



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
Β' ΚΑΡΔΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΙΙΒΕΑΑ (ΙΔΡΥΜΑ ΙΑΤΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ ΑΚΑΔΗΜΙΑΣ ΑΘΗΝΩΝ)
FEAC AE
RONTIS HELLAS AE**

**«Εκτίμηση In Vivo της αποτελεσματικότητας ενδοαγγειακής πρόθεσης
με δυνατότητα απελευθέρωσης ρετινοϊκού οξέος σε πειραματικά
μοντέλα»**

ΙΩΑΝΝΑ ΣΑΜΑΡΑ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2026



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
Β' ΚΑΡΔΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΙΙΒΕΑΑ (ΙΔΡΥΜΑ ΙΑΤΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ ΑΚΑΔΗΜΙΑΣ ΑΘΗΝΩΝ)
FEAC AE
RONTIS HELLAS AE**

**«Εκτίμηση In Vivo της αποτελεσματικότητας ενδοαγγειακής πρόθεσης
με δυνατότητα απελευθέρωσης ρετινοϊκού οξέος σε πειραματικά
μοντέλα»**

ΙΩΑΝΝΑ ΣΑΜΑΡΑ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2026

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα ».

Ημερομηνία αίτησης της κ. Σαμαρά Ιωάννας: 01-06-2020

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: Γ.Σ. αριθμ. 949α/30-11-2020

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων:

Κατσούρας Χρήστος, Αναπληρωτής Καθηγητής Καρδιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη:

Λάμπρος Μιχάλης, Καθηγητής Καρδιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Φωτιάδης Δημήτριος, Καθηγητής Βιοϊατρικής Τεχνολογίας του Τμήματος Μηχανικών επιστήμης Υλικών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 07-01-2021

«Εκτίμηση in Vivo της αποτελεσματικότητας ενδοαγγειακής πρόθεσης με δυνατότητα απελευθέρωσης ρετινοϊκού οξέος σε πειραματικά μοντέλα»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ: 1210α/26-01-2026

1. Κατσούρας Χρήστος, Καθηγητής Καρδιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
2. Μιχάλης Λάμπρος, Καθηγητής Καρδιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
3. Φωτιάδης Δημήτριος, Καθηγητής Βιοϊατρικής Τεχνολογίας του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
4. Κοραντζόπουλος Παναγιώτης, Καθηγητής Καρδιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
5. Νάκα Αικατερίνη, Καθηγήτρια Καρδιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
6. Λιάμης Γεώργιος, Καθηγητής Παθολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
7. Μηλιώνης Χαράλαμπος, Καθηγητής Παθολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 09-02-2026

Ιωάννινα 09-06-2026

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Σπυρίδων Κονιτσιώτης

Καθηγητής Νευρολογίας



Δημοσιεύσεις και παρουσιάσεις σχετικές με την διδακτορική διατριβή

- **Samara, I.;** Katsouras, C.S.; Semertzioglou, A.; Vratimos, A.; Moula, A.I.; Dimitriou, C.A.; Theofanis, M.; Papadimitropoulou, T.; Bouratzis, V.; Karanasiou, G.; et al. Histopathological Evaluation of a Retinoic Acid Eluting Stent in a Rabbit Iliac Artery Model. *Sci. Rep.* 2022, 12, 13305. (Συντελεστής εμβέλειας του περιοδικού 3.9)
- **Samara, I.;** Moulas, A.N.; Karanasiou, G.; Papadimitropoulou, T.; Fotiadis, D.; Michalis, L.K.; Katsouras, C.S. Is It Time for a Retinoic Acid-Eluting Stent or Retinoic Acid-Coated Balloon? Insights from Experimental Studies of Systemic and Local Delivery of Retinoids. *Hell. J. Cardiol.* 2024, 76, 75–87. (Συντελεστής εμβέλειας του περιοδικού 3.9)
- **Samara, I.;** Moula, A.I.; Moulas, A.N.; Katsouras, C.S. The Effect of Retinoids in Vascular Smooth Muscle Cells: From Phenotyping Switching to Proliferation and Migration. *Int. J. Mol. Sci.* 2024, 25, 10303. <https://doi.org/10.3390/ijms251910303>. (Συντελεστής εμβέλειας του περιοδικού 4.9)
- Anargyros N Moulas, Christos S Katsouras, **Ioanna Samara**, Amalia I Moula, Triantafyllia Papadimitropoulou, Athanassios Vratimos, Arsen Semertzioglou, Maria Vaiou, Athanasia Zampouka, Maria Salagianni, Evangelos Andreacos, Lampros K Michalis. Retinoic acid eluting stents for the treatment of vascular stenosis. A novel use for an old drug. Eurobiotech Congress. Prague, Czechia, October 5-7, 2022. Invited Presentation. <http://eurobiotech2022.eu/>.

- Anargyros Moulas, Christos S Katsouras, **Ioanna Samara**, Amalia I Moula, Triantafyllia Papadimitropoulou, Athanassios Vratimos, Arsen Semertzioglou, Maria Vaiou, Athanasia Zampouka, Savvas Papadopoulos, Lampros K Michalis. Comparative in vivo study of a retinoic acid stent with absorbable polymer. Eurobiotech Congress. Prague, Czechia, October 5-7, 2022. Invited Presentation. [European Biotechnology Congress 2022](#)

Ευχαριστίες

Νιώθω την ανάγκη να εκφράσω τις θερμές και ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους όσοι συνέβαλαν, με οποιονδήποτε τρόπο, στην πραγματοποίηση και ολοκλήρωση της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Ιδιαίτερα, θα ήθελα να εκφράσω τη βαθιά μου ευγνωμοσύνη προς τον επιβλέποντα καθηγητή μου, Καθηγητή κ. Κατσούρα, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε από την έναρξη αυτής της ερευνητικής προσπάθειας, για την αδιάλειπτη επιστημονική καθοδήγηση, τις πολύτιμες συμβουλές και τη συνεχή υποστήριξή του καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής. Η καθοριστική συμβολή του στη διεξαγωγή των πειραμάτων, καθώς και στη συγγραφή και ολοκλήρωση της μελέτης, υπήρξε ανεκτίμητη και χωρίς αυτήν η περάτωση της παρούσας εργασίας δεν θα ήταν δυνατή.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, Καθηγητή κ. Λάμπρο Μιχάλη και Καθηγητή κ. Δημήτριο Φωτιάδη, για τη διαρκή υποστήριξή τους, τις πολύτιμες παρατηρήσεις και τη διαθεσιμότητά τους καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης. Ιδιαίτερη ευγνωμοσύνη τους οφείλω για τη δυνατότητα που μου προσέφεραν να συμμετάσχω στο ιδιαίτερα καινοτόμο ερευνητικό έργο BioCoStent, εμπειρία που συνέβαλε ουσιαστικά στη διεύρυνση των επιστημονικών μου οριζόντων και στην απόκτηση πολύτιμης εμπειρίας στην ανάπτυξη και εφαρμογή πειραματικών μοντέλων.

Θερμές ευχαριστίες απευθύνω επίσης προς τον Καθηγητή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και επιστημονικό υπεύθυνο του έργου κ. Ανάργυρο Μουλά, ο οποίος μου

εμπιστεύθηκε το επιστημονικό και ερευνητικό του έργο σχετικά με την ανάπτυξη της ενδοστεφανιαίας πρόθεσης εκλύσεως ρετινοϊκού οξέος.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στον Διευθυντή Έρευνας και Ανάπτυξης της Rontis Corporation, κ. Άρσεν Σεμερτζόγλου, για την κατασκευή και διάθεση της ενδοστεφανιαίας πρόθεσης, καθώς και για τη συνεχή παρουσία, την αμέριστη υποστήριξη και την ουσιαστική συμβολή του κατά τη διάρκεια της διεξαγωγής των πειραμάτων, στοιχεία που υπήρξαν καθοριστικά για την επιτυχή ολοκλήρωσή τους.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου προς τον κ. Νικόλαο Κωστομητσόπουλο, Ειδικό Λειτουργικό Επιστήμονα του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ), καθώς και προς όλα τα μέλη της ομάδας του ΙΙΒΕΑΑ, για την άρτια διεξαγωγή των πειραμάτων, την αμέριστη διαθεσιμότητά τους, την εξαιρετική συνεργασία και την πολύτιμη συμβολή τους στην επιτυχή ολοκλήρωση της ερευνητικής αυτής προσπάθειας.

Περίληψη στα ελληνικά

Σκοπός: Η παρούσα διατριβή αποσκοπεί στην μελέτη της ασφάλειας και αποτελεσματικότητας καινοτόμου ενδοστεφανιαίας πρόθεσης (stent) με επικάλυψη ρετινοϊκού οξέος και βιοδιασπώμενο πολυμερές για την αντιμετώπιση της καρδιαγγειακής νόσου.

Μέθοδος: Τοποθετήθηκαν 60 stent στις λαγόνιες αρτηρίες 30 κονίκλων, αποτελούμενα από δύο διαφορετικά είδη βιοδιασπώμενων πολυμερών (Α και Β) και τρεις διαφορετικές δόσεις ρετινοϊκού οξέος [μικρή (‘L’), μεσαία (‘M’) και υψηλή δόση (‘H’)], με αποτέλεσμα τη δημιουργία τριών υπό-ομάδων (AH, AM, AL, BH, BM, BL). Δύο ομάδες ελέγχου με stent από το ίδιο μεταλλικό πλέγμα κοβαλτίου-χρωμίου, φάρμακο αποδέσμευσης το εβερόλιμους και επίστρωση με το πολυμερές ‘Α’ στη μία ομάδα (EF) και το πολυμερές ‘Β’ στην άλλη (EG) και μία ομάδα χωρίς επικάλυψη φαρμάκου. Τέσσερις εβδομάδες μετά την τοποθέτηση των stent, αφαιρέθηκαν και πραγματοποιήθηκε ιστομορφομετρική και ιστοπαθολογική ανάλυση.

Αποτελέσματα: Κανένα από τα stent δεν σχετίστηκε με τη δημιουργία θρόμβου ή σοβαρής φλεγμονώδους αντίδρασης. Οι ομάδες με το πολυμερές Β εμφάνισαν μικρότερη στένωση και μέση πάχυνση του έσω χιτώνα σε σχέση με τις ομάδες με το πολυμερές Α. Η ομάδα AH παρουσίασε την μεγαλύτερη στένωση και μέση πάχυνση του έσω χιτώνα σε σχέση με τα υπόλοιπα stent.

Συμπέρασμα: Η εμφύτευση stent επικαλυπτόμενων με ρετινοϊκό οξύ δεν συσχετίστηκε με την παρουσία θρόμβου ή/και σημαντικής φλεγμονώδους αντίδρασης. Ο βαθμός στένωσης ήταν αποδεκτός σε όλες τις ομάδες των stent σε διάστημα παρατήρησης 4 εβδομάδων. Η δόση ρετινοϊκού οξέος και ο τύπος του πολυμερούς μπορεί να παίζουν ρόλο στην βιοσυμβατότητα του stent.

Περίληψη στα αγγλικά

Objective: The present dissertation aims to evaluate the safety and efficacy of an innovative coronary stent coated with retinoic acid and a biodegradable polymer for the treatment of cardiovascular disease.

Methods: A total of 60 stents were implanted in the iliac arteries of 30 rabbits. The stents consisted of two different types of biodegradable polymers (A and B) and three different doses of retinoic acid [low ('L'), medium ('M'), and high ('H')], resulting in six subgroups (AH, AM, AL, BH, BM, BL). Two control groups were used, with stents made of the same cobalt-chromium metallic mesh, drug-eluting everolimus, and coated with polymer 'A' (EF group) or polymer 'B' (EG group), as well as one control group without drug coating. Four weeks after implantation, the stents were removed, and histomorphometric and histopathological analyses were performed.

Results: None of the stents was associated with thrombus formation or a severe inflammatory reaction. The groups with polymer B exhibited less stenosis and smaller mean intimal thickening compared to the groups with polymer A. The AH group showed the greatest stenosis and mean intimal thickening among all stent types.

Conclusion: The implantation of stents coated with retinoic acid was not associated with thrombus formation or significant inflammatory response. The degree of stenosis was acceptable in all stent groups after a 4-week observation period. The dose of retinoic acid and the type of polymer may play a role in the biocompatibility of the stent.

Πίνακας περιεχομένων

I. Γενικό μέρος	13
1. Στεφανιαία νόσος	13
1.1 Εισαγωγή	13
1.2 Παθοφυσιολογία	14
1.3 Κλινική εκδήλωση	15
1.4 Αντιμετώπιση	17
2. Η εξέλιξη της ενδοστεφανιαίας πρόθεσης	20
2.1 Ενδοστεφανιαία πρόσθεση χωρίς επικάλυψη φαρμάκου (BMS)	20
2.2 Ενδοστεφανιαία πρόθεση με αποδέσμευση φαρμάκου (DES)	22
2.3 Μπαλόνι με αποδέσμευση φαρμάκου (DCB)	32
3. Θρόμβωση των προθέσεων	34
4. Επαναστένωση	37
4.1 Μηχανισμοί και παράγοντες επαναστένωσης	37
4.2 Ο ρόλος της ενδοστεφανιαίας απεικόνισης	42
4.3 Αγγειογραφική ταξινόμηση της επαναστένωσης	44
4.4 Αντιμετώπιση επαναστένωσης	45
5. Αθηροσκλήρωση	49
5.1 Στάδια αθηροσκλήρωσης	53
6. Ρετινοϊκό οξύ	56
6.1 Εισαγωγή	56
6.2 Μεταβολισμός ρετινοϊκού οξέος	58
6.3 Μηχανισμός σηματοδότησης ρετινοϊκού οξέος	61
6.4 Θεραπευτικοί στόχοι του ρετινοϊκού οξέος	64
6.5 Σύνδρομο διαφοροποίησης	65
7. Ρετινοϊκό οξύ και καρδιαγγειακό σύστημα	66
8. Ρετινοϊκό οξύ και αθηροσκλήρωση	70
8.1 Ρετινοϊκό οξύ και πολλαπλασιασμός λείων μυϊκών κυττάρων	71
8.2 Ρετινοϊκό οξύ και Μετανάστευση λείων μυϊκών κυττάρων	76

8.3	Ρετινοϊκό οξύ και Διαφοροποίηση	78
II.	ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	82
1.	Εισαγωγή	82
2.	Μέθοδος	83
2.1	Πειραματική διαδικασία	85
2.2	Τύποι ενδοστεφανιαίας πρόθεσης	89
2.3	Νεκροψία κα ιστομορφομετρία	92
2.4	Παράμετροι αξιολόγησης	93
2.5	Στατιστική ανάλυση	99
3.	Αποτελέσματα	100
3.1	Μικροσκοπική ανάλυση	102
3.2	Απεικονιστική και ιστομορφομετρική ανάλυση	106
4.	Συζήτηση	110
4.1	Αγγειακή βλάβη και συστηματική χορήγηση ρετινοϊκού οξέος	114
4.2	Αγγειακή βλάβη και τοπική χορήγηση ρετινοϊκού οξέος	122
5.	Περιορισμοί	124
6.	Συμπέρασμα	126
III.	Παράρτημα I	131
IV.	Παράρτημα II	138
V.	Βιβλιογραφία	141

I. Γενικό μέρος

1. Στεφανιαία νόσος

1.1 Εισαγωγή

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, η στεφανιαία νόσος αποτελεί την κυριότερη αιτία θανάτου παγκοσμίως (1). Συχνά αναφέρεται ως αθηροσκληρωτική καρδιαγγειακή νόσος ή ισχαιμική καρδιακή νόσος και εκδηλώνεται κλινικά είτε ως οξύ έμφραγμα μυοκαρδίου είτε ως ισχαιμική μυοκαρδιοπάθεια, αποτελώντας μέρος του ευρύτερου φάσματος της καρδιαγγειακής νόσου (2). Υπολογίζεται ότι αντιπροσωπεύει το 2,2% των συνολικών νοσημάτων παγκοσμίως και το 32,7% της καρδιαγγειακής νόσου, με οικονομικό κόστος που υπερβαίνει τα 200 δισεκατομμύρια ετησίως στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής (3).

Ποικίλοι παράγοντες κινδύνου συμβάλουν στην εμφάνιση της στεφανιαίας νόσου, που μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε μη τροποποιήσιμους και τροποποιήσιμους. Στους μη τροποποιήσιμους ανήκουν το φύλο, η ηλικία, το οικογενειακό ιστορικό και το γενετικό υπόβαθρο. Το ανδρικό φύλο σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο σε σχέση με το γυναικείο φύλο (1,786 vs. 1,522 περιπτώσεις ανά 100,000 ασθενείς), ενώ η αύξηση της ηλικίας μετά την τέταρτη δεκαετία σχετίζεται με προοδευτική αύξηση του κινδύνου εμφάνισης στεφανιαίας νόσου (2). Στους τροποποιήσιμους παράγοντες κινδύνου συγκαταλέγονται το κάπνισμα, η παχυσαρκία, η δυσλιπιδαιμία, ο σακχαρώδης διαβήτης, η υπέρταση καθώς και κοινωνικο-οικονομικοί και ψυχο-κοινωνικοί παράγοντες (3).

1.2 Παθοφυσιολογία

Ο κυριότερος μηχανισμός εμφάνισης της στεφανιαίας νόσου είναι η δημιουργία αθηρωματικής πλάκας, που είναι αποτέλεσμα ταυτόχρονων, διαφορετικών διεργασιών που συντελούνται στο αρτηριακό τοίχωμα. Η διαδικασία της αθηρογένεσης ξεκινάει με την συσσώρευση των κυκλοφορούντων σωματιδίων LDL στον έσω χιτώνα, τα οποία στη συνέχεια υπόκεινται σε οξειδωτικές αλλαγές ως αντίδραση στη φλεγμονή, με τελικό αποτέλεσμα τη δημιουργία οξειδωμένης LDL (3). Παράλληλα, η επίδραση των βλαπτικών παραγόντων κινδύνου στο αγγειακό ενδοθήλιο προάγει την προσκόλληση λευκοκυττάρων στην εσωτερική επιφάνεια του αρτηριακού τοιχώματος, τα οποία στη συνέχεια διαφοροποιούνται σε μακροφάγα. Τα μακροφάγα επάγουν τη συσσώρευση των οξειδωμένων λιπιδίων με αποτέλεσμα την δημιουργία των αφρωδών κυττάρων και ενός νεκρωτικού πυρήνα, γεγονός που αποτελεί τον ακρογωνιαίο λίθο στη δημιουργία της αθηρωματικής πλάκας (4). Τέλος, τα λεία μυϊκά κύτταρα της μέσης στιβάδας μεταναστεύουν στην έσω στιβάδα, όπου υφίστανται ποικίλες φαινοτυπικές αλλαγές και παράγουν ένα πλούσιο εξωκυττάριο στρώμα συμβάλλοντας έτσι στη δημιουργία μίας ινώδους κάψας (5).

Η αθηρωματική πλάκα μπορεί να υποστεί ρήξη και δημιουργία θρομβωτικού υλικού στον αυλό του αγγείου, με αποτέλεσμα την εμφάνιση οξέος στεφανιαίου συνδρόμου. Ο θρόμβος στον αυλό του αγγείου δημιουργείται από την συσσώρευση αιμοπεταλίων και την ενεργοποίηση του πηκτικού μηχανισμού (6).

Η αθηροσκλήρωση αποτελεί μία χρόνια φλεγμονώδη αγγειακή νόσο που προσβάλλει κυρίως τα μεγάλου και μέσου μεγέθους αγγεία, είναι αποτέλεσμα τραυματισμού του ενδοθηλίου λόγω της παρατεταμένης έκθεσης αυτού σε

βλαπτικούς παράγοντες κινδύνου, όπως η δυσλιπιδαιμία, ο σακχαρώδης διαβήτης, η υπέρταση και το κάπνισμα, και ταυτόχρονης διήθησης κυκλοφορούντων λιποπρωτεϊνών με τελικό αποτέλεσμα τη δημιουργία του αθηρώματος (7).

1.3 Κλινική εκδήλωση

Τα κλινικά σύνδρομα με τα οποία εκδηλώνεται η στεφανιαία νόσος κατατάσσονται σε σταθερά και οξέα στεφανιαία σύνδρομα. Η χρόνια (σταθερή) στεφανιαία νόσος χαρακτηρίζεται κυρίως από μακρές σταθερές περιόδους, οι οποίες συχνά διακόπτονται αιφνιδίως από οξέα συμβάντα ως αποτέλεσμα οξέος αθηρωθρομβωτικού επεισοδίου. Τα επεισόδια αυτά οφείλονται συνηθέστερα σε ρήξη ή διάβρωση μιας προϋπάρχουσας αθηρωματικής πλάκας (6). Η μετάπτωση της σταθερής στεφανιαίας νόσου σε οξύ συμβάν είναι συχνότερη σε περιπτώσεις μειωμένου ελέγχου των παραγόντων κινδύνου και μη τήρησης των υγειονομιακών μέτρων, καθώς και σε περιπτώσεις μη βέλτιστης φαρμακευτικής αγωγής και επαναιμάτωσης.

Η κλινική εκδήλωση των σταθερών στεφανιαίων συνδρόμων είναι αποτέλεσμα διαταραχής της ισορροπίας μεταξύ προσφοράς και ζήτησης οξυγόνου από το μυοκάρδιο λόγω μείωσης της ροής αίματος στα στεφανιαία αγγεία λόγω της ύπαρξης στενώσεων. Εμφανίζονται πιο συχνά με ένα από τα παρακάτω κλινικά σενάρια: i) σταθερή στηθάγχη ή/και δύσπνοια, ii) πρωτοεμφανιζόμενη καρδιακή ανεπάρκεια ή συστολική δυσλειτουργία, iii) αγγειοσπαστική ή μικροαγγειακή στηθάγχη (8).

Τα οξέα στεφανιαία σύνδρομα προκαλούνται από αιφνίδια ρήξη ή διάβρωση της αθηρωματικής πλάκας ή παρουσία ασβεστωμένων οζιδίων και σχηματισμό

θρόμβου, γεγονός που οδηγεί είτε σε πλήρη είτε σε μερική απόφραξη του αγγείου. Χαρακτηριστικό γνώρισμα των οξέων στεφανιαίων συνδρόμων είναι η πρόκληση μυοκαρδιακής ισχαιμίας με ή χωρίς νέκρωση του μυοκαρδίου. Σύμφωνα με τις ευρωπαϊκές κατευθυντήριες οδηγίες, μυοκαρδιακό έμφραγμα ορίζεται η αύξηση ή μείωση της τροπονίνης υψηλής ευαισθησίας πάνω από την 99^η εκατοστιαία θέση του ανώτερου ορίου αναφοράς και η παρουσία τουλάχιστον ενός από τα παρακάτω ευρήματα: i) συμπτώματα ισχαιμίας, ii) νεοεμφανιζόμενες ηλεκτροκαρδιογραφικές αλλοιώσεις ενδεικτικές ισχαιμίας, iii) παρουσία παθολογικών κυμάτων Q στο ηλεκτροκαρδιογράφημα, iv) απεικονιστικά ευρήματα απώλειας βιώσιμου μυοκαρδίου ή πρωτοεμφανιζόμενες διαταραχές κινητικότητας, v) παρουσία ενδοαγγειακού θρόμβου σε στεφανιογραφικό έλεγχο ή νεκροτομή (9). Η κλινική εκδήλωση των οξέων στεφανιαίων συνδρόμων ταξινομείται με βάση τα ηλεκτροκαρδιογραφικά ευρήματα. Περιλαμβάνονται το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου με ανάσπαση του διαστήματος ST (STEMI), όπου συνηθέστερα παρατηρείται πλήρης απόφραξης του αγγείου, και το οξύ έμφραγμα μυοκαρδίου χωρίς ανάσπαση του διαστήματος ST (NSTEMI), όπου συνήθως υπάρχει μερική απόφραξη του αγγείου και εμβολισμός περιφερικά με θρομβωτικό υλικό. Περαιτέρω κατηγοριοποίηση των οξέων στεφανιαίων συνδρόμων γίνεται με βάση το αίτιο και διακρίνονται πέντε τύποι. Στον τύπο 1 ανήκουν τα εμφράγματα μυοκαρδίου λόγω ρήξης ή διάβρωσης αθηρωματικής πλάκας και σχηματισμό θρόμβου. Στον τύπο 2 ανήκουν τα εμφράγματα μυοκαρδίου που προκαλούνται λόγω διαταραχής της ισορροπίας προσφοράς/ζήτησης οξυγόνου από το μυοκάρδιο, όπως συμβαίνει στις περιπτώσεις αυτόματου διαχωρισμού, αγγειόσπασμου/μικροαγγειακής δυσλειτουργίας, παρουσία σταθερών στενώσεων λόγω αθηρωματικών πλακών ή σε

περιπτώσεις αυξημένων μεταβολικών αναγκών όπως αναιμία, σήψη κ.α. Στον τύπο 3 ανήκουν οι περιπτώσεις αιφνίδιου καρδιακού θανάτου και συμπτώματα ενδεικτικά ισχαιμίας προ του θανάτου, αλλά χωρίς πραγματοποίηση βιοχημικών δεικτών που να επιβεβαιώνουν τη διάγνωση. Στον τύπο 4 ανήκουν τα εμφράγματα μυοκαρδίου μετά από διαδερμικές επεμβάσεις επαναιμάτωσης και στον τύπο 5 ανήκουν τα εμφράγματα μυοκαρδίου μετά από αορτοστεφανιαία παράκαμψη (9).

1.4 Αντιμετώπιση

Η αντιμετώπιση της χρόνιας στεφανιαίας νόσου περιλαμβάνει τον συνδυασμό υγιεινοδιαιτητικών μέτρων, φαρμακευτικών και επεμβατικών μεθόδων. Τα υγιεινοδιαιτητικά μέτρα αποσκοπούν στη βελτίωση των παραγόντων κινδύνου και περιλαμβάνουν τη φυσική δραστηριότητα, τη μεσογειακή διατροφή, τη διακοπή καπνίσματος και αλκοόλ, την απώλεια βάρους κ.α. Στόχος της φαρμακευτικής αγωγής και των επεμβατικών παρεμβάσεων είναι αφενός η μείωση και εξάλειψη των συμπτωμάτων στηθάγχης και αφετέρου η πρόληψη καρδιαγγειακών συμβάντων. Η φαρμακευτική αγωγή, με στόχο την βελτίωση των συμπτωμάτων, περιλαμβάνει τις εξής κατηγορίες: β-αποκλειστές, αναστολείς διαύλων ασβεστίου, νιτρώδη, ιβαμπραδίνη, ρανολαζόνη, τριμεταζιδίνη, ενώ η φαρμακευτική αγωγή με στόχο την πρόληψη καρδιαγγειακών συμβάντων περιλαμβάνει την χορήγηση αντιαιμοπεταλιακής αγωγής (ασπιρίνης ή κλοπιδογρέλης) και στατίνης (8). Πολλές μελέτες έχουν δείξει την υπεροχή της επαναγγείωσης στην βελτίωση των συμπτωμάτων και της ποιότητας ζωής των ασθενών σε σχέση με την αποκλειστική χορήγηση φαρμακευτική αγωγή (10,11). Σε αντίθεση, δεν υπάρχουν σαφή δεδομένα

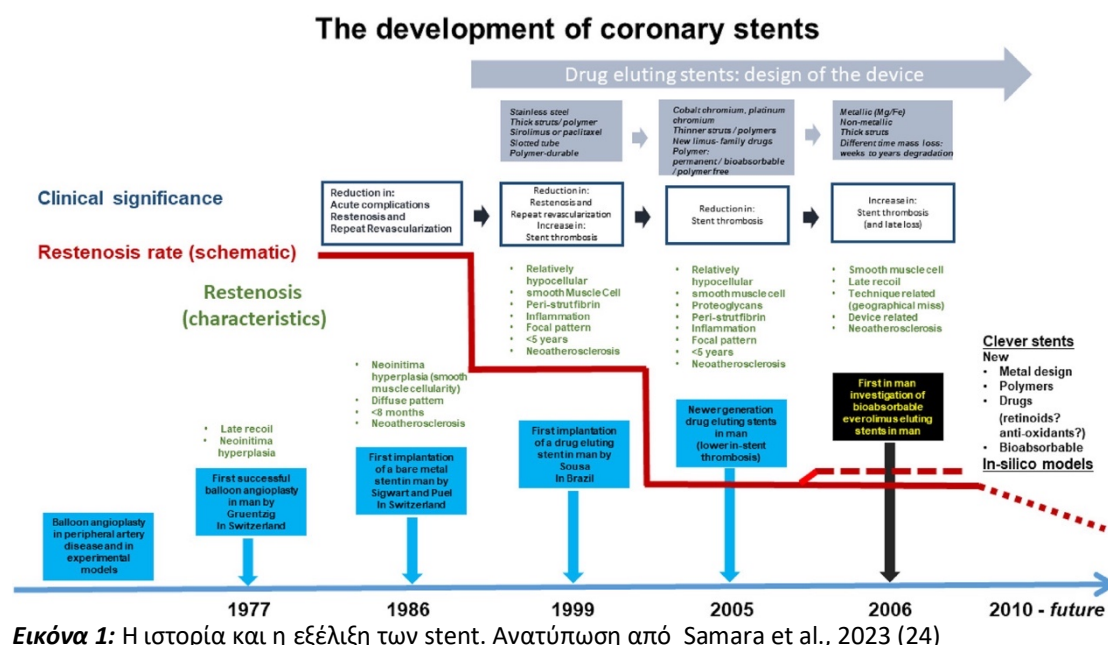
που να υποστηρίζουν την ανωτερότητα της επαναγγείωσης σε σχέση με την φαρμακευτική αγωγή όσον αφορά την πρόληψη καρδιαγγειακών συμβαμάτων. Η μελέτη ISCHEMIA έδειξε ότι τόσο οι διαδερμικές επεμβάσεις επαναγγείωσης όσο και η αορτοστεφανιαία παράκαμψη δεν μειώνουν τον κίνδυνο για μείζονα καταληκτικά σημεία (καρδιαγγειακός θάνατος, έμφραγμα του μυοκαρδίου, νοσηλεία για ασταθή στηθάγχη ή καρδιακή ανεπάρκεια) σε σχέση με τη στρατηγική μόνο φαρμακευτικής αγωγής (12). Παρόμοια αποτελέσματα έδειξε η μελέτη COURAGE λίγα χρόνια νωρίτερα (13) καθώς και BARI 2D, η οποία επικεντρώθηκε σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου II (14). Στον αντίποδα, η μελέτη FAME II έδειξε ότι σε ασθενείς με σταθερή στεφανιαία νόσο και αιμοδυναμικά σημαντικές στενώσεις, η καθοδηγούμενη από την κλασματική εφεδρεία ροής (FFR) επαναγγείωση είχε σημαντικά χαμηλότερα ποσοστά στα πρωτογενή καταληκτικά σημεία, όπως θάνατος, έμφραγμα μυοκαρδίου και επείγουσα επαναγγείωση, συγκριτικά με την αντιμετώπιση με μόνο την φαρμακευτική αγωγή (15). Στις Ευρωπαϊκές Κατευθυντήριες οδηγίες επαναγγείωσης και σταθερής στεφανιαίας νόσου, συστήνεται επαναγγείωση με ένδειξη τάξη I σε ασθενείς με στένωση > 50% στο στέλεχος ή στο εγγύς τμήμα του πρόσθιου κατιόντα κλάδου, σε παρουσία στένωσης >50% σε δύο ή τρία αγγεία και συνοδό συστολική δυσλειτουργία αριστερής κοιλίας < 35%, σε στένωση >50% του τελευταίου βατού αγγείου, και σε περιπτώσεις τεκμηριωμένης ισχαιμίας αριστερής κοιλίας > 10% σε λειτουργική μη επεμβατική δοκιμασία ή $FFR \leq 0.8$ (8,16).

Σε αντίθεση με τα χρόνια στεφανιαία σύνδρομα, η άμεση και έγκαιρη επαναιμάτωση των στεφανιαίων αγγείων κατέχει πρωταρχικό ρόλο στην αντιμετώπιση των οξέων στεφανιαίων συνδρόμων. Στο έμφραγμα του μυοκαρδίου

με ανάσπαση του διαστήματος ST, οι μέθοδοι άμεσης επαναιμάτωσης περιλαμβάνουν την πρωτογενή αγγειοπλαστική και την θρομβόλυση. Αποδεδειγμένη ανωτερότητα έχει η πρωτογενής αγγειοπλαστική, εφόσον αυτό είναι εφικτό να πραγματοποιηθεί εντός δύο ωρών από την διάγνωση του οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου σε περιπτώσεις που το κέντρο δεν διαθέτει αιμοδυναμικό εργαστήριο (17,18). Στο έμφραγμα του μυοκαρδίου χωρίς ανάσπαση του διαστήματος ST, πρέπει να διενεργηθεί στεφανιογραφικός έλεγχος εντός 2 έως 24 ωρών και αναλόγως των ευρημάτων είτε διαδερμική αγγειοπλαστική είτε αορτοστεφανιαία παράκαμψη (19).

Τόσο στα χρόνια όσο και στα οξέα στεφανιαία σύνδρομα συστήνεται με ένδειξη τάξη IA, η τοποθέτηση ενδοστεφανιαίας πρόθεσης με απελευθέρωση φαρμάκου (DES) (16), καθώς έχει αποδειχθεί μείωση των κύριων καταληκτικών σημείων, όπως θάνατος, έμφραγμα μυοκαρδίου, επαναγγείωση, σε σχέση με τη χρήση απλής μεταλλικής ενδοστεφανιαίας πρόθεσης χωρίς επικάλυψη (Bare Metal Stent -BMS) (20–23). Κύριο μειονέκτημα της χρήσης ενδοστεφανιαίας πρόθεσης είναι η εμφάνιση επαναστένωσης στο σημείο εμφύτευσης, ως αποτέλεσμα χρόνιας φλεγμονής και υπερπλασίας του ενδοθηλίου λόγω της παρουσία ξένου σώματος.

2. Η εξέλιξη της ενδοστεφανιαίας πρόθεσης



2.1 Ενδοστεφανιαία πρόσθεση χωρίς επικάλυψη φαρμάκου (BMS)

Το 1986 εμφυτεύθηκε για πρώτη φορά ενδοστεφανιαία πρόθεση (stent) από τον Jaque Paeul στην Τουλούζη και λίγο αργότερα από τον Ulrich Sigwart στην Λωζάννη (25). Τα πρώτα stent που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από ανοξείδωτο ατσάλι και ήταν αυτό-εκπτυσσόμενα. Η χρήση τους αρχικά αφορούσε επείγουσες καταστάσεις με στόχο την αποφυγή οξείας απόφραξης της αρτηρίας μετά από αγγειοπλαστική μόνο με μπαλόνι (POBA) (26). Δύο μεγάλες μελέτες, η European Belgium-Netherlands Stent (BENESTENT) και η American Stent Restenosis Study (STRESS) τυχαιοποίησαν περισσότερους από 900 ασθενείς σε δύο ομάδες, στη μία διενεργήθηκε POBA και στην άλλη πραγματοποιήθηκε εμφύτευση stent τύπου Palmaz- Schatz. Τα αποτελέσματα έδειξαν στατιστικά σημαντική μείωση του

ποσοστού επαναστένωσης και της ανάγκης για επαναγγείωση στο σημείο της διαδερμικής επέμβασης, καθώς επίσης η επιβίωση στους 7 μήνες και στους 6 μήνες αντίστοιχα ήταν μεγαλύτερη στην ομάδα του stent. Οι δύο αυτές μελέτες οδήγησαν στην έγκριση των BMS από τον Αμερικάνικο Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας και έτσι μέχρι το τέλος της δεκαετίας του '90 η χρήση των stent στις διαδερμικές επεμβάσεις ξεπερνούσε το 84% (27).

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν αρχικά για την κατασκευή των stent ήταν από μη διαβρώσιμα μέταλλα, όπως ανοξείδωτο ατσάλι (316L), κράμα κοβάλτιου-χρώμιου (Co-Cr), κράμα πλατίνας- ιρίδιου (Pt-Ir), ταντάλιο (Ta) και νιτινόλη (Ni-Ti) (28). Τα υλικά αυτά εξασφάλιζαν σταθερότητα στη δομή και το σχήμα των stent, ωστόσο η παραμονή τους στο αγγείο μπορούσε να οδηγήσει στην εμφάνιση οξείας θρόμβωσης ή/και υπερπλασίας του ενδοθηλίου με αποτέλεσμα τη δημιουργία επαναστένωσης, εξαιτίας βλάβης του ενδοθηλίου και χρόνιας φλεγμονώδους αντίδρασης (29).

Η εκτεταμένη χρήση των BMS μείωσε σημαντικά τα ποσοστά εμφράγματος του μυοκαρδίου και την ανάγκη για επείγουσα αορτοστεφανιαία παράκαμψη, ωστόσο παρέμεινε αρκετά υψηλό το ποσοστό επαναστένωσης (20-30%), με μέσο χρόνο εμφάνισης τους 6-9 μήνες (30). Άλλες σημαντικές επιπλοκές που προέκυψαν μετά την εμφύτευση των BMS, ήταν η θανατηφόρα θρόμβωση του stent και η ανάγκη για νέα επέμβαση. Στο πλαίσιο μείωσης των επιπλοκών χρησιμοποιήθηκε η χορήγηση από του στόματος διάφορων φαρμακευτικών ουσιών, χωρίς όμως να οδηγήσουν σε μείωση αυτών. Η ελάχιστη διάρκεια λήψης διπλής αντιαιμοπεταλιακής αγωγής ήταν ένας μήνας (31). Η κατανόηση του μηχανισμού δημιουργίας της επαναστένωσης και η παρατήρηση ότι η εφαρμογή φαρμακευτικών ουσιών τοπικά βελτίωσε το ποσοστό

επαναστένωσης, οδήγησε στην εξέλιξη των stent και στη κατασκευή stent με αποδέσμευση φαρμάκου (drug eluting stent-DES) (Εικόνα 1).

2.2 Ενδοστεφανιαία πρόθεση με αποδέσμευση φαρμάκου (DES)

Τα stent με αποδέσμευση φαρμάκου αποτελούνταν από τρία στοιχεία: ένα μεταλλικό πλέγμα, ένα πολυμερές και το φάρμακο διάχυσης. Το μεταλλικό πλέγμα χαρακτηρίζεται από λεπτές δοκίδες, οι οποίες επιτρέπουν την αύξηση και διατήρηση της διαμέτρου του αγγείου και την μείωση της πρόπτωσης της αθηρωματικής πλάκας (32). Το πολυμερές αποτελεί ένα υπόστρωμα για την φόρτωση του φαρμάκου αποδέσμευσης. Η βασικές λειτουργίες του πολυμερούς είναι η αναστολή της ταχείας έκπλυσης του φαρμάκου από την επιφάνεια του stent, η εξασφάλιση μίας ελεγχόμενης αποδέσμευσης του φαρμάκου και η ελαχιστοποίηση πρόκλησης τοπικής φλεγμονής (33). Το φάρμακο αποδέσμευσης είναι ένα φάρμακο που συμβάλλει στην αναστολή του πολλαπλασιασμού μετά την αγγειακή βλάβη και έχει λιποφιλικές ιδιότητες που του επιτρέπουν την αργή και σταθερή απορρόφηση από το τοίχωμα του αγγείου. Οι δύο βασικές κατηγορίες που χρησιμοποιήθηκαν είναι η πακλιταξέλη και ένα φάρμακο της οικογένειας της ραπαμυσίνης (-λίμους). Η πακλιταξέλη παρέχει έναν αντι-πολλαπλασιαστικό μηχανισμό δράσης. Δεσμεύεται στη β-υπομονάδα του ετεροδιμερούς της τουμπουλίνης και με τον τρόπο αυτό αναστέλλει την πρωτεϊνική κινάση ενεργοποιούμενη από μιτογόνα (mitogen-activated protein kinase), η οποία φυσιολογικά ενισχύει την από-πολυμεροποίηση των μικροσωλινίσκων. Ως αποτέλεσμα, δημιουργούνται υπερβολικά σταθεροί μικροσωληνίσκοι, οι οποίοι εμποδίζουν τον σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου και

τη μίτωση (32). Τα φάρμακα της οικογένειας της ραπαμυσίνης (-λίμους) εμφανίζουν έναν ανοσοκατασταλτικό τρόπο δράσης. Ανήκουν στην κατηγορία των αντιβιοτικών των μακρολίδων. Ο μηχανισμός δράσης τους έγκειται στην δέσμευση τους στην κυτταροπλασματική πρωτεΐνη FK-binding protein, η οποία οδηγεί στην αναστολή του mTOR (mammalian target of rapamycin). Η αναστολή του mTOR επάγει την αύξηση της πρωτεΐνης p27, η οποία με τη σειρά της αναστέλλει τα σύμπλοκα CDK-cyclin, τα οποία ρυθμίζουν την μετάβαση του κυτταρικού κύκλου από τη φάση G1 στη φάση S (32). Το πρώτο φάρμακο της οικογένειας της ραπαμυσίνης που χρησιμοποιήθηκε ήταν το σιρόλιμους, ένα φυσικό αντιβιοτικό με ισχυρή ανοσοκατασταλτική δράση, το οποίο εμφάνιζε καλύτερη φαρμακοκινητική και μεγαλύτερο θεραπευτικό εύρος σε σχέση με την πακλιταξέλη, παρέχοντας συνεπώς καλύτερη αντι-επαναστενωτική δράση συγκριτικά με τα stent που περιείχαν πακλιταξέλη (34). Η παρατήρηση αυτή οδήγησε γρήγορα στην δημιουργία νέων συνθετικών φαρμάκων της κατηγορίας αυτής και τη χρήση τους από τα stent νεότερων γενεών, όπως το ζοταρόλιμους, το εβερόλιμους, το ουμιρόλιμους, το νοβόλιμους και το αμφίλιμους (limus-family). Τα φάρμακα αυτά εμφανίζουν ορισμένες διαφορές ως προς τη δομή, το μοριακό βάρος, την ισχύ και τις λιποφιλικές ιδιότητες. Συγκεκριμένα, το ζοταρόλιμους είναι ιδιαίτερα λιποφιλικό φάρμακο, έχει μικρότερο χρόνο ημίσειας ζωής in vivo και παρόμοια υψηλή συγγένεια με την ανοσοφιλλίνη FKBP12 σε σχέση με το σιρόλιμους. Το εβερόλιμους εμφανίζει μεγαλύτερη αλληλεπίδραση με τον mTORC2, καλύτερη βιοδιαθεσιμότητα και μικρότερο χρόνο ημίσειας ζωής. Έχει παρατηρηθεί μείωση της αγγειακής φλεγμονής και ταχύτερη ενδοθηλιοποίηση. Το ουμιρόλιμους έχει την μεγαλύτερη λιποφιλική ιδιότητα και χρησιμοποιήθηκε για τοπική ενδοστεφανιαία χορήγηση. Το νοβόλιμους αποτελεί έναν ενεργό μεταβολίτη του σιρόλιμους και έχει

αποδειχθεί ότι αποτελεί έναν ισχυρό αναστολέα των λείων μυϊκών κυττάρων *in vitro* (35) (Πίνακας 1).

2.2.1 Πρώτης γενιάς ενδοστεφανιαία πρόθεση

Τα πρώτα DES που κατασκευάστηκαν ήταν το Taxus (Boston Scientific Corporation, USA) και το Cypher (Cordis Corporation, USA), το 2003. Στο Taxus stent το επικαλυπτόμενο φάρμακο είναι η πακλιταξέλη (PES), η οποία αναστέλλει το μικροσωληνώδες δίκτυο με αποτέλεσμα την αντι-πολλαπλασιαστική και αντι-φλεγμονώδη δράση. Απελευθερώνει το 10% του φαρμάκου τις πρώτες 10 ημέρες ενώ το υπόλοιπο φάρμακο απελευθερώνεται επ' αόριστο. Στο Cypher το επικαλυπτόμενο φάρμακο είναι το σιρόλιμους (SES). Το σιρόλιμους, επίσης γνωστό και ως ραπαμυσίνη, επηρεάζει την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου μέσω αναστολής της μετάβασης της φάσης G σε S, καταστέλλοντας έτσι την εμφάνιση ενδοθηλιακής υπερπλασίας (36). Το πολυμερές στο σιρόλιμους stent απελευθερώνει το 80% του φαρμάκου στις πρώτες 30 ημέρες (32).

Εξ αρχής πολλές μελέτες, τόσο τυχαιοποιημένες όσο και μη-τυχαιοποιημένες έδειξαν υπεροχή στα 1^{ης} γενιάς DES σε σχέση με τα BMS, όσον αφορά το ποσοστό επαναστένωσης και ανάγκη για νέα επέμβαση (36). Συγκεκριμένα, η μελέτη SIRIUS τυχαιοποίησε 1058 ασθενείς σε SES και BMS. Στους 12 μήνες παρακολούθησης παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση του ποσοστού νέας επέμβασης της βλάβης-στόχου στην ομάδα SES σε σχέση με την ομάδα του BMS (4.9% SES vs. 20% BMS, $p < 0.001$), χωρίς ωστόσο να παρατηρηθεί σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες όσον αφορά τον θάνατο και το έμφραγμα μυοκαρδίου (37). Όμοια αποτελέσματα διαπιστώθηκαν και στην 5ετή παρατήρηση της μελέτης SIRIUS, με

ποσοστό νέας επέμβασης της βλάβης-στόχου 9.4% στην ομάδα SES έναντι 24.2% στην ομάδα BMS ($p < 0.001$) και χωρίς διαφοροποίηση στα καταληκτικά σημεία θανάτου και εμφράγματος μυοκαρδίου (38). Η μελέτη TAXUS IV συνέκρινε τα PES σε σχέση με τα BMS, και τυχαιοποίησε 1314 ασθενείς. Στους 9 μήνες παρατήρησης υπήρξε στατιστικά σημαντική μείωση στην ανάγκη για νέα επέμβαση στην βλάβη-στόχο στην ομάδα PES σε σχέση με την ομάδα BMS (4.7% PES vs. 12% BMS, $p < 0.001$), καθώς επίσης παρατηρήθηκε μείωση της στένωσης αγγειογραφικά στην ομάδα PES (7.9% PES vs. 26.6% BMS, $p < 0.001$), ενώ στα πρωτογενή καταληκτικά σημεία, θάνατος και έμφραγμα μυοκαρδίου, δεν υπήρξε σημαντική διαφοροποίηση (39). Ομοίως, στη μελέτη TAXUS IV-SR, τα αποτελέσματα παρέμειναν τα ίδια στην 5ετία, με τα ποσοστά νέας επέμβασης της βλάβης -στόχου να είναι 16.9% PES vs. 27.4% BMS, $p < 0.001$ (40).

Ακολούθησαν διάφορες μελέτες που συνέκριναν τα PES σε σχέση με τα SES. Οι μελέτες REALITY και SORT OUT II δεν έδειξαν στατιστικά σημαντική διαφορά του ενός stent σε σχέση με το άλλο όσον αφορά το ποσοστό επαναστένωσης και τα κλινικά αποτελέσματα στους 12 και 18 μήνες παρακολούθησης (41,42). Μία μικρότερη μελέτη, η SIRTAX trial με 1012 ασθενείς έδειξε σημαντική μείωση των μείζονων καρδιαγγειακών συμβάντων στην ομάδα SES σε σχέση με την ομάδα PES (6.2% vs 10.8%) στους 9 μήνες παρακολούθησης, με τη βασική διαφοροποίηση να αφορά την επαναιμάτωση της βλάβης-στόχου (43).

Παρά την μείωση στην εμφάνιση επαναστένωσης λόγω της χρήσης των αντιπολλαπλασιαστικών φαρμάκων των πρώτης γενιάς DES, παρατηρήθηκε αύξηση της επανεμφάνισης της θρόμβωσης του stent, η οποία οφείλεται στην ύπαρξη διαρκούς φλεγμονής στον ιστό πέριξ του stent λόγω της παρουσίας του ανθεκτικού πολυμερούς, όπως προκύπτει από τη συγκέντρωση μακροχρόνιων ιστολογικών

δεδομένων (44). Επιπλέον, μειονέκτημα ήταν η ανάγκη για χορήγηση μεγαλύτερης διάρκειας αντιαιμοπεταλικής αγωγής (6-12 μήνες) σε σχέση με τα BMS, στα οποία η διπλή αντιαιμοπεταλιακή αγωγή παρέμενε για 1 μήνα. Γεγονός που αύξανε τον αιμορραγικό κίνδυνο. Η παρατήρηση των μειονεκτημάτων αυτών οδήγησε στην εξέλιξη και κατασκευή των 2^{ης} γενιάς DES.

2.2.2 Δεύτερης γενιάς ενδοστεφανιαία πρόθεση

Παρά την μείωση των επιπλοκών από τη χρήση των DES πρώτης γενιάς, το πρόβλημα επαναστένωσης και θρόμβωσης του stent λόγω του αυξημένου πάχους των δοκίδων των stent και της αντιδραστικής φλεγμονής γύρω από αυτά παρέμεινε σε σημαντικό βαθμό (45,46), οδηγώντας στην κατασκευή των stent δεύτερης γενιάς. Τα στεντ δεύτερης γενιάς παρουσίαζαν κατασκευαστικές διαφορές και στα τρία υλικά (μεταλλικό πλέγμα, πολυμερές, φάρμακο). Αρχικά, το υλικό του μεταλλικού πλέγματος αντικαταστάθηκε από κοβάλτιο-χρώμιο και από πλατίνα- χρώμιο, προσφέροντας την κατασκευή λεπτότερων δοκίδων (80-90mm) σε σχέση με το ανοξείδωτο ατσάλι, μειώνοντας με τον τρόπο αυτό την τοπική φλεγμονή και διατηρώντας παράλληλα την αντοχή στην πίεση του αγγείου (47). Η μελέτη ISAR-STereo έδειξε σημαντική μείωση της εμφάνισης επαναστένωσης (15.0% vs. 25.9%, $p=0.003$) και των καταληκτικών σημείων σχετιζόμενων με την επαναστένωση, όπως ισχαιμία με ανάγκη για επαναγγείωση, έμφραγμα του μυοκαρδίου και θάνατος (8.6% vs. 13.8%, $p=0.005$) στο έτος στην ομάδα των δεύτερης γενιάς DES σε σχέση με την ομάδα των BMS (46,48). Η λεπτότερη επιφάνεια αυτών των stent επιτρέπει μικρότερη αγγειακή βλάβη και επομένως φλεγμονή και θρόμβωση με τελικό αποτέλεσμα τη γρηγορότερη ενδοθηλιοποίηση (49). Επιπλέον, το πολυμερές που

χρησιμοποιήθηκε ήταν περισσότερο συμβατό με το αγγείο, επιτρέποντας γρηγορότερη διάχυση του φαρμάκου και καλύτερη ενδοθηλιακή κάλυψη (50). Τα φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν κυρίως δύο ημισυ-συνθετικά παράγωγα του σιρόλιμους, το εβερόλιμους και το ζοταρόλιμους, τα οποία είχαν περισσότερο λιποφιλικές ιδιότητες (51). Βασικό πλεονέκτημα των stent αυτών αποτελεί η δυνατότητα χορήγησης μικρότερης διάρκειας αντιαιμοπεταλικής αγωγής, 3 έως 6 μήνες σε προγραμματισμένη αγγειοπλαστική και 12 μήνες σε επείγουσα αγγειοπλαστική, μειώνοντας σημαντικά τα αιμορραγικά συμβάματα, χωρίς ταυτόχρονη αύξηση του θρομβωτικού κινδύνου (52). Σε σύγκριση με τα πρώτης γενιάς στεντ και τα BMS, τα δεύτερης γενιάς εμφανίζουν χαμηλότερο κίνδυνο επαναστένωσης εντός του stent, θρόμβωση του stent και θνητότητα (53–55).

2.2.3 Τρίτης γενιάς ενδοστεφανιαία πρόθεση

Η παρουσία του πολυμερούς στο αγγείο μετά την απελευθέρωση του φαρμάκου είναι γνωστό ότι σχετίζεται με τοπική φλεγμονώδη αντίδραση, όπως η ηωσινοφιλική διήθηση, καθώς και με νέο-ενδοθηλιακή υπερπλασία, η οποία ευθύνεται για την εμφάνιση όψιμης και πολύ όψιμης θρόμβωσης του stent (56). Τα παραπάνω μειονεκτήματα οδήγησαν στην δημιουργία των stent τρίτης γενιάς τα οποία αποτελούνται είτε από πολυμερή βιοδιασπώμενα μετά από καθορισμένο διάστημα, είτε δεν φέρουν καθόλου πολυμερές και επικαλύπτονται από ένα στρώμα που λειτουργεί ως δεξαμενή του φαρμάκου που επιτρέπει την απευθείας απελευθέρωση από αυτό. Βασικό πλεονέκτημα αποτελεί η μικρότερη διάρκεια αντιαιμοπεταλικής αγωγής (57).

Στην κατηγορία των βιοδιασπώμενων πολυμερών αναπτύχθηκαν αρχικά τέσσερα διαφορετικά stent. 1) Το Synergy™ XD, το οποίο αποτελείται από μεταλλικό πλέγμα πλατίνας-χρωμίου με πολύ λεπτές δοκίδες (74-81μm). Το φάρμακο διάχυσης είναι το εβερόλιμους και η διάχυση του ολοκληρώνεται σε 3 μήνες, ενώ το πολυμερές poly (D,L- lactide-coglycolide) απορροφάται σε διάστημα 4 μηνών μετά από την τοποθέτηση του (58). 2) Το Osiro Mission (Biotronik) με μεταλλικό πλέγμα κοβαλτίου-χρωμίου και πάχος δοκίδων (60-80μm). Το φάρμακο διάχυσης είναι το σιρόλιμους και διαχέεται σε 3 μήνες, ενώ το πολυμερές αποτελείται από δύο στιβάδες, μία εξωτερική (poly-L-lactide) η οποία προοδευτικά διασπάται σε διάστημα 12 έως 15 μήνες και μία εσωτερική από καρβίδιο πυριτίου, η οποία προάγει την ενδοθηλιοποίηση του stent και μειώνει την θρομβωτικότητα του (59,60). 3) Το Biomatrix Alpha (Biosensors International), το μεταλλικό πλέγμα είναι μείγμα κοβαλτίου – χρωμίου με πάχος 83μm. Το φάρμακο διάχυσης είναι ένα ημι-συνθετικό λιποφιλικό ανάλογο του σιρόλιμους, το οποίο εμφανίζει καλύτερη απορρόφηση, ενώ το πολυμερές έχει χρόνο διάσπασης 6 μήνες (61,62). 4) Το Ultimaster Nagomi™ (Terumo), επίσης με μεταλλικό πλέγμα κοβαλτίου- χρωμίου και πάχος δοκίδων 80μm, φάρμακο διάχυσης το σιρόλιμους με διάστημα αποδέσμευσης 3 έως 4 μηνών και ταυτόχρονη απορρόφηση του πολυμερούς (Poly(D,L- lactide-co-caprolactone) (63), γεγονός που επιτρέπει την μείωση της διπλής αντιαιμοπεταλιακής αγωγής σε ένα μήνα σε ασθενείς υψηλού αιμορραγικού κινδύνου (64). Η μετα-ανάλυση της Stefanini et al. με 4062 ασθενείς έδειξε σαφές πλεονέκτημα στην αποτελεσματικότητα και ασφάλεια αυτών των stent σε σχέση με το stent που περιλαμβάνει πολυμερές διαρκείας και σιρόλιμους φάρμακο (SES) (65).

Στην κατηγορία των stent άνευ πολυμερών αναπτύχθηκαν: 1) To Coroflex Isar Neo (B.Braun) με μεταλλικό πλέγμα κοβαλτίου- χρωμίου και εξαιρετικά λεπτές δοκίδες (55-65μm). Το φάρμακο διάχυσης ήταν το σιρόλιμους, το οποίο συνδυάστηκε με προμπουκόλη, ένα συστατικό που επιτρέπει την ελεγχόμενη αποδέσμευση του φαρμάκου σε διάστημα 90 ημερών και το οποίο εφαρμόστηκε απευθείας σε επίστρωμα στην εξωτερική επιφάνεια του stent (66,67). 2) Το Biofreedom Ultra™ (Biosensors) αποτελείται επίσης από μεταλλικό πλέγμα κοβαλτίου- χρωμίου με πάχος 84-88μm και ειδικό επίστρωμα στην εξωτερική επιφάνεια του stent που επιτρέπει την φόρτωση και αποδέσμευση του φαρμάκου σε διάστημα 28 ημερών. Βασικό πλεονέκτημα είναι η δυνατότητα γρήγορης ενδοθηλιοποίησης και επούλωσης, επιτρέποντας έτσι μικρότερη διάρκεια αντισταθμιστικής αγωγής, γεγονός ιδιαίτερα σημαντικό σε ασθενείς υψηλού αιμορραγικού κινδύνου (68,69).

2.2.4 «Τέταρτης γενιάς ενδοστεφανιαία πρόθεση»

Πριν από περίπου δύο δεκαετίες κατασκευάστηκαν για πρώτη φορά stent με βιοδιασπώμενο μεταλλικό πλέγμα. Η κατασκευή τους βασίστηκε στην ιδέα ότι η απουσία προσθετικών υλικών στην αρτηρία, θα μείωνε την ενδοθηλιακή υπερπλασία, ενώ θα μπορούσε να αποκατασταθεί ο φυσιολογικός αγγειακός τόνος και οι φυσιολογικές αγγειακές λειτουργίες. Επιπλέον, θα μπορούσε να μειωθεί ο κίνδυνος θρόμβωσης λόγω των προσθετικών υλικών, ενώ επίσης θα μπορούσε να επιτρέψει ευκολότερα μία ενδεχόμενη νέα επέμβαση (70,71). Στο πλαίσιο αυτό κατασκευάστηκαν το Absorb (Abbott Vascular) από poly-L-lactide και φάρμακο διάχυσης το εβερόλιμους, το οποίο απορροφούταν σε διάστημα 36-48 μήνες και το

Magmaris (Biotronik) από μαγνήσιο και φάρμακο διάχυσης αρχικά πακλιταξέλη και στη συνέχεια σιρόλιμους, με χρόνο απορρόφησης 6-12 μήνες (72,73). Ωστόσο, η μελέτη ABSORB III έδειξε μεγαλύτερα ποσοστά θρόμβωσης του stent και εμφράγματος του μυοκαρδίου σχετιζόμενο με τη βλάβη-στόχο σε σχέση με τα τρίτης γενιάς stent, οδηγώντας στην απόσυρσή του από την αγορά (74).

Τέλος, η ανάγκη για μείωση των μακροπρόθεσμων επιπλοκών της παραμονής του stent στο αγγείο, οδήγησε στην ιδέα της αγγειοπλαστικής μόνο με μπαλόνι, το οποίο αποδεσμεύει φάρμακο κατά τη διάρκεια της έκπτυξής του και της επαφής του με το αγγείο χωρίς να αφήνει μακροχρόνια στο αγγείο επιπλέον υλικά. Το φάρμακο διάχυσης παραμένει το σιρόλιμους και η πακλιταξέλη (75). Αρχικά η χρήση τους εδραιώθηκε στην αντιμετώπιση της επαναστένωσης εντός ενδοπροθέσεων (BMS, DES), ωστόσο νεότερα δεδομένα υποστηρίζουν την χρήση τους και σε πρωτοεμφανιζόμενες βλάβες μικρών αγγείων (76–78). Βασικό πλεονέκτημα είναι η σημαντικά μικρότερη διάρκεια της αντιαιμοπεταλιακής αγωγής, που τα καθιστούν ιδανικά σε ασθενείς υψηλού αιμορραγικού κινδύνου (79).

Παρά την αλματώδη εξέλιξη των ενδοστεφανιαίων προθέσεων τις τελευταίες δεκαετίες και την βελτίωση της πρόγνωσης των οξέων και χρόνιων στεφανιαίων συνδρόμων, οι επιπλοκές όπως η θρόμβωση του stent και κυρίως η επαναστένωση παραμένουν ακόμα ένα σημαντικό πρόβλημα των διαδερμικών καθετηριασμών. Η περαιτέρω εξέλιξη των ενδοστεφανιαίων προθέσεων είναι αναγκαία και αποτελεί μία πρόκληση.

Πίνακας 1. Τύποι ενδοστεφανιαίας πρόθεσης με αποδέσμευση φαρμάκου (DES)

Όνομα	Φάρμακο	Πλέγμα	Πάχος (μm)	Χρόνος απορρόφησης πολυμερούς	Χρόνος αποδέσμευσης
1^η γενιάς στεντ					
Cypher	Σιρόλιμους	Ανοξειδωτο ατσάλι	140	Μόνιμο	80% τις πρώτες 30 ημέρες
Taxus	Πακλιταξέλη	Ανοξειδωτο ατσάλι	132	Μόνιμο	10% τις πρώτες 10 ημέρες
2^η γενιάς στεντ					
Xience V/Promus	Εβερόλιμους	Κοβάλτιο- χρώμιο	81	Μόνιμο	80% τις πρώτες 30 ημέρες
Endeavor	Ζοταρόλιμους	Κοβάλτιο- χρώμιο	91	Μόνιμο	100% τις πρώτες 14 ημέρες
Taxus Liberte	Πακλιταξέλη	Ανοξειδωτο ατσάλι	97	Μόνιμο	10% τις πρώτες 10 ημέρες
Xience Prime, Xience Xpedition	Εβερόλιμους	Κοβάλτιο- χρώμιο	81	Μόνιμο	80% τις πρώτες 30 ημέρες
Promus Element/ Promus Premier	Εβερόλιμους	Πλατίνα- χρώμιο	81	Μόνιμο	80% τις πρώτες 30 ημέρες
Resolute	Ζοταρόλιμους	Κοβάλτιο- χρώμιο	91	Μόνιμο	85% τις πρώτες 60 ημέρες
Resolut Onyx	Ζοταρόλιμους	Κοβάλτιο- νικέλιο- πλατίνα	81	Μόνιμο	85% τις πρώτες 60 ημέρες
3^η γενιάς στεντ					
Synergy XD	Εβερόλιμους	Πλατίνα- χρώμιο	74-81	4 μήνες	~ 90 ημέρες
Osiro Mission	Σιρόλιμους	κοβαλτίου- χρωμίου	60-80	12 έως 15 μήνες	-

Biomatrix Alpha	Ημι-συνθετικό ανάλογο του σιρόλιμους	κοβαλτίου – χρωμίου	83	6 μήνες	-
Ultimaster	Σιρόλιμους	κοβαλτίου-χρωμίου	80	3 έως 4 μηνών	-
Nagomi		χρωμίου			
Coroflex Isar Neo	Σιρόλιμους	κοβαλτίου-χρωμίου	55-65	Άνευ	-
Biofreedom Ultra	Άνευ	κοβαλτίου-χρωμίου	84-88	Άνευ	100% τις πρώτες 28 ημέρες
Βιοαπορροφήσιμο πλέγμα («4^{ης} γενιάς»)					
Absorb	Εβερόλιμους	PLLA	157	> 24 μήνες	-
Absorb GT1	Εβερόλιμους	PLLA	157	> 24 μήνες	-
DESolve 100	Νοβόλιμους	PLLA	100	24 μήνες	-
MeRes	Σιρόλιμους	PLLA	100	24-36 μήνες	100% τις πρώτες 90 ημέρες
Magmaris	Σιρόλιμους	Μαγνήσιο	150	12 μήνες	100% τις πρώτες 90 ημέρες
Fantom/Fantom	Σιρόλιμους	Τυροσίνη-	125-	~ 24 μήνες	-
Encore		παράγωγο πολυκαρβονικό	150		

PLLA: poly-L-lactic acid

2.3 Μπαλόνι με αποδέσμευση φαρμάκου (DCB)

Το μπαλόνι με αποδέσμευση φαρμάκου (drug-coated balloon, DCB) επιτρέπει την τοπική χορήγηση του αντιπολλαπλασιαστικού φαρμάκου απευθείας στο τοίχωμα του αγγείου, προσφέροντας την δυνατότητα αποφυγής τοποθέτησης προσθετικών υλικών, ενώ παράλληλα επιτυγχάνεται η τοπική χορήγηση φαρμάκου (80). Ως αποτέλεσμα μειώνεται ο κίνδυνος φλεγμονώδους αντίδρασης του αγγειακού

τοιχώματος, πολλαπλασιασμού και αγγειακής αναδιαμόρφωσης και συνεπώς μειώνεται ο κίνδυνος επαναστένωσης και θρόμβωσης του stent, διεργασίες που αποτελούν τα δύο σημαντικότερα μειονεκτήματα των stent (81). Επιπλέον, η απουσία προσθετικών υλικών επιτρέπει μικρότερη διάρκεια χορήγησης διπλής αντιαιμοπεταλιακής αγωγής, το οποίο καθιστά τη χρήση τους ιδανική σε ασθενείς πολύ υψηλού αιμορραγικού κινδύνου (82).

Το πρώτο φάρμακο που χρησιμοποιήθηκε στα DCBs ήταν η πακλιταξέλη. Η πακλιταξέλη λόγω της μεγάλης λιποφιλικής της ιδιότητας εξασφαλίζει την γρήγορη κυτταρική πρόσληψη και την ομοιόμορφη κατανομή του φαρμάκου στο τοίχωμα του αγγείου, επιτρέποντας μία παρατεταμένη επίδραση στα λεία μυϊκά κύτταρα. Η μεταφορά του φαρμάκου στο αγγειακό τοίχωμα γίνεται μέσω χρήσης ημι-διατατικού τύπου μπαλονιού (83). Πρόσφατα, αναπτύχθηκαν DCBs που περιέχουν σιρόλιμους ως φάρμακο αποδέσμευσης. Το σιρόλιμους είναι λιγότερο λιποφίλικό φάρμακο καθιστώντας δύσκολη την ταχεία αποδέσμευση και απορρόφησή του από το αγγειακό τοίχωμα. Για να αντιμετωπιστεί το πρόβλημα αυτό αναπτύχθηκαν διάφορες τεχνολογίες, όπως η χρήση και μεταφορά του φαρμάκου από νανομεταφορείς, η χρήση μικροσφαιρών από βιοδιασπώμενα πολυμερή αναμεμειγμένες με σιρόλιμους, οι οποίες επιτρέπουν ελεγχόμενη και παρατεταμένη αποδέσμευση του φαρμάκου και η χρήση μικροπορώδους μπαλονιού διαστάσεων 4μm, οι οποίοι απελευθερώνουν νανοσωματίδια σιρόλιμους και επιτρέπουν καλύτερη διείσδυση στον ιστό (84).

Η χρήση των CDBs στην παρούσα φάση έχει ένδειξη στη θεραπεία επαναστένωσης εντός του stent μετά από αγγειοπλαστική είτε με BMS είτε με DES και στην θεραπεία de novo νόσου μικρών αγγείων (85,86). Ωστόσο, νεότερα

δεδομένα έχουν ήδη δείξει ότι πιθανώς αποτελεί μία υποσχόμενη εναλλακτική την αντιμετώπιση de novo βλαβών μεγαλύτερων τμημάτων των στεφανιαίων αγγείων (87).

3. Θρόμβωση των προθέσεων

Η θρόμβωση του stent μαζί με την επαναστένωση αποτελούν τις δύο βασικότερες επιπλοκές της χρήσης τους. Παρά την μεγάλη μείωση στην εμφάνισή τους με τη χρήση προθέσεων νεότερης γενιάς σε σχέση με τις πρώτες αγγειοπλαστικές, η εμφάνισή τους παραμένει σε ποσοστό $< 1\%$ το πρώτο έτος και 0.2-0.4% ανά έτος όσον αφορά τη θρόμβωση και 10% όσο αφορά την επαναστένωση (88). Η θρόμβωση του stent αποτελεί ιδιαίτερα σοβαρή επιπλοκή καθώς εμφανίζεται ως έμφραγμα του μυοκαρδίου με ανάσπαση ST και έχει θνητότητα 20-40% (89).

Η θρόμβωση του stent χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη πρόσφατου θρόμβου σε τμήμα αγγείου που έχει προηγουμένως τοποθετηθεί η πρόθεση είτε ως αγγειογραφικό εύρημα είτε ως εύρημα στη νεκροτομή. Ιστολογικά ο θρόμβος είναι πλούσιος σε αιμοπετάλια και τμήματα ινώδους, ενώ παράλληλα παρουσιάζει φλεγμονώδη στοιχεία, όπως ουδετερόφιλα και ηωσινόφιλα (90). Κλινικά ταξινομείται ανάλογα με τον χρόνο εμφάνισης. Η *οξεία θρόμβωση* προκύπτει μεταξύ 0 και 24 ωρών μετά από την αγγειοπλαστική. Η *υποξεία θρόμβωση* εμφανίζεται μεταξύ 24 ωρών και 30 ημέρων μετά την αγγειοπλαστική. Η *όψιμη θρόμβωση* εμφανίζεται μεταξύ 31 ημερών και 1 έτος μετά την αγγειοπλαστική. Τέλος, η *πολύ όψιμη θρόμβωση* εμφανίζεται μετά το 1ο έτος από την αγγειοπλαστική. Η πρώιμη

θρόμβωση συναντάται πολύ συχνότερα σε σχέση με την όψιμη θρόμβωση, με ποσοστό εμφάνισης ~ 50-70% όλων των περιπτώσεων (91).

Οι παράγοντες κινδύνου που σχετίζονται με την θρόμβωση του stent μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε παράγοντες που σχετίζονται με τον ασθενή, με την επέμβαση και με το stent που χρησιμοποιήθηκε. Στην πρώιμη θρόμβωση, βασικότερο ρόλο παίζουν οι περιεπεμβατικοί παράγοντες, όπως η υποέκπτυξη του stent, η ύπαρξη διαχωρισμού, η επηρεασμένη TIMI ροή, η υπολειπόμενη στένωση εγγύς ή άπω του stent και η πολυπλοκότητα της αγγειοπλαστικής ιδιαίτερα σε έδαφος οξέος στεφανιαίου συνδρόμου (92,93). Προδιαθεσικοί παράγοντες που σχετίζονται με τον ασθενή επίσης διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση πρώιμης θρόμβωσης, όπως το μειωμένο κλάσμα εξώθησης, η πρώιμη διακοπή των αντιαιμοπεταλιακών φαρμάκων τις πρώτες 30 ημέρες καθώς και η αντίσταση στους ADP- ανταγωνιστές λόγω γενετικών πολυμορφισμών (94,95). Παράγοντες που σχετίζονται με την συσκευή του stent έχει φανεί να έχουν μικρότερο ρόλο στην πρώιμη θρόμβωση, με μικρή υπεροχή των DES έναντι των BMS (96). Αντίθετα, στην όψιμη θρόμβωση, σημαντικότερο ρόλο έχουν οι παράγοντες που σχετίζονται με τον τύπο του stent. Τα πρώτης γενιάς DES φάνηκε ότι εμφάνιζαν υψηλότερα ποσοστά θρόμβωσης σε σχέση με τα νεότερα stent (97). Η μετάβαση από τα DES πακλιταξέλης στα DES με εβερόλιμους μείωσε τη θρόμβωση του στεντ στους 12 μήνες από 3% σε 0,7% (98). Ιστοπαθολογικά ευρήματα έδειξαν ελλιπή ενδοθηλιοποίηση του stent, εμμένουσα εναπόθεση ινικής και παρατεταμένη φλεγμονή του αγγειακού τοιχώματος, τα οποία σχετίζονταν κυρίως με την αντίδραση του αγγειακού τοιχώματος στο ανθεκτικό πολυμερές, ευρήματα που προδιαθέτουν σε θρόμβωση, επαναστένωση, αγγειοκινητική δυσλειτουργία και νέο-αθηροσκλήρωση εντός του

stent (99). Τα DES νεότερης γενιάς εμφανίζουν βελτίωση των παραπάνω προβλημάτων με την εισαγωγή λεπτότερων δοκίδων στο πλέγμα κατασκευής, περισσότερο βιοσυμβατών υλικών στα πολυμερή και χαμηλότερες δόσεις στα φάρμακα αποδέσμευσης (100). Μικρότερο, αλλά ωστόσο σημαντικό ρόλο στην όψιμη θρόμβωση έχουν τεχνικά χαρακτηριστικά που σχετίζονται με την επέμβαση, όπως η υποέκπτυξη, το μικρό μέγεθος της πρόθεσης και η μη σωστή τοποθέτηση του stent κατά την επέμβαση (101). Τέλος, παράγοντες που σχετίζονται με τον ασθενή, όπως το μειωμένο κλάσμα εξώθησης και ο σακχαρώδης διαβήτης αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης όψιμης θρόμβωσης του stent (102).

Το βασικό στοιχείο για την πρόληψη της θρόμβωσης του stent είναι η χορήγηση διπλής αντιαιμοπεταλιακής αγωγής μετά την αγγειοπλαστική και συγκεκριμένα ο συνδυασμός ασπιρίνης και αναστολέα P2Y₁₂. Η διάρκειά της κυμαίνεται στους 6 μήνες για τα χρόνια στεφανιαία σύνδρομα και στους 12 μήνες για τα οξέα στεφανιαία σύνδρομα με απαραίτητη τη συνέχιση της μονής αντιαιμοπεταλικής αγωγής εφ' ορού ζωής. Ωστόσο, είναι απαραίτητη η εξατομικευμένη προσέγγιση κάθε ασθενούς, σταθμίζοντας τον υπολειπόμενο ισχαιμικό και αιμορραγικό κίνδυνο. Σε ασθενείς με αυξημένο ισχαιμικό κίνδυνο, όπως σύμπλοκες αγγειοπλαστικές, υποτροπιάζοντα ισχαιμικά συμβάντα, πολλαπλούς παράγοντες κινδύνου κ.α, μπορεί να εξεταστεί η παράταση της διπλής αντιαιμοπεταλιακής αγωγής, ενώ αντίθετα σε ασθενείς με αυξημένο αιμορραγικό κίνδυνο είναι εφικτή η μείωση της διάρκειας μέχρι 1 έως 3 μήνες (103).

4. Επαναστένωση

Επαναστένωση ορίζεται η μείωση της διαμέτρου του αυλού του αγγείου μετά από αγγειοπλαστική. Το φαινόμενο της επαναστένωσης παρατηρήθηκε ήδη από την πραγματοποίηση των πρώτων αγγειοπλαστικών μόνο με μπαλόνι σε ποσοστό 32-55%. Η ακόλουθη χρήση των ενδοστεφανιαίων προθέσεων στα μέσα της δεκαετίας του 1990 μείωσε σημαντικά το ποσοστό επαναστένωσης μετά από αγγειοπλαστική, εισάγοντας ωστόσο μία νέα οντότητα, την επαναστένωση εντός του stent. Παρά την εξέλιξη των ενδοστεφανιαίων προθέσεων τις τελευταίες δεκαετίες, η επιπλοκή της επαναστένωσης παραμένει μία από τις συχνότερες και σημαντικότερες επιπλοκές, οδηγώντας σε νέα επέμβαση στην βλάβη-στόχο μετά από αγγειοπλαστική. Αγγειογραφικά, η επαναστένωση ορίζεται ως στένωση μεγαλύτερη από 50% εντός ή εκατέρωθεν της περιοχής τοποθέτησης του stent. Ο κλινικός φαινότυπος της επαναστένωσης είναι η εκδήλωση ισχαιμίας, η οποία σχετίζεται με αυξημένη θνητότητα (104). Μετά την χρήση των BMS, το ποσοστό επαναστένωσης μειώθηκε στο 17-41% (105), ενώ η χρήση των DES είχε ως αποτέλεσμα την περαιτέρω μείωση σε ποσοστό ως και κάτω από 10% σε κάποιες βλάβες (106).

4.1 Μηχανισμοί και παράγοντες επαναστένωσης

Η επούλωση του αρτηριακού τοιχώματος μετά από αγγειακή βλάβη λόγω αγγειοπλαστικής γίνεται κυρίως μέσω δύο βασικών μηχανισμών: την ενδοθηλιακή υπερπλασία και την αναδιαμόρφωση του αγγείου (107). Η ενδοθηλιακή υπερπλασία περιλαμβάνει πολύπλοκες διεργασίες, όπως η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, φλεγμονώδη διήθηση των κυττάρων, απελευθέρωση αυξητικών παραγόντων,

πολλαπλασιασμό και μετανάστευση λείων μυϊκών κυττάρων, εναπόθεση προτεογλυκανών και αναδιαμόρφωση του εξωκυττάριου στρώματος (108,109). Συγκεκριμένα, κατά την έκπτυξη της πρόθεσης προκαλείται ενδοθηλιακός τραυματισμός που πυροδοτεί έναν καταρράκτη διεργασιών. Αρχικά γίνεται ενεργοποίηση του ενδοθηλίου και παραγωγή νιτρικού οξέος. Τα αιμοπετάλια που έρχονται σε επαφή με το ενεργοποιημένο ενδοθήλιο απελευθερώνουν θρομβοξάνη A₂, ενώ η δέσμευση του συμπλέγματος GPIIb/IIIa με το ινωδογόνο οδηγεί στη συσσώρευση και ενεργοποίηση τους, με τελικό αποτέλεσμα τον σχηματισμό θρόμβου (110). Παράλληλα, κυκλοφορούντα λευκοκύτταρα συνδέονται με τα αιμοπετάλια μέσω μορίων προσκόλλησης και στη συνέχεια μεταναστεύουν στην έσω και μέση στιβάδα του αρτηριακού τοιχώματος στο σημείο της βλάβης μέσω κυττοκινών, οι οποίες απελευθερώνονται από τα λεία μυϊκά κύτταρα και τα ίδια τα λευκοκύτταρα. Τέλος, το σύμπλοκο των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων, των λευκοκυττάρων και των λείων μυϊκών κυττάρων απελευθερώνουν αυξητικούς παράγοντες, όπως τον αυξητικό παράγοντα προερχόμενο από τα αιμοπετάλια (PDGF), οι οποίοι επάγουν την φαινοτυπική εναλλαγή των λείων μυϊκών κυττάρων από τον συσταλτικό τύπο στον συνθετικό, γεγονός που όπως είδαμε παραπάνω προάγει την ενδοθηλιακή υπερπλασία (111). Επιπλέον, τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια απελευθερώνουν ιντερλευκίνη 1, η οποία με τη σειρά της επάγει την παραγωγή ιντερλευκίνης 6 και 8 ασκώντας περαιτέρω προ-φλεγμονώδη δράση, καθώς προάγουν την μετανάστευση των λείων μυϊκών κυττάρων μέσω ενεργοποίησης του πολυμερισμού της ακτίνης και έναρξη της τυροσίνης σε επίπεδο κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών.

Η αγγειακή αναδιαμόρφωση αναφέρεται στην αλλαγή των διαστάσεων του αγγείου, είτε την αύξηση είτε τη μείωση της διαμέτρου του και χαρακτηρίζεται από την σύνθεση κολλαγόνου (112). Η παρουσία του μεταλλικού πλέγματος των προθέσεων οδήγησε σε σημαντική μείωση της αρνητικής αναδιαμόρφωσης του αγγείου σε σχέση με την αγγειοπλαστική με μπαλόνι, χωρίς ωστόσο να επιλύσει το πρόβλημα της ενδοθηλιακής υπερπλασίας (107). Αν και η μετέπειτα εξέλιξη των DES συνέβαλε στην μείωση της ενδοθηλιακής υπερπλασίας, η παρουσία του πολυμερούς και του φαρμάκου των DES συνέχισαν να έχουν ως αποτέλεσμα την πρόκληση αντίδρασης υπερευαισθησίας, τοπική φλεγμονώδη αντίδραση και καθυστερημένη επούλωση (113).

Στην επαναστένωση προκαλούμενη από BMS, ο νέο-ενδοθηλιακός ιστός χαρακτηρίζεται κυρίως από την διάχυτη παρουσία λείων μυϊκών κυττάρων και εξωκυττάρου στρώματος, με μέγιστο χρόνο εμφάνισης περίπου στους 6 μήνες μετά την αγγειοπλαστική (105). Αντίθετα, η επαναστένωση των DES, χαρακτηρίζεται από καθυστερημένο ενδοθηλιακό πολλαπλασιασμό που μπορεί να διαρκέσει μέχρι και έτη. Επιπλέον, η επαναστένωση από DES έχει περισσότερο εστιακό χαρακτήρα, επηρεάζοντας κυρίως τις άκρες του stent, όπως έχει αποδειχθεί σε εικόνες οπτικής ενδοστεφανιαίας τομογραφίας (114).

Οι παράγοντες που ευνοούν την επαναστένωση μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε βιολογικούς, μηχανικούς, τεχνικούς και κλινικούς παράγοντες (115).

Βιολογικοί παράγοντες

A) αντίσταση στο αντιπολλαπλασιαστικό φάρμακο. Σχετίζεται με ειδικές καταστάσεις σχετιζόμενες με τον ασθενή, όπως για παράδειγμα γενετικές μεταλλάξεις στον mTOR ή στο FKBP12 που εμποδίζουν τη σύνδεση της ραπαμυσίνης με τον mTOR (116,117).

Β) αντιδράσεις υπερευαισθησίας. Σχετίζονται με αντιδράσεις στα υλικά των προθέσεων, καθώς τα επιμέρους υλικά τους είναι πιθανό να πυροδοτούν τοπικές αλλεργικές αντιδράσεις (118). Συχνότερη αντίδραση παρατηρείται στο πολυμερές (119).

Γ) μειωμένη διάχυση του φαρμάκου στη μέση στιβάδα. Σχετίζεται είτε με αυξημένα επίπεδα ενδοθηλιακής υπερπλασίας είτε με πολλαπλές στρώσεις προθέσεων, με αποτέλεσμα την μειωμένη αποτελεσματικότητα του φαρμάκου (120).

Δ) παρουσία αθηρωματικής πλάκας. Βλάβες πλούσιες σε λιπίδια ευνοούν την ανάπτυξη ενδοθηλιακής υπερπλασίας σε σχέση με τις ασβεστοποιημένες βλάβες (135).

Ε) νέο-αθηροσκλήρωση. Χαρακτηρίζεται από παρουσία αφρωδών μακροφάγων μέσα στο νέο-ενδοθήλιο, με ή χωρίς νεκρωτικό πυρήνα και ασβέστιο (122). Σχετίζεται με ενδοθηλιακή δυσλειτουργία λόγω των μη-επικαλυμμένων πλέον δοκίδων και της καθυστερημένης επούλωσης λόγω της παρουσίας του φαρμάκου (123), ενώ ταυτόχρονα αυξάνεται η συγκέντρωση των λιποπρωτεϊνών υπο-ενδοθηλιακά λόγω αυξημένης διαπερατότητας του αγγείου (124). Εμφανίζεται σε πολύ μικρότερο διάστημα σε σχέση με την αθηροσκλήρωση η οποία αναπτύσσεται σε δεκαετίες (122).

Μηχανικοί παράγοντες

Α) υπο-έκπτυξη του stent κατά την διάρκεια της τοποθέτησης. Επαρκής έκπτυξη θεωρείται όταν το ελάχιστο εμβαδόν αυλού στο σημείο τοποθέτησης του stent είναι $> 5\text{mm}^2$ ή $>/- 90\%$ του εμβαδού αναφοράς του αγγείου (125).

Β) κακή τοποθέτηση του stent. Ορίζεται ως η μη επαφή του stent με το τοίχωμα του αγγείου, με αποτέλεσμα την ύπαρξη κενού χώρου μεταξύ των δύο, η οποία επιτρέπει

την ροή αίματος μεταξύ των δύο δομών και συνεπώς την προδιάθεση για δημιουργία θρόμβου. Συνήθως προκύπτει σε σημεία έντονων ελικώσεων του αγγείου, σύμπλοκων ασύμμετρων βλαβών ή τοποθέτηση μικρότερων από τη διάμετρο του αγγείου stent (126).

Γ) ρήξη/μηχανικός τραυματισμός του stent. Σχετίζεται με το μήκος του stent, τη διάμετρο του μπαλονιού και του stent, τον αριθμό των εμφυτευμένων stent, την αλληλοεπικάλυψη των stent και την υπολειπόμενη στένωση μετά την τοποθέτηση του stent (127)

Δ) σύμπλοκες αγγειοπλαστικές. Σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο καταστροφής του πολυμερούς ή αποκόλλησης της επικάλυψης, με αποτέλεσμα τη μειωμένη διάχυση του φαρμάκου (128).

Ε) αιμοδυναμικοί παράγοντες. Η χαμηλή διατμητική τάση ευνοεί φαινοτυπικές αλλαγές στα ενδοθηλιακά κύτταρα, στον πολλαπλασιασμό και στη μετανάστευση των λείων μυϊκών κυττάρων στις περιοχές τοποθέτησης stent, δημιουργώντας με τον τρόπο αυτό ένα προ-αθηρωτικό περιβάλλον (129), που ευνοεί την ενδοθηλιακή υπερπλασία.

Τεχνικοί παράγοντες

Α) βαρότραυμα. Δημιουργείται λόγω πίεσης στο τοίχωμα του αγγείου σε περιοχές εκτός του stent, όπως για παράδειγμα σε περιπτώσεις όπου χρησιμοποιείται μεγαλύτερο μπαλόνι για την έκπτυξή του. Ο τραυματισμός του αγγείου που προκαλείται οδηγεί σε αυξημένο πολλαπλασιασμό στις άκρες του stent (130).

Β) κενό ανάμεσα στα stent. Σχετίζεται με μη βέλτιστη διάχυση του φαρμάκου στο τοίχωμα του αγγείου, με αποτέλεσμα την αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης επαναστένωσης στο κενό αυτό σημείο (131).

Κλινικοί παράγοντες

A) χρόνια νεφρική νόσος

B) προχωρημένη ηλικία

Γ) ανδρικό φύλο

Δ) κλασικοί παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου (υπέρταση, δυσλιπιδαιμία, διαβήτης, παχυσαρκία, κάπνισμα)

Η συνύπαρξη φλεγμονώδους αντίδρασης επαγόμενη από την παρουσία ξένου σώματος σε συνδυασμό με την αντι-φλεγμονώδη δράση του φαρμάκου απελευθέρωσης προάγουν μία επιβράδυνση της διαδικασίας της νεο-ενδοθηλιοποίησης. Μόρια προσκόλλησης, όπως η P-σελεκτίνη, προσελκύουν μονοκύτταρα και κυττοκίνες, τα οποία με τη σειρά τους προάγουν την διήθηση ουδετερόφιλων, μονοκυττάρων και μακροφάγων στην έσω στιβάδα του τοιχώματος (132). Ο Li και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι αυξημένα επίπεδα μονοκυττάρων και ηωσινόφιλων τρεις μήνες μετά από αγγειοπλαστική αποτελούν ισχυρό πρώιμο προγνωστικό δείκτη επαναστένωσης (133).

4.2 Ο ρόλος της ενδοστεφανιαίας απεικόνισης

Η διάγνωση της επαναστένωσης εντός του stent επιβεβαιώνεται μέσω της στεφανιαίας αγγειογραφίας, η οποία ταυτόχρονα μπορεί να καθοδηγήσει και τον τρόπο αντιμετώπισης. Τεχνικές ενδοστεφανιαίας απεικόνισης, όπως ο ενδοστεφανιαίος υπέρηχος (intravascular ultrasound- IVUS) και η οπτική τομογραφία συνοχής (optical coherence tomography- OCT) αποτελούν ειδικότερες μεθόδους διάγνωσης, ενώ παράλληλα παρέχουν την δυνατότητα διάκρισης του μηχανισμού

δημιουργίας της επαναστένωσης, εάν πρόκειται δηλαδή για επαναστένωση οφειλόμενη σε βιολογικούς, μηχανικούς ή τεχνικούς παράγοντες (134).

Ο ενδοστεφανιαίος υπέρηχος επιτρέπει μία λεπτομερή απεικόνιση του stent καθώς και των διάφορων στρωμάτων του αγγείου στο σημείο τοποθέτησής του. Μπορεί να αποκλείσει μηχανικές αιτίες επαναστένωσης (πχ υπο-έκπτυξη ή ρήξη του stent) ενώ επίσης παρέχει πληροφορίες για την έκταση της ενδοθηλιακής υπερπλασίας (135). Η εκτίμηση της ελάχιστης επιφάνειας αυλού μετά την τοποθέτηση της πρόθεσης με τη χρήση IVUS έχει δείξει μικρότερα ποσοστά αγγειογραφικής και κλινικής επαναστένωσης, ενώ η αύξηση της ελάχιστης επιφάνειας αυλού κατά 1mm^2 έχει συσχετιστεί με μείωση της επαναστένωσης κατά 20% μετά από τοποθέτηση BMS (136).

Η οπτική τομογραφία συνοχής χρησιμοποιεί μία ακτίνα φωτός κοντά στο υπέρυθρο φάσμα, η ανάκλαση της οποίας από τις διάφορες δομές του αγγείου παρέχει πληροφορίες για το βάθος και τη δομή τους. Σε σύγκριση με το IVUS εμφανίζει υψηλότερη ανάλυση και επιτρέπει πιο λεπτομερή αξιολόγηση των δομών του αγγείου και της πρόθεσης, αλλά έχει μικρότερη διεισδυτική ικανότητα στους ιστούς (137). Ενδεικτικά, ευρήματα όπως ομογενείς, συνεχείς λωρίδες ιστού υποδηλώνουν ενδοθηλιακή υπερπλασία και είναι ενδεικτικά επαναστένωσης μετά από τοποθέτηση BMS, ενώ ανομοιογενής και σε στρώσεις εναπόθεση πρωτεογλυκάνης και ινικής, ρήξη του νέο-εσω χιτώνα, μικροαγγείωση, παρουσία λιπιδίων, συσσώρευση μακροφάγων και στοιχεία μη-αποφρακτικών θρόμβων χαρακτηρίζουν την παρουσία νέο-αθηροσκλήρωσης (138).

Παρόλο που η στεφανιογραφία παραμένει ο χρυσός κανόνας για την διάγνωση της επαναστένωσης, νεότερα δεδομένα υποστηρίζουν την χρήση της αξονικής

στεφανιογραφίας στη διάγνωσή της. Ο Elwany και οι συνεργάτες του συνέκριναν την αξονική στεφανιογραφία με την κλασική στεφανιογραφία σε συμπτωματικούς ασθενείς και έδειξαν ότι η αξονική στεφανιογραφία έχει αρνητική προγνωστική αξία 97.78%, ειδικότητα 96.65% και ευαισθησία 80%, υποστηρίζοντας έτσι τον ρόλο της στον αποκλεισμό της επαναστένωσης σε συμπτωματικούς ασθενείς (139). Επιπλέον, στην μετα-ανάλυσή του ο Sun έδειξε ευαισθησία και ειδικότητα 90% και 91% αντίστοιχα στην ανίχνευση επαναστένωσης με τη χρήση αξονικής στεφανιογραφίας, ενώ η θετική και αρνητική προγνωστική αξία ήταν αντίστοιχα 68% και 98% (140).

4.3 Αγγειογραφική ταξινόμηση της επαναστένωσης

Η αγγειογραφική ταξινόμηση της εντός stent επαναστένωσης περιεγράφηκε αρχικά από τους Mehran και συν, περιλαμβάνει τέσσερις τύπους επαναστένωσης και είναι ειδική για την επαναστένωση μετά από τοποθέτηση BMS. Τύπος 1: εστιακή, $\leq$ 10 χιλιοστά σε μήκος, Τύπος 2: διάχυτη, $>$ 10 χιλιοστά εντός του stent, Τύπος 3: πολλαπλασιαστική, $>$ 10 χιλιοστά με επέκταση εκτός των ορίων του stent, Τύπος 4: ολική απόφραξη με ροή TIMI 0 (141). Η ταξινόμηση αυτή ωστόσο έχει περιορισμένη εφαρμογή στην επαναστένωση μετά από τοποθέτηση DES. Επιπλέον, δεν περιγράφει τον μηχανισμό δημιουργίας της επαναστένωσης, ούτε υποδεικνύει τον κατάλληλο τρόπο αντιμετώπισης. Το κενό αυτό οδήγησε στην ανάγκη για δημιουργία μίας νέας ταξινόμησης, η οποία είναι πιο ειδική για την επαναστένωση από DES και παράλληλα υποδηλώνει το μηχανισμό πρόκλησης της επαναστένωσης καθώς και τον τρόπο αντιμετώπισης. Η ταξινόμηση Waksman περιλαμβάνει πέντε τύπους. Τύπος I: μηχανικής αιτιολογίας επαναστένωση (IA: υπο-έκπτυξη, IB: ρήξη stent), τύπος II:

βιολογικής αιτιολογίας επαναστένωση (IIA: ενδοθηλιακή υπερπλασία, IIB: νέο-αθηροσκλήρωση χωρίς ασβεστοποίηση, IIC: νέο-αθηροσκλήρωση με ασβεστοποίηση), τύπος III: μικτής αιτιολογίας επαναστένωση, τύπος IV: χρόνια ολική επαναστένωση, τύπος V: τοποθέτηση περισσότερων από δύο stent στην πρώτη αγγειοπλαστική (142).

4.4 Αντιμετώπιση επαναστένωσης

Φαρμακευτική αντιμετώπιση

Η συστηματική και μακροχρόνια χορήγηση ασπιρίνης και στατίνης είναι απαραίτητη στο πλαίσιο της δευτερογενούς πρόληψης της στεφανιαίας νόσου, χωρίς ωστόσο να αποτελεί ειδική θεραπεία για την αντιμετώπιση της επαναστένωσης. Μελέτες χορήγησης ειδικότερων θεραπειών, όπως abciximab, από του στόματος σιρόλιμους και κορτικοστεροειδή κολχικίνη, ή τοπική εφαρμογή πακλιταξελης, απέτυχαν να δείξουν αποτελεσματικότητα στην αντιμετώπιση της επαναστένωσης (143,144).

Αγγειοπλαστική με μπαλόνι

Η αγγειοπλαστική με μπαλόνι ήταν από τις πρώτες επεμβάσεις που εφαρμόστηκαν για την αντιμετώπιση τόσο της επαναστένωσης μετά από BMS όσο και μετά από DES. Συγκεκριμένα, η χρήση μπαλονιών υψηλής πίεσης, μέχρι και 40 atm, ήταν πιο αποτελεσματική σε επαναστένωση μηχανικής αιτιολογίας, όπως η υπο-έκπτυξη του στεντ (145). Ωστόσο, η χρήση τους παρουσίασε επιπλοκές που αφορούν τις άκρες του stent και ολίσθηση του μπαλονιού εκτός του stent, οδηγώντας σε

βαρότραυμα, καθώς και υψηλό ποσοστό επανεμφάνισης επαναστένωσης έως και 50% (146).

Μπαλόνι με λεπίδες και εγχοπές

Τα μπαλόνια της κατηγορίας αυτής, μέσω των λεπίδων και των εγχοπών που διαθέτουν επιτρέπουν μία διήθηση στον νέο-ενδοθηλιακό ιστό, προσδίδοντας περισσότερη σταθερότητα κατά την έκπτυξη του και συνεπώς μειώνουν το κίνδυνο ολίσθησης και βαροτραύματος. Ωστόσο, η RESCUT trial (Restenosis Cutting Balloon Evaluation Trial) δεν έδειξε κλινική και αγγειογραφική βελτίωση στους 7 μήνες παρακολούθησης σε σχέση με την χρήση απλού μπαλονιού (147). Αντίθετα, η ISAR-DESIRE IV trial (Intracoronary Stenting and Angiographic Results: Optimizing Treatment of Drug-Eluting Stent In-Stent Restenosis 4) έδειξε ότι σε επαναστένωση μετά από DES, η προ-διάταση της βλάβης με τα συγκεκριμένα μπαλόνια βελτίωσε το αγγειογραφικό αποτέλεσμα στους 6 μήνες όταν ακολούθησε αγγειοπλαστική με μπαλόνι αποδέσμευσης φαρμάκου, χωρίς ωστόσο να βελτιώσει το κλινικό αποτέλεσμα (148).

Μπαλόνι με αποδέσμευση φαρμάκου (Drug coated balloon- DCB)

Βασικό πλεονέκτημα της κατηγορίας των μπαλονιών αυτών είναι η δυνατότητα απελευθέρωσης φαρμάκου τοπικά κατά τη διάρκεια έκπτυξης του μπαλονιού και συνεπώς η αποφυγή τοποθέτησης ακόμα μία στρώσης μεταλλικού πλέγματος. Τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται είναι η πακλιταξέλη και το σιρόλιμους. Πληθώρα μελετών τις τελευταίες δύο δεκαετίες έχουν δείξει την αποτελεσματικότητας της χρήσης του στην αντιμετώπιση της επαναστένωσης μετά από τοποθέτηση τόσο BMS όσο και DES (149).

Επανατοποθέτηση DES

Η επανατοποθέτηση DES για την αντιμετώπιση της επαναστένωσης τόσο μετά από DES και ιδιαίτερα μετά από BMS έχει δείξει στατιστικά σημαντική μείωση στο ποσοστό επαναστένωσης, στη μείωση νέο-ενδοθηλιακού πολλαπλασιασμού μετά από έλεγχο με IVUS καθώς και στη βελτίωση κλινικού αποτελέσματος σε σύγκριση με αγγειοπλαστική με απλό μπαλόνι (18,150). Όσον αφορά την τοποθέτηση σε προϋπάρχουν DES, η επιλογή stent διαφορετικού φαρμάκου αποδέσμευσης έχει χρησιμοποιηθεί καθώς μπορεί να μειώνει την πιθανότητα αντίστασης το φάρμακο (18,161).

Stent με βιοδιασπώμενα μεταλλικά πλέγματα

Η χρήση βιοαπορροφούμενου stent προσφέρει το ευεργετικό αποτέλεσμα της διάχυσης του φαρμάκου στο σημείο της βλάβης, χωρίς ωστόσο να επιβαρύνει το σημείο επαναστένωσης με ακόμα μία στρώση από υλικά. Τα κλινικά και αγγειογραφικά αποτελέσματα μετά από αγγειοπλαστική με βιοδιασπώμενο stent ήταν παρόμοια με αυτά μετά από αγγειοπλαστική με μπαλόνι, ενώ ήταν κατώτερα σε σύγκριση με τοποθέτηση DES (152). Παρόλο που τα χαρακτηριστικά αυτά το καθιστούν μία πολύτιμη εναλλακτική, η ευρεία χρήση τους στην καθημερινή πράξη δεν εφαρμόζεται.

Αθηρεκτομή και λέιζερ

Η περιστροφική αθηρεκτομή και το λέιζερ αποτελούν δύο μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν για τη μείωση του μεγέθους της αθηρωματικής βλάβης. Η περιστροφική αθηρεκτομή είναι ιδιαίτερα χρήσιμη σε περιπτώσεις έντονης ασβεστοποιημένης νέο-αθηροσκλήρωσης ή υπο-εκπτυγμένου stent που δεν βελτιώνεται μετά από διάταση με μπαλόνι με υψηλές πιέσεις. Το λέιζερ αποτελεί μία τεχνολογία που χρησιμοποιεί υπεριώδες φως υψηλής ενέργειας, το οποίο παράγει

θερμότητα και κρουστικά κύματα που διασπούν την πλάκα. Οι μέθοδοι αυτές δεν αποτελούν μέθοδο ρουτίνας, αλλά εξατομικευμένες θεραπείες σε περιπτώσεις έντονης ασβέστωσης (138).

Αγγειακή βραχυθεραπεία

Η βραχυθεραπεία χρησιμοποιεί ακτινοβολία ραδιενεργού στρόντιου-90-β, το οποίο αναστέλλει τον σχηματισμό νέο-ενδοθηλιοποίησης. Τυχαιοποιημένες κλινικές μελέτες έδειξαν υπεροχή της βραχυθεραπείας συγκριτικά με την αγγειοπλαστική με μπαλόνι και τις τεχνικές αθηροσκληρώσης (153). Αντίθετα, η μέθοδος αυτή δεν παρουσίασε υπεροχή στην αντιμετώπιση της επαναστένωσης από BMS (154), γεγονός που οδήγησε στην εγκατάλειψη της μεθόδου ως αντιμετώπιση επαναστένωσης από BMS. Αντίθετα, συνεχίζει να αποτελεί πιθανή μέθοδο αντιμετώπισης στένωσης από DES, ιδιαίτερα σε βλάβες στις οποίες ήδη προϋπάρχουν πολλαπλές στρώσεις stent (155).

Συμπερασματικά, παρά τις διάφορες μεθόδους αντιμετώπισης, η επαναστένωση παραμένει μία δύσκολη οντότητα στην αντιμετώπισή της, ενώ δεν έχει καθοριστεί ακόμα με σαφήνεια ο αποτελεσματικότερος τρόπος αντιμετώπισης. Δύο μεγάλες μετα-αναλύσεις έδειξαν σημαντική υπεροχή στη χρήση των DES και των DCB συγκρινόμενα με τις υπόλοιπες μεθόδους, καθώς εμφάνισαν καλύτερα αγγειογραφικά και κλινικά αποτελέσματα (156), χωρίς να υπάρχει σημαντική διαφοροποίηση στην κλινική αποτελεσματικότητα και ασφάλεια μεταξύ των δύο μεθόδων αυτών (157). Σύμφωνα με τις Ευρωπαϊκές Κατευθυντήριες οδηγίες, η χρήση τους στην επαναστένωση αποτελεί ένδειξη τάξης Ι (16).

5. Αθηροσκλήρωση

Η δημιουργία της αθηροσκληρωτικής πλάκας χαρακτηρίζεται από τρεις βασικές διεργασίες. Απαιτεί τη συσσώρευση λιπιδίων στο αρτηριακό τοίχωμα, την διήθηση ανοσοκυττάρων στον έσω χιτώνα του αρτηριακού τοιχώματος, όπως Τ κύτταρα και σιτευτικά κύτταρα, και την δημιουργία μίας ινώδους κάψας από λεία μυϊκά κύτταρα πλούσια σε κολλαγόνο (158).

Πληθώρα κλινικών και πειραματικών μελετών έχουν αποδείξει την βλαπτική επίδραση των υψηλών συγκεντρώσεων χοληστερόλης στο αίμα, οι οποίες προάγουν την εμφάνιση της αθηροσκληρωτικής καρδιαγγειακής νόσου. Συγκεκριμένα, η χοληστερόλη κυκλοφορεί στο αίμα ως μόριο LDL. Το μόριο LDL αποτελείται από εστεροποιημένη χοληστερόλη και τριγλυκερίδια, τα οποία περιβάλλονται από μία φωσφολιπιδική κάψα και από απολιποπρωτεΐνη B100 (ApoB100). Η διαδικασία της αθηρογένεσης ξεκινάει με την συσσώρευση των κυκλοφορούντων σωματιδίων LDL στον έσω χιτώνα και την σύνδεση της ApoB100 με πρωτεογλυκάνες του εξωκυττάριου στρώματος. Στη συνέχεια τα σωματίδια LDL υπόκεινται σε οξειδωτικές αλλαγές είτε μέσω της ενζυματικής δράσης της μυελοπεροξειδάσης και της λιποξυγενάσης είτε μέσω της δράσης παραγόντων παραγόμενων στον έσω χιτώνα των αγγείων ως αντίδραση στην φλεγμονή και στην αθηροσκλήρωση, όπως αντιδραστικών ειδών οξυγόνου, ρίζες φαινοξυλίου ή υπεροξυνιτρώδους, με τελικό αποτέλεσμα τη δημιουργία οξειδωμένης LDL. Η παρουσία των λιπιδίων αυτών πυροδοτεί την παραγωγή μορίων προσκόλλησης και χημειοτακτικών κυτοκινών από ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα και μακροφάγα (159).

Παράλληλα, η επίδραση των βλαπτικών παραγόντων κινδύνου στο αγγειακό ενδοθήλιο επάγει την έκφραση μορίων προσκόλλησης, όπως η Ε-σελεκτίνη και το VCAM-1, τα οποία με τη σειρά τους προάγουν την προσκόλληση λευκοκυττάρων στην εσωτερική επιφάνεια του αρτηριακού τοιχώματος. Διαμέσου χημειοτακτικών κυτοκινών, προάγεται η μετανάστευση των λευκοκυττάρων, όπως μονοκύτταρα, δενδριτικά κύτταρα και Τ-κύτταρα, στο έσω τοίχωμα των αρτηριών. Τα μονοκύτταρα διεγείρονται από τα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα και διαφοροποιούνται σε μακροφάγα, διεργασία απαραίτητη για την δημιουργία της αθηρωματικής πλάκας. Τα διαφοροποιημένα μακροφάγα εκφράζουν στην επιφάνεια τους υποδοχείς συλλέκτες (scavenger receptors), οι οποίοι προάγουν την συσσώρευση των οξειδωμένων λιπιδίων στα μακροφάγα, με τελικό αποτέλεσμα την δημιουργία των αφρωδών κυττάρων και ενός νεκρωτικού πυρήνα. Η συσσώρευση αφρωδών κυττάρων αποτελεί το πρώτο στάδιο στην δημιουργία του αθηρώματος. Τα αφρώδη κύτταρα οδηγούν στην υπερέκφραση μεταλλοπρωτεϊνών, οι οποίες πυροδοτούν την αποσταθεροποίηση της ινώδους πλάκας, με αποτέλεσμα την κλινική εκδήλωση της στεφανιαίας νόσου (160).

Τέλος, καταλυτική είναι η παρουσία των λείων μυϊκών κυττάρων (ΛΜΚ), τόσο στα πρώιμα όσο και στα όψιμα στάδια στην διαδικασία της δημιουργίας της αθηρωματικής πλάκας. Στο φυσιολογικό αρτηριακό τοίχωμα τα λεία μυϊκά κύτταρα βρίσκονται στην μέση στιβάδα και είναι υπεύθυνα για την συσταλτικότητα και την ευενδοτότητα των αρτηριών ως απάντηση στα διάφορα αιμοδυναμικά ερεθίσματα. Τα λεία μυϊκά κύτταρα φυσιολογικά έχουν ατρακτοειδές σχήμα, εκφράζουν συσταλτικές πρωτεΐνες, όπως η α -smooth muscle actin (α SMA) και η smooth muscle myosin heavy chain (SMMHC) γνωστή και ως myosin 11 (MYH11) και εκκρίνουν

μακρομόρια εξωκυττάριου στρώματος, όπως η ελασίνη, το κολλαγόνο και πρωτεογλυκάνες (161). Παραδοσιακά, θεωρούσαμε ότι τα λεία μυϊκά κύτταρα μεταναστεύουν από τη μέση στην έσω στιβάδα, όπου υπόκειντο σε φαινοτυπικές αλλαγές και παράγουν ένα πλούσιο εξωκυττάριο στρώμα συμβάλλοντας έτσι στη δημιουργία μίας ινώδους κάψας, της οποίας κύριος ρόλος ήταν η σταθεροποίηση της αθηρωματικής πλάκας, παρέχοντας με τον τρόπο αυτό έναν προστατευτικό ρόλο. Ωστόσο, νεότερα πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι η θεωρία αυτή είναι αρκετά απλουστευμένη σχετικά με τον συνολικό ρόλο που παρέχουν τα λεία μυϊκά κύτταρα στην εξέλιξη και δημιουργία της αθηρωματικής πλάκας, κατέχοντας έναν πολυπλοκότερο και διττό ρόλο από τα πρώτα στάδια της αθηρογένεσης, διαμέσου της ικανότητας τους να διαφοροποιούνται σε διάφορους τύπους κυττάρων ως απάντηση στην ενδοθηλιακή βλάβη. Η ικανότητα αυτή είναι γνωστή ως φαινοτυπική ευπλαστότητα (phenotypical plasticity).

Η φαινοτυπική εναλλαγή (phenotype switching) ή από-διαφοροποίηση αποτελεί την μετατροπή των ΛΜΚ από τον συσταλτικό τύπο (contractile type) σε μία συνθετική κατάσταση (synthetic type), η οποία τους επιτρέπει να μετατρέπονται σε διάφορους φαινοτύπους. Η εναλλαγή από τον συσταλτικό στον συνθετικό τύπο χαρακτηρίζεται από την απώλεια έκφρασης των συσταλτικών πρωτεϊνών. Η φαινοτυπική εναλλαγή είναι μία αναστρέψιμη διαδικασία στα πρώτα στάδια της αθηροσκλήρωσης. Η αγγειακή βλάβη οδηγεί σε μία παροδική απώλεια των συσταλτικών πρωτεϊνών των ΛΜΚ και μετατροπή αυτών σε συνθετική κατάσταση, η οποία ακολουθείται από επανάκτηση των συσταλτικών πρωτεϊνών μετά την επιδιόρθωση του αγγείου (162). Έχουν αναγνωριστεί επτά διαφορετικοί τύποι με προέλευση από τα ΛΜΚ: 1) τύπου μακροφάγα, η μετατροπή επάγεται από την

συσσώρευση χοληστερίνης στα ΛΚΜ (163) και χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση δεικτών ειδικών των μακροφάγων, όπως LGALS3, CD68 (162) και προ-φλεγμονωδών κυτοκινών (MCP1) (164), 2) αφρώδη κύτταρα, η μετατροπή προκαλείται από την έκθεση των ΛΚΜ σε οξειδωμένη LDL χοληστερόλη στην έσω και μέση στιβάδα των αγγείων (165), 3) τύπου λιποκύτταρα, ομοίως η συσσώρευση λιπιδίων στα ΛΜΚ οδηγεί στην διαφοροποίηση τους σε τύπου λιποκύτταρα και χαρακτηρίζονται από την έκφραση αδιψίνης και λεπτίνης (166), χωρίς ωστόσο να είναι ακόμα ξεκάθαρος ο ρόλος τους στην διαδικασία της αθηροσκλήρωσης, 4) οστεοχονδροτικού τύπου, ως απάντηση στα υψηλά επίπεδα ασβεστίου και φωσφόρου, εμφανίζουν οστεοχονδροτικούς δείκτες, εναπόθεση ασβεστοποιημένου υποστρώματος και έκκριση ασβεστοποιημένων κυστιδίων (167), 5) τύπου μυοϊνοβλάστη, σε πειραματικά μοντέλα η απώλεια του μεταγραφικού παράγοντα TCF21 πυροδοτεί την διαφοροποίηση των ΛΚΜ στον τύπο αυτό στην ινώδη κάψα, υποδηλώνοντας πιθανώς ένα προστατευτικό ρόλο (168), 6) ενδοθηλιακού τύπου μέσω της σηματοδότησης Notch και εκφράζουν πλήρη χαρακτηριστικά ενδοθηλιακών κυττάρων, όπως το CD31 (169), 7) μεσεγχυματικού τύπου Sca 1⁺, ως απάντηση στην αγγειακή βλάβη και τα οποία *in vitro* μπορούν να διαφοροποιηθούν περαιτέρω σε κύτταρα τύπου μακροφάγα, ενδοθηλιακά, χονδροκύτταρα και λιποκύτταρα μέσω του KLF4 παράγοντα (170). Πρόσφατα, ο Pan et al. έδειξαν ότι τα ανθρώπινα ΛΜΚ σε ιστό καρωτίδας και στεφανιαίων αρτηριών μπορούν να διαφοροποιηθούν σε μία ενδιάμεση κατάσταση αρχικά ως απάντηση στους διάφορους αθηρογόνους παράγοντες, τα οποία ονομάζονται κύτταρα 'SEM'. Τα SEM κύτταρα στη συνέχεια μπορούν να διαφοροποιηθούν σε κύτταρα τύπου μακροφάγα και ινοχονδροκύτταρα ή να επανέλθουν στην αρχική τους μορφή (171).

5.1 Στάδια αθηροσκλήρωσης

Προ-αθηροσκλήρωση: Η προ-αθηροσκλήρωση χαρακτηρίζεται από την παρουσία διάχυτης πάχυνσης της έσω στιβάδας (diffuse intimal thickening – DIT), η οποία εμφανίζεται από τα πρώτα στάδια της ζωής και θεωρείται ότι αποτελεί τον πρόδρομο στη δημιουργία της αθηρωματικής πλάκας (172). Η διάχυτη πάχυνση της έσω στιβάδας χαρακτηρίζεται από την παρουσία ΛΜΚ, πρωτεογλυκάνης και ελαστίνης, ενώ χαρακτηριστική είναι η απουσία μακροφάγων και θρόμβου (173). Τα ΛΜΚ προέρχονται πιθανώς από την μέση στιβάδα (174), εμφανίζουν μεγάλη ετερογένεια σε σχέση με τα συστατικού τύπου ΛΚΜ και αποτελούν τη μεγαλύτερη πηγή εξωκυττάριου στρώματος, το οποίο ευθύνεται για την πάχυνση της έσω στιβάδας (175). Οι πρωτεογλυκάνες κατέχουν τον κυριότερο ρόλο στο στάδιο αυτό για την συσσώρευση μορίων απολιποπρωτεΐνης (124), ενώ τα συνθετικού τύπου ΛΜΚ ευνοούν την μετατροπή τους σε αφρώδη κύτταρα (176).

Πρώιμη αθηροσκλήρωση: Η διάχυτη πάχυνση της έσω στιβάδας είναι πιθανό να εξελιχθεί σε παθολογική πάχυνση της έσω στιβάδας (pathological intimal thickening), η οποία αποτελεί το πρώτο στάδιο της αθηροσκλήρωσης. Η παθολογική πάχυνση της έσω στιβάδας χαρακτηρίζεται από αφθονία αποδιαφοροποιημένων ΛΜΚ και εξωκυττάριου στρώματος, καθώς και από εξωκυττάρια συγκεντρώσεις λιπιδίων (177). Στο στάδιο αυτό, το εξωκυττάριο στρώμα, το οποίο παράγεται κυρίως από τα ΛΜΚ, παίζει καθοριστικό ρόλο στην προσέλκυση και απορρόφηση κυκλοφορούντων σωματιδίων χοληστερόλης, καθώς το αρνητικό φορτίο των πρωτεογλυκανών αλληλεπιδρά με το θετικό φορτίο των μορίων χοληστερόλης, οδηγώντας στην απορρόφηση των δεύτερων στην έσω στιβάδα (178). Οι

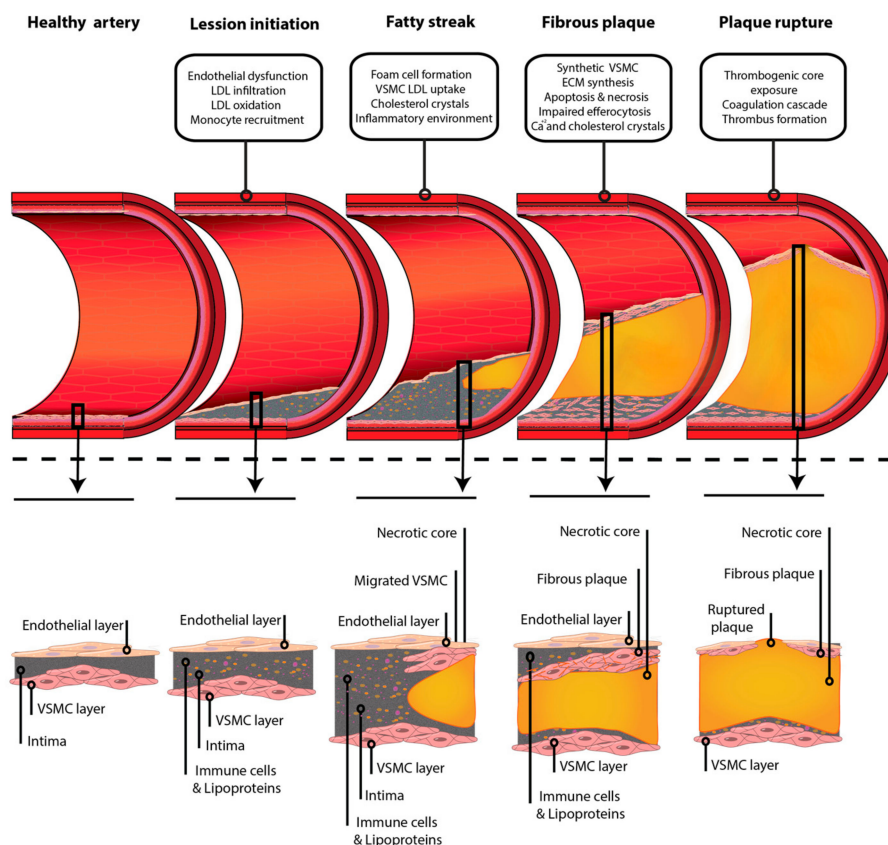
λιποπρωτεΐνες στην έσω στιβάδα υφίστανται ποικίλες μετατροπές. Η οξείδωση της LDL ενεργοποιεί μία φλεγμονώδη απάντηση και την προσέλκυση των μακροφάγων μέσω των μορίων προσκόλλησης (159).

Όψιμη αθηροσκλήρωση: Η όψιμη αθηροσκλήρωση είναι η μετάβαση της παθολογικής πάχυνσης της έσω στιβάδας στο αθήρωμα. Η δημιουργία του αθηρώματος εξαρτάται από τον βαθμό συγκέντρωσης μακροφάγων και την φαγοκυττάρωση των λιπιδίων της έσω στιβάδας από αυτά, με τελικό αποτέλεσμα τη δημιουργία των αφρώδων κυττάρων και του νεκρωτικού πυρήνα. Παράλληλα, τα ΛΜΚ μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα, τα οποία τελικά αποπίπτουν (179,180). Ως απάντηση στις διεργασίες αυτές δημιουργείται προστατευτική ινώδης κάψα, η οποία στα αρχικά στάδια χαρακτηρίζεται από πληθώρα διαφοροποιημένων ΛΜΚ, τα οποία προέρχονται τόσο από τη μέση στιβάδα όσο και από τα προϋπάρχοντα ΛΜΚ της έσω στιβάδας, καθώς και ένα εξωκυττάριο στρώμα πτωχό σε πρωτεογλυκάνες αλλά πλούσιο σε κολλαγόνο (181,182). Τέλος, στα πρώτα στάδια του αθηρώματος παρατηρείται η παρουσία ασβεστοποίησης με τη μορφή μεγάλων κοκκίων στον νεκρωτικό πυρήνα και στο εξωκυττάριο στρώμα (183). Με την εξέλιξη του αθηρώματος αυτές οι μικροασβεστώσεις μπορούν να εξελιχθούν σε οζίδια ασβεστίου, τα οποία μπορούν να διαπεράσουν το τοίχωμα του αγγείου και να πυροδοτήσουν θρόμβωση (172).

Κλινική εκδήλωση: Η κλινική εκδήλωση της αθηροσκλήρωσης είναι κυρίως το οξύ στεφανιαίο επεισόδιο και το αγγειακό εγκεφαλικό, ως αποτέλεσμα θρόμβωσης του αυλού των αγγείων. Όσο το αθήρωμα αναπτύσσεται, ο νεκρωτικός πυρήνας, η ασβεστοποίηση και η ελεύθερη χοληστερόλη αυξάνονται, ενώ ταυτόχρονα η ινώδης κάψα μειώνεται (184). Η αναδιαμόρφωση του εξωκυττάριου στρώματος μέσω

πρωτεασών που παράγονται κυρίως από τα μακροφάγα σε συνδυασμό με τον κυτταρικό θάνατο των ΛΜΚ οδηγούν στη λέπτυνση της ινώδους κάψας και την επέκταση του νεκρωτικού πυρήνα με τελικό αποτέλεσμα την πρόκληση θρόμβωσης (185). Η θρόμβωση προκαλείται στις περισσότερες περιπτώσεις (60-70%) από ρήξη της αθηρωματικής πλάκας, ακολουθεί σε συχνότητα εμφάνισης η διάβρωση της (186), ενώ σε ένα μικρό ποσοστό (5%) είναι πιθανό να δημιουργηθεί αποφρακτικός θρόμβος, ο οποίος αυτό-επουλώνεται (187) (Εικόνα 2).

Συμπερασματικά, τα ΛΜΚ κατέχουν έναν διττό ρόλο στη διαδικασία της αθηροσκλήρωσης, παρέχοντας τόσο έναν προστατευτικό ρόλο με την δημιουργία της ινώδους κάψας, αλλά συμβάλλοντας ταυτόχρονα στη πρόοδο της αθηρωμάτωσης μέσω της φαινοτυπικής εναλλαγής από τα πρώτα στάδια της αθηρογένεσης. Συγκεκριμένα, στα όψιμα στάδια της αθηροσκλήρωσης, τα ΛΜΚ αποτελούν το 30-40% των κυττάρων που εκφράζουν δείκτες μακροφάγων και το 50% των αφρωδών κυττάρων (165). Επομένως, τα ΛΜΚ θα μπορούσαν να αποτελέσουν έναν υποσχόμενο στόχο καινοτόμων θεραπειών για την πρόληψη και αντιμετώπιση της αθηροσκλήρωσης και των επιβλαβών συνεπειών της.



Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση της ανάπτυξης αθηρωματικής πλάκας από υγιές αρτηριακό τοίχωμα έως ρήξη. Ανατύπωση από Jebari-Benslaïman S., Galicia-García U., Larrea-Sebal A., Rekondo Olaetxea J., Alloza I., Vandenbroeck K., Benito-Vicente A., Martín C. (2022), “Pathophysiology of Atherosclerosis”, *International Journal of Molecular Sciences*, 23(6), 3346, υπό την άδεια CC BY 4.0.

6. Ρετινοϊκό οξύ

6.1 Εισαγωγή

Το ρετινοϊκό οξύ ανήκει στην χημική ομάδα των ρετινοϊδών και αποτελεί ενεργό μεταβολίτη της βιταμίνης Α. Τα ρετινοϊδή αποτελούν μία ομάδα φυσικών και συνθετικών στοιχείων. Στα φυσικά ρετινοϊδή συμπεριλαμβάνονται τα καροτενιοϊδή, η ρετινόλη, οι ρετινολικοί εστέρες, η ρετινάλη και το ρετινοϊκό οξύ. Η βιταμίνη Α, ή αλλιώς ρετινόλη, κατέχει σημαντικό ρόλο στην εμβρυογένεση, ενώ παράλληλα αποτελεί απαραίτητο στοιχείο στην διατροφή των ενηλίκων για την διατήρηση της

ομοιοστασίας του οργανισμού (188), καθώς διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε ποικίλες λειτουργίες του οργανισμού, όπως είναι η όραση, η ανοσοποίηση, η ανάπτυξη διάφορων ιστών κ.α. Η μοναδική πηγή βιταμίνης Α στον άνθρωπο είναι η πρόσληψη της από την τροφή, καθώς τα θηλαστικά δεν μπορούν να την συνθέσουν εξαρχής. Η πρόσληψη της γίνεται είτε ως προσχηματισμένη βιταμίνη (ρετινυλικοί εστέρες) από ζωικές τροφές, είτε από τα πρόδρομα καροτένια της βιταμίνης. Τροφές πλούσιες σε βιταμίνη Α είναι τα καρότα, τα αυγά, τα λαχανικά, τα γαλακτοκομικά προϊόντα, το συκώτι και το ιχθυέλαιο.

Η ομοιοστασία της ρετινόλης γίνεται μέσω διαφόρων πρωτεϊνών και ενζύμων, που ρυθμίζουν την απορρόφησή της από τα κύτταρα του εντέρου, ενώ στη συνέχεια εξασφαλίζουν την αποθήκευσή της κυρίως στα ηπατοκύτταρα και δευτερευόντως στα αστεροειδή κύτταρα του ήπατος (189). Κατά την κύηση, η κύρια πηγή ρετινόλης είναι η μητρική ρετινόλη, η παροχή της οποίας στο έμβρυο εξασφαλίζεται διαμέσου του πλακούντα (190). Κατά την εμβρυογένεση, η ρετινόλη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των άκρων και διαφόρων οργάνων.

Η κύρια δράση της βιταμίνης Α γίνεται μέσω του ενεργού μεταβολίτη της, του ρετινοϊκού οξέος (RA) και συγκεκριμένα του all-trans-RA (atRA). Το atRA συνδέεται και ενεργοποιεί μία υπερ-οικογένεια πυρηνικών υποδοχέων (RAR) με τελικό αποτέλεσμα την μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων (RAREs). Πειραματικά δεδομένα σε ποντίκια και ψάρια ζέβρα (zebrafish) έχουν δείξει ότι το ρετινοϊκό οξύ συμμετέχει κατά την πρώιμη εμβρυογένεση, στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση του πρόσθιου και οπίσθιου εγκεφάλου, του νωτιαίου μυελού, του νευρομεσοδέρματος, στην κεφαλοουριαία ανάπτυξη, καθώς στην ανάπτυξη διαφόρων οργάνων όπως της καρδιάς, των οφθαλμών, των πνευμόνων και του παγκρέατος, ενώ τέλος προάγει την

σπερματογένεση και την μείωση των ωαρίων κατά την ανάπτυξη των ωοθηκών (191). Έλλειψη βιταμίνης Α στις μητέρες κατά την κύηση οδηγεί σε ένα σύνθετο φάσμα ανωμαλιών, ενώ αντίθετα η αυξημένη χορήγηση βιταμίνης Α μπορεί να έχει τερατογόνο δράση (192). Στην ενήλικη ζωή η δράση του ρετινοϊκού οξέος παραμένει απαραίτητη σε διάφορους ιστούς και όργανα για την διατήρηση της λειτουργίας τους, όπως στην ομοιοστασία του επιθηλίου, στην σπερματογένεση καθώς και στη λειτουργία του εγκεφάλου και του ανοσοποιητικού συστήματος (193).

6.2 Μεταβολισμός ρετινοϊκού οξέος

Η κύρια δράση της βιταμίνης Α στην ανάπτυξη και εξέλιξη του οργανισμού επιτυγχάνεται από την ενεργοποίηση του ενεργού μεταβολίτη της, το ρετινοϊκό οξύ. Το ρετινοϊκό οξύ, με χημικό όνομα (2E,4E,6E,8E)-3,7-Dimethyl-9-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-en-1-yl)nona-2,4,6,8-tetraenoic acid, περιέχει πέντε διπλούς δεσμούς, οι οποίοι του επιτρέπουν να σχηματίζει διάφορα γεωμετρικά ισομερή και συγκεκριμένα ένα all-trans-RA (atRA) ισομερές και τέσσερα cis- ισομερή (Εικόνα 3). Από τα παραπάνω ισομερή βιολογικό ρόλο έχουν το atRA, τα 9-cis- και 13 cis- ισομερή, με κυριότερο ρόλο στην ανάπτυξη του οργανισμού να κατέχει το ισομερές all-trans-retinoic acid (194).

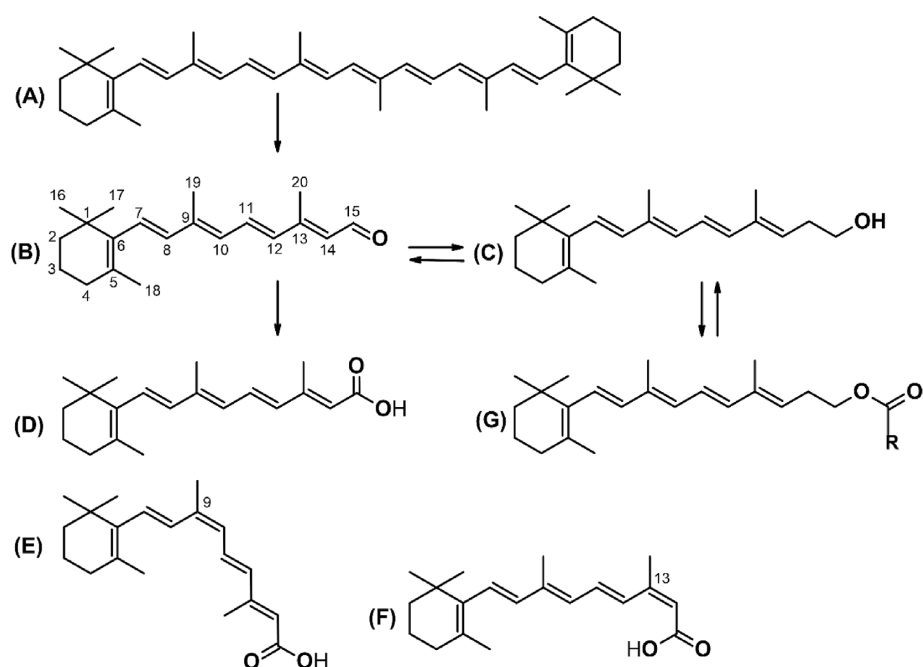
Τα ρετινοϊδή στον άνθρωπο προσλαμβάνονται από τις τροφές. Πλούσιες σε ρετινοϊδή είναι οι τροφές φυτικής προέλευσης, από τις οποίες μπορούν να προσληφθούν είτε σε απευθείας μορφή βιταμίνης Α, είτε ως προβιταμίνες Α, όπως το β-καροτένιο και στη συνέχεια να μετατραπούν σε ρετινόλη. Επιπλέον, πηγή πρόσληψης βιταμίνης Α αποτελούν και τροφές ζωικής προέλευσης, στις οποίες η

βιταμίνη Α υπάρχει με τη μορφή προσχηματισμένης ρετινόλης και εστέρα ρετινόλης (195). Η απορρόφηση της βιταμίνης Α γίνεται από τα κύτταρα του λεπτού εντέρου υπό μορφή εστέρα ρετινόλης, όπου υδρολύονται σε ρετινόλη. Στον εντερικό βλεννογόνο επαναστεροποιούνται σε εστέρες ρετινόλης και σχηματίζουν χυλομικρά, ώστε στη συνέχεια να απελευθερωθούν διαμέσου του θωρακικού πόρου στη συστηματική κυκλοφορία. Τα χυλομικρά που περιέχουν εστέρες ρετινόλης προσλαμβάνονται από τα ηπατοκύτταρα μέσω των υποδοχέων της απολιποπρωτεΐνης Ε, όπου υδρολύονται εκ νέου από την υδρολάση ρετινόλης (REH) σε ρετινόλη και σε αυτή τη μορφή αποθηκεύονται στο ήπαρ. Στο ήπαρ αποθηκεύεται το 50-80% της συνολικής ποσότητας ρετινόλης του οργανισμού (196).

Σε συνθήκες αναγκών, η ρετινόλη απελευθερώνεται στο πλάσμα όπου συνδέεται με την τρανσθυρετίνη (TTR) και την συνδετική πρωτεΐνη (RBP4), η οποία προάγει την είσοδο της ρετινόλης στα κύτταρα διαφόρων ιστών όπως των οφθαλμών, του δέρματος, του λιπώδους ιστού, των νεφρών, των όρχεων, των πνευμόνων και του μυελού των οστών, διαμέσου του υποδοχέα μεμβράνης της RBP (STRA6) (197). Ταυτόχρονα, οι εστέρες ρετινόλης των λιποπρωτεϊνών υδρολύονται από την υδρολάση ρετινοϊκού εστέρα (REH) σε ρετινόλη και εισέρχονται στα κύτταρα με μηχανισμούς που δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητοί (198). Σε ενδοκυττάριο επίπεδο η ρετινόλη συνδέεται με την συνδετική πρωτεΐνη (CRBP) με αποτέλεσμα είτε να αποθηκευτεί είτε να μεταβολιστεί περαιτέρω. Σε περιπτώσεις περίσσειας ρετινόλης, αυτή επαναστεροποιείται σε εστέρες ρετινόλης μέσω λιπαρών οξέων και αποθηκεύεται. Στην αντίθετη περίπτωση όπου υφίσταται περαιτέρω μεταβολισμό, η ρετινόλη οξειδώνεται από την δεϋδρογονάση ρετινόλης (RDH) σε ρετιναλδεΐδη, η οποία με τη σειρά της μετατρέπεται υπό την επίδραση της δεϋδρογονάσης

ρετιναλδεΐδης (ALDH) σε ρετινοϊκό οξύ. Ένας άλλος τρόπος με τον οποίο το ρετινοϊκό οξύ μπορεί να εισέλθει ενδοκυττάρια είναι διαμέσου της σύνδεσής του με την αλβουμίνη του πλάσματος, η οποία επιτρέπει την είσοδο στα κύτταρα με μηχανισμό που δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως (198).

Τέλος, το ενεργό ρετινοϊκό οξύ είτε συνδέεται με συνδετικές πρωτεΐνες (CRABPs), με σκοπό την είσοδο του μορίου στον πυρήνα όπου θα ενεργοποιήσει την μεταγραφή γονιδίων, για τα οποία είναι υπεύθυνο, είτε θα καταβολιστεί σε ανενεργή μορφή από ρυθμιστικές για την ομοιοστασία του ρετινοϊκού οξέος πρωτεΐνες. Στον καταβολισμό του ρετινοϊκού οξέος μεσολαβεί το κυτόχρωμα P450, όπως το CYP26A, το οποίο προάγει την υδροξυλίωση του ρετινοϊκού οξέος και ρυθμίζει τόσο την ενδοκυττάρια συγκέντρωση του ρετινοϊκού οξέος, όσο και την μετατροπή του σε ανενεργό μεταβολίτη (197).



Εικόνα 3. Χημικές δομές ρετινοειδών με βιολογική σημασία. Η ενζυμική διάσπαση ενός μορίου β-καροτίνης (A) παράγει δύο μόρια all-trans-ρετινάλης (B), η οποία μπορεί στη συνέχεια είτε να

αναχθεί σε all-trans-ρετινόλη (C) είτε να οξειδωθεί σε all-trans-ρετινοϊκό οξύ (D). Η ρετινόλη μπορεί να αποθηκευτεί υπό τη μορφή ρετινυλεστέρων (G) με διάφορα καρβοξυλικά οξέα (R = αλκυλική ομάδα). Τα ισομερή του ρετινοϊκού οξέος 9-cis-ρετινοϊκό οξύ (E) και 13-cis-ρετινοϊκό οξύ (F) παρουσιάζονται επίσης στο σχήμα. Πληροφορίες από Kiser et al.(199), Harrison και Curley (200). Ανατύπωση από Samara et al., 2023

6.3 Μηχανισμός σηματοδότησης ρετινοϊκού οξέος

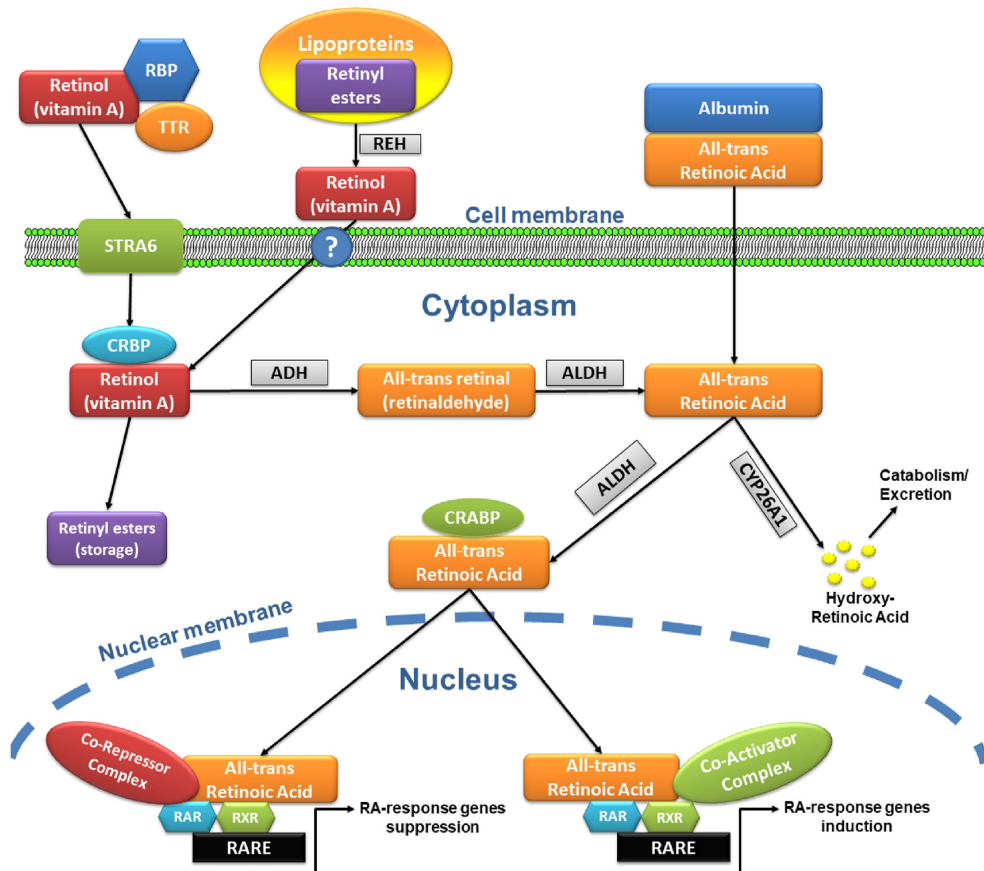
Το ρετινοϊκό οξύ δρα διαμέσου της σύνδεσής του με πυρηνικούς υποδοχείς. Έχουν ανακαλυφθεί δύο βασικές οικογένειες πυρηνικών υποδοχέων με τους οποίους συνδέεται το ρετινοϊκό οξύ, οι RAR (retinoic acid receptors) και οι RXR (retinoic X receptors). Οι πυρηνικοί υποδοχείς είναι πρωτεΐνες που δεσμεύουν τα ρετινοειδή και ανήκουν στην υπερ-οικογένεια των ορμονικών πυρηνικών υποδοχέων (201). Οι υποδοχείς των ρετινοειδών λειτουργούν ως μεταγραφικοί παράγοντες συγκριμένων γονιδίων- στόχων. Οι RAR υποδοχείς διακρίνονται σε τρεις υπότυπους, RAR α , RAR β , RAR γ και συνδέονται με το all-trans-RA με μεγάλη συγγένεια, καθώς και με όλα τα 9-cis ισομερή με μικρότερη όμως συγγένεια (202). Οι RXR υποδοχείς επίσης διακρίνονται σε τρεις υπότυπους, RXR α , RXR β , RXR γ και συνδέονται μόνο με το 9-cis ισομερές. Τέλος, το 13-cis ισομερές μπορεί να συνδεθεί με μεγάλη συγγένεια μόνο με τους RXR υποδοχείς (203). Έχει διαπιστωθεί ότι μόνο το atRA μπορεί να ενεργοποιήσει τους RAR υποδοχείς in vivo, σε αντίθεση με το 9-cis και 13-cis που ενεργοποιούν τους RXR και RAR υποδοχείς μόνο in vitro (204).

Η δομή των RAR και RXR υποδοχέων διακρίνεται από έξι περιοχές (A-F). Αυτές είναι: η περιοχή A/B, η οποία είναι απαραίτητη για την μεταγραφική ενεργοποίηση του υποδοχέα ανεξάρτητα από την πρόσδεση του προσδέτη, η περιοχή C, η οποία

περιλαμβάνει την περιοχή DNA binding domain (DBD) και είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση και δέσμευση των υποδοχέων με συγκεκριμένες αλληλουχίες του γονιδίου στόχου, η περιοχή *E*, η οποία είναι μία λειτουργικά περίπλοκη δομή καθώς περιλαμβάνει την περιοχή ligand binding domain (LBD) που είναι υπεύθυνη για την δέσμευση του προσδέτη στον υποδοχέα, την περιοχή που είναι υπεύθυνη την ενεργοποίηση της μεταγραφής του υποδοχέα από την αλληλεπίδραση με τον προσδέτη και την περιοχή που εξασφαλίζει τον διμερισμό του υποδοχέα, η περιοχή *D*, η οποία λειτουργεί ως σύνδεσμος μεταξύ των περιοχών DBD και LBD και επιτρέπει την περιστροφή της περιοχής DBD, με αποτέλεσμα να διευκολύνει την αλλαγή διαμόρφωσης των περιοχών DBD και της LBD και τέλος διακρίνεται η περιοχή *F*, η οποία απουσιάζει από τους υποδοχείς RXR, ενώ ο ρόλος τους στους υποδοχείς RAR δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητός (205).

Οι RAR και RXR υποδοχείς δημιουργούν ετεροδιμερή (RARα/RXR) τα οποία αποτελούν τους κύριους ρυθμιστικούς παράγοντες για την μεταγραφή των γονιδίων-στόχων και τελικά για τη δράση του ρετινοϊκού οξέος. Τα ετεροδιμερή (RARα/RXR) συνδέονται με συγκεκριμένες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες, γνωστές ως ρυθμιστικά στοιχεία των ρετινοϊκών οξέων (RAREs- retinoic acid response elements), τα οποία συνήθως αποτελούνται από δύο όμοια εξαμερή 5'-(A/G)G(G/T)TCA-3' (206). Τα RAREs βρίσκονται στον προαγωγέα τον γονιδίων-στόχων και αναγνωρίζονται από τους πυρηνικούς υποδοχείς, με τους οποίους προσδένονται πριν ακόμα συνδεθεί ο προσδέτης. Όσο απουσιάζει ο προσδέτης από τα ετεροδιμερή, οι υποδοχείς είναι συνδεδεμένοι με τα RAREs μέσω της DBD περιοχής και ταυτόχρονα με πρωτεΐνες που αναστέλλουν την μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων (207). Οι υποδοχείς RAR συνδέονται με συμπλέγματα που αποτελούνται από ιστόνες δεακετυδάσης (HDAN),

όπως τον αρνητικό συν-ρυθμιστή (HDAC-N-CoR) ή τον σιωπηλό μεσολαβητή για τους υποδοχείς ρετινοϊδών και θυρεοειδικών ορμονών (silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors, HDAC-SMRT), οι οποίοι καταργούν την μεταγραφή των γονιδίων-στόχων (208). Μετά την σύνδεση του ετεροδιμερούς με τον προσδέτη του, επάγονται αλλαγές στη διαμόρφωση των υποδοχέων, οι οποίες ευνοούν την αλληλεπίδραση και την δέσμευση του διμερούς με τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες. Επιπλέον, επάγουν την απομάκρυνση πρωτεϊνών- καταστολέων και προάγουν την προσέλκυση και δέσμευση πρωτεϊνών- συνενεργοποιητών, καθώς και την ακετυλοτρανσφεράσης της ιστόνης (HAT), τα οποία έχουν ως αποτέλεσμα την μεταγραφή των γονιδίων-στόχων (209) (Εικόνα 4).



Εικόνα 4. Μηχανισμός δράσης ρετινοϊκού οξέος. Ανατύπωση από Samara et al., 2023 (24)

6.4 Θεραπευτικοί στόχοι του ρετινοϊκού οξέος

Είναι γνωστό ότι το ρετινοϊκό οξύ διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε ποικίλες λειτουργίες του οργανισμού, όπως στην όραση, στην κυτταρική διαφοροποίηση και κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στην απόπτωση, στην λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και του νευρικού συστήματος και στην εμβρυογένεση (210). Τα ρετινοϊδή έχουν την δυνατότητα να αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ενώ ταυτόχρονα επάγουν την κυτταρική διαφοροποίηση, όπως έχει αποδειχθεί από την χορήγησή τους σε κυτταρικές σειρές αιμοποιητικών και επιθηλιακών κυττάρων (211). Επιπλέον, το ρετινοϊκό οξύ αναστέλλει την ανάπτυξη των όγκων, την αγγειογένεση και την μετάσταση, ενώ ακόμα έχει βρεθεί ότι ρυθμίζει την μιτοχονδριακή διαπερατότητα και τον θάνατο των υποδοχέων (212). Βασιζόμενοι σε αυτή τη γνώση, τα ρετινοϊδή έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία διαφόρων παθήσεων, ενώ η ευρύτερη χρήση τους ακόμα αποτελεί ένα πεδίο έρευνας και εξέλιξης.

Η κυριότερη χρήση τους είναι στην θεραπεία της οξείας προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας (APL). Η πρώτη αναφορά για την χρήση του ρετινοϊκού οξέος στη θεραπεία της οξείας προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας έγινε στα τέλη της δεκαετίας του 1980 στην Κίνα, με πολύ καλά αποτελέσματα όσον αφορά την πλήρη ύφεση της νόσου (211). Ερευνητικά δεδομένα έχουν δείξει όφελος στη χρήση του ρετινοϊκού οξέος σε διάφορους τύπους καρκίνων. Συγκεκριμένα έχει μελετηθεί η εφαρμογή του ρετινοϊκού οξέος στο ηπάτωμα και στον καρκίνο του πνεύμονα, του μαστού και του προστάτη. Έχουν βρεθεί ποικίλοι μηχανισμοί δράσης του μορίου, όπως η απευθείας δράση του στον καρκίνο μέσω αναστολής της ανάπτυξης και πολλαπλασιασμού

αυτού, είτε δρώντας συνεργικά με τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα συμβάλλοντας στην μείωση των δόσεων των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων και στην μείωση των ανεπιθύμητων ενεργειών, βελτιώνοντας με τον τρόπο αυτό την ποιότητα ζωής των ασθενών (213).

Επιπλέον, τα ρετινοΐδη έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως σε διάφορες δερματολογικές παθήσεις, όπως καρκίνος δέρματος, ακμή, ψωρίαση, αλλά ακόμα και στη βελτίωση των ρυτίδων. Το ρετινοϊκό οξύ επηρεάζει έντονα τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των επιθηλιακών κυττάρων, ενώ επιπλέον η συγκέντρωση του ρετινοϊκού οξέος ρυθμίζει την παραγωγή της κερατίνης. Πειραματικά δεδομένα *in vitro* έχουν δείξει ότι η έλλειψη ρετινοϊκού οξέος σε καλλιέργειες κερατινοκυττάρων προκαλεί μειωμένη κινητικότητα και αυξημένη συγκολλητικότητα, ενώ παράλληλα παρατηρείται απώλεια των χαρακτηριστικών μορφολογιών των κυττάρων αυτών (214). Ωστόσο, το κλινικό τους αποτέλεσμα είναι περιορισμένο, γεγονός που οφείλεται στην επίδραση των CYPs στον μεταβολισμό του *atRA* με αποτέλεσμα τη μείωση της δράσης του.

6.5 Σύνδρομο διαφοροποίησης

Το σύνδρομο διαφοροποίησης, γνωστό και ως σύνδρομο ρετινοϊκού οξέος αποτελεί τη σημαντικότερη ανεπιθύμητη ενέργεια της θεραπείας με ρετινοϊκό οξύ. Το σύνδρομο αυτό περιεγράφηκε από τους Fenaux et al το 1998 και περιλάμβανε τα εξής συμπτώματα και σημεία: αναπνευστική δυσχέρεια, εμπύρετο, πνευμονικά διηθήματα, απώλεια βάρους, πλευριτικές συλλογές, νεφρική ανεπάρκεια, περικαρδιακή συλλογή, καρδιακή ανεπάρκεια και υπόταση, με συνήθη χρόνο

εμφάνισης επτά ημέρες μετά την έναρξη της θεραπείας. Η άμεση χορήγηση υψηλών δόσεων κορτικοστεροειδών και διακοπή του φαρμάκου έχει φανεί ότι οδηγεί σε βελτίωση μέχρι πλήρη ύφεση των συμπτωμάτων του συνδρόμου (215). Ο ακριβής μηχανισμός του συνδρόμου αυτού δεν έχει αποσαφηνιστεί, ωστόσο πιθανολογείται ότι οφείλεται στην ενεργοποίηση ενός καταρράκτη που οδηγεί σε συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση (SIRS) μέσω απελευθέρωσης κυτοκινών όπως η ιντερλευκίνη 1 (IL-1), IL-β, IL-6, IL-8, και του παράγοντα νέκρωσης όγκου-α (TNF-α), σε καταστροφή του ενδοθηλίου και συνεπώς σε τριχοειδική απώλεια, σε μικροαγγειακή απόφραξη και σε διήθηση στρωμάτων (216).

Εκτός από το σύνδρομο ρετινοϊκού οξέος, έχει περιγραφεί μία άλλη οντότητα ανεπιθύμητων ενεργειών της χορήγησης του ρετινοϊκού οξέος, γνωστή ως *Pseudotumor cerebri*. Χαρακτηρίζεται από σοβαρή κεφαλαλγία, ναυτία, έμετο, οπτικές διαταραχές, οιδήματα οπτικών θηλών και αιμορραγίες του αμφιβληστροειδούς. Συχνότερη εμφάνιση έχει σε παιδιατρικό πληθυσμό (217). Γεγονός που περιορίζει τη συστηματική και σε υψηλές δόσεις χρήση του ρετινοϊκού οξέος.

7. Ρετινοϊκό οξύ και καρδιαγγειακό σύστημα

Διάφορες μελέτες εξέτασαν τον ρόλο της σηματοδότησης του ρετινοϊκού οξέος στην καρδιαγγειακό σύστημα. Πειραματικά μοντέλα έδειξαν ότι το ρετινοϊκό οξύ κατέχει έναν προστατευτικό ρόλο στο μυοκάρδιο μετά από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου. Αφαίρεση του γονιδίου *Aldh1a2/a3* σε ποντίκια και συνεπώς κατάργηση της κυτταρικής σηματοδότησης του ρετινοϊκού οξέος έδειξε αυξημένη

απόπτωση των μυοκαρδιακών κυττάρων σε ενήλικα ποντίκια που υπέστησαν οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου (218). Ομοίως, σε μοντέλα πρόκλησης βλάβης ισχαιμίας-επαναιμάτωσης, η χρήση του ρετινοϊκού οξέος μείωσε την εμφραγματική περιοχή ($17.81 \pm 1.05\%$ vs. $24.41 \pm 1.03\%$, $P < 0.05$), ενώ αντίστοιχα βελτίωσε το κλάσμα εξώθησης ($46.42 \pm 6.76\%$ vs. $37.18 \pm 4.63\%$, $P < 0.05$), μέσω της αντι-αποπτωτικής του ιδιότητας, όπως αυτό φάνηκε στη κυτταρομετρία ροής. Η ιδιότητα αυτή του ρετινοϊκού οξέος σχετίζεται εν μέρη στην αναστολή παραγωγής ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) και στην μείωση της φωσφορυλίωσης των κινασών που ενεργοποιούνται από μιτογόνα (MAPKs), όπως το p38, JNK, ERK (219). Επιπλέον, η εφαρμογή ρετινοϊκού οξέος έχει φανεί ότι συμμετέχει στην μείωση της αναδιαμόρφωσης της αριστερής κοιλίας μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου. Χορήγηση $0.3 \text{ mg}/(\text{kg} \times \text{ημέρα})$ σε ποντίκια, έδειξε μικρότερο εμβαδόν διατομής μυοκαρδιακών κυττάρων και ποσοστό διάμεσου κολλαγόνου σε σχέση με την ομάδα που δεν έλαβε ρετινοϊκό οξύ στους 6 μήνες παρατήρησης (220). Υπερηχογραφικά δεδομένα της αριστερής κοιλίας ποντικών που έλαβαν διατροφή χωρίς ρετινοϊκό οξύ έδειξαν επιδείνωση της διαστολικής δυσλειτουργίας (διαστολικό εμβαδόν, διάμετρος, χρόνος ισο-ογκωτικής χάλασης), υποδηλώνοντας τον ευεργετικό ρόλο του ρετινοϊκού οξέος στην αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας μετά από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου (221). Αντίθετα, στα παραπάνω ευρήματα, ο Danzl et al. έδειξαν ότι η τοπική χορήγηση ρετινοειδών στην πρώιμη φάση οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου αύξησε κατά 2.5 φορές την θνητότητα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου σε πληθυσμό ποντικών (219).

Η έκφραση γονιδίων-στόχου ρετινοϊκού οξέος, γονιδίων που σχετίζονται με την πρόσληψη, μετατροπή και μεταφορά στους πυρηνικούς υποδοχείς, σε βιοψίες

αριστερής κοιλίας ασθενών που υπεβλήθησαν σε αορτοστεφανιαία παράκαμψη λόγω στεφανιαίας νόσου με λειτουργική κλάση NYHA 2-3 και διατηρημένο κλάσμα εξώθησης ήταν σημαντικά αυξημένη σε σχέση με την έκφραση των γονιδίων-στόχου σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια τελικού σταδίου, λειτουργικής τάξης NYHA 4 είτε λόγω στεφανιαίας νόσου είτε λόγω μη-ισχαιμικής διατατικής μυοκαρδιοπάθειας. Τα ευρήματα αυτά σε συνδυασμό με την αναστολή πολλαπλασιασμού καρδιοϊνοβλαστών επαγόμενης από την χορήγηση ρετινοϊκού οξέος σε καρδιές ενήλικων ποντικών υποδηλώνουν ότι το ρετινοϊκό οξύ πιθανώς συμβάλει στην επιδιόρθωση και συνεπώς στην αναδιαμόρφωση του μυοκαρδιακού ιστού αριστερής κοιλίας με διατηρημένη συστολική λειτουργία (223). Αντίστοιχα, χορήγηση ρετινοϊκού οξέος σε ενήλικα ποντίκια που είχαν υποστεί έμφραγμα του μυοκαρδίου για τέσσερις εβδομάδες αύξησε τον πολλαπλασιασμό των μυοκαρδιακών κυττάρων και βελτίωσε την αναπαραγωγή του μυοκαρδίου και της καρδιακής λειτουργίας στις εμφραγματικές περιοχές, μέσω αύξησης της έκφρασης των πολλαπλασιαστικών γονιδίων (224).

Σε υγιή ποντίκια, η διαγραφή του γονιδίου του υποδοχέα RARα, μέσω χρήσης ταμοξιφένης, είχε ως αποτέλεσμα την πρόκληση διαστολικής δυσλειτουργίας, σε υπερηχογραφική και διακαθετηριακή μελέτη, χωρίς να παρατηρηθεί ταυτόχρονη μεταβολή στο κλάσμα εξώθησης. Η χρήση DHE έδειξε αυξημένη παραγωγή ενδοκυττάρων ενεργών μορφών οξυγόνου, όπως αυξημένα επίπεδα σε NOX2 και NOX4 και μειωμένα επίπεδα σε SOD1 και SOD2, υποδηλώνοντας αυξημένο οξειδωτικό στρες (225).

In vitro μοντέλα καρδιακών κυττάρων έχουν δείξει ότι το atRA κατέχει έναν προστατευτικό ρόλο έναντι στην καρδιοτοξικότητα από δοξορουβικίνη, μέσω

ενεργοποίησης του μηχανισμού σηματοδότησης ERK2, χωρίς ταυτόχρονα να επηρεάζει την αντικαρκινική της αποτελεσματικότητα, όπως φάνηκε σε καρκινικά κύτταρα στομάχου (226). Ομοίως, τόσο σε ανθρώπινα καρδιοκύτταρα όσο και σε πειραματικό μοντέλο ποντικών, η χορήγηση atRA μείωσε την καρδιοτοξικότητα οφειλόμενη σε ανθρακυκλίνες. Στα ανθρώπινα καρδιοκύτταρα προήγαγε την έκφραση γονιδίων των υποδοχέων RARs, όπως των υποδοχέων RAR-β και RAR-γ, ενώ επιπλέον κατέστειλε την έκφραση των γονιδίων του ενζύμου της τοποϊσομεράσης II, με αποτέλεσμα την καταστολή των γονιδίων απόκρισης ανθρακυκλίνης, ενώ στα καρδιοκύτταρα ποντικού φάνηκε βελτίωση της καρδιακής λειτουργίας σε σύγκριση με τα ποντίκια που έλαβαν θεραπεία μόνο με δοξορουβικίνη (227). Αντιθέτως σε υγιή ποντίκια, η από του στόματος χορήγηση atRA σε δόσεις 0.3mg/kg/ημέρα, 5 mg/kg/ημέρα και 10 mg/kg/ημέρα προήγαγε την υπερτροφία του μυοκαρδίου με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο σχετιζόμενη με την αύξηση του οξειδωτικού στρες και αλλαγές στην μεταβολική ενέργεια (228).

Η χρήση του ρετινοϊκού οξέος ως βιοδείκτη και η μέτρηση του στον ορό του αίματος έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να έχει προγνωστικό ρόλο είτε στους ασθενείς με εγκατεστημένη καρδιαγγειακή νόσο στον γενικό πληθυσμό. Τα χαμηλά επίπεδα συγκέντρωσης λυκοπενίου και β-καροτίνης στο ορό, σχετίστηκαν με αυξημένο κίνδυνο οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου στους άνδρες ηλικίας 46-65 ετών (229), και με αυξημένη καρδιαγγειακή θνητότητα, ιδιαίτερα στους ασθενείς που εμφάνιζαν χαμηλά επίπεδα β-καροτίνης (230). Ομοίως, σε ασθενείς με αγγειογραφικά αποδεδειγμένη στεφανιαία νόσο, τα επίπεδα ρετινοϊκού οξέος ήταν σημαντικά χαμηλότερα στην ομάδα που εμφάνιζε αυξημένη καρδιαγγειακή θνητότητα σε σχέση με την ομάδα με χαμηλότερη θνητότητα, ενώ τα υψηλότερα επίπεδα ρετινοϊκού

οξέος σχετίστηκαν με χαμηλότερη ολική θνητότητα (231). Αντίθετα, ο Min et al. έδειξαν ότι η καρδιαγγειακή θνητότητα σχετίζεται τόσο με τα χαμηλά επίπεδα ρετινοϊκού οξέος ($< 30\mu\text{g/dL}$) όσο και με τα ιδιαίτερα αυξημένα επίπεδα ρετινοϊκού οξέος ($80\mu\text{g/dL}$) (232).

8. Ρετινοϊκό οξύ και αθηροσκλήρωση

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η αθηροσκλήρωση αποτελεί μία πολύπλοκη νόσο, η οποία χαρακτηρίζεται από την ενεργοποίηση διαφόρων κυτταρικών τύπων, όπως τα μακροφάγα και τα λεία μυϊκά κύτταρα και τα οποία συναντώνται σε όλα τα στάδια της εξέλιξης της αθηροσκλήρωσης. Τα λεία μυϊκά κύτταρα διαδραματίζουν έναν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της αθηροσκλήρωσης, ως απάντηση σε ερεθίσματα όπως η ενδοθηλιακή βλάβη. Η επαγωγή του πολλαπλασιασμού, της μετανάστευσης και της αποδιαφοροποίησης των λείων μυϊκών κυττάρων στα σημεία της ενδοθηλιακής βλάβης αποτελεί τον βασικό μηχανισμό δράσης των λείων μυϊκών κυττάρων στην δημιουργία της αθηρωματικής πλάκας, καθώς και στην σταθεροποίηση και αποσταθεροποίηση αυτής (233). Πληθώρα *in vitro* και *in vivo* πειραματικών μοντέλων έχουν αποδείξει την πλειοτροπική ανασταλτική δράση του ρετινοϊκού οξέος στις διαδικασίες του πολλαπλασιασμού, της μετανάστευσης και της φαινοτυπικής αλλαγής των λείων μυϊκών κυττάρων, καθιστώντας σαφές τον ρόλο του ρετινοϊκού οξέος στην διαδικασία της αθηροσκλήρωσης.

8.1 Ρετινοϊκό οξύ και πολλαπλασιασμός λείων μυϊκών κυττάρων

Ο πολλαπλασιασμός των λείων μυϊκών κυττάρων του έσω χιτώνα είναι απαραίτητη διαδικασία για την ανάπτυξη του νέο-ενδοθηλιακού ιστού και της αθηρωματικής πλάκας. Πριν από τέσσερις δεκαετίες, οι Peclo et al. εφάρμοσαν ρετινοϊκό οξύ σε συγκεντρώσεις 10^{-5} έως 10^{-7} M σε καλλιέργειες λείων μυϊκών κυττάρων προερχόμενων από το μέσο χιτώνα της αορτής αρουραίων, γεγονός που προκάλεσε αύξηση του πολλαπλασιασμού των λείων μυϊκών κυττάρων και της έκφρασης του αντιγόνου L1, ενός ειδικού επιφανειακού αντιγόνου των λείων μυϊκών κυττάρων (234).

Τα αποτελέσματα αυτά δεν επιβεβαιώθηκαν σε μεταγενέστερες μελέτες. Ο Neuville και οι συνεργάτες του απέδειξαν ότι η εφαρμογή του all-trans ρετινοϊκού οξέος (ATRA) in vitro αναστέλλει τόσο την πάχυνση του μέσου χιτώνα όσο και την πάχυνση του έσω χιτώνα μέσω αναστολής του πολλαπλασιασμού των λείων μυϊκών κυττάρων, με σημαντικότερη επίδραση στην πάχυνση του έσω χιτώνα. Το ρετινοϊκό οξύ πιθανώς ασκεί τη δράση του μέσω της ικανότητας του να μεταβολίζει τα ρετινοειδή, τα οποία επάγονται από την παρουσία της κυτταρικής πρωτεΐνης δέσμευσης της ρετινόλης-1 (CRBP-1). Επιπλέον, έδειξαν ότι το all-trans ρετινοϊκό οξύ και ένας αγωνιστής του υποδοχέα ρετινοϊκού οξέος-α (RAR-α) οδήγησαν σε μείωση της πάχυνσης του έσω χιτώνα κατά 76% και σε αύξηση της διαμέτρου του αυλού κατά 33%, χωρίς να επηρεάσουν τα λεία μυϊκά κύτταρα του μέσου χιτώνα, ως απάντηση στον τραυματισμό του ενδοθηλίου σε καρωτίδες αρουραίων (235). Ο Tran-Lundmark et al. διαπίστωσαν ότι το ATRA αυξάνει την έκφραση της περλεκάνης, μίας μεγάλης ηπαρίνης θειικής πρωτεογλυκάνης που δρα ως σημαντικός ρυθμιστής της ανάπτυξης

των λείων μυϊκών κυττάρων, εξαρτώμενης από την έκφραση της αλυσίδας ηπαρίνη-θειϊκή. Πιο συγκεκριμένα, το ATRA μειώνει τη φωσφορυλίωση της φωσφατάσης και της ομόλογης τενσίνης (PTEN) καθώς και τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης ενεργοποιημένης κινάσης Akt σε φυσιολογικά κύτταρα, προάγοντας τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου μέσω ανταγωνισμού με τη σηματοδότηση που προκαλείται από υποδοχείς αυξητικών παραγόντων και ιντεγκρίνες (236). Επιπλέον, οι Streb et al. έδειξαν ότι τα ρετινοειδή αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων μέσω της μεταγραφής ενός συγκεκριμένου ισομορφισμού της πρωτεΐνης πρόσδεσης πρωτεϊνικής κινάσης A 12 (AKAP12), γνωστής για τις αντικαρκινικές της ιδιότητες μέσω της σηματοδότησης της PKA (237). Πρόσφατα, βρέθηκε ότι η άμεση ενεργοποίηση της AMPK και η αναστολή της σηματοδότησης mTOR από ATRA με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο μπορεί να αναστείλει τη νεο-ενδοθηλιακή υπερπλασία και να καταστείλει τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των λείων μυϊκών κυττάρων (238,239). Επώαση ανθρώπινων λείων μυϊκών κυττάρων με 1 μ M ATRA για 72 ώρες επήγαγε την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων-στόχων του ρετινοϊκού οξέος (RBP1, STRA6, CYP26B1, CRABP1 και RAR α), οδηγώντας στην αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Η ενεργοποίηση αυτών των γονιδίων έχει αποδειχθεί ότι συμμετέχει στη μεταφορά, πρόσληψη, μετατροπή και παράδοση του ρετινοϊκού οξέος στους πυρηνικούς υποδοχείς, οδηγώντας στη συσσώρευση παραγώγων του ρετινοϊκού οξέος (223).

Πληθώρα μελετών έχουν εξετάσει τους παράγοντες τύπου Kruppel (KLFs), μια ομάδα μεταγραφικών παραγόντων που ρυθμίζουν την κυτταρική ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση. Ο KLF5 είναι ένας καλά τεκμηριωμένος προ-πολλαπλασιαστικός ρυθμιστής, που εκφράζεται σε σημαντικό βαθμό σε λεία μυϊκά

κύτταρα των αγγείων ενηλίκων μετά από αγγειακό τραυματισμό, ενισχύοντας έτσι την ενεργοποίηση διαφόρων διεγερτικών παραγόντων (240). Σε *in vitro* καλλιέργειες λείων μυϊκών κυττάρων ασθενών που εμφάνισαν πρώιμη επαναστένωση μετά από αγγειοπλαστική βρέθηκε ότι η έκφραση του KLF5 ήταν σημαντικά αυξημένη στα δείγματα που εμφάνιζαν ανάπτυξη των λείων μυϊκών κυττάρων σε σύγκριση με την ομάδα χωρίς ανάπτυξη αυτών (89% έναντι 20%, $p < 0.01$) (241). Επιπλέον, σε ετεροζυγωτικά ποντίκια KLF5(+/-), παρατηρήθηκε μικρότερη στένωση του αρτηριακού τοιχώματος μετά από αγγειακό τραυματισμό σε σύγκριση με τα μη τροποποιημένα ποντίκια. Οι συγγραφείς έδειξαν επίσης ότι ο KLF5 συνδέεται φυσικά με τον υποδοχέα RAR α , προάγοντας με τον τρόπο αυτό τη μεταγραφική δραστηριότητα του KLF5 και τον σχηματισμό του νέο-ενδοθηλίου (242). Βασισμένοι σε αυτά τα αποτελέσματα, ο Zhang et al. εξέτασαν την επίδραση του Am80, ενός συνθετικού αγωνιστή του RAR α , τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Η ανάλυση συνανοσοκαθίζησης έδειξε ότι το Am80 καταστέλλει επιτυχώς την αλληλεπίδραση μεταξύ KLF5 και RAR α σε κυτταρικό και ιστικό επίπεδο μέσω της αποφοσφορύλωσης του KLF5 στα λεία μυϊκά κύτταρα, η οποία επάγεται από την ενεργοποίηση των σηματοδοτικών οδών PI3/Akt και p38 MAPK (243). Επιπλέον, ο Yu et al. εξέτασαν την επίδραση της χορήγησης ATRA 10 mg/kg ανά ημέρα από του στόματος σε μοντέλο φλεβικού αυτόλογου μοσχεύματος σε κουνέλια μετά από 2, 4 και 8 εβδομάδες χορήγησης. Η θεραπεία με ATRA οδήγησε στα εξής αποτελέσματα: 1) μείωση της πάχυνσης της έσω-μέσης στιβάδας των φλεβικών μοσχευμάτων και μειωμένη έκφραση της πρωτεΐνης Ki67, 2) αναστολή της αυξητικής δραστηριότητας των λείων μυϊκών κυττάρων της ανθρώπινης ομφαλικής φλέβας (HUVSMCs) με δοσοεξαρτώμενο τρόπο, πιθανώς μέσω της οδού της κατασταλτικής πρωτεΐνης

όγκου ρετινοβλαστώματος (RB) και του μεταγραφικού παράγοντα E2F (Rb-E2F), και 3) μείωση της αλληλεπίδρασης KLF5-RARα και αναστολή της επαγωγίσιμης συνθετάσης μονοξειδίου του αζώτου (iNO), που είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση γονιδίων-στόχων του KLF5 (244). Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι η αλληλεπίδραση KLF5-RARα παίζει κρίσιμο ρόλο στην ενδοθηλιακή απάντηση στον αγγειακό τραυματισμό και ότι οι αγωνιστές του RARα μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως πιθανά φάρμακα κατά του σχηματισμού νέο-ενδοθηλιακής υπερπλασίας μέσω της καταστολής του KLF5. Τέλος, ο KLF4 επηρεάζει τον σχηματισμό νέο-ενδοθηλίου καταστέλλοντας την έκφραση του RARα και αναστέλλοντας τη σηματοδότηση PI3K/ERK όπως φάνηκε σε καλλιέργειες λείων μυϊκών κυττάρων μετά από χορήγηση συνθετικού Am80 (245).

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει την επίδραση του ρετινοϊκού οξέος σε διάφορους μιτωτικούς παράγοντες, οδηγώντας στην αναστολή του πολλαπλασιασμού των λείων μυϊκών κυττάρων. Ο Miano et al. απέδειξαν την έκφραση των υποδοχέων ρετινοειδών σε κυτταρικές σειρές λείων μυϊκών κυττάρων αορτής αρουραίου και στη συνέχεια την ανασταλτική δράση του ATRA στην κυτταρική ανάπτυξη, μέσω της δράσης του έναντι του αυξητικού παράγοντα που προέρχεται από αιμοπετάλια (PDGF-BB) μετά από 12 ώρες χορήγησης (246). Το ρετινοϊκό οξύ εμφανίζει διεγερτική επίδραση στη σύνθεση ελαστίνης, με μέγιστη διέγερση της τάξης των 2,8 φορές υψηλότερη σε συγκέντρωση ρετινοϊκού οξέος 10^{-6} M κατά τη διάρκεια χορήγησης 24-48 ωρών καθώς και αύξηση των επιπέδων mRNA της ελαστίνης, οδηγώντας σε αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (247). Σχετικές συγκεντρώσεις ATRA (IC_{50} , 10 nM για σεροτονίνη και IC_{50} , 1 μ M για ορό) ανέστειλαν τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων σε δείγματα αορτής σκύλου επαγόμενο από ορό και σεροτονίνη, ενώ ειδικοί αγωνιστές της γ -υποομάδας του RAR υποδοχέα

αποδείχθηκαν ισχυρότεροι αναστολείς σε σύγκριση με τα φυσιολογικά ρετινοειδή. (248). Επιπλέον, η 12ωρη έκθεση σε ATRA μείωσε την έκφραση του γονιδίου του υποδοχέα αγγειοτασίνης I (AT1-R) σε καλλιεργημένα λεία μυϊκά κύτταρα θωρακικής αορτής αρουραίων, τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης. Ο AT1-R φαίνεται ότι καταστέλλεται από το ATRA μέσω νέας πρωτεϊνικής σύνθεσης εξαρτώμενης από το ετεροδιμερές RAR/RXR (249). Η ενδοθηλίνη ασκεί διεγερτική δράση στα λεία μυϊκά κύτταρα επάγοντας τον πολλαπλασιασμό τους. Ωστόσο, η χορήγηση ATRA σε καλλιέργειες λείων μυϊκών κυτταρικών αορτής αρουραίου διεγερμένες από ενδοθηλίνη εμφανίζει την ικανότητα να καταστέλλει τη μιτογένεση και τη δραστηριότητα της εξωκυτταρικής σηματοδοτικής κινάσης (ERK), οδηγώντας σε μείωση του αριθμού των κυττάρων στις καλλιέργειες (250). Τέλος, η προ-θεραπεία με ATRA ανέστειλε τη σύνθεση DNA που φυσιολογικά επάγεται από τον βασικό αυξητικό παράγοντα ινοβλαστών (bFGF) με δόσοεξαρτώμενο τρόπο (251). Παρόλο που ο μηχανισμός δράσης του ρετινοϊκού οξέος στον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων δεν είναι πλήρως κατανοητός, υπάρχουν αναφορές ότι το ρετινοϊκό οξύ δρα στοχεύοντας γονίδια που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο, όπως οι κυκλίνες και οι κινάσες που εξαρτώνται από κυκλίνες (Cdks), που είναι απαραίτητες για την είσοδο στον κυτταρικό κύκλο και την επακόλουθη πρόοδο στη φάση G1 (252,253). Συμπερασματικά, οι παραπάνω μελέτες έχουν αποδείξει σαφώς μια ανασταλτική επίδραση στον πολλαπλασιασμό των VSMCs, είτε επηρεάζοντας διάφορους μιτογόνους παράγοντες είτε διεγείροντας τα ανενεργά λεία μυϊκά κύτταρα.

8.2 Ρετινοϊκό οξύ και Μετανάστευση λείων μυϊκών κυττάρων

Η μετανάστευση των αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων είναι ένα βασικό στάδιο για τον σχηματισμό της νέο-ενδοθηλιακής υπερπλασίας, το οποίο περιλαμβάνει κυρίως την αποδόμηση των συστατικών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, που ρυθμίζεται από τις μεταλλοπρωτεϊνάσες μήτρας (MMPs) ή από τα συστήματα ενεργοποιητή πλασμινογόνου (235).

Το ρετινοϊκό οξύ μειώνει την παραγωγή του προ-MMP-1 στα ανθρώπινα αορτικά λεία μυϊκά κύτταρα με μη-δοσοεξαρτώμενο τρόπο, μέσω της καταστολής του αυξητικού παράγοντα που προέρχεται από τα αιμοπετάλια (PDGF), γεγονός που υποδηλώνει ότι το ρετινοϊκό οξύ μπορεί να συμβάλλει στην αναστολή της μετανάστευσης των λείων μυϊκών κυττάρων (254). Ο Axel και οι συνεργάτες του εξέτασαν τη συνεχή και την εφάπαξ επώαση με ATRA σε μονοκαλλιέργειες και συν-καλλιέργειες με φίλτρο ανθρώπινων αρτηριακών λείων μυϊκών κυττάρων (haSMCs). Η μέτρηση των κυττάρων μετά από 7 ημέρες μονοκαλλιέργειας haSMCs έδειξε IC₅₀ 0,22 μM και IC_{max} 10,0 μM, με αναστολή ανάπτυξης άνω του 60% σε σύγκριση με τις ομάδες ελέγχου στη μέγιστη συγκέντρωση των 10,0 μM. Στις συν-καλλιέργειες με φίλτρο κατόπιν ανάπτυξης με τη χρήση αυξητικών παραγόντων, η συνεχής χορήγηση ATRA για 14 ημέρες οδήγησε σε μείωση του αριθμού των κυττάρων και στις δύο πλευρές του φίλτρου, με μεγαλύτερη επίδραση στον πολλαπλασιασμό στην ενδοθηλιακή πλευρά σε χορήγηση δόσεων $\geq 0,1$ μM, ενώ χορήγηση χαμηλότερων δόσεων $\geq 0,001$ μM ήταν αποτελεσματικές για την αναστολή της μετανάστευσης. Επιπλέον, η χορήγηση ATRA σε μονοκαλλιέργειες έδειξε μείωση της έκφρασης του MMP-2 σε μη διεγερμένα haSMCs και του MMP-9 μετά από ≥ 12 ώρες διέγερσης

με εστέρα φορβολίου. Οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τόσο η συνεχής όσο και η εφάπαξ χρήση του ATRA έχει ανασταλτικά αποτελέσματα στη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό (255).

Σε ένα άλλο πειραματικό μοντέλο, εξετάστηκε η από του στόματος χορήγηση ATRA σε ένα μοντέλο ποντικού με νόσο Kawasaki. Χρησιμοποιήθηκαν αρσενικά ποντίκια C57BL/6J ηλικίας 5 εβδομάδων, στα οποία η στένωση των στεφανιαίων και η αγγειίτιδα προκλήθηκαν μέσω χορήγησης ενδοπεριτοναϊκής ένεσης εκχυλίσματος κυτταρικού τοιχώματος *Lactobacillus casei*. Δύο εβδομάδες αργότερα, το ATRA χορηγήθηκε από του στόματος σε δόση 30 mg/kg για 5 ημέρες την εβδομάδα για 14 εβδομάδες, ενώ η ομάδα ελέγχου έλαβε μόνο καλαμποκέλαιο. Στην ομάδα των ποντικών που προκλήθηκε η νόσος από το LCWE, η καταστροφή της ελαστίνης τόσο στην εξωτερική όσο και στην εσωτερική ελαστική μεμβράνη μειώθηκε, ενώ παράλληλα η πρωτεΐνη MMP-9 εμφάνισε σημαντικά μείωση. Η στεφανιαία στένωση και οι φλεγμονώδεις δείκτες ήταν χαμηλότεροι στην ομάδα που έλαβε ATRA. Επιπλέον, τα ανθρώπινα λεία μυϊκά κύτταρα των στεφανιαίων αρτηριών διεγέρθηκαν με τον αυξητικό παράγοντα των αιμοπεταλίων υπομονάδας B (PDGF-BB), προκαλώντας αύξηση στην επιφάνεια κάλυψης από μεταναστευτικά κύτταρα. Η θεραπεία με 0.1, 1.0 και 10 nM ATRA για 72 ώρες έδειξε μείωση της μεταναστευτικής δραστηριότητας. Το σημαντικότερο αποτέλεσμα (49%) παρατηρήθηκε στην ομάδα που έλαβε 10 nM ATRA. Η ανάλυση ELISA έδειξε σημαντική μείωση στη συνολική δραστικότητα του MMP-9 στην ομάδα ATRA/PDGF-BB, ενώ δεν παρατηρήθηκε σημαντική αλλαγή στην ομάδα PDGF-BB (256).

Παρομοίως, ο Johst και συν παρατήρησαν μείωση στα μεταναστευτικά κύτταρα σε όλες τις ομάδες haSMCs που επώαστηκαν με ρετινοϊκό οξύ σε σύγκριση

με τις ομάδες ελέγχου, κάτι που συσχετίστηκε με μειωμένη παραγωγή τενασκίνης, όπως τεκμηριώθηκε μέσω της χρήσης ανοσοχρώσης και με την καταστολή των MAPKs p44/p42. Η τενασκίνη είναι μια πρωτεΐνη θεμέλιας ουσίας που προάγει τη μετάβαση των αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων από το συσταλτικό στον συνθετικό φαινότυπο, οδηγώντας σε αποσταθεροποίηση της αλληλεπίδρασης κυττάρου-εξωκυττάριας ουσίας (257). Αν και έχουν αναφερθεί αντικρουόμενα ευρήματα που δείχνουν αύξηση της μετανάστευσης που προκαλείται από το ρετινοϊκό οξύ (235), τα παραπάνω δεδομένα υποδηλώνουν ότι το ATRA μπορεί να διαδραματίσει ρόλο στην αναστολή της μετανάστευσης των λείων μυϊκών κυττάρων.

8.3 Ρετινοϊκό οξύ και Διαφοροποίηση

Η φαινοτυπική εναλλαγή αναφέρεται στη διαδικασία κατά την οποία οι μεσαίες λείες μυϊκές κυτταρικές σειρές διαφοροποιούνται, πολλαπλασιάζονται και μεταναστεύουν ως απάντηση σε διάφορα εξωτερικά ερεθίσματα. Η μετάβαση των λείων μυϊκών κυττάρων από τον συσταλτό στον συνθετικό τύπο συμβάλλει στη σταθερότητα των αθηροσκληρωτικών πλακών αυξάνοντας το πάχος της προστατευτικής ινώδους κάψας (258). Πρόσφατα, ο Pan et al. έδειξαν τη μετάβαση των λείων μυϊκών κυττάρων σε μία ενδιάμεση κατάσταση γνωστή ως SEM κύτταρα (stem cell, endothelial cell, monocyte) σε ένα πειραματικό μοντέλο λείων μυϊκών κυττάρων ποντικών, τα οποία προσομοιάζουν με αυτά που παρατηρούνται στις ανθρώπινες αθηροσκληρωτικές καρωτίδες. Τα SEM κύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν σε μακροφαγικά ή ινοβλαστικά κύτταρα ή να επανέλθουν στον αρχικό φαινότυπο των λείων μυϊκών κυττάρων. Οι ερευνητές χορήγησαν ATRA ως

ενεργοποιητή της σηματοδότησης του ρετινοϊκού οξέος σε ποντίκια ROSA26ZsGreen1/+; Ldlr-/-; Myh11-CreERT2. Παρατηρήθηκε ~40% μείωση στην αναλογία των ZsGreen1+LY6A+LY6C1+ SEM κυττάρων μεταξύ των συνολικών ZsGreen1+ κυττάρων, ενώ υπήρξε αύξηση των ZsGreen1+ κυττάρων στην προστατευτική ινώδη κάψα. Η ανάλυση RNAscope των τμημάτων της αθηροσκληρωτικής BCA έδειξε ~70% μείωση των Vcam1-χρωματισμένων SEM κυττάρων. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν έντονα ότι η θεραπεία με ATRA μπορεί να μειώσει τη μετάβαση των SEM κυττάρων και να καταστείλει την αποδιαφοροποίησή τους προς περισσότερους διαφοροποιημένους τύπους κυττάρων προερχόμενων από λεία μυϊκά κύτταρα και τα οποία είναι απαραίτητα στην διαδικασία της αθηροσκλήρωσης (171).

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η σύνθεση mRNA και πρωτεΐνης της α-λείας μυϊκής ακτίνης παρουσιάζει χαμηλές συγκεντρώσεις στα ενεργά πολλαπλασιαζόμενα λεία μυϊκά κύτταρα (259). Έχει αποδειχθεί ότι η ATRA διεγείρει την έκφραση του mRNA των λείων μυϊκών ινών και της βαριάς αλυσίδας μυοσίνης (MHC) στα hSMC, προάγοντας έναν μη ενεργοποιημένο, πλήρως διαφοροποιημένο φαινότυπο που ενισχύει τη σταθεροποίηση των αθηροσκληρωτικών πλακών (235,255). Ομοίως, μελέτες *in vivo* έδειξαν αύξηση της έκφρασης της λείας α-ακτίνης και της βαριάς αλυσίδας μυοσίνης μετά από του στόματος ή τοπική χορήγηση ATRA, οδηγώντας στην υπόθεση της διατήρησης του «ώριμου» συσταλτού φαινοτύπου των λείων μυϊκών κυττάρων (260–262). Ο Haller et al. απέδειξε αυξημένη έκφραση της PKC και της PKC-α στα διαφοροποιημένα λεία μυϊκά κύτταρα καλλιιεργειών από αορτές αρουραίων σε σύγκριση με τα αποδιαφοροποιημένα κύτταρα, τα οποία χαρακτηρίζονταν από έκφραση α-ακτίνης και δεσμίνης στην ανοσόχρωση και στην

ανάλυση με western-blotting. Στη συνέχεια, επώασαν τις καλλιέργειες με ρετινοϊκό οξύ και παρατήρησαν αύξηση της έκφρασης της PKC-α και της δραστηριότητας της PKC, υποδεικνύοντας την ανασταλτική δράση του ρετινοϊκού οξέος στην αποδιαφοροποίηση των λείων μυϊκών κυττάρων (263).

Ένας άλλος δείκτης διαφοροποίησης των SMCs είναι τα κανάλια L-τύπου Ca^{2+} . Σε καλλιέργειες λείων μυϊκών κυττάρων αορτής αρουραίου (A7r5), παρατηρήθηκε μείωση του αριθμού των λειτουργικών καναλιών Ca^{2+} στα αποδιαφοροποιημένα κύτταρα, η οποία αναστράφηκε μετά την εφαρμογή του ρετινοϊκού οξέος (264). Ο Rogers et al. χρησιμοποίησαν λεία μυϊκά κύτταρα στεφανιαίων αρτηριών ανθρώπου και έδειξαν ότι η ATRA μπορεί να αναστείλει τη διαφοροποίηση των λείων μυϊκών κυττάρων προς έναν οστεοβλαστικό φαινότυπο μέσω διαφόρων μηχανισμών. Αρχικά, αξιολόγησαν τις αλλαγές στο οστεογενετικό μεταγραφικό πρόγραμμα μετά την εφαρμογή της ATRA μετρώντας τα επίπεδα mRNA τριών μεταγραφικών παραγόντων που εμπλέκονται στη διαδικασία της αγγειακής ασβεστοποίησης, όπως οι Runt-related transcription factor 2 (RUNX2), Msh homeobox 2 (MSX2) και SRY-box transcription factor 9 (SOX9). Μεταξύ των αναγνωρισμένων μηχανισμών περιλαμβάνονται η ενεργοποίηση του RAR-α, η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης της μη ειδικής για τους ιστούς αλκαλικής φωσφατάσης, η σηματοδότηση του ATRA και η αύξηση της πρωτεΐνης G1a, οι οποίες συμβάλλουν στην καταστολή της ασβεστοποίησης των λείων μυϊκών κυττάρων (265).

Ένας άλλος παράγοντας τύπου Kruppel-like, ο KLF4, έχει αποδειχθεί ότι διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη διαφοροποίηση των λείων μυϊκών κυττάρων (266). Ο Wang et al. έδειξαν ότι η ATRA αυξάνει την έκφραση του KLF4 και οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης των γονιδίων δεικτών διαφοροποίησης (SM22α, α-SMA), ενώ

μειώνει την έκφραση των δεικτών αποδιαφοροποίησης (SMemb) (267). Διάφοροι μοριακοί μηχανισμοί έχουν προταθεί για τη διέγερση της πρωτεΐνης KLF4 από την ATRA, συμπεριλαμβανομένων της ακετυλίωσης, της φωσφορυλίωσης (268,269) και της μεταγραφικής ρύθμισης του γονιδίου KLF4 μέσω της λειτουργικής αλληλεπίδρασης του RARα με τους KLF4, Sp1 και YB1 που συνδέονται με τα GC boxes στον υποκινητή του KLF4 (268). Ένας νέος παράγοντας παρόμοιος με τους KLFs, ο ZFP580, βρέθηκε ότι επάγεται από τη σύνδεση της ATRA με τον υποδοχέα RARα μέσω της οδού PI3K/Akt. Ο ZFP580 καταστέλλει την αποδιαφοροποίηση, όπως αποδεικνύεται από τη μειωμένη έκφραση του δείκτη αποδιαφοροποίησης SMemb και την αυξημένη έκφραση των SM22α και SMA-actin (258).

II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Εισαγωγή

Η παρούσα έρευνα διερεύνησε την αποτελεσματικότητα καινοτόμου ενδοστεφανιαίας πρόσθεσης (stent) επικαλυπτόμενη με ρετινοϊκό οξύ, για την αντιμετώπιση της καρδιαγγειακής νόσου. Μελετήθηκε η αποτελεσματικότητα της απελευθέρωσης του ρετινοϊκού οξέος μέσω βιοδιασπώμενων πολυμερών στην εμφάνιση επαναστένωσης της ενδοστεφανιαίας πρόθεσης. Η έρευνα είχε σκοπό να μελετήσει *in vivo* τα αποτελέσματα σε ζωικό μοντέλο κονίκλου και χοίρου. Στο πρώτο στάδιο, μελετήθηκε η εφικτότητα και η φαρμακοκινητική του υπό μελέτη DES σε ζωικό μοντέλο κόνικλου. Για τον σκοπό αυτό, δοκιμάστηκαν διαφορετικές διαμορφώσεις και δοσολογίες του υπό ανάπτυξη DES ώστε να προσδιοριστεί η βέλτιστη από πλευράς αποτελεσματικότητας και φαρμακοκινητικής διαμόρφωση του προϊόντος. Η διαδικασία περιλάμβανε την προώθηση και τοποθέτηση stent στις λαγόνιες αρτηρίες 30 κονίκλων διαμέσου καθετηριασμού της ωτιαίας αρτηρίας, μελέτη της μορφολογίας των αρτηριών με οπτική τομογραφία (Optical Coherence Tomography, OCT), αφαίρεση των τμημάτων αρτηριών που περιλαμβάνουν τα stent και μελέτη της ιστομορφομετρίας με οπτικές μεθόδους. Στο δεύτερο στάδιο, μελετήθηκε η αποτελεσματικότητα και η ασφάλεια του stent σε ζωικό μοντέλο χοίρου. Στο στάδιο αυτό δοκιμάστηκε το υπό ανάπτυξη DES σε στεφανιαίες αρτηρίες χοίρου. Χρησιμοποιήθηκαν 12 πειραματόζωα. Η διαδικασία είχε σκοπό να εμφυτευθούν stent σε στεφανιαίες αρτηρίες χοίρων, μελέτη της μορφολογίας των

αρτηριών με οπτική τομογραφία (Optical Coherence Tomography, OCT) και στη συνέχεια αφαίρεση των αρτηριών με τα stent και μελέτη της ιστομορφομετρίας.

2. Μέθοδος

Η μελέτη διεξήχθη με βάση τις διεθνείς κατευθυντήριες οδηγίες ARRIVE 2.0 (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments), ώστε να διασφαλιστεί η χρήση αυστηρής μεθοδολογίας στον σχεδιασμό και την διεξαγωγή των πειραμάτων *in vivo* (270). Επιπλέον, η διεξαγωγή της μελέτης αυτής είναι εναρμονισμένη με την νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης μέσω της οδηγίας 2010/63/EU που αφορά την ορθολογική χρήση των ζώων ως πειραματικά μοντέλα και έχει ως στόχο την αποφυγή των πειραμάτων σε ζώα κατά το μέτρο του δυνατού καθώς και την βελτίωση των συνθηκών διαβίωσης για τα πειραματόζωα. Σύμφωνα με το άρθρο 4 της οδηγίας αυτής ακολουθείται η αρχή 3Rs, δηλαδή η αρχή της αντικατάστασης, της μείωσης και της τελειοποίησης (replacement, reduction, refinement), η οποία εξασφαλίζει ότι μία πειραματική διαδικασία αποτελεί εναλλακτική λύση σε δοκιμές σε ζώα μόνο εάν είναι ικανή να τις αντικαταστήσει, να μειώσει τον αριθμό των ζώων που χρησιμοποιούνται και να ελαχιστοποιήσει το στρες που προκαλείται στα ζώα (271). Η έρευνα πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο του έργου BioCoStent με στόχο την ανάπτυξη μίας καινοτόμου ενδοστεφανιαίας πρόθεσης που απελευθερώνει φάρμακο και χρήση βιοαποικοδομήσιμων βιοϋλικών, μέσω της *in silico* μοντελοποίησης, για τη θεραπεία και την αντιμετώπιση της καρδιαγγειακής νόσου. Το έργο επιχορηγήθηκε στα πλαίσια του προγράμματος «Ερευνώ-Δημιουργώ-Καινοτομώ», ΕΠΑνΕΚ 2014-2020. Η συνολική διάρκεια του προγράμματος ήταν 36

μήνες και συνολικό προϋπολογισμό 993.500,00 ευρώ. Το πανεπιστήμιο Ιωαννίνων συμμετείχε στο έργο BioCoStent μέσω της Μονάδας Ιατρικής Τεχνολογίας και Ευφύων Πληροφοριακών Συστημάτων (Medlab) και της Β' Καρδιολογικής κλινικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Λοιποί συμμετέχοντες φορείς στο έργο ήταν το πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, η FEAC AE, Rontis Hellas AE. Τα πειράματα διεξήχθησαν στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών, μετά από σχετική έγκριση του πρωτοκόλλου από την Επιτροπή Βιοηθικής του Ίδρυματος Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών και από την Γενική Διεύθυνση Περιφερειακής Αγροτικής Οικονομίας και Κτηνιατρικής Αττικής.

Για την διεξαγωγή του πρώτου σταδίου του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν 30 αρσενικοί κόνικλοι τύπου New Zealand, βάρους 2.5-3.5 κιλών. Η τοποθέτηση των stent έγινε στις λαγόνιες αρτηρίες των κόνικλων. Η επιλογή των λαγόνιων αρτηριών κόνικλου αποτελεί μία ευρέως αποδεδειγμένη μέθοδο, καθώς έχει αποδειχθεί ότι οι λαγόνιες αρτηρίες, των κόνικλων όπως και οι στεφανιαίες αρτηρίες χοίρων προσομοιάζουν στις ανθρώπινες αρτηρίες ως προς το μέγεθος, την πρόσβαση αλλά και την απάντηση στην ενδοθηλιακή βλάβη, επομένως επιτρέπουν μία αξιόπιστη πρώτη αξιολόγηση της ασφάλειας και της αποτελεσματικότητας των διάφορων ενδοαγγειακών συσκευών (272). Για την διεξαγωγή ενός έγκυρου πειράματος είναι ιδιαίτερα σημαντική η σωστή επιλογή μεγέθους του stent, καθώς και η τοποθέτηση του σε αγγεία χωρίς προηγούμενη βλάβη. Ένα stent θεωρείται κατάλληλο όταν η αναλογία θεραπείας προς αγγείο κυμαίνεται μεταξύ 1.0-1.1. Ωστόσο, το συγκεκριμένο μοντέλο δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί απόλυτα για την αξιολόγηση καταληκτικών σημείων επιβίωσης, θρομβωτικών συμβαμάτων ή άλλων επιπλοκών καθώς επιπλοκές όπως η υποξεία θρόμβωση ή οι αρρυθμίες καρδιακής προέλευσης

λόγω της φαρμακευτικής αγωγής ή της θεραπείας δεν μπορούν να συσχετιστούν με την τοποθέτηση συσκευών σε περιφερικά αγγεία (273).

Στη δεύτερη φάση του πειράματος, χρησιμοποιήθηκαν 12 χοίροι, βάρους 50-55 κιλών. Η τοποθέτηση των stent έγινε στις στεφανιαίες αρτηρίες. Εμφυτεύθηκε ένα stent στη δεξιά στεφανιαία αρτηρία και ένα στο αριστερό σύστημα των στεφανιαίων αρτηριών, είτε στον πρόσθιο κατιόντα κλάδο είτε στην περισπώμενη αρτηρία. Το στεφανιαίο αρτηριακό σύστημα των χοίρων εμφανίζει πολλές ομοιότητες με το ανθρώπινο στεφανιαίο δίκτυο, με αγγεία παρόμοιας διαμέτρου. Ωστόσο, παρατηρείται σημαντική διαφορά ως προς το σχήμα και τον προσανατολισμό της καρδιάς μέσα στο θώρακα. Η καρδιά στους χοίρους εμφανίζει κωνοειδές σχήμα και έχει περισσότερο κεντρικό προσανατολισμό μέσα στο θώρακα. Για το λόγο αυτό είναι απαραίτητη η λήψη τροποποιημένων τομών από των αγγειογράφο. Χρησιμοποιήθηκαν οι AP cranial και η RAO cranial για την απεικόνιση του αριστερού στεφανιαίου συστήματος και η LAO για την απεικόνιση της δεξιάς στεφανιαίας αρτηρίας, σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία (274).

2.1 Πειραματική διαδικασία

Στα πειραματόζωα κονίκλων χορηγήθηκε διαχωριστική αναισθησία μέσω της ενδομυϊκής οδού. Χρησιμοποιήθηκε κεταμίνη σε δοσολογία 35mg ανά κιλό και ξυλαζίνη 7mg ανά κιλό, ενώ ταυτόχρονα είχαν συνεχή παρακολούθηση της καρδιαγγειακής λειτουργίας μέσω περιφερικού οξύμετρου. Στη συνέχεια, τοποθετήθηκαν και ακινητοποιήθηκαν σε ύπτια θέση κάτω από τον χειροκίνητο αγγειογράφο (C-arm) και ακολούθως, πραγματοποιήθηκε ο καθετηριασμός της

κεντρικής ωτιαίας αρτηρίας, από μία ομάδα που περιλάμβανε έναν εκπαιδευόμενο και έναν έμπειρο επεμβατικό καρδιολόγο. Διαμέσου του καθετηριασμού της κεντρικής ωτιαίας αρτηρίας διενεργήθηκε η εκλεκτική αγγειογραφία και η τοποθέτηση των stent στις λαγόνιες αρτηρίες. Η κεντρική ωτιαία αρτηρία διατρέχει σε ευθεία πορεία όλη την οπίσθια επιφάνεια του ωτός του κονίκλου και αποτελεί κύριο κλάδο της έξω καρωτίδας και κύρια πηγή αιμάτωσης του ωτός. Αντίστοιχα, το φλεβικό σύστημα του ωτός αποτελείται από την ουραία ωτιαία φλέβα (caudal auricular vein), η οποία βρίσκεται στο πίσω μέρος του ωτός και παροχετεύει το αίμα από το πτερυγίο του ωτός προς την έξω σφαγίτιδα φλέβα. Η διάμετρος των αγγείων του πτερυγίου είναι περίπου 1 χιλιοστό, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις μπορεί να φθάσει μέχρι και τα 2 χιλιοστά. Αρχικά, η οπίσθια επιφάνεια των ωτών αμφοτερόπλευρα ξυρίστηκε και αποστειρώθηκε με την χρήση ιωδιούχου διαλύματος (Betadine). Στη συνέχεια, η κεντρική ωτιαία αρτηρία παρακεντήθηκε στο ύψος του περιφερικού ημιμορίου του πτερυγίου. Για την παρακέντηση χρησιμοποιήθηκε ενδοφλέβιος καθετήρας 22-gauge. Η κεντρική βελόνα του καθετήρα αφαιρέθηκε και ένα υδρόφιλο σύρμα-οδηγός (V18, Boston scientific, MA) εισήχθη προσεκτικά και προωθήθηκε υπό ακτινοσκοπική καθοδήγηση στην έξω καρωτίδα, στο αορτικό τόξο και στην κατιούσα αορτή έως την θωρακική αορτή. Ο φλεβοκαθετήρας αφαιρέθηκε και πραγματοποιήθηκε μία τομή του δέρματος περίπου τριών εκατοστών από σημείο της παρακέντησης και κατά μήκος του σύρματος- οδηγού μέχρι τη βάση της ραχιαίας επιφάνειας του πτερυγίου με τη χρήση νυστεριού. Ακολούθησαν διαδοχικές διατάσεις της αρτηρίας με τη χρήση αγγειοδιαστολέα διαμέσου του σύρματος- οδηγού. Οι αγγειοδιαστολή ήταν απαραίτητη ώστε να αφαιρεθεί ο περιβάλλον στενωτικός αρτηριακός ιστός και να προετοιμαστεί κατάλληλα το πεδίο για την

εισαγωγή του αρτηριακού θηκαριού. Στη συνέχεια, ένα θηκάρι 4-F (Radifocus Introducer II, Terumo, Tokyo, Japan) συμβατό με το 0.018-inch σύρμα εισήχθη διαμέσου του σύρματος-οδηγού, το οποίο προωθήθηκε μέχρι την έξω καρωτίδα και χορηγήθηκε ενδαρτηριακά κλασική ηπαρίνη (100 UI/kg). Διαμέσου του θηκαριού και με βάση το σύρμα-οδηγό εισήχθη ένας καθετήρας 4-F (Impress VER-H, Merit Medical, USA), ο οποίος προωθήθηκε μέχρι το άπω τμήμα της αορτής και πραγματοποιήθηκε η πρώτη αγγειογραφία ώστε να εκτιμηθεί οπτικά η διάμετρος των αγγείων- στόχων και να καθοδηγήσει την πρόσβαση στις λαγόνιες αρτηρίες, που αποτελούσαν τα σημεία τοποθέτησης των stent. Μετά την αγγειογραφία, αφαιρέθηκε το σύρμα-οδηγός 0.018-inch και αντικαταστάθηκε από ένα μικρότερο σύρμα-οδηγό 0.014-inch (Lotus II, Rontis, Switzerland), το οποίο προωθήθηκε μέχρι τις μηριαίες αρτηρίες. Τέλος, εισήχθησαν τα stent, τα οποία προωθήθηκαν και τοποθετήθηκαν λίγα εκατοστά μετά την έκφυση των λαγόνιων αρτηριών. Εφαρμόστηκε διάταση 20atm για 20 δευτερόλεπτα. Η σωστή τοποθέτηση και έκπτυξη των στεντ επιβεβαιώθηκε με μία τελική αγγειογραφία, ενώ παράλληλα εκτιμήθηκαν η βατότητα των αγγείων και η παρουσία πιθανής επιπλοκής, όπως ο σχηματισμός θρόμβου, η παρουσία διαχωρισμού, η υπο-έκπτυξη του στεντ κ.α.

Σε έναν μικρό αριθμό πειραματόζων (N=4), μετά την αρχική τοποθέτηση των stent διενεργήθηκε επιπλέον απεικόνιση των stent με τη χρήση οπτικής τομογραφίας συνοχής. Ο σκοπός της διενέργειας αυτής της απεικονιστικής μεθόδου είναι να εκτιμηθεί τόσο η σωστή τοποθέτηση και έκπτυξη των stent, αλλά και για την ταυτόχρονη λήψη δεδομένων, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν σε παράλληλη πειραματική μελέτη για την *in silico* προσομοίωση της διαδικασίας διαστολής. Στις περιπτώσεις, όπου διενεργήθηκε οπτική τομογραφία συνοχής ακολουθήθηκε η ίδια

διαδικασία, με τις εξής δύο διαφορές: 1) αντί για το θηκάρι 4-F (Radifocus Introducer II, Terumo, Tokyo, Japan), χρησιμοποιήθηκε ένα θηκάρι 5-F, συμβατό με 0.035-inch (Terumo, Tokyo, Japan), το οποίο είναι μικρότερης εξωτερικής διαμέτρου, αλλά επιτρέπει τη χρήση μεγαλύτερων καθετήρων (slender introducer), 2) χρήση μεγαλύτερου αγγειογραφικού καθετήρα 5F (Envoy MPC, Codman, USA), ο οποίος επιτρέπει την είσοδο της συσκευής της οπτικής τομογραφίας. Η οπτική τομογραφία πραγματοποιήθηκε χωρίς τη χρήση ιωδιούχου σκιαγραφικού αλλά έγινε έκπλυση με φυσιολογικό ορό. Μετά την ολοκλήρωση του καθετηριασμού και της αγγειοπλαστικής, το θηκάρι αφαιρέθηκε και εφαρμόστηκε εξωτερική αιμοστατική συμπίεση περίπου 10 λεπτών.

Στη συνέχεια, τα πειραματόζωα μεταφέρθηκαν μετά την ολοκλήρωση της τοποθέτησης των stent σε ξεχωριστά κλουβιά από ατσάλι, όπου παρακολουθούνταν από εξειδικευμένο κτηνίατρο για διάρκεια τεσσάρων εβδομάδων. Στο τέλος της περιόδου μελέτης, τα πειραματόζωα θανατώθηκαν και ακολούθησε αφαίρεση των τμημάτων των αρτηριών που περιείχαν το stent και διενέργεια ιστομορφομετρικής και ιστοπαθολογικής αξιολόγησης. Στα ζώα δεν χορηγήθηκε αντιαιμοπεταλιακή αγωγή κατά τη διάρκεια του πειράματος.

Στα πειραματόζωα χοίρων πραγματοποιήθηκε ομοίως διαχωριστική αναισθησία. Χορηγήθηκε αρχικά κεταμίνη 3mg ανά κιλό και ξυλαζίνη 1,5mg ανά κιλό ενδομυϊκά εφάπαξ. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε φλεβικός καθετήρας και σταθεροποιήθηκε με συρραφή επί του δέρματος. Το πειραματόζωο μεταφέρθηκε και τοποθετήθηκε στον αγγειογράφο, όπου ακινητοποιήθηκε σε ύπτια θέση. Τοποθετήθηκε ρινικό οξυγόνο 10L/min, ενώ ταυτόχρονα είχαν συνεχή παρακολούθηση της καρδιαγγειακής λειτουργίας μέσω περιφερικού οξύμετρου.

Τέλος, χορηγήθηκε προποφόλη 1% έως 25mg μέγιστη συνολική δόση αναλόγως των ζωτικών σημείων του πειραματόζωου και της ανταπόκρισής του στην παραπάνω αναισθησία. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε ο καθετηριασμός της δεξιάς επιπολής μηριαίας αρτηρίας μέσω υπερηχογραφικής καθοδήγησης, από μία ομάδα που περιλάμβανε έναν εκπαιδευόμενο και έναν έμπειρο επεμβατικό καρδιολόγο. Χορηγήθηκε ηπαρίνη (100 IU.Kg, ενδαρτηριακά). Διαμέσου του καθετηριασμού της επιπολής μηριαίας αρτηρίας διενεργήθηκε η εκλεκτική αγγειογραφία και η τοποθέτηση των stent στις στεφανιαίες αρτηρίες. Τα πειραματόζωα ελάμβαναν διπλή αντιαιμοπεταλιακή αγωγή (ασπιρίνη 100 mg και κλοπιδογρέλη 75mg). Η ιστομορφομετρική και ιστοπαθολογική αξιολόγηση των τμημάτων που περιείχαν τα stent δεν έχει ολοκληρωθεί προς το παρόν λόγω έλλειψης οικονομικών πόρων.

2.2 Τύποι ενδοστεφανιαίας πρόθεσης

Συνολικά εμφυτεύθηκαν εξήντα (60) προθέσεις σε λαγόνιες αρτηρίες τριάντα (30) κονίκλων. Δύο (2) stent ίδιου τύπου ανά ζώο, ένα (1) σε κάθε αρτηρία. Μελετήθηκαν δέκα (10) ομάδες διαφορετικών stent, κάθε ομάδα περιελάμβανε έξι (6) stent.

Για την κατασκευή των υπό μελέτη stent αποδέσμευσης φαρμάκου (DES) χρησιμοποιήθηκε αρχικά stent χωρίς επικάλυψη (BMS) από μεταλλικό πλέγμα κοβαλτίου-χρωμίου (Leader Plus, Rontis, Zug, Switzerland) διαστάσεων μήκους 12 χιλ και διαμέτρου 2.50 χιλ (12mm x 2.5mm). Στη συνέχεια, επικαλύφθηκε με ένα μείγμα αποτελούμενο από πολυμερές και φάρμακο. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν δύο

διαφορετικά είδη πολυμερών, το πολυμερές 'Α' το οποίο αποτελείται από πολύ-λακτιδιο-συν-γλυκολίδιο (poly lactic-co-glycolic acid- PLGA) και το πολυμερές 'Β' το οποίο αποτελείται από πολύ-λακτίδιο (poly lactic acid- PLA). Σε κάθε ομάδα πολυμερούς προστέθηκε το φάρμακο του ρετινοϊκού οξέος σε τρεις (3) διαφορετικές δόσεις, μικρή ('L',Low), μεσαία ('M',Medium) και υψηλή δόση ('H',High). Ως αποτέλεσμα δημιουργήθηκαν τρεις υπο-ομάδες για το κάθε πολυμερές. Για το πολυμερές 'Α', προέκυψαν οι υπο-ομάδες 'AL' η οποία περιείχε 48μg/mm ρετινοϊκού οξέος, 'AM' η οποία περιείχε 77μg/mm ρετινοϊκού οξέος, 'AH' η οποία περιείχε 112μg/mm ρετινοϊκού οξέος. Για το πολυμερές 'Β', οι υπο-ομάδες 'BL' για την χαμηλή δόση ρετινοϊκού οξέος η οποία περιείχε 48 μg/mm, 'BM' για την μεσαία δόση η οποία περιείχε 77 μg/mm, 'BH' για την υψηλή δόση η οποία περιείχε 135 μg/mm. Ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά του ρετινοϊκού οξέος είναι η αποδόμησή του στην έκθεση της υπεριώδους ακτινοβολίας και του οξυγόνου. Στο πλαίσιο αυτό, κατά την κατασκευή των stent, και ιδιαίτερα κατά την επίστρωση και αποθήκευση αυτών, ελήφθησαν όλες οι προαπαιτούμενες προφυλάξεις για την προστασία του φαρμάκου από τυχόν έκθεση στο φως και στο οξυγόνο, ώστε να αποφευχθεί η αποδόμησή του και συνεπώς η δραστηριότητά του. Συγκεκριμένα, κατά την προετοιμασία των μειγμάτων επίστρωσης, η επεξεργασία του φαρμάκου πραγματοποιήθηκε υπό αμυδρό κίτρινο φως, ενώ μετά την επίστρωση και την επισφράγιση τους στους καθετήρες, τα συστήματα των stent συσκευάστηκαν σε αδιαφανή πακέτα από ειδικό αλουμινόχαρτο με απορροφητικές ιδιότητες υγρασίας και οξυγόνου. Επιπλέον, μετά την κατασκευή των stent διενεργήθηκαν περαιτέρω έλεγχοι ποιότητας, ώστε να εξασφαλιστεί η τοποθέτηση σωστής ποσότητας του φαρμάκου στα stent.

Για τις ομάδες ελέγχου κατασκευάστηκαν δύο διαφορετικές ομάδες stent. Τα stent αυτά αποτελούνταν από το ίδιο μεταλλικό πλέγμα κοβαλτίου-χρωμίου (Leader Plus, Rontis, Zug, Switzerland) διαστάσεων μήκους 12 χιλ και διαμέτρου 2.50 χιλ (12mm x 2.5mm). Το φάρμακο το οποίο επιλέχθηκε ως φάρμακο αποδέσμευσης και στις δύο ομάδες ήταν το εβερόλιμους. Στη μία ομάδα έγινε επίστρωση με το πολυμερές 'Α' και στη δεύτερη ομάδα με το πολυμερές 'Β'. Οι ομάδες αυτές ονομάστηκαν ομάδα 'ΕΓ' και 'ΕΓ' αντίστοιχα. Επιπλέον, ως ομάδες ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν το εμπορικό διαθέσιμο stent αποδέσμευσης φαρμάκου εβερόλιμους (Xience Pro Everolimus Coronary Stent System, Abbott vascular, Santa Clara, USA), διαστάσεων μήκους 12 χιλ και διαμέτρου 2.5 χιλ., καθώς και το stent μη αποδέσμευσης φαρμάκου (BMS, Rontis, Zug, Switzerland), μεταλλικού πλέγματος κοβαλτίου-χρωμίου και όμοιων διαστάσεων μήκους 12 χιλ και διαμέτρου 2.5 χιλ (Πίνακας 2).

Πίνακας 2. Τύπος ενδοστεφανιαίας πρόθεσης προς αξιολόγηση

Ομάδα	Πολυμερές	Φάρμακο	Δόση φαρμάκου (μg/12 mm στεντ)	Ονοματολογία ιστολογικής αξιολόγησης	Διαστάσεις [μήκος (mm) x διάμετρο (mm)]
AL	A (PLGA)	RA	48	Test Item 1 (TI 1)	2.5 x 12
AM	A (PLGA)	RA	77	Test Item 2 (TI 2)	2.5 x 12
AH	A (PLGA)	RA	112	Test Item 3 (TI 3)	2.5 x 12
BL	B (PLA)	RA	48	Test Item 4 (TI 4)	2.5 x 12
BM	B (PLA)	RA	77	Test Item 5 (TI 5)	2.5 x 12
BH	B (PLA)	RA	135	Test Item 6 (TI 6)	2.5 x 12
C	-	-	-	Test Item 7 (TI 7)	2.5 x 12

D	Fluoropolymer (poly(vinylidene fluoride- co-hexafluoropropylene) and poly(<i>n</i> -butyl methacrylate)	Everolimus	58	Test Item 8 (TI 8)	2.5 x 12
EF	A (PLGA)	Everolimus	92	Reference Item 1 (RI 1)	2.5 x 12
EG	B (PLA)	Everolimus	92	Reference Item 2 (RI 2)	2.5 x 12

2.3 Νεκροψία και ιστομορφομετρία

Μετά από μία περίοδο παρακολούθησης διάρκειας τεσσάρων εβδομάδων, τα ζώα θανατώθηκαν και πραγματοποιήθηκε λήψη των τμημάτων των αρτηριών που περιείχαν τα stent για την διενέργεια ιστο-παθολογικής ανάλυσης. Η ευθανασία και νεκροτομή πραγματοποιήθηκαν στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών, όπου φυλάσσονταν τα ζώα. Για την ευθανασία χρησιμοποιήθηκε ενέσιμη νατριούχος πεντοβαρβιτόλη, ενώ η νεκροτομή διενεργήθηκε από έμπειρο κτηνίατρο. Στη συνέχεια ακολούθησε η αφαίρεση των τμημάτων των αρτηριών στα οποία είχε εμφυτευθεί το stent. Τα επεξεργασμένα τμήματα των αρτηριών διατηρήθηκαν σε ρυθμιστική φορμόλη 10% και μεταφέρθηκαν για την πραγματοποίηση της ιστολογικής, απεικονιστικής και ιστοπαθολογικής μελέτης. Η ιστολογική και ιστομορφομετρική ανάλυση πραγματοποιήθηκαν σε ανεξάρτητο εργαστήριο (Anapath Services, GmbH, Switzerland), πιστοποιημένο με την 'Ορθή Εργαστηριακή Πρακτική' (Good Laboratory Practice), από πιστοποιημένο κτηνίατρο παθολογοανατόμο. Η διαδικασία επεξεργασίας των δειγμάτων των αρτηριών από τα σημεία εμφύτευσης των stent περιλάμβανε ενσωμάτωση αυτών σε ρητίνη μεθακρυλικού μεθυλίου (MMA), κοπή σε τομές με εγκάρσια κατεύθυνση με χρήση διαμαντοτροχού (EXAKT System) και λείανση έως ότου αποκτήσουν τελικό πάχος

περίπου 40-60μm (EXAKT System). Μία τομή από κάθε δείγμα χρωματίστηκε με τροποποιημένη χρώση Paragon, σύμφωνα με τις Τυπικές Διαδικασίες Λειτουργίας (Standard Operating Procedures). Στη συνέχεια ακολούθησε έλεγχος ποιότητας των παρασκευασμάτων. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν στον παθολογοανατόμο για την ιστοπαθολογική ανάλυση. Τα δεδομένα που προέκυπταν από την μικροσκοπική ανάλυση καταγράφονταν από τον παθολογοανατόμο και εισάγονταν κατευθείαν σε βάση δεδομένων Excel καθ' όλη τη διάρκεια την ιστοπαθολογικής μελέτης. Οι παράμετροι που εξετάστηκαν στην ιστοπαθολογική μελέτη είναι εναρμονισμένοι με το σύστημα βαθμονόμησης όπως περιγράφεται στο ISO 10993-6:2016(E).

2.4 Παράμετροι αξιολόγησης

Οι παράμετροι αξιολόγησης της ιστοπαθολογικής μελέτης είναι α) η αρτηριακή αντίδραση, η οποία περιλαμβάνει το ποσοστό απώλειας ενδοθηλίου (%), την επιφάνεια σχηματισμού ινώδους ή/και αιμοπεταλιακού θρόμβου, την υπερπλασία του έσω χιτώνα, την παρουσία λείων μυϊκών κυττάρων στον υπερπλαστικό έσω χιτώνα, την παρουσία πρωτεογλυκανών και κολλαγόνου, β) η παρουσία φλεγμονής στο αρτηριακό τοίχωμα, σε επίπεδο έσω/μέσου χιτώνα και σε επίπεδο έξω χιτώνα, γ) η απώλεια των λείων μυϊκών κυττάρων του μέσου χιτώνα, σε διατοιχωματικό επίπεδο και σε μορφή κυκλοτερούς απώλειας, δ) η αντικατάσταση του ιστού του αρτηριακού τοιχώματος από πρωτεογλυκάνες, κολλαγόνο ή/και από κύτταρα του έξω χιτώνα, ε) η ανοσολογική αντίδραση του ξενιστή στο stent, όπως παρουσία πολυμορφοπύρηνων, λεμφοκυττάρων, πλασματοκυττάρων, μακροφάγων, γιγαντοκυττάρων, νέκρωσης, ίνωσης, αιμορραγία γύρω από τις δοκίδες του

στεντ/εναπόθεση ινώδους, νέο-αγγείωση και λιπώδης διήθηση), στ) η ρήξη της ελαστικής μεμβράνης, είτε εξωτερική είτε εσωτερική, ι) η υπερτροφία μέσου χιτώνα, είτε εστιακή είτε διάχυτη. Η αξιολόγηση των δεδομένων έγινε με βάση το προσαρμοσμένο σύστημα βαθμολόγησης κατά ISO 10993-6:2016(E), σύμφωνα με το οποίο κάθε παράμετρος βαθμολογήθηκε από το 0 έως το 4 ανάλογα με τα ιστολογικά ευρήματα (Πίνακας 3). Σύμφωνα με τον ορισμό του ISO 10993-6:2016(E) η βαθμολογία προκύπτει από τη σύγκριση με ένα υλικό αναφοράς και συνεπώς διαμορφώθηκε ως εξής: 0.0-2,9 αντιστοιχεί σε καμία ή ελάχιστη αντίδραση του ξενιστή, 3.0-8.9 αντιστοιχεί σε ήπια αντίδραση του ξενιστή, 9.0- 15.0 αντιστοιχεί σε μέτρια αντίδραση του ξενιστή, ≥ 15.1 αντιστοιχεί σε σοβαρή αντίδραση του ξενιστή. Για την σάρωση των αρτηριακών τεμαχίων χρησιμοποιήθηκε ένας σαρωτής τεμαχίων Olympus Slideview VS200, εξοπλισμένος με κάμερα Olympus U-TV1XC και φακό αντικειμένων 20x.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ποσοτική αξιολόγηση των ευρημάτων μέσω ανάλυσης της εικόνας για κάθε δείγμα αρτηρίας. Η αξιολόγηση περιλάμβανε τις εξής παραμέτρους: το εμβαδόν εντός της έξω ελαστικής μεμβράνης (EEL, μm^2), το εμβαδόν εντός της έσω ελαστικής μεμβράνης (IEL, μm^2), τη διάμετρο του αυλού του αγγείου (μm^2), το μέγεθος της έσω στιβάδας του αρτηριακού τοιχώματος (υπολογισμός: IEL- αυλός, μm^2), το μέγεθος της μέσου στιβάδας του αρτηριακού τοιχώματος (υπολογισμός: EEL- IEL, μm^2), το ποσοστό στένωσης του αυλού του αγγείου [υπολογισμός: $100 - (100 \times \text{αυλός} / \text{IEL}, \%)$], την πάχυνση της έσω στιβάδας του αρτηριακού τοιχώματος (υπολογισμός: μέση τιμή από δέκα περίπου ισαπέχοντα σημεία μέτρησης του πάχους, μm^2) (εικόνα 5). Οι αριθμητικοί μέσοι όροι των παραπάνω παραμέτρων χρησιμοποιήθηκαν για περαιτέρω περιγραφική στατιστική

ανάλυση. Στο παράρτημα Ι παρουσιάζονται ενδεικτικές εικόνες, μία για κάθε ομάδα, με τις μετρήσεις όπως πραγματοποιήθηκαν. Για την ποσοτική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό απεικόνισης και ανάλυσης εικόνας της Olympus, cellSens, έκδοση 1.18.

Τα δείγματα των αρτηριών δεν υπέστησαν έκπλυση κατά την λήψη τους ώστε να μην αλλοιωθεί το δείγμα και η ενδεχόμενη παρουσία τοπικού θρόμβου. Ως αποτέλεσμα, ήταν συχνή η παρουσία ερυθρών αιμοσφαιρίων στον αυλό των αρτηριών, με τη μορφή στρογγυλών ανώριμων κυττάρων χωρίς εμφανή πυρήνα.

Πίνακας 3. Παράμετροι αξιολόγησης κατά την ιστοπαθολογική εξέταση, προσαρμοσμένες στο σύστημα βαθμολόγησης που περιγράφεται στο ISO 10993-6:2016(E).

Παράμετροι προς αξιολόγηση	Βαθμολογία				
Αρτηριακή αντίδραση	0	1	2	3	4
Απώλεια ενδοθηλίου (%)	0	Σπάνια, 1-5/οπμμ	5-10/ οπμμ	10-20/ οπμμ	>20/ οπμμ
Επιφάνεια (Ινώδους/αιμοπεταλιακού θρόμβου)	0	πολύ μικρή εστία, εκτεινόμενη σε 1 έως 5 ενδοθηλιακά κύτταρα	μικρή εστία, εκτεινόμενη σε περίπου 5–10 ενδοθηλιακά κύτταρα	εκτεινόμενη σε περίπου 10-20 ενδοθηλιακά κύτταρα	εκτεινόμενη σε >20 ενδοθηλιακά κύτταρα
υπερπλασία του έσω χιτώνα	0	μικρή εστία	δύο μικρές εστίες ή επιμήκης εναπόθεση που καταλαμβάνει <20% του αυλού και φθάνει σε ύψος έως το διπλάσιο του έσω χιτώνα	εκτεταμένη γραμμική εναπόθεση <40% του αυλού, με μέγιστο ύψος έως 3× του έσω χιτώνα	Εκτεταμένη γραμμική εναπόθεση >40% του αυλού, με ύψος >3× του έσω χιτώνα
Λεία μυϊκά κύτταρα στον υπερπλαστικό έσω χιτώνα	0	μικρή εστία	δύο μικρές εστίες ή επιμήκης εναπόθεση που καταλαμβάνει <20% του αυλού και φθάνει σε ύψος έως το διπλάσιο του έσω χιτώνα	εκτεταμένη γραμμική εναπόθεση <40% του αυλού, με μέγιστο ύψος έως 3× του έσω χιτώνα	Εκτεταμένη γραμμική εναπόθεση >40% του αυλού, με ύψος >3× του έσω χιτώνα

Πρωτεογλυκάνη/κολλαγόνο	0	μικρή εστία	δύο μικρές εστίες ή επιμήκης εναπόθεση που καταλαμβάνει <20% του αυλού και φθάνει σε ύψος έως το διπλάσιο του έσω χιτώνα	εκτεταμένη γραμμική εναπόθεση <40% του αυλού, με μέγιστο ύψος έως 3× του έσω χιτώνα	Εκτεταμένη γραμμική εναπόθεση >40% του αυλού, με ύψος >3× του έσω χιτώνα
Υπολογισμός	Υποσύνολο (x2)				
Αρτηριακή φλεγμονή	Βαθμολογία				
	0	1	2	3	4
Εσω/μέσο χιτώνα	0	Ελάχιστη εστία	2–3 απομακρυσμένες εστίες	Συγχωνευμένες αλλοιώσεις καλύπτουν περίπου το 20% της επιφάνειας του αυλού	Φλεγμονώδης διεργασία που καλύπτει >20% της στοχευμένης περιοχής
Έξω χιτώνα	0	Ελάχιστη εστία	2–3 απομακρυσμένες εστίες	Συγχωνευμένες αλλοιώσεις καλύπτουν περίπου το 20% της έξω επιφάνειας	Φλεγμονώδης διεργασία που καλύπτει >20% της στοχευμένης περιοχής
Υπολογισμός	Υποσύνολο (x2)				
Απώλεια λείων μυϊκών κυττάρων μέσου χιτώνα	Βαθμολογία				
	0	1	2	3	4
Διατοιχωματική απώλεια	0	Ελάχιστη εστία	2–3 απομακρυσμένες εστίες	Συγχωνευμένες αλλοιώσεις καλύπτουν περίπου το 20% της στοχευμένης περιοχής	καλύπτει >20% της στοχευμένης περιοχής
Κυκλοτερής απώλεια	0	Ελάχιστη εστία	2–3 απομακρυσμένες εστίες	Συγχωνευμένες αλλοιώσεις καλύπτουν περίπου το 20% της στοχευμένης περιοχής	καλύπτει >20% της στοχευμένης περιοχής
Υπολογισμός	Υποσύνολο (x2)				
Αντικατάσταση αρτηριακού τοιχώματος	Βαθμολογία				
	0	1	2	3	4
Πρωτεογλυκάνες	0	Ελάχιστη εστία	2–3 απομακρυσμένες εστίες	Συγχωνευμένες αλλοιώσεις καλύπτουν περίπου το 20% της στοχευμένης περιοχής	καλύπτει >20% της στοχευμένης περιοχής
Κολλαγόνο	0	Ελάχιστη εστία	2–3 απομακρυσμένες εστίες	Συγχωνευμένες αλλοιώσεις καλύπτουν περίπου το 20% της	καλύπτει >20% της στοχευμένης περιοχής

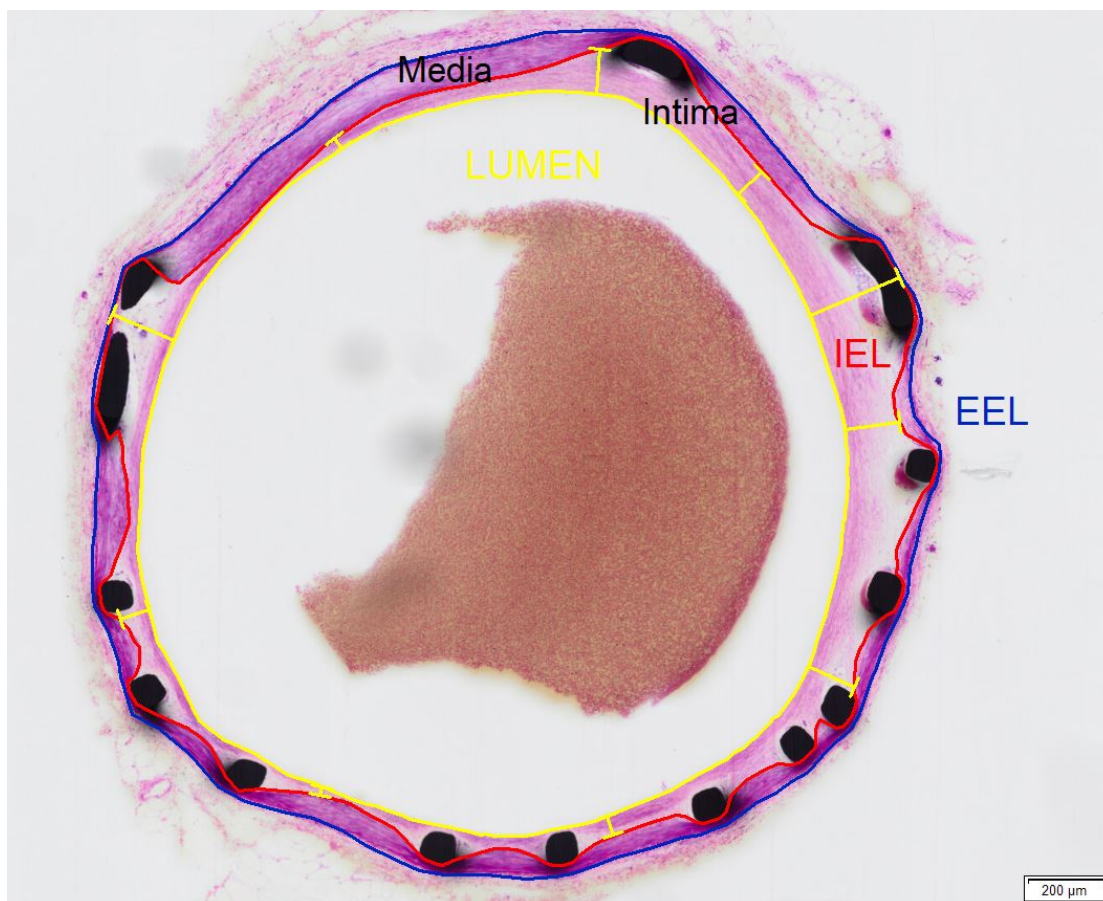
				στοχευμένης περιοχής	
Κύτταρα του έξω χιτώνα	0	Ελάχιστη εστία	2–3 απομακρυσμένες εστίες	Συγχωνευμένες αλλοιώσεις καλύπτουν περίπου το 20% της στοχευμένης περιοχής	καλύπτει >20% της στοχευμένης περιοχής
Υπολογισμός	Υποσύνολο				
Ανοσολογική αντίδραση ξενιστή στο στεντ	Βαθμολογία				
	0	1	2	3	4
Πολυμορφοπύρρηνα	0	Σπάνια, 1-5/οπμμ	5-10/ οπμμ	Εκτεταμένη διήθηση	Συμπυκνωμένη
Λεμφοκύτταρα	0	Σπάνια, 1-5/οπμμ	5-10/ οπμμ	Εκτεταμένη διήθηση	Συμπυκνωμένη
Πλασματοκύτταρα	0	Σπάνια, 1-5/οπμμ	5-10/ οπμμ	Εκτεταμένη διήθηση	Συμπυκνωμένη
Μακροφάγα	0	Σπάνια, 1-5/οπμμ	5-10/ οπμμ	Εκτεταμένη διήθηση	Συμπυκνωμένη
Γιγαντοκύτταρα	0	Σπάνια, 1-5/οπμμ	3-5/ οπμμ	Εκτεταμένη διήθηση	Πλάκες
Νέκρωση	0	Ελάχιστη	Ήπια	Μέτρια	Σοβαρή
Υπολογισμός	Υποσύνολο (x2)				
Ίνωση	0	Λεπτού πάχους ζώνη	μέτριου πάχους ζώνη	Παχιά ζώνη	Εκτεταμένου πάχους ζώνη
Αιμορραγία γύρω από τις δοκίδες του στεντ/εναπόθεση ινώδους	0	Ελάχιστη	Ήπια	Μέτρια	Εκτεταμένη
Νέο-αγγείωση	0	Ελάχιστη	Ήπια	Μέτρια	Εκτεταμένη
Λιπώδης διήθηση	0	Minimal amount off at associated with fibrosis	Several layers of fat and fibrosis	Elongated and broad accumulation of fat calls about the implant site	Extensive fat surrounding the implant
Υπολογισμός	Υποσύνολο				
Ρήξη ελαστικής μεμβράνης	Βαθμολογία				
	0	1	2	3	4
Εξωτερική	0	1–3 εστιακές ρωγμές	Συγχωνευόμενες εστιακές διακοπές εντοπίζονται σε ~10% του μήκους	Συγχωνευόμενες εστιακές διακοπές εντοπίζονται στο 10–30% του μήκους	Συγχωνευόμενες εστιακές διακοπές εντοπίζονται σε >30% του μήκους

Εσωτερική	0	1–3 εστιακές ρωγμές	Συγχωνευόμενες εστιακές διακοπές εντοπίζονται σε ~10% του μήκους	Συγχωνευόμενες εστιακές διακοπές εντοπίζονται στο 10–30% του μήκους	Συγχωνευόμενες εστιακές διακοπές εντοπίζονται σε >30% του μήκους
Υπολογισμός	Υποσύνολο (x2)				
Υπερτροφία μέσου χιτώνα	Βαθμολογία				
	0	1	2	3	4
εστιακή	0	Ελάχιστη εστία	2–3 απομακρυσμένες εστίες	Συγχωνευμένες αλλοιώσεις καλύπτουν περίπου το 20% της στοχευμένης περιοχής	Συγχωνευμένες αλλοιώσεις καλύπτουν περίπου > 20% της στοχευμένης περιοχής
διάχυτη	0	X 0.5 αύξηση απόσταση ινών ρετικουλίνης	X 1 αύξηση απόσταση ινών ρετικουλίνης	X 1.5 αύξηση απόσταση ινών ρετικουλίνης	X 2 αύξηση απόσταση ινών ρετικουλίνης
Υπολογισμός	Υποσύνολο (x2)				
Τελικό σκορ	Υπολογισμός ολικού δείγματος				
	Συνολικός αριθμός ανά ομάδα				
	Μέσος όρος				

Οπμμ: οπτικό πεδίο μεγάλης μεγέθυνσης

Εικόνα 5. Ενδεικτική εικόνα με εμφανιζόμενες μετρήσεις. Ζώο αριθ. 1050, μέση διατομή, αριστερή λαγόνιος αρτηρία, Ομάδα ΑΗ, Paragon, φακός x20.

Η εικόνα παρουσιάζει τις παραμέτρους μέτρησης: εξωτερική ελαστική μεμβράνη (EEL), εσωτερική ελαστική μεμβράνη (IEL), αυλός, έσω χιτώνας (Intima) και μέσο χιτώνα (Media). Για τη μέτρηση του πάχους του έσω χιτώνα χρησιμοποιήθηκαν περίπου δέκα ισαπέχουσες μετρήσεις.



2.5 Στατιστική ανάλυση

Για την στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Prism 8 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Για την ανάλυση των περιγραφικών παραμέτρων χρησιμοποιήθηκαν το μέσο εμβαδόν, το εμβαδόν της έσω στιβάδας, το ποσοστό στένωσης και η πάχυνση του έσω χιτώνα. Για τον έλεγχο της κανονικότητας των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το τεστ Shapiro-Wilk. Στις περιπτώσεις που τα δεδομένα παρουσίαζαν κανονική κατανομή, η σύγκριση έγινε με τη χρήση t-ελέγχου για ανεξάρτητα δείγματα. Στις περιπτώσεις που δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή, για την ανάλυσή τους χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος Mann-Whitney. Για τον παράγοντα p , τιμή χαμηλότερη από 0.05 θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική.

3. Αποτελέσματα

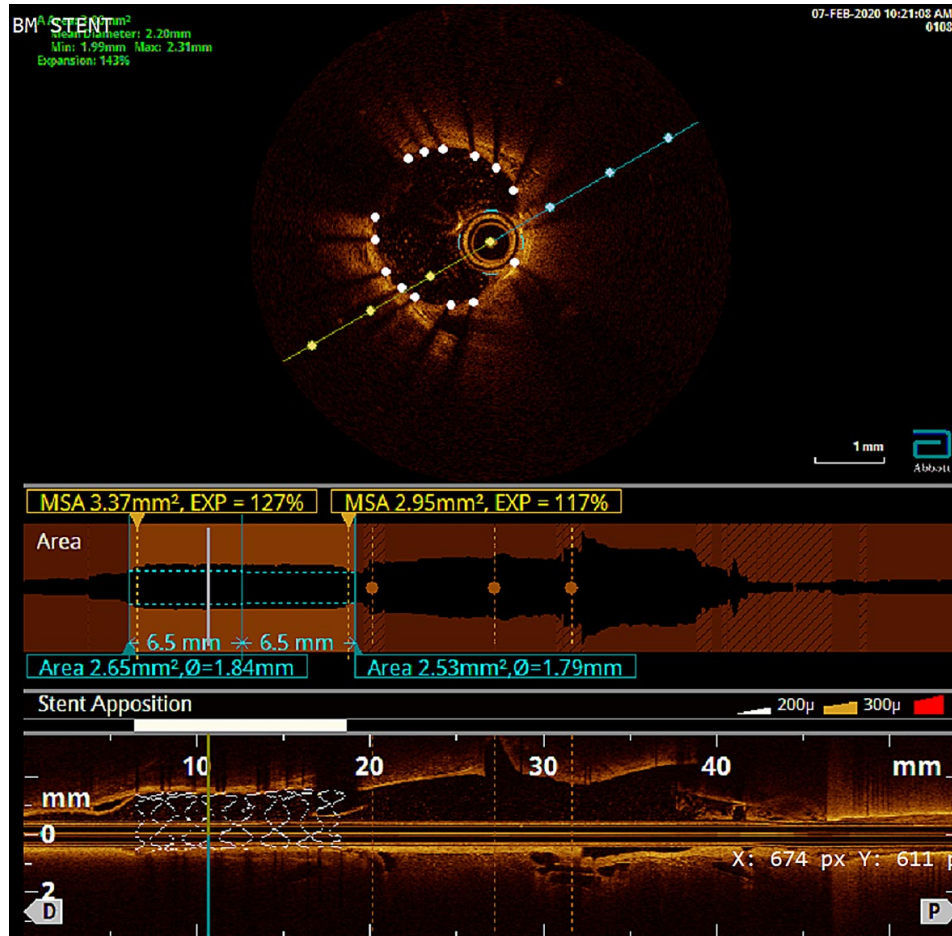
Η έκπτυξη των stent στις αρτηρίες ήταν επιτυχημένη σε όλα τα πειραματόζωα. Η τοποθέτησή τους ελέγχθηκε σε κάθε ζώο με μία τελική αγγειογραφία. Επιλέχθηκαν τυχαία τέσσερα stent των οποίων η τοποθέτηση και σωστή έκπτυξη ελέγχθηκε περαιτέρω με την χρήση της οπτικής τομογραφίας συνοχής. Στην εικόνα 6 απεικονίζεται stent επικαλυπτόμενο με ρετινοϊκό οξύ μεσαίας δόσης και πολυμερές B (ομάδα BM) με την τεχνική της οπτικής τομογραφίας συνοχής. Η εικόνα ελήφθη αμέσως μετά την τοποθέτηση του stent.

Ένα ζώο, στο οποίο είχαν τοποθετηθεί μη επικαλυπτόμενα stent, δεν επιβίωσε μέχρι την 4^η βδομάδα της περιόδου παρατήρησης της μελέτης και επομένως δεν συμπεριλήφθηκε στην μελέτη. Συνεπώς η ομάδα των μη-επικαλυπτόμενων στεντ (BMS) συμπεριλάμβανε τέσσερα (4) stent. Στην νεκροψία δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές βλάβες στο επίπεδο των stent. Ωστόσο, δεν μπορεί να αποκλειστεί με ασφάλεια η εμφύτευση των μη επικαλυπτόμενων stent ως αίτιο θανάτου. Σε ένα ζώο (No. 1080) παρά την έκπτυξη του μπαλονιού μετά την τοποθέτηση του stent, το stent προσκολλήθηκε στο μπαλόνι με αποτέλεσμα να παρασυρθεί κατά την απόσυρση του μπαλονιού. Το stent τοποθετήθηκε τελικά στην κατιούσα αορτή και συνεπώς χρησιμοποιήθηκε αυτό το αρτηριακό τμήμα στην μελέτη. Σε άλλο ζώο (No. 1087) παρατηρήθηκε εκτεταμένη θρόμβωση στην αριστερή λαγόνια αρτηρία μετά την προώθηση του οδηγού-σύρματος και πριν την τοποθέτηση του stent, καθιστώντας αδύνατη την προώθηση του stent στο σημείο αυτό. Συνεπώς, το stent τοποθετήθηκε απευθείας στην κατιούσα αορτή και ομοίως το τμήμα της αορτής που περιλάμβανε το stent χρησιμοποιήθηκε στην μελέτη. Τέλος, στο ζώο No. 1074, ομοίως το stent της

δεξιάς λαγόνιας αρτηρίας προσκολλήθηκε στο μπαλόνι και κατά την απόσυρση παρασύρθηκε στην αορτή όπου και τοποθετήθηκε. Το stent της αριστερής λαγόνιας αρτηρίας πραγματοποιήθηκε κανονικά χωρίς επιπλοκές.

Κανένα από τα τοποθετημένα stent δεν συσχετίστηκε με δημιουργία θρόμβου ή νέκρωση του αρτηριακού τοιχώματος. Επιπλέον, κανένα αρτηριακό δείγμα δεν εμφάνισε διαχωρισμό, παρατηρήθηκαν μόνο πολυεστιακές ρήξεις της ελαστικής μεμβράνης και ιδιαίτερα στο έσω τοίχωμα. Η αντίδραση του ξενιστή αξιολογήθηκε ως χαμηλή σε όλες τις ομάδες. Παρατηρήθηκαν σωματίδια εντός του έσω χιτώνα, τα οποία δεν έλαβαν χρώση κατά την παθολογοανατομική μελέτη και τα οποία είχαν συσχέτιση με τα μακροφάγα και τα γιγαντοκύτταρα σε όλες τις ομάδες εκτός της ομάδας C (BMS).

Εικόνα 6. Τυπικές εικόνες οπτικής συνεκτικής τομογραφίας (OCT) που ελήφθησαν αμέσως μετά την εμφύτευση stent της ομάδας BM (stent με πολυμερές PLA και φάρμακο ρετινοϊκό οξύ).



Ανατύπωση από Samara et al., 2022 (275)

3.1 Μικροσκοπική ανάλυση

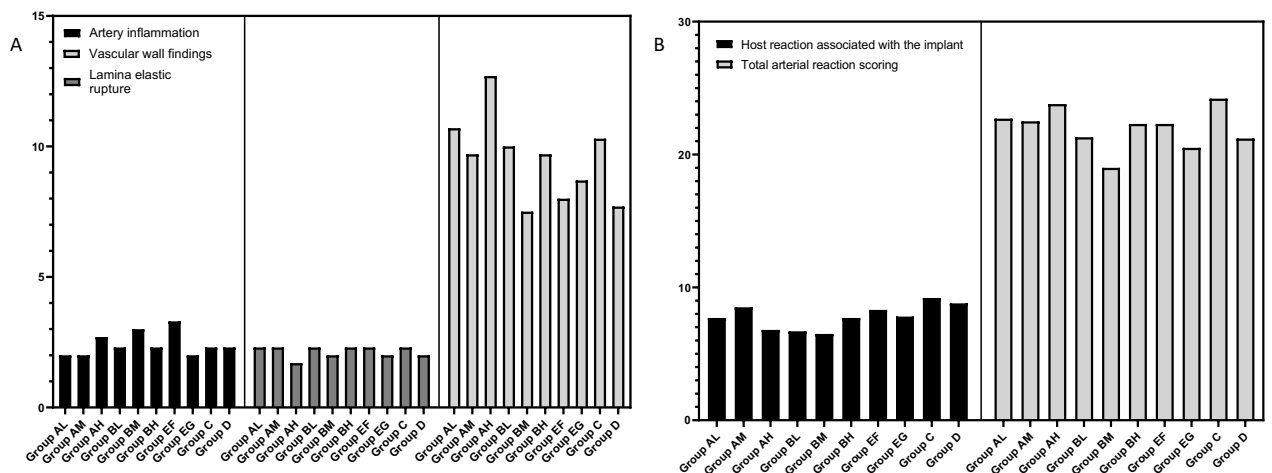
Όλα τα δείγματα των σημείων εμφύτευσης των stent παρουσίαζαν ένα ή περισσότερα από τα παρακάτω χαρακτηριστικά ήπιας αρτηριακής αντίδρασης σε διαφορετικό βαθμό. Συγκεκριμένα, το ενδοθήλιο περιλάμβανε πολυεστιακές περιοχές πλούσιες σε αντιδραστικά υπερτροφικά ενδοθηλιακά κύτταρα. Παρατηρήθηκε πάχυνση του έσω χιτώνα, η οποία οφείλεται κυρίως στον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων και η οποία σχετίστηκε με αύξηση της

στένωσης του αυλού του αγγείου, χωρίς ωστόσο να μπορεί να αποκλειστεί η παρουσία φλεγμονής ως πιθανός παράγοντας της στένωσης. Παρουσία φλεγμονώδους αντίδρασης και στις τρεις τοιχωματικές στιβάδες (έσω, μέσος και έξω χιτώνας), υπό μορφή διάσπαρτων πολυεστιακών κυτταρικών διηθημάτων, μεικτού τύπου, με προεξάρχοντα κυτταρικό τύπο τα μονοπύρηνια. Καταγράφηκε αντίδραση του ξενιστή σχετιζόμενη με στο stent, η οποία τεκμηριώνεται α) από την παρουσία κυτταρικών διηθημάτων μικτού τύπου σε ποικίλου βαθμού βαρύτητα, με κυρίαρχο κυτταρικό τύπο τα λεμφοκύτταρα, τα πολυμορφοπύρηνια και τα μακροφάγα, τα οποία συχνά συσχετίζονταν με γιγαντοκύτταρα, β) από την παρουσία ίνωσης πέριξ των δοκίδων σε ορισμένα δείγματα, γ) από την περιστασιακή παρουσία νέο-αγγείωσης, η οποία μάλιστα συνέβαλε στην πάχυνση του έσω και μέσου χιτώνα, δ) από την παρουσία συχνών τοπικών αιμορραγιών. Όλα τα δείγματα παρουσίαζαν ήπια αντίδραση ξενιστή ως προς τις δοκίδες των stent, με μικρές διαφορές μεταξύ τους (πίνακας 4). Συγκεκριμένα, η ομάδα BM εμφάνισε το χαμηλότερο μέσο σκορ, ενώ η ομάδα C το υψηλότερο.

Όσον αφορά την συνολική αρτηριακή αντίδραση, η ομάδα BM εμφάνισε τη χαμηλότερη τιμή μέσου σκορ με τιμή 19.0, ενώ η ομάδα C την υψηλότερη με τιμή 24.2, οι οποίες αντιστοιχούν σε μία διαφορά της τάξης +5.2, η οποία θεωρήθηκε μη σημαντική. Η διαφορά αυτή του συνολικού μέσου σκορ ανάμεσα στις δύο ομάδες σχετίζεται με την μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού του έσω χιτώνα, την παρουσία μικρότερης έκτασης ρήξη της ελαστικής μεμβράνης και την ηπιότερη αντίδραση ξενιστή έναντι στις δοκίδες των stent. Στις ομάδες που περιλάμβαναν τα stent με πολυμερές A και B παρατηρήθηκε χαμηλότερο μέσο σκορ συνολικής αρτηριακής αντίδρασης στις ομάδες BL, BM, BH σε σχέση με τις ομάδες AL, AM, AH.

Η μείωση αυτή αποδίδεται κυρίως στην ύπαρξη ευρημάτων μικρότερης βαρύτητας στο αγγειακό τοίχωμα, καθώς και στην έλλειψη ή παρουσία ήπιου βαθμού αιμορραγίας πέριξ των δοκίδων των stent στις ομάδες BL, BM, BH. Τέλος, στις ομάδες EF και EG το μέσο σκορ της συνολικής αρτηριακής αντίδρασης ήταν ελαφρώς μεγαλύτερο στην ομάδα EF σε σχέση με την ομάδα EG, ενώ συγκριτικά με την ομάδα C, οι δύο ομάδες EF και EG παρουσίαζαν χαμηλότερο μέσο σκορ συνολικής αρτηριακής αντίδρασης σε σχέση με την ομάδα C (εικόνα 7). Οι τιμές των μέσων σκορ κάθε παραμέτρου και της συνολικής αρτηριακής αντίδρασης για την κάθε ομάδα συνοψίζονται στον πίνακα 5.

Εικόνα 7. Α. Ιστόγραμμα με τους μέσους όρους βαθμολογίας για φλεγμονή αρτηρίας, ρήξη ελαστικής μεμβράνης και ευρήματα αγγειακού τοιχώματος. Β. Ιστόγραμμα με τους μέσους όρους βαθμολογίας για την αντίδραση ξενιστή στο εμφύτευμα και για τη συνολική αρτηριακή αντίδραση.



Ανατύπωση από Samara et al., 2022 (275)

Πίνακας 4. Σύνολο συνοπτικών βαθμών αντίδρασης ξενιστή στις δοκίδες του stent ανά ομάδα.

	AL	AM	AH	BL	BM	BH	EF	EG	C	D
Σύνολο δειγμάτων	6.0	6.0	6.0	6.0	4.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
Σύνολο βαθμού αντίδρασης ξενιστή	46	51	41	40	26	46	50	47	55	53
Μέσος βαθμός αντίδρασης ξενιστή στο εμφύτευμα.	7.7	8.5	6.8	6.7	6.5	7.7	8.3	7.8	9.2	8.8

Πίνακας 5. Συνοπτικοί μέσοι όροι όλων των παραμέτρων αξιολόγησης και της συνολικής αρτηριακής αντίδρασης.

	AL	AM	AH	BL	BM	BH	EF	EG	C	D
Αρτηριακή αντίδραση	10.7	9.7	12.7	10.0	7.5	9.7	8.0	8.7	10.3	7.7
Αρτηριακή φλεγμονή	2.0	2.0	2.7	2.3	3.0	2.3	3.3	2.0	2.3	2.3
Απώλεια λείων μυϊκών κυττάρων μέσου χιτώνα	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.3	0.0	0.0	0.3
Αντικατάσταση αρτηριακού τοιχώματος	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.3	0.0	0.0	0.3
Υπερτροφία μέσου χιτώνα	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Ρήξη ελαστικής μεμβράνης	2.3	2.3	1.7	2.3	2.0	2.3	2.3	2.0	2.3	2.0
Ανοσολογική αντίδραση ξενιστή στο στεντ	7.7	8.5	6.8	6.7	6.5	7.7	8.3	7.8	9.2	8.8
ΣΥΝΟΛΙΚΟ σκορ αρτηριακής αντίδρασης	22.7	22.5	23.8	21.3	19.0	22.3	22.3	20.5	24.2	21.2
Μεταλλικά σωματίδια	0.7	1.2	1.0	1.5	1.3	1.7	0.2	1.0	0.0	0.5

3.2 Απεικονιστική και ιστομορφομετρική ανάλυση

Η σύγκριση των εξής παραμέτρων: μέγεθος της έσω στιβάδας του αρτηριακού τοιχώματος, μέγεθος της μέσης στιβάδας του αρτηριακού τοιχώματος, στένωση του αυλού του αγγείου και πάχυνση της έσω στιβάδας του αρτηριακού τοιχώματος δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων AL, AM, AH, BL, BM, BH σε σχέση με την ομάδα C. Ομοίως, η σύγκριση των ίδιων παραμέτρων: μέγεθος της έσω στιβάδας του αρτηριακού τοιχώματος, μέγεθος της μέσης στιβάδας του αρτηριακού τοιχώματος, στένωση του αυλού του αγγείου και πάχυνση της έσω στιβάδας του αρτηριακού τοιχώματος δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων AL, AM, BL, BM, BH σε σχέση με την ομάδα D. Οι ομάδες BL, BM, BH εμφάνισαν μικρότερη στένωση και πάχυνση της έσω στιβάδας του αρτηριακού τοιχώματος σε σύγκριση με τις ομάδες AL, AM, AH.

Η διαφορά πάχυνσης της έσω στιβάδας του αρτηριακού τοιχώματος μεταξύ των ομάδων AH και BH ήταν στατιστικά σημαντική (105.1 vs $75.3 \mu\text{m}^2$ αντίστοιχα, $p = 0.0235$). Ομοίως, η διαφορά πάχυνσης της έσω στιβάδας του αρτηριακού τοιχώματος μεταξύ των ομάδων AH και AL ήταν στατιστικά σημαντική (105.1 vs $71.5 \mu\text{m}^2$ αντίστοιχα, $p = 0.0432$). Επιπλέον, στατιστικά σημαντική ήταν η διαφορά του ποσοστού στένωσης μεταξύ της ομάδας AH και της ομάδας D (26.2% vs 14.0% αντίστοιχα, $p = 0.0169$). Η ομάδα AH εμφάνισε το υψηλότερο ποσοστό στένωσης με τιμή 26.2% , καθώς και την μεγαλύτερη πάχυνση της έσω στιβάδας του αρτηριακού τοιχώματος με τιμή $105.1 \mu\text{m}^2$.

Δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων BL και BM ως προς όλες τις παραμέτρους. Επίσης, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική

διαφορά μεταξύ των ομάδων EF και EG ως προς τις παραμέτρους: μέγεθος της έσω στιβάδας του αρτηριακού τοιχώματος, μέγεθος της μέσης στιβάδας του αρτηριακού τοιχώματος, στένωση του αυλού του αγγείου και πάχυνση της έσω στιβάδας του αρτηριακού τοιχώματος. Ωστόσο, η ομάδα EF εμφάνισε μεγαλύτερο ποσοστό στένωσης σε σχέση με την ομάδα EG χωρίς ωστόσο στατιστικά σημαντική διαφορά (20.62% vs 11.23% αντίστοιχα, $p = 0.22$). Επιπλέον, οι ομάδες EF και EG δεν παρουσίασαν καμία στατιστικά σημαντική διαφορά σε κάποια από τις παραμέτρους σε σχέση με ομάδα D.

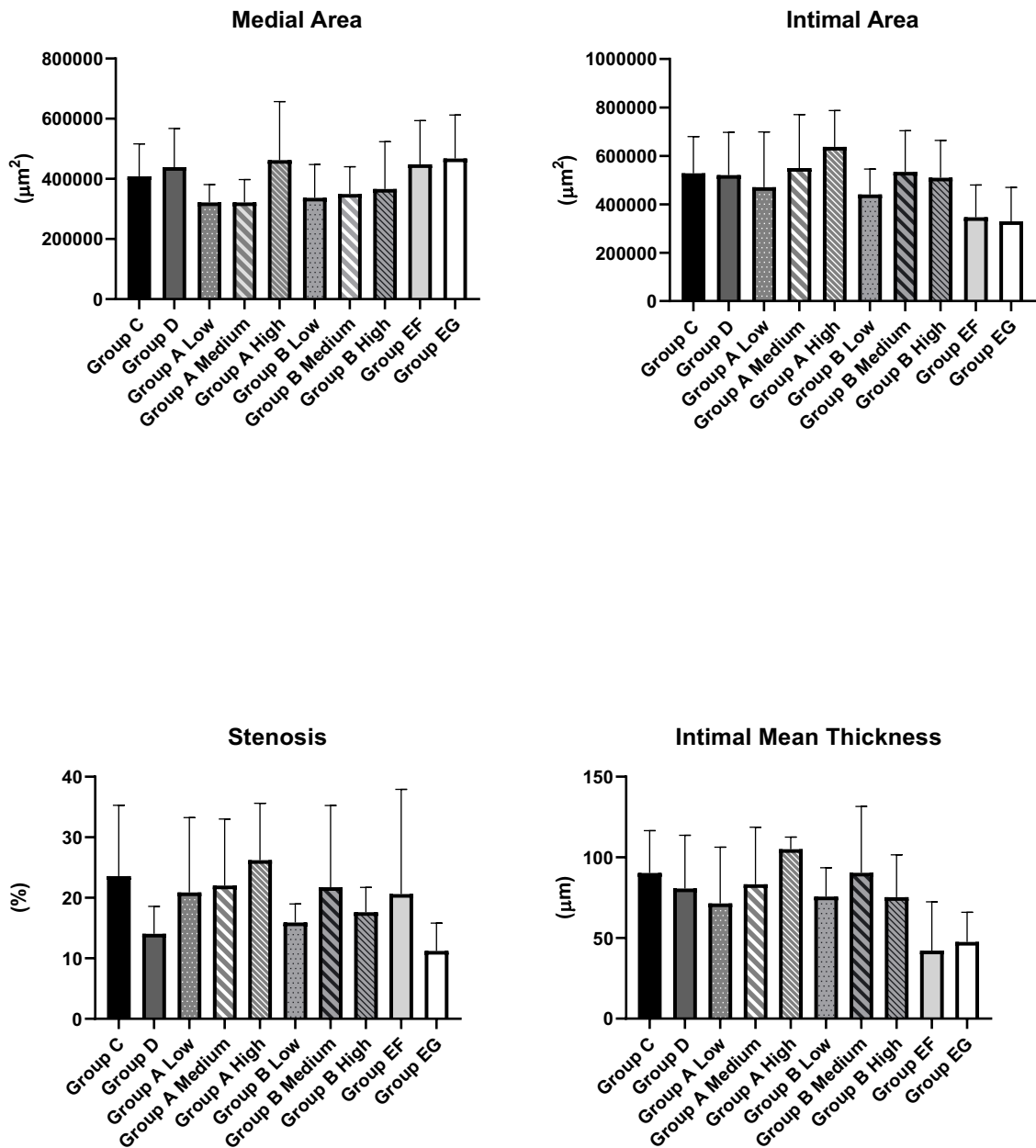
Αντιθέτως, το μέγεθος της έσω στιβάδας του αρτηριακού τοιχώματος μεταξύ των ομάδων EG και C εμφάνισε στατιστικά σημαντική διαφορά (329,954 vs 527,738 μm^2 αντίστοιχα, $p = 0.0407$). Επίσης στατιστικά σημαντική ήταν η διαφορά του ποσοστού στένωσης μεταξύ των ομάδων EG και C (11.2% vs 23.6%, $p = 0.0366$). Ενώ τέλος, στατιστικά σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε μεταξύ των ομάδων EF και C ως προς την πάχυνση της έσω στιβάδας του αρτηριακού τοιχώματος (42.2 vs 90.3 μm , $p = 0.0149$).

Τα αποτελέσματα των απεικονιστικών αναλύσεων συνοψίζονται στον *πίνακα 6* και στην *εικόνα 8*, ενώ στο *παράρτημα II* αναφέρονται τα ιστομορφομετρικά δεδομένα ξεχωριστά ανά αρτηριακό δείγμα.

Πίνακας 6. Συνολικές συνοπτικές μετρήσεις για κάθε ομάδα

	AL	AM	AH	BL	BM	BH	C	D	EF	EG
Μέσος όρος										
Εμβαδόν έσω ελαστικής μεμβράνης (EEL, μm^2)	27365 39,52	30030 16,90	31030 39,78	31133 91,42	31856 35,40	32228 87,09	30248 21,13	41744 12,50	27190 17,25	33943 71,19
Εμβαδόν έσω ελαστικής μεμβράνης (IEL, μm^2)	24149 54,44	26814 31,27	26407 86,79	27762 84,18	28361 29,24	28567 65,08	26162 51,51	37354 26,05	22703 65,29	29266 04,99
Διάμετρος αυλού (μm^2)	19441 43,11	21322 39,84	20034 79,24	23360 45,12	23027 19,12	23470 36,49	20885 13,49	32150 22,09	19242 09,11	25966 51,04
Μέγεθος μέσης στιβάδας (μm^2)	32158 5,08	32158 5,63	46225 2,99	33710 7,25	34950 6,16	36612 2,01	40856 9,62	43898 6,45	44865 1,96	46776 6,20
Μέγεθος έσω στιβάδας (μm^2)	47081 1,33	54919 1,43	63730 7,54	44023 9,05	53341 0,12	50972 8,60	52773 8,03	52040 3,96	34615 6,18	32995 3,95
Ποσοστό στένωσης (%)	20,87	22,02	26,22	15,92	21,76	17,63	23,59	14,04	20,62	11,23
Μέση πάχυνση έσω στιβάδας (μm)	71,46	83,26	105,10	75,69	90,38	75,34	90,25	80,71	42,17	47,60

Εικόνα 8. Ιστογράμματα στηλών με μέσους όρους ανά ομάδα για την περιοχή μέσου χιτώνα, περιοχή έσω χιτώνα, στένωση και μέσο πάχος έσω χιτώνα.



4. Συζήτηση

Στην παρούσα πειραματική έρευνα μελετήθηκε η αποτελεσματικότητα καινοτόμου ενδοστεφανιαίας πρόσθεσης (stent) επικαλυπτόμενη με ρετινοϊκό οξύ. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν stent αποτελούμενα από δύο διαφορετικά είδη βιοδιασπώμενων πολυμερών (Α και Β) και επικαλυπτόμενα με τρεις διαφορετικές δόσεις ρετινοϊκού οξέος σε κάθε ομάδα πολυμερούς [μικρή ('L', Low), μεσαία ('M', Medium) και υψηλή δόση ('H', High)], με αποτέλεσμα τη δημιουργία τριών υπό-ομάδων για το κάθε πολυμερές (AH, AM, AL, BH, BM, BL). Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στις λαγόνιες αρτηρίες τριάντα κονίκλων. Μετά από μία περίοδο παρατήρησης τεσσάρων εβδομάδων, τα τμήματα των αρτηριών που περιείχαν τα stent αφαιρέθηκαν και πραγματοποιήθηκε ιστομορφομετρική και ιστοπαθολογική ανάλυση. Τα βασικά ευρήματα της ιστοπαθολογικής μελέτης που προέκυψαν ήταν:

(1) *Απουσία θρόμβωσης ή νέκρωσης του αγγειακού τοιχώματος.* Σε κανένα από τα εξεταζόμενα stent δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός ενδοαυλικού θρόμβου ή ευρήματα νέκρωσης του αγγειακού τοιχώματος, γεγονός που υποδεικνύει ότι κατά την περίοδο παρατήρησης των τεσσάρων εβδομάδων μετά την εμφύτευση των stent, καμία από τις θεραπευτικές στρατηγικές δεν σχετίστηκε με αύξηση του κινδύνου θρομβωτικών επιπλοκών. (2) *Ρήξεις ελαστικών στιβάδων χωρίς επέκταση στους υπόλοιπους χιτώνες.* Σε όλες τις ομάδες παρατηρήθηκαν πολυεστιακές ρήξεις των ελαστικών στιβάδων, με προεξάρχουσα εμφάνιση στην έσω ελαστική στιβάδα. Ωστόσο, τα ευρήματα αυτά δεν παρουσίασαν επέκταση στο μέσο χιτώνα ούτε προκάλεσαν διατοιχωματική ρήξη. Το εύρημα αυτό υποδηλώνει χαμηλό κίνδυνο πρόκλησης ιατρογενούς διαχωρισμού του αρτηριακού τοιχώματος ως αποτέλεσμα

μηχανικής επιπλοκής από την εμφύτευση του stent κατά τη συγκεκριμένη χρονική διάρκεια. (3) *Ανοσολογική και φλεγμονώδης αντίδραση του ξενιστή*. Η αντίδραση του ξενιστή σχετιζόμενη με στο stent που παρατηρήθηκε χαρακτηρίστηκε ως χαμηλού βαθμού αντίδραση. Οι διαφορές των ευρημάτων μεταξύ των ομάδων ήταν ελάχιστες έως μικρές ανεξάρτητα από τον τύπο stent που χρησιμοποιήθηκε. (4) *Περιορισμένη διαφοροποίηση στο μέσο όρο της συνολικής αρτηριακής αντίδρασης*. Στην συγκριτική αξιολόγηση, οι διαφορές στο μέσο όρο της συνολικής αρτηριακής αντίδρασης μεταξύ των διαφορετικών ομάδων ήταν μικρές, γεγονός που υποδηλώνει ότι η δόση και ο τύπος του πολυμερούς μπορεί να διαδραματίζουν ορισμένο ρόλο στη βιοσυμβατότητα και στην αποτελεσματικότητα της εμφυτεύσιμης συσκευής.

Πληθώρα *in vitro* και *in vivo* πειραματικών μοντέλων έχουν αποδείξει την πλειοτροπική δράση του ρετινοϊκού οξέος στην διαδικασία της αθηροσκλήρωσης, μέσω της ανασταλτικής του επίδρασης κυρίως στις διαδικασίες του πολλαπλασιασμού, της μετανάστευσης και της φαινοτυπικής αλλαγής των λείων μυϊκών κυττάρων (276). Το ρετινοϊκό οξύ έχει ανασταλτική δράση κατά δοσο-εξαρτώμενο τρόπο τόσο στον πολλαπλασιασμό των ανθρώπινων αρτηριακών λείων μυϊκών κυττάρων *in vitro*, όσο και στην ανάπτυξη ανθρώπινων φλεβικών λείων μυϊκών κυττάρων (244,255).

Ομοίως, η συστηματική χορήγηση ρετινοϊκού οξέος σε πειραματικά μοντέλα *in vivo* έχει δείξει μείωση του αθηρωματικού φορτίου. Κόνικλοι που έλαβαν δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά για τέσσερις εβδομάδες είχαν ως αποτέλεσμα την αύξηση των λιπιδίων του ορού αίματος καθώς και την εμφάνιση αθηρωματικών πλακών στην αορτή. Στη συνέχεια έλαβαν 5mg/kg/ημέρα all-trans- ρετινοϊκού οξέος για διάστημα οκτώ εβδομάδων. Η χορήγηση ρετινοϊκού οξέος είχε ως αποτέλεσμα

σημαντική μείωση της ολικής χοληστερόλης, της LDL χοληστερόλης, αύξηση της HDL χοληστερόλης, καθώς και σημαντική μείωση του φορτίου αθηρωματικής πλάκας στη αορτή. Επιπλέον, παρατηρήθηκε αναστολή έκφρασης της P- σελεκτίνης, του συνδεδεμένου ινώδους στα αιμοπετάλια και της εναπόθεσης αυτού στον έσω χιτώνα της αορτής. Το ινωδογόνο πλάσματος, ο παράγοντας νέκρωσης όγκου-α (TNF-α) και η ιντερλευκίνη 6 (IL-6) εμφάνισαν σημαντική μείωση μετά τη χορήγηση του ρετινοϊκού οξέος υποδηλώνοντας την αντιφλεγμονώδη δράση του ρετινοϊκού οξέος (277). Σε παρόμοιο πειραματικό μοντέλο κονίκλων χορηγήθηκαν 10mg/kg/ημέρα ρετινοϊκού οξέος για διάστημα 12 εβδομάδων. Η ομάδα που έλαβε το ρετινοϊκό οξύ εμφάνισε 73.98% βελτίωση της ενδοθήλιο-εξαρτώμενης χάλασης του τοιχώματος της θωρακικής αορτής επαγόμενης από την ακετυλοχολίνη. Επιπλέον, παρατηρήθηκε βελτίωση της διαπερατότητας του αρτηριακού τοιχώματος μετά τη χορήγηση ρετινοϊκού οξέος, γεγονός που οφείλεται στην αποκατάσταση του κατεστραμμένου ενδοθηλίου από το ρετινοϊκό οξύ. Το all-trans-ρετινοϊκό οξύ μείωσε την έκφραση της καβεολίνης-1 (CAV-1) και ενίσχυσε την έκφραση των επιπέδων οκκλουδίνης, ενώ παράλληλα παρατηρήθηκε αύξηση της δραστηριότητας του ενδοθηλιακού νιτρικού οξέος (eNOS) και της συγκέντρωσης νιτρικού οξέος (NO) μετά τη χορήγηση ρετινοϊκού οξέος (278).

Σε ποντίκια με ανεπάρκεια απολιποπρωτεΐνης E, η χορήγηση 5mg/kg/ημέρα all-trans-ρετινοϊκού οξέος για διάστημα 8 εβδομάδων μείωσε τα επίπεδα LDL και VLDL χοληστερόλης σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, ενώ η ολική επιφάνεια αθηροσκληρωτικών βλαβών ήταν 53% μικρότερη στην ομάδα που έλαβε ATRA κατά την ιστολογική ανάλυση. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ρύθμιση της καφεοποίησης του περιαγγειακού λιπώδους ιστού τμημάτων της αριστερής νεφρικής αρτηρίας, καθώς

και αύξηση της σύνθεσης και έκκρισης αδιπονεκτίνης από τα περιαγγειακά τμήματα λιπώδους ιστού, ενώ η χορήγηση ATRA αύξησε την συγκέντρωση νιτρικού οξέος στην αορτή. Ευρήματα που τεκμηριώνουν την μείωση της αθηροσκλήρωσης σε ποντίκια με ανεπάρκεια απολιποπρωτεΐνης E (279). Σε παρόμοιο πειραματικό μοντέλο ποντικών με ανεπάρκεια απολιποπρωτεΐνης E που έλαβαν δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά για διάστημα 8 εβδομάδων παρατηρήθηκε 40.7% μείωση της επιφάνειας αθηροσκληρωτικών πλακών στον αορτικό κόλπο μετά τη ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση 2mg/kg 9-cis ρετινοϊκού οξέος τέσσερις έως πέντε φορές την εβδομάδα. Η συγκέντρωση της ολικής και LDL χοληστερόλης ορού ήταν χαμηλότερες στην ομάδα που έλαβε 9-cis ρετινοϊκό οξύ σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, ενώ κατά την *in vitro* μελέτη αποδείχθηκε ότι τα περιτοναϊκά μακροφάγα εμφάνιζαν υψηλότερη έκφραση του πρωτεϊνικού μεταφορέα ABCA1 και ABCG1 κατά δοσο-εξαρτώμενο τρόπο στην υπό μελέτη ομάδα, καθώς και χαμηλότερη συγκέντρωση οξειδωμένης LDL χοληστερόλης (280). Αντίστοιχα, η έλλειψη βιταμίνης A στη διατροφή ποντικών με ανεπάρκεια απολιποπρωτεΐνης E έδειξε σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης χοληστερόλης πλάσματος και 61% αύξηση των αθηρωματικών πλακών στον αορτικό κόλπο των ποντικών σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Αντίθετα, ο διατροφικός εμπλουτισμός με β-καροτένιο ανέστειλε την αύξηση χοληστερόλης και την αθηροσκλήρωση στην ομάδα αυτή. Ευρήματα που υποδηλώνουν τον ρόλο της ανεπάρκειας της βιταμίνης A ως παράγοντα κινδύνου για την αθηροσκλήρωση (281). Παρόμοια, ο Zhou και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι το διατροφικό συμπλήρωμα β-καροτενίου σε ποντίκια με ανεπάρκεια του υποδοχέα LDLR^{-/-} μείωσε τόσο το μέγεθος των αθηρωματικών βλαβών στην αορτική ρίζα, όσο και τα επίπεδα χοληστερόλης πλάσματος (282).

4.1 Αγγειακή βλάβη και συστηματική χορήγηση ρετινοϊκού οξέος

Ήδη από τα τέλη της δεκαετίας του 1990, *in vivo* πειραματικά μοντέλα απέδειξαν την ευεργετική δράση της συστηματικής χορήγησης ρετινοϊκού οξέος στην εμφάνιση στένωσης ή επαναστένωσης μετά από πρόκληση αγγειακής τοιχωματικής βλάβης τόσο του αρτηριακού όσο και του φλεβικού τοιχώματος περιφερικών αγγείων. Για την δημιουργία της αγγειακής βλάβης χρησιμοποιήθηκαν διάφοροι μέθοδοι, όπως εμβολεκτομή, καθετηριασμός με μπαλόνι, τοποθέτηση stent ή απολίνωση αρτηριών. Αρχικά, ο Miano και οι συνεργάτες του πραγματοποίησαν αγγειοπλαστική με απλό μπαλόνι στην αριστερή κοινή καρωτίδα ποντικών για την πρόκληση της αρτηριακής βλάβης. Παράλληλα χορήγησαν 30mg/kg/ημέρα τέσσερις ημέρες πριν τον καθετηριασμό και η οποία συνεχίστηκε για περίοδο 14 ημερών μετά την πρόκληση της αρτηριακής βλάβης. Η ιστομορφομετρική ανάλυση έδειξε μείωση της επιφάνειας νέο-έσω στιβάδας, του αριθμού κυττάρων της νέο-έσω στιβάδας και του λόγου έσω/μέσου στιβάδας καθώς και σημαντική αύξηση της περιμέτρου του αγγειακού τοιχώματος σε σχέση με την ετερόπλευρη καρωτίδα που δεν υπέστη τραυματισμό. Οι δομικές αυτές αλλαγές είχαν ως αποτέλεσμα την αύξηση της επιφάνειας του αυλού στο σημείο της βλάβης κατά 35-37%, γεγονός που υποδηλώνει την ανασταλτική δράση του ρετινοϊκού οξέος στον σχηματισμό νέο-ενδοθηλιακού ιστού (283).

Σε παρόμοιο πειραματικό μοντέλο, χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια τα οποία υπεβλήθησαν σε καθετηριασμό με μπαλόνι της αριστερής κοινής καρωτίδας. Στα ζώα χορηγήθηκαν από του στόματος δύο είδη ρετινοϊκού οξέος, *all-trans* ρετινοϊκό οξύ σε δόσεις 5, 10, 24mg/kg και 13-*cis* ρετινοϊκό οξύ σε δόσεις 5 και 10mg/kg. Η έναρξη του

ρετινοϊκού οξέος έγινε τρεις ημέρες πριν την πρόκληση της αγγειακής βλάβης δια του καθετηριασμού και συνεχίστηκε για διάστημα 21 ημερών μετά την επέμβαση. Τα αποτελέσματα έδειξαν μείωση του λόγου έσω/μέσου στιβάδας κατά δοσο-εξαρτώμενο τρόπο. Επιπλέον, παρατηρήθηκε αύξηση της διαμέτρου του αγγείου και της εξωτερικής ελαστικής στιβάδας στη δοσολογία των 10mg/kg/ημέρα τόσο για το all-trans ρετινοϊκό οξύ όσο και το 13- cis ρετινοϊκό οξύ, γεγονός που υποδηλώνει αναστολή της αναδιαμόρφωσης του αγγείου. Μελετήθηκε ακόμα ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός στις 24, 72 ώρες και στις 7 ημέρες μετά τον καθετηριασμό. Η ανοσο-ιστοχημική μελέτη έδειξε μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στις 24 και 72 ώρες, ενώ στο διάστημα των 7 ημερών δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (284).

Ο Wiegman και οι συνεργάτες του εξέτασαν τον ρόλο του ρετινοϊκού οξέος στην διαδικασία της επαναστένωσης μετά από αγγειοπλαστική με μπαλόνι *in vivo*. Διενεργήθηκε αγγειοπλαστική με απλό μπαλόνι στις μηριαίες αρτηρίες κονίκλων με εστιακή αθηροσκλήρωση. Η πρόκληση της αθηροσκλήρωσης πραγματοποιήθηκε μέσω αφυδάτωσης με ρεύμα αέρα τοπικά, ακολουθούμενη από υπερλιπιδαιμική δίαιτα για διάστημα 28 ημερών. Η υπό ομάδα μελέτη έλαβε 6mg/kg/ημέρα ρετινοϊκού οξέος τρεις ημέρες πριν την επέμβαση και 28 ημέρες μετά την αγγειοπλαστική. Η ιστομορφομετρική ανάλυση έδειξε την ύπαρξη μεγαλύτερης επιφάνειας αυλού στην ομάδα του ρετινοϊκού οξέος σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (0.51 ± 0.20 vs 0.34 ± 0.13 mm², $P=0.004$), καθώς και αύξηση στην επιφάνεια της έσω ελαστικής και έξω ελαστικής στιβάδας αντίστοιχα (0.89 ± 0.27 vs 0.66 ± 0.24 mm², $P=0.001$, and 1.29 ± 0.38 vs 0.98 ± 0.32 mm², $P=0.001$). Γεγονός που υποδηλώνει θετική αναδιαμόρφωση του αγγείου παρά την απουσία διαφοροποίησης της

απόλυτης επιφάνειας αθηρωματικής πλάκας ανάμεσα στις δύο ομάδες. Επιπλέον, παρατηρήθηκε αύξηση της α-ακτίνης και της δεσμίνης κατά την ανοσοϊστοχημική χρώση, εύρημα που υποδηλώνει τον ρόλο του ρετινοϊκού οξέος στην ρύθμιση των λείων μυϊκών κυττάρων και συνεπώς της αγγειακής αναδιαμόρφωσης (285).

Λίγο αργότερα, ο Fujii και οι συνεργάτες του μελέτησαν τον ρόλο του Am80, ενός συνθετικού α-ειδικού αγωνιστή του υποδοχέα του ρετινοϊκού οξέος (RAR) στο σχηματισμό νέο-ενδοθηλίου μετά από πρόκληση αγγειακής βλάβης. Πειραματικά μοντέλα κονίκλων υπεβλήθησαν σε αγγειοπλαστική με εμφύτευση stent BMS μεγέθους 2.5mm x 16mm στις λαγόνιες αρτηρίες. Η έναρξη του Am80 έγινε μία μέρα πριν την τοποθέτηση των stent σε δοσολογία 1mg/kg/ημέρα και ακολούθησε για διάστημα 28 ημερών μετά την επέμβαση. Τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική μείωση της έσω στιβάδας, του λόγου έσω/μέσης στιβάδας καθώς και του ποσοστού στένωσης, υποδεικνύοντας της δράση του Am80 στην μείωση του νέο-ενδοθηλιακού σχηματισμού μετά την αγγειακή βλάβη, παρά την απουσία διαφοράς στην μέση επιφάνεια του αγγείου. Επιπλέον, μελετήθηκε ο ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα KLF5 στη ρύθμιση του φαινοτύπου των λείων μυϊκών κυττάρων μετά από αγγειοπλαστική. Το ρετινοϊκό Am80 αναστέλλει την έκφραση και μεταγραφική λειτουργία του παράγοντα KLF5, παρεμποδίζοντας τον σχηματισμό του συμπλόκου με το ετεροδιμερές RAR/RXR. Με τον τρόπο αυτό το ρετινοϊκό Am80 συμβάλλει στην ρύθμιση του φαινοτύπου, του πολλαπλασιασμού και της μεταναστευτικής ικανότητας των λείων μυϊκών κυττάρων (286).

Σε άλλο πειραματικό μοντέλο κονίκλων τύπου New Zealand μελετήθηκε η επίδραση του all-trans- ρετινοϊκού οξέος σε σφαγιτιδικό φλεβικό μόσχευμα, το οποίο τοποθετήθηκε στην καρωτίδα του ζώου. Τα ζώα έλαβαν ρετινοϊκό οξύ σε δοσολογία

10mg/kg/ημέρα για διάστημα δύο εβδομάδων. Παρατηρήθηκε μείωση του πάχους της έσω στιβάδας καθώς και του λόγου έσω/μέσης στιβάδας (0.63 vs 0.88, $P < 0.01$) τέσσερις εβδομάδες μετά την πραγματοποίηση της επέμβασης. Η ανάλυση τύπου Northern έδειξε μείωση της έκφρασης της μεταλλοπρωτεΐνης - 2 στις 7 ημέρες και της μεταλλοπρωτεΐνης - 9 στις 28 ημέρες, υποδεικνύοντας τον ρόλο του ρετινοϊκού οξέος στη μείωση της ενδοθηλιακής υπερπλασίας (287). Παράλληλα, διερευνήθηκε η δράση του ρετινοϊκού οξέος στις διαδικασίες του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και απόπτωσης των φλεβικών μοσχευμάτων. Παρατηρήθηκε μείωση του δείκτη πολλαπλασιασμού και του βαθμού απόπτωσης στην έσω στιβάδα των μοσχευμάτων στην υπό μελέτη ομάδα. Ωστόσο, δεν ανευρέθηκαν διαφορές στην μέση και έξω στιβάδα, γεγονός που επιβεβαιώνει την ανασταλτική δράση του ρετινοϊκού στην ενδοθηλιακή υπερπλασία (288).

Παρόμοια, ο Yu και οι συνεργάτες του πραγματοποίησαν αναστόμωση του εγγύς με το άπω τμήμα της σφαγιτιδικής αρτηρίας κονίκλων με τοποθέτηση αυτόλογου φλεβικού μοσχεύματος σφαγίτιδας. Αρχικά, επιβεβαιώθηκε η στένωση του φλεβικού μοσχεύματος και ο υπερπολλαπλασιασμός των λείων μυϊκών κυττάρων σε ανοσο-ιστοχημική μελέτη και στη συνέχεια μελέτησαν την δράση του ρετινοϊκού οξέος, σε συστηματική χορήγηση 10mg/kg/ημέρα. Διαπιστώθηκε μείωση του πάχους του έσω και μέσου χιτώνα και συνεπώς μείωση του βαθμού στένωσης των φλεβικών μοσχευμάτων, καθώς και αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης των λείων μυϊκών κυττάρων ανθρώπινης ομφαλικής φλέβας. Επιπλέον, όπως παρατηρήθηκε στην ανάλυση συνεξακρίβωσης, η χορήγηση ρετινοϊκού οξέος μείωσε την αλληλεπίδραση μεταξύ KLF5 – RARα, οδηγώντας στην αναστολή έκφρασης της επαγωγίσιμης συνθετάσης μονοξειδίου του αζώτου (iNOS) (244).

Σε μη-υπερλιπιδαιμικά ποντίκια ROSA26ZsGreen1/β; Myh11-CreERT2 τα οποία υπεβλήθησαν σε απολίνωση της καρωτίδας, χορήγηση 2.5mg/kg all-trans ρετινοϊκού οξέος από του στόματος, τρεις φορές τη βδομάδα για διάστημα 12 εβδομάδων, έδειξε περίπου 70% μείωση της επιφάνειας της έσω στιβάδας, παρουσία ZsGreen1⁺ προερχόμενων από λεία μυϊκά κύτταρα στην έσω στιβάδα και περίπου 60% μείωση των λόγων επιφάνειας έσω/μέσης στιβάδας και ZsGreen1⁺ λεία μυϊκά κύτταρα/κύτταρα προερχόμενα από λεία μυϊκά κύτταρα σε έσω και μέση στιβάδα. Συνεπώς, η χορήγηση ρετινοϊκού οξέος μειώνει την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης και αυξάνει το πάχος του ινώδους καλύμματος, ενώ ταυτόχρονα καταστέλλει την μετάπτωση των λείων μυϊκών κυττάρων σε SEM κύτταρα (171).

Στην έρευνα αυτή μελετήθηκε για πρώτη φορά, η δράση του ρετινοϊκού οξέος στην ενδοθηλιακή βλάβη διαμέσου τοπικής χορήγησης με τη χρήση stent με αποδέσμευση φαρμάκου (DES), προκειμένου να επιτευχθεί βραδεία αποδέσμευση φαρμάκου και συνεπώς μεγαλύτερης διάρκειας δράση. Το πλεονέκτημα της τοπικής χορήγησης φαρμάκου έγκειται στην αποφυγή των ανεπιθύμητων ενεργειών της συστηματικής χορήγησης του ρετινοϊκού οξέος. Για το σκοπό αυτό, τοποθετήσαμε στις λαγόνιες αρτηρίες κονίκλων stent επικαλυπτόμενα από ρετινοϊκό οξύ σε τρεις διαφορετικές δόσεις ρετινοϊκού οξέος (υψηλή, μεσαία και χαμηλή δόση), ενώ ως ομάδες ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν μία ομάδα αποτελούμενη από stent χωρίς αποδέσμευση φαρμάκου (BMS), μία ομάδα από ένα εμπορικά διαθέσιμο stent αποδέσμευσης φαρμάκου εβερόλιμους (Xience Pro, Abbott) και δύο ομάδες με stent με αποδέσμευση φαρμάκου εβερόλιμους από το ίδιο υλικό κοβαλτίου-χρωμίου και ίδιου πολυμερούς.

Κατά την ιστολογική ανάλυση των τμημάτων στα οποία τοποθετήθηκαν τα stent εξετάστηκε η παρουσία και ο βαθμός της φλεγμονώδους αντίδρασης του τοιχώματος των αγγείων που προκλήθηκε από την τοποθέτηση και έκπτυξη των stent. Όλα τα δείγματα των σημείων εμφύτευσης των stent παρουσίαζαν ένα ή περισσότερα από τα παρακάτω χαρακτηριστικά ήπιας αρτηριακής αντίδρασης, όπως αντιδραστικά υπερτροφικά ενδοθηλιακά κύτταρα, πάχυνση του έσω χιτώνα, παρουσία φλεγμονώδους αντίδρασης και στις τρεις τοιχωματικές στιβάδες υπό μορφή διάσπαρτων πολυεστιακών κυτταρικών διηθημάτων, παρουσία κυτταρικών διηθημάτων μικτού τύπου, ίνωση πέριξ των δοκίδων, παρουσία νέο-αγγείωσης και συχνές τοπικές αιμορραγίες. Τα επίπεδα τοπικής φλεγμονής ήταν χαμηλά και αναμενόμενα, ενώ παρουσίαζαν μικρές διαφορές μεταξύ των ομάδων. Η συνολική αρτηριακή αντίδραση ήταν χαμηλότερη στην ομάδα BM και μεγαλύτερη στην ομάδα C, ωστόσο η διαφορά που προέκυψε ανάμεσα στις δύο ομάδες δεν θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική. Η διαφορά αυτή του συνολικού μέσου σκορ ανάμεσα στις δύο ομάδες σχετίζεται με την μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού του έσω χιτώνα, την παρουσία μικρότερης έκτασης ρήξη της ελαστικής μεμβράνης και την ηπιότερη αντίδραση ξενιστή έναντι στις δοκίδες των stent. Μεταξύ των stent με πολυμερές A και B παρατηρήθηκε χαμηλότερο μέσο σκορ συνολικής αρτηριακής αντίδρασης στην ομάδα με το πολυμερές B, λόγω εμφάνισης ηπιότερου βαθμού αιμορραγίας πέριξ των δοκίδων των stent καθώς και λόγω παρουσίας ευρημάτων μικρότερης βαρύτητας στο αγγειακό τοίχωμα. Οι ομάδες EF και EG εμφάνισαν μικρότερη συνολική αρτηριακή αντίδραση σε σχέση με την ομάδα C. Η παρουσία φλεγμονώδους αντίδρασης του αγγειακού τοιχώματος ως αποτέλεσμα ενδοθηλιακής βλάβης και των επακόλουθων μηχανισμών επούλωσης από την τοποθέτηση του

stent θεωρείται αναμενόμενη. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι η πλήρης απουσία φλεγμονής είναι αδύνατον να επιτευχθεί με την χρήση των καθιερωμένων τεχνικών αγγειοπλαστικής λόγω των μηχανικού στρες που προκαλείται κατά την τοποθέτηση και έκπτυξη των stent. Ο βαθμός φλεγμονώδους αντίδρασης που καταγράφηκε στην παρούσα μελέτη επιβεβαιώνει την αναμενόμενη ιστική αντίδραση και θεωρείται αποδεκτός, καθώς δεν ανευρίσκονται στοιχεία που να υποδηλώνουν χρόνιες φλεγμονώδεις ή παθολογικές αντιδράσεις.

Τα παραπάνω ευρήματα συνηγορούν στην ασφάλεια και βιοσυμβατότητα του stent επικαλυπτόμενου με ρετινοϊκό οξύ. Στη συγκριτική αξιολόγηση, οι διαφορές μεταξύ των ομάδων στο συνολικό μέσο σκορ αρτηριακής αντίδρασης ήταν περιορισμένες, γεγονός που υποδεικνύει παρόμοια βιοσυμβατότητα και αποτελεσματικότητα μεταξύ των θεραπειών που χρησιμοποιήθηκαν.

Κατά την ιστομορφομετρική ανάλυση, οι ομάδες με το πολυμερές B εμφάνισαν μικρότερη στένωση και μέση πάχυνση του έσω χιτώνα σε σχέση με τις ομάδες με το πολυμερές A. Επιπρόσθετα, τα αρτηριακά τμήματα που περιείχαν το stent με πολυμερές A και υψηλή δόση ρετινοϊκού οξέος (AH) παρουσίασαν την μεγαλύτερη στένωση και μέση πάχυνση έσω χιτώνα σε σχέση με τα υπόλοιπα stent και ειδικότερα η διαφορά ως προς το ποσοστό στένωσης σε σχέση με την ομάδα D (Xience Pro) ήταν στατιστικά σημαντική ($p = 0,01$). Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι το πολυμερές A ανεξάρτητα της ποσότητας φαρμάκου που απελευθερώνει προκαλεί περισσότερες μεταβολές στο αρτηριακό τοίχωμα σε σχέση με το πολυμερές B. Μπορούμε επομένως να συμπεράνουμε ότι όλες οι ομάδες με πολυμερές B εμφανίζουν μεγαλύτερη βιοσυμβατότητα σε σχέση με τις ομάδες με το πολυμερές A.

Όσον αφορά τη δοσολογία του ρετινοϊκού οξέος που περιείχε το stent, η ομάδα AL εμφάνισε στατιστικά σημαντικά μικρότερη μέση πάχυνση του έσω χιτώνα σε σχέση με την ομάδα AH (71.46μm vs 105.10μm, $p = 0.04$), γεγονός που υποδηλώνει την δοσο-εξαρτώμενη επίδραση του ρετινοϊκού οξέος στην μέση πάχυνση του έσω χιτώνα. Αντιθέτως, δεν παρατηρήθηκε δοσο-εξαρτώμενη αρτηριακή μεταβολή για το πολυμερές B, ούτε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων BL και BH για κάποια από τις υπό μελέτη παραμέτρους. Η ομάδα EG έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς την επιφάνεια έσω στιβάδας, ποσοστού στένωσης και μέσης πάχυνσης έσω στιβάδας σε σχέση με την ομάδα C (11.23% vs 23.59%, $p = 0.03$ και 47.6μm vs 90.25μm, $p = 0.008$ αντίστοιχα). Η ομάδα EF εμφάνισε επίσης στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς την μέση πάχυνση της έσω στιβάδας σε σχέση με την ομάδα C (42.17μm vs 90.25μm, $p = 0.01$). Όσον αφορά συγκριτικά τις δύο ομάδες EG και EF, η ομάδα EF παρουσίασε ήπια μεγαλύτερη μέση ολική αρτηριακή αντίδραση σε σχέση με την ομάδα EG, καθώς και μεγαλύτερο ποσοστό στένωσης σε σχέση με την ομάδα EG, χωρίς ωστόσο οι διαφορές αυτές να είναι στατιστικά σημαντικές. Τα ευρήματα αυτά συνάδουν με την υπεροχή των ομάδων με πολυμερές B σε σύγκριση με της ομάδας με πολυμερές A που περιεγράφηκε παραπάνω και τα οποία υποδηλώνουν ότι τα stent με εβερόλιμους της Rontis όταν επικαλύπτονται με πολυμερές τύπου B πιθανώς να παρουσιάζουν μεγαλύτερη βιοσυμβατότητα σε σχέση με όταν επικαλύπτονται με το πολυμερές A. Ωστόσο είναι απαραίτητο το εύρημα αυτό να επιβεβαιωθεί με περαιτέρω μελέτες.

Τέλος, σε όλες τις ομάδες εκτός από την ομάδα C ανιχνεύτηκαν εντός της έσω στιβάδας σωματίδια τα οποία δεν έλαβαν χρώση. Τα σωματίδια αυτά συσχετίστηκαν με διάσπαρτα μακροφάγα και γιγαντοκύτταρα και θεωρήθηκε ότι προκαλούν μία

ελάχιστη «αντίδραση ξένου σώματος». Αν και δεν είναι απολύτως κατανοητός ο τρόπος προέλευσής τους, είναι πιθανό να αποτελούν είτε υπολείμματα του πολυμερούς του stent είτε υπολείμματα που προέρχονται από τη διαδικασία εμφύτευσης. Παρόλο που ο ρόλος των σωματιδίων αυτός δεν θεωρείται σημαντικός στην αρτηριακή αναδιαμόρφωση, δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα συμβολής τους στην έναρξη της τοπικής ανοσολογικής απόκρισης και του σχηματισμού νέο-ενδοθηλιακού ιστού.

4.2 Αγγειακή βλάβη και τοπική χορήγηση ρετινοϊκού οξέος

Τα πρώτα πειραματικά δεδομένα της τοπικής δράσης του ρετινοϊκού οξέος στην ενδοθηλιακή βλάβη χρονολογούνται περίπου πριν από μία εικοσαετία. Ο Herdeg και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν ως πειραματικό μοντέλο κόνικλους τύπου New Zealand. Αρχικά τα ζώα υπεβλήθησαν σε αγγειοπλαστική με μπαλόνι στη δεξιά καρωτίδα με σκοπό την πρόκληση της αρτηριακής βλάβης και τον σχηματισμό πλάκας και στη συνέχεια χορηγήθηκαν τοπικά 10ml, 10μM ρετινοϊκού οξέος μέσω αγγειοπλαστικής με διπλό μπαλόνι. Τέσσερις εβδομάδες μετά την πραγματοποίηση της επέμβασης, τα υπό μελέτη αρτηριακά τμήματα αφαιρέθηκαν. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση του πρώιμου πολλαπλασιασμού του νέο-ενδοθηλίου ($p = 0.0002$), καθώς και στατιστικά σημαντική αύξηση της διαμέτρου στη συνολική διάμετρο του αγγείου ($p = 0.026$), γεγονός που οδήγησε σε σημαντική μείωση της στένωσης του αγγείου σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($21.7 \pm 8.3\%$ vs $31.8 \pm 13.4\%$ αντίστοιχα). Κατά την ανοσοκυτταροχημική μελέτη παρατηρήθηκε αύξηση της α-ακτίνης στα δείγματα που εφαρμόστηκε το ρετινοϊκό οξύ, υποδεικνύοντας το ρόλο

του ρετινοϊκού οξέος στην αποδιαφοροποίηση των λείων μυϊκών κυττάρων. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν τη θετική δράση του ρετινοϊκού οξέος στη διαδικασία της επαναστένωσης μετά από αγγειοπλαστική (260). Λίγα χρόνια αργότερα, ο Gregory και οι συνεργάτες του εξέτασαν την αποτελεσματικότητα της τοπικής χορήγησης all-trans ρετινοϊκού οξέος μέσω πορώδους μεμβράνης πολυεστέρα με βάση το κιτρικό (POC) στην ανάπτυξη της ενδοθηλιακής υπερπλασίας. Για το σκοπό διενεργήθηκε σε πειραματικό μοντέλο ποντικών αρτηριακή βλάβη μέσω καθετήρα εμβολεκτομής και στη συνέχεια χειρουργική τοποθέτηση της μεμβράνης POC περίξ της έξω στιβάδας. Η μεμβράνη απελευθέρωνε 12 μg ρετινοϊκού οξέος σε διάστημα δύο εβδομάδων, επιτρέποντας το 92% της απελευθέρωσης μόλις την πρώτη εβδομάδα. Η ιστομορφομετρική ανάλυση έδειξε 76% μείωση των μακροφάγων στην έσω στιβάδα, 56% μείωση της επιφάνειας της εσωτερικής στιβάδας, 57% μείωση του λόγου επιφάνειας έσω/μέση στιβάδας και 50% μείωση του ποσοστού στένωσης ($p = 0.001$), συμβάλλοντας στην αναστολή σχηματισμού νέο-ενδοθηλιακής υπερπλασίας. Αντιθέτως, δεν παρατηρήθηκε σημαντική επίδραση στην απόπτωση και στην διαφοροποίηση των κυττάρων (289). Η ίδια ομάδα εξέτασε επίσης την αποτελεσματικότητα της τοπικής χορήγησης ρετινοϊκού οξέος μέσω αγγειακού μοσχεύματος ePTFE (expanded polytetrafluoroethylene) επικαλυμμένα με POC. Σε πειραματικό μοντέλο ποντικών διενεργήθηκε η τοποθέτηση του συνθετικού αγγειακού μοσχεύματος στην αορτή. Τα αποτελέσματα έδειξαν μείωση της επιφάνειας της έσω στιβάδας, αύξηση της διαμέτρου του αυλού και των επιφανειών των μέσων στιβάδων, καθώς και μείωση του ποσοστού στένωσης. Επιπλέον, παρατηρήθηκε μείωση του σχηματισμού νέο-έσω στιβάδας τόσο στο εγγύς όσο και

στο περιφερικό τμήμα του μοσχεύματος, καθώς και μείωση της φλεγμονώδους αντίδρασης συγκριτικά με τα υπόλοιπα δείγματα (290).

Παρά την ραγδαία πρόοδο στον τομέα των διαδερμικών καθετηριασμών των στεφανιαίων και την διαρκή εξέλιξη των ενδοστεφανιαίων προθέσεων, η πρώιμη ή όψιμη επαναστένωση των stent παραμένει μία από τις βασικότερες επιπλοκές της επέμβασης αυτής. Ο βασικός στόχος για την βελτίωση της ασφάλειας και αποτελεσματικότητας των DES αποτελεί η αναστολή νέο-ενδοθηλιακού ιστού μετά την τοποθέτηση του stent. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με την τοπική εφαρμογή κατάλληλου φαρμάκου, το οποίο αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό, την μετανάστευση και την από-διαφοροποίηση των λείων μυϊκών κυττάρων και το οποίο μειώνει την φλεγμονώδη αρτηριακή αντίδραση. Υποθέσαμε ότι το ρετινοϊκό οξύ θα μπορούσε να αποτελεί μία τέτοια επιλογή καθώς όπως έχει αποδειχθεί σε πληθώρα *in vitro* και *in vivo* πειραματικών μελετών αναστέλλει τόσο τον πολλαπλασιασμό όσο και την μετανάστευση και την από-διαφοροποίηση των λείων μυϊκών κυττάρων μέσω της κυτταρικής σηματοδότησης, ενώ ταυτόχρονα είναι λιγότερο κυτταροτοξικό σε σχέση με τα χρησιμοποιούμενα φάρμακα, όπως η πακλιταξέλη και τα φάρμακα της οικογένειας -λίμους, τα οποία αναστέλλουν το πολλαπλασιασμό μέσω διακοπής του κυτταρικού κύκλου σε διάφορα στάδια.

5. Περιορισμοί

Η παρούσα μελέτη παρουσιάζει ορισμένους περιορισμούς, οι οποίοι εγείρουν ερωτήματα ως προς τη δυνατότητα χρήσης συσκευών αποδέσμευσης ρετινοϊκού οξέος στον άνθρωπο στην καθημερινή κλινική πράξη. Πρώτον, η τοποθέτηση των υπό

μελέτη stent πραγματοποιήθηκε σε υγιείς αρτηρίες, στις οποίες δεν είχε πραγματοποιηθεί προηγουμένως αθηροσκληρωτική βλάβη. Δεύτερον, το σημείο εμφύτευσης των stent ήταν οι λαγόνιες αρτηρίες, οι οποίες εμφανίζουν περισσότερο ελαστική φύση σε σχέση με το μυώδες τοίχωμα των στεφανιαίων αρτηριών. Συνεπώς, είναι πιθανό ο βαθμός της αρτηριακής αντίδρασης και του σχηματισμού νέο-ενδοθηλιακού ιστού να είναι ηπιότερος και άρα να υπο-εκτιμούνται σε σχέση με μία πιθανή αντίδραση του αρτηριακού τοιχώματος των στεφανιαίων αρτηριών. Τρίτον, το διάστημα παρατήρησης ήταν μόλις τέσσερις εβδομάδες. Περίοδος η οποία εναρμονίζεται με τις ισχύουσες οδηγίες ως διάστημα ικανό για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειας των stent ρετινοϊκού οξέος (273). Ωστόσο, δεν είναι γνωστή η αποτελεσματικότητα τους σε μακροχρόνια περίοδο. Περαιτέρω διερεύνηση είναι απαραίτητη για την εκτίμηση της καταλληλότητας των stent ρετινοϊκού οξέος για μεγαλύτερα διαστήματα.

Τα θετικά ευρήματα της έρευνας αυτής στο πειραματικό μοντέλο κονίκλων, μας οδήγησε στην διεξαγωγή περαιτέρω μελέτης της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειας των stent επικαλυπτόμενων με ρετινοϊκό οξύ σε πειραματικό μοντέλου χοίρου. Τα stent τοποθετήθηκαν στα στεφανιαία αγγεία των ζώων, καθώς προσομοιάζουν περισσότερο την ανατομία και τη δομή των στεφανιαίων αγγείων στον άνθρωπο. Λόγω έλλειψης οικονομικών πόρων η ιστολογικής και ιστομορφολογικής ανάλυσης δεν ολοκληρώθηκε ακόμη.

6. Συμπέρασμα

Η στεφανιαία νόσος αποτελεί ένα από τα βασικότερα προβλήματα υγείας, καθώς είναι η κυριότερη αιτία θανάτου παγκοσμίως, οδηγώντας σε ευρεία χρήση οικονομικών πόρων της υγείας. Οι κλινικές εκδηλώσεις της στεφανιαίας νόσου περιλαμβάνουν είτε το οξύ έμφραγμα μυοκαρδίου είτε την ισχαιμική μυοκαρδιοπάθεια, και αποτελεί μέρος της γενικότερης καρδιαγγειακής νόσου. Είναι ευρέως αποδεδειγμένο ότι στην εμφάνιση της στεφανιαίας νόσου συμβάλλουν ποικίλοι παράγοντες κινδύνου (τροποποιήσιμοι και μη τροποποιήσιμοι). Ο κυριότερος παθοφυσιολογικός μηχανισμός εμφάνισης της στεφανιαίας νόσου είναι η δημιουργία αθηρωματικής πλάκας, μία χρόνια φλεγμονώδης αγγειακή νόσος, η οποία είναι αποτέλεσμα τραυματισμού του ενδοθηλίου λόγω της παρατεταμένης έκθεσης αυτού στους βλαπτικούς παράγοντες κινδύνου. Οι κυριότερες επιπλοκές της δημιουργίας αθηρωματικής πλάκας είναι είτε η προοδευτική στένωση του αυλού του αγγείου, η οποία οδηγεί στη εμφάνιση ισχαιμίας των παρακείμενων ιστών, είτε η ρήξη αυτής η οποία οδηγεί στην δημιουργία θρόμβου με μερική ή πλήρη απόφραξη του αγγείου.

Η εισαγωγή της αγγειοπλαστικής με ενδοστεφανιαία πρόθεση στα μέσα της δεκαετίας του '80 για την αντιμετώπιση των οξέων και μετέπειτα των χρόνιων στεφανιαίων συμβαμάτων, βελτίωσε δραστικά τόσο την επιβίωση όσο και των πρόγνωση των ασθενών αυτών. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκαν stent χωρίς επικάλυψη (BMS), η χρήση των οποίων μείωσε σημαντικά τα ποσοστά εμφράγματος του μυοκαρδίου και την ανάγκη για επείγουσα αορτοστεφανιαία παράκαμψη. Ωστόσο παρέμεινε αρκετά υψηλό το ποσοστό επαναστένωσης (20-30%), με μέσο χρόνο

εμφάνισης στους 6-9 μήνες, ενώ επίσης προέκυψε το πρόβλημα της θρόμβωσης του stent και η ανάγκη για επαναγγείωση. Η εμφάνιση πρώιμων και όψιμων επιπλοκών από τις επεμβατικές μεθόδους είχαν ως αποτέλεσμα την ραγδαία εξέλιξη της τεχνολογίας και των υλικών που χρησιμοποιήθηκαν στις διαδερμικές επεμβατικές μεθόδους τις δεκαετίες που ακολούθησαν, οδηγώντας στην κατασκευή των stent με επικάλυψη φαρμάκου (DES). Η σταδιακή απελευθέρωση μικρής ποσότητας κυτταροστατικών φαρμάκων επέτρεψε τη μείωση της ενδοθηλιακής υπερπλασίας και της φλεγμονώδους αντίδρασης των παρακείμενων ιστών, οδηγώντας σε μείωση του κινδύνου επαναστένωσης ή και θρόμβωσης του stent. Ειδικότερα, νεότερα stent (τρίτης γενιάς DES), αποτελούνται είτε από πολυμερή βιοδιασπώμενα μετά από καθορισμένο διάστημα, είτε δεν φέρουν καθόλου πολυμερές και επικαλύπτονται από ένα στρώμα που λειτουργεί ως δεξαμενή του φαρμάκου που επιτρέπει την απευθείας απελευθέρωση από αυτό, μειώνοντας με τον τρόπο αυτό ακόμα περισσότερο την τοπική φλεγμονώδη αντίδραση και τον κίνδυνο επαναστένωσης.

Στην παρούσα μελέτη ερευνήσαμε την αποτελεσματικότητα καινοτόμου ενδοστεφανιαίας πρόσθεσης επικαλυπτόμενη με ρετινοϊκό οξύ στην αντιμετώπιση της καρδιαγγειακής νόσου. Συγκεκριμένα μελετήθηκε η αποτελεσματικότητα της απελευθέρωσης του ρετινοϊκού οξέος με βιοδιασπώμενα πολυμερή στην εμφάνιση επαναστένωσης της ενδοστεφανιαίας πρόθεσης. Η επιλογή του ρετινοϊκού οξέος στηρίχθηκε στην ιδέα ότι η μείωση της επιπλοκής της επαναστένωσης μπορεί να επιτευχθεί με την τοπική εφαρμογή κατάλληλου φαρμάκου, το οποίο αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό, την μετανάστευση και την από-διαφοροποίηση των λείων μυϊκών κυττάρων και το οποίο μειώνει την φλεγμονώδη αρτηριακή αντίδραση. Πληθώρα *in vitro* και *in vivo* πειραματικών μελετών έδειξαν ότι το ρετινοϊκό οξύ μπορεί να

αναστέλλει τις διαδικασίες αυτές μέσω της κυτταρικής σηματοδότησης, ενώ ταυτόχρονα είναι λιγότερο κυτταροτοξικό σε σχέση με τα χρησιμοποιούμενα φάρμακα, όπως η πακλιταξέλη και τα φάρμακα της οικογένειας -λίμους, τα οποία αναστέλλουν το πολλαπλασιασμό μέσω διακοπής του κυτταρικού κύκλου σε διάφορα στάδια. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι το ρετινοϊκό οξύ αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων καθώς και τον σχηματισμό νέο-ενδοθηλιακού ιστού μετά από πρόκληση αρτηριακής βλάβης μέσω διαδερμικού καθετηριασμού με μπαλόνι, συμβάλλοντας με τον τρόπο αυτό στην σημαντική μείωση της επαναστένωσης του αγγείου.

Για την διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας εμφυτεύτηκαν συνολικά 60 stent στις λαγόνιες αρτηρίες 30 κονίκλων. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν stent αποτελούμενα από δύο διαφορετικά είδη βιοδιασπώμενων πολυμερών (Α και Β) και επικαλυπτόμενα με τρεις διαφορετικές δόσεις ρετινοϊκού οξέος σε κάθε ομάδα πολυμερούς [μικρή ('L', Low), μεσαία ('M', Medium) και υψηλή δόση ('H', High)], με αποτέλεσμα τη δημιουργία τριών υπό-ομάδων για το κάθε πολυμερές (AH, AM, AL, BH, BM, BL), καθώς και δύο ομάδες ελέγχου με stent από το ίδιο μεταλλικό πλέγμα κοβαλτίου-χρωμίου, φάρμακο αποδέσμευσης το εβερόλιμους και επίστρωση με το πολυμερές 'Α' στη μία ομάδα και το πολυμερές 'Β' στην άλλη, μία ομάδα χωρίς επικάλυψη φαρμάκου και μία ομάδα με το εμπορικό διαθέσιμο stent αποδέσμευσης φαρμάκου εβερόλιμους (Xience Pro, Abbott). Δημιουργήθηκαν συνολικά 10 διαφορετικές ομάδες. Τέσσερις εβδομάδες μετά την τοποθέτηση των στεντ τα τμήματα των αρτηριών που περιείχαν τα stent αφαιρέθηκαν και πραγματοποιήθηκε ιστομορφομετρική και ιστοπαθολογική ανάλυση.

Τα βασικά ευρήματα που προέκυψαν από την ιστοπαθολογική μελέτη ήταν: (1) απουσία θρόμβωσης ή νέκρωσης του αγγειακού τοιχώματος, (2) παρουσία ρήξεων των ελαστικών στιβάδων χωρίς επέκταση στους υπόλοιπους χιτώνες, (3) παρουσία ανοσολογικής και φλεγμονώδους αντίδρασης του ξενιστή, (4) παρουσία περιορισμένης διαφοροποίησης στο μέσο όρο της συνολικής αρτηριακής αντίδρασης. Στην συγκριτική αξιολόγηση παρατηρήθηκε ότι οι διαφορές στο μέσο όρο της συνολικής αρτηριακής αντίδρασης μεταξύ των διαφορετικών ομάδων ήταν μικρές, γεγονός που υποδηλώνει ότι η δόση και ο τύπος του πολυμερούς μπορεί να διαδραματίζουν ορισμένο ρόλο στη βιοσυμβατότητα και στην αποτελεσματικότητα της εμφυτεύσιμης συσκευής. Τέλος, κατά την ιστομορφομετρική ανάλυση ο βαθμός στένωσης που καταγράφηκε ήταν αποδεκτός σε όλες τις ομάδες των stent. Οι ομάδες με το πολυμερές Β εμφάνισαν μικρότερη στένωση και μέση πάχυνση του έσω χιτώνα σε σχέση με τις ομάδες με το πολυμερές Α. Η ομάδα ΑΗ παρουσίασε την μεγαλύτερη στένωση και μέση πάχυνση του έσω χιτώνα σε σχέση με τα υπόλοιπα stent. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι το πολυμερές Α ανεξάρτητα της ποσότητας φαρμάκου που απελευθερώνει προκαλεί περισσότερες μεταβολές στο αρτηριακό τοίχωμα.

Η παρούσα πειραματική μελέτη είχε δύο βασικούς περιορισμούς. Πρώτον, η τοποθέτηση των υπό μελέτη stent πραγματοποιήθηκε σε υγιείς αρτηρίες, στις οποίες δεν είχε πραγματοποιηθεί προηγουμένως αθηροσκληρωτική βλάβη. Δεύτερον, το σημείο εμφύτευσης των stent ήταν οι λαγόνιες αρτηρίες, οι οποίες εμφανίζουν περισσότερο ελαστική φύση σε σχέση με το μυώδες τοίχωμα των στεφανιαίων αρτηριών. Ωστόσο, τα θετικά αποτελέσματα της έρευνας αυτής, καθώς και τα δεδομένα της ήδη υπάρχουσας βιβλιογραφίας αποτελούν ελπιδοφόρα ευρήματα για

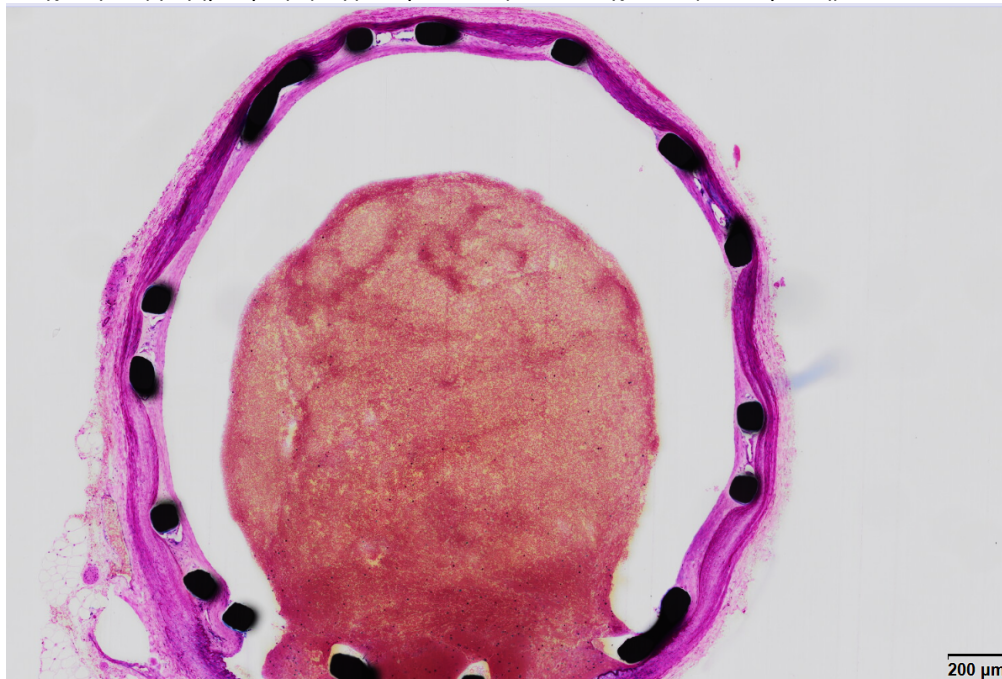
τη χρήση του ρετινοϊκού οξέος στην αντιμετώπιση του προβλήματος στην επαναστένωση. Περαιτέρω διερεύνηση απαιτείται προκειμένου να αποσαφηνιστεί ο ρόλος και η επίδραση του ρετινοϊκού οξέος στη διαδικασία της επαναστένωσης μετά από τοποθέτηση ενδοστεφανιαίας πρόθεσης.

III. Παράρτημα I

Εικόνα 9. Ζώο αριθ. 1091, Ομάδα C. Paragon, Κλίμακα = 200 μm .
Μέτρια αύξηση (βαθμός 3) της υπερπλασίας του έσω χιτώνα (διπλό βέλος)

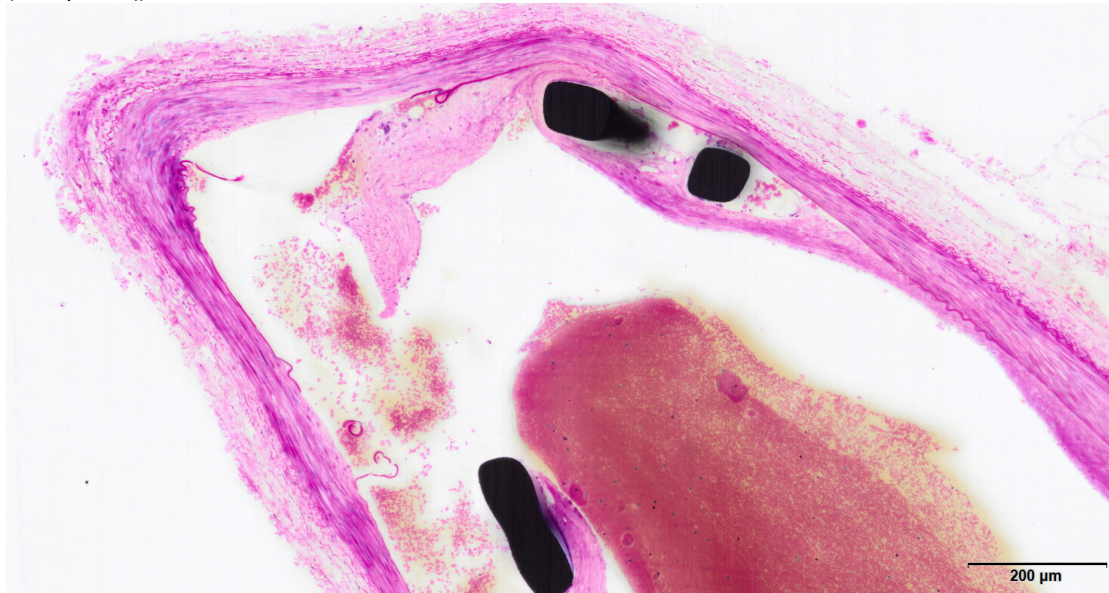


Εικόνα 10. Ζώο αριθ. 1089, Ομάδα BM. Paragon, Κλίμακα = 200 μm .
Ελάχιστη αύξηση (βαθμός 1) της υπερπλασίας του έσω χιτώνα (διπλό βέλος)



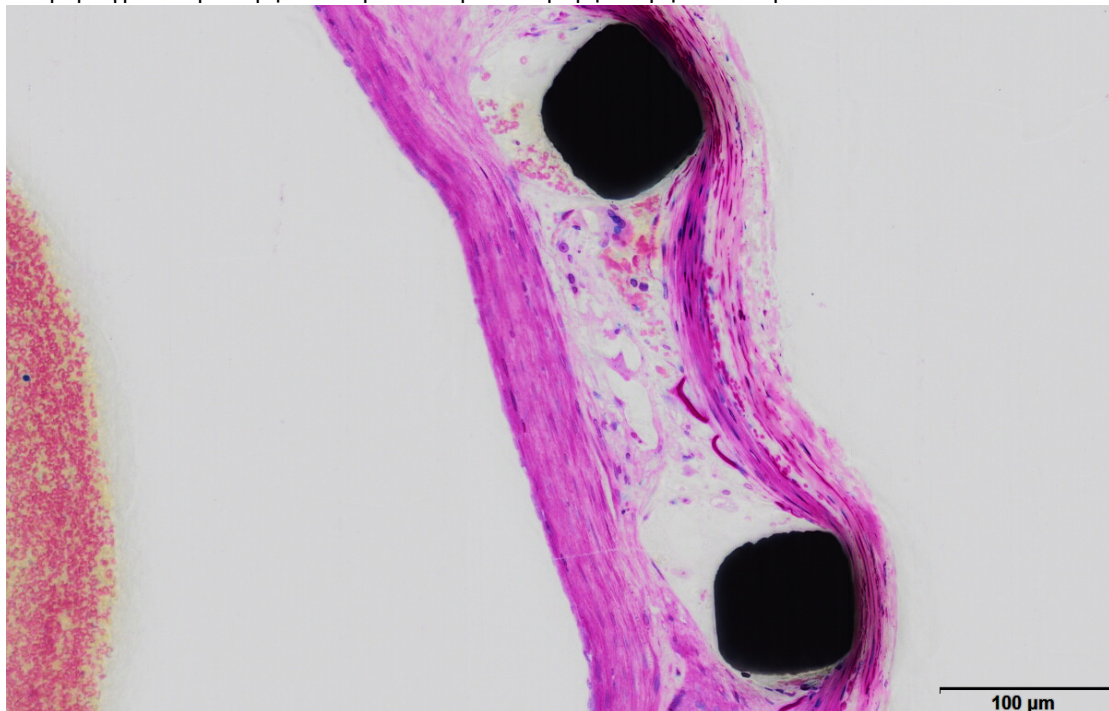
Εικόνα 11. Ζώο αριθ. 1048, Ομάδα AL. Paragon, Κλίμακα = 200 μm .

Πολυεστιακές ρήξεις της έσω ελαστικής μεμβράνης (μαύρο βέλος) με παρουσία οξείας αιμορραγίας (αστερίσκος).



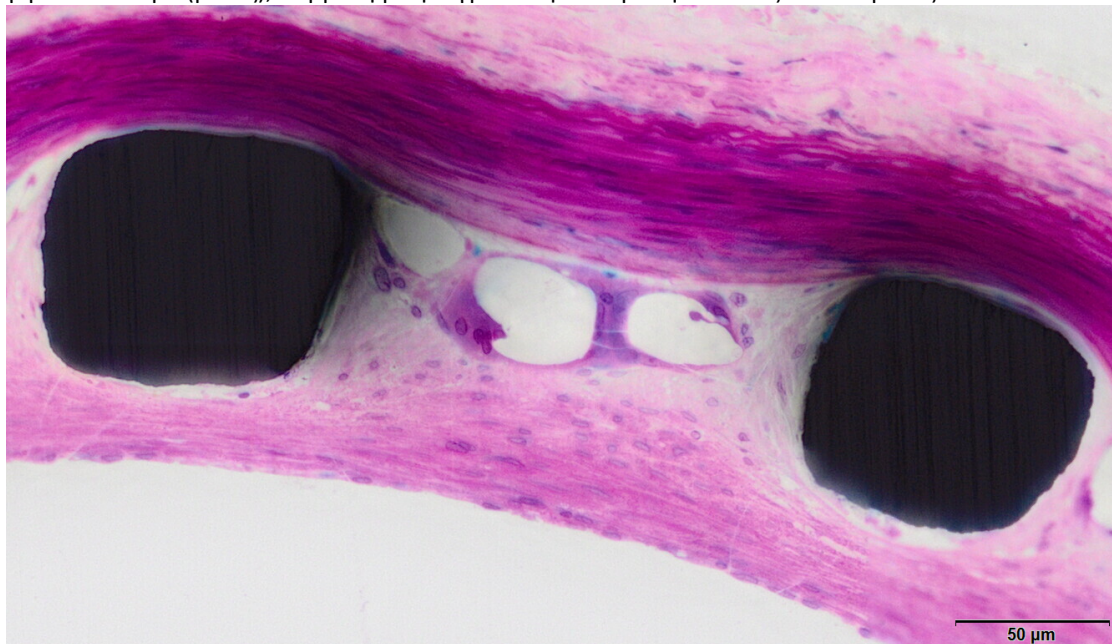
Εικόνα 12. Ζώο αριθ. 1080, Ομάδα ΒΗ. Paragon, Κλίμακα = 100 μm .

Παρουσία πολυπύρηνων (γιγαντοκυττάρων) (βέλος) σε επαφή με τα στηρίγματα του stent, αναμειγμένων με λεμφοκύτταρα και λίγα πολυμορφοπύρηνά κύτταρα.



Εικόνα 13. Ζώο αριθ. 1089, Ομάδα ΒΜ. Paragon, Κλίμακα = 50 μm .

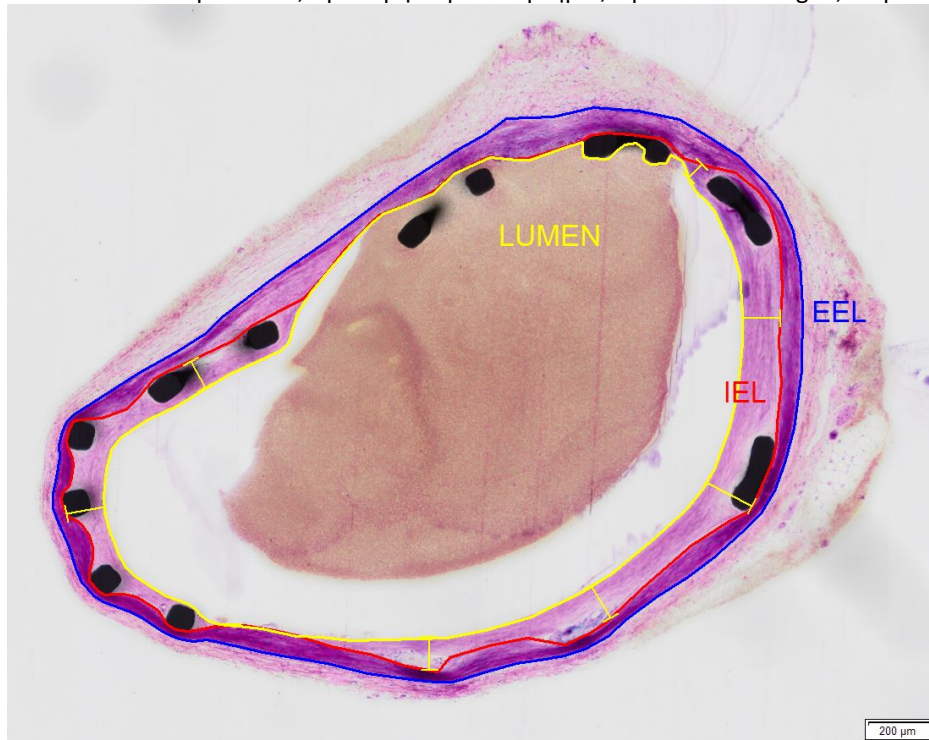
Παρουσία σωματιδίων ανοξείδωτου χάλυβα εντός του έσω χιτώνα, σε συνδυασμό με γιγαντοκύτταρα (βέλος), συμβατή με φλεγμονώδη αντίδραση τύπου “ξένου σώματος”.



Εικόνα 14. Ζώο αριθ. 1085, Αριστερή λαγόνια αρτηρία, Ομάδα ΑΛ. Paragon, Κλίμακα x20



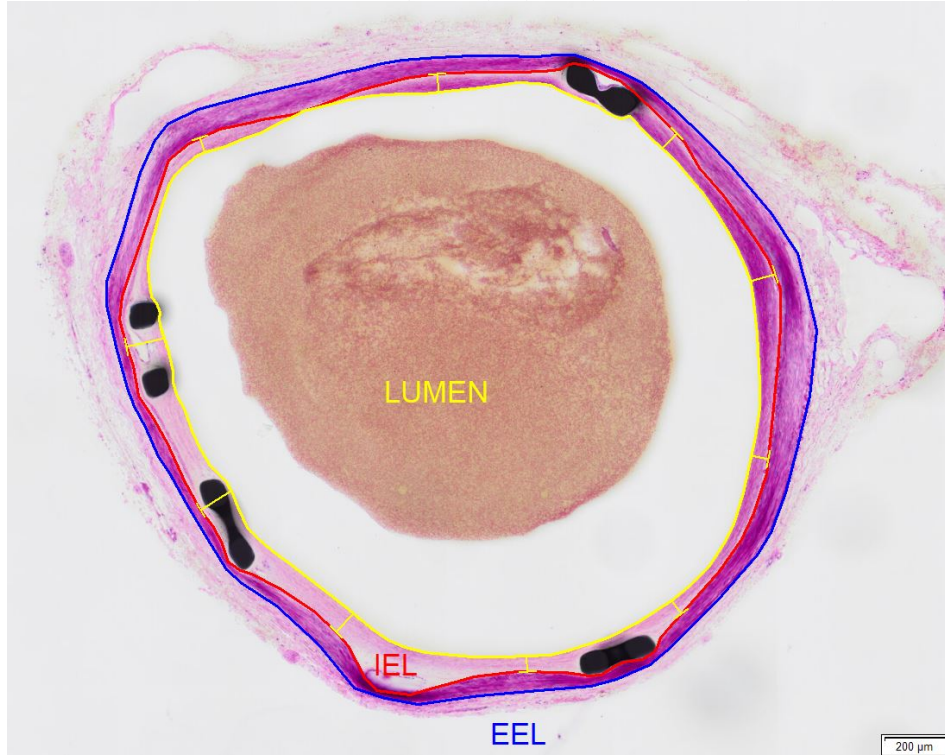
Εικόνα 15. Ζώο αριθ. 1086, Αριστερή λαγόνια αρτηρία, Ομάδα AM. Paragon, Κλίμακα x20



Εικόνα 16. Ζώο αριθ. 1087, Δεξιά λαγόνια αρτηρία, Ομάδα AH. Paragon, Κλίμακα x20



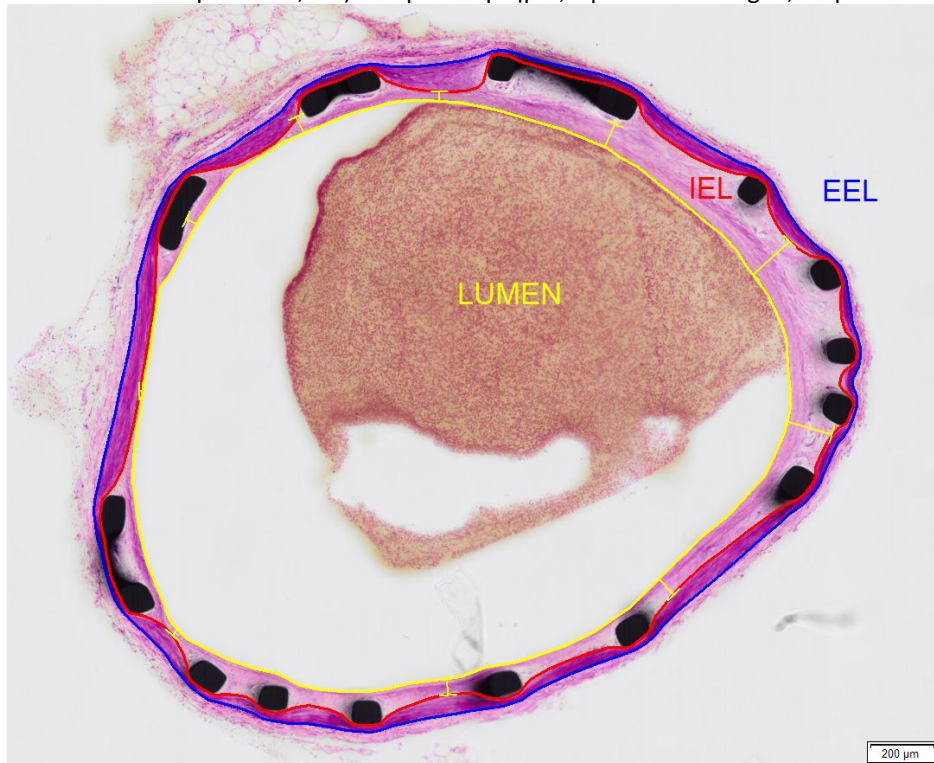
Εικόνα 17. Ζώο αριθ. 1075, Δεξιά λαγόνια αρτηρία, Ομάδα BL. Paragon, Κλίμακα x20



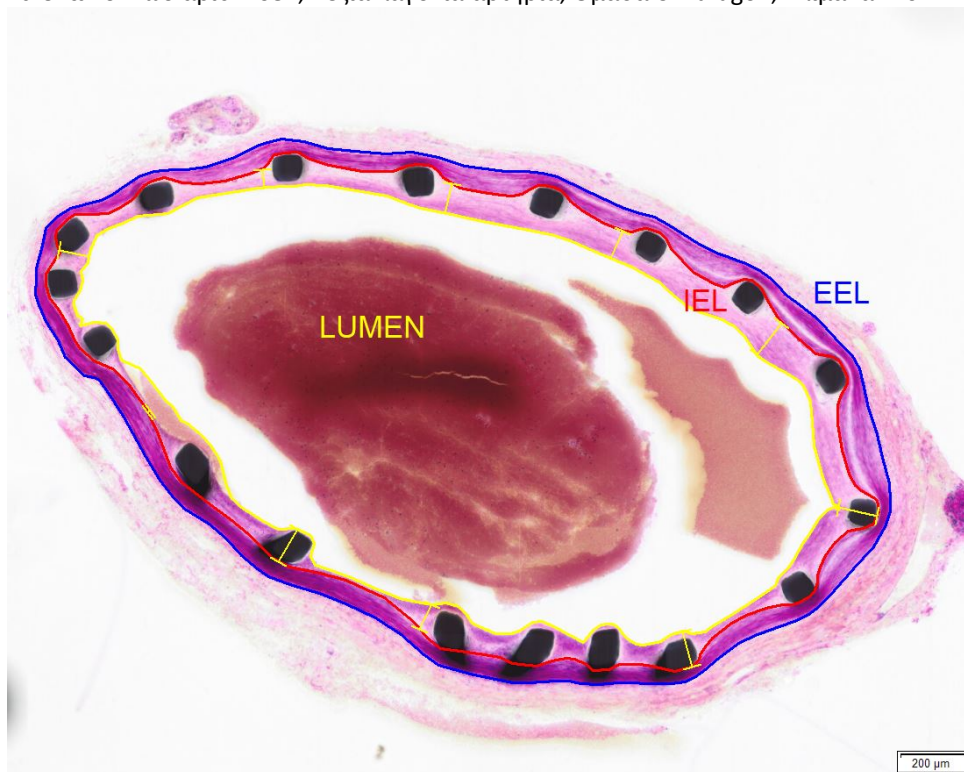
Εικόνα 18. Ζώο αριθ. 1064, Δεξιά λαγόνια αρτηρία, Ομάδα BM. Paragon, Κλίμακα x20



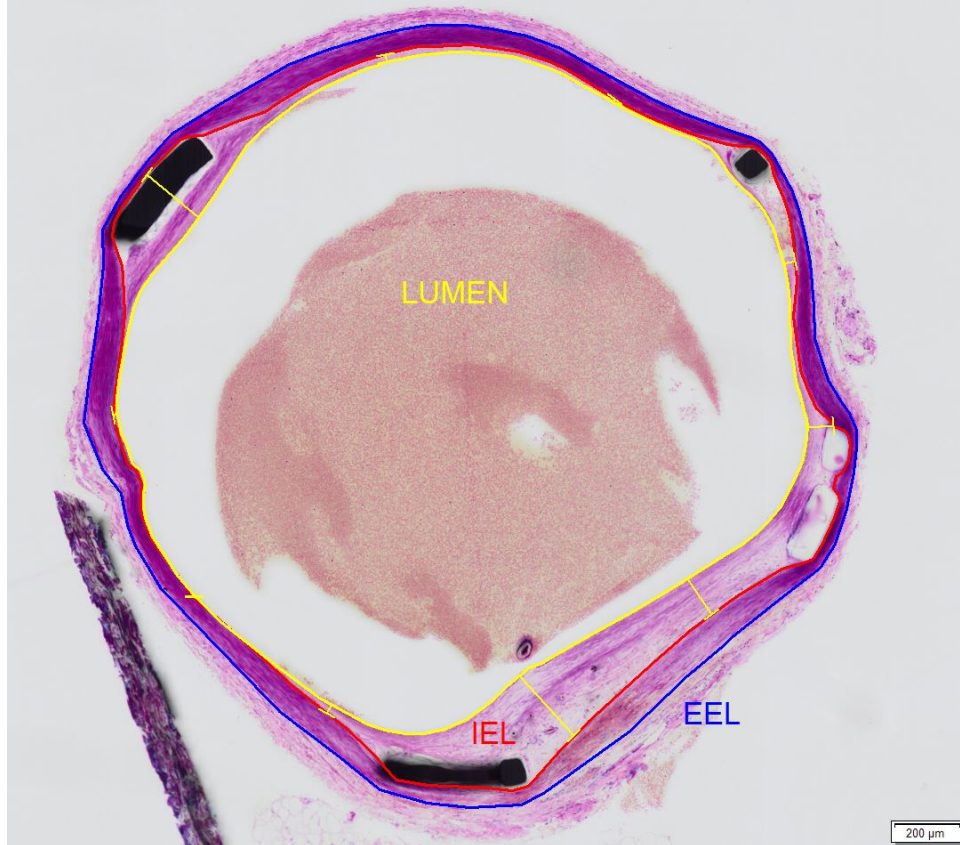
Εικόνα 19. Ζώο αριθ. 1069, Δεξιά λαγόνια αρτηρία, Ομάδα ΒΗ. Paragon, Κλίμακα x20



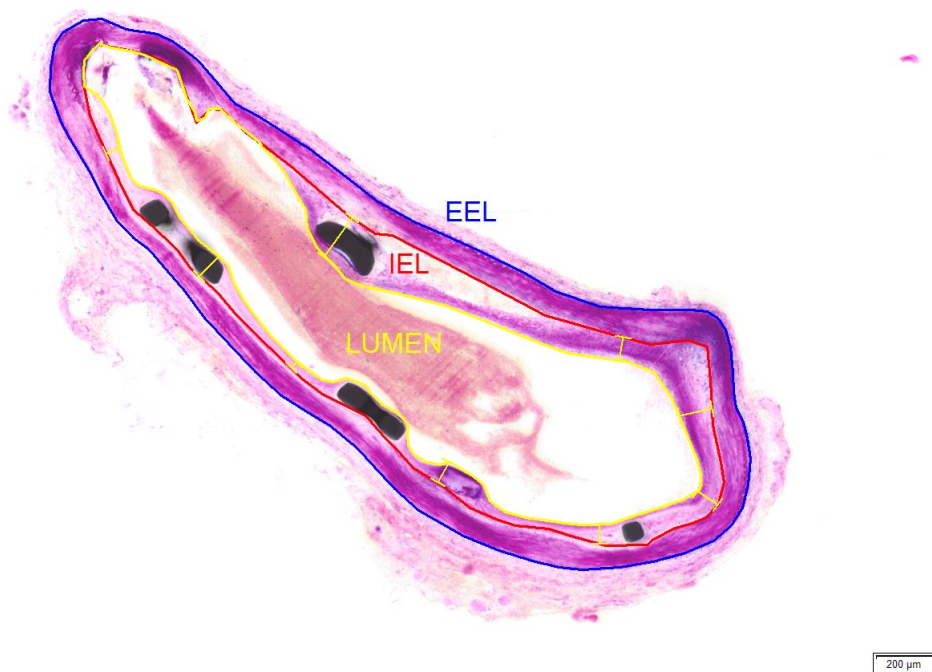
Εικόνα 20. Ζώο αριθ. 1081, Δεξιά λαγόνια αρτηρία, Ομάδα C. Paragon, Κλίμακα x20



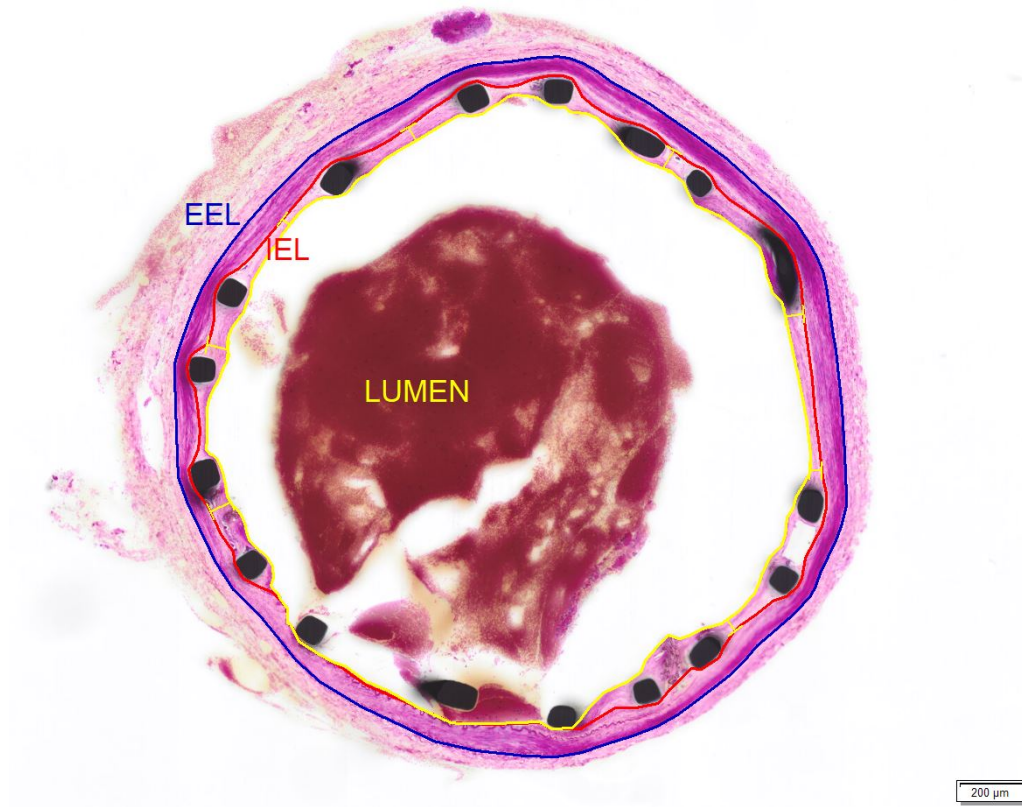
Εικόνα 21. Ζώο αριθ. 1082, Αριστερή λαγόνια αρτηρία, Ομάδα D. Paragon, Κλίμακα x20



Εικόνα 22. Ζώο αριθ. 1083, Δεξιά λαγόνια αρτηρία, Ομάδα EF. Paragon, Κλίμακα x20



Εικόνα 23. Ζώο αριθ. 1071, Αριστερή λαγόνια αρτηρία, Ομάδα EG. Paragon, Κλίμακα x20



IV. Παράρτημα II

Πίνακας 9. Στατιστικά σημαντικές διαφορές για τις παραμέτρους: επιφάνεια μέσου χιτώνα, επιφάνεια έσω χιτώνα, στένωση και μέση πάχυνση έσω χιτώνα συγκριτικά ανά ομάδα.

Μετρήσεις	Ομάδες σύγκρισης	Test	p-value	P < 0.05
Επιφάνεια μέσης στιβάδας (μm²)	Group AL vs AH	Unpaired T-test	0.1216	No
	Group BL vs BH	Unpaired T-test	0.7191	No
	Group AL vs C	Unpaired T-test	0.1139	No
	Group AM vs C	Unpaired T-test	0.1375	No
	Group AH vs C	Unpaired T-test	0.5678	No
	Group AL vs D	Unpaired T-test	0.0700	No
	Group AM vs D	Unpaired T-test	0.0836	No
	Group AH vs D	Unpaired T-test	0.8121	No
	Group BL vs C	Unpaired T-test	0.2825	No
	Group BM vs C	Unpaired T-test	0.3949	No
	Group BH vs C	Unpaired T-test	0.5974	No
	Group BL vs D	Unpaired T-test	0.1716	No
	Group BM vs D	Unpaired T-test	0.2665	No
	Group BH vs D	Unpaired T-test	0.4005	No
	Group EF vs C	Unpaired T-test	0.5988	No
	Group EG vs C	Unpaired T-test	0.4400	No
	Group EF vs D	Unpaired T-test	0.9053	No
	Group EG vs D	Unpaired T-test	0.7234	No
	Group EF vs EG	Unpaired T-test	0.8239	No
	Group AL vs BL	Unpaired T-test	0.7678	No

	Group AM vs BM	Unpaired T-test	0.6130	No
	Group AH vs BH	Unpaired T-test	0.3692	No
Επιφάνεια έσω στιβάδας (μm^2)	Group AL vs AH	Unpaired T-test	0.1656	No
	Group BL vs BH	Unpaired T-test	0.3820	No
	Group AL vs C	Unpaired T-test	0.6213	No
	Group AM vs C	Unpaired T-test	0.8487	No
	Group AH vs C	Unpaired T-test	0.2366	No
	Group AL vs D	Unpaired T-test	0.6821	No
	Group AM vs D	Unpaired T-test	0.8084	No
	Group AH vs D	Unpaired T-test	0.2443	No
	Group BL vs C	Unpaired T-test	0.2720	No
	Group BM vs C	Unpaired T-test	0.9573	No
	Group BH vs C	Unpaired T-test	0.8422	No
	Group BL vs D	Unpaired T-test	0.3613	No
	Group BM vs D	Unpaired T-test	0.9108	No
	Group BH vs D	Unpaired T-test	0.9132	No
	Group EF vs C	Unpaired T-test	0.0520	No
	Group EG vs C	Unpaired T-test	0.0407	Yes
	Group EF vs D	Unpaired T-test	0.0823	No
	Group EG vs D	Unpaired T-test	0.0650	No
	Group EF vs EG	Unpaired T-test	0.8413	No
	Group AL vs BL	Unpaired T-test	0.7713	No
	Group AM vs BM	Unpaired T-test	0.9075	No
	Group AH vs BH	Unpaired T-test	0.1763	No
Στένωση (%)	Group AL vs AH	Unpaired T-test	0.4185	No
	Group BL vs BH	Unpaired T-test	0.4309	No
	Group AL vs C	Mann-Whitney test	0.3939	No
	Group AM vs C	Unpaired T-test	0.8157	No
	Group AH vs C	Unpaired T-test	0.6766	No
	Group AL vs D	Mann-Whitney test	0.5887	No
	Group AM vs D	Unpaired T-test	0.1312	No
	Group AH vs D	Unpaired T-test	0.0169	Yes
	Group BL vs C	Unpaired T-test	0.1510	No
	Group BM vs C	Unpaired T-test	0.8244	No
	Group BH vs C	Unpaired T-test	0.2657	No
	Group BL vs D	Unpaired T-test	0.4182	No
	Group BM vs D	Unpaired T-test	0.2212	No
	Group BH vs D	Unpaired T-test	0.1802	No
	Group EF vs C	Unpaired T-test	0.7347	No
	Group EG vs C	Unpaired T-test	0.0366	Yes
	Group EF vs D	Unpaired T-test	0.3882	No
	Group EG vs D	Unpaired T-test	0.3104	No
	Group EF vs EG	Unpaired T-test	0.2272	No
	Group AL vs BL	Mann-Whitney test	>0.9999	No
	Group AM vs BM	Unpaired T-test	0.9733	No
	Group AH vs BH	Unpaired T-test	0.0669	No
Μέση πάχυνση έσω στιβάδας (μm)	Group AL vs AH	Unpaired T-test	0.0432	Yes
	Group BL vs BH	Unpaired T-test	0.9787	No
	Group AL vs C	Mann-Whitney test	0.2403	No
	Group AM vs C	Unpaired T-test	0.7057	No
	Group AH vs C	Unpaired T-test	0.2130	No

	Group AL vs D	Mann-Whitney test	0.6991	No
	Group AM vs D	Unpaired T-test	0.8997	No
	Group AH vs D	Unpaired T-test	0.1077	No
	Group BL vs C	Unpaired T-test	0.2882	No
	Group BM vs C	Unpaired T-test	0.9956	No
	Group BH vs C	Unpaired T-test	0.3486	No
	Group BL vs D	Unpaired T-test	0.7501	No
	Group BM vs D	Unpaired T-test	0.6906	No
	Group BH vs D	Unpaired T-test	0.7614	No
	Group EF vs C	Unpaired T-test	0.0149	Yes
	Group EG vs C	Unpaired T-test	0.0085	Yes
	Group EF vs D	Unpaired T-test	0.0613	No
	Group EG vs D	Unpaired T-test	0.0570	No
	Group EF vs EG	Unpaired T-test	0.7150	No
	Group AL vs BL	Mann-Whitney test	0.3095	No
	Group AM vs BM	Unpaired T-test	0.7773	No
	Group AH vs BH	Unpaired T-test	0.0235	Yes

V. Βιβλιογραφία

1. The top 10 causes of death [Internet]. 2024. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
2. Khan MA, Hashim MJ, Mustafa H, Baniyas MY, Al Suwaidi SKBM, AlKatheeri R, et al. Global Epidemiology of Ischemic Heart Disease: Results from the Global Burden of Disease Study. *Cureus*. 2020 Jul 23;12(7):e9349.
3. Shahjehan RD, Sharma S, Bhutta BS. Coronary Artery Disease. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 [cited 2025 Feb 22]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564304/>
4. Frąk W, Wojtasińska A, Lisińska W, Młynarska E, Franczyk B, Rysz J. Pathophysiology of Cardiovascular Diseases: New Insights into Molecular Mechanisms of Atherosclerosis, Arterial Hypertension, and Coronary Artery Disease. *Biomedicines* [Internet]. 2022 Aug 10 [cited 2025 Nov 25];10(8):1938. Available from: <https://www.mdpi.com/2227-9059/10/8/1938>
5. Libby P, Theroux P. Pathophysiology of Coronary Artery Disease. *Circulation* [Internet]. 2005 Jun 28 [cited 2025 Nov 25];111(25):3481–8. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.537878>
6. Knuuti J, Wijns W, Saraste A, Capodanno D, Barbato E, Funck-Brentano C, et al. 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes. *Eur Heart J*. 2020 Jan 14;41(3):407–77.
7. Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? *Circulation*. 2004 Jun 1;109(21 Suppl 1):II27-33.
8. Vrints C, Andreotti F, Koskinas KC, Rossello X, Adamo M, Ainslie J, et al. 2024 ESC Guidelines for the management of chronic coronary syndromes. *Eur Heart J*. 2024 Sep 29;45(36):3415–537.
9. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Chaitman BR, Bax JJ, Morrow DA, et al. Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). *J Am Coll Cardiol*. 2018 Oct 30;72(18):2231–64.
10. Henderson RA, Pocock SJ, Clayton TC, Knight R, Fox KAA, Julian DG, et al. Seven-year outcome in the RITA-2 trial: coronary angioplasty versus medical therapy. *J Am Coll Cardiol*. 2003 Oct 1;42(7):1161–70.
11. Hueb W, Soares PR, Gersh BJ, César LAM, Luz PL, Puig LB, et al. The medicine, angioplasty, or surgery study (MASS-II): a randomized, controlled clinical trial of three therapeutic strategies for multivessel coronary artery disease: one-year results. *J Am Coll Cardiol*. 2004 Dec 19;43(10):1743–51.
12. Maron DJ, Hochman JS, Reynolds HR, Bangalore S, O'Brien SM, Boden WE, et al. Initial Invasive or Conservative Strategy for Stable Coronary Disease. *N Engl J Med* [Internet]. 2020 Apr 9 [cited 2025 Sep 28];382(15):1395–407. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1915922>
13. Boden WE, O'Rourke RA, Teo KK, Hartigan PM, Maron DJ, Kostuk WJ, et al. Optimal medical therapy with or without PCI for stable coronary disease. *N Engl J Med*. 2007 Apr 12;356(15):1503–16.
14. Chaitman BR, Hardison RM, Adler D, Gebhart S, Grogan M, Ocampo S, et al. The Bypass Angioplasty Revascularization Investigation 2 Diabetes randomized trial of different treatment strategies in type 2 diabetes mellitus with stable ischemic heart disease: impact of treatment strategy on cardiac mortality and myocardial infarction. *Circulation*. 2009 Dec 22;120(25):2529–40.
15. De Bruyne B, Pijls NHJ, Kalesan B, Barbato E, Tonino PAL, Piroth Z, et al. Fractional Flow Reserve–Guided PCI versus Medical Therapy in Stable Coronary

- Disease. *N Engl J Med* [Internet]. 2012 Sep 13 [cited 2025 Feb 22];367(11):991–1001. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoal205361>
16. Neumann FJ, Sousa-Uva M, Ahlsson A, Alfonso F, Banning AP, Benedetto U, et al. 2018 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization. *Eur Heart J*. 2019 Jan 7;40(2):87–165.
 17. De Luca G, Suryapranata H, Marino P. Primary angioplasty vs. thrombolysis. *Indian Heart J*. 2007;59(4):302–10.
 18. Stenestrand U, Lindbäck J, Wallentin L, RIKS-HIA Registry. Long-term outcome of primary percutaneous coronary intervention vs prehospital and in-hospital thrombolysis for patients with ST-elevation myocardial infarction. *JAMA*. 2006 Oct 11;296(14):1749–56.
 19. Byrne RA, Rossello X, Coughlan JJ, Barbato E, Berry C, Chieffo A, et al. [2023 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes]. *G Ital Cardiol (Rome)*. 2024 Feb;25(2 Suppl 2):e1–112.
 20. Ozaki Y, Hara H, Onuma Y, Katagiri Y, Amano T, Kobayashi Y, et al. CVIT expert consensus document on primary percutaneous coronary intervention (PCI) for acute myocardial infarction (AMI) update 2022. *Cardiovasc Interv Ther*. 2022 Jan;37(1):1–34.
 21. Park H, Ahn JM, Kang DY, Kim SO, Ko E, Kim TO, et al. Very Long-term Safety and Effectiveness of Drug-Eluting or Bare-Metal Stents for Left Main Coronary Disease. *CJC Open*. 2021 Oct;3(10):1199–206.
 22. Piccolo R, Bonaa KH, Efthimiou O, Varenne O, Urban P, Kaiser C, et al. Drug-Eluting or Bare-Metal Stents for Left Anterior Descending or Left Main Coronary Artery Revascularization. *J Am Heart Assoc*. 2021 Oct 19;10(20):e018828.
 23. Singh IM, Filby SJ, El Sakr F, Gorodeski EZ, Lincoff AM, Ellis SG, et al. Drug-eluting stents versus bare-metal stents for treatment of bare-metal in-stent restenosis. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2010 Aug 1;76(2):257–62.
 24. Samara I, Moulas AN, Karanasiou G, Papadimitropoulou T, Fotiadis D, Michalis LK, et al. Is it time for a retinoic acid-eluting stent or retinoic acid-coated balloon? Insights from experimental studies of systemic and local delivery of retinoids. *Hellenic J Cardiol*. 2024;76:75–87.
 25. Sigwart U, Puel J, Mirkovitch V, Joffe F, Kappenberger L. Intravascular stents to prevent occlusion and restenosis after transluminal angioplasty. *N Engl J Med*. 1987 Mar 19;316(12):701–6.
 26. Roubin GS, Cannon AD, Agrawal SK, Macander PJ, Dean LS, Baxley WA, et al. Intracoronary stenting for acute and threatened closure complicating percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Circulation*. 1992 Mar;85(3):916–27.
 27. Holmes DR, Savage M, LaBlanche JM, Grip L, Serruys PW, Fitzgerald P, et al. Results of Prevention of REStenosis with Tranilast and its Outcomes (PRESTO) trial. *Circulation*. 2002 Sep 3;106(10):1243–50.
 28. Saraf AR, Yadav SP. Fundamentals of bare-metal stents. In: *Functionalised Cardiovascular Stents* [Internet]. Elsevier; 2018 [cited 2025 Feb 23]. p. 27–44. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780081004968000020>
 29. Blake Y. Biocompatible materials for cardiovascular stents. 2020 Dec 11 [cited 2025 Feb 23]; Available from: <https://zenodo.org/record/4321792>
 30. Moliterno DJ. Healing Achilles--sirolimus versus paclitaxel. *N Engl J Med*. 2005 Aug 18;353(7):724–7.
 31. Levine GN, Bates ER, Bittl JA, Brindis RG, Fihn SD, Fleisher LA, et al. 2016 ACC/AHA Guideline Focused Update on Duration of Dual Antiplatelet Therapy in Patients With Coronary Artery Disease: A Report of the American College of

Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines: An Update of the 2011 ACCF/AHA/SCAI Guideline for Percutaneous Coronary Intervention, 2011 ACCF/AHA Guideline for Coronary Artery Bypass Graft Surgery, 2012 ACC/AHA/ACP/AATS/PCNA/SCAI/STS Guideline for the Diagnosis and Management of Patients With Stable Ischemic Heart Disease, 2013 ACCF/AHA Guideline for the Management of ST-Elevation Myocardial Infarction, 2014 AHA/ACC Guideline for the Management of Patients With Non-ST-Elevation Acute Coronary Syndromes, and 2014 ACC/AHA Guideline on Perioperative Cardiovascular Evaluation and Management of Patients Undergoing Noncardiac Surgery. *Circulation*. 2016 Sep 6;134(10):e123-155.

32. Katz G, Harchandani B, Shah B. Drug-eluting stents: the past, present, and future. *Curr Atheroscler Rep*. 2015 Mar;17(3):485.
33. Driver M. Coatings for cardiovascular devices: coronary stents. In: *Coatings for Biomedical Applications* [Internet]. Elsevier; 2012 [cited 2025 Feb 23]. p. 223–50. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781845695682500072>
34. Schömig A, Dibra A, Windecker S, Mehilli J, Suárez de Lezo J, Kaiser C, et al. A meta-analysis of 16 randomized trials of sirolimus-eluting stents versus paclitaxel-eluting stents in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 2007 Oct 2;50(14):1373–80.
35. Lee DH, Cardiology Service, Interventional Cardiology Unit, University Hospital Marques de Valdecilla, Santander, Spain, Torre Hernandez JMDL, Cardiology Service, Interventional Cardiology Unit, University Hospital Marques de Valdecilla, Santander, Spain. The Newest Generation of Drug-eluting Stents and Beyond. *European Cardiology Review* [Internet]. 2018 [cited 2025 Nov 26];13(1):54. Available from: <https://www.eocrjournal.com/articles/drug-eluting-stents-and-beyond>
36. McKavanagh P, Zawadowski G, Ahmed N, Kutryk M. The evolution of coronary stents. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2018 Mar;16(3):219–28.
37. Holmes DR, Leon MB, Moses JW, Popma JJ, Cutlip D, Fitzgerald PJ, et al. Analysis of 1-year clinical outcomes in the SIRIUS trial: a randomized trial of a sirolimus-eluting stent versus a standard stent in patients at high risk for coronary restenosis. *Circulation*. 2004 Feb 10;109(5):634–40.
38. Weisz G, Leon MB, Holmes DR, Kereiakes DJ, Popma JJ, Teirstein PS, et al. Five-year follow-up after sirolimus-eluting stent implantation results of the SIRIUS (Sirolimus-Eluting Stent in De-Novo Native Coronary Lesions) Trial. *J Am Coll Cardiol*. 2009 Apr 28;53(17):1488–97.
39. Stone GW, Ellis SG, Cox DA, Hermiller J, O’Shaughnessy C, Mann JT, et al. A polymer-based, paclitaxel-eluting stent in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2004 Jan 15;350(3):221–31.
40. Ellis SG, Stone GW, Cox DA, Hermiller J, O’Shaughnessy C, Mann T, et al. Long-term safety and efficacy with paclitaxel-eluting stents: 5-year final results of the TAXUS IV clinical trial (TAXUS IV-SR: Treatment of De Novo Coronary Disease Using a Single Paclitaxel-Eluting Stent). *JACC Cardiovasc Interv*. 2009 Dec;2(12):1248–59.
41. Morice MC, Colombo A, Meier B, Serruys P, Tamburino C, Guagliumi G, et al. Sirolimus- vs paclitaxel-eluting stents in de novo coronary artery lesions: the REALITY trial: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2006 Feb 22;295(8):895–904.
42. Galløe AM, Thuesen L, Kelbaek H, Thayssen P, Rasmussen K, Hansen PR, et al. Comparison of paclitaxel- and sirolimus-eluting stents in everyday clinical practice: the SORT OUT II randomized trial. *JAMA*. 2008 Jan 30;299(4):409–16.

43. Windecker S, Remondino A, Eberli FR, Jüni P, Räber L, Wenaweser P, et al. Sirolimus-eluting and paclitaxel-eluting stents for coronary revascularization. *N Engl J Med*. 2005 Aug 18;353(7):653–62.
44. Stefanini GG, Taniwaki M, Windecker S. Coronary stents: novel developments. *Heart*. 2014 Jul;100(13):1051–61.
45. Yoshitomi Y, Kojima S, Yano M, Sugi T, Matsumoto Y, Saotome M, et al. Does stent design affect probability of restenosis? A randomized trial comparing Multilink stents with GFX stents. *Am Heart J*. 2001 Sep;142(3):445–51.
46. Pache J, Kastrati A, Mehilli J, Schühlen H, Dotzer F, Hausleiter J, et al. Intracoronary stenting and angiographic results: strut thickness effect on restenosis outcome (ISAR-STEREO-2) trial. *J Am Coll Cardiol*. 2003 Apr 16;41(8):1283–8.
47. Menown IBA, Noad R, Garcia EJ, Meredith I. The platinum chromium element stent platform: from alloy, to design, to clinical practice. *Adv Ther*. 2010 Mar;27(3):129–41.
48. Kastrati A, Mehilli J, Dirschinger J, Dotzer F, Schühlen H, Neumann FJ, et al. Intracoronary stenting and angiographic results: strut thickness effect on restenosis outcome (ISAR-STEREO) trial. *Circulation*. 2001 Jun 12;103(23):2816–21.
49. Iglesias JF, Heg D, Roffi M, Tüller D, Noble S, Muller O, et al. Long-Term Effect of Ultrathin-Strut Versus Thin-Strut Drug-Eluting Stents in Patients With Small Vessel Coronary Artery Disease Undergoing Percutaneous Coronary Intervention: A Subgroup Analysis of the BIOSCIENCE Randomized Trial. *Circ Cardiovascular Interventions* [Internet]. 2019 Aug [cited 2025 Feb 23];12(8):e008024. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCINTERVENTIONS.119.008024>
50. Choi HH, Kim JS, Yoon DH, Hong KS, Kim TH, Kim BK, et al. Favorable neointimal coverage in everolimus-eluting stent at 9 months after stent implantation: comparison with sirolimus-eluting stent using optical coherence tomography. *Int J Cardiovasc Imaging*. 2012 Mar;28(3):491–7.
51. Allocco DJ, Joshi AA, Dawkins KD. Everolimus-eluting stents: update on current clinical studies. *Med Devices (Auckl)*. 2011;4:91–8.
52. Palmerini T, Sangiorgi D, Valgimigli M, Biondi-Zoccai G, Feres F, Abizaid A, et al. Short- versus long-term dual antiplatelet therapy after drug-eluting stent implantation: an individual patient data pairwise and network meta-analysis. *J Am Coll Cardiol*. 2015 Mar 24;65(11):1092–102.
53. Sarno G, Lagerqvist B, Fröbert O, Nilsson J, Olivecrona G, Omerovic E, et al. Lower risk of stent thrombosis and restenosis with unrestricted use of ‘new-generation’ drug-eluting stents: a report from the nationwide Swedish Coronary Angiography and Angioplasty Registry (SCAAR). *Eur Heart J*. 2012 Mar;33(5):606–13.
54. Stone GW, Rizvi A, Newman W, Mastali K, Wang JC, Caputo R, et al. Everolimus-eluting versus paclitaxel-eluting stents in coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2010 Dec 6;362(18):1663–74.
55. Kedhi E, Joesoef KS, McFadden E, Wassing J, van Mieghem C, Goedhart D, et al. Second-generation everolimus-eluting and paclitaxel-eluting stents in real-life practice (COMPARE): a randomised trial. *Lancet*. 2010 Jan 16;375(9710):201–9.
56. Cook S, Ladich E, Nakazawa G, Eshtehardi P, Neidhart M, Vogel R, et al. Correlation of intravascular ultrasound findings with histopathological analysis of thrombus aspirates in patients with very late drug-eluting stent thrombosis. *Circulation*. 2009 Aug 4;120(5):391–9.

57. Garg S, Serruys PW. Coronary stents: looking forward. *J Am Coll Cardiol*. 2010 Aug 31;56(10 Suppl):S43-78.
58. Sarno G, Lagerqvist B, Olivecrona G, Varenhorst C, Danielewicz M, Hambraeus K, et al. Real-life clinical outcomes with everolimus eluting platinum chromium stent with an abluminal biodegradable polymer in patients from the Swedish Coronary Angiography and Angioplasty Registry (SCAAR). *Catheter Cardiovasc Interv*. 2017 Nov 15;90(6):881–7.
59. Kandzari DE, Koolen JJ, Doros G, Garcia-Garcia HM, Bennett J, Roguin A, et al. Ultrathin Bioresorbable Polymer Sirolimus-Eluting Stents Versus Durable Polymer Everolimus-Eluting Stents: BIOFLOW V Final 5-Year Outcomes. *JACC Cardiovasc Interv*. 2022 Sep 26;15(18):1852–60.
60. Pilgrim T, Heg D, Roffi M, Tüller D, Muller O, Vuilliminet A, et al. Ultrathin strut biodegradable polymer sirolimus-eluting stent versus durable polymer everolimus-eluting stent for percutaneous coronary revascularisation (BIOSCIENCE): a randomised, single-blind, non-inferiority trial. *Lancet*. 2014 Dec 13;384(9960):2111–22.
61. Windecker S, Serruys PW, Wandel S, Buszman P, Trznadel S, Linke A, et al. Biolimus-eluting stent with biodegradable polymer versus sirolimus-eluting stent with durable polymer for coronary revascularisation (LEADERS): a randomised non-inferiority trial. *Lancet*. 2008 Sep 27;372(9644):1163–73.
62. Menown IBA, Mamas MA, Cotton JM, Hildick-Smith D, Eberli FR, Leibundgut G, et al. Thin Strut CoCr Biodegradable Polymer Biolimus A9-Eluting Stents versus Thicker Strut Stainless Steel Biodegradable Polymer Biolimus A9-Eluting Stents: Two-Year Clinical Outcomes. *J Interv Cardiol*. 2021;2021:6654515.
63. Saito S, Valdes-Chavarri M, Richardt G, Moreno R, Iniguez Romo A, Barbato E, et al. A randomized, prospective, intercontinental evaluation of a bioresorbable polymer sirolimus-eluting coronary stent system: the CENTURY II (Clinical Evaluation of New Terumo Drug-Eluting Coronary Stent System in the Treatment of Patients with Coronary Artery Disease) trial. *Eur Heart J*. 2014 Aug 7;35(30):2021–31.
64. Valgimigli M, Frigoli E, Heg D, Tijssen J, Jüni P, Vranckx P, et al. Dual Antiplatelet Therapy after PCI in Patients at High Bleeding Risk. *N Engl J Med*. 2021 Oct 28;385(18):1643–55.
65. Stefanini GG, Byrne RA, Serruys PW, de Waha A, Meier B, Massberg S, et al. Biodegradable polymer drug-eluting stents reduce the risk of stent thrombosis at 4 years in patients undergoing percutaneous coronary intervention: a pooled analysis of individual patient data from the ISAR-TEST 3, ISAR-TEST 4, and LEADERS randomized trials. *Eur Heart J*. 2012 Dec;33(10):1214–22.
66. Massberg S, Byrne RA, Kastrati A, Schulz S, Pache J, Hausleiter J, et al. Polymer-free sirolimus- and probucol-eluting versus new generation zotarolimus-eluting stents in coronary artery disease: the Intracoronary Stenting and Angiographic Results: Test Efficacy of Sirolimus- and Probucol-Eluting versus Zotarolimus-eluting Stents (ISAR-TEST 5) trial. *Circulation*. 2011 Aug 2;124(5):624–32.
67. Mahmood Zuhdi AS, Krackhardt F, Waliszewski MW, Ismail MD, Boxberger M, Wan Ahmad WA. Efficacy and Safety of Polymer-Free Ultrathin Strut Sirolimus-Probucol Coated Drug-Eluting Stents for Chronic Total Occlusions: Insights from the Coroflex ISAR 2000 Worldwide Registry. *Cardiol Res Pract*. 2018;2018:8053168.
68. Urban P, Meredith IT, Abizaid A, Pocock SJ, Carrié D, Naber C, et al. Polymer-free Drug-Coated Coronary Stents in Patients at High Bleeding Risk. *N Engl J Med*. 2015 Nov 19;373(21):2038–47.

69. Ellert-Gregersen J, Jensen LJ, Jakobsen L, Freeman PM, Eftekhari A, Maeng M, et al. Polymer-free biolimus-coated stents versus ultrathin-strut biodegradable polymer sirolimus-eluting stents: two-year outcomes of the randomised SORT OUT IX trial. *EuroIntervention* [Internet]. 2022 Jun [cited 2025 Feb 23];18(2):e124–31. Available from: <https://eurointervention.pcronline.com/doi/10.4244/EIJ-D-21-00874>
70. Waksman R. Biodegradable stents: they do their job and disappear. *J Invasive Cardiol*. 2006 Feb;18(2):70–4.
71. Gogas BD. Bioresorbable scaffolds for percutaneous coronary interventions. *Glob Cardiol Sci Pract*. 2014;2014(4):409–27.
72. Otsuka F, Pacheco E, Perkins LEL, Lane JP, Wang Q, Kamberi M, et al. Long-term safety of an everolimus-eluting bioresorbable vascular scaffold and the cobalt-chromium XIENCE V stent in a porcine coronary artery model. *Circ Cardiovasc Interv*. 2014 Jun;7(3):330–42.
73. Garcia-Garcia HM, Haude M, Kuku K, Hideo-Kajita A, Ince H, Abizaid A, et al. In vivo serial invasive imaging of the second-generation drug-eluting absorbable metal scaffold (Magmaris - DREAMS 2G) in de novo coronary lesions: Insights from the BIOSOLVE-II First-In-Man Trial. *Int J Cardiol*. 2018 Mar 15;255:22–8.
74. Kereiakes DJ, Ellis SG, Metzger DC, Caputo RP, Rizik DG, Teirstein PS, et al. Clinical Outcomes Before and After Complete Everolimus-Eluting Bioresorbable Scaffold Resorption: Five-Year Follow-Up From the ABSORB III Trial. *Circulation*. 2019 Dec 3;140(23):1895–903.
75. Scheller B, Speck U, Abramjuk C, Bernhardt U, Böhm M, Nickenig G. Paclitaxel balloon coating, a novel method for prevention and therapy of restenosis. *Circulation*. 2004 Aug 17;110(7):810–4.
76. Giacoppo D, Alfonso F, Xu B, Claessen BEPM, Adriaenssens T, Jensen C, et al. Drug-Coated Balloon Angioplasty Versus Drug-Eluting Stent Implantation in Patients With Coronary Stent Restenosis. *J Am Coll Cardiol*. 2020 Jun 2;75(21):2664–78.
77. Lin Y, Sun X, Liu H, Pang X, Dong S. Drug-coated balloon versus drug-eluting stent for treating de novo coronary lesions in large vessels: a meta-analysis of clinical trials. *Herz*. 2021 Jun;46(3):269–76.
78. Messori A, Trippoli S. Treatment of Patients With De Novo Small-Vessel Coronary Lesions: Analysis of Six Randomised Controlled Trials Comparing Paclitaxel-Coated Balloons With Drug-Eluting Stents. *Cureus*. 2024 Sep;16(9):e69983.
79. Jeger RV, Eccleshall S, Wan Ahmad WA, Ge J, Poerner TC, Shin ES, et al. Drug-Coated Balloons for Coronary Artery Disease: Third Report of the International DCB Consensus Group. *JACC Cardiovasc Interv*. 2020 Jun 22;13(12):1391–402.
80. Zhao H, Miao R, Lin F, Zhao G. Drug-Coated Balloon in Primary Percutaneous Coronary Intervention. *J Interv Cardiol*. 2023;2023:5210808.
81. Her AY, Shin ES, Bang LH, Nuruddin AA, Tang Q, Hsieh IC, et al. Drug-coated balloon treatment in coronary artery disease: Recommendations from an Asia-Pacific Consensus Group. *Cardiol J*. 2021;28(1):136–49.
82. Sinnaeve PR, Adriaenssens T. Dual Antiplatelet Therapy De-escalation Strategies. *Am J Cardiol*. 2021 Apr 1;144 Suppl 1:S23–31.
83. Waksman R, Pakala R. Drug-eluting balloon: the comeback kid? *Circ Cardiovasc Interv*. 2009 Aug;2(4):352–8.

84. Yerasi C, Case BC, Forrestal BJ, Torguson R, Weintraub WS, Garcia-Garcia HM, et al. Drug-Coated Balloon for De Novo Coronary Artery Disease: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol*. 2020 Mar 10;75(9):1061–73.
85. Neumann FJ, Sousa-Uva M. ‘Ten commandments’ for the 2018 ESC/EACTS Guidelines on Myocardial Revascularization. *Eur Heart J*. 2019 Jan 7;40(2):79–80.
86. Jeger RV, Farah A, Ohlow MA, Mangner N, Möbius-Winkler S, Weilenmann D, et al. Long-term efficacy and safety of drug-coated balloons versus drug-eluting stents for small coronary artery disease (BASKET-SMALL 2): 3-year follow-up of a randomised, non-inferiority trial. *Lancet*. 2020 Nov 7;396(10261):1504–10.
87. Lee SY, Cho YK, Kim SW, Hong YJ, Koo BK, Bae JW, et al. Clinical Results of Drug-Coated Balloon Treatment in a Large-Scale Multicenter Korean Registry Study. *Korean Circ J*. 2022 Jun;52(6):444–54.
88. Byrne RA, Joner M, Kastrati A. Stent thrombosis and restenosis: what have we learned and where are we going? The Andreas Grüntzig Lecture ESC 2014. *Eur Heart J*. 2015 Dec 14;36(47):3320–31.
89. Schulz S, Schuster T, Mehilli J, Byrne RA, Ellert J, Massberg S, et al. Stent thrombosis after drug-eluting stent implantation: incidence, timing, and relation to discontinuation of clopidogrel therapy over a 4-year period. *Eur Heart J*. 2009 Nov;30(22):2714–21.
90. Riegger J, Byrne RA, Joner M, Chandraratne S, Gershlick AH, Ten Berg JM, et al. Histopathological evaluation of thrombus in patients presenting with stent thrombosis. A multicenter European study: a report of the prevention of late stent thrombosis by an interdisciplinary global European effort consortium. *Eur Heart J*. 2016 Dec 14;37(19):1538–49.
91. Kimura T, Morimoto T, Kozuma K, Honda Y, Kume T, Aizawa T, et al. Comparisons of baseline demographics, clinical presentation, and long-term outcome among patients with early, late, and very late stent thrombosis of sirolimus-eluting stents: Observations from the Registry of Stent Thrombosis for Review and Reevaluation (RESTART). *Circulation*. 2010 Jul 6;122(1):52–61.
92. van Werkum JW, Heestermans AA, Zomer AC, Kelder JC, Suttorp MJ, Rensing BJ, et al. Predictors of coronary stent thrombosis: the Dutch Stent Thrombosis Registry. *J Am Coll Cardiol*. 2009 Apr 21;53(16):1399–409.
93. Cayla G, Hulot JS, O’Connor SA, Pathak A, Scott SA, Gruel Y, et al. Clinical, angiographic, and genetic factors associated with early coronary stent thrombosis. *JAMA*. 2011 Oct 26;306(16):1765–74.
94. Iakovou I, Schmidt T, Bonizzoni E, Ge L, Sangiorgi GM, Stankovic G, et al. Incidence, predictors, and outcome of thrombosis after successful implantation of drug-eluting stents. *JAMA*. 2005 Dec 4;293(17):2126–30.
95. Sibbing D, Koch W, Massberg S, Byrne RA, Mehilli J, Schulz S, et al. No association of paraoxonase-1 Q192R genotypes with platelet response to clopidogrel and risk of stent thrombosis after coronary stenting. *Eur Heart J*. 2011 Jul;32(13):1605–13.
96. Kastrati A, Mehilli J, Pache J, Kaiser C, Valgimigli M, Kelbaek H, et al. Analysis of 14 trials comparing sirolimus-eluting stents with bare-metal stents. *N Engl J Med*. 2007 Mar 8;356(10):1030–9.
97. Stone GW, Moses JW, Ellis SG, Schofer J, Dawkins KD, Morice MC, et al. Safety and efficacy of sirolimus- and paclitaxel-eluting coronary stents. *N Engl J Med*. 2007 Mar 8;356(10):998–1008.

98. Kedhi E, Joesoef KS, McFadden E, Wassing J, van Mieghem C, Goedhart D, et al. Second-generation everolimus-eluting and paclitaxel-eluting stents in real-life practice (COMPARE): a randomised trial. *Lancet*. 2010 Jan 16;375(9710):201–9.
99. Byrne RA, Joner M, Kastrati A. Polymer coatings and delayed arterial healing following drug-eluting stent implantation. *Minerva Cardioangiol*. 2009 Oct;57(5):567–84.
100. Tada T, Byrne RA, Simunovic I, King LA, Cassese S, Joner M, et al. Risk of stent thrombosis among bare-metal stents, first-generation drug-eluting stents, and second-generation drug-eluting stents: results from a registry of 18,334 patients. *JACC Cardiovasc Interv*. 2013 Dec;6(12):1267–74.
101. Attizzani GF, Capodanno D, Ohno Y, Tamburino C. Mechanisms, pathophysiology, and clinical aspects of incomplete stent apposition. *J Am Coll Cardiol*. 2014 Apr 15;63(14):1355–67.
102. van Werkum JW, Heestermans AA, Zomer AC, Kelder JC, Suttorp MJ, Rensing BJ, et al. Predictors of coronary stent thrombosis: the Dutch Stent Thrombosis Registry. *J Am Coll Cardiol*. 2009 Apr 21;53(16):1399–409.
103. Valgimigli M, Bueno H, Byrne RA, Collet JP, Costa F, Jeppsson A, et al. 2017 ESC focused update on dual antiplatelet therapy in coronary artery disease developed in collaboration with EACTS. *European Heart Journal* [Internet]. 2018 Jan 14 [cited 2025 Nov 28];39(3):213–60. Available from: <https://academic.oup.com/eurheartj/article/39/3/213/4095043>
104. Cassese S, Byrne RA, Schulz S, Hoppman P, Kreutzer J, Feuchtenberger A, et al. Prognostic role of restenosis in 10 004 patients undergoing routine control angiography after coronary stenting. *Eur Heart J*. 2015 Jan 7;36(2):94–9.
105. Bucerchi D, Piraino D, Andolina G, Cortese B. Understanding and managing in-stent restenosis: a review of clinical data, from pathogenesis to treatment. *J Thorac Dis*. 2016 Oct;8(10):E1150–62.
106. Pleva L, Kukla P, Hlinomaz O. Treatment of coronary in-stent restenosis: a systematic review. *J Geriatr Cardiol*. 2018 Feb;15(2):173–84.
107. Costa MA, Simon DI. Molecular basis of restenosis and drug-eluting stents. *Circulation*. 2005 Dec 3;111(17):2257–73.
108. Libby P, Schwartz D, Brogi E, Tanaka H, Clinton SK. A cascade model for restenosis. A special case of atherosclerosis progression. *Circulation*. 1992 Dec;86(6 Suppl):III47–52.
109. Welt FGP, Rogers C. Inflammation and restenosis in the stent era. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002 Nov 1;22(11):1769–76.
110. Reinthaler M, Jung F, Landmesser U, Lendlein A. Trend to move from permanent metals to degradable, multifunctional polymer or metallic implants in the example of coronary stents. *Expert Rev Med Devices*. 2016 Nov;13(11):1001–3.
111. Gori T. Restenosis after Coronary Stent Implantation: Cellular Mechanisms and Potential of Endothelial Progenitor Cells (A Short Guide for the Interventional Cardiologist). *Cells*. 2022 Jun 30;11(13):2094.
112. Schwartz RS, Topol EJ, Serruys PW, Sangiorgi G, Holmes DR. Artery size, neointima, and remodeling: time for some standards. *J Am Coll Cardiol*. 1998 Dec;32(7):2087–94.
113. Lee SY, Hong MK, Jang Y. Formation and Transformation of Neointima after Drug-eluting Stent Implantation: Insights from Optical Coherence Tomographic Studies. *Korean Circ J*. 2017 Nov;47(6):823–32.
114. Nakamura D, Yasumura K, Nakamura H, Matsuhira Y, Yasumoto K, Tanaka A, et al. Different Neoatherosclerosis Patterns in Drug-Eluting- and Bare-Metal Stent

- Restenosis - Optical Coherence Tomography Study. *Circ J*. 2019 Jan 25;83(2):313–9.
115. Bajeu IT, Niculescu AG, Scafa-Udriște A, Andronesu E. Intrastent Restenosis: A Comprehensive Review. *Int J Mol Sci*. 2024 Jan 30;25(3):1715.
 116. Huang S, Houghton PJ. Mechanisms of resistance to rapamycins. *Drug Resist Updat*. 2001 Dec;4(6):378–91.
 117. Kurmasheva RT, Huang S, Houghton PJ. Predicted mechanisms of resistance to mTOR inhibitors. *Br J Cancer*. 2006 Oct 23;95(8):955–60.
 118. Köster R, Vieluf D, Kiehn M, Sommerauer M, Kähler J, Baldus S, et al. Nickel and molybdenum contact allergies in patients with coronary in-stent restenosis. *Lancet*. 2000 Dec 2;356(9245):1895–7.
 119. Nebeker JR, Virmani R, Bennett CL, Hoffman JM, Samore MH, Alvarez J, et al. Hypersensitivity cases associated with drug-eluting coronary stents: a review of available cases from the Research on Adverse Drug Events and Reports (RADAR) project. *J Am Coll Cardiol*. 2006 Jan 3;47(1):175–81.
 120. Maluenda G, Ben-Dor I, Gaglia MA, Wakabayashi K, Mahmoudi M, Sardi G, et al. Clinical outcomes and treatment after drug-eluting stent failure: the absence of traditional risk factors for in-stent restenosis. *Circ Cardiovasc Interv*. 2012 Feb 1;5(1):12–9.
 121. Nomoto Y, Nakagawa M, Shirai N, Kajio K, Mizutani K, Yamazaki T, et al. Neointimal coverage after second generation drug-eluting stent implantation has a relationship with pre-existing atherosclerotic lesion characteristics. *Medicine (Baltimore)*. 2019 Sep;98(37):e17097.
 122. Otsuka F, Byrne RA, Yahagi K, Mori H, Ladich E, Fowler DR, et al. Neoatherosclerosis: overview of histopathologic findings and implications for intravascular imaging assessment. *Eur Heart J*. 2015 Aug 21;36(32):2147–59.
 123. Nakazawa G, Otsuka F, Nakano M, Vorpahl M, Yazdani SK, Ladich E, et al. The pathology of neoatherosclerosis in human coronary implants bare-metal and drug-eluting stents. *J Am Coll Cardiol*. 2011 Mar 15;57(11):1314–22.
 124. Skålén K, Gustafsson M, Rydberg EK, Hultén LM, Wiklund O, Innerarity TL, et al. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature*. 2002 Jun 13;417(6890):750–4.
 125. de Jaegere P, Mudra H, Figulla H, Almagor Y, Doucet S, Penn I, et al. Intravascular ultrasound-guided optimized stent deployment. Immediate and 6 months clinical and angiographic results from the Multicenter Ultrasound Stenting in Coronaries Study (MUSIC Study). *Eur Heart J*. 1998 Aug;19(8):1214–23.
 126. Cook S, Wenaweser P, Togni M, Billinger M, Morger C, Seiler C, et al. Incomplete stent apposition and very late stent thrombosis after drug-eluting stent implantation. *Circulation*. 2007 Dec 8;115(18):2426–34.
 127. Shaikh F, Maddikunta R, Djelmami-Hani M, Solis J, Allaqaband S, Bajwa T. Stent fracture, an incidental finding or a significant marker of clinical in-stent restenosis? *Catheter Cardiovasc Interv*. 2008 Apr 1;71(5):614–8.
 128. Balakrishnan B, Tzafriri AR, Seifert P, Groothuis A, Rogers C, Edelman ER. Strut position, blood flow, and drug deposition: implications for single and overlapping drug-eluting stents. *Circulation*. 2005 Jun 7;111(22):2958–65.
 129. Malek AM, Alper SL, Izumo S. Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis. *JAMA*. 1999 Dec 1;282(21):2035–42.
 130. Moses JW, Leon MB, Popma JJ, Fitzgerald PJ, Holmes DR, O’Shaughnessy C, et al. Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery. *N Engl J Med*. 2003 Oct 2;349(14):1315–23.

131. Ishikawa K, Aoyama Y, Hirayama H. Management of drug-eluting stent restenosis. *J Invasive Cardiol*. 2012 Apr;24(4):178–82.
132. Clare J, Ganly J, Bursill CA, Sumer H, Kingshott P, de Haan JB. The Mechanisms of Restenosis and Relevance to Next Generation Stent Design. *Biomolecules*. 2022 Mar 10;12(3):430.
133. Li S, Qiu H, Lin Z, Fan L, Guo Y, Zhang Y, et al. The Early Predictive Value of Circulating Monocytes and Eosinophils in Coronary DES Restenosis. *Front Cardiovasc Med*. 2022;9:764622.
134. Giacoppo D, Gargiulo G, Aruta P, Capranzano P, Tamburino C, Capodanno D. Treatment strategies for coronary in-stent restenosis: systematic review and hierarchical Bayesian network meta-analysis of 24 randomised trials and 4880 patients. *BMJ*. 2015 Nov 4;351:h5392.
135. Garcia-Garcia HM, Shen Z, Piazza N. Study of restenosis in drug eluting stents: new insights from greyscale intravascular ultrasound and virtual histology. *EuroIntervention*. 2009 Dec;5 Suppl D:D84-92.
136. Kasaoka S, Tobis JM, Akiyama T, Reimers B, Di Mario C, Wong ND, et al. Angiographic and intravascular ultrasound predictors of in-stent restenosis. *J Am Coll Cardiol*. 1998 Nov 15;32(6):1630–5.
137. Nagaraja V, Kalra A, Puri R. When to use intravascular ultrasound or optical coherence tomography during percutaneous coronary intervention? *Cardiovasc Diagn Ther*. 2020 Oct;10(5):1429–44.
138. Nicolais C, Lakhter V, Virk HUH, Sardar P, Bavishi C, O'Murchu B, et al. Therapeutic Options for In-Stent Restenosis. *Curr Cardiol Rep*. 2018 Feb 12;20(2):7.
139. Elwany MN, Abskharoun M, Dawood M, Al-Tahan SM, Sanhoury M. The utility and effectiveness of the newer generation high-resolution coronary computed tomography angiography in the evaluation of coronary in-stent restenosis. *Curr Probl Cardiol*. 2024 Feb;49(2):102212.
140. Sun Z, Almutairi AMD. Diagnostic accuracy of 64 multislice CT angiography in the assessment of coronary in-stent restenosis: a meta-analysis. *Eur J Radiol*. 2010 Feb;73(2):266–73.
141. Mehran R, Dangas G, Abizaid AS, Mintz GS, Lansky AJ, Satler LF, et al. Angiographic patterns of in-stent restenosis: classification and implications for long-term outcome. *Circulation*. 1999 Nov 2;100(18):1872–8.
142. Shlofmitz E, Iantorno M, Waksman R. Restenosis of Drug-Eluting Stents: A New Classification System Based on Disease Mechanism to Guide Treatment and State-of-the-Art Review. *Circ Cardiovasc Interv*. 2019 Aug;12(8):e007023.
143. Cassese S, De Luca G, Ribichini F, Cernigliaro C, Sansa M, Versaci F, et al. ORAI iMmunosuppressive therapy to prevent in-Stent rEstenosis (RAMSES) cooperation: a patient-level meta-analysis of randomized trials. *Atherosclerosis*. 2014 Dec;237(2):410–7.
144. Shah B, Smilowitz NR, Xia Y, Feit F, Katz SD, Zhong J, et al. Major Adverse Cardiovascular Events After Colchicine Administration Before Percutaneous Coronary Intervention: Follow-Up of the Colchicine-PCI Trial. *The American Journal of Cardiology* [Internet]. 2023 Oct [cited 2026 Jan 30];204:26–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002914923005660>
145. Felekos I, Karamasis GV, Pavlidis AN. When everything else fails: High-pressure balloon for undilatable lesions. *Cardiovasc Revasc Med*. 2018 Apr;19(3 Pt A):306–13.
146. Alfonso F, García P, Fleites H, Pimentel G, Sabaté M, Hernández R, et al. Repeat stenting for the prevention of the early lumen loss phenomenon in patients

- with in-stent restenosis. Angiographic and intravascular ultrasound findings of a randomized study. *Am Heart J*. 2005 Feb;149(2):e1-8.
147. Albiero R, Silber S, Di Mario C, Cernigliaro C, Battaglia S, Reimers B, et al. Cutting balloon versus conventional balloon angioplasty for the treatment of in-stent restenosis: results of the restenosis cutting balloon evaluation trial (RESCUT). *J Am Coll Cardiol*. 2004 Mar 17;43(6):943–9.
 148. Kufner S, Joner M, Schneider S, Tölg R, Zrenner B, Repp J, et al. Neointimal Modification With Scoring Balloon and Efficacy of Drug-Coated Balloon Therapy in Patients With Restenosis in Drug-Eluting Coronary Stents: A Randomized Controlled Trial. *JACC Cardiovasc Interv*. 2017 Jul 10;10(13):1332–40.
 149. Alfonso F, Byrne RA, Rivero F, Kastrati A. Current treatment of in-stent restenosis. *J Am Coll Cardiol*. 2014 Jun 24;63(24):2659–73.
 150. Mehilli J, Byrne RA, Tiroch K, Pinieck S, Schulz S, Kufner S, et al. Randomized trial of paclitaxel- versus sirolimus-eluting stents for treatment of coronary restenosis in sirolimus-eluting stents: the ISAR-DESIRE 2 (Intracoronary Stenting and Angiographic Results: Drug Eluting Stents for In-Stent Restenosis 2) study. *J Am Coll Cardiol*. 2010 Jun 15;55(24):2710–6.
 151. Alfonso F, Pérez-Vizcayno MJ, Dutary J, Zueco J, Cequier A, García-Touchard A, et al. Implantation of a drug-eluting stent with a different drug (switch strategy) in patients with drug-eluting stent restenosis. Results from a prospective multicenter study (RIBS III [Restenosis Intra-Stent: Balloon Angioplasty Versus Drug-Eluting Stent]). *JACC Cardiovasc Interv*. 2012 Jul;5(7):728–37.
 152. Alfonso F, Cuesta J, Pérez-Vizcayno MJ, García Del Blanco B, Rumoroso JR, Bosa F, et al. Bioresorbable Vascular Scaffolds for Patients With In-Stent Restenosis: The RIBS VI Study. *JACC Cardiovasc Interv*. 2017 Sep 25;10(18):1841–51.
 153. Sack H. [Catheter-based radiotherapy to inhibit restenosis after coronary stenting]. *Strahlenther Onkol*. 1998 Mar;174(3):168.
 154. Holmes DR, Teirstein P, Satler L, Sketch M, O'Malley J, Popma JJ, et al. Sirolimus-eluting stents vs vascular brachytherapy for in-stent restenosis within bare-metal stents: the SISR randomized trial. *JAMA*. 2006 Mar 15;295(11):1264–73.
 155. Negi SI, Torguson R, Gai J, Kiramijyan S, Koifman E, Chan R, et al. Intracoronary Brachytherapy for Recurrent Drug-Eluting Stent Failure. *JACC Cardiovasc Interv*. 2016 Jun 27;9(12):1259–65.
 156. Siontis GCM, Stefanini GG, Mavridis D, Siontis KC, Alfonso F, Pérez-Vizcayno MJ, et al. Percutaneous coronary interventional strategies for treatment of in-stent restenosis: a network meta-analysis. *Lancet*. 2015 Aug 15;386(9994):655–64.
 157. Giacoppo D, Alfonso F, Xu B, Claessen BEPM, Adriaenssens T, Jensen C, et al. Paclitaxel-coated balloon angioplasty vs. drug-eluting stenting for the treatment of coronary in-stent restenosis: a comprehensive, collaborative, individual patient data meta-analysis of 10 randomized clinical trials (DAEDALUS study). *Eur Heart J*. 2020 Oct 7;41(38):3715–28.
 158. Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol*. 2011 Mar;12(3):204–12.
 159. Tabas I, Williams KJ, Borén J. Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. *Circulation*. 2007 Oct 16;116(16):1832–44.
 160. Tousoulis D, Charakida M, Stefanadis C. Endothelial function and inflammation in coronary artery disease. *Heart*. 2006 Apr;92(4):441–4.
 161. Basatemur GL, Jørgensen HF, Clarke MCH, Bennett MR, Mallat Z. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol*. 2019 Dec;16(12):727–44.

162. Grootaert MOJ, Bennett MR. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis: time for a re-assessment. *Cardiovasc Res.* 2021 Sep 28;117(11):2326–39.
163. Rong JX, Shapiro M, Trogan E, Fisher EA. Transdifferentiation of mouse aortic smooth muscle cells to a macrophage-like state after cholesterol loading. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Nov 11;100(23):13531–6.
164. Shankman LS, Gomez D, Cherepanova OA, Salmon M, Alencar GF, Haskins RM, et al. KLF4-dependent phenotypic modulation of smooth muscle cells has a key role in atherosclerotic plaque pathogenesis. *Nat Med.* 2015 Jun;21(6):628–37.
165. Allahverdian S, Chehroudi AC, McManus BM, Abraham T, Francis GA. Contribution of intimal smooth muscle cells to cholesterol accumulation and macrophage-like cells in human atherosclerosis. *Circulation.* 2014 Apr 15;129(15):1551–9.
166. Nguyen Dinh Cat A, Briones AM, Callera GE, Yogi A, He Y, Montezano AC, et al. Adipocyte-derived factors regulate vascular smooth muscle cells through mineralocorticoid and glucocorticoid receptors. *Hypertension.* 2011 Sep;58(3):479–88.
167. Durham AL, Speer MY, Scatena M, Giachelli CM, Shanahan CM. Role of smooth muscle cells in vascular calcification: implications in atherosclerosis and arterial stiffness. *Cardiovasc Res.* 2018 Mar 15;114(4):590–600.
168. Wirka RC, Wagh D, Paik DT, Pjanic M, Nguyen T, Miller CL, et al. Atheroprotective roles of smooth muscle cell phenotypic modulation and the TCF21 disease gene as revealed by single-cell analysis. *Nat Med.* 2019 Aug;25(8):1280–9.
169. Michel JB, Virmani R, Arbustini E, Pasterkamp G. Intraplaque haemorrhages as the trigger of plaque vulnerability. *Eur Heart J.* 2011 Aug;32(16):1977–85, 1985a, 1985b, 1985c.
170. Majesky MW, Horita H, Ostriker A, Lu S, Regan JN, Bagchi A, et al. Differentiated Smooth Muscle Cells Generate a Subpopulation of Resident Vascular Progenitor Cells in the Adventitia Regulated by Klf4. *Circ Res.* 2017 Jan 20;120(2):296–311.
171. Pan H, Xue C, Auerbach BJ, Fan J, Bashore AC, Cui J, et al. Single-Cell Genomics Reveals a Novel Cell State During Smooth Muscle Cell Phenotypic Switching and Potential Therapeutic Targets for Atherosclerosis in Mouse and Human. *Circulation.* 2020 Nov 24;142(21):2060–75.
172. 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 Dec;20(5):1262–75.
173. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W, Rosenfeld ME, et al. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation.* 1994 Dec;89(5):2462–78.
174. Kaur H, Carvalho J, Looso M, Singh P, Chennupati R, Preussner J, et al. Single-cell profiling reveals heterogeneity and functional patterning of GPCR expression in the vascular system. *Nat Commun.* 2017 Jun 16;8:15700.
175. Mosse PR, Campbell GR, Wang ZL, Campbell JH. Smooth muscle phenotypic expression in human carotid arteries. I. Comparison of cells from diffuse intimal thickenings adjacent to atheromatous plaques with those of the media. *Lab Invest.* 1985 Nov;53(5):556–62.
176. Campbell JH, Reardon MF, Campbell GR, Nestel PJ. Metabolism of atherogenic lipoproteins by smooth muscle cells of different phenotype in culture. *Arteriosclerosis.* 1985;5(4):318–28.

177. Yahagi K, Kolodgie FD, Otsuka F, Finn AV, Davis HR, Joner M, et al. Pathophysiology of native coronary, vein graft, and in-stent atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol.* 2016 Feb;13(2):79–98.
178. Campbell JH, Popadyne L, Nestel PJ, Campbell GR. Lipid accumulation in arterial smooth muscle cells. Influence of phenotype. *Atherosclerosis.* 1983 Jun;47(3):279–95.
179. Clarke MCH, Talib S, Figg NL, Bennett MR. Vascular smooth muscle cell apoptosis induces interleukin-1-directed inflammation: effects of hyperlipidemia-mediated inhibition of phagocytosis. *Circ Res.* 2010 Feb 5;106(2):363–72.
180. Ait-Oufella H, Kinugawa K, Zoll J, Simon T, Boddaert J, Heeneman S, et al. Lactadherin deficiency leads to apoptotic cell accumulation and accelerated atherosclerosis in mice. *Circulation.* 2007 Apr 24;115(16):2168–77.
181. Jacobsen K, Lund MB, Shim J, Gunnarsen S, Füchtbauer EM, Kjolby M, et al. Diverse cellular architecture of atherosclerotic plaque derives from clonal expansion of a few medial SMCs. *JCI Insight.* 2017 Oct 5;2(19):e95890, 95890.
182. Gomez D, Shankman LS, Nguyen AT, Owens GK. Detection of histone modifications at specific gene loci in single cells in histological sections. *Nat Methods.* 2013 Feb;10(2):171–7.
183. New SEP, Goettsch C, Aikawa M, Marchini JF, Shibasaki M, Yabusaki K, et al. Macrophage-derived matrix vesicles: an alternative novel mechanism for microcalcification in atherosclerotic plaques. *Circ Res.* 2013 Jun 21;113(1):72–7.
184. Newby AC. Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiol Rev.* 2005 Jan;85(1):1–31.
185. van der Wal AC, Becker AE, van der Loos CM, Das PK. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation.* 1994 Jan;89(1):36–44.
186. Davies MJ, Thomas A. Thrombosis and acute coronary-artery lesions in sudden cardiac ischemic death. *N Engl J Med.* 1984 Dec 3;310(18):1137–40.
187. Pasterkamp G, den Ruijter HM, Libby P. Temporal shifts in clinical presentation and underlying mechanisms of atherosclerotic disease. *Nat Rev Cardiol.* 2017 Jan;14(1):21–9.
188. Cunningham TJ, Duester G. Mechanisms of retinoic acid signalling and its roles in organ and limb development. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015 Feb;16(2):110–23.
189. D'Ambrosio DN, Clugston RD, Blaner WS. Vitamin A metabolism: an update. *Nutrients.* 2011 Jan;3(1):63–103.
190. Simões-Costa MS, Azambuja AP, Xavier-Neto J. The search for non-chordate retinoic acid signaling: lessons from chordates. *J Exp Zool B Mol Dev Evol.* 2008 Jan 15;310(1):54–72.
191. Kin Ting Kam R, Deng Y, Chen Y, Zhao H. Retinoic acid synthesis and functions in early embryonic development. *Cell Biosci [Internet].* 2012 Mar [cited 2025 Feb 26];2(1):11. Available from: <https://cellandbioscience.biomedcentral.com/articles/10.1186/2045-3701-2-11>
192. Rhinn M, Dollé P. Retinoic acid signalling during development. *Development.* 2012 Mar;139(5):843–58.
193. Raverdeau M, Mills KHG. Modulation of T cell and innate immune responses by retinoic Acid. *J Immunol.* 2014 Apr 1;192(7):2953–8.
194. Ross SA, McCaffery PJ, Drager UC, De Luca LM. Retinoids in embryonal development. *Physiol Rev.* 2000 Jul;80(3):1021–54.

195. Harrison EH, Curley RW. Carotenoids and Retinoids: Nomenclature, Chemistry, and Analysis. *Subcell Biochem.* 2016;81:1–19.
196. Goodman DS. Overview of current knowledge of metabolism of vitamin A and carotenoids. *J Natl Cancer Inst.* 1984 Dec;73(6):1375–9.
197. Napoli JL. Retinoic acid biosynthesis and metabolism. *FASEB J.* 1996 Jul;10(9):993–1001.
198. Barber T, Esteban-Pretel G, Marín MP, Timoneda J. Vitamin a deficiency and alterations in the extracellular matrix. *Nutrients.* 2014 Nov 10;6(11):4984–5017.
199. Kiser PD, Golczak M, Palczewski K. Chemistry of the Retinoid (Visual) Cycle. *Chem Rev [Internet].* 2014 Jan 8 [cited 2025 Oct 6];114(1):194–232. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cr400107q>
200. Asson-Batres MA, Rochette-Egly C. The biochemistry of retinoid signaling II: the physiology of vitamin A uptake, transport, metabolism, and signaling. Dordrecht: Springer; 2016. (Subcellular biochemistry).
201. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell.* 1995 Dec 15;83(6):835–9.
202. Chen JD, Evans RM. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature.* 1995 Oct 5;377(6548):454–7.
203. Weston AD, Blumberg B, Underhill TM. Active repression by unliganded retinoid receptors in development: less is sometimes more. *J Cell Biol.* 2003 Apr 28;161(2):223–8.
204. Janesick A, Nguyen TTL, Aisaki K ichi, Igarashi K, Kitajima S, Chandraratna RAS, et al. Active repression by RAR γ signaling is required for vertebrate axial elongation. *Development.* 2014 Jun;141(11):2260–70.
205. Bastien J, Rochette-Egly C. Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene.* 2004 Mar 17;328:1–16.
206. Balmer JE, Blomhoff R. Gene expression regulation by retinoic acid. *J Lipid Res.* 2002 Nov;43(11):1773–808.
207. Evans RM, Mangelsdorf DJ. Nuclear Receptors, RXR, and the Big Bang. *Cell.* 2014 Mar 27;157(1):255–66.
208. Watson PJ, Fairall L, Schwabe JWR. Nuclear hormone receptor co-repressors: structure and function. *Mol Cell Endocrinol.* 2012 Jan 30;348(2):440–9.
209. Glass CK, Rosenfeld MG. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev.* 2000 Jan 15;14(2):121–41.
210. Tang XH, Gudas LJ. Retinoids, retinoic acid receptors, and cancer. *Annu Rev Pathol.* 2011;6:345–64.
211. Bollag W, Holdener EE. Retinoids in cancer prevention and therapy. *Ann Oncol.* 1992 Jul;3(7):513–26.
212. Alizadeh F, Bolhassani A, Khavari A, Bathaie SZ, Naji T, Bidgoli SA. Retinoids and their biological effects against cancer. *Int Immunopharmacol.* 2014 Jan;18(1):43–9.
213. Chen MC, Hsu SL, Lin H, Yang TY. Retinoic acid and cancer treatment. *Biomedicine (Taipei).* 2014;4(4):22.
214. Fuchs E, Green H. Regulation of terminal differentiation of cultured human keratinocytes by vitamin A. *Cell.* 1981 Sep;25(3):617–25.
215. De Botton S, Dombret H, Sanz M, Miguel JS, Caillot D, Zittoun R, et al. Incidence, clinical features, and outcome of all trans-retinoic acid syndrome in 413 cases of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. The European APL Group. *Blood.* 1998 Oct 15;92(8):2712–8.

216. Sanz MA, Montesinos P. How we prevent and treat differentiation syndrome in patients with acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 2014 Dec 1;123(18):2777–82.
217. Mahmoud HH, Hurwitz CA, Roberts WM, Santana VM, Ribeiro RC, Krance RA. Tretinoin toxicity in children with acute promyelocytic leukaemia. *Lancet*. 1993 Dec 4;342(8884):1394–5.
218. Da Silva F, Jian Motamedi F, Weerasinghe Arachchige LC, Tison A, Bradford ST, Lefebvre J, et al. *Elife*. 2021 Oct 8;10:e68280.
219. Zhu Z, Zhu J, Zhao X, Yang K, Lu L, Zhang F, et al. All-Trans Retinoic Acid Ameliorates Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury by Reducing Cardiomyocyte Apoptosis. *PLoS One*. 2015;10(7):e0133414.
220. Paiva SAR, Matsubara LS, Matsubara BB, Minicucci MF, Azevedo PS, Campana AO, et al. Retinoic acid supplementation attenuates ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *J Nutr*. 2005 Oct;135(10):2326–8.
221. Minicucci MF, Azevedo PS, Oliveira SA, Martinez PF, Chiuso-Minicucci F, Polegato BF, et al. Tissue vitamin A insufficiency results in adverse ventricular remodeling after experimental myocardial infarction. *Cell Physiol Biochem*. 2010;26(4–5):523–30.
222. Danzl K, Messner B, Doppler C, Nebert C, Abfalterer A, Sakic A, et al. Early inhibition of endothelial retinoid uptake upon myocardial infarction restores cardiac function and prevents cell, tissue, and animal death. *J Mol Cell Cardiol*. 2019 Jan;126:105–17.
223. Bilbija D, Elmabsout AA, Sagave J, Haugen F, Bastani N, Dahl CP, et al. Expression of retinoic acid target genes in coronary artery disease. *Int J Mol Med*. 2014 Mar;33(3):677–86.
224. Tan YZ, Shen HR, Wang YL, Wang QL, Wu XP, Yu SN, et al. Retinoic acid released from self-assembling peptide activates cardiomyocyte proliferation and enhances repair of infarcted myocardium. *Exp Cell Res*. 2023 Jan 1;422(1):113440.
225. Zhu S, Guleria RS, Thomas CM, Roth A, Gerilechaogetu F, Kumar R, et al. Loss of myocardial retinoic acid receptor α induces diastolic dysfunction by promoting intracellular oxidative stress and calcium mishandling in adult mice. *J Mol Cell Cardiol*. 2016 Oct;99:100–12.
226. Yang L, Luo C, Chen C, Wang X, Shi W, Liu J. All-trans retinoic acid protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity by activating the ERK2 signalling pathway. *Br J Pharmacol*. 2016 Jan;173(2):357–71.
227. Hasbullah JS, Scott EN, Bhavsar AP, Gunaretnam EP, Miao F, Soliman H, et al. All-trans retinoic acid (ATRA) regulates key genes in the RARG-TOP2B pathway and reduces anthracycline-induced cardiotoxicity. *PLoS One*. 2022;17(11):e0276541.
228. Silva RAC, Gonçalves AF, Dos Santos PP, Rafacho B, Claro RFT, Minicucci MF, et al. Cardiac Remodeling Induced by All-Trans Retinoic Acid is Detrimental in Normal Rats. *Cell Physiol Biochem*. 2017;43(4):1449–59.
229. Karppi J, Laukkanen JA, Mäkilallio TH, Kurl S. Low serum lycopene and β -carotene increase risk of acute myocardial infarction in men. *Eur J Public Health*. 2012 Dec;22(6):835–40.
230. Karppi J, Laukkanen JA, Mäkilallio TH, Ronkainen K, Kurl S. Low β -carotene concentrations increase the risk of cardiovascular disease mortality among Finnish men with risk factors. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2012 Oct;22(10):921–8.
231. Liu Y, Chen H, Mu D, Li D, Zhong Y, Jiang N, et al. Association of Serum Retinoic Acid With Risk of Mortality in Patients With Coronary Artery Disease. *Circ Res*. 2016 Aug 5;119(4):557–63.

232. Min KB, Min JY. Relation of serum vitamin A levels to all-cause and cause-specific mortality among older adults in the NHANES III population. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2014 Nov;24(11):1197–203.
233. Miano JM, Fisher EA, Majesky MW. Fate and State of Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circulation*. 2021 Dec 25;143(21):2110–6.
234. Peclo MM, Printseva OYu null. Retinoic acid enhances the proliferation of smooth muscle cells. *Experientia*. 1987 Feb 15;43(2):196–8.
235. Neuville P, Yan Z, Gidlöf A, Pepper MS, Hansson GK, Gabbiani G, et al. Retinoic acid regulates arterial smooth muscle cell proliferation and phenotypic features in vivo and in vitro through an RAR α -dependent signaling pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999 Jun;19(6):1430–6.
236. Tran-Lundmark K, Tannenberg P, Rauch BH, Ekstrand J, Tran PK, Hedin U, et al. Perlecan Heparan Sulfate Is Required for the Inhibition of Smooth Muscle Cell Proliferation by All-trans-Retinoic Acid. *J Cell Physiol*. 2015 Feb;230(2):482–7.
237. Streb JW, Long X, Lee TH, Sun Q, Kitchen CM, Georger MA, et al. Retinoid-induced expression and activity of an immediate early tumor suppressor gene in vascular smooth muscle cells. *PLoS One*. 2011 Apr 5;6(4):e18538.
238. Zhang J, Deng B, Jiang X, Cai M, Liu N, Zhang S, et al. All-Trans-Retinoic Acid Suppresses Neointimal Hyperplasia and Inhibits Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Migration via Activation of AMPK Signaling Pathway. *Front Pharmacol*. 2019;10:485.
239. Kim EJ, Choi YK, Han YH, Kim HJ, Lee IK, Lee MO. ROR α suppresses proliferation of vascular smooth muscle cells through activation of AMP-activated protein kinase. *Int J Cardiol*. 2014 Aug 20;175(3):515–21.
240. Aizawa K, Suzuki T, Kada N, Ishihara A, Kawai-Kowase K, Matsumura T, et al. Regulation of platelet-derived growth factor-A chain by Krüppel-like factor 5: new pathway of cooperative activation with nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem*. 2004 Jan 2;279(1):70–6.
241. Sakamoto H, Sakamaki T, Kanda T, Hoshino Y ichi, Sawada Y, Sato M, et al. Smooth muscle cell outgrowth from coronary atherectomy specimens in vitro is associated with less time to restenosis and expression of a key Transcription factor KLF5/BTEB2. *Cardiology*. 2003;100(2):80–5.
242. Shindo T, Manabe I, Fukushima Y, Tobe K, Aizawa K, Miyamoto S, et al. Krüppel-like zinc-finger transcription factor KLF5/BTEB2 is a target for angiotensin II signaling and an essential regulator of cardiovascular remodeling. *Nat Med*. 2002 Aug;8(8):856–63.
243. Zhang X hua, Zheng B, Han M, Miao S bing, Wen J kun. Synthetic retinoid Am80 inhibits interaction of KLF5 with RAR alpha through inducing KLF5 dephosphorylation mediated by the PI3K/Akt signaling in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett*. 2009 Apr 17;583(8):1231–6.
244. Yu Y, Wang Y, Fei X, Song Z, Xie F, Yang F, et al. All-Trans Retinoic Acid Prevented Vein Grafts Stenosis by Inhibiting Rb-E2F Mediated Cell Cycle Progression and KLF5-RAR α Interaction in Human Vein Smooth Muscle Cells. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2021 Feb;35(1):103–11.
245. Zheng B, Han M, Bernier M, Zhang X hua, Meng F, Miao S bing, et al. Krüppel-like factor 4 inhibits proliferation by platelet-derived growth factor receptor beta-mediated, not by retinoic acid receptor alpha-mediated, phosphatidylinositol 3-kinase and ERK signaling in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 2009 Aug 21;284(34):22773–85.

246. Miano JM, Topouzis S, Majesky MW, Olson EN. Retinoid receptor expression and all-trans retinoic acid-mediated growth inhibition in vascular smooth muscle cells. *Circulation*. 1996 Dec 15;93(10):1886–95.
247. Hayashi A, Suzuki T, Tajima S. Modulations of elastin expression and cell proliferation by retinoids in cultured vascular smooth muscle cells. *J Biochem*. 1995 Jan;117(1):132–6.
248. Pakala R, Benedict CR. RAR gamma agonists inhibit proliferation of vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2000 Feb;35(2):302–8.
249. Takeda K, Ichiki T, Funakoshi Y, Ito K, Takeshita A. Downregulation of angiotensin II type 1 receptor by all-trans retinoic acid in vascular smooth muscle cells. *Hypertension*. 2000 Jan;35(1 Pt 2):297–302.
250. Chen S, Gardner DG. Retinoic acid uses divergent mechanisms to activate or suppress mitogenesis in rat aortic smooth muscle cells. *J Clin Invest*. 1998 Aug 15;102(4):653–62.
251. Kosaka C, Sasaguri T, Komiyama Y, Takahashi H. All-trans retinoic acid inhibits vascular smooth muscle cell proliferation targeting multiple genes for cyclins and cyclin-dependent kinases. *Hypertens Res*. 2001 Sep;24(5):579–88.
252. Kosaka C, Sasaguri T, Komiyama Y, Takahashi H. All-trans retinoic acid inhibits vascular smooth muscle cell proliferation targeting multiple genes for cyclins and cyclin-dependent kinases. *Hypertens Res*. 2001 Sep;24(5):579–88.
253. Wakino S, Kintscher U, Kim S, Jackson S, Yin F, Nagpal S, et al. Retinoids inhibit proliferation of human coronary smooth muscle cells by modulating cell cycle regulators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001 Dec;21(5):746–51.
254. Kato S, Sasaguri Y, Morimatsu M. Down-regulation in the production of matrix metalloproteinase 1 by human aortic intimal smooth muscle cells. *Biochem Mol Biol Int*. 1993 Oct;31(2):239–48.
255. Axel DI, Frigge A, Dittmann J, Runge H, Spyridopoulos I, Riessen R, et al. All-trans retinoic acid regulates proliferation, migration, differentiation, and extracellular matrix turnover of human arterial smooth muscle cells. *Cardiovasc Res*. 2001 Mar;49(4):851–62.
256. Sukanuma E, Sato S, Honda S, Nakazawa A. All trans retinoic acid alleviates coronary stenosis by regulating smooth muscle cell function in a mouse model of Kawasaki disease. *Sci Rep*. 2021 Jul 5;11(1):13856.
257. Johst U, Betsch A, Wiskirchen J, Schöber W, Vonthein R, Rinkert N, et al. All-trans and 9-cis retinoid acids inhibit proliferation, migration, and synthesis of extracellular matrix of human vascular smooth muscle cells by inducing differentiation in vitro. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2003 Apr;41(4):526–35.
258. Wei S, Zhang J, Han B, Liu J, Xiang X, Zhang M, et al. Novel Zinc Finger Transcription Factor ZFP580 Facilitates All-Trans Retinoic Acid -Induced Vascular Smooth Muscle Cells Differentiation by Rar α -Mediated PI3K/Akt and ERK Signaling. *Cell Physiol Biochem*. 2018;50(6):2390–405.
259. Patel S, Shi Y, Niculescu R, Chung EH, Martin JL, Zalewski A. Characteristics of Coronary Smooth Muscle Cells and Adventitial Fibroblasts. *Circulation* [Internet]. 2000 Feb 8 [cited 2024 Jul 6];101(5):524–32. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.CIR.101.5.524>
260. Herdeg C. Effects of local all-trans-retinoic acid delivery on experimental atherosclerosis in the rabbit carotid artery. *Cardiovascular Research* [Internet]. 2003 Feb 1 [cited 2024 Jul 6];57(2):544–53. Available from: [https://academic.oup.com/cardiovascres/article-lookup/doi/10.1016/S0008-6363\(02\)00709-5](https://academic.oup.com/cardiovascres/article-lookup/doi/10.1016/S0008-6363(02)00709-5)

261. Wiegman PJ, Barry WL, McPherson JA, McNamara CA, Gimple LW, Sanders JM, et al. All- *trans* -Retinoic Acid Limits Restenosis After Balloon Angioplasty in the Focally Atherosclerotic Rabbit: A Favorable Effect on Vessel Remodeling. *ATVB* [Internet]. 2000 Jan [cited 2024 Jul 6];20(1):89–95. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.ATV.20.1.89>
262. Colbert MC, Kirby ML, Robbins J. Endogenous Retinoic Acid Signaling Colocalizes With Advanced Expression of the Adult Smooth Muscle Myosin Heavy Chain Isoform During Development of the Ductus Arteriosus. *Circulation Research* [Internet]. 1996 May [cited 2024 Jul 6];78(5):790–8. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.RES.78.5.790>
263. Haller H, Lindschau C, Quass P, Distler A, Luft FC. Differentiation of Vascular Smooth Muscle Cells and the Regulation of Protein Kinase C- α . *Circulation Research* [Internet]. 1995 Jan [cited 2024 Jul 6];76(1):21–9. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.RES.76.1.21>
264. Gollasch M, Haase H, Ried C, Lindschau C, Morano I, Luft FC, et al. L-type calcium channel expression depends on the differentiated state of vascular smooth muscle cells. *FASEB J*. 1998 Dec;12(7):593–601.
265. Rogers MA, Chen J, Nallamshetty S, Pham T, Goto S, Muehlschlegel JD, et al. Retinoids Repress Human Cardiovascular Cell Calcification With Evidence for Distinct Selective Retinoid Modulator Effects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2020 Mar;40(3):656–69.
266. Zheng B, Han M, Bernier M, Zhang X hua, Meng F, Miao S bing, et al. Krüppel-like factor 4 inhibits proliferation by platelet-derived growth factor receptor beta-mediated, not by retinoic acid receptor alpha-mediated, phosphatidylinositol 3-kinase and ERK signaling in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 2009 Aug 21;284(34):22773–85.
267. Wang C, Han M, Zhao XM, Wen JK. Kruppel-like factor 4 is required for the expression of vascular smooth muscle cell differentiation marker genes induced by all-trans retinoic acid. *J Biochem*. 2008 Sep;144(3):313–21.
268. Meng F, Han M, Zheng B, Wang C, Zhang R, Zhang X hua, et al. All-trans retinoic acid increases KLF4 acetylation by inducing HDAC2 phosphorylation and its dissociation from KLF4 in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Sep 11;387(1):13–8.
269. Yu K, Zheng B, Han M, Wen J kun. ATRA activates and PDGF-BB represses the SM22 α promoter through KLF4 binding to, or dissociating from, its cis-DNA elements. *Cardiovasc Res*. 2011 Jun 1;90(3):464–74.
270. Percie Du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, et al. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. Boutron I, editor. *PLoS Biol* [Internet]. 2020 Jul 14 [cited 2025 Sep 27];18(7):e3000410. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pbio.3000410>
271. European_Union. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the Protection of Animals Used for Scientific Purposes. [Internet]. 2010. Available from: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:en:PDF>
272. Leigh Perkins LE. Preclinical Models of Restenosis and Their Application in the Evaluation of Drug-Eluting Stent Systems. *Vet Pathol* [Internet]. 2010 Jan [cited 2025 Oct 2];47(1):58–76. Available from: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0300985809352978>

273. Schwartz RS, Edelman E, Virmani R, Carter A, Granada JF, Kaluza GL, et al. Drug-eluting stents in preclinical studies: updated consensus recommendations for preclinical evaluation. *Circ Cardiovasc Interv.* 2008 Oct;1(2):143–53.
274. Tsigkas G, Vasilagkos G, Tousis A, Theofanis M, Apostolos A, Spyridonidis I, et al. Ultrasound-guided femoral approach for coronary angiography and interventions in the porcine model. *Sci Rep [Internet].* 2022 Aug 17 [cited 2025 Dec 1];12(1):13909. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-022-17436-0>
275. Samara I, Katsouras CS, Semertzioglou A, Vratimos A, Moula AI, Dimitriou CA, et al. Histopathological evaluation of a retinoic acid eluting stent in a rabbit iliac artery model. *Sci Rep.* 2022 Aug 3;12(1):13305.
276. Rhee EJ, Nallamshetty S, Plutzky J. Retinoid metabolism and its effects on the vasculature. *Biochim Biophys Acta.* 2012 Jan;1821(1):230–40.
277. Zhou B, Pan Y, Hu Z, Wang X, Han J, Zhou Q, et al. All-trans-retinoic acid ameliorated high fat diet-induced atherosclerosis in rabbits by inhibiting platelet activation and inflammation. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:259693.
278. Wu Y, Wang X, Zhou Q, Wang Y, Zhou J, Jiang Q, et al. ATRA improves endothelial dysfunction in atherosclerotic rabbits by decreasing CAV-1 expression and enhancing eNOS activity. *Mol Med Rep.* 2018 Dec;17(5):6796–802.
279. Kalisz M, Chmielowska M, Martyńska L, Domańska A, Bik W, Litwiniuk A. All-trans-retinoic acid ameliorates atherosclerosis, promotes perivascular adipose tissue browning, and increases adiponectin production in Apo-E mice. *Sci Rep.* 2021 Feb 24;11(1):4451.
280. Zhou W, Lin J, Chen H, Wang J, Liu Y, Xia M. Retinoic acid induces macrophage cholesterol efflux and inhibits atherosclerotic plaque formation in apoE-deficient mice. *Br J Nutr.* 2015 Aug 28;114(4):509–18.
281. Relevy NZ, Harats D, Harari A, Ben-Amotz A, Bitzur R, Rühl R, et al. Vitamin A-deficient diet accelerated atherogenesis in apolipoprotein E(-/-) mice and dietary β -carotene prevents this consequence. *Biomed Res Int.* 2015;2015:758723.
282. Zhou F, Wu X, Pinos I, Abraham BM, Barrett TJ, von Lintig J, et al. β -Carotene conversion to vitamin A delays atherosclerosis progression by decreasing hepatic lipid secretion in mice. *J Lipid Res.* 2020 Nov;61(11):1491–503.
283. Miano JM, Kelly LA, Artacho CA, Nuckolls TA, Piantedosi R, Blaner WS. all-Trans-retinoic acid reduces neointimal formation and promotes favorable geometric remodeling of the rat carotid artery after balloon withdrawal injury. *Circulation.* 1998 Sep 22;98(12):1219–27.
284. DeRose JJ, Madigan J, Umana JP, Prystowsky JH, Nowygrod R, Oz MC, et al. Retinoic acid suppresses intimal hyperplasia and prevents vessel remodeling following arterial injury. *Cardiovasc Surg.* 1999 Oct;7(6):633–9.
285. Wiegman PJ, Barry WL, McPherson JA, McNamara CA, Gimple LW, Sanders JM, et al. All-trans-retinoic acid limits restenosis after balloon angioplasty in the focally atherosclerotic rabbit : a favorable effect on vessel remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000 Jan;20(1):89–95.
286. Fujiu K, Manabe I, Ishihara A, Oishi Y, Iwata H, Nishimura G, et al. Synthetic retinoid Am80 suppresses smooth muscle phenotypic modulation and in-stent neointima formation by inhibiting KLF5. *Circ Res.* 2005 Nov 25;97(11):1132–41.
287. Leville CD, Dassow MS, Seabrook GR, Jean-Claude JM, Towne JB, Cambria RA. All-trans-retinoic acid decreases vein graft intimal hyperplasia and matrix metalloproteinase activity in vivo. *J Surg Res.* 2000 Dec 15;90(2):183–90.

288. Leville CD, Osipov VO, Jean-Claude JM, Seabrook GR, Towne JB, Cambria RA. All-trans-retinoic acid decreases cell proliferation and increases apoptosis in an animal model of vein bypass grafting. *Surgery*. 2000 Aug;128(2):178–84.
289. Gregory EK, Webb AR, Vercammen JM, Flynn ME, Ameer GA, Kibbe MR. Periadventitial atRA citrate-based polyester membranes reduce neointimal hyperplasia and restenosis after carotid injury in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2014 Nov 15;307(10):H1419-1429.
290. Gregory EK, Webb A, Vercammen JM, Kelly ME, Akar B, van Lith R, et al. Inhibiting intimal hyperplasia in prosthetic vascular grafts via immobilized all-trans retinoic acid. *J Control Release*. 2018 Mar 28;274:69–80.