

PARTICULARITĂȚILE EVOLUTIVE ALE PLĂCILOR ATEROSCLEROTICE A ARTERELOR POLIGONULUI WILLIS

**Eremia Zota – mem. cor., dr. hab. în șt. med., prof. univ.,
Catedra de Anatomie Patologică, USMF „Nicolae Testemițanu”,
Cercetător științific superior al Centrului de Patologie și Patobiologie „Vasile Anestiade”,
Departamentul Boli Cerebro-Vasculare, IMSP IMU AȘM,
Andrei Munteanu – asist. univ.,
Catedra de Anatomie Patologică, USMF „Nicolae Testemițanu”, cercetător științific
al Centrului de Patologie și Patobiologie “Vasile Anestiade”,
Departamentul Boli Cerebro-Vasculare, IMSP IMU, AȘM
e-mail: amannberg@yandex.ru, tel. mob. +37369315977**

Rezumat

Numeroase studii au demonstrat că disfuncția endotelială este un semn precoce al aterosclerozei, ceea ce favorizează creșterea permeabilității vasculare, activarea mastocitelor și migrarea leucocitelor, limfocitelor, macrofagelor, adeziunea plachetară, proliferarea celulelor musculare netede vasculare și eventual vasospasmul, ce în ansamblu determină un statut pro-inflamator. Toate componentele mai sus menționate pot fi considerate participanți patogenetici activi în ateroscleroză și un rezultat de agregare a tuturor factorilor de risc care însoțesc o varietate mare de boli cardiovasculare acute, cum ar fi boala coronariană, hipertensiunea, diabetul zaharat, dislipidemiile etc. Afluxul de monocite și mastocite la etapele precoce ale aterosclerozei, determină manifestările mai pronunțate ale inflamației vasculare, în special la pacienții cu tulburări metabolice. Procesul de neovascularizație a plăcilor ateromatoase, adesea începe de la intimă, progresează și favorizează destabilizarea în continuare a plăcilor aterosclerotice (rupturi, hemoragii etc.). De asemenea, anti-MCT (triptaza mastocitară) și CD - 68 demonstrează în mod clar etapele importante patogenetice și modele de dezvoltare a aterosclerozei și a complicațiilor sale, la pacienții cu sindromul metabolic. În studiul de față, am analizat distribuția histotopografică a vaselor noi formate ca o caracteristică a angiogenezei, gradul de degranulare a mastocitelor, expresia macrofagelor în diferite tipuri de plăci, în diferite vase arteriale la pacienți cu ateroscleroză și sindromul metabolic complicat cu ateroscleroza. Noi am încercat să analizăm importanța mastocitelor și macrofagelor, etapelor de dezvoltare a aterosclerozei, de asemenea criteriile de diagnostic și prognostic. Studiul nostru a inclus 34 de pacienți, care au decedat de ateroscleroza (nr. = 17) și complicațiile aterosclerotice ale sindromului metabolic (nr. = 17). Fragmente de aa. cerebrale (arterele cerebrale medii), au fost prelevate pentru cercetare în timpul necropsiilor. Fragmentele au fost prelucrate folosind tehnicile histologice uzuale. Determinarea tipurilor de plăci a fost bazată pe clasificarea morfologică, macroscopică și histopatologică ale secțiunilor colorate Hematoxilina-Eozină, histochemice - Impregnare Argentică și Orceină. Pentru a determina expresia celulelor mastocitare în vasele afectate, am folosit anti-MCT. Macrofagele au fost identificate folosind CD-68 markerul specific și pentru vasele noi formate - respectiv, prin aplicarea CD-105 (endoglin), care este specific. Evaluarea rezultatelor s-a bazat pe determinarea densității și intensității reacției finale, reflectate în raportul cantitativ al diferitelor zone ale plăcilor ateromatoase. Mastocitele pozitiv colorate, macrofage și vasele noi formate s-au găsit în mai multe tipuri de plăci aterosclerotice, în special în adventice și în imediată apropiere a plăcilor și în straturile subendoteliale. Am găsit o corelație statistică între tipul de placă și datele clinice. Metoda imunohistochimică este eficientă pentru determinarea mastocitelor, macrofagelor și vaselor noi formate ale plăcilor aterosclerotice, în mod direct reflectând multe elemente patogenice importante ale aterogenezei la pacienții cu sindrom metabolic.

Cuvinte-cheie: ateroscleroza, angiogeneza, mastocit, macrofag, sindroamele cardiovasculare acute

Summary. Evolutionary peculiarities of atherosclerotic plaques of willis polygon arteries

Numerous studies have demonstrated that endothelial damage is a precursory symptom of atherosclerosis, which leads to an increase of vascular permeability, activation of mast cells and migration of leukocytes, lymphocytes, macrophages, adhesion of platelets, proliferation of vascular smooth muscle cells and eventual vasospasm and pro-inflammatory condition. All of the above listed components can be rightfully considered active pathogenetic participants in atherosclerosis and a result of aggregation of all risk factors that accompany a wide variety of cardiovascular diseases, such as coronary heart disease, hypertension, diabetes, dyslipidemia, etc. The influx of monocytes and mast cells during the early stages of atherosclerosis leads to the most pronounced manifestations of vascular inflammation, especially in patients with metabolic disorders. In our study, we analyzed the histotopographic distribution of newly formed blood vessels as a feature of angiogenesis, the extent of mast cell degranulation, the expression of macrophages in different types of plaques, as well as various arterial vessels in patients with atherosclerosis and metabolic syndrome, complicated by atherosclerosis. We have tried to analyze the importance of mast cells and macrophages, the patterns of development of atherosclerosis stages, along with diagnostic and prognostic features. The study included 34 patients, who died of atherosclerosis (no. =17) and atherosclerotic complications of metabolic syndrome (no. =17). Fragments of their cerebral (middle cerebral arteries), were collected for research at autopsy. The fragments were processed using standard techniques. The type definition of plaques was based on morphological classification, as well as on macroscopic and histological images

of hematoxylin-eosin stained sections and on histochemical methods – silver and orcein impregnation. To determine the expression of mast cells in the affected vessels, we have used anti-MCT immunohistochemical stain. Macrophages were identified using the CD-68 specific marker and the newly formed vessels – respectively, by using CD-105 (Endoglin), which is specific. The evaluation of the results was based on determining the density and intensity of the final reaction, reflected in the quantitative ratio of different zones of atheromatous plaques. Positively stained mast cells, macrophages and newly formed vessels were found in many types of atherosclerotic plaques, especially in adventitia and in the immediate vicinity of plaques and in subendothelial layers. We found a statistical correlation between the plaque type and clinical data. The immunohistochemical method is effective for determining mast cells, macrophages, and newly formed vessels of atherosclerotic plaques, directly reflecting many important pathogenetic elements of atherogenesis in patients with metabolic syndrome.

Key words: atherosclerosis, angiogenesis, mast cell, macrophage, acute cardiovascular syndromes

Резюме. Особенности развития атеросклеротических бляшек артерий великого круга

Многочисленные исследования демонстрируют, что повреждение эндотелия является ранним предвестником атеросклероза, которая приводит к повышению проницаемости сосудов, активации мастоцитов, миграции лейкоцитов, лимфоцитов, макрофагов, адгезии тромбоцитов, пролиферации гладкомышечных клеток сосудов и в конечном счете вызывая спазм сосудов и провоспалительный статус. Все выше перечисленные компоненты можно полноправно считать активными патогенетическими участниками атеросклероза и как результат агрегации всех факторов риска сопровождающие широкий спектр сердечно-сосудистых заболеваний, таких как ишемическая болезнь сердца, гипертония, сахарный диабет, дислипидемии и т.д. Приток мастоцитов и моноцитов на ранних стадиях атеросклеротического процесса приводит к наиболее выраженным проявлениям сосудистого воспаления, особенно у пациентов с метаболическими расстройствами. Процесс неоваскуляризации бляшек, зачастую начинается с интимы, прогрессирует и приводит к дальнейшей дестабилизации атеросклеротических бляшек (интрамуральные кровоизлияния, разрывы и др.). Также анти-MCT (mast cell tryptase) и CD-68 наглядно демонстрируют важные патогенетические этапы и закономерности развития атеросклероза и его осложнений у пациентов с метаболическими нарушениями. В нашем исследовании мы проанализировали гистотопографическое распределение новообразованных сосудов как особенности ангиогенеза, степень дегрануляции мастоцитов, экспрессию макрофагов в различных типах бляшек, а также разных артериальных сосудов у пациентов с атеросклерозом и метаболическим синдромом осложненным атеросклерозом. Мы попробовали проанализировать значение мастоцитов и макрофагов, закономерностей развития стадий атеросклероза, наряду с диагностическими и прогностическими особенностями. В исследование было включено 34 пациента, умерших от атеросклероза ($n = 17$) и атеросклеротических осложнений метаболического синдрома ($n = 17$), у которых при вскрытии были взяты для исследований фрагменты мозговых артерий (средние мозговые артерии). Фрагменты были обработаны с помощью стандартных методик. Определение типа бляшек основывалось на морфологической классификации, а также на основании макроскопической и гистологической картины окрашенных Г.-Э. срезов и гистохимических методов – импрегнирование серебром и орсеином. Для определения экспрессии мастоцитов в пораженных сосудах мы использовали иммуногистохимическую окраску анти-MCT (mast cell tryptase). Макрофаги были выявлены применяя специфический маркер CD-68, а новообразованные сосуды – соответственно, CD-105 (Эндоглин), являющийся специфичным. Оценка результатов была основана на определении плотности и интенсивности окончательной реакции, отраженной в количественном соотношении различных зон атероматозных бляшек. Положительно окрашенные мастоциты, макрофаги и новообразованные сосуды выявлены во многих типах атеросклеротических бляшек, и особенно в адвентиции, так же обнаружены в непосредственной близости от бляшек и в субэндотелиальных слоях. Мы обнаружили статистическую корреляцию между типа бляшки и клинических данных. Иммуногистохимический метод эффективен для определения мастоцитов, макрофагов и новообразованных сосудов атеросклеротических бляшек и непосредственно отражает многие важные патогенетические звенья атерогенеза у больных с метаболическим синдромом.

Ключевые слова: атеросклероз, ангиогенез, мастоцит, макрофаг, острые сердечно-сосудистые синдромы

Introducere

Patologia cerebro-vasculară este una din cele mai frecvente cauze de deces a populației în vîrstă aptă de muncă în țările economic dezvoltate. În Europa numărul anual de pacienți decedați constituie în jur de 2,35 mln. Necătînd la progresele medicinei contemporane în diagnosticarea clinică și strategii terapeutice simptomatice a bolilor cerebro-vasculare și a sindromului metabolic, ateroscleroza este principala cauză de morbiditate și mortalitate nu numai în Republica Moldova dar și în toată lumea. În ultimii ani

pe larg este recunoscut conceptul de inflamație imună - ca rol cu importanță majoră în aterogeneză, ce ne impune să revedem viziunile noastre asupra etapelor de formare ale plăcilor aterosclerotice.

Este greu de a nominaliza o altă boală ca ateroscleroza, în privința patogenezei căreia ar exista un număr atît de mare de teorii, ipoteze, presupuneri și chiar speculații. Pentru înțelegerea patogeniei aterosclerozei are o mare importanță cunoașterea precisă a căilor și mecanismelor ce determină pătrunderea lipo-proteinelor aterogene în peretele vascular. Un rol la

fel de mare i se atribuie analizei reacțiilor de protecție și adaptare, care determină metabolismul peretelui vascular în condiții normale și în caz de ateroscleroză. Pentru o înțelegere mai profundă a mecanismelor care au loc în peretele vascular în ateroscleroză, este necesar să se efectueze un studiu structural-funcțional detaliat al elementelor celulare ale peretelui arterelor, al participării acestor elemente la captarea lipidelor, la sinteza collagenului și elastinei. Cunoașterea metabolismului peretelui vascular în ateroscleroză determină în mare măsură căile de prevenire și de tratament al acestei boli.

Noi considerăm ateroscleroza ca fiind cauza principală a dezvoltării bolii cardiace ischemice, accidentului vascular cerebral, leziunilor arteriale ale membrilor inferioare și ale altor organe. Ateroscleroza este o maladie a secolului XXI, devenind tot mai mult o povară sau o cruce pe care omenirea o poartă ca pedeapsă pentru civilizația actuală. Apare impresia că Dumnezeu i-a pedepsit pe oameni prin această boală pentru tendința lor spre conflicte sociale, pentru limitarea stilului de viață activ, pentru abuzul de hrană și de somn și multe alte obiceiuri și deprinderi vicioase.

Manifestările clinice ale aterosclerozei sunt dependente în mare măsură de localizarea leziunii în ramificația vasculară. Analiza materialului interesat demonstrează că, uneori, este suficientă prezența în arterele cerebrale a unei plăci aterosclerotice cu o anumită localizare pentru a provoca accidente vasculare cerebrale (de natură ischemică sau hemoragică) [1].

Ateroscleroza afectează în primul rând arterele de tip elastic și muscular-elastic. În arterele cerebrale lipsește lamina elastică externă, iar lamina elastică internă este bine dezvoltată. Arterele poligonului Willis (Fig. 1) sunt artere de tip muscular, deoarece în ele este bine dezvoltat stratul mediu (muscular).

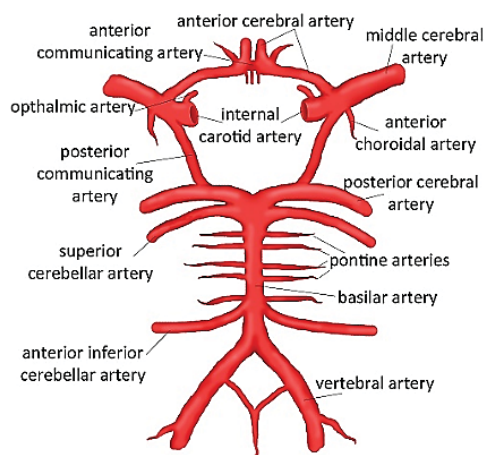


Figura 1. Poligonul arterial Willis

Accidentele cerebrale vasculare pot apărea la orice vârstă și sex. În mare măsură ele reflectă gradul

de afectare a vaselor cerebrale (arterelor carotide, bazilare și cerebrale). Fig. 2 demonstrează structura normală a stratului interior a arterei bazilare în microscopia electronică prin scanare.

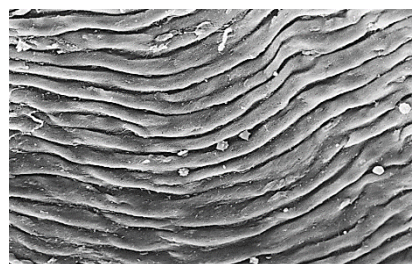


Figura 2. Microscopia de scanare electronică a suprafeței arterei bazilare în normă (X 3200).

În petele lipidice din arterele cerebrale medii, depuneri de lipide în substanța de bază se observă mai ales în straturile superficiale ale țesutului interior, în lamina elastică internă (Fig. 3, 4). În acest stadiu de lipidoză, lamina elastică își păstrează proprietățile tinctoriale și se colorează intens cu fuxină prin metoda Weigert.



Figura 3. Acumularea lipidelor de-a lungul peretelui interior al laminei elastice a arterei cerebrale medii, vârsta bolnavului – 37 de ani (colorație Oil Red, X 460)

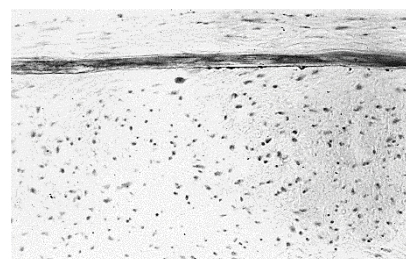


Figura 4. Depozite lipidice de-a lungul laminei elastice interioare a arterei cerebrale medii, vârsta bolnavului – 67 de ani (colorație Oil Red, X 460)

În dezvoltarea ulterioară a lipidozei arterei cerebrale medii, depuneri semnificative de lipide se observă nu numai în lamina elastică internă, dar și pe fibrele desprinse de ea. Uneori lipidoza țesutului interior are caracter difuz, lipidele se depun pe lamina elastică internă, pe plăcile ei ce se separă și în straturile tisulare dintre ele.

În stadiul formelor incipiente ale aterosclerozei arterelor cerebrale medii, fără o comparație cu modificările similare din alte artere se poate crea impresia

despre degenerarea adipoasă primară izolată a laminei elastice interne în ateroscleroză și doar despre o depozitare secundară de lipide în intimă. Studiul caracteristicilor depunerii de lipide în diferite sisteme arteriale, precum și în diferite segmente ale arterei cerebrale medii, face posibilă determinarea stadiului de depozitare a lipidelor pe suprafața membranelor elastice sau în elementele celulare [2].

Modificările degenerative ale laminei elastice interioare ale arterelor cerebrale medii diferă de modificările elementelor elastice din alte artere investigate de noi, ceea ce poate fi, probabil, explicat prin depunerea selectivă semnificativă a lipidelor pe lamina elastică interioară, care devine adipoasă și în același timp îngroșată. În acest caz se observă în primul rând nu liza, ci tumifierea și clivajul membranei. La colorația cu fuxină, o astfel de membrană are o culoare violet închis și își pierde refrangibilitatea (puterea de refracție) dublă în lumina polarizată.

La depunerea și impregnarea ulterioară cu lipide în aortă și în arterele coronare ale inimii, în structurile elastice ale intimei se regăsesc, de asemenea, semne de modificări degenerative. Aceste modificări se manifestă nu numai prin schimbarea proprietăților lor tinctoriale, ci și prin lipirea, uniformizarea și fragmentarea unor fibre. Contururile și granițele fibrelor elastice devin neclare, în unele zone fibrele elastice subțiri sunt supuse lizei, parcă se dizolvă în masa înconjurătoare de lipide. Totodată, adesea se observă alternanța porțiunilor de fibre elastice lizate cu zone în care abia începe distrugerea acestora, menținându-se în același timp proprietățile lor tinctoriale.

În formele progresive ale aterosclerozei, metabolismul peretelui vascular este orientat spre utilizarea cantității excesive de lipide apărute și, prin urmare, este legat de evacuarea în porțiunile lipidozei a diverselor elemente celulare din sectoarele modificate ale peretelui arterial (predominant celule musculare netede) și elemente celulare mobile (monocite mononucleare) din fluxul sangvin, precum și de activarea enzimelor oxidativ-regeneratoare și hidrolitice.

Acest proces este însoțit de formarea țesutului conjunctiv nou, fenomen care duce inevitabil la producerea de către celulele mezenchimale *in situ* a fracțiunilor sulfatate de glicozaminoglicani, mai ales a dermatan sulfatului. Probabil că în primele etape această reacție poate fi privită ca una protector-adaptivă.

În celulele spumoase se acumulează un număr mare de compuși de colesterol și acizi grași. În procesul de absorbție a lipidelor de către celule și de formare a celulelor spumoase, cele din urmă, din cauza modificărilor reactive, sunt înconjurate de țesut conjunctiv imatur, care în procesul de maturare formează

straturi ce separă celulele spumoase de stratul lor superficial și de țesutul conjunctiv.

În paralel cu acumularea de lipide în celulele spumoase și creșterea țesutului conjunctiv, se observă modificări degenerative marcate ale fibrelor elastice, care cuprind și lamina elastică internă. La acumularea lipidelor în învelișul interior ale arterelor cerebrale medii, sunt deosebit de pronunțate fenomenele de bazofilie și metacromazie a laminei elastice interne. Lamina "se dizolvă" treptat, ceea ce duce la penetrarea ei de către lipide (**Fig. 5**).



Figura 5. Liza laminei elastice interne. Pătrunderea lipidelor în membrana medie a arterelei cerebrale medii și formarea ateromului în medie sub defectul laminei elastice interne (colorație Oil Red, X 460).

În astfel de cazuri, marginea laminei elastice interne din partea intimei, adică marginea cu lipide precipitate ce se profilează, este cea mai schimbată, având formă festonată (**Fig. 6**). În același timp, marginea inferioară a plăcii elastice, adiacente învelișului mediu, rămâne fără modificări vizibile aproape până la lizarea completă a laminei elastice interne, fapt ce servește drept confirmare a caracterului secundar al modificărilor distrofice în membrana elastică ca răspuns la depunerea lipidelor. În stadii mai avansate ale descompunerii laminei elastice interne, cea din urmă lipsește la o distanță considerabilă sau se păstrează sub formă de fragmente și cocoloașe [3].



Figura 6. Liza și fragmentarea laminei elastice interne în zona plăcii aterosclerotice din artera cerebrală medie (colorație pe elastic prin metoda Weigert–Hart, X 840).

Distrugerea intensivă a structurilor elastice ale ţesutului interior al arterelor sunt o reflectare a modificărilor metabolice generale ce au loc în peretele vascular, inclusiv hipoxia tisulară, eliberarea enzimelor lizozomale hidrolitice, acidoza ţesutului, depunerea imunoglobulinei cu formarea unui complex autoimun, îmbibarea intimei cu proteine plasmatică, penetrarea elastazei şi plasmei sangvine.

În stadiile timpurii ale aterosclerozei, în celulele spumoase şi în spaţiul extracelular se observă formarea cristalelor de colesterol. Cristalele de colesterol, deşi constituie o parte relativ inertă a colesterolului, totuşi pot provoca leziuni tisulare mecanice, exacerbând procesul aterosclerotic. Spre deosebire de esterii colesterolului, cristalele acestuia nu sunt absorbite de celule, deci chiar şi în condiţii de regresie ele se păstrează în peretele arterial.

Formarea cristalelor de colesterol între masele ateromatoase este legată de dezintegrarea celulelor spumoase şi eliberarea conţinutului lor în spaţiul intercelular, inclusiv vacuole lipidice fără membrană, care constau din esterii ai colesterolului (Fig. 7).

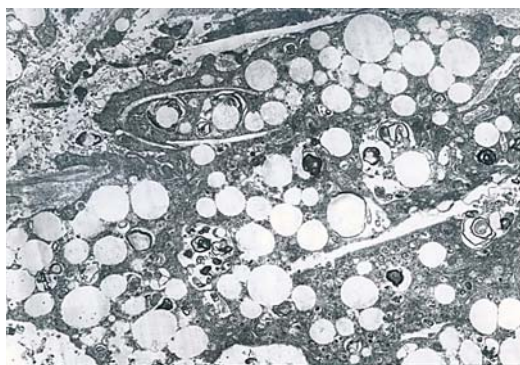


Figura 7. Placa aterosclerotică a arterei cerebrale medii. Formarea cristalelor de colesterol în zona celulei spumoase dezintegrate de origine musculară netedă, care conţine în citoplasmă vacuole lipidice (X 60000).

Acumularea cristalelor de colesterol se concentrează mai ales de-a lungul laminei elastice interne (Fig. 8), ceea ce poate provoca, de asemenea, deteriorarea şi liza elasticului.

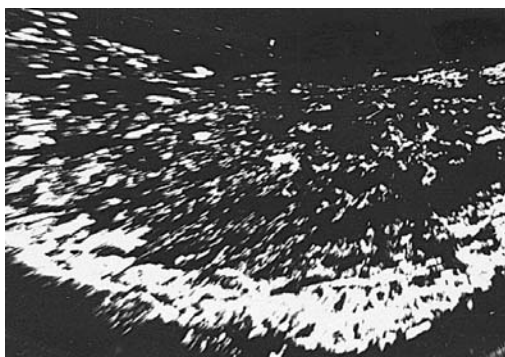


Figura 8. Microscopia polarizantă arată că cristalele de colesterol se depun de-a lungul laminei elastice interne a arterei cerebrale medii (X 460).

La distrugerea membranei elastice şi la pătrunderea lipidelor în ţesutul mediu, celulele spumoase ale intimei se pot forma in situ, adică în tunica intimă şi în sectoarele din jurul ei. În acelaşi timp, celulele musculare netede ale stratului subintimal pătrund în intimă prin zonele afectate ale elasticului, contribuind la destrămarea în continuare a laminei elastice interne. Celulele musculare netede participă la formarea componentelor ţesutului conjunctiv, inclusiv în fibrele de collagen şi cele elastice (Fig. 9–12). La pătrunderea lipidelor în tunica medie, în sectorul de sub adventice se observă o acumulare de macrofage şi limfocite ce creează infiltrate. Este de asemenea posibilă infiltrarea macrofagelor prin membrană în sectoarele de depunere a lipidelor.



Figura 9. Pătrunderea lipidelor în medie prin defectul laminei elastice interne (coloraţie Oil Red, X 460).



Figura 10. Migraţia celulelor musculare netede prin defectul laminei elastice interne (coloraţie prin metoda Weigert, X 460).



Figura 11. Migraţia celulelor mononucleare prin defectele laminei elastice interne în placa aterosclerotică, cu formarea infiltratelor în straturile profunde ale plăcii (coloraţie prin metoda Weigert, X 460).

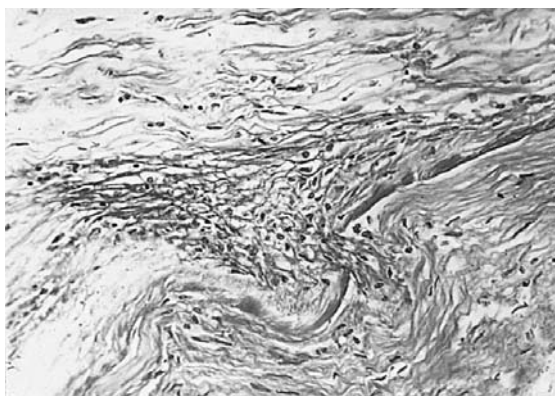


Figura 12. *Formarea fibrelor de precolagen, care acoperă defectele laminei elastice interne (colorație după metoda Weigert–Hart, X 460).*

În paralel cu procesele de degradare a structurilor fibroase ale peretelui vascular are loc formarea noilor structuri. Cu toate acestea, procesele de formare a fibrelor elastice sunt exprimate mult mai slab decât procesele de apariție a fibrelor de collagen. Motive pentru acest fenomen sunt multe. În esență, toți factorii care duc la depunerea lipidelor în intimă și la tulburări metabolice ale peretelui vascular sunt motive ce contribuie la dezvoltarea țesutului conjunctiv și la formarea plăcilor fibroase aterosclerotice.

Fibrele elastice nou-formate, într-o oarecare măsură, acoperă defectele fibrelor, în special deasupra laminei elastice interne deteriorate. Fibrele elastice subțiri sunt localizate în stratul musculo-elastic între glicozaminoglicanii acizi. Deosebit de remarcată este geneza fibrelor elastice noi în artera bazilară a creierului, unde acestea se formează chiar înaintea lizei complete a laminei elastice interne. Fibrele elastice nou-formate, la rândul lor, sunt supuse modificărilor distrofice. Acestea se lipesc între ele, se colorează intens cu fuxină, se omogenizează, pe alocuri se supun lizei și se dizolvă treptat în masa înconjurătoare de lipide și proteine (Fig. 13).

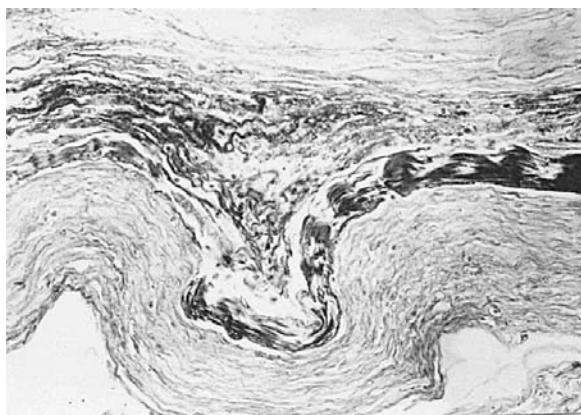


Figura 13. *Omogenizarea, liza și fragmentarea fibrelor nou-formate în locurile de rupere a laminei elastice interne, care acoperă parțial defectul laminei în stratul subendotelial al celulelor spumoase (colorație prin metoda Weigert–Hart, X 840).*

Odată cu depunerea lipidelor pe fibrele elastice, se produce și acumularea lor în structurile argirofile ale intimei și pe fibrele de collagen pe stratul de conectare al plăcilor. După aspectul lor exterior, depunerile de lipide pe structurile argirofile și fibrele de collagen sunt oarecum diferite de depozitele de lipide pe membranele elastice. Modificările ce au loc în structurile argirofile sunt destul de dificil de urmărit, deoarece acestea sunt foarte strâns alăturate de fibrele elastice, împletindu-le de jur împrejur. Iată de ce, de exemplu, în artera bazilară cerebrală, în locurile de liză a laminei elastice interne poate fi observată formarea doar a câtorva fibre elastice care acoperă defectul lizat al laminei, iar formarea fibrelor argirofile are loc pe întreaga grosime a plăcilor aterosclerotice (Fig. 14).



Figura 14. *Tumefierea, fragmentarea, liza și dezintegrarea laminei elastice interne, "acoperirea" parțială a defectului cu fibre elastice nou-formate. În stratul subendotelial – acumularea celulelor spumoase (colorație prin metoda Weigert–Hart, X 840).*

Totodată, în asemenea locuri se observă o creștere a conținutului fibrelor de collagen. Fibrele argirofile nou-formate în plăcile aterosclerotice își pierd sinuoizitatea lor caracteristică, se lipesc între ele și cu fibrele elastice, se impregnează intens cu argint.

Producția crescută de fibre de collagen conduce la o îngroșare a stratului interior. Intima și stratul subintimal, chiar în condiții de normă, în special la vârstnici, se află în mod constant la limită de anoxie. În condiții de anoxie se formează intens elemente ale țesutului conjunctiv, ducând la îngroșarea și deformarea pereților arterei.

La analiza suprafeței arterei bazilare cu microscopul electronic de scanare, deasupra petelor lipidice și plăcilor se observă o trăsătură caracteristică a aterogenezei – modificarea monostratului endotelial. Endoteliul, pe suprafața edemului și a depunerii în focar a lipidelor în intimă, ia forma unui pavaj de caldarâm, cu depuneri de eritrocite în culele dintre celulele proeminente (Fig. 15).

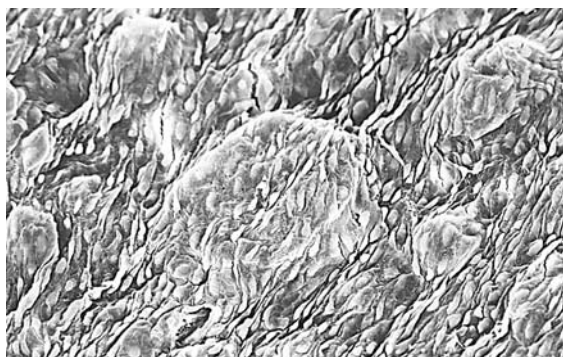


Figura 15. Microscopie electronică de scanare. Focar de endoteliu umflat deasupra zonei de depunere a lipidelor în intimă (X 3200).

Deasupra plăcilor aterosclerotice în curs de dezvoltare, pot fi distinse două tipuri de celule endoteliale [4]. Primul tip – celule endoteliale funcțional activate, în citoplasma cărora se atestă o creștere a numărului de mitocondrii hipertrofice, concentrate la polii nucleului; expansiunea cisternelor de reticul endoplasmatic rugos (granular); un număr mare de ribozomi și de vezicule endocitare nemărginite; sunt proeminenți corpusculii Weibel–Palade. Al doilea tip – celule endoteliale cu modificări distrofice și degenerative ireversibile pe fondul formării vacuolelor mari de lipide în zona reticulului endoplasmatic rugos.

Odată cu procesele distructive din elementele de bază ale peretelui vascular – distrugerea fibrelor elastice, de collagen și a elementor celulare: endoteliul, CMN, monocite, macrofage, fibroblaste – în peretele vascular au loc și procese adaptiv-regenerative de compensare, care sunt însoțite de formarea unor noi vase sangvine – neoangiogeneza (neovascularizarea). Noi am studiat acest proces prin metode speciale de investigație.

Intima vaselor nou-formate, asociate cu plăci aterosclerotice, a fost studiată pentru prima dată în 1876 de către Koester. În plăcile aterosclerotice, angiogeneza permite formarea noilor microvase, pentru a menține nivelul necesar de oxigen și substanțe nutritive în peretele vascular.

CD105 este o glicoproteină membranară homodimerică, integrală, formată din 90–95 de subunități kDa, legate de bisulfid, și este componentă a factorului transformator de creștere al complexului receptor TGF- β . CD105 se manifestă în celulele angiogenice endoteliale [5]. Astfel, CD105 este un marker sensibil pentru identificarea vaselor de sânge nou-formate [6].

Totodată, CD105 este un marker mult mai specific și sensibil pentru evaluarea vaselor de sânge nou-formate în plăcile aterosclerotice decât CD31 sau TGF- β 1 [7, 8]. Determinarea nivelului de CD-105 solubile circulante – antigene sensibile – ne permite a determina exact prezența plăcilor instabile sau rupturile lor [9].

Neovascularizarea are loc în zonele leziunilor aterosclerotice în curs de modificare constantă, reconstrucție și predispuse la rupere [10]. Unele studii arată că formarea de noi vase sangvine contribuie la creșterea leziunilor aterosclerotice și este un factor-cheie care duce la destabilizarea și destrămarea plăcii.

Unele dintre vasele sangvine nou-formate sunt imature, similare cu cele observate la neovascularizarea tumorilor solide și, prin urmare, pot conduce la rupere și sângerare în regiunea plăcii, iar ulterior – la instabilitatea acesteia.

Mastocitele, macrofagele și limfocitele T, care interacționează simultan, de regulă formează infiltrate celulare inflamatorii ale plăcilor aterosclerotice și ale substanței intercelulare [13].

Material și metode

Prin metode imunohistochimice am studiat o serie de vase cerebrale diverse la 34 de pacienți cu boală cerebrovasculară (ictus ischemic și hemoragic). Printre ei au fost reprezentanți ai tuturor categoriilor de vârstă, însă am observat că gradul de afectare crește după vârsta de 40 de ani. Vârsta varia între 44 și 83 de ani (vârsta medie – 62,8 ani). Femeile au constituit 41,2%, bărbații – 58,8%. La autopsie au fost luate pentru cercetare fragmente de arterele cerebrale medii.

Fragmentele vasculare au fost prelucrate prin metode-standard (fixare în 10% soluție de formalină tamponată, închidere în blocuri de parafină; secțiunile au fost obținute de 4-5 micrometri grosime). Determinarea tipului și stadiului plăcilor s-a bazat pe clasificarea morfologică AHA (American Heart Association, 1995), luând în considerație tabloul macroscopic și histologic al secțiunilor colorate cu hematoxină-eozină, precum și tehnicile histochemice – impregnare cu argint și orceină.

Secțiunile suplimentare ale blocurilor de parafină au fost prelucrate imunohistochimic, au fost deparafinate, hidratate, și supuse reacției de detecție a antigenului în modulul PT Link (Dako Cytomation Danemarca). Următorul pas a fost incubarea anticorpilor primari, folosind sistemul de detecție NovoLink Max Polymer, iar pentru vizualizarea reacției finale am folosit 3,3-diaminobenzidină diclorhidrat ca cromogen cu o colorație brună.

Interpretarea CD105: am cuantificat structurile vasculare cu lumen, pozitive pentru CD105, colorate în brun la nivel citoplasmatic în celulele endoteliale. Densitatea microvasculară a fost determinată aplicând metoda hot spot [11, 12].

Totodată, sa luat în considerație și semnalele pozitive pentru celulele endoteliale CD105 pozitive, capilare și plexuri din celulele endoteliale CD105 pozitive, precum și în spațiul periplacă și în placă însăși [14].

Tabelul 1

Metodele imunohistochimice utilizate în studiu

Anticorp	Sursă	Clonă	Diluție	Sistem de detecție	Demascare antigen	Incubare cu anticorp primar
Actina de tip mușchi neted	Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK	Human Alpha Smooth Muscle Actin, clona asm-1	RTU	NovoLink Max Polymer Detection System (Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK)	Microunde, 5 minute, pH 6	30 minute, temperatura camerei
CD68	Dako Glostrup Denmark	Monoclonal mouse anti-human, QBEnd 10	1:25	NovoLink Max Polymer Detection System	Microunde, 30 minute, pH 6	30 minute, temperatura camerei
Endoglin	Dako Glostrup Denmark	Monoclonal mouse anti-human, clone SN6h	1: 10	NovoLink Max Polymer Detection System	Proteinase K, 10 minute	30 minute, temperatura camerei
CD34	Dako Glostrup Denmark	Monoclonal mouse anti-human, 1A4	RTU	NovoLink Max Polymer Detection System	Microunde, 30 minute, pH 6	30 minute, temperatura camerei
Triptaza mastocitară	NeoMarkers, Fremont, CA	Mouse Monoclonal Antibody, clona AA1)	RTU	NovoLink Max Polymer Detection System	Microunde, 30 minute, pH 6	30 minute, temperatura camerei

Tabelul 2

Scorul expresiei anticorpilor în peretele vaselor arteriale și în plăcile aterosclerotice

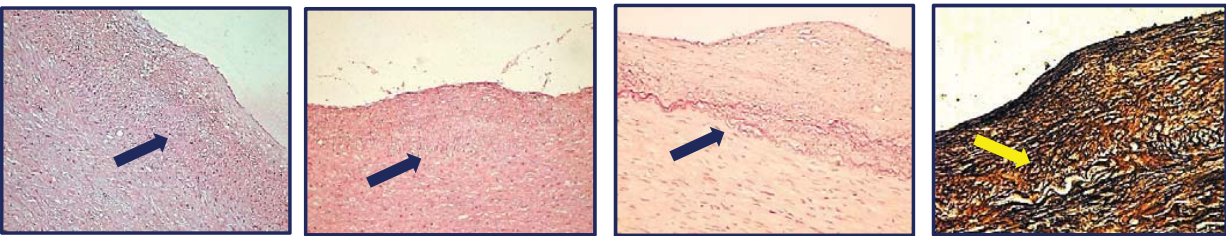
Scorul	Imunomarcajul	Celule pozitive (%)	Intensitatea
0	-	<1%	-
1	+	1-25%	Slabă
2	++	26-50%	Moderată
3	+++	>50%	Pronunțată

Rezultate obținute

Analiza histopatologică a relevat existența a trei tipuri majore (condiționate) de leziuni aterosclerotice: leziune intermediară (LI), placă fibroasă (forma-

tă) (PF), placă fibroasă calcifiată (și/sau complicată) (PFC) în toate vasele studiate, care, la rândul lor, au fost colorate cu hematoxină-eozină, orceină și impregnate cu argint.

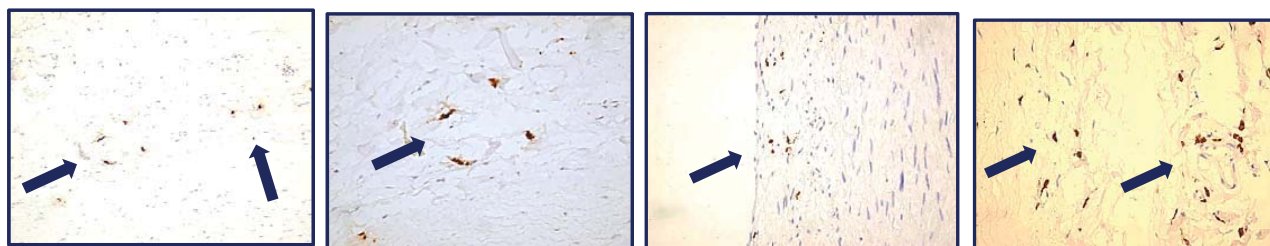
Aceste imagini studiate la microscopia optică ale arterei bazilare, cu aplicarea metodelor histochimice de colorație, reflectă modificări structurale ale componentelor peretelui vascular caracteristice stadiilor de plăci fibroase. Cele mai reprezentative fiind dezorganizarea stratului endotelial, cu îngroșarea semnificativă a acestuia, depozitarea maselor aterogene la nivel subendotelial, hiperplazia endoteliocitelor fig. 16 și fig. 17 colorate cu *Hematoxină-Eosină x 10, x 20*.



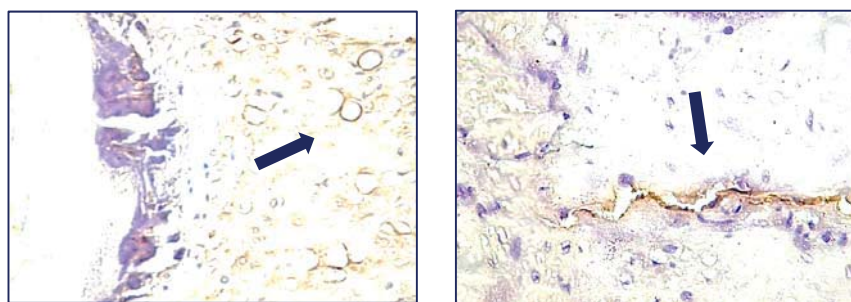
a) hematoxin-eosină x 20; b) orceină x 20; c) orceină x 40; d) impregnare argentică x 40
Figura 16. Placa aterosclerotică fibroasă a arterei cerebrale medii. Colorație: a) Hematoxină-Eosină x 20; b), c) Orceină x 20, x 40; d) Impregnare argentică x 40.



a) hematoxin-eosină x 10; b) orceină x 20; c) impregnare argentică x 10; d) impregnare argentică x 40
Figura 17. Placa aterosclerotică fibroasă a arterei cerebrale medii. Colorație: a) Hematoxină Eosină x 10; b) Orceină x 20; c), d) Impregnare argentică x 10, x 40.



a) anti-MCT x 20; b) anti-MCT x 40; c) anti-CD 68 x 20; d) anti-CD 68 x 40.
Figura 18. Placa aterosclerotică fibroasă a arterei cerebrale medii. Colorație: a), b) anti-MCT x 20, x 40; c), d) anti-CD 68 x 20, x 40.



a) anti-CD 105 x 40; b) anti-CD 105 x 40.

Figura 19. Placa aterosclerotică fibroasă calcinată a arterei cerebrale medii. Colorație: a), b) anti-CD 105 x 40.

Aplicînd pe aceste secțiuni colorația cu *Orceină* cu *magnificarea* x 20 și x 40 fig. 16, fig. 16, 17 și 17 sunt bine evidente modificările la nivel de lamina proprie cu îngroșarea, deformarea și dedublarea acesteia – ce nu este caracteristic pentru vasele arteriale intacte. Membrana bazală, pe care sunt așezate endoteliocitele, este dedublată la nivel de placă fibroasă și tot aici sunt observate mase ateromatoase, țesutul fibros care și explică defomările specifice plăcilor fibroase în afectarea aterosclerotică. *Impregnare argentică*, cu *magnificarea* x10 și x 40 fig. 16, fig 17, fig 17 permite evidențierea fibrelor elastice și reticulare la nivel de placă cu dezorganizarea complexă a matricei extracelulare, spațiile optice goale observate - sunt zone de acumulări lipidice care sunt înconjurată de fibre groase și deformate, în unele plăci complicate devin cu amplasare haotică și care pot fi combinate cu depozitări calcare, îmbibiție hemoragică și componentele celulare inflamatorii în plăcile instabile, care la rîndul său se pot complica cu rupere, avînd manifestări clinice de accidente vasculare acute hemoragice fatale.

Metodele imunohistochimice demonstrează existența expresiei diferențiale anti-MCT, CD68 și CD105 (endoglin) în diferite tipuri de leziuni aterosclerotice și în diverse tipuri de vase în asociere cu distribuția histotopografică [13].

Informațiile obținute confirmă teoriile evoluției și mecanismele patogene ale aterogenezei. În pofida acestor afirmații, astăzi există o mulțime de probleme științifice și clinice nerezolvate.

La analiza expresiei imunohistochimice ale componentelor celulare, care participă în mod diferit și

dependent de stadiul evolutiv a plăcilor aterosclerotice, se determină participarea variată ale celulelor inflamatoare în diverse compartimente a peretelui vascular. În *fig 18 anti-MCT magnificare* x 20, x 40 sunt reprezentate celulele mastocitare pozitiv colorate în maro (brun) cu markerul specific pentru acestea anti-MCT (mast cells tryptase). Repartizarea mastocitelor este foarte variată și direct proporțională de stadiul evolutiv a procesului aterogen în pusee de acutizare ale reacțiilor inflamatorii. Mai frecvent mastocitele sunt localizate în spațiul subendotelial și în jurul procesului inflamator, cât și în placă dacă procesul inflamator are extindere în aceasta.

Pe de altă parte, concomitent cu mastocite, în diferite stadii evolutive, pot fi observate și macrofagele, care sunt evidențiate cu markerul selectiv pentru ele – CD68 (*celulele macrofagale sunt colorate pozitiv în brun*) în *fig 18 magnificare* x 20, x 40. Ca și mastocitele, macrofagele, la fel au răspândire în placă variată, depinde acest proces a statutul imunoreactiv și stadiul evolutiv ale procesului aterogen. Numărul mastocitelor și macrofagelor este variat, dar legitățile expresiei acestora au fost observate cu unele particularități - creșterea mastocitelor este caracteristică pentru reacțiile inflamatorii acute, iar a macrofagelor – la diminuarea fazelor acute de inflamație. Prin funcțiile lor strict definite se explică și rolul lor important procesele inflamatorii în general și în special în evoluția plăcilor aterosclerotice.

O altă verigă patogenetică importantă este angiogeneza aterosclerotică, care este demonstrată în *fig 19*. Angiogeneza aterosclerotică ca și cea tumorală

are unele particularități evolutive asemănătoare. Markerul specific CD105 (endoglină) evidențiază în brun endoteliul vaselor noi formate în jurul plăcilor aterosclerotice și în unele cazuri în interiorul acestora, expresia endoteliului pozitiv colorat și capilarelor de novo formate este variat și este dependent de foarte mulți factori. În *fig 19 magnificare x40* este reprezentată placă aterosclerotică complicată, cu prezența focarului de calcinoză, în care sunt determinate multiple vase formate de novo, care pot forma aglomerări de celule endoteliale, plexuri și capilare cu lumenuri bine evidențiate.

Tabelul 3

Datele biochimice de laborator ale pacienților incluși în studiu

Vârsta	63,4 (medie)
Sex	11/6 (♂/♀)
Glicemia	4,74 (mmol/l)
Colesterol total	6,90 (mmol/l)
Trigliceride	0,86 (mmol/l)
Lipoproteine cu densitate înaltă	1,003 (mmol/l)
Lipoproteine cu densitate joasă	1,99 (mmol/l)
Leucocite	8,42 ($\times 10^9/l$)
Limfocite	24,5 (%)
Monocite	7,57 (%)
Protrombină	73,6 (%)
Fibrinogen	3,3 (g/l)
Viteza de sedimentare a eritrocitelor	17,5 (mm/h)

Discuții și concluzii

Pentru comparație poate fi adus drept exemplu angiogeneza proceselor tumorale, în care mastocitele și macrofagele, la fel ca în procesele de formare a plăcilor aterosclerotice, sunt implicate în neovascularizare (numai atunci când se discută mecanismele, funcțiile generale și verigile fiziopatologice).

Anti-MCT și CD68 markeri selectivi pentru mastocite, macrofage, care sunt componente importante ale proceselor imune în inițierea, proliferarea și diferențierea celulelor în leziunile aterosclerotice. De rând cu limfocitele T și macrofagele, în leziunile aterosclerotice sunt implicate și alte celule imune efectoare, în timp ce limfocitele, macrofagele predomină asupra mastocitelor, care îndeplinesc o funcție importantă în dezvoltarea plăcii aterosclerotice în diferite vase, ceea ce se explică prin generarea unor mari cantități de proteaze, inclusiv cele care sunt produse de macrofage, cu acumularea lor în regiunea nucleului necrotic al plăcii [14].

Factorii produși de mastocite și macrofage pot cauza distrugerea matricei intercelulare și provoacă o modificare suplimentară a lipoproteinelor cu densitate joasă. Cele mai multe vase examinate au fost

colorate pozitiv de anti-MCT și CD68 la nivelul endoteliului, plăcii aterosclerotice, în regiunea mediei și adventiceii, precum și la nivel de vasa vasorum.

Celulele endoteliale, mastocitele, macrofagele și limfocitele, în mod evident, sunt celule efectoare implicate în aterogeneză, cu dezvoltarea plăcilor aterosclerotice la pacienții cu ateroscleroză a vaselor cerebrale. Mastocitele reglementează comportamentul celulelor musculare netede (CMN), probabil prin intermediul mediatorilor lor secretați. Fibrele de collagen produse de celulele musculare netede pot preveni ruptura plăcilor aterosclerotice. Cu toate acestea, chimaza inhibă proliferarea celulelor mastocitare și sinteza collagenului de către CMN, reducând astfel stabilitatea plăcii.

Acțiunea citokinelor mastocitare proinflamatorii, cum ar fi TNF- α , induce expresia proteazei CMN. Mastocitele TNF- α -pozitive, MMP-cisteina, proteazele CMN cathepsin-pozitive, împreună cu macrofagele, sugerează un rol de reglementare în expresia mediatorilor celulari, proteazele mastocitelor în activarea CMN în zonele de ruptură a plăcilor aterosclerotice. Sediul mastocitelor și macrofagelor în peretele vascular, în special perivascular și la nivelul intimei, presupune un rol important în patogeneza aterosclerozei și, probabil, este cauza principală a bolilor cardiovasculare acute (în special, infarctul miocardic și accidentul vascular cerebral).

Rolul angiogenezei în dezvoltarea aterosclerozei este unul complex și depinde de stadiul procesului patologic. Dezvoltarea microvaselor în plăcile aterosclerotice este rezultatul neovascularizării, aceste capilare nou-formate sunt fragile și predispuse ruperii cu sângerare. Depunerea fibrinei în placă, formarea hemosiderinei și începutul inflamației imune sunt dovezi de sângerare în leziunile ateromatoase. Rolul angiogenezei în destabilizarea și distrugerea plăcii aterosclerotice rămâne o întrebare deschisă, dar unele raționamente recente despre cauzele primare ale instabilității plăcii pot duce la o interpretare nouă promițătoare a aterogenezei în general.

Legitățile de dezvoltare (stabilitatea și instabilitatea) plăcii aterosclerotice depind în mare măsură de angiogeneza procesului aterosclerotic. Rezultatele obținute de noi arată că metoda imunohistochimică comparativă folosind markeri vasculari demonstrează aspecte patogenetice importante în formarea plăcii aterosclerotice. Celulele macrofage și mastocite, precum și alte celule imune joacă un rol important în dezvoltarea plăcilor aterosclerotice și, nu în ultimul rând, în procesul de angiogeneză. Apare întrebarea: Poate oare inhibarea angiogenezei să fie o țintă terapeutică în ateroscleroză sau cum poate fi utilizată aceasta în sindromul metabolic?

Datele disponibile sugerează că terapia antiangiogenică ar putea avea un potențial impact asupra dezvoltării neointimei în leziunile aterosclerotice, iar efectele secundare și acțiunea factorilor nocivi sunt susceptibile de a inhiba funcția endoteliului și regenerarea lui. Aceste declarații sunt susținute de dovezi științifice ale unui număr mare de laboratoare, care demonstrează că VEGF are un efect protector asupra endoteliului arterelor. Studii clinice recente ale anticorpilor inhibitorului VEGF, la administrarea bevacizumabului, avastinului în tumorile maligne, indică faptul că până la 5% din pacienții tratați cu avastin pot prezenta un risc crescut de evenimente tromboembolice, inclusiv accidente vasculare cerebrale acute, infarct miocardic și flebotromboză. Aceste date ne permit să presupunem că VEGF endogen poate juca un oarecare rol ateroprotectiv în vascularizare. Multiplele funcții biologice importante ale VEGF și integritatea funcțiilor endoteliului vascular sunt argumente sigure, care limitează în prezent orice abordări antiangiogenice pentru tratamentul bolilor cardiovasculare.

În concluzie menționăm că există o relație strânsă între morfologia plăcii și manifestările clinice la pacienții cu ateroscleroză arterelor cerebrale. Remodelarea pozitivă și zona de placă mai mare pot fi găsite în placa mobilă, iar remodelarea negativă și zona de plăci mai mici – în placa stabilă. Gradul de solubilitate al CD105 este legat de caracteristicile plăcii și poate servi drept predictor pentru placa solubilă. Sunt necesare studii pe eșantioane mari, pentru a dovedi dacă CD105 solubile pot prognoșta ruptura plăcii aterosclerotice.

CD105 este un marker valoros al angiogenezei plăcilor aterosclerotice, a intimei arterelor și vaselor adventice, un indicator al gradului de diferență în dezvoltarea patologică a aterosclerozei, factori care pot avea o mare importanță la introducerea metodelor moderne de cercetare, diagnostic, tratament și prognostic al acestor boli.

Bibliografie

1. Peterson S., Peto V., and Rayner M. (2005). *European Cardiovascular Disease Statistics*. British Heart Foundation, London. doi: 10.1289/image.cehp.v113.i2c.
2. V. Anestiadis, , Nagornev, V. and Zota, E. (2008). PATHOBIOLOGY OF ATHEROGENESIS. *Atherosclerosis Supplements*, 9(1), p.221. doi: 10.1016/s1567-5688(08)70881-x
3. Anestiadis V, Nagornev V. and Zota, E. Aterogeneze (aspect patobiologicii). (2001). p.157.

4. Anestiadis V, Zota, E. Ateroscleroză i elastica arterii, (1970) p.34.
5. Barbara, N., Wrana, J. and Letarte, M. (1999). Endoglin Is an Accessory Protein That Interacts with the Signaling Receptor Complex of Multiple Members of the Transforming Growth Factor- Superfamily. *Journal of Biological Chemistry*, 274(2), pp.584-594. doi: 10.1074/jbc.274.2.584.
6. Ribatti, D., Levi-Schaffer, F. and Kovanen, P. (2008). Inflammatory angiogenesis in atherogenesis-a double-edged sword. *Annals of Medicine*, 40(8), pp.606-621. doi: 10.1080/07853890802186913
7. Li, C., Mollahan, P., Baguneid, M.,S., McMahon, R.,F., Kumar, P., Walker, M.,G., Freemont, A.,J., Kumar, S. (2006). A comparative study of neovascularisation in atherosclerotic plaques using CD31, CD105 and TGF beta₁. *Pathobiology*. 73(4). pp.192-197. doi: 10.1159/000096020.
8. Middleton, J., Americh, L., Gayon, R., Julien, D., Mansat, M., Mansat, P., Anract, P., Cantagrel, A., Cattan, P., Reimund, J., Aguilar, L., Amalric, F. and Girard, J. (2005). A comparative study of endothelial cell markers expressed in chronically inflamed human tissues: MECA-79, Duffy antigen receptor for chemokines, von Willebrand factor, CD31, CD34, CD105 and CD146. *The Journal of Pathology*, 206(3), pp.260-268. doi: 10.1002/path.1788.
9. Cui, S., Lu, S.,Z., Chen, Y.,D., He, G.,X., Meng, L.,J., Liu, J.,P., Song, Z.,Y., Liu, X.,L., Song, X.,T., Ge, C.,J., Liu, H.(2008). Relationship among soluble CD105, hypersensitive C-reactive protein and coronary plaque morphology: an intravascular ultrasound study. *Chin. Med. J.(Engl)*. 121. pp.128-132.
10. Kovanen, P. (2007). Mast cells: multipotent local effector cells in atherothrombosis. *Immunol Rev*, 217(1), pp.105-122. doi: 10.1111/j.1600-065x.2007.00515.x.
11. Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors. In: *Breast Cancer Res. Treat.*, 1995, vol. 36, nr. 2, p. 169-180.
12. Van der Auwera, I., Cao, Y., Tille, J., Pepper, M., Jackson, D., Fox, S., Harris, A., Dirix, L. and Vermeulen, P. (2006). First international consensus on the methodology of lymphangiogenesis quantification in solid human tumors. *British Journal of Cancer*, 95(12), pp.1611-1625. doi: 10.1038/sj.bjc.6603445.
13. Мунтяну А.И., Райка М., Зота Е.Г. Иммуногистохимическое изучение роли макрофагов в процессе ангиогенеза в атеросклеротических бляшках у пациентов с метаболическим синдромом. АРХИВ ПАТОЛОГИИ, АРХИВ ПАТОЛОГИИ, Том 78 март—апрель 2>2016, стр.19-29. doi: 10.17116/patol201678219-28, УДК 616.13-004.6-091.8
14. Ieremia Zota, Andrei Munteanu, Eremai Zota. Clinico-morphological manifestations of atherosclerotic lesions of cerebral basilar arteries. *Curierul Medical*. April, 2016, Vol. 60, No 2. ISSN 1857-0666