



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ

ΚΑΡΔΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

**ΕΠΙΚΕΚΑΛΥΜΜΕΝΕΣ ΕΝΔΑΓΓΕΙΑΚΕΣ ΠΡΟΘΕΣΕΙΣ ΚΑΙ
ΕΠΑΝΑΣΤΕΝΩΣΗ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΑΓΓΕΙΟΠΛΑΣΤΙΚΗ**

ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ Ν.ΛΥΣΙΤΣΑΣ

ΙΑΤΡΟΣ - ΚΑΡΔΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2011



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΚΑΡΔΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

ΕΠΙΚΕΚΑΛΥΜΜΕΝΕΣ ΕΝΔΑΓΓΕΙΑΚΕΣ ΠΡΟΘΕΣΕΙΣ ΚΑΙ
ΕΠΑΝΑΣΤΕΝΩΣΗ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΑΓΓΕΙΟΠΛΑΣΤΙΚΗ

ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ Ν.ΛΥΣΙΤΣΑΣ
ΙΑΤΡΟΣ - ΚΑΡΔΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2011

« Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα' Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2' (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος) ».

Ημερομηνία αίτησης του κ Λυσίτσα Δημητρίου: 20-2-2003

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 497^α/1-4-2003

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Μιχάλης Λάμπρος Καθηγητής Καρδιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Σιδερής Δημήτριος Καθηγητής Καρδιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Γουδέβενος Ιωάννης Αναπληρωτής Καθηγητής Καρδιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 21-4-2003

«Επικαλυμμένες ενδοαγγειακές προθέσεις και επαναστένωση μετά από αγγειοπλαστική»

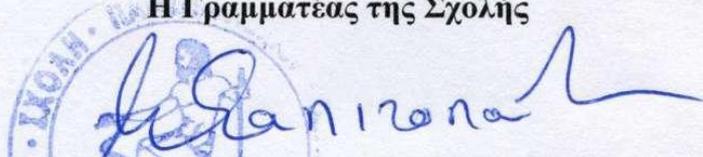
ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 711^α/3-5-2011

Γουδέβενος Ιωάννης	Καθηγητής Παθολογίας -Καρδιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μιχάλης Λάμπρος	Καθηγητής Καρδιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Παυλίδης Νικόλαος	Καθηγητής Παθολογίας -Ογκολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Σιδερής Δημήτριος	Ομότιμος Καθηγητής Καρδιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Αγγελίδης Χαράλαμπος	Αναπληρωτής Καθηγητής Γενικής Βιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Κωλέττης Θεόφιλος	Αναπληρωτής Καθηγητής Καρδιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Νάκα Αικατερίνη	Επίκουρος Καθηγήτρια Καρδιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 30-11-2011

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Μαργαρίτα Τζαφλίδου
Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσικής

Η Γραμματέας της Σχολής

ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ

Στη συζυγό μου Χριστίνα,

στα παιδιά μου Δάφνη και Νικόλα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω θερμές ευχαριστίες και ευγνωμοσύνη:

Στον κ. Λάμπρο Κ. Μιχάλη, Καθηγητή Καρδιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και επιβλέπων της διδακτορικής διατριβής, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την αμέριστη καθοδήγηση και συμπαράσταση και τον ενθουσιασμό του για την έρευνα, ο οποίος αποτελεί έμπνευση για κάθε νέο ερευνητή. Επίσης για την δημιουργία και παροχή άριστης ερευνητικής υποδομής, χωρίς την οποία, η ολοκλήρωση του παρόντος ερευνητικού εγχειρήματος θα ήταν αδύνατη.

Στον κ. Χρήστο Κατσούρα, Επίκουρο Καθηγητή Καρδιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την συνεχή υποστήριξη του και κυρίως για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση στην άσκηση του πειραματικού μοντέλου.

Στους φίλους και συναδέλφους, Ιωάννη Παπακώστα, Ειδικευόμενο Αγγειοχειρουργικής, και Ιωάννη Τούμπουλη, Λέκτορα Καρδιοχειρουργικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, για τις ώρες που αφιέρωσαν στην εκπαίδευση μου στο παρόν πειραματικό μοντέλο και για την υποστήριξη τους παρά την ταυτόχρονη άσκηση της κλινικής τους εκπαίδευσης.

Στους κ. Χαράλαμπο Αγγελίδη, Καθηγητή Βιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κ. Κωνσταντίνο Σεφεριάδη, Καθηγητή Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κ. Νικόλαο Παυλίδη, Καθηγητή Ογκολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κ. Ευάγγελο Μαρίνο, Αναπληρωτή Καθηγητή Ιστολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, κ. Lubna Khaldi, Ειδική Παθολογοανατόμο και τους συνεργάτες τους, για την περαιώση των *in vitro* πειραμάτων, την υλικοτεχνική υποστήριξη και την πολύτιμη βοήθεια και συμβουλές τους.

Και τέλος στους γονείς μου για την ηθική και ουσιαστική υποστήριξη τους και στην σύζυγό μου για την υπομονή και κατανόηση που έδειξε καθώς και την συμπαράσταση της στο δύσκολο αυτό εγχείρημα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Εισαγωγή	4
2. Ορισμός της επαναστένωσης και φαινόμενα που συμβαίνουν στο αγγειακό τοίχωμα κατά την αγγειοπλαστική	7
3. Μηχανισμοί επαναστένωσης	8
3.1 Ελαστική επαναφορά	8
3.2 Σχηματισμός θρόμβου	9
3.3 Υπερπλασία νεοιστού	11
3.4 Αναδιαμόρφωση	14
3.5 Φλεγμονώδη αντίδραση	17
3.6 Αναγέννηση του ενδοθηλίου μετά από αγγειοπλαστική	17
4. Απόπτωση και επαναστένωση	18
4.1 Απόπτωση μετά από αγγειοπλαστική	18
4.2 Hsp70 και απόπτωση	21
5. Πειραματικά μοντέλα επαναστένωσης	21
6. Κυτταρικός κύκλος στην επαναστένωση	23
7.0 Πρόληψη της επαναστένωσης	25
8.0 Χαρακτηριστικά D=24851 και πιθανώς ρόλος στην επαναστένωση	29
1. Σκοπός της μελέτης	30

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Υλικά και μέθοδοι	33
-----------------------------	-----------

1.1 Ομάδες επικαλυμμένων stents και τρόπος κατασκευής τους.	33
1.2 In vitro μελέτες της D-24851	36
1.2.1 Προσδιορισμός της αντιπολλαπλασιαστικής και αντιαποπρωτικής δράσης της D-24851.	36
1.3 In vivo μελέτες	40
1.3.1 Μέθοδος τοποθέτησης ενδοαγγειακών προσθέσεων	40
1.3.2 Συλλογή ιστών και ιστομορφομετρική και ιστοπαθολογική ανάλυση στις 28 ημέρες	41
1.3.3 Εκτίμηση της αναγέννησης του ενδοθηλίου στις 90 μέρες	45
1.3.4 Φαρμακοκινητικές ιδιότητες της D-24851 από τον ορό και τις αρτηρίες κουνελιών	46
2. Στατιστική ανάλυση	46
3. Αποτελέσματα	47
4.1 In vitro μελέτες	47
4.2 In vivo μελέτες	51
4. Συζήτηση- Συμπεράσματα	65
Περίληψη	71
Abstract	73
Βιβλιογραφία	75

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Εισαγωγή

Οι νόσοι του καρδιαγγειακού συστήματος είναι η πρώτη αιτία θανάτου παγκοσμίως σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας. Υπολογίζεται ότι 17.1 εκατομμύρια ασθενείς πέθαναν από καρδιαγγειακά νοσήματα το 2004, αποτελώντας το 30% όλων των θανάτων παγκοσμίως. Από αυτό το ποσοστό, περίπου 7.2 εκατομμύρια οφείλονταν στη στεφανιαία νόσο, η κύρια αιτία της οποίας είναι η αθηροσκλήρωση. [1] Οι θεραπευτικές μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί ως σήμερα για την αντιμετώπιση της στεφανιαίας νόσου, διακρίνονται σε φαρμακευτικές, επεμβατικές (αγγειοπλαστική) και χειρουργικές (αορτοστεφανιαία παράκαμψη). Το 1977 ο Andreas Grüntzig πραγματοποίησε την πρώτη διαδερμική ενδοστεφανιαία αγγειοπλαστική με μπαλόνι. Αν και αρχικά η μέθοδος αντιμετωπίστηκε με ενθουσιασμό, οι ερευνητές σύντομα ανακάλυψαν αρκετούς περιορισμούς, οι κυριότεροι των οποίων ήταν η οξεία απόφραξη του αγγείου και η επαναστένωση του αγγείου στο σημείο της επέμβασης. Μελέτες απέδειξαν ότι 30-60% των ασθενών που υποβάλλονταν σε αγγειοπλαστική με μπαλόνι, ανέπτυσαν συμπτώματα ισχαιμίας λόγω επαναστένωσης μέσα στους πρώτους έξι μήνες. [2] Η μελέτη CABRI έδειξε ότι το 41,2% των ασθενών που αντιμετωπίστηκαν με αγγειοπλαστική με μπαλόνι παρουσίαζε διάφορα μείζονα καρδιαγγειακά συμβάματα στους 12 μήνες μετά την επέμβαση. [3] Στα αναφερόμενα στην μελέτη μείζονα καρδιακά συμβάματα περιλαμβάνονταν ο θάνατος, το έμφραγμα του μυοκαρδίου και η επαναστένωση που απαιτούσε διαδερμική ή χειρουργική επέμβαση.

Περαιτέρω έρευνα έδειξε ότι μολονότι η αγγειοπλαστική με μπαλόνι προκαλεί συμπίεση της αθηροσκληρωτικής πλάκας και με αυτό τον τρόπο αύξηση της επιφάνειας του αρτηριακού αυλού, το αποτέλεσμα της τελικά οφείλεται σε αλλαγές της γεωμετρίας του αυλού οι οποίες προκαλούνται κυρίως από την διάσπαση και ρήξη της πλάκας και από την επέκταση των ρωγμών στο αρτηριακό τοίχωμα σε ποικίλο βάθος και μήκος. Ο τραυματισμός

του αγγειακού τοιχώματος που προκαλεί αυτού του είδους η επέμβαση (αγγειοπλαστική) ευθύνεται για τα δυο σημαντικά προβλήματα που σχετίζονται με αυτήν την τεχνική, δηλαδή την οξεία απόφραξη του αγγείου, είτε λόγω σχηματισμού θρόμβου είτε λόγω διαχωρισμού του τοιχώματος, και την επαναστένωση του αυλού. Η προσπάθεια αντιμετώπισης αυτών των προβλημάτων οδήγησε στην ανάγκη τοποθέτησης ενδοαγγειακών προθέσεων (stents). Ο όρος stent προέρχεται από έναν Βρετανό οδοντίατρο του δεκάτου ενάτου αιώνα, τον Charles Stent ο οποίος ανέπτυξε ένα καλούπι με το οποίο σχημάτιζε εντυπώματα των δοντιών και της στοματικής κοιλότητας. [4] Αργότερα ο όρος αυτός χρησιμοποιήθηκε σε διάφορες εφαρμογές όπως π.χ. σε υποστηρικτικούς μηχανισμούς δερματικών μοσχευμάτων, σε σωληνοειδείς κατασκευές που έχουν αναστομωθεί και πιο πρόσφατα για την ενδοαγγειακή υποστήριξη κατά την διάνοιξη των αγγειακών στενώσεων. [4] Η σύλληψη της τοποθέτησης προσθετικών μηχανισμών για την διατήρηση της ακεραιότητας του αυλού αθηρωσκληρωτικών αγγείων αποδίδεται στον Charles Dotter το 1969, που εισήγαγε σπειροειδή ελατήρια σε περιφερικές αρτηρίες σκυλιών. [5] Αργότερα παρουσιάστηκαν τα αποτελέσματα τοποθέτησης stent και συγκεκριμένα συρμάτινου ελατηρίου από nitinol με τη βοήθεια καθετήρα σε αρτηρίες σκυλιών το 1983. [6,7] Το 1986 έγινε η πρώτη εμφύτευση σε άνθρωπο από τον Jacques Puel στην Τουλούζη της Γαλλίας και αμέσως μετά ο Ulrich Sigwart στην Λωζάννη της Ελβετίας ανακοίνωσε την εμφύτευση αυτό-εκτεινόμενων stents σε ασθενείς. [8,9] Το 1988, 117 αυτοεκτεινόμενα stents (Wallstents), τοποθετήθηκαν σε αυτόχθονες στεφανιαίες αρτηρίες και φλεβικά μοσχεύματα με απογοητευτικά αποτελέσματα αφού 27 stents εμφάνισαν πλήρη απόφραξη, οδηγώντας σε αντιπαράθεση για τις χρησιμοποιούμενες αντιπηκτικές αγωγές. Ωστόσο η αισιοδοξία για την κλινική χρήση της τεχνικής αυτής παρέμεινε αφού παρατηρήθηκε 14% επαναστένωση μετά από follow up περίπου 6 μηνών. [10] Την ίδια περίοδο ο Roubin και συν. ανακοίνωσαν τα αποτελέσματα από ένα νέο stent, το Giantourco-Roubin σε 115 ασθενείς. Το ποσοστό των επιπλοκών ήταν αποδεκτά χαμηλό αλλά ο ρυθμός

επαναστένωσης έφτασε το 41%. [11] Ο Schatz και συν. ανακοίνωσαν τα αποτελέσματα μιας πολυκεντρικής μελέτης με Palmaz-Schatz stents στην οποία η υποξεία θρόμβωση έφτανε το 16%. [12] Δυο μεταγενέστερες ιστορικές τυχαιοποιημένες μελέτες, η Benestent και η STRESS έπαιξαν σημαντικό ρόλο για την καθιέρωση της χρήσης των stents. Η επίπτωση της επαναστένωσης ήταν σημαντικά χαμηλότερη στους ασθενείς με stent (Benestent 22%, STRESS 32%) σε σύγκριση με την αγγειοπλαστική με μπαλόνι (Benestent 32%, STRESS 42%) και η χρήση των stents συσχετίστηκε με ευνοϊκότερη έκβαση. [13,14] Τις τελευταίες δεκαετίες τα χαρακτηριστικά τους βελτιώθηκαν δραματικά και σήμερα διαθέτουμε ιδιαίτερα ευέλικτα, σχετικά θρομβοανθιστάμενα, εύκολα εκπτυσσόμενα, ιστοσυμβατά και με καλύτερη υποστηρικτική δύναμη stents. Επίσης η χρήση διπλής αντιαιμοπεταλιακής αγωγής περιόρισε την οξεία και υποξεία θρόμβωση μετά από τοποθέτηση stent. [15] Σαν αποτέλεσμα το ποσοστό άμεσης επιτυχίας των διαδερμικών ενδοστεφανιαίων επεμβάσεων αυξήθηκε από 61% την περίοδο 1977-1981 σε 92% την περίοδο 1997-1998 σύμφωνα με την Dynamic NHLBI Registry. [16] Πιο πρόσφατα αποτελέσματα έδειξαν ότι stents χρησιμοποιούνται στο 90% των στεφανιαίων επεμβάσεων. [17] Παρόλη την μείωση του ρυθμού επαναστένωσης κατά 30% με την χρήση των μεταλλικών stents, η επαναστένωση μετά από αγγειοπλαστική με χρήση stents παραμένει ένα κλινικό πρόβλημα. Διαπιστώθηκε δε ότι η μείωση της επαναστένωσης μετά από χρήση stent κυρίως οφείλεται στην μείωση της ελαστικής επαναφοράς και της αρνητικής αναδιαμόρφωσης του αγγειακού τοιχώματος. [18]

2. Ορισμός της επαναστένωσης και φαινόμενα που συμβαίνουν στο αγγειακό τοίχωμα κατά την αγγειοπλαστική

Παρότι η έννοια της επαναστένωσης είναι οικεία στην καρδιολογική κοινότητα, δεν υπάρχει γενική συναίνεση για τον ακριβή ορισμό της. Ως επαναστένωση ορίζεται η διαδικασία επούλωσης του αρτηριακού τοιχώματος λόγω του τραυματισμού που προκαλείται μετά από διαδερμική στεφανιαία αγγειοπλαστική. [19] Από τα αγγειογραφικά κριτήρια που έχουν χρησιμοποιηθεί για τον ορισμό της επαναστένωσης, η ελάττωση της διαμέτρου του αυλού του αγγείου κατά >50% στη θέση που έγινε η αγγειοπλαστική με μπαλλόνι ή με stent, είναι ο ορισμός που χρησιμοποιείται στις πρόσφατες πολυκεντρικές μελέτες. [20] Πριν αναλύσουμε τους μηχανισμούς της επαναστένωσης θα πρέπει να εξετάσουμε τις αλλαγές που επέρχονται στον αυλό της αρτηρίας μετά την διάταση που υφίσταται από την αγγειοπλαστική με μπαλλόνι ή με stent. Η διάταση του αγγειακού τοιχώματος προκαλεί διάσπαση του ενδοθηλίου, του έσω ελαστικού χιτώνα (internal elastic lamina, IEL) και διαχωρισμό του μέσου ελαστικού χιτώνα (media) που συχνά επεκτείνεται στον έξω ελαστικό χιτώνα (external elastic lamina, EEL). [21-23] Η αύξηση του αυλού οφείλεται σε έναν συνδυασμό μείωσης της πλάκας λόγω συμπίεσης, αξονικής ανακατανομής της πλάκας προς το εγγύς και άπω τμήμα της στενωτικής βλάβης, μετατόπισης της πλάκας σε παρακείμενα τμήματα του αγγείου, και διαστολής του αγγείου. [24-29] Μελέτες με ενδοαγγειακό υπέρηχο (IVUS) έδειξαν ότι η αγγειοπλαστική με ή χωρίς stent αυξάνει την μέση περιοχή του έξω ελαστικού χιτώνα και μειώνει την μέση περιοχή της πλάκας και του μέσου ελαστικού χιτώνα στο σημείο της αγγειοπλαστικής χωρίς ή με τοποθέτηση stent. [29] Αυτό συνοδεύεται από αύξηση της περιοχής της πλάκας και του μέσου ελαστικού χιτώνα εγγύς και άπω της περιοχής που έγινε η επέμβαση [29] και ταυτόχρονη μείωση της περιοχής του αυλού σε αυτά τα σημεία.

Ιστολογικά, οι αρτηρίες μετά από επιτυχή αγγειοπλαστική (αυλός >50% σε σχέση με τον αυλό του τμήματος αναφοράς) παρουσιάζουν βραχυπρόθεσμα μεγαλύτερο αυλό, μικρότερο μέγεθος της πλάκας και πιο λεπτό έξω ελαστικό χιτώνα σε σχέση με την εικόνα που παρατηρείται σε ανεπιτυχή αγγειοπλαστική. [30]

Το άμεσο αποτέλεσμα της αγγειοπλαστικής στο αρτηριακό τοίχωμα φαίνεται ότι επηρεάζει τόσο την βραχυπρόθεσμη επιτυχία της επέμβασης όσο και το ποσοστό της επαναστένωσης. Σε περιπτώσεις αγγειοπλαστικής με stent το μέγεθος της πλάκας εκτός των ορίων του stent μετά την έκπτυξη του σχετίζεται θετικά με την ανάπτυξη νεοιστού. [31] Επιπρόσθετα, το πάχος του νεοιστού συσχετίζεται με την έκταση του τοιχωματικού τραύματος, το οποίο καθορίζεται από το βαθμό διείδυσης του μεταλλικού πλέγματος στο αρτηριακό τοίχωμα. [32] Το γεγονός ότι η αγγειοπλαστική προκαλεί ποικίλες επιδράσεις τόσο στο σημείο της επέμβασης όσο και σε τμήματα του αγγείου εγγύς και άπω της επέμβασης, υποδεικνύει ότι η επαναστένωση μπορεί να είναι το τελικό προϊόν πολλαπλών επιδράσεων. Μολονότι ακόμη και σήμερα οι ακριβείς διεργασίες που οδηγούν στην επαναστένωση δεν είναι ακριβώς γνωστές πιστεύουμε ότι πρόκειται για ένα πολυσύνθετο παθοφυσιολογικό μηχανισμό και συνδυασμό διάφορων βιολογικών διεργασιών που λαμβάνουν χώρα σε διαφορετικές χρονικές περιόδους.

3. Μηχανισμοί επαναστένωσης

3.1 Ελαστική επαναφορά

Οι στεφανιαίες αρτηρίες είναι αρτηρίες που ο μεν μέσος χιτώνας τους αποτελείται κατά κύριο λόγο από λείες μυικές ίνες , ο δε έσω και έξω ελαστικός χιτώνας τους

αποτελείται κατά κύριο λόγο από ελαστικές ίνες. Η διαταση του αρτηριακού τοιχώματος από την έκπτυξη του μπαλονιού ακολουθείται επομένως από ελαστική επαναφορά λόγω των ελαστικών ιδιοτήτων του αγγειακού τοιχώματος. Αυτή η ελαστική επαναφορά συμβαίνει δευτερόλεπτα ή λεπτά μετά το ξεφούσκωμα του μπαλονιού προκαλώντας μείωση της επιφάνειας του αυλού μέχρι και 40%. [33] Εικοσιτέσσερις ώρες μετά την αγγειοπλαστική με μπαλόνι, >14% των ασθενών έχουν επαναστενωθεί, κυρίως σε αγγεία με έκκεντρες βλάβες. [34] Αν και υψηλά επίπεδα ελαστικής επαναφοράς μπορεί να οδηγήσουν σε όψιμη επαναστένωση, μεμονωμένα μεγαλύτερα επίπεδα πρώιμης επαναφοράς δεν συσχετίζονται με μεγαλύτερη όψιμη απώλεια. [35,36] Όμως η μεγαλύτερη πρώιμη ελαστική επαναφορά μπορεί να συμβάλλει στην επαναστένωση αφού επιτρέπει μικρότερα επίπεδα αρνητικής αναδιαμόρφωσης να οδηγήσουν σε επαναστένωση. [35] Μολονότι τόσο η αγγειοπλαστική με μπαλόνι όσο και με stent προκαλούν υπερδιατασιμότητα και τραυματισμό του αρτηριακού τοιχώματος, τα stents μειώνουν σημαντικά την επαναστένωση επειδή εμποδίζουν σε μεγάλο βαθμό την ελαστική επαναφορά και η όποια επαναστένωση οφείλεται κύρια στην υπερπλασία του νεοϊστού (δες παρακάτω). [37]

3.2 Σχηματισμός θρόμβου

Η αγγειοπλαστική προκαλεί απογύμνωση του ενδοθηλίου και διαχωρισμό που μπορεί να επεκτείνεται στον μέσο ελαστικό χιτώνα. Επακόλουθη έκθεση στοιχείων όπως κολλαγόνο, παράγοντας von Willebrand, ινωδονεκτίνη και λαμινίνη οδηγεί στην προσκόλληση και συσσώρευση αιμοπεταλίων με την μεσολάβηση γλυκοπρωτεϊνικών υποδοχέων μεμβράνης, κυρίως των υποδοχέων IIb/IIIa. Οι υποδοχείς IIb/IIIa δρουν ως το τελικό μονοπάτι για την συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Η συσσώρευση των αιμοπεταλίων προκαλεί απελευθέρωση θρομβοξάνης A₂ και σεροτονίνης οι οποίες προάγουν περαιτέρω προσκόλληση και

συσσώρευση καθώς συμβάλλουν στον πολλαπλασιασμό των λειών μυϊκών κυττάρων. [38] Τα αιμοπετάλια μπορούν επίσης να απελευθερώσουν μιτογόνους και χημειοτακτικούς παράγοντες όπως platelet-derived growth factor (PDGHF), fibroblast growth factor (FGF) και transforming growth factor- β (TGF- β), οι οποίοι προάγουν την μετανάστευση αγγειακών λειών μυϊκών κυττάρων και τον σχηματισμό νεοιστού. [39] Μεγάλη συσσώρευση αιμοπεταλίων, ινώδους και παγιδευμένων ερυθρών κυττάρων έχουν βρεθεί στην περιοχή της αρτηριακής βλάβης. [40-42] Τόσο τα αιμοπετάλια όσο και ο σχηματισμός θρόμβου εμπλέκονται στην επαναστένωση μετά από αγγειοπλαστική, [40,41,43,44] ενώ η αγγειογραφική διάγνωση ύπαρξης θρόμβου είναι προγνώστικος παράγοντας όψιμης επαναστένωσης. [45, 46] Εναπόθεση ινώδους και αιμοπεταλίων στο μεταλλικό πλέγμα των ενδοαγγειακών προθέσεων λαμβάνει χώρα πρώιμα μετά την τοποθέτησή τους και δείχνει να σχετίζεται με δημιουργία νεοιστού και εκτεταμένη νεοαγγείωση στα σημεία όπου συμβαίνει επαναστένωση. [47-49]

Ένας από τους πιο ισχυρούς διεγερτικούς παράγοντες στον σχηματισμό θρόμβου μετά την αγγειοπλαστική είναι η έκθεση στον ιστικό παράγοντα (tissue factor), [50] του οποίου η έκφραση και συγκέντρωση είναι αυξημένη στις αθηρωματικές πλάκες σε σύγκριση με τα υγιή αγγεία. [51] Ο ιστικός παράγοντας αυξάνεται περισσότερο μετά την αγγειοπλαστική με μπαλόνι σε σύγκριση με τα stents, γεγονός που ίσως να σημαίνει ότι η επαναστένωση μετά από stent συνοδεύεται από λιγότερο θρομβογόνο περιβάλλον από ότι μετά από αγγειοπλαστική με μπαλόνι. Μολονότι αναστολείς ανασυνδυσμένου ιστικού παράγοντα περιορίζουν τον σχηματισμό νεοιστού σε πειραματόζωα, [52] τα αποτελέσματα δεν έχουν δοκιμαστεί σε ανθρώπους.

Ο σχηματισμός θρόμβου μπορεί επίσης να δράσει σαν υπόστρωμα πάνω στο οποίο τα λεία μυϊκά κύτταρα μπορούν να μεταναστεύσουν, να συνθέσουν κολλαγόνο και να επαναδιοργανώσουν τον θρόμβο, [53] επάγοντας απευθείας τον σχηματισμό νεοιστού.

Πράγματι, κάποιοι παράγοντες του καταρράκτη της πήξης όπως ο X, Xa, S,[54] καθώς και η θρομβίνη [55] ίσως να δρουν ως μιτογόνοι παράγοντες για τα λεία μυϊκά κύτταρα. Αναστολείς του παράγοντα X μείωσαν το σχηματισμό νεοιστού σε πειραματόζωα. [56] Πάρα τα δεδομένα που υποδεικνύουν ότι ο σχηματισμός θρόμβου μπορεί να προάγει απευθείας την επαναστένωση, οι διάφορες μελέτες αντιαιμοπεταλιακών και αντιπηκτικών παραγόντων απέτυχαν να μειώσουν την επαναστένωση. [57-59] Επίσης ακόμα δεν είναι γνωστή η σχέση ανάμεσα στο μέγεθος του σχηματισθέντος θρόμβου στο σημείο της αγγειοπλαστικής και την έκταση του νεοιστού. [60] Αυτό είναι σημαντικό αφού καθορίζει τον εν δυνάμει βαθμό επιτυχίας της στρατηγικής που εστιάζει αποκλειστικά στην αναστολή και περιορισμό του θρόμβου στην περιοχή της αγγειοπλαστικής.

3.3 Υπερπλασία νεοιστού

Ο αρτηριακός τραυματισμός που συνοδεύει τις επεμβάσεις στα στεφανιαία αγγεία προάγει έναν αριθμό αλλαγών στο αγγειακό τοίχωμα οι οποίες προκαλούν πολλαπλασιασμό και μετανάστευση αγγειακών λειών μυϊκών κυττάρων (vascular smooth muscle cells, VSMC) στο σημείο της βλάβης. Η αγγειοπλαστική προάγει 1) μηχανική διάταση της αρτηρίας, ρήξη της έσω ελαστικής μεμβράνης και διαχωρισμό της μέσης ελαστικής μεμβράνης, 2) απογύμνωση του ενδοθηλίου και έκθεση σε μιτογόνους παράγοντες της κυκλοφορίας όπως αγγειοτενσίνη II και πλασμίνη, και 3) απελευθέρωση μιτογόνων παραγόντων και κυτοκινών από αιμοπετάλια, ενδοθηλιακά κύτταρα, λεία μυϊκά κύτταρα και φλεγμονώδη κύτταρα. Υπό φυσιολογικές συνθήκες τα λεία μυϊκά κύτταρα βρίσκονται στη φάση G0 του κυτταρικού κύκλου. Έρευνες σε πειραματόζωα έδειξαν ότι ο αρτηριακός τραυματισμός προκαλεί άμεση έκφραση πρώιμων γονιδίων οδηγώντας την είσοδο των λειών μυϊκών κυττάρων του μέσου και έσω ελαστικού χιτώνα στο κυτταρικό κύκλο, και τον πολλαπλασιασμό τους. [61,62] Στη

συνέχεια ακολουθεί πολλαπλασιασμός και/ή μετανάστευση λείων μυικών κυττάρων, καθώς και σύνθεση εξωκυττάριας ουσίας και κολλαγόνου. Αυτοί οι μηχανισμοί προάγονται από παράγοντες των αιμοπεταλίων οδηγώντας στον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και μετανάστευση, την παράγωγη εξωκυττάριας ουσίας και την ανάπτυξη νεοσχηματιζόμενου έσω χιτώνα. [44, 60] Μέχρι πρόσφατα ο σχηματιζόμενος νεοιστός θεωρούταν η κυρία αιτία επαναστένωσης μετά από αγγειοπλαστική και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός ήταν ο πρωτεύον στόχος των αντί-επαναστενωτικών θεραπειών. Πολλές μελέτες χρησιμοποίησαν τον όρο υπερπλασία των λειών μυικών ινών ενώ ιστολογικά δείγματα έκαναν αναφορά σε φαινοτύπους υπερτροφίας. [63-65] Έχει επίσης δειχθεί ότι λεία μυικά κύτταρα από επαναστενωτικές βλάβες πολλαπλασιάζονται ταχύτερα από τα κύτταρα αθηρωσκληρωτικών βλαβών. [66,67] Στοιχεία από μελέτες σε ασθενείς δείχνουν όμως τον περιορισμένο ρόλο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στο μηχανισμό της επαναστένωσης. Ο O'Brien και συν. έδειξαν ότι μετά από αγγειοπλαστική οι ανθρώπινες αρτηρίες δεν επιδεικνύουν τον ίδιο βαθμό κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε σύγκριση με τα πειραματόζωα και ότι ενώ αμέσως μετά τον αρτηριακό τραυματισμό είναι υψηλός προοδευτικά μειώνεται. [68] Σε παρόμοια συμπεράσματα έχουν καταλήξει και άλλες μελέτες [69-71] μολονότι είναι πιθανόν ότι τα τυχαία δείγματα από τις αθηρεκτομές σε κλινικό επίπεδο να μην είναι αρκετά για να εκτιμήσουν πλήρως τον βαθμό του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Σε αντίθεση με την αγγειοπλαστική με μπαλόνι η επαναστένωση μετά από τοποθέτηση ενδοαγγειακής προθέσεως οφείλεται κυρίως στον σχηματισμό νεοιστού. [72-76] Η τελευταία σχετίζεται με αύξηση του νεοσχηματιζόμενου έσω χιτώνα μέχρι τους τρεις πρώτους μήνες με μικρές αλλαγές μέχρι τους έξι μήνες. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός της προοδευτικής μείωσης του νεοιστού από τους έξι μήνες μέχρι τα τρία χρόνια πιθανόν λόγω αναδιαμόρφωσης του. [77] Και σε αυτήν την περίπτωση ο βαθμός κυτταρικού πολλαπλασιασμού αποδεδείχθηκε χαμηλός σε δείγματα από επαναστενωτικές βλάβες παρόλο ότι κάποιοι δείκτες είναι υψηλότεροι σε

σύγκριση με την απλή αγγειοπλαστική με μπαλόνι. [68, 70, 78,79] Αν και ο σχηματισμός νεοιστού μετά από stent σχετίζεται με τον βαθμό τραυματισμού και την διάσπαση του μέσου χιτώνα [47] οι δείκτες του κυτταρικού πολλαπλασιασμού δεν δείχνουν να σχετίζονται με τον βαθμό τραυματισμού του αρτηριακού τοιχώματος . [68] Η πλειονότητα των υπερπλαστικών κυττάρων φαίνεται να εντοπίζεται εν τω βάθει και σε άμεση σχέση με το μεταλλικό πλέγμα πιθανόν ως αντίδραση στην παρουσία του μεταλλικού πλέγματος. [79] Αυτό δηλώνει ότι ο πολλαπλασιασμός των λειών μυϊκών κυττάρων συμβαίνει ως μια χρόνια, χαμηλού βαθμού διεργασία έχοντας σαν διαρκές ερέθισμα την παρουσία του stent και αυτό ίσως είναι αρκετό σε συνδυασμό με άλλους μηχανισμούς για την συσσώρευση νεοιστού.

Οι επαναστενωτικές βλάβες είναι υποκυτταρικές σε σύγκριση με τις αθηρωματικές βλάβες αποτελούμενες κυρίως από κολλαγόνο και πρωτεογλυκάνες εξωκυττάριας ουσίας οι οποίες παράγονται από μικρό αριθμό λειών μυϊκών κυττάρων. [80] Στον νεοιστό ανθρώπινων βλαβών μόνο το 11% της μάζας του αποτελείται από κύτταρα [81] ενώ υπάρχει αυξημένη παραγωγή κολλαγόνου και πρωτεογλυκανών σε σύγκριση με τις αθηρωματικές βλάβες. [80-83] Και στην επαναστένωση μετά από τοποθέτηση ενδοαγγειακών προθέσεων το κύριο μέρος του νεοιστού αποτελείται από πρωτεογλυκάνες εξωκυττάριας ουσίας και κολλαγόνο [68], με προοδευτική τους αύξηση και μείωση της κυτταρικότητας κατά την ανάπτυξη της στένωσης. [48] Υπάρχει μια χρόνια αντίδραση ξένου σώματος προς το stent με πολυμορφοπύρρηνα γιγαντοκύτταρα και παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων κολλαγόνου και εξωκυττάριας ουσίας από τα λιγιστά λεία μυϊκά κύτταρα. [79] Είναι πιθανόν ότι όλα τα παραπάνω παίζουν σημαντικό ρόλο στα προσδοκώμενα αποτελέσματα θεραπειών οι οποίες στοχεύουν μόνο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε σύγκριση με αυτές που στοχεύουν στην τροποποίηση του συνθετικού φαινοτύπου των λειών μυϊκών κυττάρων.

3.4 Αναδιαμόρφωση

Σε αντίθεση με την δημιουργία νεοσχηματιζόμενου έσω χιτώνα, η αγγειακή αναδιαμόρφωση μπορεί να οριστεί ως αλλαγή στο μέγεθος του αγγείου χωρίς απαραίτητα να συνοδεύεται από ιστικές αλλαγές. Είναι μια φυσιολογική διεργασία για την διατήρηση της επιφάνειας του αυλού σαν απάντηση σε αλλαγές της αιματικής ροής. [84] Στα πρώιμα στάδια της αθηροσκλήρωσης η διάταση του αγγείου αποτελεί αντισταθμιστικό μηχανισμό στην αυξανόμενη συγκέντρωση αθηρωματικού υλικού. [85] Στα όψιμα στάδια όμως ο αντισταθμιστικός αυτός μηχανισμός δεν είναι ικανός να διατηρήσει την επιφάνεια του αυλού με αποτέλεσμα την μείωση του. [85] Η αναδιαμόρφωση μπορεί επομένως να είναι είτε προς τα έξω (θετική αναδιαμόρφωση, positive/expansive remodeling) είτε προς τα έσω (αρνητική αναδιαμόρφωση, negative /constrictive remodeling). Επομένως η επαναστένωση μπορεί να λάβει χώρα εξαιτίας της αρνητικής αναδιαμόρφωσης χωρίς την παρουσία σημαντικής ποσότητας νεοιστού. Από την άλλη μεριά η θετική αναδιαμόρφωση μπορεί να αποτρέψει την στένωση του αγγειακού αυλού πάρα την ύπαρξη μεγάλων ποσοτήτων νεοιστού. Πράγματι σε πειραματόζωα, τραυματισμένες αρτηρίες μπορούν να διατηρήσουν την ίδια επιφάνεια αυλού ακόμη και αν το 60% αυτών αποτελείται από νεοιστό. [86-88] Η αναδιαμόρφωση είναι μια προοδευτική διεργασία που συμβάλλει κυρίως στην όψιμη απώλεια αυλού μετά την επέμβαση. [89] Η έκταση της αναδιαμόρφωσης ωστόσο μετά την αγγειοπλαστική δεν φαίνεται να σχετίζεται με την έκταση της αναδιαμόρφωσης του τμήματος του αγγείου που εμπεριέχει την βλάβη και επομένως η ικανότητα αρνητικής αναδιαμόρφωσης δεν είναι ιδιότητα μόνο του συγκεκριμένου τμήματος της αρτηρίας. [90] Σε μια μελέτη επαναστένωσης σε ασθενείς μετά από αγγειοπλαστική, στο 40% των δειγμάτων στην αυτοψία, δεν υπήρχε σχηματιζόμενος νεοιστός. [91] Αυτό δημιούργησε την πεποίθηση ότι η αγγειακή αναδιαμόρφωση είναι ο κύριος συντελεστής της επαναστένωσης. Αυτό

επιβεβαιώθηκε από μελέτες με ενδοαγγειακό υπέρηχο σε επαναστενωτικές βλάβες, οι οποίες έδειξαν ότι η αναδιαμόρφωση συνέβαλε στην απώλεια των 2/3 με 3/4 της επιφάνειας του αυλού. [92,93] Επιπρόσθετα οι ασθενείς με επαναστένωση είχαν τον ίδιο βαθμό νεοιστού με αυτούς χωρίς επαναστένωση και οι διαφορές στη μέση διάμετρο αυλού ήταν εξολοκλήρου λόγω της αρνητικής αναδιαμόρφωσης. [92,93] Οι βλάβες που υπέστησαν θετική αναδιαμόρφωση παρουσίασαν χαμηλότερο ποσοστό επαναστένωσης παρά την μεγαλύτερη επιφάνεια νεοιστού, επιβεβαιώνοντας ότι οι παρατηρήσεις του Glagov και συν. το 1987 σε πρωτογενείς αθηροσκληρωτικές βλάβες ισχύουν και σε βλάβες που συνοδεύουν αρτηριακό τραυματισμό. Η αγγειακή αναδιαμόρφωση αποδείχτηκε ο σημαντικότερος συντελεστής επαναστένωσης για μια σειρά θεραπευτικών μεθόδων όπως της αγγειοπλαστικής με μπαλόνι, της αθηρεκτομής, χρήσης laser κ.α. Τα παραπάνω ευρήματα επιβεβαιώθηκαν με ιστολογικές μελέτες βλαβών από επαναστένωση οι οποίες έδειξαν μειωμένη επιφάνεια του έσω ελαστικού χιτώνα γεγονός που δείχνει ότι η αρνητική αναδιαμόρφωση αποτελεί παράγοντα καθοριστικό για την διάμετρο του αγγειακού αυλού. [30, 94,95] Αν και η αναδιαμόρφωση μπορεί να προσδιοριστεί με τον ενδοαγγειακό υπέρηχο, δεν έχει βρεθεί ο ακριβής μηχανισμός. Δεν είναι γνωστό αν αποτελεί κύρια αντίδραση του μέσου ή έξω χιτώνα στον τραυματισμό ή αν πρόκειται για συνδυασμό και των δυο. Σε φυσιολογικές καταστάσεις όπως στην ελάττωση της αρτηριακής κυκλοφορίας μετά την γέννηση, αλλαγές στη διάμετρο του αγγείου επιτυγχάνονται ρυθμίζοντας το ποσοστό κυτταρικού πολλαπλασιασμού/θανάτου στον αρτηριακό μέσω χιτώνα. [96-98] Αυτοί οι μηχανισμοί μπορούν να οδηγήσουν σε συρρίκνωση ή διεύρυνση του μέσου χιτώνα προκαλώντας θετική ή αρνητική αναδιαμόρφωση ή ακόμα και απόφραξη του αγγείου. [96-98] Η αναδιαμόρφωση μπορεί επίσης να οφείλεται σε αλλαγές των ιδιοτήτων της εξωκυττάριας ουσίας. Η αγγειοπλαστική προκαλεί οξείες αλλαγές στην σύνθεση και αποδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας, οδηγώντας σε αυξημένη σύνθεση κολλαγόνου, μειωμένη δράση των μεταλλοπρωτεϊνών και επομένως σε μειωμένη

αποδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας. [99] Τα λεία μυϊκά κύτταρα στις επαναστενωτικές βλάβες παρουσιάζουν ένα συνθετικό φαινότυπο πολύ πιο ισχυρό σε σύγκριση με τα κύτταρα των πρωτογενών αθηρωματικών βλαβών. [100] Επίσης η πυκνότητα του κολλαγόνου σε βλάβες με αρνητική αναδιαμόρφωση είναι μεγαλύτερη από ότι σε αυτές με θετική, φανερώνοντας άμεση σχέση της αυξημένης σύνθεσης κολλαγόνου με την δημιουργία επαναστένωσης μέσω της αρνητικής αναδιαμόρφωσης. [101] Η δράση των μεταλλοπρωτεϊνών είναι μειωμένη και η περιεκτικότητα σε κολλαγόνο αυξημένη σε ανθρώπινες επαναστενωτικές βλάβες σε σύγκριση με πρωτογενείς αθηρωματικές πλάκες και υγιείς αρτηρίες. [81] Η αναστολή των μεταλλοπρωτεϊνών περιορίζει την επαναστένωση σε πειραματόζωα αποτρέποντας την αρνητική αναδιαμόρφωση. [102] Επομένως φαίνεται ότι οι αλλαγές στην εξωκυττάρια ουσία ίσως να είναι το ίδιο σημαντικές στην διεργασία της αναδιαμόρφωσης. Επιπλέον αλλαγές μετά τον αρτηριακό τραυματισμό συμβαίνουν στον έξω ελαστικό χιτώνα. Ο έξω χιτώνας παρουσιάζει το μεγαλύτερο ρυθμό κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε σχέση με τους άλλους χιτώνες μετά τον τραυματισμό, με διαφοροποίηση των ινοβλαστών σε μυοβλάστες και νεοσχηματιζόμενο έξω χιτώνα σε υγιείς αρτηρίες χοίρων. [103-107] Οι μυοβλάστες είναι ικανοί να συνθέσουν κολλαγόνο και ίσως να έχουν συσπαστικές ιδιότητες παρόμοιες των λειών μυϊκών κυττάρων, προκαλώντας σύσπαση του ουλώδη ιστού του έξω χιτώνα και οδηγώντας σε σύσπαση του μέσω χιτώνα και τελικά σε συρρίκνωση του αγγείου. [103, 108] Επιπρόσθετα, σύμφωνα με δεδομένα σε πειραματόζωα και λιγότερο σε ανθρώπους, οι μυοβλάστες μπορεί να έχουν και μεταναστευτικές ιδιότητες συμβάλλοντας στην δημιουργία νεοιστού. [104,105] Μολονότι η αναδιαμόρφωση του έξω χιτώνα μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην επαναστένωση, αυτό δεν έχει επιβεβαιωθεί πλήρως σε μελέτες ανθρώπινου υλικού ενώ άλλες μελέτες σε πειραματόζωα δείχνουν ότι η αντίδραση του έξω χιτώνα σε τραυματισμένες αρτηρίες είναι μικρότερη από ότι σε υγιείς. [107]

3.5 Φλεγμονώδη αντίδραση

Η φλεγμονώδης αντίδραση μετά τον αρτηριακό τραυματισμό με επακόλουθη απελευθέρωση χημειοτακτικών και αυξητικών παραγόντων έχει ενοχοποιηθεί ως ένας από του σημαντικότερους συντελεστές της επαναστένωσης. [109,110] Μελέτες σε ανθρώπινες αρτηρίες με stent έδειξαν οξεία φλεγμονή αμέσως μετά την εμφύτευση του stent και κυρίως όταν αυτή σχετίζεται με διάσπαση του μέσου χιτώνα ή διείσδυση του λιπώδους πυρήνα της πλάκας. [47-49] Ο Kornowski και συν. απέδειξαν ότι υπάρχει απευθείας συσχετισμός της έκτασης της φλεγμονώδους αντίδρασης τόσο με τον βαθμό του αρτηριακού τραυματισμού όσο και με τον βαθμό επαναστένωσης. [111]

3.6 Αναγέννηση του ενδοθηλίου μετά από αγγειοπλαστική

Η αναγέννηση του ενδοθηλίου αποτελεί φυσιολογική διαδικασία που ακολουθεί κάθε τραυματισμό του αρτηριακού τοιχώματος συμπεριλαμβανομένης και της εμφύτευσης stent. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα πολλαπλασιάζονται και μεταναστεύουν από γειτονικά τμήματα της αρτηρίας τα οποία δεν έχουν υποστεί τραυματισμό και οδηγούν στην επανενδοθηλιοποίηση του τραυματισμένου τμήματος. In vitro μελέτες της ραπαμυσίνης και της πακλιταξέλης έδειξαν ότι μπορεί να καταστέλουν τον πολλαπλασιασμό και την μετανάστευση των VSMCs αλλά παράλληλα εμποδίζουν την επανενδοθηλιοποίηση. [112-115]

Έχουν παρατηρηθεί περιορισμένος σχηματισμός ενδοθηλίου και μικροθρόμβοι λόγω εστιακής συσσώρευσης αιμοπεταλίων, 16 μήνες μετά την τοποθέτηση επικαλυμμένου με ραπαμυσίνη stent σε ασθενή που πέθανε από μη καρδιογενή αίτια. [116] Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η ραπαμυσίνη αναστέλει in vitro τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και τη διαφοροποίηση των ανθρώπινων αρχέγονων προενδοθηλιακών κυττάρων, τα οποία πιθανόν να εμπλέκονται στην επανενδοθηλιοποίηση. [117,18] In vivo, η

χρονική διάρκεια της αναγέννησης του ενδοθηλίου ποικίλει στα διάφορα πειραματικά μοντέλα. Στους χοίρους έχει περιγραφεί πλήρης ενδοθηλιοποίηση στις 28 ημέρες τόσο στα επικαλυμμένα όσο και στα μεταλλικά stent. [119] Στα κουνέλια παρατηρήθηκε περιορισμένη ενδοθηλιοποίηση και με την ραπαμυσίνη και με την πακλιταξέλη. [120] Αυτά τα αποτελέσματα δεν μπορούν φυσικά να εξαχθούν στο ανθρώπινο μοντέλο. Μελέτες με μη επικαλυμμένα απλά μεταλλικά stent σε ασθενείς έδειξαν ότι η ολοκλήρωση της ενδοθηλιοποίησης συμβαίνει μετά από 3-4 μήνες. [121] Επίσης νεκροτομικές μελέτες δειγμάτων στεφανιαίων αρτηριών με απλά και με επικαλυμμένα με κυταρροτοξικές ουσίες stent έδειξαν σαφή καθυστέρηση στην επανενδοθηλιοποίηση και αρτηριακή επούλωση στα δεύτερα. [112] Πρόσφατα απεικονιστική μελέτη με την βοήθεια της οπτικής συνεκτικής τομογραφίας (optical coherence tomography, OCT) επιβεβαίωσε την μη ολοκληρωμένη ενδοθηλιοποίηση επικαλυμμένων stents με ραπαμυσίνη. [122]

Δεν είναι βέβαιο αν η επανενδοθηλιοποίηση απλά συμβαίνει σε ένα καθυστερημένο στάδιο ή δεν ολοκληρώνεται καθόλου. Αυτό που είναι βέβαιο και έχει αποδεδειχθεί κλινικά είναι ότι το εκτεθειμένο αρτηριακό τοίχωμα αποτελεί υπόστρωμα για την δημιουργία θρόμβου και την απόφραξη των στεφανιαίων αρτηριών η οποία συνοδεύεται από μεγάλη θνητότητα. [123]

4. Απόπτωση και επαναστένωση.

4.1 Απόπτωση μετά από αγγειοπλαστική

Η απόπτωση, σε αντίθεση με την νέκρωση, είναι ένας προγραμματισμένος, εξειδικευμένος μηχανισμός κυταρρικού θανάτου, που οδηγεί στην απομάκρυνση μη λειτουργικών, κατεστραμμένων κυττάρων. [124] Η απόπτωση ενεργοποιείται από διάφορα

ερεθίσματα όπως βλάβες του DNA, ενδοκυττάρια βλάβες, τοξίνες, και εξοκυττάρια σήματα. [125] Αποτελεί ουσιώδη μηχανισμό για την ανάπτυξη και την κυτταρική ρύθμιση των πολυκυτταρικών οργανισμών. [126] Στο καρδιαγγειακό σύστημα, η απόπτωση έχει εμπλακεί στην ισχαιμική και ιδιοπαθή διατακτική μυοκαρδιοπάθεια, το έμφραγμα του μυοκαρδίου, την αρρυθμιογενή δυσπλασία της δεξιάς κοιλίας καθώς και σύνδρομο διαταραχής της καρδιακής ηλεκτρικής αγωγιμότητας π.χ. σύνδρομο μακρού QT. [127-130] Η απόπτωση, επίσης, έχει συσχετισθεί με την στεφανιαία νόσο αθηροσκληρηνητικής αιτιολογίας καθώς και την αρτηριοπάθεια που παρατηρείται στους μεταμοσχευθέντες ασθενείς. [131, 132] Ο αποπτωτικός θάνατος των VSMC έχει περιγραφεί σε αρκετά πειραματικά μοντέλα οξείας αρτηριακής βλάβης. [133]

Αρκετές μελέτες αποδεικνύουν ότι η αγγειακή βλάβη που προκαλείται από την αγγειοπλαστική με μπαλόνι επάγει την απόπτωση σε δύο φάσεις. Σε γενικές γραμμές, η πρώτη φάση αντιπροσωπεύει μια ταχεία έκρηξη του αποπτωτικού μηχανισμού στο μέσο χιτώνα και συμβαίνει μέσα σε λίγες ώρες από τη βλάβη, με αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση των κυττάρων του αγγειακού τοιχώματος. Μελέτες στο πειραματικό μοντέλο καρωτίδας αρουραίου έδειξε ότι η βλάβη με μπαλόνι οδηγεί σε ταχεία και σχετικά άμεση πρόκληση απόπτωσης των VSMC του μέσου χιτώνα. [134] Η έκφραση των δεικτών απόπτωσης στο μοντέλο αυτό κορυφώθηκε σε 1 ώρα μετά από τον τραυματισμό, αλλά δεν ήταν πλέον εμφανής 4 ώρες μετά. Αν και οι συνέπειες της πρώιμης εκδήλωσης της απόπτωσης στα VSMCs του μέσου χιτώνα είναι άγνωστη, θα μπορούσε να επάγει τον σχηματισμό νεοιστού σε μεταγενέστερο χρόνο προκαλώντας μεγαλύτερη επούλωση ως αντιδραστική απάντηση στην αρχική μείωση του κυτταρικού πλυθισμού του αγγειακού τοιχώματος. Επιπρόσθετα, η απελευθέρωση κυτοκινών από τα αποπτωτικά κύτταρα θα μπορούσε να ενισχύσει την υπερπλαστική αντίδραση μετά τον τραυματισμό. [135] Η δεύτερη φάση της απόπτωσης εμφανίζεται πιο όψιμα (ημέρες ή και εβδομάδες) και σε πολύ χαμηλότερη συχνότητα. Στο

μοντέλο καρωτίδας αρουραίου, η απόπτωση σε αυτή την φάση περιορίζεται στα VSMCs του αναπτυσσόμενου νεοιστού. [136] Ταχεία απόπτωση μετά από αγγειοπλαστική με μπαλόνι έχει επίσης αναφερθεί στο πειραματικό μοντέλο λαγονίου αρτηρίας κουνελιών. [136] Στην περίπτωση αυτή, η αυξημένη αναλογία μπαλονιού-αρτηρίας προκαλεί μεγαλύτερη συχνότητα απόπτωσης VSMC στην πρόωμη, ταχεία φάση, οδηγώντας σε μεγαλύτερη οξεία απώλεια κυτταρικού πλυθισμού. [137] Παραδόξως, οι αναλύσεις των αγγειακών βλαβών έχουν αποκαλύψει ότι τα VSMCs του νεοιστού είναι λιγότερο ευαίσθητα στην ταχεία φάση της απόπτωσης σε σύγκριση με τα VSMCs του μέσου χιτώνα, γεγονός που υποδηλώνει ότι η διαφοροποίηση του φαινότυπου των VSMC παίζει ρόλο στην αποπτωτική τους απάντηση στην αγγειοπλαστική. [138] Νορμοχοληστερολαιμικά και υπερχοληστερολαιμικά κουνέλια εμφανίζουν παρόμοιο προφίλ πρόωρης απόπτωσης, αλλά η υπερχοληστερολαιμία ενισχύει την απόπτωση στο νεοιστό 2 εβδομάδες μετά τον τραυματισμό. [139] Η παρατήρηση αυτή οδήγησε στην υπόθεση ότι τα μακροφάγα που βρίσκονται στις αγγειακές βλάβες των υπερχοληστερολαιμικών κουνελιών μπορούν να συμβάλουν σε αλλαγές των VSMC σε όψιμα χρονικά σημεία. Η συμμετοχή των μακροφάγων έχει επίσης εμπλακεί στην απόπτωση των VSMC μετά την εμφύτευση stent σε αρτηρίες κουνελιών. [140] Στη μελέτη αυτή η εμφύτευση stent προκάλεσε μεγαλύτερου βαθμού κυτταρικό πολλαπλασιασμό αλλά και απόπτωση στο μέσο χιτώνα σε σύγκριση με την αγγειοπλαστική με μπαλόνι. Στον νεοιστό όμως ο βαθμός απόπτωσης ήταν πολύ μεγαλύτερος μετά από εμφύτευση stent, ενώ ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός ήταν παρόμοιος και στις δύο ομάδες. Ενώ θα αναμενόταν μείωση του υπερπλαστικού νεοιστού, τα ευρήματα έδειξαν το αντίθετο. Αυτό συνέβη γιατί 1) η απόπτωση στη στοιβάδα του νεοιστού μετά την εμφύτευση stent αφορά κυρίως τα μακροφάγα και όχι τα λεία μυϊκά κύτταρα, 2) η παρουσία μακροφάγων συνδυάζεται με μηχανισμούς φλεγμονής που φαίνεται να έχουν σημαντικό ρόλο στον σχηματισμό νεοιστού και 3) η απόπτωση μακροφάγων πιθανώς να επιτρέπει την συσσώρευση εξωκυττάριας

ουσίας. Συμπερασματικά ο ρόλος της απόπτωσης στο σχηματισμό νεοιστού δεν είναι απόλυτα ξεκάθαρος αν και βρέθηκε ότι, χορηγούμενοι τοπικά, αντιαποπτωτικοί παράγοντες μείωσαν την υπερπλασία νεοιστού σε αρτηρίες κουνελιών. [141] Στην επιλογή παραγόντων που επιδρούν στο μηχανισμό της θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ότι συμβαίνει σε διάφορους κυτταρικούς τύπους, χρονικά επίπεδα και αγγειακά τμήματα.

4.2 Hsp70 και απόπτωση

Τις τελευταίες δεκαετίες η εκτεταμένη έρευνα των μηχανισμών της απόπτωσης οδήγησε στην ανακάλυψη πρωτεϊνών που προάγουν τον μη ελεγχόμενο κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω της αναστολής της απόπτωσης. Σε αυτές ανήκει και το μέλος της οικογένειας των 70-kDa πρωτεϊνών θερμικής προσβολής (heat shock proteins, Hsp), Hsp70. [142] Τα κύτταρα που υπερεκφράζουν την Hsp70 παρουσιάζουν αυξημένη αντίσταση στους αποπτωτικούς παράγοντες όπως το νιτροπρωσικό νάτριο και η ταξόλη. [143] Επίσης μελέτες έδειξαν ότι οι ιδιότητες επιβίωσης της Hsp70 αυξάνουν την αντίσταση διαφόρων ειδών κυττάρων στην κυτταροτοξική δράση πολλών αποπτωτικών παραγόντων. [144,145] Αυτές οι παρατηρήσεις οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η επαγωγή της Hsp70 από φαρμακευτικούς παράγοντες πιθανόν να αποτελεί μειονέκτημα στην αποπτωτική και κυτταροτοξική τους δράση.

5. Πειραματικά μοντέλα επαναστένωσης

Αν και τα πειραματικά μοντέλα έχουν δώσει σημαντικές πληροφορίες και γνώσεις για τον μηχανισμό της επαναστένωσης, υπάρχουν αρκετές και σημαντικές διαφορές στους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς μεταξύ των πειραματόζωων και του ανθρώπινου μοντέλου.

Μέχρι τώρα δεν υπάρχουν πειραματικά μοντέλα που να αναπαράγουν πιστά τον μηχανισμό αντίδρασης στον αρτηριακό τραυματισμό σε σύγκριση με τις ανθρώπινες αρτηρίες. Για παράδειγμα τα ζωικά μοντέλα παρουσιάζουν μια υπερπλαστική αντίδραση στον τραυματισμό με χαμηλή περιεκτικότητα σε κολλαγόνο ενώ οι ανθρώπινες βλάβες εμφανίζουν υποκυτταρική αντίδραση πλούσια όμως σε κολλαγόνο και εξωκυττάρια ουσία. [146]

Δεύτερον υπάρχουν πολύ λίγα δεδομένα για μετανάστευση των κυττάρων του μέσου ή του έξω χιτώνα σε ανθρώπινες βλάβες. Τέλος ελάχιστα μοντέλα εμφανίζουν τον μηχανισμό αναδιαμόρφωσης ως απάντηση στον τραυματισμό. Πράγματι αναδιαμόρφωση παρατηρείται μόνο στα μεγάλα ζωικά μοντέλα, όπως οι χοίροι και τα πρωτεύοντα θηλαστικά [106, 147, 148] ενώ ίσως να μην αποτελεί τον κύριο λόγο επαναστένωσης σε μη υγιείς αρτηρίες κουνελιών. [149-151] Μια άλλη σημαντική διαφορά έγκειται στη σύγκριση του μηχανισμού επούλωσης του αρτηριακού τοιχώματος μετά από τοποθέτηση stent. Μορφομετρικές αναλύσεις έδειξαν ότι η μεγίστη ανάπτυξη νεοιστού σε ανθρώπινες αρτηρίες συμβαίνει μεταξύ έξι και δώδεκα μηνών με 22% υποστροφή μετά από ένα χρόνο ενώ σε αρτηρίες χοίρων αυτό συμβαίνει στον πρώτο μηνά με 25% υποστροφή στους επόμενους τρεις με έξι μήνες. [152] Η παραδοχή αυτή είναι ουσιώδης για την αξιολόγηση ολόκληρου του φάσματος των υποψηφίων θεραπευτικών μεθόδων κατά της επαναστένωσης. Το άλλο σημαντικό μειονέκτημα των πειραματικών μοντέλων είναι ότι σε πολλές περιπτώσεις έχουν αποτύχει στην πρόβλεψη θεραπευτικής επιτυχίας μεθόδων κατά της επαναστένωσης, μια θεμελιώδης προϋπόθεση για κάθε πειραματικό μοντέλο. Υπάρχει ένας σημαντικός αριθμός πειραματικών μελετών με φαρμακευτικούς παράγοντες που ενώ έδειξαν να μειώνουν το σχηματισμό νεοιστού ή να αυξάνουν την επιφάνεια του αυλού, δεν αναπαρήγαγαν τα ίδια αποτελέσματα στο ανθρώπινο μοντέλο. Κατά γενική συναίνεση όμως μολονότι δεν υπάρχουν ζωικά πειραματικά μοντέλα που να αποτελούν πιστά αντίγραφα της ανθρώπινης αγγειακής νόσου, οι διάφορες φάσεις της αντίδρασης στον αγγειακό τραυματισμό παρουσιάζουν αρκετές

ομοιότητες. Υπάρχουν καλά μελετημένα μοντέλα στα οποία οι διάφορες αντιδράσεις και συμπεριφορές που προκαλούν οι υπό μελέτη συσκευές μπορούν να ερμηνευτούν. Μέχρι σήμερα οι υγιείς στεφανιαίες αρτηρίες χοίρων και οι λαγόνιες αρτηρίες κουνελιών έχουν κριθεί ως οι πιο κατάλληλες για την μελέτη των διαφόρων εφαρμογών κατά της επαναστένωσης. [153]

6. Κυτταρικός κύκλος στην επαναστένωση

Τις δυο τελευταίες δεκαετίες η θεραπευτική στρατηγική κατά της επαναστένωσης βίωσε σημαντικές αλλαγές αφού η μηχανική προσέγγιση κρίθηκε ως υπεραπλουστευμένη για να αντιμετωπίσει τον πολύπλοκο μηχανισμό της επαναστένωσης. Κύριο στόχο της νέας στρατηγικής αποτέλεσε η κυτταρική υπερπλασία και τα διάφορα στάδια του κυτταρικού κύκλου. Όπως έχει αναφερθεί κάτω από φυσιολογικές συνθήκες τα λεία μυϊκά κύτταρα του μέσου χιτώνα βρίσκονται αδρανή στη φάση G0 του κυτταρικού κύκλου. Μετά από αγγειακό τραυματισμό ή διέγερση από αυξητικούς παράγοντες τα κύτταρα εισέρχονται στη φάση G1. Η προαγωγή του κυτταρικού κύκλου μέσω της φάσης G1 ρυθμίζεται από μια οικογένεια πρωτεϊνών, τις κυκλίνες (cyclins) και τις εξαρτώμενες στις κυκλίνες κινάσες (CDKs). Η πρόοδος του κύκλου εξαρτάται από την φωσφορυλίωση και αποφωσφορυλίωση των CDKs και την παρουσία συγκεκριμένων αναστολέων ή ρυθμιστών της δράσης των CDKs. Οι αναστολείς των CDKs αποτελούν σημαντικούς αρνητικούς ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου αναστέλλοντας την συσσώρευση και δράση του συμπλέγματος κυκλίνης/CDK. Στα θηλαστικά υπάρχουν δυο ομάδες αναστολέων των CDK (CDKI): η οικογένεια των INK4 (p15,16,18,19) η οποία είναι ειδική για το σύμπλεγμα CDK4/cyclin D και η οικογένεια CIP/KIP (p21,27) η οποία επάγεται από το p53. [154] Η p27 είναι ένας αναστολέας με

σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της μετάβασης από τη φάση G1 στην S, ένα βασικό σημείο για την προαγωγή του κυτταρικού κύκλου. [155]

Ένας άλλος ρυθμιστής-κλειδι για τον κυτταρικό κύκλο είναι η πρωτεΐνη που παράγεται από το γονίδιο του ρετινοβλαστώματος (pRB), του πρώτου κατασταλτικού γονιδίου των όγκων (tumor suppressor gene) που απομονώθηκε και μελετήθηκε. Η pRB είναι μια πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη, η οποία δρα ως αρνητικός ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 καταστέλλοντας την αντιγραφή των γονιδίων που απαιτούνται για την μετάβαση από τη φάση G1 στην φάση S. Ένας μείζον κυτταρικός στόχος της pRB είναι η οικογένεια των παραγόντων αντιγραφής E2F. Για να προχωρήσουν τα κύτταρα μέσω των φάσεων G1 και S απαιτείται απενεργοποίηση της pRB μέσω φωσφορυλίωσης. Αυτό γίνεται μέσω των συμπλεγμάτων cyclin/CDK τα οποία αυξάνοντας την δράση τους, προκαλούν περαιτέρω φωσφορυλίωση της pRB και απελευθέρωση E2F προάγοντας τον κύκλο στη φάση S. [156]

Επιπρόσθετα οι παράγοντες αντιγραφής GAX και GATA-6 σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο των αγγειακών λειών μυϊκών κυττάρων, επάγοντας την έκφραση της p53 και αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό τους. [157, 158] Όλοι οι παραπάνω ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου αποτελούν ελκυστικούς θεραπευτικούς στόχους αφού μελέτες σε πειραματικά μοντέλα έχουν δείξει αυξημένη δράση των κυκλινών, CDKs και CDKIs μετά από αγγειακό τραυματισμό. [159, 160] Οι ερευνητές εστίασαν το ενδιαφέρον τους σε ουσίες οι οποίες στοχεύουν άμεσα ή έμμεσα σε μόρια και πρωτεΐνες του κυτταρικού κύκλου.

7. Πρόληψη της επαναστένωσης

Ένα πλήθος φαρμακευτικών ουσιών και μηχανικών συσκευών έχουν δοκιμαστεί έως σήμερα. Ορισμένες από αυτές απέτυχαν σε πειραματικό επίπεδο, ενώ άλλες δεν κατάφεραν να επιβεβαιώσουν τα καταρχήν ενθαρρυντικά τους πειραματικά αποτελέσματα τους σε κλινικές μελέτες. Θεραπείες όπως η βραχυθεραπεία καθώς και η συστηματική χορήγηση φαρμακευτικών ουσιών όπως η προβουκόλη και η τρανιλάστη έδειξαν θετικά αποτελέσματα σε μικρές μελέτες ασθενών αλλά δεν κατάφεραν να αναπαράγουν τα ίδια αποτελέσματα σε μεγαλύτερες και πιο οργανωμένες μελέτες αποτυγχάνοντας να παγιωθούν ως αντιεπαναστενωτικές θεραπείες. [161-164] Η επικάλυψη της επιφανείας των stent με άλλα υλικά ώστε να μεταβληθούν τα χαρακτηριστικά βιοσυμβατότητας του μετάλλου αποτέλεσε επίσης μία ορθολογική προσέγγιση. Γαλβανισμός, ψεκασμός, εμβύθιση και παλμική ιοντική επιμετάλλωση αποτελούν μερικές από τις τεχνικές που έχουν χρησιμοποιηθεί.[165-168] Τα υλικά επικάλυψης διακρίνονται σε 4 κατηγορίες: ανόργανα υλικά, ενδοθηλιακά κύτταρα, συνθετικά και βιολογικά πολυμερή και πορώδη μέταλλα. Τα δύο πρώτα χρησιμοποιήθηκαν αποκλειστικά σαν υλικά επικάλυψης ενώ τα πολυμερή εκτός από υλικά επικάλυψης, χρησιμοποιούνται και ως αποκλειστικό υλικό κατασκευής stent. Ενώ αρχικά όλα τα παραπάνω υλικά χρησιμοποιήθηκαν για την βελτίωση της βιοσυμβατότητας των stent, στη συνέχεια κυρίως τα πολυμερή αποτέλεσαν τις πλατφόρμες μεταφοράς και ελεγχόμενης αποδέσμευσης φαρμακευτικών ουσιών. Πράγματι η επινόηση της μεταφοράς και τοπικής απελευθέρωσης φαρμακευτικών ουσιών αντιμετωπίστηκε σαν ιδανική μέθοδος για την θεραπεία μιας τόσο εντοπισμένης νόσου όπως η επαναστένωση. [169] Η παρατεταμένη, τοπική θεραπευτική επίδραση βασίστηκε στην τοποθέτηση της φαρμακευτικής ουσίας στην επιφάνεια του stent είτε απευθείας [170] είτε με την βοήθεια ενός πολυμερούς που εξασφαλίζει την προοδευτική απελευθέρωση της τοποθετημένης θεραπευτικής ουσίας σε

προκαθορισμένη χρονική περίοδο και με προκαθορισμένο ρυθμό. [171,172] Αυτό εξασφαλίζει πρώτον εστίαση της δράσης του φαρμάκου στον ιστό-στόχο και δεύτερον υψηλές δόσεις χωρίς τις παρενέργειες της συστηματικής χορήγησης. Παράμετροι όπως η επιφάνεια του stent, ο τύπος του πολυμερούς, ο τρόπος δέσμευσης, η διαλυτότητα και η δυνατότητα ιστικής δέσμευσης της ουσίας αλληλεπιδρούν μεταξύ τους καθορίζοντας την τοπική συγκέντρωση, την ιστική ανακατανομή και την τελική επίδραση του φαρμάκου.

Τα πολυμερή κατηγοριοποιούνται σε σταθερά (μη βιοδιασπώμενα) και σε βιοδιασπώμενα. [172] Τα πρώτα είναι και αυτά που χρησιμοποιήθηκαν στις πρώτες γενιές επικαλυμμένων stent. Πρόκειται για πολυμερή που δεν διασπώνται στον οργανισμό και παραμένουν μόνιμα πάνω στο stent. Πλεονέκτημα των πολυμερών αυτών είναι η καλύτερη μηχανική συμπεριφορά τους και η σχετικά ομοιόμορφη κατανομή του φαρμάκου. Μειονεκτήματα είναι α) η μηχανική καταστροφή τους με την πάροδο του χρόνου που μπορεί να έχει απρόβλεπτες συνέπειες μεταξύ των οποίων και η απελευθέρωση τυχόν υπολειμματικού φαρμάκου σε χρόνο που δεν χρειάζεται και β) η πιθανή χρόνια φλεγμονή που έχει ως αποτέλεσμα την όψιμη επαναστένωση και την πολύ όψιμη θρόμβωση του stent. [112, 173] Πιο πρόσφατες μελέτες πάντως έδειξαν ότι τα επικαλυμμένα stents με βιοσταθερά πολυμερή είναι ασφαλή τουλάχιστον όσο και τα μεταλλικά stent. [174-176] Η απελευθέρωση του φαρμάκου στα σταθερά πολυμερή γίνεται με επιφανειακή απελευθέρωση ή με διάχυση μέσω πόρων. Ο ρυθμός της διάχυσης καθορίζεται από τη δομή και τη φύση του πολυμερούς, την ύπαρξη υπερκείμενου στρώματος επικάλυψης (top coat), την αναλογία μάζας φαρμάκου – πολυμερούς και τη χημική φύση φαρμάκου και πολυμερούς. [177] Τα βιοδιασπώμενα πολυμερή, χαρακτηρίζονται συνήθως από αιθερικό δεσμό μεταξύ των μονομερών τους, κάτι που τα καθιστά ικανά να υποστούν διάσπαση στον οργανισμό. Το βασικό θεωρητικό πλεονέκτημα των βιοδιασπώμενων πολυμερών είναι η διάσπαση τους μετά την μεταφορά του φαρμάκου και η παραμονή μόνο του μεταλλικού stent. Μειονεκτήματα των βιοδιασπώμενων

πολυμερών είναι η συνήθως κατώτερη μηχανική συμπεριφορά τους και η πιθανότητα πρόκλησης φλεγμονής από το υλικό που απελευθερώνεται τοπικά με τη διάσπαση. Στην περίπτωση των βιοδιασπώμενων πολυμερών κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν την απελευθέρωση του φαρμάκου είναι η αναλογία μάζας πολυμερούς και φαρμάκου και ο ρυθμός διάσπασης του βιοδιασπώμενου πολυμερούς.[177]

Υπάρχουν αρκετές τεχνικές για την εναπόθεση φαρμακευτικών ουσιών στις ενδοαγγειακές προθέσεις και για την απελευθέρωση του φαρμάκου ή των φαρμάκων. Η απλούστερη τεχνική περιλαμβάνει την εμβάπτιση του στεντ σε διάλυμα του φαρμάκου σε κατάλληλο διαλύτη και εξάτμιση του διαλύτη.[178] Με την τεχνική αυτή παράγονται stent χωρίς ομοιόμορφη κατανομή του φαρμάκου. Επιπλέον δεν υπάρχει κάποια σταθερή σύνδεση του φαρμάκου με το stent και για το λόγο αυτό το φάρμακο είναι δυνατό να απομακρυνθεί πριν την εμφύτευση, κατά την τοποθέτηση του στεντ στον καθετήρα, κατά τη διαδικασία αποστείρωσης ή κατά τη διάρκεια της εμφύτευσης. Επιπλέον μετά την εμφύτευση η απελευθέρωση του φαρμάκου είναι ταχύτατη. Όλες οι παραπάνω μέθοδοι επικάλυψης των stent έχουν δοκιμαστεί σε πειραματόζωα και πιλοτικές μελέτες ασθενών. Μερικά από αυτά τα υλικά έδειξαν μείωση της υπερπλασίας του νεοιστού και της φλεγμονής σε πειραματικά μοντέλα χωρίς όμως τα αποτελέσματα αυτά να επαληθευθούν σε κλινικές μελέτες.[178-181] Τα πολυμερή παρουσίασαν αντικρουόμενα αποτελέσματα [182-185] ενώ σε μερικές περιπτώσεις προκληθήκαν σοβαρές ιστικές αντιδράσεις. [186] Άλλες επικαλύψεις όπως αδρανή πολυμερή [187] η φωσφορυλοχολίνη [188,189] και η ηπαρίνη [190-192] παρουσίασαν μείωση της οξείας/υποξείας θρόμβωσης του stent και πιθανόν ανασταλτική επίδραση στο νεοσχηματιζόμενο ιστό (επαναστένωση). [Η περαιτέρω ανάπτυξη βιοαποδομήσιμων και μη βιοαποδομήσιμων πολυμερών επέτρεψαν την μεταφορά και απελευθέρωση της ουσίας χωρίς να προκαλείται ιστική αντίδραση και οδήγησε στην πειραματική και κλινική αξιολόγηση μιας μεγάλης ποικιλίας φαρμακευτικών ουσιών όπως

κυτταροστατικών (ραπαμυσίνη, μυκοφενολικό οξύ), αντιφλεγμονωδών (κορτικοστεροειδή, τρανιλάστη), αντιμιτωτικών (πακλιταξέλη, αγγειοπεπτίνη, ακτινομυσίνη), αντιθρομβωτικών (ιρουδίνη, ιλοπρόστη), αναστολέων των μεταλλοπρωτεϊνών (μπατιμαστάτη) και προαγωγών της ενδοθηλιοποίησης (οιστραδιόλη). Αρκετά χρόνια πριν ο Aggarwal και συν. ανακοίνωσαν τα αποτελέσματα ενός επικαλυμμένου stent με κυτταρικό πολυμερές και απελευθέρωση αντισωμάτων κατά των γλυκοπρωτεϊνικών υποδοχέων IIb/IIIa των αιμοπεταλίων τα οποία τοποθετήθηκαν σε λαγόνιες αρτηρίες κουνελιών και απέτυχαν να περιορίσουν το μέσο πάχος του νεοιστού στις είκοσι οχτώ ημέρες. [193] Ο Alt και συν. ανακοίνωσαν την μείωση του νεοιστού και την αύξηση της επιφάνειας του αυλού στις είκοσι οχτώ ημέρες με την τοποθέτηση επικαλυμμένων Palmaz-Schatz stents με πολυλακτικό οξύ, ένα βιοσυμβατό και βιοαποδομήσιμο υλικό, και συνδυασμό ιρουδίνης και ιλοπρόστης σε αρτηρίες προβάτων και χοίρων.[194] Άλλες ουσίες όπως η δεξαμεθαζόνη, [195, 196] και η οιστραδιόλη, [197,198] παρουσίασαν θετικά αποτελέσματα τόσο σε πειραματικές όσο και σε κλινικές μελέτες. Οι πρώτες ουσίες όμως που επέδειξαν αποτελεσματικότερο και ασφαλέστερο προφίλ και οι οποίες έχουν επικρατήσει στην κλινική πράξη είναι η ραπαμυσίνη και η πακλιταξέλη. [199-201]

Η ραπαμυσίνη είναι ένας ανοσοκατασταλτικός και κυτταροστατικός παράγοντας που μέσω της δέσμευσης του στην ενδοκυττάρια πρωτεΐνη υποδοχέα FKBP12, αυξάνει τα επίπεδα της p27 οδηγώντας στην αναστολή του συμπλέγματος cyclin/CDK και την στάση του κυτταρικού κύκλου στην όψιμη φάση G1. [202] Η πακλιταξέλη είναι ένας αντινεοπλαστικός παράγοντας που προκαλεί σταθεροποίηση των μικροσωληναρίων και αποτρέπει την επαναδιοργάνωση του δικτύου τους που είναι σημαντική για την μίτωση. Αυτό προκαλεί στάση του κυτταρικού κύκλου στην φάση M και αναστολή της υπερπλασίας και μετανάστευσης των λείων μυϊκών κυττάρων. [203] Επιπρόσθετα τόσο το υδροφοβικό όσο και το λιποφίλικό της προφίλ συνεισφέρουν στην μειωμένη απώλεια της στην αιματική ροή, την

αυξημένη ιστική της δέσμευση και την διατήρηση της βιολογικής της επίδρασης στον θεραπευτικό στόχο. [203] Πρόσφατα άλλες ουσίες, κυρίως παράγωγα της ραπαμυσίνης όπως το zotarolimus και το everolimus έδειξαν παρόμοια θετικά αποτελέσματα σε μεγάλες πολυκεντρικές κλινικές μελέτες και χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη. [204, 205] Παρά την πρόοδο που παρατηρήθηκε τα τελευταία χρόνια στον σχεδιασμό τόσο της πλατφόρμας που μεταφέρει τις φαρμακευτικές ουσίες (πολυμερή, σχεδιασμός stent) όσο και στις ουσίες που χρησιμοποιούνται για την τοπική θεραπεία της επαναστένωσης, μέσο- και μακροπρόθεσμα δεδομένα από μελέτες προβάλλουν αμφιβολίες για την ασφάλεια αυτών των συστημάτων. Κύρια αιτία αποτελεί η όψιμη θρόμβωση πιθανά λόγω της περιορισμένης επανενδοθηλιοποίησης που προκαλείται ως αποτέλεσμα της τοπικής θεραπείας με τις παραπάνω ουσίες. [206]

8. Χαρακτηριστικά της D-24851 και πιθανός ρόλος της στην επαναστένωση

Η D-24851 (indibulin) είναι μια νέα συνθετική ουσία η οποία προκαλεί αποσταθεροποίηση των μικροσωληναρίσκων και στάση του κυτταρικού κύκλου στην φάση G2-M. [207] Οι υποδοχείς δέσμευσης της D-24851 είναι διαφορετικοί από αυτούς άλλων γνωστών αποσταθεροποιητών της τουμπουλίνης όπως η βινκριστίνη και η κολχικίνη. [207] Συγκρινόμενη με άλλους παράγοντες με παρόμοια δράση όπως η πακλιταξέλη, η D-24851 έδειξε ανώτερες αντιυπερπλαστικές ιδιότητες σε μη τοξικές δόσεις. [207] Επίσης λόγω του υδροφοβικού και λιποφιλικού της προφίλ, αναμένεται να έχει μικρότερες απώλειες στην αιματική ροή κατά την μεταφορά και τοπική της χορήγηση καθώς και παρατεταμένη ιστική

δέσμευση και επομένως δράση. [170] Με τα δεδομένα αυτά υποθέσαμε ότι η D-24851 μπορεί να λειτουργήσει θετικά ως αναστολέας της επαναστένωσης.

Σκοπός της μελέτης

Η επαναστένωση παραμένει το κυριότερο πρόβλημα μετά από διαδερμικές ενδοαγγειακές επεμβάσεις. Η πρόοδος της τεχνολογίας και η χρήση των stent αντιμετώπισε με επιτυχία πολλούς από τους μηχανισμούς αυτής της διεργασίας. Η δημιουργία νεοιστού θεωρείται σήμερα η σημαντικότερη διεργασία που συμβάλλει στην επαναστένωση του αρτηριακού αυλού μετά από τοποθέτηση stent. Οι μηχανισμοί που συμμετέχουν στη δημιουργία του νεοιστού είναι πολλοί και ποικίλες φαρμακευτικές ουσίες έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι σήμερα στοχεύοντας στην αναστολή της υπερπλασίας και μετανάστευσης των λείων μυϊκών κυττάρων, στην μείωση της φλεγμονής, στην αναγέννηση του ενδοθηλίου κ.α.

Όλα τα παραπάνω μας οδήγησαν στον σχεδιασμό αυτής της πειραματικής ερευνητικής μελέτης σκοποί της οποίας είναι:

1. In vitro αξιολόγηση των αντιυπερπλαστικών και αποπτωτικών ιδιοτήτων της D-24851 με απώτερο σκοπό τον προσδιορισμό πλεονεκτημάτων της παραπάνω ουσίας σε σύγκριση με φαρμακευτικές ουσίες που ήδη έχουν δοκιμαστεί στην πράξη.
2. Υποθέτουμε ότι αν η D-24851 εμφανίζει ισχυρότερο αντιεπαναστενωτικό προφίλ, θα μπορούσε να μειώσει την δημιουργία νεοιστού και την επαναστένωση περιορίζοντας ταυτόχρονα την δόσοεξαρτώμενη τοξική επίδραση του φαρμάκου στην αναγέννηση του ενδοθηλίου

3. Προσδιορισμός του βαθμού ενδοθηλιοποίησης με την βοήθεια ηλεκτρονικού σαρωτικού μικροσκοπίου η οποία επιτρέπει τον ακριβή ποιοτικό και ποσοτικό υπολογισμό του, αντίθετα με προηγούμενες μελέτες στη βιβλιογραφία, στις οποίες οι μετρήσεις έγιναν με φωτονικό μικροσκόπιο και είναι ημιποσοτικές και εξαρτώμενες από τον εκάστοτε παρατηρητή.
4. Προσδιορισμός του βαθμού επαγωγής της Hsp70 από την D-24851
5. Δημιουργία stents επικαλυμμένων με πολυμερή ουσία και διάφορες δόσεις της D-24851 και αξιολόγηση της ασφάλειας και αποτελεσματικότητας αυτού του συστήματος σε ένα πειραματικό μοντέλο λαγόνιας αρτηρίας κουνελιού.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Υλικά και μέθοδοι

1.1 Ομάδες επικαλυμμένων stents και τρόπος κατασκευής τους

Ενδοαγγειακές προσθέσεις από ανοξείδωτο ασάλι, εκπτυσσόμενες με την βοήθεια μπαλονιού, μήκους 9 χιλιοστών (Medispes SW AG, Zug, Switzerland), επικαλύφθηκαν είτε με μια λεπτή μεμβράνη πολυμερούς (poly(DL-lactide-co-glycolide), (PLGA), είτε με συνδυασμό πολυμερούς και διαφόρων συγκεντρώσεων D-24851.

Η διαδικασία επικάλυψης αποτελεί πνευματική ιδιοκτησία της εταιρείας Medispes και οι λεπτομέρειές της δεν αποκαλύφθηκαν από την εταιρεία. Συνοπτικά η τεχνική περιλαμβάνει την παρασκευή διαλυμάτων που περιέχουν το πολυμερές και το φάρμακο σε κατάλληλες αναλογίες και την επικάλυψη του stent με μια ειδική τεχνική με το διάλυμα και στη συνέχεια την εξάτμιση του διαλύτη.

Κατασκευάστηκαν επικαλυμμένα stents με D-24851 με τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις: χαμηλής δόσης, [low dose (LD), $0.08 \pm 0.0025 \mu\text{M}$ ($31 \pm 1 \mu\text{g}$)], υψηλής δόσης, [high dose (HD), $0.55 \pm 0.02 \mu\text{M}$ ($216 \pm 8 \mu\text{g}$)] και πολύ υψηλής δόσης [extreme dose (ED), $4.55 \pm 0.1 \mu\text{M}$ ($1774 \pm 39 \mu\text{g}$)].

Το συνολικό βάρος του συνδυασμού πολυμερούς και φαρμάκου σε κάθε stent ήταν $2.0 \pm 0.2 \text{ mg}$ στα LD και HD και 3.0 ± 0.1 στα ED. Το πάχος της επικάλυψης προσδιορίστηκε με την χρήση στερεομικροσκοπίου και η μάζα της με βαρυμετρική ανάλυση δηλαδή ζύγισμα του stent πριν και μετά την επικάλυψη.

Στα πλαίσια τυπικών διαδικασιών ποιότητας της εταιρείας, όλα τα stent υποβλήθηκαν κατά τη διάρκεια της διαδικασίας παρασκευής τους σε ενδελεχείς ελέγχους για την ακεραιότητα της επικάλυψης και την ορθότητα της τοποθέτησης στον καθετήρα. Η σταθερότητα της επικάλυψης δοκιμάστηκε με συνδυασμό τεχνικών. Αρχικά επικαλυμμένα stent εκπύχθηκαν με μπαλόνι είτε στεγνά είτε μετά την εμβύθισή τους σε φυσιολογικό ορό

για 30 δευτερόλεπτα. Ακολούθησε παρατήρηση των stent με οπτικό μικροσκόπιο και εκτίμηση της ακεραιότητας της επικάλυψης. Για περαιτέρω εκτίμηση της επικάλυψης, στο διάλυμα φαρμάκου και πολυμερούς που χρησιμοποιήθηκε, προστέθηκε σε μικρή συγκριτικά αναλογία φθορίζουσα ουσία και έγινε επικάλυψη των stent. Τα stent που παράχθηκαν με τον τρόπο αυτό εκπύχθηκαν στεγνά και μετά από εμβύθιση σε ορό όπως προαναφέρθηκε και εξετάστηκε η ακεραιότητα της επικάλυψης σε μικροσκόπιο φθορισμού με τη χρήση προσπίπτουσας ακτινοβολίας διέγερσης κατάλληλου μήκους κύματος. Η τεχνική αυτή επιτρέπει τη διαπίστωση μικρής κλίμακας ελαττωμάτων στη μάζα και την επιφάνεια της επικάλυψης.

Τα stents τοποθετήθηκαν σε καθετήρες αγγειοπλαστικής (Medispes SW AG Zug, Switzerland) και αποστειρώθηκαν με αέριο αιθυλενοξειδίο (οξιράνιο). Η αποστείρωση με αιθυλενοξειδίο είναι μια από τις κύριες μεθόδους αποστείρωσης ιατροτεχνολογικών προϊόντων. Κύρια πλεονεκτήματά της είναι το σχετικά μικρό κόστος της εγκατάστασης και μειονεκτήματα ο απαιτούμενος χρόνος αποστείρωσης και η ανάγκη αερισμού για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων του αιθυλενοξειδίου τα οποία είναι τοξικά. Έχει αποδειχθεί πως η απομάκρυνση του αιθυλενοξειδίου ακολουθεί εκθετικό ρυθμό. Για την απομάκρυνση του αιθυλενοξειδίου στα stent της μελέτης, τα συστήματα καθετήρων-stent τοποθετήθηκαν σε ειδικούς βιομηχανικούς θαλάμους αερισμού για 6 ημέρες υπό ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας.

Σε στατιστικά επαρκή αριθμό δειγμάτων από τα αποστειρωμένα και αερισμένα stent, έγινε έλεγχος των υπολειμμάτων του αιθυλενοξειδίου με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας. Τα συστήματα καθετήρων-stent τεμαχίστηκαν και εκχυλίστηκαν με νερό στους 37°C για 24 ώρες. Στο εκχύλισμα προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του αιθυλενοξειδίου με αέρια χρωματογραφία και δειγματοληψία από το υπερκείμενο χώρο (head space gas chromatography). 2 mL εκχυλίσματος τοποθετήθηκαν σε ειδικό φιαλίδιο 10mL με ελαστικό

πώμα (septum) και έγινε δειγματοληψία με αυτόματο δειγματολήπτη του υπερκείμενου χώρου από το διάλυμα. Χρησιμοποιήθηκε σύστημα αέριας χρωματογραφίας HP 5890 με στήλη Poropak QS 80/100 mesh 6ft και η ανίχνευση έγινε με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (Flame ionization detector, FID). Η μέθοδος ήταν γραμμική για την περιοχή 0,1 – 50 ppm ($R^2=0.999$). Το όριο ανίχνευσης (detection limit) της μεθόδου ήταν 0.03ppm και το όριο ποσοτικής μέτρησης (quantitation limit) 0.04ppm. Η ανάλυση των υδατικών εκχυλισμάτων των συστημάτων καθετήρων-stent μετά από 6 ημέρες αερισμού με αέρια χρωματογραφία, έδειξε σε όλες τις περιπτώσεις πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις αιθυλενοξειδίου και σε κάθε περίπτωση κάτω από τα αποδεκτά σύμφωνα με τους εθνικούς και διεθνείς κανονισμούς όρια.

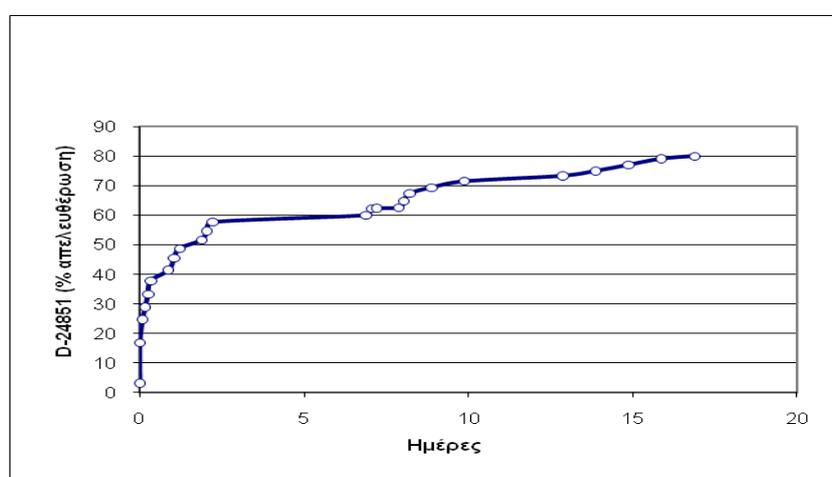
Τα επικαλυμμένα stent παρέμειναν σταθερά για τουλάχιστον 3 μήνες, αποθηκευμένα και σφραγισμένα σε θερμοκρασία δωματίου με αφυγραντική ουσία. Η εξέταση τους μετά από τρεις μήνες με οπτικό μικροσκόπιο και παρατήρηση της κινητικής αποδέσμευσης δεν έδειξε μηχανικές ή χημικές αλλοιώσεις.

Η κινητική της αποδέσμευσης του φαρμάκου από τα επικαλυμμένα stent έγινε με εμβάπτιση των stent σε ανθρώπινο ορό και μέτρηση του φαρμάκου που απελευθερώνονταν με χρήση Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC). Επικαλυμμένα stent βυθίστηκαν διαδοχικά σε ποσότητες 0,25 mL αποσταγμένου ύδατος στους 37°C. Σε τακτά χρονικά διαστήματα το κάθε stent απομακρύνονταν από το διάλυμα και μεταφέρονταν σε νέα ποσότητα ύδατος του ίδιου όγκου. Το διάλυμα από το οποίο απομακρύνθηκε το stent φυλάγονταν στους -40°C μέχρι να αναλυθεί με HPLC για την περιεκτικότητά του σε φάρμακο. Η μεταφορά του stent στην επόμενη ποσότητα ύδατος έγινε τις δύο πρώτες φορές σε χρονικά διαστήματα 12 ωρών και στη συνέχεια 24 ωρών μέχρι τις 9 ημέρες. Τα διαλύματα όγκου 0,25mL προς ανάλυση αναμείχθηκαν με 0.75 mL υγρή φάση χρωματογραφίας (78% ακετονιτρίλιο σε νερό με ρυθμιστικό οξικού αμμωνίου 0,25mM pH 6.5) και έγινε μέτρηση στην HPLC. Η υγρή

χρωματογραφία πραγματοποιήθηκε σε συσκευή Waters με ισοκρατική έκλυση σε στήλη C₁₈ 250x4 mm, 5μm και ανίχνευση στα 345 nm.

Η απελευθέρωση του φαρμάκου ήταν ταχεία αρχικά, με τη μεγαλύτερη ποσότητα του φαρμάκου να απελευθερώνεται στις 4 πρώτες ημέρες και στη συνέχεια βραδύτερη απελευθέρωση που έφθανε σε ένα όριο μεταξύ 6 και 9 ημερών (Εικόνα 1)

Εικόνα 1.



Καμπύλη απελευθέρωσης της D-24851 όπως προέκυψε με την μέθοδο της HPLC.

1.2 In vitro μελέτες της D-24851

1.2.1 Προσδιορισμός της αντιπολλαπλασιαστικής και αντιαποπτωτικής δράσης της D-24851.

Κυτταρικές σειρές και συνθήκες καλλιέργειας: Κύτταρα C2 καλλιεργήθηκαν σε DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) με 10% FCS (Fetal Calf Serum – ορός εμβρύου μόσχου) και συλλέχθηκαν πριν φτάσουν σε 80% συρροή έτσι ώστε να παραμείνουν σε αδιαφοροποίητο στάδιο.

Αντιδραστήρια και δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας: Για τις καμπύλες δόσης-απόκρισης αξιολογήθηκαν οι ουσίες ραπαμυκίνη (A.G.Scientific, Inc.), γλουφωσφαμίδη (ASTA Medica) και D-24851 σε μια *in vitro* φαρμακολογική δοκιμασία, σύμφωνα με πρωτόκολλο που έχει περιγραφεί στην βιβλιογραφία. [208] Εν συντομία, κύτταρα C2 καλλιεργήθηκαν σε πλάκες 96 οπών (1×10^4 κύτταρα ανά οπή σε 100 μ l) και διατηρήθηκαν σε μέσο χωρίς ορό για 48 ώρες. Στη συνέχεια, προστέθηκε στην κυτταροκαλλιέργεια κατάλληλη ποσότητα διαλύματος που περιείχε έναν από τους τρεις παράγοντες (ραπαμυκίνη, γλουφωσφαμίδιο ή D-24851). Μετά από επώαση 24 ωρών, το θρεπτικό υλικό της κυτταροκαλλιέργειας αντικαταστάθηκε με DMEM που περιείχε 10% FCS και την προς μελέτη ουσία στην ίδια συγκέντρωση με την αρχική.

Για τη μέτρηση της σύνθεσης του DNA, προστέθηκε στην καλλιέργεια [3 H-μέθυλ]-θυμιδίνη (2.5 μ Ci/ml), PerkinElmer/NEN ειδικής δραστηριότητας 6.7 μ Ci/mmol), 12 ώρες μετά την προσθήκη του FCS. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν στις 36 ώρες, πάνω σε διηθητικό χαρτί με γυάλινες ίνες (glass-fiber paper filter) και κατακρημνίστηκαν με την προσθήκη 5 ml παγωμένου τριγλωροξικού οξέος (TCA) (10%). Η ραδιενέργεια μετρήθηκε με αναλυτή υγρής σπινθηροβολίας (Liquid Scintillation Analyzer, Packard). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σαν ποσοστό επι τοις εκατό της σύνθεσης του DNA για τη διευκόλυνση της σύγκρισης.

Για τη μέτρηση της πρωτεϊνοσύνθεσης, προστέθηκε στην κυτταροκαλλιέργεια L-[4.5- 3 H(N)]-λευκίνη (5 μ Ci/ml, PerkinElmer/NEN ειδικής δραστηριότητας 42.5 Ci/mmol), 14 ώρες μετά την προσθήκη του FCS. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν 18 ώρες αργότερα και η ραδιενέργεια μετρήθηκε όπως περιγράφεται παραπάνω.

Για τον προσδιορισμό της κυτταρικής διαίρεσης και βιωσιμότητας, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος WST-1 (Boehringer Mannheim). 14 ώρες μετά την προσθήκη του FCS, προστέθηκαν 10 μ l του διαλύματος WST-1 (έτοιμο προς χρήση) ανά οπή και επώασθησαν για

ακόμη 2 ώρες. Η ποσότητα του formazan salt προσδιορίστηκε με μέτρηση της απορροφησης στα 440 nm σε αναλυτή ELISA (ELISA reader).

Όλες οι δοκιμασίες επαναλήφθηκαν τρεις φορές και κάθε σημείο αντιστοιχεί στον μέσο όρο \pm τυπική απόκλιση (SD) του τριπλού αντιπροσωπευτικού πειράματος.

Ανίχνευση των μορφολογικών αλλαγών των αποπτωτικών κυττάρων: Τα αποπτωτικά κύτταρα μετά από κατεργασία με D-24851 ανιχνεύθηκαν με διπλή χρώση βρωμιούχου αιθιδίου/πορτοκαλί της Ακριδίνης (10 μ g/ml το καθένα σε PBS). Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σαν συρρέουσες μονοστοιβάδες και οι χρώσεις είχαν διάρκεια 10 λεπτά. Ακολούθησαν 3 πλυσίματα με PBS και παρατήρηση των κυττάρων σε μικροσκόπιο ανοσοφθορισμού, για ανίχνευση τυχόν μορφολογικών αλλαγών.

Ανάλυση της κατάτμησης του DNA (DNA fragmentation): Τα C2 κύτταρα υποβλήθηκαν σε κατεργασία με D-24851 (0.1 and 10 μ M) για 24 και 48 ώρες στους 37°C. Μετά την κατεργασία, τα κύτταρα που αιωρούνταν στο θρεπτικό μέσο και αυτά που ήταν προσκολλημένα στα τριβλία συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση στα 800g για 10 λεπτά στους 4°C. Το ολικό γενωμικό DNA απομονώθηκε από το ίζημα των C2 κυττάρων και 5 μ g από κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν για διαχωρισμό με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (1,8%) και εν συνεχεία χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο και φωτογράφιση.

Western blot ανάλυση: Τα C2 κύτταρα υπέστησαν κατεργασία με D-24851 για 2, 24 και 48 ώρες στους 37°C. Μετά την κατεργασία, τα κύτταρα που αιωρούνταν στο θρεπτικό μέσο και αυτά που ήταν προσκολλημένα στα τριβλία συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση στα 800g για 10 λεπτά στους 4°C, ξεπλύθηκαν μία φορά με PBS, συλλέχθηκαν και λύθηκαν σε 200 μ l ρυθμιστικού διαλύματος λύσης RIPA (50 mM Tris/HCL, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) με 1 μ g·mL⁻¹ πεπστατίνης (pepstatin), 1 μ g·mL⁻¹ λευπεπτίνης (leupeptin) και 1 mM φαινυλμεθανοσουλφονικού φλουοριδίου (phenylmethanesulfonyl fluoride). Τα κυτταρολύματα προέκυψαν μετά από επώαση του

κυτταρικού εναιωρήματος σε πάγο για 10 λεπτά και στη συνέχεια φυγοκέντρωση στα 11000g για 10 min στους 4°C. Το υπερκείμενο κάθε δείγματος (περίπου 30 µg πρωτεϊνης ανά σειρά) αναμείχθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα SDS-δείγματος (μερκαπτοαιθανόλη, γλυκερόλη, κυανό της βρωμοφαινόλης) και, μετά από βρασμό για 3 λεπτά, ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή 10% πολυακρυλαμιδίου/SDS. Ακολούθησε υβριδισμός κατά Western χρησιμοποιώντας ειδικά αντισώματα για τις hsp70 (SPA 810, StressGen) και hsc70 (SPA 815, StressGen).

***In vitro* φαρμακοκινητική αποδέσμευση της D-24851 από τα επικαλυμμένα stent:**

Ένα LD και ένα ED stent εμποτίστηκαν σε ορό αίματος κουνελιού (1 mL) μέσα σε σωληνάριο πολυπροπυλενίου και επώαστηκαν στους 37 °C για συνολικό χρόνο 31 ημερών. Ο ορός του αίματος ανανεωνόταν στο μίγμα επώασης κάθε 2-8 ώρες (ημέρα επώασης 1), 8-16 ώρες (ημέρες επώασης 2-6), 24 ώρες (ημέρες επώασης 6-10) ή 48 ώρες (ημέρες επώασης 11-31), αντιστοίχως. Δείγματα ορού αίματος στα οποία είχαν εμποτιστεί τα stents ελήφθησαν στα αντίστοιχα (προαναφερθέντα) χρονικά διαστήματα με σκοπό την εκχύλιση οργανικής φάσης του D-24851 χρησιμοποιώντας ένα σύστημα διαλυτών πέντε σταδίων που περιείχε ν-εξάνιο (50%), 2-προπανόλη (30%) και διαιθυλαιθέρα (20%), ακολουθούμενο από εξάτμιση μέχρι ξηρού (Speed-Vac), ανασύσταση σε 60% ακετονιτρίλιο (Lichrosolv, Merck) και ανάλυση με HPLC.

HPLC ανάλυση της D-24851: Δείγματα προερχόμενα από εκχύλιση οργανικής φάσης που περιείχαν D-24851 (0.2 mL) εισήχθησαν σε σύστημα HPLC ανάστροφης φάσης (Waters Corporation, Milford) διαμέσου μίας στήλης C₁₈ (Waters 4.6X150mm, 5 µm), υπό ισόποση (ή σταθερή) ροή διαλυτών (1.0 mL/min), ενός μίγματος διαλυτών ακετονιτρίλιου (Lichrosolv, Merck) (60%) και νερού βαθμού HPLC (Labscan) (40%), το οποίο περιείχε οξικό αμμώνιο (0.05 mM) με pH 6.5. Το φάσμα εκμομπής των εκλουόμενων διαλυτών ουσιών καταγράφηκε στα 345 nm από έναν ενσωματωμένο ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας πολλαπλών μηκών κύματος (Waters 2487). Διάλυμα συνθετικής D-24851 (ASTA Medica) με εύρος

συγκεντρώσεων από 5 ng/mL μέχρι 250 µg/mL είτε σε 60% ακετονιτρίλιο, είτε σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS), είτε σε φυσιολογικό ορό αίματος κουνελιού (που είχε παρασκευασθεί με κατάλληλες αραιώσεις ενός διαλύματος αναφοράς D-24851 σε DMSO (DiMethyl Sulfoxide, διμεθυλοσουλφοξείδιο) χρησιμοποιήθηκε για σκοπούς βαθμονόμησης-ποσοτικοποίησης σε όλα τα πειράματα. Το όριο κατώτατης ποσοτικοποίησης για το D-24851, δηλαδή η ελάχιστη συγκέντρωση που παράγει < 15% ενδογενή διακύμανση του εμβადού της εκάστοτε κορυφής, ήταν 25 ng/mL. Για την αποτίμηση της απόδοσης της εκχύλισης οργανικής φάσης (βλέπε ανωτέρω), γνωστή ποσότητα D-24851 (10 ng/mL ως 100 µg/mL) προσετέθηκε σε καθαρά δείγματα ορού αίματος κουνελιού ή PBS (ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών), υπεβλήθη σε εκχύλιση βάσει του πρωτοκόλλου εκχύλισης και σε HPLC ανάλυση και συγκρίθηκε με ανάλογα δείγματα D-24851 που είχαν παρασκευασθεί σε 60% ακετονιτρίλιο και είχαν υποβληθεί σε απευθείας HPLC ανάλυση: η ποσότητα D-24851 που ανακτήθηκε με την HPLC ανάλυση δειγμάτων ορού αίματος ήταν $52 \pm 13\%$ (n=12), ενώ η ποσότητα που ανακτήθηκε σε δείγματα PBS ήταν $38 \pm 10\%$ (n=8). Οι τιμές αυτές ελήφθησαν υπόψιν σε όλες τις περιπτώσεις στον υπολογισμό της ποσότητας D-24851 στα βιολογικά δείγματα.

1.3 In vivo μελέτες

1.3.1 Μέθοδος τοποθέτησης ενδοαγγειακών προσθέσεων

Οι πειραματικές μελέτες έλαβαν χώρα σε πλήρη συμφωνία με τον οδηγό φροντίδας και χρήσης πειραματόζωων (Guide for the care and use of Laboratory animals, U.S. National Institutes of Health, NIH Publication No. 85-23; revised 1996). Ο πίνακας 1 περιλαμβάνει όλες τις in vivo υπομελέτες, την περίοδο παρακολούθησης και τον αριθμό των stents που χρησιμοποιήθηκαν.

Πίνακας 1.

Μέλετη	Περίοδος παρακολούθησης (ημέρες)	Αριθμός stents
Ιστομορφομετρία	28	31
Ενδοθηλιοποίηση	90	12
In vivo D-24851 φαρμακοκινητική	1,3,10,14,28	10

Ως πειραματόζωα χρησιμοποιήθηκαν νορμοχοληστερολεμικά αρσενικά κουνέλια Νέας Ζηλανδίας, βάρους 2.9-3.1κιλών, η θρέψη των οποίων έγινε με τροφή κουνελιού και νερό. Την ημέρα της επέμβασης (διάρκειας 34 ± 12 λεπτών) καθώς και καθόλη την διάρκεια του πειράματος χορηγήθηκαν 75 mg ασπιρίνης και 1 mg/kg κλοπιδογρέλης ημερησίως σε όλα τα πειραματόζωα. Η αναισθησία έγινε με ενδομυϊκή χορήγηση κεταμίνης (35.0 mg/kg Imalgene; Γερολυματος, Αθήνα, Ελλάδα) και ξυλαζίνης (5.0 mg/kg Rompun; Bayer, Leverkusen, Germany). Σε συνθήκες πλήρους αποστείρωσης, μετά την χειρουργική αποκάλυψη της δεξιάς μηριαίας αρτηρίας και την εισαγωγή αρτηριακού θηκαριού 5-Fr με την μεθοδο Seldinger, χορηγήθηκε ενδοαρτηριακά bolus δόση ηπαρίνης (100 IU/kg). Η ενδοαγγειακή πρόσθεση, τοποθετημένη σε 3-mm καθετήρα αγγειοπλαστικής με μπαλόνι, οδηγήθηκε υπό ακτινοσκόπηση στην δεξιά λαγόνια αρτηρία και εκπύχθηκε για 15 δευτερόλεπτα σε πίεση 8 atm. Πριν και μετά την εμφύτευση του stent έγινε αγγειογραφία, στοχεύοντας σε μια αναλογία διαμέτρου μπαλονιού-αρτηρίας 1.1-1.2.

2.3.2 Συλλογή ιστών και ιστομορφομετρική και ιστοπαθολογική ανάλυση στις 28 ημέρες

Πέντε ομάδες stent εμφυτεύτηκαν: μη επικαλυμμένα (bare metal stents, BMS), PLGA-επικαλυμμένα χωρίς φάρμακο (PMS) και PLGA- επικαλυμμένα με χαμηλή, υψηλή και πολύ

υψηλή δόση φαρμάκου. Τα πειραματόζωα θανατωθήκαν στις 28 ημέρες αφού προηγήθηκε αγγειογραφία για να βεβαιωθεί ότι δεν υπήρχε απόφραξη του αυλού της αρτηρίας. Οι αρτηρίες με την ενδοαγγειακή πρόθεση μονιμοποιήθηκαν με ενδοαορτική έγχυση 10% φορμαλίνης υπό πίεση 100 mm Hg και εμβυθίστηκαν σε methyl methacrylate. Η πλαστικοποίηση των παρασκευασμάτων έγινε με τη μέθοδο του θερμού πολυμερισμού. Τα παρασκευάσματα τοποθετήθηκαν σε γυάλινα φιαλίδια που περιείχαν το διάλυμα για την πλαστικοποίηση. Στη συνέχεια τα φιαλίδια με το διάλυμα αυτό τοποθετήθηκαν σε δοχείο με κενό αέρος για 1 και μισή ώρα περίπου για την αφαίρεση των φυσαλίδων και στη συνέχεια εμβαπτίστηκαν σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37° C, μέχρι της πήξεως του υλικού. Μετά την πήξη του υλικού πλαστικοποίησης των παρασκευασμάτων ακλούθησε θραύση και αφαίρεση των δειγμάτων. Από τα δείγματα κόπηκαν τομές πάχους 5μm από το εγγύς, μέσο και άπω τμήμα της αρτηρίας με μικροτόμο (tungsten carbide μαχαιρίδιο). Τα πλακίδια μαζί με τις τομές πιέστηκαν στη συνέχεια σε πρέσα και έμειναν στον κλίβανο για μια εβδομάδα. Η αποπλαστικοποίηση των παρασκευασμάτων έγινε με την χρήση ξυλόλης και στη συνέχεια χρωματίστηκαν με χρώση trichrome- Masson's. Οι μετρήσεις έγιναν σε τέσσερις τομές κάθε αρτηρίας και υπολογίστηκε ο μέσος όρος. Επίσης για να εκτιμηθεί πιθανή επίδραση στα όρια του αρτηριακού τμήματος με την ενδοαγγειακή πρόσθεση, αρτηριακό τμήμα 2 mm εγγύς και άπω του stent εξετάστηκε με οπτικό μικροσκόπιο.

Οι μορφομετρικές αναλύσεις έγιναν σε μη αφαλατωμένες τομές με ειδικό σύστημα ψηφιακής ανάλυσης (computerized digital image analysis system) από ανεξάρτητο παρατηρητή. Η σάρωση όλου του δείγματος έγινε με προκαθορισμένο μέγεθος πεδίου. Έγινε λεπτομερή καταγραφή των διαφόρων παραμέτρων με τη χρήση ειδικού mouse και την βοήθεια ψηφιακής τράπεζας σχεδιασμού. Η ιστομορφομετρική ανάλυση κάθε τομής συμπεριέλαβε την περιοχή του έξω (vessel area), μέσο (medium area) και έσω ελαστικού χιτώνα (internal elastic lamina area, IEL), του νεοιστού (neointimal area) και του αυλού του

αγγείου (lumen area). Στα σημεία επαφής του μεταλλικού πλέγματος με το αρτηριακό τοίχωμα μετρήθηκε το πάχος του νεοιστού (neointimal thickness) και μια μέση τιμή πάχους του νεοιστού υπολογίστηκε για κάθε αρτηριακή τομή. Η επί τοις εκατό στένωση (percent stenosis) του αυλού υπολογίστηκε από την εξίσωση $100 \times [1 - (\text{περιοχή έσω ελαστικού χιτώνα} - \text{περιοχή νεοιστού}) / \text{περιοχή έσω ελαστικού χιτώνα}]$.

Πίνακας 2.

Βαθμός	Περιγραφή τραυματισμού
0	Ακέραια έσω ελαστική μεμβράνη, απογυμνωμένο ενδοθήλιο, συμπίεση αλλά όχι εμφανής ρήξη του μέσου χιτώνα
1	Ρήξη της έσω ελαστικής μεμβράνης, συμπίεση αλλά όχι εμφανής ρήξη του μέσου χιτώνα
2	Ρήξη της έσω ελαστικής μεμβράνης, εμφανής ρήξη του μέσο χιτώνα, ακέραια έξω ελαστική μεμβράνη αλλά συμπιεσμένη
3	Ρήξη της έσω ελαστικής μεμβράνης, ρήξη του μέσο χιτώνα επεκτεινόμενη στην έξω ελαστική μεμβράνη, μερική προβολή των συρμάτων πλεγμάτων στον έξω ελαστικό χιτώνα

Πίνακας 3.

Βαθμός	Εκτίμηση φλεγμονής
0	Μη ύπαρξη φλεγμονωδών κυττάρων γύρω από το μεταλλικό πλέγμα
1	Μικρή, μη περιμετρική λεμφοκυτταρική διήθηση γύρω από το μεταλλικό πλέγμα
2	Εντοπισμένη, μετρίου προς σοβαρού μεγέθους μη περιμετρική κυτταρική συνάθροιση γύρω από το μεταλλικό πλέγμα
3	Περιμετρική, σοβαρού μεγέθους λεμφοκυτταρική διήθηση του μεταλλικού πλέγματος

Ο βαθμός τραυματισμού του αρτηριακού τοιχώματος υπολογίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο περιγραφής και βαθμολόγησης που περιγράφηκε από τον Schwarz et al (Πίνακας 2).

Η αξιολόγηση του βαθμού φλεγμονής έγινε σύμφωνα με την μέθοδο που έχει περιγράφει από τον Kornowski et al (Πίνακας 3). [111]

Πίνακας 4.

Βαθμός	Περιγραφή συγκέντρωσης ινώδους ιστού
1	Εστιακή εναπόθεση ινώδους σε οποιοδήποτε τμήμα της αρτηρίας και μετρίου βαθμού εναπόθεση ινώδους εγγύς του μεταλλικού πλέγματος σε σύνολο <25% της περιμέτρου της αρτηρίας
2	Μετρίου βαθμού εναπόθεση ινώδους εγγύς του μεταλλικού πλέγματος σε σύνολο >25% της περιμέτρου της αρτηρίας η σοβαρού βαθμού εναπόθεσης ινώδους εγγύς ή ανάμεσα από τα μεταλλικά πλέγματα σε σύνολο <25% της περιμέτρου της αρτηρίας
3	σοβαρού βαθμού εναπόθεσης ινώδους εγγύς ή ανάμεσα από τα μεταλλικά πλέγματα σε σύνολο >25% της περιμέτρου της αρτηρίας

Η περιεκτικότητα του νεοιστού σε ινώδες ιστό και λεία μυϊκά κύτταρα υπολογίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο βαθμολόγησης που περιγράφηκε από τον Suzuki et al (Πίνακες 4 και 5). [119]

Πίνακας 5.

Βαθμός	Περιγραφή συγκέντρωσης λειών μυϊκών κυττάρων (ΛΜΚ)
1	Αραιή συγκέντρωση ΛΜΚ σε οποιοδήποτε τμήμα της αρτηρίας και μετρίου βαθμού διήθηση ΛΜΚ σε λιγότερο από το συνολικό πάχος του νεοιστού, σε σύνολο <25% της περιμέτρου της αρτηρίας
2	Μετρίου βαθμού διήθηση ΛΜΚ σε λιγότερο από το συνολικό πάχος του νεοιστού, σε σύνολο >25% της περιμέτρου της αρτηρίας ή πυκνή συγκέντρωση ΛΜΚ σε όλο το πάχος του νεοιστού, σε σύνολο <25% της περιμέτρου της αρτηρίας
3	Πυκνή συγκέντρωση ΛΜΚ σε όλο το πάχος του νεοιστού, σε σύνολο >25% της περιμέτρου της αρτηρίας

1.3.3 Εκτίμηση της αναγέννησης του ενδοθηλίου στις 90 μέρες

Τέσσερις ομάδες stents, PMS και με τις τρεις συγκεντρώσεις της D-24851, εμφυτεύτηκαν στις δεξιές λαγόνιες αρτηρίες 12 κουνελιών με την ίδια μέθοδο που περιγράφηκε πιο πάνω (τρία stent σε κάθε ομάδα). Η συλλογή αρτηριών έγινε στις 90 μέρες και τα ιστικά δείγματα εξετάστηκαν με ηλεκτρονικό σαρωτικό μικροσκόπιο (scanning electron microscope, SEM). Ο ιστός μονιμοποιήθηκε σε μονιμοποιητή Karnovsky για 24 ώρες. Κατόπιν, κάτω από στερεοσκόπιο, το αγγείο χωρίστηκε σε δυο τμήματα με τη βοήθεια ειδικού ψαλιδιού με λεπτά άκρα, κόβοντας το stent. Σε περιπτώσεις όπου υπήρχαν εκτεταμένοι θρόμβοι αυτοί ξεπλύθηκαν και αφαιρέθηκαν ώστε να γίνει ορατή η επιφάνεια του ενδοθηλίου στο μικροσκόπιο. Μετά την μονιμοποίηση ο ιστός αφυδατώθηκε με σειρά αλκοολών από 25-100% και μετά αποξηράνθηκε αφού πρώτα εμποτίστηκε σε διάλυμα διμεθυλ-διλαζανίου. Κατόπιν ο αυλός προσανατολίστηκε κατάλληλα, επικαλύφθηκε με λεπτό στρώμα χρυσού με την μέθοδο sputtering και τέλος παρατηρήθηκε σε σαρωτικό ηλεκτρονικό μικροσκόπιο τύπου JEOL JSM5600 σε μεγεθύνσεις από 25X-3000X. Η παρατήρηση έγινε στα 3kV με κλίση παρασκευάσματος 30 μοίρες. Φωτογραφίες ελήφθησαν σε ηλεκτρονική μορφή υπό μορφή αρχείων *BMP και τυπώθηκαν σε εκτυπωτή laser υψηλής ανάλυσης ή φυλάχθηκαν σε ειδικό αρχείο σε σκληρό δίσκο. Οι μορφομετρικές μετρήσεις του ενδοθηλίου έγιναν σε H/Y με τη βοήθεια του ειδικού προγράμματος μορφομετρίας Image ProPlus.

1.3.4 Φαρμακοκινητικές ιδιότητες της D-24851 από τον ορό και τις αρτηρίες κουνελιών

LD stents (n=5) και ED stents (n =5) εμφυτεύτηκαν στις δεξιές λαγόνιες αρτηρίες κουνελιών. Η ευθανασία των κουνελιών έγινε ξεχωριστά για το καθένα 1, 3, 10, 14 ή 28 ημέρες μετά την εμφύτευση των stents. Δείγματα ορού αίματος (0.5 mL) συλλέχθηκαν 1, 3 και 10 ημέρες μετά την εμφύτευση των stents και υπεβλήθησαν απευθείας σε εκχύλιση οργανικής φάσης και σε ανάλυση HPLC του D-24581. Τα stents καθώς και δείγματα

αρτηριακού ιστού γύρω από τα stents συλλέχθηκαν 1, 3, 10, 14 και 28 ημέρες μετά την αρχική εμφύτευση τους και καταψύχθηκαν στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ μέχρι να διεκπεραιωθεί η ανάλυση. Δείγματα αρτηριακού ιστού (50 mg) κονιορτοποιήθηκαν υπό ρεύμα υγρού αζώτου και αναμείχθηκαν με 1 mL PBS (0.1 M, pH 7.5) που περιείχε κολλαγενάση (Sigma, type IA) (5 U/mL), CaCl_2 (χλωριούχο ασβέστιο) (1 mM) και BSA (Bovine Serum Albumin, αλβουμίνη ορού βοός) (0.02% w/v). Ακόλουθησε ολονύχτια επώαση των δειγμάτων στους $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, εν συνεχεία ομογενοποίηση με έναν ομογενοποιητή Polytron PT1200 (Kinematica AG, Switzerland), εκχύλιση οργανικής φάσης και ανάλυση HPLC, όπως περιγράφηκε ανωτέρω. Αντιστοίχως έγινε ολονύχτια επώαση των stents στους $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ σε PBS (0.1 M, pH 7.5) που περιείχε κολλαγενάση (5 U/mL), CaCl_2 (1 mM) και BSA (0.02% w/v) (1 mL ανά stent) και ακολούθως εκχύλιση οργανικής φάσης και ανάλυση HPLC. Η ποσοτικοποίηση έγινε βάσει της καμπύλης βαθμονόμησης της HPLC με συνθετικό D-24851 (ASTA Medica), όπως περιγράφηκε ανωτέρω.

2. Στατιστική ανάλυση

Τα δεδομένα αναφέρονται σαν μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση (mean \pm standard deviation). Η σύγκριση των συνεχόμενων μεταβλητών έγινε με one-way ANOVA. Η ανάλυση των ομάδων ανά ζεύγη κάνοντας πολλαπλές συγκρίσεις έγινε σύμφωνα με το post hoc Bonferroni test. Το επίπεδο σημαντικότητας p θεωρήθηκε στατιστικά σημαντικό όταν είχε τιμή <0.05 . Όλες οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το πρόγραμμα στατιστικής SPSS (version 11.5; SPSS, Chicago, IL).

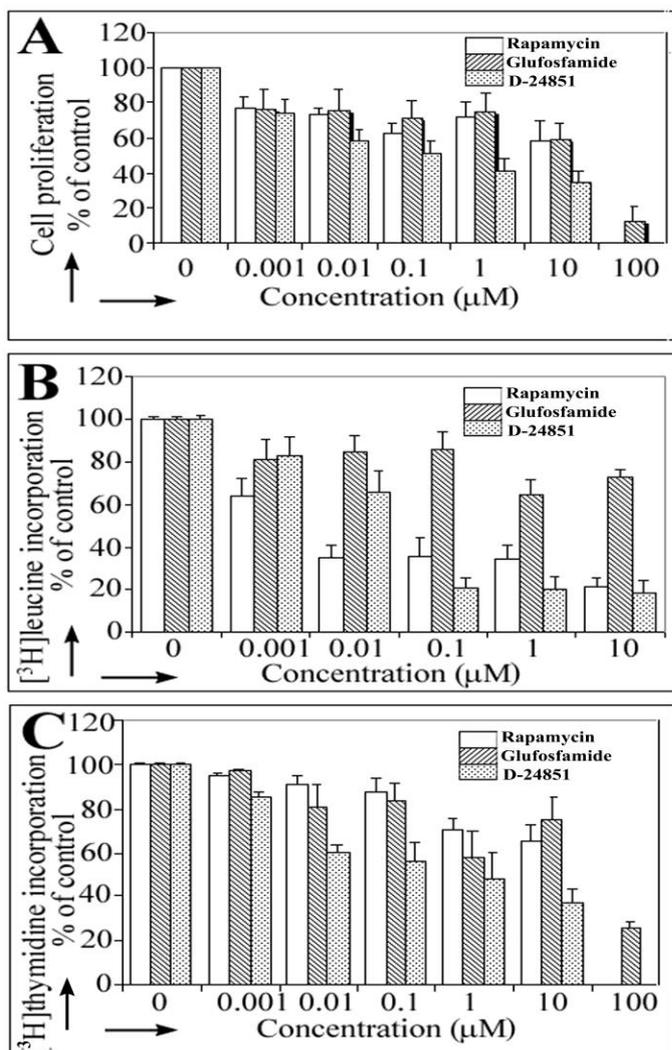
3. Αποτελέσματα

3.1 In vitro D-24851 μελέτες

Κυτταροτοξική δράση του D24851: Από τις μετρήσεις της δοκιμασίας WST-1 προέκυψε ότι το D-24851 προκάλεσε μείωση της κυτταρικής ανάπτυξης, η οποία ήταν ανάλογη με τη συγκέντρωση της ουσίας δηλαδή δοσοεξαρτώμενη. Αξιολογήθηκαν τρία ανεξάρτητα σετ τριπλών πειραμάτων. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα C2, που εκτέθηκαν σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις ραπαμυκίνης και γλουφοσφαμιδίου, 2 γνωστών κυτταροτοξικών και ανασταλτικών παραγόντων της κυτταροδιαίρεσης. (Εικόνα 2A) Στις συγκεντρώσεις μεταξύ 0-100 μM D-24851 βρέθηκε αύξηση της κυτταροτοξικότητας σαν αποτέλεσμα της αύξησης της συγκέντρωσης/δόσης. Η τιμή IC_{50} για τη C2 κυτταρική σειρά υπολογίστηκε από την καμπύλη δόσης-απόκρισης σε Microsoft Excel και ήταν περίπου 80nM. Η αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης και της σύνθεσης του DNA επίσης ήταν δοσοεξαρτώμενη (Εικόνα 2B και 2C).

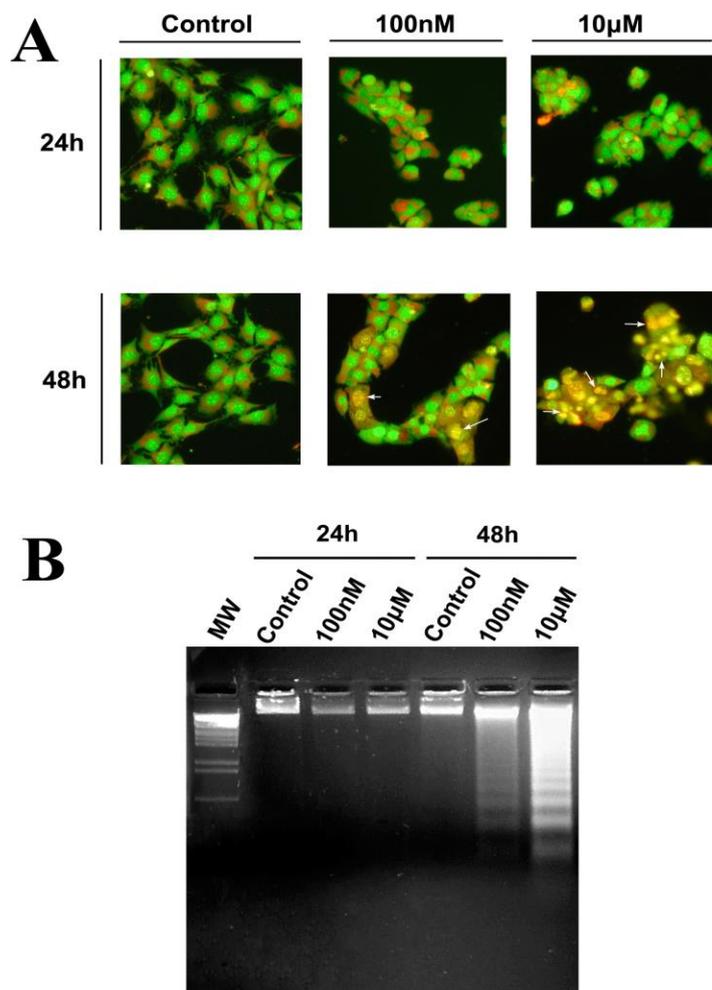
Επαγωγή της απόπτωσης από την D-24851: Οι αποπτωτικές επιδράσεις του D-24851 στα C2 κύτταρα φαίνονται στην εικόνα 3. 24 ώρες μετά την έκθεση των C2 κυττάρων σε 100nM-10 μM D-24851, παρατηρήθηκαν προαποπτωτικά κύτταρα, ενώ στις 48 ώρες έκθεσης άρχισαν να εμφανίζονται αποπτωτικά χαρακτηριστικά, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι τα C2 κύτταρα που εκτίθενται σε D-24851 οδηγούνται μαζικά σε απόπτωση. Για να επιβεβαιωθεί περαιτέρω η επαγωγή της απόπτωσης, τα C2 κύτταρα υποβλήθηκαν στην ίδια κατεργασία (100 nM-100 μM) με D-24851 για 48 ώρες και η ανάλυση με ηλεκτροφόρηση σε αгарόζη του DNA που αποδεσμεύτηκε από αυτή τη διαδικασία (DNA συνδεδεμένο με το ολιγονουκλεόσωμα) έδειξε το χαρακτηριστικό πρότυπο σκάλας (ladder pattern) της απόπτωσης.

Εικόνα 2



Έκθεση κυτάρων C2 σε αυξανόμενες ποσότητες Ραπαμυκίνης, Γλουφωσφαμίδης και D-24851 και η επίδραση των ουσιών αυτών στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (2A), στην πρωτεϊνοσύνθεση (2B) και στη σύνθεση DNA (2C).

Εικόνα 3.



Έκθεση κυττάρων C2 σε διάφορες συγκεντρώσεις D-2851 (100nM, 10µM). Όπως φαίνεται **(A)** τα αποπτωτικά κύτταρα (άσπρα βέλη) αυξήθηκαν μετά από 48 ώρες, ενώ και η ηλεκτροφόρηση έδειξε το χαρακτηριστικό πρότυπο σκάλας (ladder pattern), **(B)**.

H D-24851 δεν επάγει τον αντιαποπτωτικό μηχανισμό που βασίζεται στην hsp 70. Όπως φαίνεται στην εικόνα 4, η hsp 70 συνεχώς παραμένει στα ίδια επίπεδα ακόμη και μετά από 48 ώρες έκθεσης στα 10 µM. Το ίδιο αποτέλεσμα προέκυψε αναλύοντας την έκφραση του hsc 70 γονιδίου. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η D-24851 δεν αυξάνει τα

ενδοκυτταρικά επίπεδα της HSP 70 και δεν ενεργοποιεί περαιτέρω τον αντιαποπτωτικό μηχανισμό που βασίζεται στην hsp70.

Εικόνα 4.



Ανάλυση Western blot. Υπό την επίδραση της D-24851 δεν παρατηρείται καμία αλλαγή στα επίπεδα της κυτταροπλασματικής Hsp70 και Hsc 70. Για την σύγκριση των αποτελεσμάτων, C2 κύτταρα εκτέθησαν σε θερμικό σοκ στους 43.5 °C για 1 ώρα.

***In vitro* κινητική αποδέσμευσης της D-24851:** Η *in vitro* επώαση D-24851 επικαλυμμένων stents σε ορό κουνελιού για 31 μέρες (1 χαμηλής δόσης stent, LDS) ή 23 μέρες (1 πολύ υψηλής δόσης stent, EDS) είχε σαν αποτέλεσμα την σταδιακή αποδέσμευση στο διάλυμα, περίπου 16% της συνολικής ποσότητας του φαρμάκου από τα χαμηλής δόσης stents και 3% από τα πολύ υψηλής δόσης stents (Εικόνα 7A,7B).

3.2 In vivo μελέτες

Πενήντα τρία stents εμφυτεύθηκαν στις δεξιές λαγόνιες αρτηρίες κουνελιών χωρίς επιπλοκές. Όλα τα πειραματόζωα επέζησαν για τη συνολική χρονική περίοδο της μελέτης. Δεν υπήρξε ένδειξη συστηματικής τοξικότητας σε καμία από τις ομάδες των stents.

Ιστομορφομετρική και ιστοπαθολογική ανάλυση: Αμέσως μετά την εμφύτευση των stents καθώς και πριν την ευθανασία των πειραματόζωων, η αγγειογραφία της λαγόνιας αρτηρίας έδειξε ότι ο αυλός όλων των αρτηριών με stents δεν ήταν αποφραγμένος. Τα δεδομένα της ποσοτικής ιστομορφομετρικής και ημιποσοτικής ιστοπαθολογικής ανάλυσης για καθεμιά από τις ομάδες των stents φαίνονται αναλυτικά στους πίνακες 6 και 8 (μετρήσεις απ'όλα τα δείγματα-τομές των stent κάθε ομάδας) και συνοψίζονται στους πίνακες 7 και 9 αντιστοίχως.

Πίνακας 6. Ιστομορφομετρικές παρατηρήσεις.

Δείγματα	Vessel area (mm ²)	IEL area (mm ²)	Lumen area (mm ²)	Neointimal area (mm ²)	Percent stenosis (%)	Neointimal thickness (mm)
Ομάδα LDS						
Κουνέλι 1						
LDS1a	3,24	2,74	2,05	0,69	25,19	11,17
LDS1b	3,42	2,86	2,09	0,77	27,00	17,86
LDS1c	3,65	3,04	2,21	0,84	27,46	19,78
LDS1d	3,38	2,81	2,10	0,71	25,30	12,48
Κουνέλι 2						
LDS2a	3,63	2,62	2,23	0,38	14,67	4,21
LDS2b	4,01	3,37	2,83	0,55	16,19	9,52
LDS2c	3,93	3,42	2,84	0,58	16,98	5,00
LDS2d	3,45	2,43	2,16	0,27	11,13	7,47
Κουνέλι 3						
LDS3a	3,80	3,16	2,32	0,84	26,45	13,18
LDS3b	4,85	4,07	3,02	1,05	25,82	6,80
LDS3c	3,78	3,05	2,25	0,80	26,12	10,04
Κουνέλι 4						

LDS4a	3,16	2,52	1,88	0,64	25,53	13,14
LDS4b	3,60	3,12	2,32	0,80	25,77	19,66
LDS4c	3,58	2,84	2,15	0,69	24,25	13,49
LDS4d	3,25	2,53	2,08	0,45	17,82	5,66
Κουνέλι 5						
LDS5a	3,51	2,96	2,58	0,39	13,05	5,53
LDS5b	3,48	2,90	2,47	0,43	14,75	3,29
LDS5c	3,57	2,95	2,59	0,36	12,30	3,74
Κουνέλι 6						
LDS6a	3,82	3,28	2,71	0,57	17,27	8,14
LDS6b	3,71	3,13	2,49	0,64	20,60	2,58
LDS6c	3,22	2,81	2,25	0,56	19,92	15,82
Κουνέλι 7						
LDS7a	4,45	3,79	3,00	0,80	20,97	4,14
LDS7b	4,10	3,56	2,95	0,60	16,95	3,81
LDS7c	3,97	3,48	2,89	0,59	17,04	3,66
Ομάδα BMS						
Κουνέλι 1						
BMS1a	4,81	4,21	2,70	1,51	35,87	9,83
BMS1b	4,98	4,34	1,87	2,47	56,91	17,63
BMS1c	4,71	3,88	1,81	2,07	53,36	45,35
BMS1d	4,20	3,46	1,94	1,52	43,88	49,60
Κουνέλι 2						
BMS2a	4,66	2,81	1,81	1,00	35,45	13,28
BMS2b	4,60	2,65	1,81	,84	31,56	39,26
BMS2c	4,70	2,91	2,03	,88	30,14	48,46
BMS2d	4,44	3,80	2,85	,95	24,98	45,90
Κουνέλι 3						
BMS3a	2,69	2,20	1,56	,64	29,19	5,87
BMS3b	4,37	3,73	2,87	,86	23,09	7,66
BMS3c	4,29	3,75	3,07	,68	18,04	5,08
Κουνέλι 4						
BMS4a	3,45	2,95	1,79	1,17	39,46	15,95
BMS4b	3,65	3,09	2,30	,99	32,12	10,94
BMS4c	3,62	3,06	2,15	,91	29,78	19,91
BMS4d	3,75	3,20	2,23	,96	30,17	9,69
Κουνέλι 5						
BMS5a	3,09	2,43	1,70	,72	29,79	8,42
BMS5b	3,51	2,72	1,96	,75	27,71	8,21
BMS5c	3,90	3,36	2,55	,81	24,02	9,62
BMS5d	3,62	3,05	2,31	,74	24,21	4,95
Κουνέλι 6						
BMS6a	3,95	3,24	2,44	,80	24,70	2,66
BMS6b	3,66	3,23	2,47	,76	23,57	5,61
BMS6c	3,93	3,20	2,50	,70	21,88	4,16
BMS6d	3,83	3,21	2,50	,70	21,97	7,77
Ομάδα						

PMS						
Κουνέλι 1						
PMS1a	3,54	2,41	1,25	1,16	48,26	38,28
PMS1b	3,49	3,05	1,74	1,31	43,03	27,68
PMS1c	3,55	3,03	1,83	1,20	39,73	10,84
PMS1d	3,93	3,39	1,77	1,63	47,95	62,03
Κουνέλι 2						
PMS2a	4,80	3,96	2,90	1,06	26,72	36,56
PMS2b	4,42	3,84	2,90	,94	24,41	29,10
PMS2c	4,55	4,06	3,09	,97	23,91	23,27
PMS2d	4,48	3,97	3,03	,94	23,63	19,49
Κουνέλι 3						
PMS3a	2,63	2,10	1,34	,76	31,35	14,32
PMS3b	3,22	2,78	1,94	,84	30,32	12,48
PMS3c	3,78	3,39	2,40	,99	29,30	12,25
PMS3d	3,89	3,46	2,51	,95	27,36	14,11
Κουνέλι 4						
PMS4a	2,25	1,43	,99	,64	44,78	17,90
PMS4b	3,03	2,57	1,61	,96	37,41	20,18
PMS4c	3,89	3,40	2,42	,98	28,73	27,78
PMS4d	4,08	3,56	2,55	1,00	28,24	15,39
Κουνέλι 5						
PMS5a	4,02	3,61	2,53	1,08	29,83	11,62
PMS5b	4,20	3,79	2,97	,82	21,67	9,82
PMS5c	4,51	4,18	3,00	1,19	28,33	9,48
PMS5d	4,83	4,37	3,08	1,28	29,36	11,96
Κουνέλι 6						
PMS6a	3,48	2,79	1,95	,84	26,42	9,70
PMS6b	3,34	2,70	1,93	,77	28,60	11,15
PMS6c	4,09	3,35	2,30	1,04	31,19	6,68
Κουνέλι 7						
PMS7a	4,16	3,64	2,68	,96	23,76	8,75
PMS7b	4,69	4,16	3,21	,95	22,89	6,51
PMS7c	4,60	3,98	3,03	,95	21,26	4,75
PMS7d	4,46	3,70	2,70	,99	24,19	5,24
Ομάδα HDS						
Κουνέλι 1						
HDS1a	,63	,52	,32	,20	38,77	6,51
HDS1b	3,69	3,08	2,57	,51	16,59	9,93
HDS1c	3,72	3,12	2,44	,68	21,85	7,01
HDS1d	3,95	3,28	2,55	,73	22,19	6,00
Κουνέλι 2						
HDS2a	4,82	4,09	3,24	,84	20,65	20,35
HDS2b	4,77	3,82	1,42	2,40	62,89	77,25
HDS2c	4,61	4,01	2,72	1,30	32,30	17,55
HDS2d	4,45	3,89	2,84	1,04	26,79	9,15
Κουνέλι						

3						
HDS3a	5,24	4,49	3,37	1,12	24,99	8,45
HDS3b	5,03	4,27	3,05	1,22	28,58	13,04
HDS3c	3,66	3,12	1,94	1,18	37,96	11,88
HDS3d	3,56	3,01	2,01	1,00	33,15	17,88
Κουνέλι 4						
HDS4a	2,74	2,19	1,53	,66	30,12	10,55
HDS4b	2,73	2,20	1,57	,63	28,54	6,57
HDS4c	4,22	3,79	2,85	,94	24,89	8,57
Κουνέλι 5						
HDS5a	4,22	3,80	2,97	,83	21,94	3,55
HDS5b	4,44	3,80	2,88	,92	24,30	1,80
HDS5c	4,39	3,99	3,07	,92	23,08	10,78
Κουνέλι 6						
HDS6a	3,87	3,10	1,10	2,00	64,55	35,26
HDS6b	4,58	3,74	1,63	2,11	56,45	21,26
HDS6c	4,29	3,41	1,57	1,84	53,99	32,32
HDS6d	5,78	4,43	2,57	1,86	41,93	80,31
Ομάδα EDS						
Κουνέλι 1						
EDS1a	4,45	3,66	2,07	1,59	43,38	17,08
EDS1b	4,43	3,70	2,55	1,15	31,12	9,04
EDS1c	4,58	3,90	2,70	1,20	30,75	15,58
EDS1d	4,31	3,90	2,89	1,02	26,03	8,36
Κουνέλι 2						
EDS2a	4,74	3,85	1,88	1,98	51,31	54,05
EDS2b	4,68	4,18	3,12	1,06	25,26	4,89
EDS2c	4,41	3,93	3,07	,87	22,03	6,63
EDS2d	4,43	3,89	2,92	,97	24,92	7,28
Κουνέλι 3						
EDS3a	6,88	4,99	2,78	2,21	44,26	12,00
EDS3b	5,32	4,33	2,66	1,67	38,64	12,44
EDS3c	5,15	4,19	2,62	1,57	37,47	9,65
EDS3d	5,93	5,05	3,16	1,89	37,34	7,87
Κουνέλι 4						
EDS4a	8,25	5,75	1,82	3,94	68,45	46,24
EDS4b	5,76	5,05	3,51	1,54	30,51	3,60
EDS4c	6,32	5,46	3,83	1,63	29,90	7,75
EDS4d	5,68	4,84	3,30	1,54	31,74	7,56
Κουνέλι 5						
EDS5a	4,80	3,52	2,01	1,51	42,80	33,52
EDS5b	5,61	4,56	2,35	2,20	48,36	13,97
EDS5c	5,77	4,82	2,72	2,09	43,50	17,22
EDS5d	5,39	4,69	3,62	1,08	22,93	10,89

Κάθε stent κόπηκε σε 3-4 τομές-δείγματα (a,b,c,d). Vessel area, περιοχή έξω ελαστικού χιτώνα. Internal elastic lamina area, IEL, περιοχή έσω ελαστικού χιτώνα. Neointimal area, περιοχή του νεοιστού. Lumen area, περιοχή

του αυλού του αγγείου. Neointimal thickness, πάχος του νεοιστού. Percent stenosis, επί τοις εκατό στένωση του αυλού. BMS, μη επικαλυμμένα stents. PMS, PLGA-επικαλυμμένα χωρίς φάρμακο stents. PLGA- επικαλυμμένα με χαμηλή (LDS), υψηλή (HDS) και πολύ υψηλή δόση φαρμάκου (EDS).

Πίνακας 7. Ιστομορφωμετρικές μετρήσεις.

Treatment	Vessel area (mm ²)	IEL area (mm ²)	Lumen area (mm ²)	Neointimal area (mm ²)	Percent stenosis (%)	Neointimal thickness (mm)
Control	4.01±0.59	3.24±0.53	2.23±0.42	1.02±0.46	30.9±9.7	0.17±0.16
Polymer coated	3.92±0.66	3.36±0.70	2.36±0.64	1.0±0.2	30.5±7.9	0.17±0.12
Low dose	3.72±0.43	3.09±0.43	2.47±0.37	0.63±0.18 *,†	20.2±5.2 ‡,§	0.09±0.05
High dose	4.06±1.06	3.41±0.90	2.28±0.80	1.13±0.57	33.5±14.1	0.19±0.21
Extreme dose	5.34±0.99#	4.41±0.64#	2.77±0.57	1.63±0.68	36.5±11.5	0.15±0.13

Οι τιμές αναφέρονται σαν μέση τιμή ± τυπική απόκλιση (mean ± SD). * P=0.029; † P=0.026 vs control and polymer-coated, respectively; ‡ P=0.003; § P=0.003 vs control and polymer-coated, respectively; || P=NS, vs control and polymer-coated, respectively; # P≤0.0001, vs all other treatment groups

Πίνακας 8. Ιστοπαθολογικές παρατηρήσεις.

Δείγματα	Injury score	Inflammation score	Fibrin deposition	Intimal SMC content
Ομάδα LDS				
Κουνέλι 1				
LDS1a	,67	1,00	2,00	2,00
LDS1b	,56	1,00	2,00	2,00
LDS1c	,75	2,00	2,00	2,00
LDS1d	,71	2,00	2,00	2,00
Κουνέλι				

2				
LDS2a	2,00	,20	,60	1,00
LDS2b	,50	,75	1,00	2,00
LDS2c	,60	,60	1,00	1,00
LDS2d	2,00	1,00	1,00	1,00
Κουνέλι 3				
LDS3a	1,00	1,00	1,23	1,00
LDS3b	,75	,30	1,00	1,00
LDS3c	2,00	1,00	2,00	1,00
Κουνέλι 4				
LDS4a	1,00	1,00	1,00	1,00
LDS4b	1,00	1,00	1,00	1,00
LDS4c	,75	1,00	1,00	1,00
LDS4d	1,00	1,00	1,00	1,00
Κουνέλι 5				
LDS5a	,50	1,00	2,00	1,00
LDS5b	,00	1,00	2,00	1,00
LDS5c	,50	,00	2,00	1,00
Κουνέλι 6				
LDS6a	,50	1,00	2,00	1,00
LDS6b	1,40	,00	2,00	1,00
LDS6c	1,17	1,00	2,00	1,00
Κουνέλι 7				
LDS7a	1,00	,00	2,00	1,00
LDS7b	,57	1,00	1,43	1,00
LDS7c	1,60	1,00	1,80	1,00
LDS7d	1,00	1,00	1,70	1,00
Ομάδα BMS				
Κουνέλι 1				
BMS1a	1,00	1,00	1,00	2,00
BMS1b	2,00	1,00	,00	2,00
BMS1c	,67	1,00	1,00	2,00
BMS1d	,87	1,00	1,00	2,00
Κουνέλι 2				
BMS2a	1,50	2,00	,25	2,00
BMS2b	1,33	1,33	,66	2,00
BMS2c	,83	,75	,50	3,00
BMS2d	,50	1,00	1,00	2,00
Κουνέλι 3				
BMS3a	,67	,71	1,00	2,00
BMS3b	,75	,83	1,40	3,00
BMS3c	,22	,78	1,44	2,00
Κουνέλι 4				
BMS4a	,56	1,00	1,00	1,00
BMS4b	,23	1,00	1,08	1,00
BMS4c	,21	1,00	1,00	2,00
BMS4d	,07	1,00	1,00	2,00

Κουνέλι 5				
BMS5a	2,60	1,00	,60	2,00
BMS5b	1,60	,60	,60	2,00
BMS5c	,67	,89	1,13	2,00
BMS5d	,50	1,00	1,00	2,00
Κουνέλι 6				
BMS6a	,56	1,00	1,00	1,00
BMS6b	,28	1,00	2,00	1,00
BMS6c	,40	1,00	2,00	1,00
BMS6d	,43	,86	1,00	1,00
Ομάδα PMS				
Κουνέλι 1				
PMS1a	2,00	1,00	,33	3,00
PMS1b	2,00	1,00	1,00	2,00
PMS1c	2,00	1,00	1,00	2,00
PMS1d	2,00	1,00	3,00	3,00
Κουνέλι 2				
PMS2a	,00	1,00	,00	3,00
PMS2b	2,33	,22	,89	1,00
PMS2c	1,17	,50	,67	1,00
PMS2d	1,17	,50	,83	1,00
Κουνέλι 3				
PMS3a	,71	1,71	,85	3,00
PMS3b	,75	1,00	,50	1,00
PMS3c	,92	1,00	,07	1,00
PMS3d	1,15	1,07	,15	2,00
Κουνέλι 4				
PMS4a	,00	,00	,00	2,00
PMS4b	1,00	1,42	1,50	2,00
PMS4c	,90	,90	,63	2,00
PMS4d	1,40	1,10	,80	2,00
Κουνέλι 5				
PMS5a	1,70	2,00	,86	2,00
PMS5b	1,90	2,00	,81	2,00
PMS5c	2,33	1,17	1,25	2,00
PMS5d	1,00	1,00	1,00	2,00
Κουνέλι 6				
PMS6a	1,25	1,25	1,25	2,00
PMS6b	,00	1,33	1,00	2,00
PMS6c	,00	1,33	1,00	2,00
Κουνέλι 7				
PMS7a	1,70	1,00	,86	2,00
PMS7b	2,00	,40	,50	2,00
PMS7c	1,00	,20	,81	2,00
PMS7d	1,00	1,00	,88	2,00
Ομάδα HDS				

Κουνέλι 1				
HDS1a	1,10	,60	2,00	2,00
HDS1b	,56	,33	2,00	2,00
HDS1c	,43	,28	1,70	2,00
HDS1d	1,14	,43	1,70	2,00
Κουνέλι 2				
HDS2a	1,28	2,00	2,00	1,00
HDS2b	1,55	2,00	2,00	1,00
HDS2c	1,25	,40	1,33	3,00
HDS2d	1,00	,50	1,00	3,00
Κουνέλι 3				
HDS3a	1,00	,67	1,67	3,00
HDS3b	1,00	,33	1,70	3,00
HDS3c	1,33	1,00	3,00	1,00
HDS3d	1,00	1,00	3,00	1,00
Κουνέλι 4				
HDS4a	,75	1,00	3,00	1,00
HDS4b	1,00	1,00	3,00	1,00
HDS4c	1,00	,00	2,00	2,00
Κουνέλι 5				
HDS5a	,67	1,00	2,00	2,00
HDS5b	,71	1,00	1,33	1,00
HDS5c	1,00	1,00	2,00	1,00
Κουνέλι 6				
HDS6a	1,40	1,00	2,00	3,00
HDS6b	,55	1,00	2,00	2,00
HDS6c	1,11	1,00	1,67	2,00
HDS6d	1,50	1,00	2,22	2,00
Ομάδα EDS				
Κουνέλι 1				
EDS1a	,63	1,00	3,00	,00
EDS1b	,44	1,00	3,00	,00
EDS1c	,63	1,00	3,00	,00
EDS1d	,88	1,00	3,00	,00
Κουνέλι 2				
EDS2a	1,20	1,00	3,00	2,00
EDS2b	1,00	1,00	3,00	2,00
EDS2c	,75	1,00	3,00	2,00
EDS2d	,89	1,00	3,00	,00
Κουνέλι 3				
EDS3a	,28	1,00	3,00	2,00
EDS3b	,00	1,00	3,00	1,00
EDS3c	,00	1,00	3,00	2,00
EDS3d	,00	1,00	3,00	2,00
Κουνέλι 4				
EDS4a	2,00	2,00	3,00	3,00

EDS4b	1,00	1,00	3,00	3,00
EDS4c	,75	1,00	3,00	3,00
EDS4d	1,00	1,00	3,00	3,00
Κουνέλι 5				
EDS5a	1,00	1,00	3,00	3,00
EDS5b	1,50	1,00	3,00	3,00
EDS5c	1,60	1,00	3,00	3,00
EDS5d	1,60	1,00	3,00	3,00

Κάθε stent κόπηκε σε 3-4 τομές-δείγματα. Injury score, βαθμός τραυματισμού. Inflammation score, βαθμός φλεγμονής. Fibrin deposition, βαθμός εναπόθεσης ινώδους. Intimal SMC content, συγκέντρωση λείων μυικών κυτάρων στον νεοιστό.

Πίνακας 9. Ιστοπαθολογικές παρατηρήσεις.

Treatment	Injury score	Inflammation score	Fibrin deposition	Intimal SMC content
Control	0.8±0.62	0.99±0.26	0.98±0.46*	1.83±0.58
Polymer coated	1.23±0.71	1.00±0.48	0.83±0.57*	1.96±0.59
Low dose	0.94±0.51	0.87±0.5	1.71±0.73	1.20±0.41 †
High dose	1.01±0.3	0.84±0.49	2.01±0.55	1.86±0.77
Extreme dose	0.86±0.55	1.05±0.22	3.00	1.85±1.22

Οι τιμές αναφέρονται σαν μέση τιμή ± τυπική απόκλιση (mean ± SD). * $P \leq 0.0001$ vs low, high and extreme dose;

† $P \leq 0.05$ vs all other treatment groups.

Αντιπροσωπευτικές εγκάρσιες αρτηριακές τομές από όλες τις ομάδες των stents φαίνονται στην εικόνα 5.

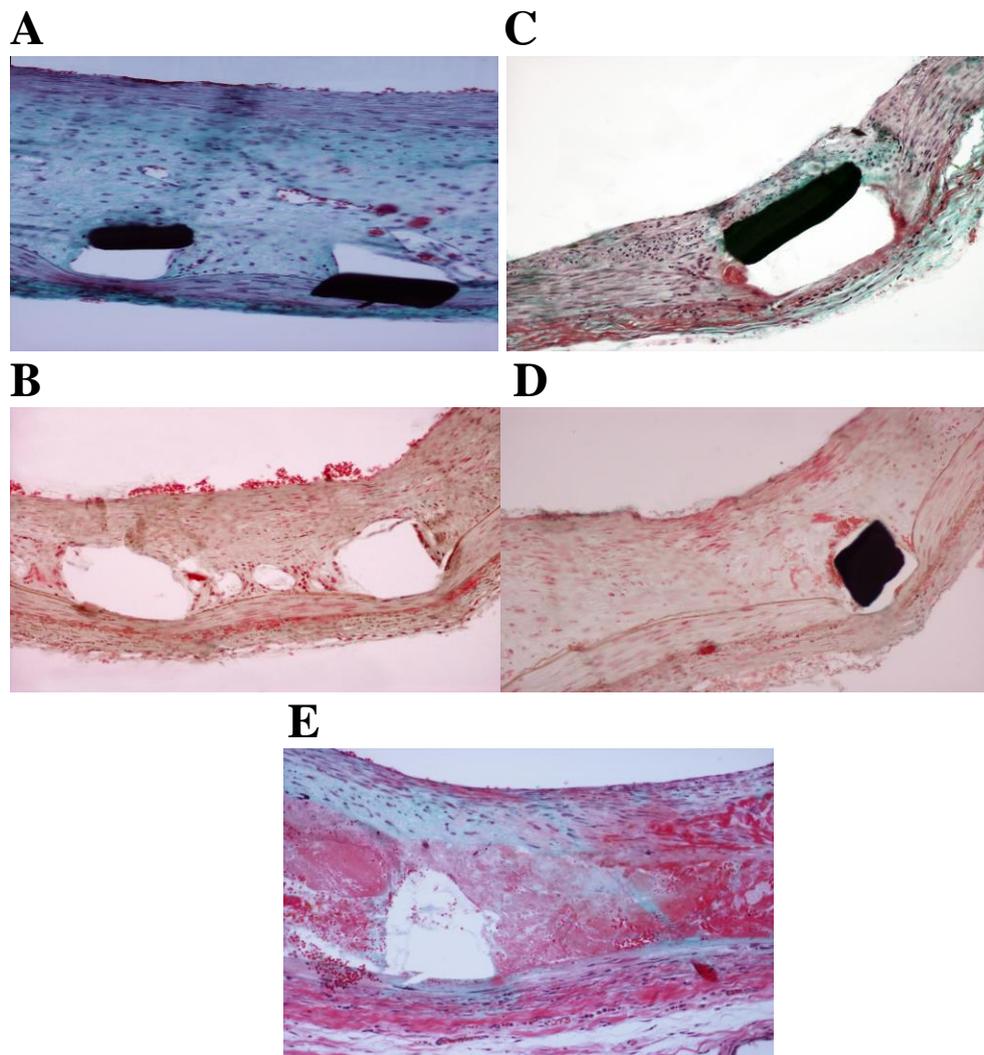
Ο βαθμός αρτηριακού τραυματισμού καθώς και της φλεγμονής του αρτηριακού τοιχώματος ήταν παρόμοια σε όλες τις ομάδες. Τα LD stents μείωσαν κατά 38% ($P=0.029$)

και 37% ($P=0.026$) την περιοχή του νεοιστού σε σύγκριση με τα BMS και τα PMS αντιστοίχως. Υπήρξε επίσης μια στατιστικά σημαντική μείωση κατά 35% ($P=0.003$) και 34% ($P=0.003$) στην επί τοις εκατό στένωση του αυλού σε σύγκριση με τα BMS και τα PMS αντιστοίχως. Μείωση κατά 47% του πάχους του νεοιστού παρατηρήθηκε σε σύγκριση με τα BMS και τα PMS μολονότι δεν αποδείχτηκε στατιστικά σημαντική ($P= NS$).

Στατιστικά σημαντική ($P<0.0001$) δόσοεξαρτώμενη αύξηση της εναποθέσεως ινώδους στο νεοιστό παρατηρήθηκε σε όλες τις ομάδες των επικαλυμμένων stents με D-24851 σε σύγκριση με τα BMS και τα PMS. Στο νεοιστό των αρτηριακών τοιχωμάτων με BMS και PMS παρατηρήθηκε μεγαλύτερος αποικισμός λειών μυϊκών κυττάρων σε σύγκριση με τα LD stents ($P=0.04$ και $P=0.003$, αντιστοίχως). Με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου δεν παρατηρήθηκαν γιγαντοκύτταρα (ως ένδειξη αντίδρασης ξένου σώματος) σε καμία από τις ομάδες.

Οι μετρήσεις των υπολοίπων περιοχών των αρτηριακών δειγμάτων ήταν στατιστικά σημαντικές μόνο μεταξύ των ED stents και καθεμιάς από τις 4 άλλες ομάδες. Αυτό οφείλεται πιθανόν στην τοξική επίδραση της πολύ υψηλής δόσης του φαρμάκου, η οποία προκάλεσε μικροαιμοραγίες στη στοιβάδα του νεοιστού καθώς και εστιακή νέκρωση στην περιοχή επαφής του μεταλλικού πλέγματος με το αρτηριακό τοίχωμα.

Εικόνα 5.



Αντιπροσωπευτικά δείγματα αρτηριακών τομών στις οποίες φαίνεται η υπερπλασία του νεοϊστού στις 28 ημέρες. Α. BMS. Β. PMS. C LDS. D. HDS. E. EDS. Νεοαγγειογένεση είναι παρούσα στην (Α) και (Β). Ήπιου (C) και μετρίου (D) βαθμού εναπόθεση ινώδους κυρίως κοντά στα μεταλλικά πλέγματα, ενώ σοβαρού βαθμού εναπόθεση ινώδους και αιμορραγίας είναι εμφανές στην (E).

Αναγέννηση του ενδοθηλίου μετά από 90 μέρες: Η μελέτη με σαρωτικό ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έδειξε ότι στην ομάδα των PM stents, το 93.45% της επιφάνειας του αρτηριακού τοιχώματος είχε ενδοθηλιοποιηθεί σε σύγκριση με μόνο 57.4% και 52.3% στις ομάδες των LD και HD stents αντιστοίχως ($P < 0.0001$) (Εικόνα 6). Το ενδοθήλιο στην ομάδα των LD stents ήταν καλά σχηματισμένο αλλά τα ενδοθηλιακά κύτταρα ήταν

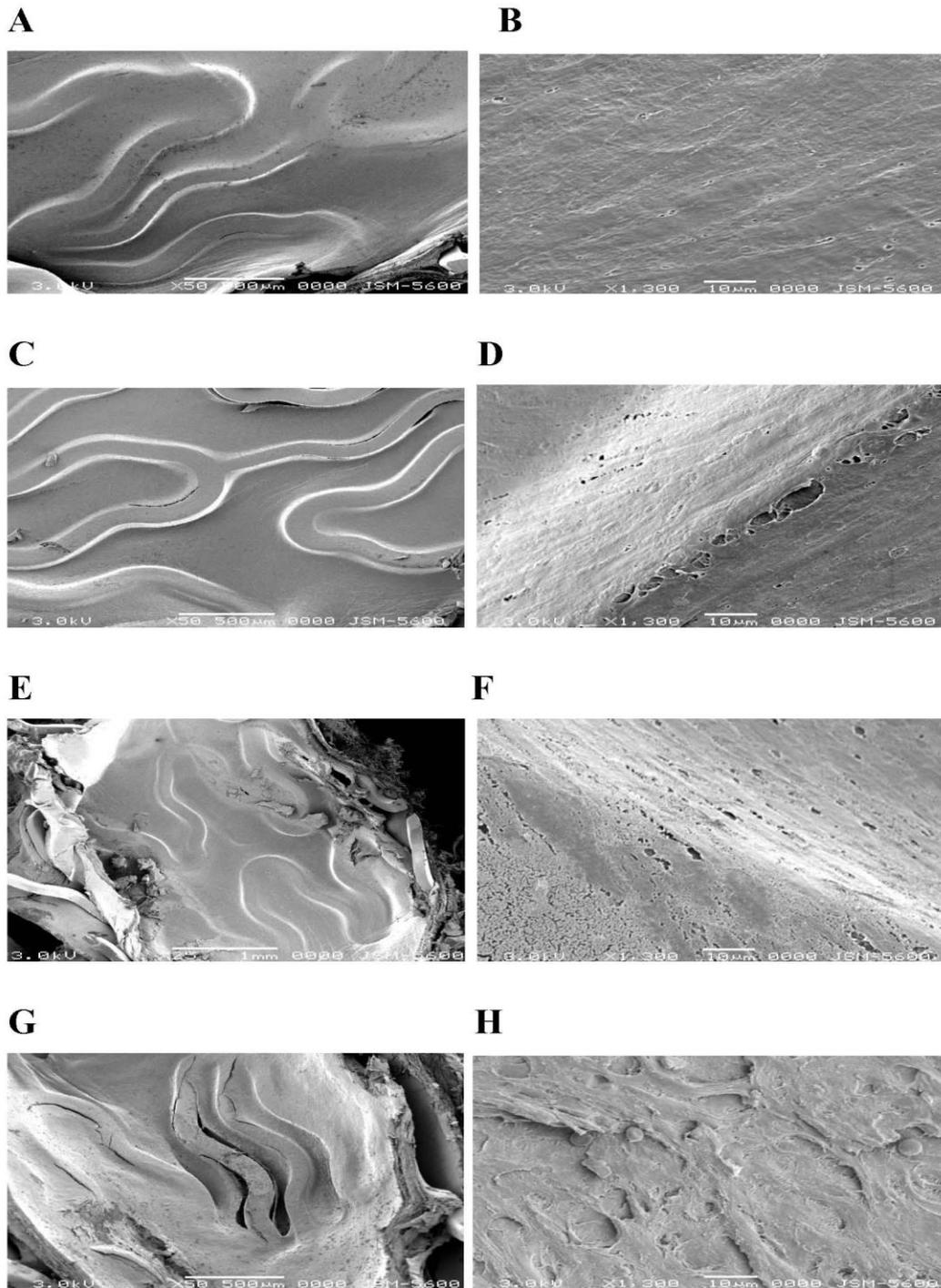
διαχωρισμένα με παρουσία κενών σε μερικές περιοχές και μια πορώδη εμφάνιση κάποιου αριθμού κυττάρων πιθανόν ως εκδήλωση απόπτωσης ή πενιχρής ανάπτυξης. Στην ομάδα των HD stents όλα τα παραπάνω στοιχεία ήταν πιο έκδηλα και κυρίως οι περιοχές γύρω από τα μεταλλικά πλέγματα ήταν απογυμνωμένα από ενδοθήλιο. Δεν ήταν δυνατό να εκτιμηθεί η ενδοθηλιοποίηση στην ομάδα των ED stents καθώς η αναπαραγωγή του ενδοθηλίου ήταν πολύ περιορισμένη και υπήρχε εκτεταμένη παρουσία θρόμβου, φλεγμονωδών κυττάρων και ερυθρών κυττάρων στις μη ενδοθηλιοποιημένες περιοχές.

In vivo κινητική αποδέσμευσης της D-24851: Στα in vivo πειράματα, βρέθηκε ότι το 90% της συνολικής ποσότητας της D-24851 στις ομάδες των LD και ED stents αποδεσμεύτηκε στις πρώτες 24 ώρες από την εμφύτευση τους (Εικόνα 7C, 7D). Σημαντικές ποσότητες του φαρμάκου εντοπίστηκαν στην εγγύς και άπω περιοχή, στα όρια του stent, ενώ ανιχνεύσιμη ποσότητα υπήρχε και στον ορό. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι ο διαχωρισμός του stent από τον αγγειακό ιστό έγινε μηχανικά προκαλώντας σημαντικές απώλειες πολυμερούς και φαρμάκου κατά την επεξεργασία. Αυτό σημαίνει ότι οι μετρήσεις δεν θα μπορούσαν να είναι αξιόπιστες και αυτό εξηγεί τις διαφορές στις in vitro και in vivo φαρμακοκινητικές μετρήσεις. Στην ομάδα των ED stents η συγκέντρωση στον ορό μεταξύ 3 και 10 ημερών ήταν 2 µg/ml.

4. Συζήτηση-Συμπεράσματα

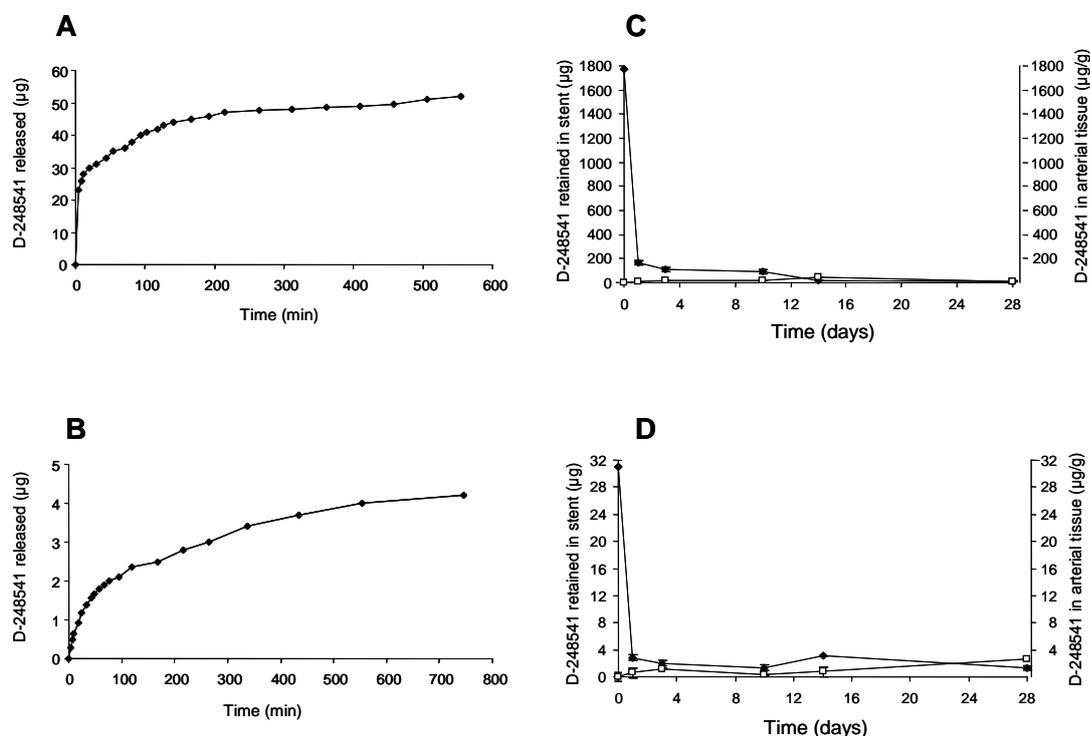
Οι πρόσφατες εξελίξεις στην τεχνολογία των επικαλυμμένων με φαρμακευτικές ουσίες stent έχουν εστιάσει σε δυο τομείς: πρώτον στην ανάπτυξη μιας πλατφόρμας η οποία να εξασφαλίζει την μεταφορά και τοπική χορήγηση ουσιών χωρίς να προκαλεί φαινόμενα τοπικής φλεγμονής ή θρόμβωσης και δεύτερον στην ανεύρεση φαρμακευτικών ουσιών με

Εικόνα 6.



Ενδοθηλιοποίηση των αρτηριακών τμημάτων στις 90 ημέρες. Φωτογραφίες από σαρωτικό ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (αριστερά μεγέθυνση x50 και δεξιά x1300). Στην ομάδα PMS (A και B) η ενδοθηλιοποίηση του stent είναι σχεδόν πλήρης. Στις ομάδες LDS (C, D) και HDS (E, F) η ενδοθηλιοποίηση είναι μερική. Η ομάδα EDS (G, H) εμφάνισε επίσης μερική ενδοθηλιοποίηση με εκτεταμένο σχηματισμό θρόμβου.

Εικόνα 7.



Φαρμακοκινητική αποδέσμευση της D-24851 από EDS (A,C) και LDS (B,D) stents. *In vitro* μελέτη φαρμακοκινητικής σε ορό κουνελιού στις 23 (A) και 31 (B) ημέρες και *in vivo* μελέτη της φαρμακοκινητικής μετά από τοποθέτηση σε κουνέλια (C, D) και στη συνέχεια μετρήσεις με HPLC όπως έχουν περιγραφεί στο Μέθοδοι και Υλικά. Κατά την *in vivo* μελέτη (C,D), επίπεδα του φαρμάκου προσδιορίστηκαν τόσο πάνω στο stent (closed symbols) όσο και στον ιστό περίξ του (peristental arterial tissue), (open symbols); οι τιμές αντιπροσωπεύουν την μέση τιμή από 3 μετρήσεις σε κάθε δείγμα.

ασφαλές όσο και αποτελεσματικό αντιεπανεστενωτικό προφίλ οι οποίες να μπορούν να χορηγηθούν τοπικά. Είναι εμφανές ότι λόγω των πολλαπλών παραγόντων που συμβάλλουν στον μηχανισμό της επαναστένωσης, υπάρχει ένα μεγάλο εύρος φαρμακευτικών ουσιών που ερευνάται σε προκλινικό και κλινικό στάδιο.

Στην παρούσα μελέτη το poly (DL-lactide-co-glycolide) ήταν το πολυμερές υλικό που χρησιμοποιήθηκε σαν πλατφόρμα για την δέσμευση, μεταφορά και τοπική χορήγηση της ουσίας D-24851. Προηγούμενες μελέτες έχουν αποδείξει την πλήρη ιστοσυμβατότητα του

υλικού αυτού, κάτι που επιβεβαιώθηκε και από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης. [209]

Η D-24851 είναι μια φαρμακευτική ουσία που αποτρέπει την συγκρότηση των ετεροδιμερών της τουμπουλίνης και ελέγχει τον σχηματισμό των μικροσωληναρίσκων με αποτέλεσμα να επάγει την στάση του κυτταρικού κύκλου στην μετάφαση και επομένως την κυτταρική ανάπτυξη. [207] Επιπρόσθετα η υδροφοβικότητα της D-24851 πιθανόν μειώνει τις απώλειες του φαρμάκου στην αιματική ροή κατά την εμφύτευση του stent ενώ παράλληλα η λιποφιλικότητα του αυξάνει τις ιστικές δεσμευτικές του ικανότητες οδηγώντας σε παράταση τόσο της παραμονής του στον ιστό όσο και της βιολογικής του δράσης. Τα *in vitro* αποτελέσματα μας δείχνουν ότι η D-24851 αναστέλλει την υπερπλασία, την πρωτεϊνική σύνθεση και την σύνθεση DNA με δοσοεξαρτώμενο τρόπο καθώς και επάγει την κυτταρική απόπτωση. Όλα τα παραπάνω συνηγορούν θετικά στην επικάλυψη stents με D-24851 για την θεραπεία της επαναστένωσης.

Οι πρωτεΐνες θερμικής προσβολής (heat shock protein, Hsp) διαδραματίζουν έναν ουσιώδη προστατευτικό ρόλο σε πολλαπλές μορφές κυτταρικού stress, συνεισφέροντας στους διορθωτικούς μηχανισμούς για την διατήρηση του κυτταρικού κύκλου και των υπολοίπων κυτταρικών διεργασιών. [210, 211] Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι ο μηχανικός τραυματισμός που προκαλείται από ενδοαγγειακές επεμβάσεις έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης της Hsp70 στα αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα. [212] Άλλες μελέτες έδειξαν ότι άλλοι φαρμακευτικοί παράγοντες δέσμευσης της τουμπουλίνης όπως η βινκριστίνη και η πακλιταξέλη επάγουν την Hsp70. [213] Στην δική μας μελέτη οι *in vitro* μελέτες έδειξαν ότι η D-24851 δεν επάγει την έκφραση της Hsp70. Αυτό πιθανόν να σχετίζεται με μειωμένη κυτταρική αντίσταση στην αποπτωτική δράση της D-2485, υποδεικνύοντας ένα πλεονέκτημα της D-24851 στην αντιμετώπιση της επαναστένωσης σε σύγκριση με άλλες ουσίες π.χ. πακλιταξέλη. Ένα άλλο χαρακτηριστικό που ίσως να

συνηγορεί σε ένα πλεονεκτικότερο προφίλ της D-24851 είναι το γεγονός ότι επάγει την απόπτωση με ένα p53- μη εξαρτώμενο τρόπο, [214] παίρνοντας υπόψη ότι ο ρόλος του p53 στην επαναστένωση είναι αρκετά αμφιλεγόμενος. [215] Είναι φανερό ότι παράγοντες με πλεονεκτικότερο αποπτωτικό προφίλ μπορούν εν δυνάμει να αποβούν αποτελεσματικότεροι σε χαμηλότερες δόσεις και επομένως να περιορίσουν το πρόβλημα της επανενδοθηλιοποίησης, το οποίο έχει αποδειχτεί τόσο στην δική μας όσο και σε προηγούμενες μελέτες ότι είναι δόσοεξαρτώμενο.

Το εύρος των δόσεων της D-24851 που χρησιμοποιήθηκε για την επικάλυψη των stents είχε ως στόχο να συμπεριλάβει τόσο θεραπευτικά όσο και τοξικά επίπεδα του φαρμάκου. Η πολύ υψηλή δόση ήταν η μέγιστη δόση που μπόρεσε να φορτωθεί στην πλατφόρμα του stent. Οι ιστομορφομετρικές και ιστοπαθολογικές μετρήσεις έδειξαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις ομάδες με επικαλυμμένα με φάρμακο stents και σε αυτές χωρίς φάρμακο, γεγονός που απέδειξε την άμεση επίδραση της τοπικά χορηγούμενης D-24851 στο αρτηριακό τοίχωμα. Τόσο τα HD και κυρίως τα ED stents είχαν μάλλον τοξική επίδραση με περαιτέρω αύξηση του νεοιστού. Η ομάδα των LD stents όμως ήταν τόσο ασφαλής όσο και δραστική αφού συνοδεύτηκε από στατιστικά σημαντική μείωση της υπερπλασίας του νεοιστού και της επί τοις εκατό στένωσης του αυλού κατά 38% και 34% αντιστοίχως, συγκρινόμενη με τα BMS. Τα αποτελέσματα αυτά είναι άμεσα συγκρίσιμα με προηγούμενες πειραματικές μελέτες επικαλυμμένων stent με διάφορες κυτταροστατικές και κυτταροτοξικές ουσίες (Πίνακας 10).

Πίνακας 10. Πειραματικές μελέτες επικαλυμμένων stent με διάφορες κυτταροστατικές και κυτταροτοξικές ουσίες

	Neointimal area(mm ²)	Percent stenosis (%)	Neointimal thickness (mm)
Lysitsas et al			
D-24851-LDS	0.63±0.18	20.2±5.2	0.9±0.05
vs control	1.02±0.46 p=0.029	30.9±9.7 p=0.003	0.17±0.16 p>0.05
Suzuki et al			
Sirolimus vs control	2.47±1.04 5.06±1.08 p<0.001	26±11 55±20 p<0.001	Δεν αναφέρεται
Klugherz et al			
Sirolimus vs control	0.66±0.12 1.2±0.16 p<0.05	8.6 15.1 p<0.05	0.07±0.04 0.13±0.03 p<0.05
Finkelstein et al			
Paclitaxel vs control	2.0±0.5 4.0±1.6 p=0.0004	27±10 49±13 p=0.01	0.16±0.1 0.45±0.20 p=0.0001
Touchard et al			
Zotarolimus vs control	1.69±0.55 2.78±1.07 p=0.01	22.4±8.6 35.7±13 p=0.01	0.25±0.07 0.38±0.13 p=0.01
Huang et al			
Methotrexate vs control	1.22±0.34 2.25±1.28 p<0.01	21±8 36±21 p<0.01	Δεν αναφέρεται
Salu et al			
CytochalasinD vs control	1.57±0.20 2.46±0.22 p=0.007	35±5 50±5 p>0.05	Δεν αναφέρεται

Στις μελέτες αυτές αναφέρεται μείωση του υπερπλαστικού νεοίστου και της επί τις εκατό στένωσης του αυλού από 35 έως 50% χρησιμοποιώντας παρόμοιες ιστομορφομετρικές μεθόδους.

Τα αποτελέσματα σε κάποιες από αυτές όμως πρέπει να ερμηνευθούν με προσοχή (Πίνακας 11). Οι Klugherz και συν. αναφέρουν μηδενικό σκορ αγγειακού τραυματισμού και φλεγμονής, διαδικασίες αναπόσπαστες από τον παθοφυσιολογικό αγγειακό μηχανισμό που ακολουθεί την αγγειοπλαστική με stent. Στα αποτελέσματα των Huang και συν. φαίνεται ότι το σκορ του αγγειακού τραυματισμού και φλεγμονής είναι σημαντικά μεγαλύτερα στην

ομάδα των bare metal stent δικαιολογώντας ίσως και το αυξημένο ποσοστό νεοιστού σε σύγκριση με την ομάδα της μεθοτρεξάτης. Το ίδιο παρατηρείται και στο πείραμα των Finkelstein και συν. όσο αναφορά τον βαθμό φλεγμονής. Ο βαθμός αρτηριακού τραυματισμού και φλεγμονής αποτελούν ανεξάρτητους παράγοντες επαγωγής του υπερπλαστικού νεοιστού και τυχόν σημαντικές διαφορές είναι πιθανόν να αλλοιώνουν την φαινομενική αποτελεσματικότητα των φαρμακευτικών επικαλυμμένων stent.

Στην παρούσα μελέτη οι ιστολογικές αναλύσεις φανέρωσαν σημαντική, δοσοεξαρτώμενη εναπόθεση ινώδους ιστού σε όλες τις ομάδες με D-24851 επικαλυμμένα stent, αντίδραση που συμβαδίζει με την όψιμη και μη ολοκληρωμένη ενδοθηλιοποίηση. [112]

Πίνακας 11. Πειραματικές μελέτες επικαλυμμένων stent με διάφορες κυτταροστατικές και κυτταροτοξικές ουσίες

	Injury score	Inflammation Score	Fibrin deposition	Endothelial coverage (%)
Lysitsas et al D-24851-LDS vs control	0.94±0.51 0.80±0.62 p=NS	0.87±0.5 0.99±0.26 p=NS	1.71±0.73 0.98±0.46 p<0.0001	57.4 93.45 p<0.05
Suzuki et al Sirolimus vs control [119]	1.56±0.72 1.88±1.07 p=NS	0.12±0.34 0.97±1.09 p=NS	1.09±0.73 0.44±0.56 p=0.0001	2.9±0.4* 2.9±0.4* p=NS
Klugherz et al Sirolimus vs control [216]	0.00 0.00 p=NS	0.03 0.00 p=NS	Δεν αναφέρεται	86±7* 91±4* p=NS
Finkelstein et al Paclitaxel vs control [217]	1.7±0.2 1.8±0.3 p=0.4	1.92±0.79 0.21±0.43 p=0.001	2.92±0.29 1.07±0.27 p=0.00001	Αναφέρεται πλήρη ενδοθηλιοποίηση
Touchard et al Zotarolimus vs control [218]	0.08±0.14 0.07±0.04 p=NS	1.0±0.0 1.0±0.33 p=NS	0.21±0.42 0.05±0.23 p=NS	2.4±1.2* 2.6±0.9* p=NS
Huang et al Methotrexate vs control [219]	0.20±0.13 0.41±0.32 p<0.05	1.02±0.03 1.27±0.50 p<0.05	Δεν αναφέρεται	Αναφέρεται ελλειπώς
Salu et al CytochalasinD vs control [220]	1.67±0.19 1.69±0.14 p=NS	1.80±0.20 2.22±0.21 p=NS	6.5±1.6% 4.9±2% p=NS	>90%# >90%# p=NS

*=χρήση οπτικού μικροσκοπίου, #- χρήση ηλεκτρονικού σαρωτικού μικροσκοπίου

Αν και περιορισμένη ενδοθηλιοποίηση παρατηρήθηκε σε όλες τις ομάδες με D-24851, είναι δύσκολο να συγκρίνουμε τα αποτελέσματα αυτά με άλλες μελέτες της βιβλιογραφίας αφού σε αυτές η εκτίμηση της ενδοθηλιοποίησης έγινε μόνο με οπτικό μικροσκόπιο σε μικρές μεγεθύνσεις (και επομένως είναι αρκετά υποκειμενική) και όχι με ηλεκτρονικό σαρωτικό μικροσκόπιο. Για παράδειγμα, κατά την εξέταση των δειγμάτων της ομάδας LDS σε μικρή μεγέθυνση το stent φαίνεται καλά ενδοθηλιοποιημένο και δεν υπάρχουν περιοχές ακάλυπτες παρά μόνο σε ορισμένα σημεία ακριβώς δίπλα στο stent. Αυξάνοντας διαδοχικά την μεγέθυνση όμως το ενδοθήλιο εμφανίζει ανοίγματα, τα κύτταρα σχηματίζουν μεταξύ τους ρήγματα και γενικά η εικόνα της περιοχής δείχνει φτωχή και ατελή ανάπτυξη του ενδοθηλίου καταδεικνύοντας τις ακριβείς και πολύτιμες πληροφορίες που εξάγονται με αυτή την μέθοδο και την βοήθεια τους στην τελική εκτίμηση του πόσο ασφαλές είναι το προφίλ της ουσίας. Από τις παραπάνω μελέτες μόνο ο Salu και συν. χρησιμοποίησαν παρόμοια μέθοδο για την εκτίμηση της ενδοθηλιοποίησης. Στις υπόλοιπες μελέτες αναφέρεται πλήρης ενδοθηλιοποίηση με ημιποσοτική μέθοδο κατά την οποία η εγκάρσια αγγειακή τομή χωρίζεται σε τεταρτημόρια και μετά από παρατήρηση με οπτικό μικροσκόπιο αναφέρεται απλώς η ποσοτική ύπαρξη ενδοθηλίου (25, 50, 75 ή 100%) χωρίς τη δυνατότητα περιγραφής ποιοτικών χαρακτηριστικών. Το παράδοξο είναι ότι σε όλες αυτές τις μελέτες, πλην αυτής του Touchard και συν. για το zotarolimus, ο βαθμός εναπόθεσης ινώδους, ο οποίος αποτελεί αναγνωρισμένο δείκτη φτωχής ενδοθηλιοποίησης όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, φαίνεται σημαντικά αυξημένος στις ομάδες των επικαλυμμένων stent. [Πίνακας 11]

Στους περιορισμούς της παρούσας μελέτης συμπεριλαμβάνεται το γεγονός ότι είναι πειραματική και τα αποτελέσματα δεν μπορούν άμεσα να εξαχθούν στο ανθρώπινο αγγειακό σύστημα. Όπως προαναφέρθηκε τα αποτελέσματα της in vivo μελέτης των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων της D-24851 δεν είναι αξιόπιστα και σε συμφωνία με αυτά της

in vitro μελέτης. Επίσης η αναστολή της υπερπλασίας του νεοιστού που παρατηρήθηκε στις 28 μέρες, είναι πιθανόν να μην διατηρείται περαιτέρω λόγω της καθυστερημένης ενδοθηλιοποίησης και επομένως της αυξημένης πιθανότητας δημιουργίας όψιμης θρόμβωσης.

Σε αυτή τη μελέτη η πρωτότυπη φαρμακευτική ουσία D-24851 απέδειξε σε in vitro μελέτες τις αντιυπερπλαστικές και αποπτωτικές ικανότητες της, χωρίς να επάγει την Hsp70, μια αντιαποπτωτική πρωτεΐνη η οποία αυξάνει την κυτταρική αντίσταση στους αποπτωτικούς παράγοντες. Επιπρόσθετα, τα LD επικαλυμμένα stent με D-24851 μείωσαν στατιστικά σημαντικά την υπερπλασία του νεοιστού και την επί τοις εκατό στένωση του αυλού, 28 μέρες μετά την εμφύτευση τους στη δεξιά λαγόνια αρτηρία κουνελιών. Λόγω της περιορισμένης επανενδοθηλιοποίησης, μακροπρόθεσμες μελέτες χρειάζονται για να αποδειχτεί εάν διατηρείται η ανασταλτική επίδραση αυτού του συστήματος τοπικής χορήγησης D-24851 στην υπερπλασία του νεοιστού.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΕΠΙΚΕΚΑΛΥΜΜΕΝΕΣ ΕΝΔΑΓΓΕΙΑΚΕΣ ΠΡΟΘΕΣΕΙΣ ΚΑΙ ΕΠΑΝΑΣΤΕΝΩΣΗ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΑΓΓΕΙΟΠΛΑΣΤΙΚΗ

Εισαγωγή: Η υπερπλασία του έσω χιτώνα παίζει μείζον ρόλο στην επαναστένωση (in-stent restenosis). Στην παρούσα μελέτη αξιολογήσαμε in vitro την επίδραση της D-24851 (κυτταροτοξική ουσία που σταματά τον κυτταρικό κύκλο στο στάδιο G2-M) στον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων και μελετήσαμε την ασφάλεια και την δραστηριότητα μίας ενδαγγειακής πρόθεσης (stent) επικαλυμμένης με πολυμερή ουσία που απελευθερώνει την D-24851, στην αναστολή της υπερπλασίας του έσω χιτώνα χωρίς να εμποδίζει την αναγεννητική ικανότητα του ενδοθηλίου σε in vivo πειραματικό μοντέλο.

Υλικό και Μέθοδοι: Γυμνά μεταλλικά stent (n=6), stent επικαλυμμένα μόνο με πολυμερή ουσία (polymer-coated, n=7) και stent επικαλυμμένα με πολυμερή ουσία που απελευθερώνουν $31 \pm 1 \mu\text{g}$ (low-dose, n=7), $216 \pm 8 \mu\text{g}$ (high-dose, n=6) ή $1774 \pm 39 \mu\text{g}$ (extreme-dose, n=5) της D-24851 εμφυτεύτηκαν στις μηριαίες αρτηρίες λευκών New Zealand κουνελιών. Τα πειραματόζωα θυσιάστηκαν στις 28 ημέρες για ιστομορφομετρική ανάλυση. Για την αξιολόγηση της ενδοθηλιακής αναγέννησης στις 90 ημέρες, 12 πειραματόζωα χρησιμοποιήθηκαν για την τοποθέτηση polymer-coated (n=3), low dose (n=3), high dose (n=3) or extreme dose (n=3) ενδαγγειακών προθέσεων.

Αποτελέσματα: In vitro η D-24851 αναστέλλει την υπερπλασία των λείων μυϊκών κυττάρων και επάγει την απόπτωση τους χωρίς να αυξάνει την επαγωγή της heat shock protein 70 (HSP-70), μία κυτταροπροστατευτική και αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη. Η θεραπεία με low-dose D-24851 stents συνδυάστηκε με 38% (P=0.029) μείωση της υπερπλαστικής περιοχής του έσω χιτώνα και 35% (P=0.003) μείωση της επι τοις εκατό στένωσης του αυλού σε σύγκριση με τα γυμνά μεταλλικά stents. Ο τραυματισμός και η φλεγμονή του αρτηριακού

τοιχώματος δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων. Τα επικαλυμμένα μόνο με πολυμερή ουσία stents εμφάνισαν παρόμοια ανάπτυξη νεοιστού σε σύγκριση με τα γυμνά μεταλλικά stents. Ωστόσο, όλες οι ομάδες των stents με D-24851 παρουσίασαν ατελή ενδοθηλιοποίηση συγκρινόμενα με τα polymer-coated stents.

Συμπεράσματα: Οι επικεκαλυμμένες ενδαγγειακές προσθέσεις με πολυμερή ουσία και χαμηλή δόση D-24851 μειώνουν σημαντικά την υπερπλασία του έσω χιτώνα. Λόγω της ατελούς ενδοθηλιοποίησης, μακράς διάρκειας μελέτες είναι απαραίτητες για να πιστοποιήσουν ότι η αναστολή του νεοιστού παραμένει και μετά τις 28 ημέρες.

ABSTRACT

Drug eluting stents and stent restenosis post percutaneous angioplasty

Dimitrios Lysitsas

Background: Experimental and clinical data suggest that stents eluting anti-proliferative agents can be used for the prevention of in-stent restenosis. Currently we investigated in vitro the antiproliferative and apoptotic effect of D-24851 and evaluated the safety and efficacy of D-24851-eluting polymer-coated stents in a rabbit restenosis model (n=53).

Methods and Materials: Uncoated stents (n=6), poly (DL-Lactide-co-glycolide) (PLGA)-coated stents (n=7) and PLGA-coated stents loaded with 0.08 ± 0.0025 μM [(31 \pm 1 μg), (low-dose, n=7)], 0.55 ± 0.02 μM [(216 \pm 8 μg), (high-dose, n=6)] and 4.55 ± 0.1 μM [(1774 \pm 39 μg), (extreme-dose, n=5)] of D-24851 were randomly implanted in New Zealand rabbit right iliac arteries and the animals were sacrificed after 28 days for histomorphometric analysis. For the assessment of endothelial regrowth in 90 days, 12 rabbits were subjected to PLGA-coated (n=3), low-dose (n=3), high-dose (n=3) and extreme-dose (n=3) stent implantation.

Results: In vitro studies revealed that D-24851 exerts its growth inhibitory effects via inhibition of proliferation and induction of apoptosis without increasing the expression of heat shock protein-70, a cytoprotective and anti-apoptotic protein. Treatment with low-dose D-24851 stents was the only been associated with significant reduction in neointimal area and percent stenosis when compared with bare metal stents [38% (P=0.029) and 35% (P=0.003) reduction respectively]. Suboptimal healing, however, was observed in all groups of D-24851-loaded stents in 90 days in comparison with PLGA-coated stents.

Conclusion: Low-dose D-24851 eluting polymer-coated stents significantly inhibit neointimal hyperplasia at 28 days through inhibition of proliferation and enhancement of

apoptosis. In view of the suboptimal re-endothelialization, longer-term studies are needed in order to establish whether the inhibition of intimal growth is maintained.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Fact sheet N° 317, World Health Organisation, update September 2009
2. Bauters C, Isner JM. The biology of restenosis. In: Topol EJ, ed. Textbook of Cardiovascular Medicine. Philadelphia, Pennsylvania: Lippincott-Raven; 1998:2465–2490.
3. Kurbaan AS, Bowker TJ, Ilesley CD, Rickards AF. Impact of postangioplasty restenosis on comparisons of outcome between angioplasty and bypass grafting. Coronary Angioplasty versus Bypass Revascularisation Investigation (CABRI) Investigators. Am J Cardiol. 1998;82:272-6.
4. Ruygrok PN, Serruys PW. Intracoronary Stenting: From Concept to Custom. Circulation 1996;94: 882 - 890.
5. Dotter CT. Transluminally placed coil-spring endarterial tube grafts: long-term patency in canine popliteal artery. Invest Radiol. 1969;4:329-332.
6. Dotter CT, Buschmann RW, McKinney MK, Rosch J. Transluminal expandable nitinol coil stent grafting: preliminary report. Radiology. 1983;147(1):259-60.
7. Cragg A, Lund G, Rysavy J, Castaneda F, Castaneda-Zuniga WR, Amplatz K. Nonsurgical placement of arterial endoprostheses: a new technique using nitinol wire. Radiology 1983;147: 261–263.
8. Kutryk MJB, Serruys PW: Historical Overview. Coronary Stenting, Current Perspective, Martin Dunitz, 1999; pp: 1-14.
9. Sigwart U, Puel J, Mirkovitch V, Joffre F, Kappenberger L. Intravascular stents to prevent occlusion and restenosis after transluminal angioplasty. N Engl J Med. 1987;316:701-706.

10. Serruys PW, Strauss BH, Beatt KJ, Bertrand ME, Puel J, Rickards AF, Meier B, Goy JJ, Vogt P, Kappenberger L, Sigwart U. Angiographic follow-up after placement of a self-expanding coronary artery stent. *N Engl J Med* 1991;324:13-17.
11. Roubin GS, Cannon AD, Agrawal SK, Macander PJ, Dean LS, Baxley WA, Breland J. Intracoronary stenting for acute and threatened closure complicating percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Circulation*. 1992;85:916-927.
12. Schatz RA, Baim DS, Leon M, Ellis SG, Goldberg S, Hirshfeld JW, Cleman MW, Cabin HS, Walker C, Stagg J, Buchbinder M, Teirstein PS, Topol EJ, Savage M, Perez JA, Curry C, Whitworth H, Sousa JE, Tio F, Almagor Y, Ponder R, Penn IM, Leonard B, Levine SL, Fish D, Palmaz JC. Clinical experience with the Palmaz-Schatz coronary stent: initial results of a multicenter study. *Circulation*. 1991;83:148-161.
13. Serruys PW, de Jaegere P, Kiemeneij F, Macaya C, Rutsch W, Heyndrickx G, Emanuelsson H, Marco J, Legrand V, Materne P, Belardi J, Sigwart U, Colombo A, Goy JJ, van den Heuvel P, Delcan J, Morel MA, for the Benestent Study Group. A comparison of balloon-expandable stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med*.. 1994;331:489-495.
14. Fischman DL, Leon M, Baim DS, Schatz RA, Savage MP, Penn I, Detre K, Veltri L, Ricci D, Nobuyoshi M, Cleman M, Heuser R, Almond D, Teirstein PS, Fish D, Colombo A, Brinker J, Moses J, Shaknovich A, Hirshfeld J, Bailey S, Ellis S, Rake R, Goldberg S, for the Stent Restenosis Study Investigators. A randomized comparison of coronary stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. *N Engl J Med*. 1994;331:496-501.
15. Ischinger TA. Antithrombotics in interventional cardiology: optimizing treatment and strategies. *Am J Cardiol*. 1998;82:25L-28L.

16. Williams DO et al. Percutaneous coronary intervention in the current era compared with 1985-1986: the NHLBI Registries. *Circulation* 2000;102:2945-51.
17. Arjomand H, Turi ZG, McCormick D, Goldberg S. Percutaneous coronary intervention: historical perspectives, current status, and future directions. *Am Heart J.* 2003;146(5):787-96.
18. Grech ED. ABC of interventional cardiology: percutaneous coronary intervention. I: history and development. *BMJ.* 2003;326:1080-2.
19. Schwartz RS. Animal models of human coronary restenosis. In Topol EJ, ed. *Textbook of Interventional Cardiology.* 2nd ed. Philadelphia, PA: W.B. Saunders, 1994:365–81.
20. Holmes Jr. DR, Vlietstra RE, Smith HC, Vetrovec GW, Kent KM, Cowley MJ, Faxon DP, Gruentzig AR, Kelsey SF, Detre KM. Restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty (PTCA): a report from the PTCA Registry of the National Heart, Lung, and Blood Institute. *Am J Cardiol* 1984;53:77C–81C.
21. Karas S, Gravanis M, Santoian E, Robinson KA, Anderberg K, King SB. Coronary intimal proliferation after balloon injury and stenting in swine: an animal model of restenosis. *J Am Coll Cardiol* 1992;20:467–474.
22. den Heijer P, Foley D, Escaned J, Hillege H, van Dijk R, Serruys P, Lie K. Angioscopic versus angiographic detection of intimal dissection and intracoronary thrombus. *J Am Coll Cardiol* 1994;24:649–654.
23. Wilensky R, March K, Graduspizlo I, Sandusky G, Fineberg N, Hathaway D. Vascular injury, repair, and restenosis after percutaneous transluminal angioplasty in the atherosclerotic rabbit. *Circulation* 1995; 92:2995–3005.
24. Losordo DW, Rosenfield K, Pieczek A, Baker K, Harding M, Isner JM. How does angioplasty work? Serial analysis of human iliac arteries using intravascular ultrasound. *Circulation* 1992;86:1845– 1858.

25. Potkin BN, Keren G, Mintz GS, Douek PC, Pichard AD, Satler LF, Kent KM, Leon MB. Arterial responses to balloon coronary angioplasty: an intravascular ultrasound study. *J Am Coll Cardiol* 1992;20: 942–951.
26. Tenaglia AN, Buller CE, Kisslo KB, Stack RS, Davidson CJ. Mechanisms of balloon angioplasty and directional coronary atherectomy as assessed by intracoronary ultrasound. *J Am Coll Cardiol* 1992;20:685–691.
27. The SH, Gussenhoven EJ, Zhong Y, Li W, van Egmond F, Pieterman H, van Urk H, Gerritsen GP, Borst C, Wilson RA. Effect of balloon angioplasty on femoral artery evaluated with intravascular ultrasound imaging. *Circulation* 1992;86:483–493.
28. Mintz GS, Pichard AD, Kent KM, Satler LF, Popma JJ, Leon MB. Axial plaque redistribution as a mechanism of percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Am J Cardiol* 1996;77:427–430.
29. Ahmed JM, Mintz GS, Weissman NJ, Lansky AJ, Pichard AD, Satler LF, Kent KM. Mechanism of lumen enlargement during intracoronary stent implantation: an intravascular ultrasound study. *Circulation* 2000;102:7–10.
30. Sangiorgi G, Taylor AJ, Farb A, Carter AJ, Edwards WD, Holmes DR, Schwartz RS, Virmani R. Histopathology of postpercutaneous transluminal coronary angioplasty remodeling in human coronary arteries. *Am Heart J* 1999;138:681–687.
31. Prati F, Di Mario C, Moussa I, Reimers B, Mallus MT, Parma A, Lioy E, Colombo A. In-stent neointimal proliferation correlates with the amount of residual plaque burden outside the stent: an intravascular ultrasound study. *Circulation* 1999;99:1011–1014.
32. Schwartz RS, Huber KC, Murphy JG, Edwards WD, Camrud AR, Vlietstra RE, Holmes DR. Restenosis and the proportional neointimal response to coronary artery injury: results in a porcine model. *J Am Coll Cardiol* 1992;19:267–274.

33. Rensing BJ, Hermans WR, Strauss BH, Serruys PW. Regional differences in elastic recoil after percutaneous transluminal coronary angioplasty: a quantitative angiographic study. *J Am Coll Cardiol* 1991;17:34B-38B.
34. Nobuyoshi M, Kimura T, Nosaka H, Mioka S, Ueno K, Yokoi H, Hamasaki N, Horiuchi H, Ohishi H. Restenosis after successful percutaneous transluminal coronary angioplasty: serial angiographic follow-up of 229 patients. *J Am Coll Cardiol* 1988;12:616-623.
35. Ardissino D, Di Somma S, Kubica J, Barberis P, Merlini PA, Eleuteri E, De Servi S, Bramucci E, Specchia G, Montemartini C. Influence of elastic recoil on restenosis after successful coronary angioplasty in unstable angina pectoris. *Am J Cardiol* 1993;71:659-663.
36. Rodriguez A, Santaera O, Larribeau M, Sosa MI, Palacios IF. Early decrease in minimal luminal diameter after successful percutaneous transluminal coronary angioplasty predicts late restenosis. *Am J Cardiol* 1993;71:1391-1395.
37. Haude M, Erbel R, Issa H, Meyer J. Quantitative analysis of elastic recoil after balloon angioplasty and after intracoronary implantation of balloon-expandable Palmaz-Schatz stents. *J Am Coll Cardiol* 1993;21:26-34.
38. Pakala R, Willerson JT, Benedict CR. Effect of serotonin, thromboxane A₂, and specific receptor antagonists on vascular smooth muscle cell proliferation. *Circulation* 1997;96:2280-2286.
39. Chandrasekar B, Tanguay JF. Platelets and restenosis. *J Am Coll Cardiol*. 2000;35:555-62.
40. Harker LA. Role of platelets and thrombosis in mechanisms of acute occlusion and restenosis after angioplasty. *Am J Cardiol* 1987;60:20B-28B.
41. Heras M, Chesebro JH, Penny WJ, Bailey KR, Badimon L, Fuster V. Effects of thrombin inhibition on the development of acute platelet-thrombus deposition during angioplasty in

- pigs. Heparin versus recombinant hirudin, a specific thrombin inhibitor. *Circulation* 1989;79:657–665.
42. Uchida Y, Hasegawa K, Kawamura K, Shibuya I. Angioscopic observation of the coronary luminal changes induced by percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Am Heart J* 1989;117:769–776.
43. Chesebro JH, Lam JY, Badimon L, Fuster V. Restenosis after arterial angioplasty: a hemorrheologic response to injury. *Am J Cardiol* 1987;60:10B–16B.
44. Ip JH, Fuster V, Badimon L, Badimon J, Taubman MB, Chesebro JH. Syndromes of accelerated atherosclerosis: role of vascular injury and smooth muscle cell proliferation. *J Am Coll Cardiol* 1990;15:1667–1687
45. Bauters C, Lablanche JM, McFadden EP, Hamon M, Bertrand ME. Relation of coronary angioscopic findings at coronary angioplasty to angiographic restenosis. *Circulation* 1995;92:2473–2479.
46. Violaris AG, Melkert R, Herrman JP, Serruys PW. Role of angiographically identifiable thrombus on long-term luminal renarrowing after coronary angioplasty: a quantitative angiographic analysis. *Circulation* 1996;93:889–897.
47. Farb A, Sangiorgi G, Carter AJ, Walley VM, Edwards WD, Schwartz RS, Virmani R. Pathology of acute and chronic coronary stenting in humans. *Circulation* 1999;99:44–52.
48. Grewe PH, Deneke T, Machraoui A, Barmeyer J, Muller KM. Acute and chronic tissue response to coronary stent implantation: pathologic findings in human specimen. *J Am Coll Cardiol* 2000;35:157–163.
49. Komatsu R, Ueda M, Naruko T, Kojima A, Becker AE. Neointimal tissue response at sites of coronary stenting in humans: macroscopic, histological, and immunohistochemical analyses. *Circulation* 1998;98:224–233.

50. Speidel CM, Eisenberg PR, Ruf W, Edgington TS, Abendschein DR. Tissue factor mediates prolonged procoagulant activity on the luminal surface of balloon-injured aortas in rabbits. *Circulation* 1995;92:3323-3330.
51. Wilcox J, Smith K, Schwartz S, Gordon D. Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:2839–2843.
52. Asada Y, Hara S, Tsuneyoshi A, Hatakeyama K, Kisanuki A, Marutsuka K, Sato Y, Kamikubo Y, Sumiyoshi A. Fibrin-rich and platelet-rich thrombus formation on neointima: recombinant tissue factor pathway inhibitor prevents fibrin formation and neointimal development following repeated balloon injury of rabbit aorta. *Thromb Haemost* 1998;80:506–511.
53. Rekhter MD, O'Brien E, Shah N, Schwartz SM, Simpson JB, Gordon D. The importance of thrombus organization and stellate cell phenotype in collagen I gene expression in human, coronary atherosclerotic and restenotic lesions. *Cardiovasc Res* 1996;32:496–502.
54. Gasic GP, Arenas CP, Gasic TB, Gasic GJ. Coagulation factors X, Xa, and protein S as potent mitogens of cultured aortic smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:2317–2320.
55. Bar SR, Benezra M, Eldor A, Hy AE, Fenton JD, Wilner GD, Vlodavsky I. Thrombin immobilized to extracellular matrix is a potent mitogen for vascular smooth muscle cells: nonenzymatic mode of action. *Cell Regul* 1990;1:453–463.
56. Ragosta M, Gimple LW, Gertz SD, Dunwiddie CT, Vlasuk GP, Haber HL, Powers ER, Roberts WC, Sarembock IJ. Specific factor Xa inhibition reduces restenosis after balloon angioplasty of atherosclerotic femoral arteries in rabbits. *Circulation* 1994;89:1262–1271.
57. Kastrati A, Schühlen H, Hausleiter J, Walter H, Zitzmann-Roth E, Hadamitzky M, Elezi S, Ulm K, Dirschinger J, Neumann FJ, Schomig A. Restenosis after coronary stent

placement and randomization to a 4-week combined antiplatelet or anticoagulant therapy: six-month angiographic follow-up of the Intracoronary Stenting and Antithrombotic Regimen (ISAR) Trial. *Circulation*. 1997;96:462-7

58. Garachemani AR, Fleisch M, Windecker S, Pfiffner D, Meier B. Heparin and coumadin versus acetylsalicylic acid for prevention of restenosis after coronary angioplasty. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2002;55:315-20.
59. Serruys P, Herrman J, Simon R, Rutsch W, Bode C, Laarman G, van-Dijk R, for the HELVETICA Investigators. A comparison of hirudin with heparin in the prevention of restenosis after PTCA. *N Engl J Med*. 1995;333:757-763.
60. Liu MW, Roubin GS, King SB. Restenosis after coronary angioplasty. Potential biologic determinants and role of intimal hyperplasia. *Circulation* 1989;79:1374-1387.
61. Miano JM, Tota RR, Vlastic N, Danishefsky KJ, Stemerman MB. Early proto-oncogene expression in rat aortic smooth muscle cells following endothelial removal. *Am J Pathol* 1990;137:761-765.
62. Bauters C, de Groote P, Adamantidis M, Delcayre C, Hamon M, Lablanche JM, Bertrand ME, Dupuis B, Swynghedauw B. Proto-oncogene expression in rabbit aorta after wall injury. First marker of the cellular process leading to restenosis after angioplasty? *Eur Heart J* 1992;13:556-559.
63. Garratt KN, Edwards WD, Kaufmann UP, Vlietstra RE, Holmes DRJ. Differential histopathology of primary atherosclerotic and restenotic lesions in coronary arteries and saphenous vein bypass grafts: analysis of tissue obtained from 73 patients by directional atherectomy. *J Am Coll Cardiol* 1991;17:442-448.
64. Nobuyoshi M., Kimura T, Ohishi H, Horiuchi H, Nosaka H, Hamasaki N, Yokoi H, Kim K. Restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty: pathologic observations in 20 patients. *J Am Coll Cardiol*. 1991;17:433-439.

65. Hanke H, Strohschneider T, Oberhoff M, Betz E, Karsch KR. Time course of smooth muscle cell proliferation in the intima and media of arteries following experimental angioplasty. *Circ Res.* 1990;67:651-9.
66. Darts PC, Voisard R, Betz E. In vitro growth characteristics of human atherosclerotic plaque cells: comparison of cells from primary stenosing and restenosing lesions of peripheral and coronary arteries. *Res Exp Med Berl* 1990;190:77-87.
67. MacLeod DC, Strauss BH, de Jong M, Escaned J, Umans VA, van Suylen RJ, Verkerk A, de Foyter PJ, Serruys PW. Proliferation and extracellular matrix synthesis of smooth muscle cells cultured from human coronary atherosclerotic and restenotic lesions. *J Am Coll Cardiol* 1994;23:59-65.
68. O'Brien ER, Alpers CE, Stewart DK, Ferguson M, Tran N, Gordon D, Benditt EP, Hinohara T, Simpson JB, Schwartz SM. Proliferation in primary and restenotic coronary atherectomy tissue. Implications for antiproliferative therapy. *Circ Res* 1993;73:223-2231.
69. Ciezki JP, Hafeli UO, Song P, Urankar-Nagy N, Ratliff NB, Rybicki L, Brill K, Meier D. Parenchymal cell proliferation in coronary arteries after percutaneous transluminal coronary angioplasty: a human tissue bank study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999;45:963-968.
70. Moreno PR, Palacios IF, Leon MN, Rhodes J, Fuster V, Fallon JT. Histopathologic comparison of human coronary in-stent and post-balloon angioplasty restenotic tissue. *Am J Cardiol* 1999;84:462-466.
71. Wei GL, Krasinski K, Kearney M, Isner JM, Walsh K, Andres V. Temporally and spatially coordinated expression of cell cycle regulatory factors after angioplasty. *Circ Res* 1997;80:418-426.

72. Gordon PC, Gibson CM, Cohen DJ, Carrozza JP, Kuntz RE, Baim DS. Mechanisms of restenosis and redilation within coronary stents—quantitative angiographic assessment. *J Am Coll Cardiol* 1993;21:1166–1174.
73. Hoffmann R, Mintz GS, Dussailant GR, Popma JJ, Pichard AD, Satler LF, Kent KM, Griffin J, Leon MB. Patterns and mechanisms of in-stent restenosis. A serial intravascular ultrasound study. *Circulation* 1996;94:1247–1254.
74. Kornowski R, Mintz GS, Kent KM, Pichard AD, Satler LF, Bucher TA, Hong MK, Popma JJ, Leon MB. Increased restenosis in diabetes mellitus after coronary interventions is due to exaggerated intimal hyperplasia. A serial intravascular ultrasound study. *Circulation* 1997;95:1366–1369.
75. Mudra H, Regar E, Klauss V, Werner F, Henneke KH, Sbarouni E, Theisen K. Serial follow-up after optimized ultrasoundguided deployment of Palmaz-Schatz stents. In-stent neointimal proliferation without significant reference segment response. *Circulation* 1997;95:363–370.
76. Arakawa K, Isoda K, Sugiyabu Y, Fukuda M, Nishizawa K, Shibuya T, Nakamura H. Intimal proliferation after stenting reflected by increased stent-to-vessel cross-sectional area ratio: serial intravascular ultrasound study. *J Cardiol* 1998;32:379–389.
77. Asakura M, Ueda Y, Nanto S, Hirayama A, Adachi T, Kitakaze M, Hori M, Kodama K. Remodeling of in-stent neointima, which became thinner and transparent over 3 years: serial angiographic and angioscopic follow-up. *Circulation* 1998;97:2003–2006.
78. Strauss BH, Umans VA, van Suylen RJ, de Feyter PJ, Marco J, Robertson GC, Renkin J, Heyndrickx G, Vuzevski VD, Bosman FT, Serruys P. Directional atherectomy for treatment of restenosis within coronary stents: clinical, angiographic and histologic results. *J Am Coll Cardiol* 1992;20:1465–1473.

79. Yutani C, Ishibashi-Ueda H, Suzuki T, Kojima A. Histologic evidence of foreign body granulation tissue and de novo lesions in patients with coronary stent restenosis. *Cardiology* 1999;92:171–177.
80. Tyagi SC, Meyer L, Schmaltz RA, Reddy HK, Voelker DJ. Proteinases and restenosis in the human coronary artery: extracellular matrix production exceeds the expression of proteolytic activity. *Atherosclerosis* 1995;116:43–57.
81. Schwartz RS, Holmes DR Jr, Topol EJ. The restenosis paradigm revisited: an alternative proposal for cellular mechanisms. *J Am Coll Cardiol* 1992;20:1284–1293.
82. Riessen R, Isner JM, Blessing E, Loushin C, Nikol S, Wight TN. Regional differences in the distribution of the proteoglycans biglycan and decorin in the extracellular matrix of atherosclerotic and restenotic human coronary arteries. *Am J Pathol* 1994;144:962–974.
83. Matsaura R, Isaka N, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Sakakur T, Nakano T. Deposition of PG-M/versican is a major cause of human coronary restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *J Pathol* 1996;180:311–316.
84. Folkow B. The Benjamin W. Zweifach Award lecture. Functional and structural “autoregulation”—some personal considerations concerning the century-old development of these microvascular concepts. *Microvasc Res* 1989;37:242–255.
85. Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 1987;316:1371–1375.
86. Kakuta T, Currier JW, Haudenschild CC, Ryan TJ, Faxon DP. Differences in compensatory vessel enlargement, not intimal formation, account for restenosis after angioplasty in the hypercholesterolemic rabbit model. *Circulation* 1994;89:2809–2815.
87. Post MJ, Borst C, Kuntz RE. The relative importance of arterial remodeling compared with intimal hyperplasia in lumen renarrowing after balloon angioplasty. A study in the

normal rabbit and the hypercholesterolemic Yucatan micropig. *Circulation* 1994;89:2816–2821.

88. Lafont A, Guzman L, Whitlow P, Goormastic M, Cornhill J, Chisolm G. Restenosis after experimental angioplasty — intimal, medial, and adventitial changes associated with constrictive remodeling. *Circ Res* 1995;76:996–1002.
89. de Smet BJ, van der Zande J, van der Helm YJ, Kuntz RE, Borst C, Post MJ. The atherosclerotic Yucatan animal model to study the arterial response after balloon angioplasty: the natural history of remodeling. *Cardiovasc Res* 1998;39:224–232.
90. de Smet B, Pasterkamp G, van der helm Y, Borst C, Post M. The relation between de novo atherosclerosis remodelling and angioplasty-induced remodelling in an atherosclerotic Yucatan micropig model. *Artheroscler Thromb* 1998;18:702–707.
91. Waller BF, Pinkerton CA, Orr CM, Slack JD, VanTassel JW, Peters T. Restenosis 1 to 24 months after clinically successful coronary balloon angioplasty: a necropsy study of 20 patients. *J Am Coll Cardiol* 1991;17:58B– 70B.
92. Mintz GS, Popma JJ, Pichard AD, Kent KM, Satler LF, Wong C, Hong MK, Kovach JA, Leon MB. Arterial remodeling after coronary angioplasty. A serial intravascular ultrasound study. *Circulation* 1996;94:35–43.
93. Mintz GS, Popma JJ, Pichard AD, Kent KM, Satler LF, Hong MK, Leon MB. Intravascular ultrasound assessment of the mechanisms and predictors of restenosis following coronary angioplasty. *J Invasive Cardiol* 1997;9:303–314.
94. Birnbaum Y, Fishbein MC, Luo H, Nishioka T, Siegel RJ. Regional remodeling of atherosclerotic arteries: a major determinant of clinical manifestations of disease. *J Am Coll Cardiol* 1997;30:1149–1164.

95. Nakamura Y, Zhao H, Yutani C, Imakita M, Ishibashi-Ueda H. Morphometric and histologic assessment of remodeling associated with restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Cardiology* 1998;90:115–121.
96. Slomp J, van Munsteren JC, Poelman RE, de Reeder EG, Bogers AC, Gittenberger-de-Groot AC. Formation of intimal cushions in the ductus arteriosus as a model for vascular intimal thickening. An immunohistochemical study of changes in extracellular matrix components. *Atherosclerosis* 1992;93:25–39.
97. Cho A, Courtman D, Langille L. Apoptosis (programmed cell death) in arteries of the neonatal lamb. *Circ Res* 1995;76:168–175.
98. Cho A, Mitchell L, Koopmans D, Langille BL. Effects of changes in blood flow rate on cell death and cell proliferation in carotid arteries of immature rabbits. *Circ Res* 1997;81:328–337.
99. Guarda E, Katwa LC, Campbell SE, Tanner MA, Webel RM, Laughlin H, Jenkins S, Myers PR. Extracellular matrix collagen synthesis and degradation following coronary balloon angioplasty. *J Mol Cell Cardiol* 1996;28:699–706.
100. Chen YH, Chen YL, Lin SJ, Chou CY, Mar GY, Chang MS, Wang SP. Electron microscopic studies of phenotypic modulation of smooth muscle cells in coronary arteries of patients with unstable angina pectoris and postangioplasty restenosis. *Circulation* 1997;95:1169–1175.
101. Lafont A, Durand E, Samuel JL, Besse B, Addad F, Levy BI, Desnos M, Guerot C, Boulanger CM. Endothelial dysfunction and collagen accumulation: two independent factors for restenosis and constrictive remodeling after experimental angioplasty. *Circulation* 1999;100:1109–1115.
102. de Smet BJ, de Kleijn D, Hanemaaijer R, Verheijen JH, Robertus L, van Der Helm YJ, Borst C, Post MJ. Metalloproteinase inhibition reduces constrictive arterial remodeling

- after balloon angioplasty: a study in the atherosclerotic Yucatan micropig. *Circulation* 2000;101:2962–2967.
103. Scott NA, Cipolla GD, Ross CE, Dunn B, Martin FH, Simonet JN, Wilcox JN. Identification of a potential role for the adventitia in vascular lesion formation after balloon overstretch injury of porcine coronary arteries. *Circulation* 1996;93:2178–2187.
104. Shi Y, O'Brien J, Fard A, Mannion J, Wang D, Zalewsky A. Adventitial myofibroblasts contribute to neointimal formation in injured porcine coronary arteries. *Circulation* 1996;94:1655–1664.
105. Shi Y, Pieniek M, Fard A, O'Brien J, Mannion J, Zalewski A. Adventitial remodeling after coronary arterial injury. *Circulation* 1996;93:340–348.
106. Waksman R, Rodriguez JC, Robinson KA, Cipolla GD, Crocker IR, Scott NA, King SB, Wilcox JN. Effect of intravascular irradiation on cell proliferation, apoptosis, and vascular remodeling after balloon overstretch injury of porcine coronary arteries. *Circulation* 1997;96:1944–1952.
107. Labinaz M, Pels K, Hoffert C, Aggarwal S, O'Brien ER. Time course and importance of neoadventitial formation in arterial remodeling following balloon angioplasty of porcine coronary arteries. *Cardiovasc Res* 1999;41:255–266.
108. Yee KO, Schwartz SM. Why atherosclerotic vessels narrow: the fibrin hypothesis. *Thromb Haemost* 1999;82:762–771.
109. Libby P, Schwartz E, Brogi H, Tanaka H, Clinton SK. A cascade model for restenosis: a special case of atherosclerosis progression. *Circulation* 1992;86 Suppl III:III-47–52.
110. Tanaka H, Sukhova GK, Swanson SJ, et al. Sustained activation of vascular cells and leukocytes in the rabbit aorta after balloon injury. *Circulation* 1993;88:1788–1803.

111. Kornowski R, Hong MK, Tio FO, Bramwell O, Wu H, Leon MB. In-stent restenosis: contributions of inflammatory responses and arterial injury to neointimal hyperplasia. *J Am Coll Cardiol.* 1998;31:224-30.
112. Joner M, Finn AV, Farb A, Mont EK, Kolodgie FD, Ladich E, Kutys R, Skorija K, Gold HK, Virmani R. Pathology of drug-eluting stents in humans: delayed healing and late thrombotic risk. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48:193–202.
113. Marx SO, Jayaraman T, Go LO, Marks AR. Rapamycin-FKBP inhibits cell cycle regulators of proliferation in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1995;76:412–417.
114. Matter CM, Rozenberg I, Jaschko A, Greutert H, Kruz DJ, Wnendt S, Kuttler B, Joch H, Grunenfelder J, Zund G, Tanner FC, Luscher TF. Effects of tacrolimus or sirolimus on proliferation of vascular smooth muscle and endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2006;48:286–292.
115. Parry TJ, Brosius R, Thyagarajan R, Carter D, Argentieri D, Falotico R, Siekierka J. Drug-eluting stents: sirolimus and paclitaxel differentially affect cultured cells and injured arteries. *Eur J Pharmacol.* 2005;524:19–29.
116. Guagliumi G, Farb A, Musumeci G, Valsecchi O, Tsepili M, Motta T, Virmani R. Images in cardiovascular medicine: sirolimus-eluting stent implanted in human coronary artery for 16 months: pathological findings. *Circulation.* 2003;107:13401341
117. Butzal M, Loges S, Schweizer M, Fischer U, Gehling UM, Hossfeld DK, Fiedler W. Rapamycin inhibits proliferation and differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. *Exp Cell Res.* 2004;300:65–71.
118. Urao N, Okigaki M, Yamada H, Aadachi Y, Matsuno K, Matsui A, Matsunaga S, Tateishi K, Nomura T, Takahashi T, Tatsumi T, Matsubara H. Erythropoietin-mobilized endothelial progenitors enhance reendothelialization via Akt-endothelial nitric oxide synthase activation and prevent neointimal hyperplasia. *Circ Res.* 2006;98:1405–1413.

119. Suzuki T, Kopia G, Hayashi S, et al. Stent-based delivery of sirolimus reduces neointimal formation in a porcine coronary model. *Circulation* 2001;104:1188 –1193.
120. Finn AV, Kolodgie FD, Harnek J, Guerrero LJ, Acampado E, Tefera K, Skorija K, Weber DK, Gold HK, Virmani R. Differential response of delayed healing and persistent inflammation at sites of overlapping sirolimus- or paclitaxel-eluting stents. *Circulation*. 2005;112:270–278.
121. Farb A, Burke AP, Kolodgie FD, Virmani R. Pathological mechanisms of fatal late coronary stent thrombosis in humans. *Circulation*. 2003;108:1701-6
122. Matsumoto D, Shite J, Shinke T, Otake H, Tanino Y, Ogasawara D, Sawada T, Paredes OL, Hirata K, Yokoyama M. Neointimal coverage of sirolimus-eluting stents at 6-month follow-up: evaluated by optical coherence tomography. *Eur Heart J*. 2007;28:961-7.
123. Nordmann AJ, Briel M, Bucher HC. Mortality in randomized controlled trials comparing drug-eluting vs. bare metal stents in coronary artery disease: a meta-analysis. *Eur Heart J* 2006;27:2784-814.
124. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biologic phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26:239–257
125. Rowan S, Fisher DE. Mechanisms of apoptotic cell death. *Leukemia*. 1997;11:457–465
126. Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1995;11:73–91
127. Yao M, Keogh A, Spratt P, dos Remedios CG, Kiessling PC. Elevated DNase I levels in human idiopathic dilated cardiomyopathy: an indicator of apoptosis? *J Mol Cell Cardiol*. 1996;28:95–101
128. Cheng W, Kajstura J, Nitahara JA, Li B, Reiss K, Liu Y, Clark WA, Krajewski S, Reed JC, Olivetti G, Anversa P. Programmed myocyte cell death affects the viable myocardium after infarction in rats. *Exp Cell Res*. 1996;226:316–327.

129. James TN. Long reflections on the QT interval: the sixth annual Gordon K. Moe Lecture. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 1996;7:738–759.
130. James TN, St Martin E, Willis PW 3rd, Lohr TO. Apoptosis as a possible cause of gradual development of complete heart block and fatal arrhythmias associated with absence of the AV node, sinus node, and internodal pathways. *Circulation.* 1996;93:1424–1438
131. Bochaton-Piallat ML, Gabbiani F, Redard M, Desmouliere A, Gabbiani G. Apoptosis participates in cellular regulation during rat aortic intimal thickening. *Am J Pathol.* 1995;146:1059–1064
132. Dong C, Wilson JE, Winters GL, McManus BM. Human transplant coronary artery disease: pathologic evidence for Fas mediated apoptotic cytotoxicity in allograft arteriopathy. *Lab Invest.* 1996;74:921–931
133. Perlman H, Maillard L, Krasinski K, Walsh K. Evidence for the rapid onset of apoptosis in medial smooth muscle cells following balloon injury. *Circulation.* 1997;95:981–987
134. Perlman H, Maillard L, Krasinski K, Walsh K. Evidence for the rapid onset of apoptosis in medial smooth muscle cells following balloon injury. *Circulation.* 1997;95:981–987
135. Miwa K, Asano M, Horai R, Iwakura Y, Nagata S, Suda T. Caspase 1-independent IL-1 β release and inflammation induced by the apoptosis inducer Fas ligand. *Nat Med.* 1998;4:1287–1292
136. Han DKM, Haudenschild CC, Hong MK, Tinkle BT, Leon MB, Liao G. Evidence for apoptosis in human atherogenesis and in a rat vascular injury model. *Am J Pathol.* 1995;147:267–277
137. Rivard A, Luo Z, Perlman H, Fabre JE, Nguyen T, Maillard L, Walsh K. Early cell loss after angioplasty results in a disproportionate decrease in percutaneous gene transfer to the vessel wall. *Hum Gene Ther.* 1999;10:711–721

138. Pollman MJ, Hall ZL, Mann MJ, Zhang L, Gibbons GH. Inhibition of neointimal cell *bcl-x* expression induces apoptosis and regression of vascular disease. *Nat Med.* 1998;4:222–227
139. Song JM, Kim HS, Rhee MY, Chae IH, Sohn DW, Oh BH, Lee MM, Park YB, Choi YS, Lee YW. Effect of hypercholesterolemia on the sequential changes of apoptosis and proliferation after balloon injury to rabbit iliac artery. *Atherosclerosis.* 2000;150:309–320
140. Kollum M, Kaiser S, Kinscherf R, Metz J, Kubler W, Hehrlein C. Apoptosis after stent implantation compared with balloon angioplasty in rabbits. Role of macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:2382–2388
141. Beohar N, Flaherty JD, Davidson CJ, Maynard RC, Robbins JD, Shah AP, Choi JW, MacDonald LA, Jorgensen JP, Pinto JV, Chandra S, Klaus HM, Wang NC, Harris KR, Decker R, Bonow RO. Antirestenotic effects of a locally delivered caspase inhibitor in a balloon injury model. *Circulation.* 2004;109:108-13.
142. Mosser DD, Caron AW, Bourget L, et al. Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 1997;17:5317-5327.
143. Kwak HJ, Jun CD, Pae HO, et al. The role of inducible 70-kDa heat shock protein in cell cycle control, differentiation, and apoptotic cell death of the human myeloid leukemic HL-60 cells. *Cell Immunol* 1998;187:1-12.
144. Lee WC, Lin KY, Chen KD, et al. Induction of HSP70 is associated with vincristine resistance in heat-shocked 9L rat brain tumor cells. *Br J Cancer* 1992;66:653-659
145. Ito H, Shimojo T, Fujisaki H, et al. Thermal pre-conditioning protects rat cardiac muscle cells from doxorubicin-induced apoptosis. *Life Sci* 1999;64:755-761.
146. Coats WD Jr, Whittaker P, Cheung DT, Currier JW, Han B, Faxon DP. Collagen content is significantly lower in restenotic versus nonrestenotic vessels after balloon angioplasty in the atherosclerotic rabbit model. *Circulation* 1997;95:1293–1300.

147. Andersen HR, Maeng M, Thorwest M, Falk E. Remodeling rather than neointimal formation explains luminal narrowing after deep vessel wall injury — Insights from a porcine coronary (re)stenosis model. *Circulation* 1996;93:1716–1724.
148. Geary RL, Williams JK, Golden D, Brown DG, Benjamin ME, Adams MR. Time course of cellular proliferation, intimal hyperplasia, and remodeling following angioplasty in monkeys with established atherosclerosis. A nonhuman primate model of restenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:34–43.
149. Gertz SD, Gimple LW, Banai S, Ragosta M, Powers ER, Roberts WC, Perez LS, Sarembock IJ. Geometric remodeling is not the principal pathogenetic process in restenosis after balloon angioplasty. Evidence from correlative angiographic-histomorphometric studies of atherosclerotic arteries in rabbits. *Circulation* 1994;90:3001–3008.
150. Kakuta T, Currier JW, Haudenschild CC, Ryan TJ, Faxon DP. Differences in compensatory vessel enlargement, not intimal formation, account for restenosis after angioplasty in the hypercholesterolemic rabbit model. *Circulation* 1994;89:2809–2815.
151. Post MJ, Borst C, Kuntz RE. The relative importance of arterial remodeling compared with intimal hyperplasia in lumen renarrowing after balloon angioplasty. A study in the normal rabbit and the hypercholesterolemic Yucatan micropig. *Circulation* 1994;89:2816–2821.
152. Virmani R, Kolodgie FD, Farb A, Lafont A. Drug eluting stents: are human and animal studies comparable? *Heart*. 2003;89:133-8.
153. Schwartz RS, Edelman ER, Carter A, Chronos N, Rogers C, Robinson KA, Waksman R, Weinberger J, Wilensky RL, Jensen DN, Zuckerman BD, Virmani R; Consensus Committee. Drug-eluting stents in preclinical studies: recommended evaluation from a consensus group. *Circulation*. 2002;106:1867-73.

154. Vidal A, Koff A. Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause. *Gene*. 2000;247:1-15.
155. Kiyokawa H, Kineman RD, Manova-Todorova KO, Soares VC, Hoffman ES, Ono M, Khanam D, Hayday AC, Frohman LA, Koff A. Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27(Kip1). *Cell*. 1996;85:721-32.
156. Harbour JW, Dean DC. The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev*. 2000;14:2393-409.
157. Perlman H, Suzuki E, Simonson M, et al. GATA-6 induces p21(Cip1) expression and G1 cell cycle arrest. *J Biol Chem*. 1998;273:13713–13718.
158. Smith RC, Branellec D, Gorski DH, et al. p21CIP1-mediated inhibition of cell proliferation by overexpression of the *gax* homeodomain gene. *Genes Dev*. 1997;11:1674–1689.
159. Tanner F, Yang Z, Duckers E, et al. Expression of cyclin dependent kinase inhibitors in vascular disease. *Circ Res*. 1998;82:396–403.
160. Wei GL, Krasinski K, Kearney M, et al. Temporally and spatially coordinated expression of cell cycle regulatory factors after angioplasty. *Circ Res*. 1997;80:418–426.
161. Leon MB, Teirstein PS, Moses JW, Tripuraneni P, Lansky A, Janis S, et al: Localized intracoronary gamma radiation therapy to inhibit the recurrence of restenosis after stenting. *N Engl J Med* 2001;344:250-256.
162. Waksman R, Raizner A, Yeung AC, Lansky A, Vandertie L for the INHIBIT Investigators: Use of localized intracoronary beta-radiation in treatment of in-stent restenosis: the INHIBIT randomized controlled trial. *Lancet* 2002;359:551-557.
163. Watanabe K, Sekiya M, Ikeda S, Miyagawa M, Hashida K. Preventive effects of probucol on restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Am Heart J* 1996;132:23–29.

164. Holmes DR Jr, Savage M, LaBlanche JM, Grip L, Serruys PW, Fitzgerald P, Fischman D, Goldberg S, Brinker JA, Zeiher AM, Shapiro LM, Willerson J, Davis BR, Ferguson JJ, Popma J, King SB 3rd, Lincoff AM, Tcheng JE, Chan R, Granett JR, Poland M. Results of Prevention of REStenosis with Tranilast and its Outcomes (PRESTO) trial. *Circulation*. 2002;106:1243-50.
165. Hehrlein C, Zimmermann M, Metz J, Ensinger W, Kubler W. Influence of surface texture and charge on the biocompatibility of endovascular stents. *Coron Artery Dis* 1995;6(7):581-6.
166. Chen M, Liang H, Chiu Y, Chang Y, Wei H, Sung H. A novel drug-eluting stent spray-coated with multi-layers of collagen and sirolimus. *J Control Release* 2005;108(1):178-89.
167. Acharya G, Park K. Mechanisms of controlled drug release from drug-eluting stents. *Adv Drug Deliv Rev*. 2006;58:387-401.
168. Liu CL, Chu PK, Lin GQ, Qi M. Anti-corrosion characteristics of nitride-coated AISI 316L stainless steel coronary stents. *Surf Coat Technol* 2006;201:2802-6.
169. Ettenson DS, Edelman ER. Local drug delivery: an emerging approach in the treatment of restenosis. *Vasc Med*. 2000;5:97-102.
170. Raman VK, Edelman ER. Coated stents: local pharmacology. *Semin Interv Cardiol*. 1998;3:133-7.
171. Bär FW, van der Veen FH, Benzina A, Habets J, Koole LH. New biocompatible polymer surface coating for stents results in a low neointimal response. *J Biomed Mater Res*. 2000;52:193-8.
172. Gunn J, Cumberland D. Stent coatings and local drug delivery; state of the art. *Eur Heart J*. 1999;20:1693-700.

173. Virmani R, Kolodgie FD, Farb A. Drug-eluting stents: are they really safe? *Am Heart Hosp J.* 2004;2:85-88.
174. Marzocchi A, Saia F, Piovaccari G, et al. Long-term safety and efficacy of drug-eluting stents two-year results of the REAL (Registro Angioplastiche dell'Emilia Romagna) multicenter registry. *Circulation.* 2007;115:3181-3188.
175. Urban P, Gershlick AH, Guagliumi G, et al; for e-Cypher Investigators. Safety of coronary sirolimus-eluting stents in daily clinical practice: one-year follow-up of the e-Cypher registry. *Circulation.* 2006;113:1434-1441.
176. Moreno R, Fernandez C, Hernandez R, et al. Drug-eluting stent thrombosis: results from a pooled analysis including 10 randomized studies. *J Am Coll Cardiol.* 2005;45:954-959.
177. Mani G, Feldman MD, Patel D, Agrawal CM. Coronary stents: a materials perspective.. *Biomaterials.* 2007;28:1689-710
178. Edelman E, Seifert P, Groothuis A, Morss A, Bornstein D, Rogers C. Gold-coated NIR stents in porcine coronary arteries. *Circulation* 2001;103:429–34.
179. Colombo A, Airolidi F. Passive coating: the dream does not come true. *J Invasive Cardiol* 2003;15:566–7.
180. Dahl JRV, Haager PK, Grube E, Gross M, Beythien C, Kromer EP, et al. Effects of gold coating of coronary stents on neointimal proliferation following stent implantation. *Am J Cardiol* 2002;89:801–5.
181. Tanajura LF, Abizaid AA, Feres F, Pinto I, Mattos L, Staico R, et al. Randomized intravascular ultrasound comparison between patients that underwent amorphous hydrogenated silicon-carbide coated stent deployment versus uncoated stent. *JACC; 2003.Abstracts—Angiography & Interventional Cardiology:58A.*
182. Simon C, Palmaz JC, Sprague EA. Protein interactions with endovascular prosthetic surfaces. *J Long Term Eff Med Implants* 2000;10:127–41.

183. van Beusekom HM, Serruys PW, van der Giessen WJ. Coronary stent coatings. *Coron Artery Dis* 1994;5:590–6.
184. van Beusekom HM, Schwartz RS, van der Giessen WJ. Synthetic polymers. *Semin Interv Cardiol* 1998;3:145–8
185. van der Giessen WJ, Schwartz RS. Coated and active stents: an introduction. *Semin Interv Cardiol* 1998;3:125–6
186. van der Giessen WJ, Lincoff AM *et al.* Marked inflammatory sequelae to implantation of biodegradable and nonbiodegradable polymers in porcine coronary arteries. *Circulation* 1996;94:1690–7.
187. Rogers C, Edelman ER. Endovascular stent design dictates experimental restenosis and thrombosis. *Circulation* 1995;91:2995–3001
188. Malik N, Gunn J, Shepherd L, Crossman DC, Cumberland DC, Holt CM. Phosphorylcholine coated stents in porcine coronary arteries: *in vivo* assessment of biocompatibility. *J Invasive Cardiol* 2001;13:193–201
189. Whelan DM, van der Giessen WJ, Krabbendam SC *et al.* Biocompatibility of phosphorylcholine coated stents in normal porcine coronary arteries. *Heart* 2000;83:338–45
190. Serruys PW, Emanuelsson H, van der Giessen W *et al.* Heparin-coated Palmaz-Schatz stents in human coronary arteries. Early outcome of the Benestent-II Pilot Study. *Circulation* 1996;93:412–22
191. Ahn YK, Jeong MH, Kim JW *et al.* Preventive effects of the heparin-coated stent on restenosis in the porcine model. *Cathet Cardiovasc Interv* 1999;48:324–30
192. van der Giessen WJ, van Beusekom HM, Eijgelshoven MH, Morel MA, Serruys PW. Heparin coating of coronary stents. *Semin Interv Cardiol* 1998;3:173–6

193. Aggarwal RK, Ireland DC, Azrin MA, *et al.*: Antithrombotic potential of polymer-coated stents eluting platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor antibody. *Circulation* 1996;94:3311–3317.
194. Alt E, Haehnel I, Beilharz C, *et al.*: Inhibition of neointima formation after experimental coronary artery stenting: a new biodegradable stent coating releasing hirudin and the prostacyclin analogue iloprost. *Circulation* 2000;101:1453–1458.
195. Lincoff AM, Furst JG, Ellis SG, Tuch RJ, Topol EJ. Sustained local delivery of dexamethasone by a novel intravascular eluting stent to prevent restenosis in the porcine coronary injury model. *J Am Coll Cardiol.* 1997;29:808-16.
196. Liu X, Huang Y, Hanet C, Vandormael M, Legrand V, Dens J, Vandebossche JL, Missault L, Vrints C, De Scheerder I. Study of antirestenosis with the BiodivYsio dexamethasone-eluting stent (STRIDE): a first-in-human multicenter pilot trial. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2003;60:172-8;
197. New G, Moses JW, Roubin GS, Leon MB, Colombo A, Iyer SS, Tio FO, Mehran R, Kipshidze N. Estrogen-eluting, phosphorylcholine-coated stent implantation is associated with reduced neointimal formation but no delay in vascular repair in a porcine coronary model. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2002;57:266-71.
198. Abizaid A, Albertal M, Costa MA, Abizaid AS, Staico R, Feres F, Mattos LA, Sousa AG, Moses J, Kipshidze N, Roubin GS, Mehran R, New G, Leon MB, Sousa JE. First human experience with the 17-beta-estradiol-eluting stent: the Estrogen And Stents To Eliminate Restenosis (EASTER) trial. *J Am Coll Cardiol.* 2004;43:1118-21.
199. Drachman DE, Edelman ER, Seifert P, *et al.* Neointimal thickening after stent delivery of paclitaxel: change in composition and arrest of growth over six months. *J Am Coll Cardiol* 2000;36:2325–2332.

200. Moses JW, Leon MB, Popma JJ, Fitzgerald PJ, Holmes DR, O'Shaughnessy C, Caputo RP, Kereiakes DJ, Williams DO, Teirstein PS, Jaeger JL, Kuntz RE; SIRIUS Investigators. Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery. *N Engl J Med* 2003;349:1315-23.
201. Stone GW, Ellis SG, Cox DA, Hermiller J, O'Shaughnessy C, Mann JT, Turco M, Caputo R, Bergin P, Greenberg J, Popma JJ, Russell ME; TAXUS-IV Investigators. A polymer-based, paclitaxel-eluting stent in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2004;350:221-31.
202. Gallo R, Padurean A, Jayaraman T, Marx S, Roque M, Adelman S, Chesebro J, Fallon J, Fuster V, Marks A, Badimon JJ. Inhibition of intimal thickening after balloon angioplasty in porcine coronary arteries by targeting regulators of the cell cycle. *Circulation*. 1999;99:2164-70.
203. Nguyen KT, Shaikh N, Wawro D, Zhang S, Schwade ND, Eberhart RC, Tang L. Molecular responses of vascular smooth muscle cells to paclitaxel-eluting bioresorbable stent materials. *J Biomed Mater Res A*. 2004;69:513-24
204. Fajadet J, Wijns W, Laarman GJ, Kuck KH, Ormiston J, Münzel T, Popma JJ, Fitzgerald PJ, Bonan R, Kuntz RE; ENDEAVOR II Investigators. Randomized, double-blind, multicenter study of the Endeavor zotarolimus-eluting phosphorylcholine-encapsulated stent for treatment of native coronary artery lesions: clinical and angiographic results of the ENDEAVOR II trial. *Circulation*. 2006;114:798-806
205. Costa RA, Lansky AJ, Mintz GS, Mehran R, Tsuchiya Y, Negoita M, Gilutz Y, Nikolsky E, Fahy M, Pop R, Cristea E, Carlier S, Dangas G, Stone GW, Leon MB, Müller R, Techen G, Grube E. Angiographic results of the first human experience with everolimus-eluting stents for the treatment of coronary lesions (the FUTURE I trial). *Am J Cardiol*. 2005;95:113-6

206. Lüscher TF, Steffel J, Eberli FR, Joner M, Nakazawa G, Tanner FC, Virmani R Drug-eluting stent and coronary thrombosis: biological mechanisms and clinical implications. *Circulation*. 2007 Feb 27;115(8):1051-8
207. Bacher G, Nickel B, Emig P, Vanhoefer U, Seeber S, Shandra A, Klenner T, Beckers T.D-24851, a novel synthetic microtubule inhibitor, exerts curative antitumoral activity in vivo, shows efficacy toward multidrug-resistant tumor cells, and lacks neurotoxicity. *Cancer Res*. 2001;61:392-9
208. Cao W., Mohacsi P., Shorthouse R., Pratt R., Morris R.E., Effects of Rapamycin on growth factors-stimulated vascular smooth muscle cell DNA synthesis. *TRANSPLANTATION* 1995;59:390-395.
209. Guzman LA, Labhasetwar V, Song C, Jang Y, Lincoff AM, Levy R, Topol EJ. Local intraluminal infusion of biodegradable polymeric nanoparticles. A novel approach for prolonged drug delivery after balloon angioplasty. *Circulation*. 1996;94:1441-8.
210. Whitley D, Goldberg SP, Jordan WD. Heat shock proteins: a review of the molecular chaperones. *J Vasc Surg*. 1999;29:748-51.
211. Helmbrecht K, Zeise E, Rensing L. Chaperones in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: a review. *Cell Prolif*. 2000;33:341-65.
212. Kirby LB, Mondy JS, Brophy CM. Balloon angioplasty induces heat shock protein 70 in human blood vessels. *Ann Vasc Surg*. 1999;13:475-9.
213. Gehrman M, Pfister K, Hutzler P, Gastpar R, Margulis B, Multhoff G. Effects of antineoplastic agents on cytoplasmic and membrane-bound heat shock protein 70 (Hsp70) levels. *Biol Chem*. 2002;383:1715-25
214. Ito H, Kanzawa T, Kondo S, Kondo Y. Microtubule inhibitor D-24851 induces p53-independent apoptotic cell death in malignant glioma cells through Bcl-2 phosphorylation and Bax translocation. *Int J Oncol*. 2005;26:589-96

215. Scott S, O'Sullivan M, Hafizi S, Shapiro LM, Bennett MR. Human vascular smooth muscle cells from restenosis or in-stent stenosis sites demonstrate enhanced responses to p53: implications for brachytherapy and drug treatment for restenosis. *Circ Res.* 2002;90:398-404
216. Klugherz BD, Llanos G, Lieuallen W, Kopia GA, Papandreou G, Narayan P, Sasseen B, Adelman SJ, Falotico R, Wilensky RL. Twenty-eight-day efficacy and pharmacokinetics of the sirolimus-eluting stent. *Coron Artery Dis.* 2002;13:183-8.
217. Finkelstein A, McClean D, Kar S, Takizawa K, Varghese K, Baek N, Park K, Fishbein MC, Makkar R, Litvack F, Eigler NL. Local drug delivery via a coronary stent with programmable release pharmacokinetics. *Circulation.* 2003;107:777-84.
218. Garcia-Touchard A, Burke SE, Toner JL, Cromack K, Schwartz RS. Zotarolimus-eluting stents reduce experimental coronary artery neointimal hyperplasia after 4 weeks. *Eur Heart J.* 2006;27:988-93.
219. Huang Y, Salu K, Liu X, Li S, Wang L, Verbeken E, Bosmans J, De Scheerder I. Methotrexate loaded SAE coated coronary stents reduce neointimal hyperplasia in a porcine coronary model. *Heart.* 2004 ;90:195-9.
220. Salu KJ, Bosmans JM, Huang Y, Hendriks M, Verhoeven M, Levels A, Cooper S, De Scheerder IK, Vrints CJ, Bult H. Effects of cytochalasin D-eluting stents on intimal hyperplasia in a porcine coronary artery model. *Cardiovasc Res.* 2006;69:536-44.