове стране запажа се велики број цистичних формација испуњених садржајем који се боји *alcian blue-PAS* реакцијом када се она одвија на  $pH=1,0$  (Слика 14). Имунохистохемијска бојења на *CD3* и *CD45* антигене показала су изостанак реакције у свим деловима васкуларног зида коарктационог сегмента аорте.



СЛИКА 10. Глатка мишићна ћелија у апоптози (TEM,  $\times 54000$ ).

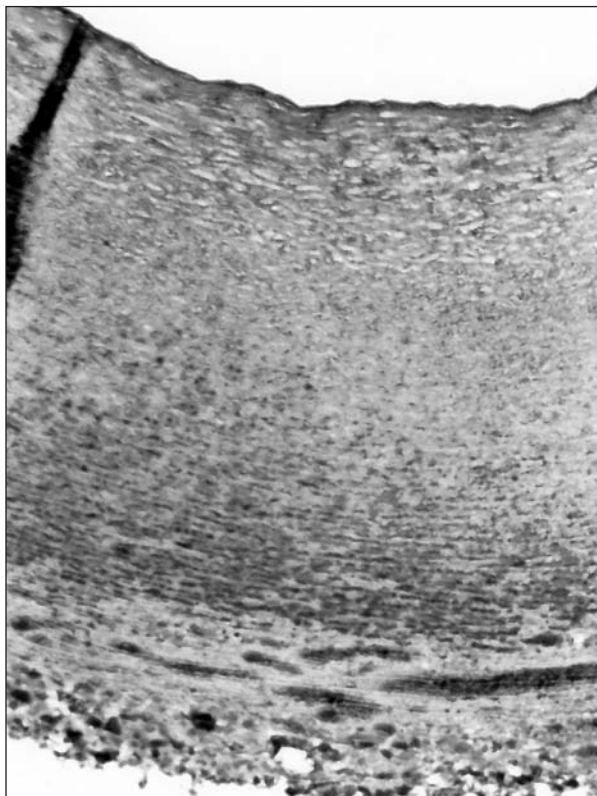
FIGURE 10. Apoptotic smooth muscle cell (TEM,  $\times 54000$ ).





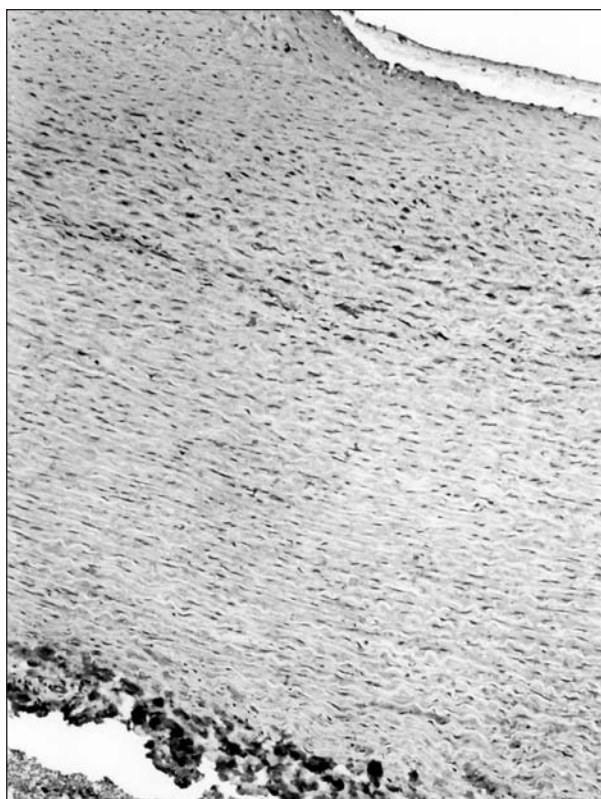
**СЛИКА 11.** Интима, унутрашњи и спољашњи део медије антеро-медијалног дела аортног зида (*orcein*, x128).

**FIGURE 11.** Intima, inner and outer media of anteromedial aortic wall (*orcein*, x128).



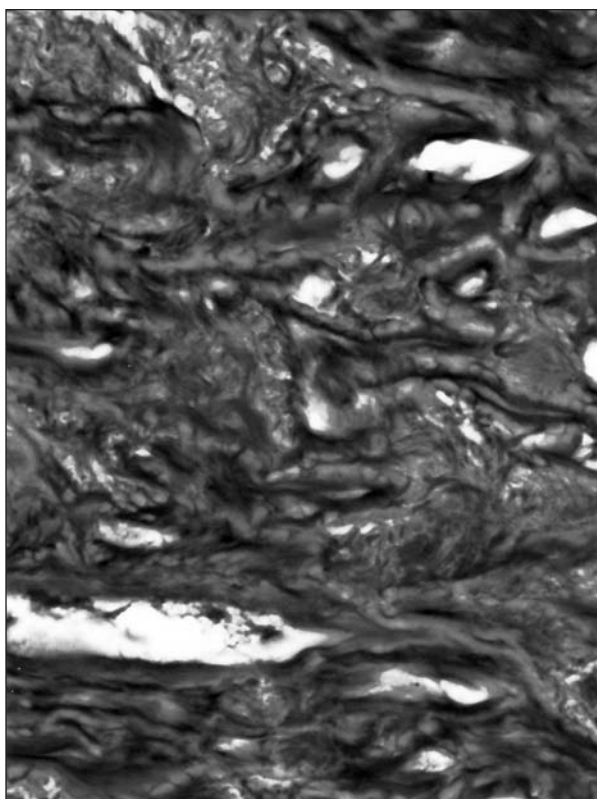
**СЛИКА 13.** Антеромедијални аортни зид са диференцираним глатким мишићним ћелијама у спољашњој медији (имунохистохемијско бојење на дезмин, x64).

**FIGURE 13.** Anteromedial aortic wall with differentiated smooth muscle cells in outer media (immunocytochemical staining on desmin, x64).



**СЛИКА 12.** S-100 имунореактивне ћелије и унутрашњем делу медије антеромедијалног аортног зида (имунохистохемијско бојење на S-100 протеин, x64).

**FIGURE 12.** S-100-positive cells in inner media of the anteromedial aortic wall (immunocytochemical staining on S-100 protein, x64).



**СЛИКА 14.** Цисте у медији аорте у коарктацији адултног типа (*alcian blue-PAS, pH 1,0*, x256).

**FIGURE 14.** Pseudocysts in aortic media in coarctation of the aorta – adult type (*alcian blue-PAS, pH 1.0*, x256).

## ДИСКУСИЈА

Резултати анализе коронарне атеросклерозе показали су најпре функционално, а затим и морфолошко оштећење ендотела коронарних артерија. Већ од стадијума масне траке запажа се недиференцијација глатких мишићних ћелија интима које губе показатеље контрактилног фенотипа. Ова појава је праћена повећањем експресије виментина и *S-100* протеина, који код неких глатких мишићних ћелија указује на специфично порекло из нервног гребена. Недиференцијација глатких мишићних ћелија прогредира развојем лезије. Упоредо с тим процесом запажају се, већ од стадијума преатерома, пенасте ћелије различитог порекла: један број потиче од моноцитно-макрофагне лозе (*CD68* имунореактивне), друге су глаткомишићног порекла, и то како од ћелија тунике медије (виментин-имунореактивне), тако и од ћелија нервног гребена (*S-100* имунореактивне). У касним стадијумима атеросклерозне лезије запажа се изразита хипоцелуларност, праћена интензивним запаљењем, па овакав резултат сугерише да је смањење броја ћелија током процеса атеросклерозе великим делом настало као последица ћелијске некрозе.

У свим испитиваним узорцима коарктационих сегмената аорте уочава се задебљање у субендотелу интима, које је на задњем аортном зиду фокално и проминира у лумен, што је иначе одлика коарктације аорте [17]. Субендотелни слој фокалног задебљања показује изразиту хипоцелуларност. Уочене ретке ћелије у задебљању показале су имунореактивност на  $\alpha$ -глаткомишићни актин, што показује да су то глатке мишићне ћелије [18]. Међутим, ове ћелије су испољиле имунореактивност на виментин, као и изостанак реакције на показатеље диференцираног контрактилног фенотипа, односно тешке ланце глаткомишићног миозина и дезмин. Познато је да је дезмин показатељ диференцираног контрактилног фенотипа глатке мишићне ћелије, као и то да се коекспримира са виментином [18]. Упоредо са губитком дезминске експресије евидентна је експресија виментина. Пошто се ова два интермедијарна филамента коекспримирају у васкуларним глатким мишићним ћелијама [18], „померање” експресије ка виментину би могло да сугерише на губитак контрактилних особина [18, 19]. Ови резултати, заједно са резултатима ТЕМ, указали су на то да ове ћелије представљају синтетски фенотип глатких мишићних ћелија.

У унутрашњем делу медије, испод фокалне промене, методом ТЕМ идентификоване су ћелије чије промене указују на то да су ово глатке мишићне ћелије које се налазе у процесу апоптозе [20]. Изостанак реакције на *CD3* и *CD45* показује да у околини ових ћелија нема запаљењске реакције. На основу овога би могло да се претпостави да је до смањења броја ћелија дошло процесом апоптозе, а не некрозе, као што је описивано у литератури [21].

Хистохемијска испитивања псеудоцистичних поља у фокалном задебљању и унутрашњој медији указују на присуство јако сулфатисаних муцина (протеогликана) у саставу ових депозита, док је заступљеност хијалуронске киселине мања [22, 23]. Добијени

резултати искључују присуство неутралних муцина, што је у сагласности са наводима у доступној литератури [24].

У делу зида аорте са супротне стране задебљања, у субендотелу интима, велики број еластичних влакана указује на промену која се описује као „нећелијска места” („ацелуларна места”) [21, 24]. У медији испод овог густог еластичног ткива (унутрашњи слој медије) идентификоване су ћелије имунореактивне на *PCNA*, као и на  $\alpha$ -глаткомишићни актин и виментин, што заједно с ултраструктурним истраживањима указује на то да је реч о синтетском фенотипу глатких мишићних ћелија [25]. Занимљив је налаз *S-100* имунореактивних ћелија у овом слоју, али је природа ових ћелија нејасна. Показано је да се један од деветнаест подтипова *S-100* мултигеног протеина – *S-100A6* експримира у васкуларним глатким мишићним ћелијама [26]. Такође је познато да је експресија *S-100* протеина повезана с унутарћелијским механизмима који имају  $Ca^{++}$  зависну регулацију, попут фосфорилације, диференцијације и, што је овде посебно значајно, пролиферације [26, 27]. Овакав резултат би такође могао да одговара и описаној уобичајеној расподели васкуларних дендритских ћелија, међутим, ове ћелије се у неупоредиво већем броју налазе у интими атеросклерозних лезија [28]. Такође је показано да васкуларни миофибробласти у условима повећаног притиска могу да експримирају *S-100* протеин током своје пролиферације у „раном васкуларном одговору” [29, 30].

У спољашњем слоју медије ове стране аортног зида глатке мишићне ћелије су имунореактивне на тешке ланце глаткомишићног миозина и дезмин, што показује да је реч о потпуно диференцираном контрактилном фенотипу глатких мишићних ћелија [31].

## ЗАКЉУЧАК

У ремоделованом артеријском зиду у патолошким условима основну ћелијску популацију представљају глатке мишићне ћелије недиференцираног, синтетског фенотипа. Пенасте ћелије потичу од моноцитно-макрофагне лозе, али и од глатких мишићних ћелија тунике медије и од ћелија нервног гребена. Недиференцијација ових ћелија прогредира током развоја лезије. Упоредо с овим процесом активирају се адвентицијални миофибробласти. Резултати истраживања коарктационих сегмената аорте показали су да се на задњој страни коарктационог сегмента аорте, непосредно испод фокалног задебљања, недиференциране глатке мишићне ћелије налазе и у унутрашњем и у спољашњем делу медије. У делу зида наспрам фокалног задебљања резултати показују да је недиференцирање глатких мишићних ћелија захватило и ову страну, али да је медија очуванија (синтетске ћелије се налазе само у унутрашњем слоју медије). Ови резултати указују на то да се процес недиференцијације глатких мишићних ћелија, али и фрагментација, фенестрација и исправљање ламина, одигравају од унутрашњег ка спољашњем делу медије и од постериорне ка антеромедијалној страни зида аорте. Доминантан процес у настанку хипоцелулар-

ности током каснијих фаза атеросклерозе била би ћелијска некроза, док је код коарктације аорте адултног типа смањење броја ћелија незапаљењске природе и настало вероватно као последица апоптозе.

## ЛИТЕРАТУРА

- Pasterkamp G, Galis ZS, de Kleijn DPV. Expansive arterial remodeling: location, location. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 2004; 24:429-34.
- Endemann DH, Touyz RM, Iglarz CS, Schiffrin EL. Eplerenone prevents salt-induced vascular remodeling and cardiac fibrosis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2004; 43:1252-63.
- Lačković V, Japundžić M, Bumbaširević V, Miličević S. The occurrence and characterization of metallophilic reaction in endothelial cells lining the splenic sinusoids in adult rats and its relation to iron storage. *IRCS Med Sci* 1986; 14:225-6.
- Lačković V. *Cirkulatorni sistem*. Beograd: Nauka; 2001.
- Vuković I, Lačković V, Todorović V, Kanjuh V, Ilić S. Cytohistologic and immunohistochemical characteristics of the aortic intima and media in coarctation of the aorta of the adult type. *Srp Arh Celok Lek* 2004; 132(Suppl 1):66-71.
- Ilić S, Vuković I, Hercog Đ, et al. Surgery for coarctation of the aorta in infants younger than three months. *Srp Arh Celok Lek* 2004; 132(Suppl 1):27-33.
- Lačković V, Šternić N, Kanjuh V, Kostić V, Vuković I. Angiogenesis in the central nervous system: a role of vascular endothelial growth factor. *Vojnosanit Pregl* 2005; 62(1):59-67.
- Vuković I, Ilić S, Stanković V, Lačković V, Todorović V. Cytohistology and immunocytochemistry of neointimal thickening in aortic coarctation of adult type. *Medicus* 2005; 6(1):11-7.
- Yoshida T, Owens GK. Molecular determinants of vascular smooth muscle cell diversity. *Circulation Res* 2005; 96:280-92.
- Hristov M, Erl W, Weber CP. Endothelial progenitor cells mobilization, differentiation, and homing. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:1185-9.
- Allan LD, Crawford DC, Tynan M. Evolution of coarctation of the aorta in intrauterine life. *Br Heart J* 1984; 52:471.
- Russell GA, Berry PJ, Watterston K, Dhasmana JP, Wisheart JD. Patterns of ductal tissue in coarctation of the aorta in the first three months of life. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1991; 102:569-76.
- Campbell BD, Waldhausen AJ. Coarctation of the aorta: A surgical option revisited. *Ann Thorac Surg* 1990; 49:863-71.
- Machii M, Becker EA. Nature of coarctation in hypoplastic left heart syndrome. *Ann Thorac Surg* 1995; 59:1491-4.
- Reifenstein GH, Levine SA, Gross RE. Coarctation of the aorta. A review of 104 autopsied cases of the "adult type" 2 years of age or older. *Am Heart J* 1947; 33:146-68.
- Bancroft JD, Gamble M. *Theory and Practice of Histological Techniques*, Bancroft JD, Gamble M, editors. 5<sup>th</sup> edition. Edinburgh, London, New York, Oxford: Churchill Livingstone; 2002.
- Lačković V, Japundžić M, Vuzevski V, Bumbaširević V, Stefanović B. Use of silver methenamine staining in the study of the dark cell-light cell phenomenon. *Med Sci Res* 1990; 18:615-6.
- van Son AMJ, van Asten NJCW, van Lier JH. A comparison of coarctation resection and subclavian flap angioplasty using ultrasonographically monitored postocclusive reactive hyperemia. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993; 100:817-29.
- Battifora H. Assessment of antigen damage in immunohistochemistry. The vimentin internal control. *Am J Clin Pathol* 1991; 96:669-71.
- Murry CE, Gipaya CT, Bartosek T, Bendit EO, Schwartz SM. Monoclonality of smooth muscle cells in human atherosclerosis. *Am J Pathol* 1997; 151:697-705.
- Dimmeler S, Hermann C, Zeiher MA. Apoptosis of endothelial cells. Contribution to the pathophysiology of atherosclerosis? *Eur Cytokine Netw* 1998; 9:697-8.
- Isner JM, Donaldson RF, Fulton D, Bhan I, Payne D, Cleveland R. Cystic medial necrosis in coarctation of the aorta: a potential factor contributing to adverse consequences observed after percutaneous balloon angioplasty of coarctation sites. *Circulation* 1987; 75:689-95.
- Gallagher PJ. Blood vessels. In: *Histology for pathologists*, Stephen S. Sternberg, editors. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1997; p.763-86.
- Totty AB. The Mucins. In: *Theory and Practice of Histological Techniques*. Bancroft JD, Gamble M, editors. 5<sup>th</sup> edition. Edinburgh, London, New York, Oxford: Churchill Livingstone; 2002.
- Rottino A. Medial degeneration of the aorta. A study of two hundred and ten routine autopsy specimens by a serial block method. *Arch Path* 1939; 28:377-85.
- Thyberg J, Blomgren K, Hedin U, Dryjski M. Phenotypic modulation of smooth muscle cells during the formation of neointimal thickenings in the rat carotid after balloon injury: an electron-microscopic and stereological study. *Cell Tiss Res* 1995; 281:421-33.
- Donato R. Functional roles of S-100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type (review). *Biochem Biophys Acta* 1999; 1450:192-231.
- Orehov AN, Andreeva ER, Mikhailova IA, Gordon D. Cell proliferation in normal and atherosclerotic human aorta: proliferative splash in lipid-rich lesions. *Atherosclerosis* 1998; 139:41-8.
- Bobryshev YV, Kononov HV, Lord RSA. Ultrastructural recognition of dendritic cells with dendritic cell appearance in the intimal lesions of aortas of chickens affected with Marec's disease. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1999b; 31:179-85.
- Zalewski A, Shi Y. Vascular myofibroblasts. Lessons from coronary repair and remodeling. *Brief Rev of Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:417-22.
- Vuković I. *Citohistološke i imunohistohemijske karakteristike aterosklerotičnih i neaterosklerotičnih proliferacija u intimi [magistarska teza]*. Beograd: Medicinski fakultet; 2003.



## CYTOHISTOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF VASCULAR REMODELLING IN DISEASES OF THE BLOOD VESSELS

Vesna LAČKOVIĆ<sup>1</sup>, Irena VUKOVIĆ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Histology and Embryology, School of Medicine, University of Belgrade, Belgrade;

<sup>2</sup>Institute of Histology and Embryology, School of Medicine, University of Kragujevac, Kragujevac

**INTRODUCTION** Vascular remodelling is an adaptive process involving the adjustment of the structure and function of blood vessels to long-term changes in haemodynamic conditions. This process leads to structural alterations within vessel walls in different cardiovascular diseases, such as hypertension, atherosclerosis, and coarctation of the aorta.

**OBJECTIVE** We investigated the histochemical and immunocytochemical characteristics of morphological lesions in coronary atherosclerosis and coarctation of the aorta.

**METHOD** Twenty-one samples of atherosclerotically modified right coronary arteries, divided into 6 segments, were analysed. We also examined 10 samples of coarctation segments, excised during surgery. The segments were stained histochemically (using orcein and alcian blue-PAS), immunocytochemically (using  $\alpha$ -smooth muscle actin- $\alpha$ -SMA, vimentin, desmin, myosin heavy chains-MHC, CD3, CD45, S-100, and Proliferating Cell Nuclear Antigen-PCNA), and for electron microscopy.

**RESULTS** The results of our study of morphological lesions in coronary atherosclerosis demonstrated initial functional and then, in the later stages of atherosclerosis, morphological, damage to the endothelium. The preatheroma stage revealed the presence of intimal dedifferentiation of smooth muscle cells, with the expression of vimentin and  $\alpha$ -SMA, and the lack of expression of desmin. Along with these changes, a huge num-

ber of foam cells of variant origin were noticed. Some of them were CD68-immunoreactive while others were both vimentin- and S-100-immunoreactive. All examined samples of the coarctation of the aorta demonstrated the presence of dedifferentiated smooth muscle cells as well as a diminution in cell numbers, followed by apoptotic smooth muscle cells, and the absence of inflammatory cells.

**CONCLUSION** Some foam cells develop from monocyte-macrophage lineage (CD68-immunoreactive), while others originate from smooth muscle cells (vimentin and S-100-immunoreactive). Coarctation of the aorta is characterised by a diminution in cell numbers (apoptosis) as well as their dedifferentiation from contractile to synthetic phenotype.

**Key words:** atherosclerosis; coarctation; smooth muscle cells; intimal thickening

Vesna LAČKOVIĆ  
Institut za histologiju i embriologiju  
Medicinski fakultet  
Višegradska 26, 11000 Beograd  
Tel.: 011 361 5772  
E-mail: mvlacko@eunet.yu

\* Приступно предавање је одржано 7. марта 2005. године.