ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΕΜΠΟΤΙΣΜΕΝΑ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΣΤΑΤΙΚΗ ΟΥΣΙΑ ΜΠΑΛΟΝΙΑ ΑΓΓΕΙΟΠΛΑΣΤΙΚΗΣ.

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΟΥΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΤΗΣ ΟΥΣΙΑΣ

ΣΤΟ ΟΥΡΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΜΟΝΤΕΛΟΥ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΔΕΣΠΟΙΝΑ Κ. ΛΙΟΥΡΔΗ

ΙΑΤΡΟΣ

ΠΑΤΡΑ 2020

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ευάγγελος Λιάτσικος - Καθηγητής Ουρολογίας, Επιβλέπων Καθηγητής

Δημήτριος Γούμενος - Καθηγητής Παθολογίας-Νεφρολογίας

Δημήτριος Καρναμπατίδης - Καθηγητής Ακτινολογίας - Επεμβατικής Ακτινολογίας

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ευάγγελος Λιάτσικος- Καθηγητής Ουρολογίας ,Επιβλέπων Καθηγητής

Δημήτριος Γούμενος – Καθηγητής Παθολογίας- Νεφρολογίας

Δημήτριος Καρναμπατίδης – Καθηγητής Ακτινολογίας - Επεμβατικής Ακτινολογίας

Γεώργιος Καγκάδης – Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Φυσικής - Ιατρικής Πληροφορικής

Πέτρος Ζαμπάκης – Επίκουρος Καθηγητής Ακτινολογίας

Ευάγγελος Παπαχρήστου - Επίκουρος Καθηγητής Νεφρολογίας

Μάριος Παπασωτηρίου – Επίκουρος Καθηγητής Νεφρολογίας

Στην οικογένειά μου

Η Ιθάκη σ'έδωσε τ'ωραίο ταξίδι.

Χωρίς αυτήν δεν θα 'βγαινες στον δρόμο.

Ευχαριστίες

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Πατρών και στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Πατρών. Αποτελεί προσπάθεια ετών και αποτέλεσμα συνεργασίας πολλών επιστημόνων του Πανεπιστημίου. Η συλλογική αυτή προσπάθεια και η κατάθεση των εξειδικευμένων γνώσεων και ικανοτήτων των συμμετεχόντων έκανε εφικτή την πραγματοποίηση αυτού του εγχειρήματος.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά

- τον Επιβλέποντα Καθηγητή κ. Λιάτσικο Ευάγγελο, Καθηγητή Ουρολογίας, για την καθοριστική του καθοδήγηση, καθώς και για τη συμβολή του στην καλλιέργεια ενός επιστημονικού τρόπου σκέψης, όλα αυτά τα χρόνια στην ερευνητική του ομάδα

- τους πάντοτε αρωγούς, κ.κ. Καθηγητή Γούμενο Δημήτριο, Καθηγητή Παθολογίας-Νεφρολογίας και Καθηγητή Καρναμπατίδη Δημήτριο, Καθηγητή Ακτινολογίας - Επεμβατικής Ακτινολογίας για τις πολύτιμες συμβουλές τους και την επιστημονική υποστήριξη στην εκπόνηση της παρούσας διατριβής

- τους αείμνηστους Καθηγητές του Τμήματος Ιατρικής Καλπαξή Δημήτριο και Τσαμαντά Αθανάσιο, για την ουσιαστική συμβολή τους στην αξιολόγηση και τεκμηρίωση των πειραματικών δεδομένων

- τον Καθηγητή του Τμήματος Φαρμακευτικής κ. Σπυρούλια Γεώργιο, τον κ. Καλληδώνη Παναγιώτη, Επίκουρο Καθηγητή Ενδοσκοπικής και Λαπαροσκοπικής Ουρολογίας, καθώς και τον κ. Κίτρου Παναγιώτη, Επίκουρο

Καθηγητή Επεμβατικής Ακτινολογίας, οι οποίοι με τις εξειδικευμένες γνώσεις τους έδωσαν ιδιαίτερη βαρύτητα στην παρούσα μελέτη.

- τους εξαιρετικούς συνεργάτες, κ. Βρεττό Θεοφάνη, Επιμελητή Α Αναισθησιολογίας , κ. Κυριαζή Ιάσωνα ,χειρουργό ουρολόγο, καθώς και τους ερευνητές κ. Κωστοπούλου Ουρανία και κ. Μαρούση Κων/νο.

Κλείνοντας ,θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς την οικογένειά μου για την αμέριστη υποστήριξη και συμπαράσταση, στην προσπάθεια ολοκλήρωσης αυτού του επιστημονικού έργου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Εισαγωγή ……11
2. Στενώματα ουρητήρα……...13
3. Ιστολογία ουροθηλίου……..22
4. Μπαλόνια καλυμμένα με φαρμακευτικές ουσίες - ρόλος και μηχανισμός δράσης……..28
5. Πακλιταξέλη – δομή και μηχανισμός δράσης……..32

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Αξιολόγηση της κατανομής της πακλιταξέλης, με τις μεθόδους της ανοσοϊστοχημείας και της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, μετά από τη χρήση μπαλονιών αγγειοπλαστικής, καλυμμένων με τη φαρμακευτική ουσία, σε ουρητήρα χοίρου

1. Περίληψη……58
2. Εισαγωγή……61
3. Υλικά και μέθοδοι……..64
4. Αποτελέσματα……72
5. Συζήτηση…….85
6. Συμπέρασμα…….93
6. Βιβλιογραφία……95
7. Δημοσίευση της διδακτορικής διατριβής
8. Δημοσιεύσεις σχετικές με τη χρήση μπαλονιών αγγειοπλαστικής καλυμμένων με πακλιταξέλη ,κατά τη διάρκεια της διδακτορικής διατριβής

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα στενώματα ουρητήρα αποτελούν ένα σύνθετο πρόβλημα όσον αφορά στην κλινική τους αντιμετώπιση, καθώς και μία σημαντική πηγή νοσηρότητας των ασθενών που πάσχουν από αυτά. Η αντιμετώπισή τους απαιτεί την πραγματοποίηση πολύπλοκων χειρουργικών ανακατασκευαστικών μεθόδων με σημαντικά ποσοστά αποτυχίας και μεγάλο αριθμό πιθανών επιπλοκών (1-4). Συγκεκριμένα, ανάλογα από τη θέση που εδράζεται το στένωμα, το μήκος και την αιτιολογία του, οι επεμβάσεις μπορεί να περιλαμβάνουν ουρητηροουρητηρική αναστόμωση ή επανεμφύτευση του υγιούς ουρητήρα στην ουροδόχο κύστη, αφού αφαιρεθεί το στενωμένο τμήμα ουρητήρα. Υπάρχουν και πιο πολύπλοκες τεχνικές για την αποκατάσταση μεγάλων σε μήκος στενωμάτων που περιλαμβάνουν την κινητοποίηση της ουροδόχου κύστεως με συρραφή της στο σύστοιχο ψοϊτη μυ (psoas hitch) καθώς και τη δημιουργία «πτερυγίου» από τη ουροδόχο κύστη (Boari flap) με σκοπό την επανεμφύτευση του υγιούς ουρητήρα (5). Καθεμία από αυτές τις μεθόδους απαιτεί τη χειρουργική πρόσβαση στην περιτοναϊκή κοιλότητα και μπορεί να σχετίζεται με σημαντικές τεχνικές δυσκολίες, νοσηρότητα και αποτυχία αποκατάστασης της λειτουργικότητας της ουροφόρου οδού προς την ουροδόχο κύστη.

Συνεπώς, τα τελευταία χρόνια έχει γίνει σημαντική προσπάθεια για την εφαρμογή ελάχιστα επεμβατικών μεθόδων για την πραγματοποίηση των ανωτέρω επεμβάσεων εμπλέκοντας τη λαπαροσκοπική και ρομποτικά-υποβοηθούμενη λαπαροσκοπική χειρουργική (6-10). Επιπροσθέτως, έχουν προταθεί ελάχιστα επεμβατικές τεχνικές με ενδοσκοπική ή ενδο-αυλική (endoluminal) αντιμετώπιση των ουρητηρικών στενωμάτων με σκοπό την αποφυγή της νοσηρότητας που σχετίζεται με τις πολύπλοκες χειρουργικές επεμβάσεις (11-15).

2. ΣΤΕΝΩΜΑΤΑ ΟΥΡΗΤΗΡΑ

Τα στενώματα του ουρητήρα (ΟΣ) αντιπροσωπεύουν μια σχετικά σπάνια αλλά με συνεχώς αυξανόμενη επίπτωση ουρολογική κατάσταση που οφείλεται σε πλειάδα αιτίων και με μεγάλο εύρος θεραπευτικών επιλογών. Σε μια προσπάθεια αξιολόγησης των στενωμάτων του ουρητήρα θα ήταν χρήσιμο να τα ταξινομήσουμε σε εξωγενή και ενδογενή, καθώς αυτό θα βοηθούσε στο μετέπειτα χειρισμό τους.

Τα εξωγενή ΟΣ προκαλούνται από ενδοκοιλιακές κακοήθειες (εντερικές, γυναικολογικές, αιματολογικές, οπισθοπεριτοναϊκές ή ουρολογικές κακοήθειες), πρωτοπαθή ή δευτεροπαθή οπισθοπεριτοναϊκή ίνωση. Επίσης, από τράυματα, ιατρογενείς τραυματισμούς καθώς και από πιεστικά φαινόμενα εξαιτίας αγγειακών ανευρυσμάτων (13). Τα ενδογενή ΟΣ προκαλούνται από λιθίαση ουρητήρα, ακτινοθεραπεία, ουρητηρικές κακοήθειες ή ιατρογενείς τραυματισμούς μετά από χειρουργείο (Εικόνα 1). Η επίπτωση των ΟΣ ποικίλει αναλόγως την αιτία αλλά ανέρχεται στο 1% των ασθενών μετά από ουρητηροσκόπηση, 5-24% σε ασθενείς με ενσφηνωμένο λίθο για περισσότερο από 2 μήνες, 2-3% μετά από ακτινοθεραπεία, 1.4%-15% σε ουρητηροεντερική αναστόμωση και 3-8% μετά από μεταμόσχευση νεφρού (16-18).



Εικόνα 1: Ουρητηρικό στένωμα, όπως απεικονίζεται στην ανιούσα πυελογραφία (το μαύρο βέλος δείχνει τη θέση).

Οι ασθενείς με ΟΣ μπορεί να είναι συμπτωματικοί ή ασυμπτωματικοί αναλόγως του βαθμού και της χρονιότητας του στενώματος. Οι συμπτωματικοί ασθενείς μπορούν να εμφανίσουν σύστοιχο οσφυϊκό άλγος, ναυτία, έμετο, αιματουρία, λοιμώξεις ουροποιητικού ή λιθίαση. Η διάγνωση τίθεται με τη λήψη του ιστορικού, τη φυσική εξέταση, βασικό εργαστηριακό και απεικονιστικό έλεγχο. Αναλόγως της κλινικής εικόνας, οι θεράποντες μπορεί να πραγματοποιήσουν αξονική ή μαγνητική ουρογραφία, απεκκριτικό σπινθηρογράφημα νεφρών, ανιούσα πυελογραφία ή νεφροστομογραφία. Το απεκκριτικό σπινθηρογράφημα

99mTc-MAG3 και η μαγνητική ουρογραφία έχουν το πλεονέκτημα προσδιορισμού τόσο της λειτουργικότητας των νεφρών όσο και του βαθμού της απόφραξης κάτι που είναι σημαντικό για το χειρουργικό πλάνο. Η απόφραξη λόγω στενώματος ορίζεται ως T1/2 μεγαλύτερο από 20 min στο απεκκριτικό σπινθηρογράφημα. Ωστόσο, η νεφρική λειτουργία, η ενυδάτωση του ασθενούς και η λειτουργία της ουροδόχου κύστεως μπορούν να επηρεάσουν το χρόνο απέκκρισης (13).

Στη φαρέτρα του ουρολόγου για την αντιμετώπιση των ΟΣ υπάρχουν ποικίλες επεμβάσεις που εναπόκεινται στον θεραπόντα να τις επιλέξει βάσει της ανατομικής θέσης, του μήκους και της αιτιολογίας του ΟΣ, της διάρκεια παραμονής και του μεγέθους του ουρητηρικού stent, καθώς και της νεφρικής λειτουργίας.

Ενδοσκοπική αντιμετώπιση

Διαστολή με μπαλόνι

Δύο συχνά εφαρμοζόμενες τεχνικές για την αντιμετώπιση των ΟΣ είναι η διαστολή με μπαλόνι και η ενδοουρητηροτομή (ενδοσκοπική διατομή του ΟΣ). Υπάρχει ποικιλία μπαλονιών-διαστολέων για την πραγματοποίηση των ανωτέρω διαστολών. Οι διαστολείς αυτοί έχουν διάφορες διαμέτρους και μήκη τόσο σε ό,τι αφορά στους καθετήρες εισαγωγής τους όσο και στα ίδια τα μπαλόνια.

Στην κλινική μελέτη των Byun και συνεργατών διαπιστώθηκε ότι η διαστολή με μπαλόνι υψηλών πιέσεων είχε ακτινολογική επιτυχία σε 57% των καλοήθων και 14% των κακοήθων ΟΣ, σε χρόνο παρακολούθησης 36 μηνών (19). Η επιτυχία στην αντιμετώπιση στενωμάτων μακρύτερων των 2 εκατοστών ήταν μηδενική. Η εν λόγω μελέτη υπογραμμίζει αρκετά σημαντικά στοιχεία της διαστολής με μπαλόνι που παρουσιάζονται και σε άλλες κλινικές μελέτες. Συγκεκριμένα, η διαστολή με μπαλόνι είναι πιο αποτελεσματική σε μικρού μήκους στενώματα κάτω των 2 εκατοστών, καλοήθους και μη ισχαιμικής αιτιολογίας (20-23). Στη μελέτη των Hafez και συνεργατών δεν αναδείχθηκε συσχετισμός ανάμεσα στη θέση του ΟΣ και την επιτυχία της διαστολής, ενώ σε πολλές άλλες μελέτες η εντόπιση του στενώματος στο μέσο ουρητήρα σχετίζεται με χαμηλότερο βαθμό

επιτυχίας (24). Η συνολική επιτυχία στην αντιμετώπιση των ΟΣ με διαστολή με μπαλόνι κυμαίνεται μεταξύ 33 και 100% (24, 25).

Ενδοουρητηροτομή

Η ενδοσκοπική διατομή του στενώματος μπορεί να πραγματοποιηθεί ανιόντως, διαδερμικά ή με συνδυασμό και των δύο χρησιμοποιώντας ενδοσκοπικό μαχαιρίδιο, διαθερμία ή λέιζερ (Holmium:YAG). Η εντόπιση του στενώματος καθορίζει την τεχνική που θα χρησιμοποιηθεί καθώς και την αποτελεσματικότητα της τεχνικής. Συνήθως, οι τομές που πραγματοποιούνται περιλαμβάνουν όλο το πάχος του ουρητηρικού τοιχώματος και φτάνουν ως το περιουρητηρικό λίπος. Οι τομές εκτείνονται μερικά χιλιοστά άνωθεν και κάτωθεν του στενώματος. Η θέση που πραγματοποιούνται οι τομές αυτές είναι οπισθοπλάγια στην περίπτωση των εγγύς ΟΣ και προσθιοπλάγια στα άπω ουρητηρικά στενώματα, για να αποφευχθούν τραυματισμοί αγγείων (24, 26). Είναι σχετικά δύσκολο να αξιολογήσουμε την αποτελεσματικότητα της ενδοουρητηροτομής εξαιτίας της έλλειψης κανόνων για τη μακροχρόνια παρακολούθηση των

περιστατικών αυτών. Ωστόσο, υπάρχει ένας ικανοποιητικός αριθμός μελετών που περιγράφει τα αποτελέσματα των διαφόρων μεθόδων. Η συνολική επιτυχία της τεχνικής κυμαίνεται μεταξύ 60% και 86% (24).

Χρόνιος αυτοσυγκρατούμενος ουρητηρικός καθετήρας

Η τοποθέτηση αυτοσυγκρατούμενου ουρητηρικού καθετήρα (Stent) είναι μία προσωρινή θεραπευτική επιλογή ως την οριστική αντιμετώπιση του ΟΣ, καθώς αποσυμφορεί μια οξέως αποφραγμένη νεφρική μονάδα. Η χρήση του δεν εξαρτάται από το μήκος του ΟΣ. Ένας κύριος περιοριστικός παράγοντας για την τοποθέτηση των stent είναι η πιθανή δυσκολία αναγνώρισης των ουρητηρικών στομίων ή η αδυναμία τοποθέτησης του stent διαμέσου του ΟΣ. Τα stents έχουν βελτιωθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια με τη χρήση προηγμένων υλικών ,έχουν μικρότερο κόστος αλλά είναι και καλύτερα ανεκτά από τον ασθενή (13).

Τα stents ενδείκνυνται για αντιμετώπιση τόσο των ενδογενών όσο και των εξωγενών ΟΣ. Αρκετές μελέτες έχουν αξιολογήσει κλινικές και ακτινολογικές παραμέτρους που σχετίζονται με την πιθανή αποτυχία ενός ουρητηρικού stent. Μία προοπτική μελέτη με 92 ασθενείς που

αντιμετωπίσθηκαν με τοποθέτηση stent, έδειξε ότι η άπω εξωγενής πίεση στον ουρητήρα και ο βαθμός της υδρονέφρωσης πριν την τοποθέτηση του stent αποτελούν τους μόνους προγνωστικούς παράγοντες για την αποτελεσματικότητά του stent σε βάθος χρόνου 3 μηνών (27). Μία άλλη αναδρομική μελέτη με 38 ασθενείς με ενδογενή ΟΣ έδειξε ότι το φύλο (άρρεν), η αυξημένη τιμή κρεατινίνης και η σοβαρή προεγχειρητική υδρονέφρωση, σχετίζονται με την αποτυχία της μεθόδου (28).

Το ποσοστό επιτυχίας της τοποθέτησης των stents έχει αποδειχθεί ότι είναι υψηλότερο στις περιπτώσεις των ενδογενών ΟΣ. Οι Yossepowitch και συνεργάτες έδειξαν ότι τα ουρητηρικά stents είναι επιτυχή σε ποσοστό 94% και 73% των ασθενών με ενδογενή και εξωγενή απόφραξη, αντιστοίχως (27). Μετά από παρακολούθηση 3 μηνών, σε όλους τους ασθενείς με ενδογενές ΟΣ τα stents παρέμειναν λειτουργικά συγκριτικά με 56.4% των ασθενών με ΟΣ εξωγενούς αιτιολογίας. Μία άλλη μελέτη διερεύνησε την αποτελεσματικότητα των stents σε ασθενείς με ποικίλης αιτιολογίας ΟΣ (29). Το συνολικό ποσοστό επιτυχίας έφτανε το 84%. Τα αντίστοιχα ποσοστά για περιστατικά με κακοήθεια, οπισθοπεριτοναϊκή ίνωση και καλοήθεις όγκους ήταν 81%, 85% και 100% αντιστοίχως.

ΟΣ σε ουρητηροεντερικές αναστομώσεις

Μια ειδική κατηγορία ΟΣ είναι αυτά που αναπτύσσονται σε ουρητηροεντερικές αναστομώσεις (ΟΕΑ). Οι τελευταίες είναι αναστομώσεις μεταξύ του ουρητήρα και του λεπτού ή παχέος εντέρου που πραγματοποιούνται στη διάρκεια κυστεκτομών για κακοήθειες της κύστης ή άλλα νοσήματα που απαιτούν την αφαίρεση του οργάνου. Τα συγκεκριμένα περιστατικά αποτελούν μία θεραπευτική πρόκληση για τον ουρολόγο.

Η επίπτωση των ΟΣ σε ΟΕΑ έχει καταδειχθεί από μακροχρόνια μελέτη να είναι 4-8% (30). Η αντιμετώπιση των στενωμάτων αυτών με ανοιχτή χειρουργική επέμβαση, laser και διαστολή με μπαλόνι έδειξε ποσοστά επιτυχίας 91%, 33% και 25%, αντιστοίχως (31).

ΟΣ σε μεταμοσχευμένους νεφρούς

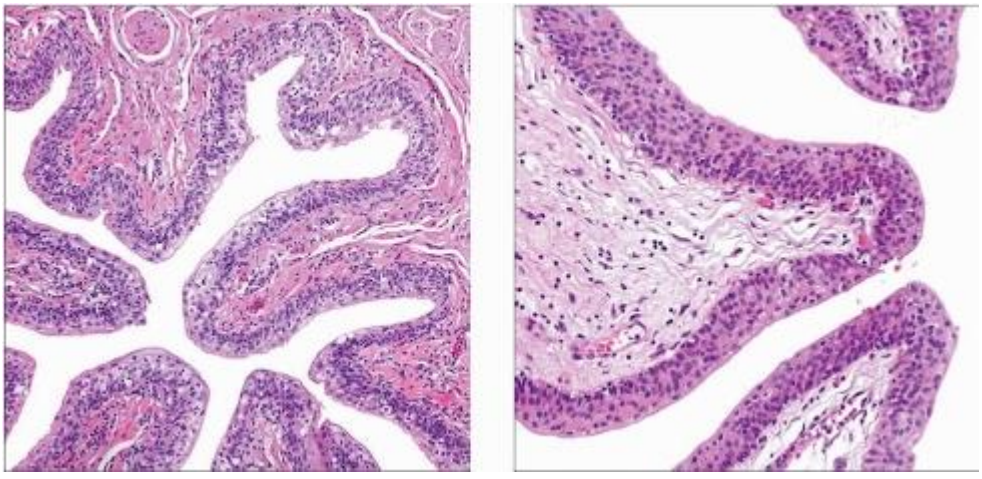
Ένας σημαντικός αριθμός των μεταμοσχευμένων ασθενών παρουσιάζει επιπλοκές σχετιζόμενες με την επέμβαση της μεταμόσχευσης νεφρού. Η επίπτωση των ΟΣ είναι 1-4% (32-34). Ο χειρισμός των ουρητηρικών στενωμάτων σε μεταμοσχευμένο ουρητήρα έγκειται σε ενδοσκοπικές τεχνικές ή ανοικτή ανακατασκευή.

Η θεραπευτικές επιλογές για τα ΟΣ σε μεταμοσχευμένο ουρητήρα σε ασθενείς που ήταν συμπτωματικοί ή εμφάνιζαν έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας περιορίζονταν σε προσωρινή παροχέτευση του νεφρού με stent ή νεφροστομία με σκοπό την αντιμετώπιση με ανοικτή χειρουργική διόρθωση του στενώματος. Η χρόνια χρήση ουρητηρικού stent ενδείκνυται σε ασθενείς που η γενική κατάστασή τους δεν επιτρέπει να χειρουργηθούν ή επιθυμούν την τακτική αλλαγή του stent αντί της χειρουργικής επέμβασης (13).

Σε ό,τι αφορά στην ελάχιστα επεμβατική αντιμετώπιση των στενωμάτων αυτών, η διαστολή με μπαλόνι και η διατομή με laser έχουν ποσοστά επιτυχίας 33-60% και 67-75%, αντιστοίχως (35-38).

3. Η ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΟΥΡΟΘΗΛΙΟΥ

Το ουροθήλιο είναι ένας τύπος πολύστιβου επιθηλίου που καλείται μεταβατικό (Εικόνα 2), διότι μεταβάλλεται το πάχος του στα διάφορα τμήματα της αποχετευτικής μοίρας, όπου και αποκλειστικά απαντάται, αλλά μεταβάλλεται και σε συνάρτηση με την πλήρωση ή μη του οργάνου όσον αφορά στη μορφολογία (π.χ. στην πλήρη και διατεταμένη κύστη τα επιφανειακά κύτταρα παρατηρούνται αποπλατυσμένα, ενώ όταν είναι κενή αυτά εμφανίζονται κυβοκυλινδρικά (39).



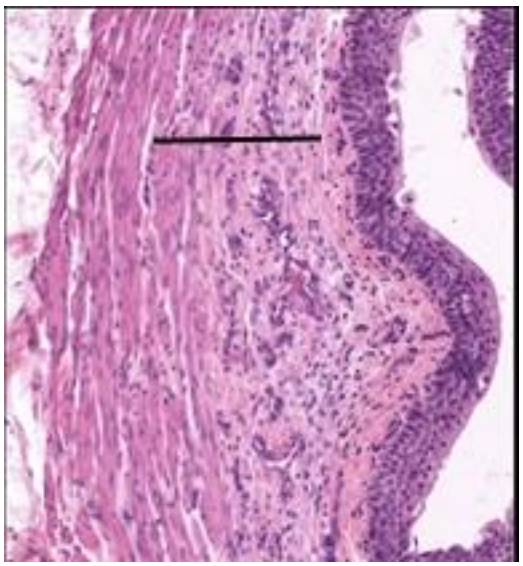
Εικόνα 2: Φυσιολογικό ουροθήλιο του ουρητήρα (χρώση αιματοξυλίνης-Εωσίνης).

Τα κύτταρα της βασικής στιβάδας είναι κυβοειδή, της ενδιάμεσης στιβάδας περισσότερο πολυγωνικά ενώ τα επιφανειακά κύτταρα εμφανίζουν τις μεταβολές στο σχήμα που προαναφέρθηκαν. Στις επιπολής στιβάδες υπάρχουν κάποια κύτταρα με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά τα οποία καλούνται "ομβρελοειδή" (umbrella cells)(39).

Τα ομβρελοειδή κύτταρα είναι ευμεγέθη με μεγάλους υποστρόγγυλους πυρήνες, οι οποίοι παρουσιάζουν εμφανές πυρήνιο. Μερικά από αυτά μπορεί να είναι διπύρηνα. Υπερμικροσκοπικά, τα "ομβρελοειδή κύτταρα" εμφανίζουν υψηλή εξειδίκευση. Πιο συγκεκριμένα η προσαύλια επιφάνεια τους ,η οποία είναι κυρτή, αποτελείται από παχιές δύσκαμπτες μεμβρανικές πλάκες μεταξύ των οποίων παρεμβάλλονται τμήματα λεπτής κυτταρικής μεμβράνης που λειτουργούν ως "μεντεσέδες" και επιτρέπουν το σχηματισμό σχισμών με υποκείμενα κυστίδια. Έτσι, το ουροθήλιο μεταβάλλεται σε πάχος και μορφολογία και γίνεται αδιαπέραστο στα ούρα ,τα οποία είναι δυνητικώς τοξικά, ενώ παράλληλα παρεμποδίζεται η μεταφορά ύδατος διαμέσου του επιθηλίου προς τα συνήθως υπέρτονα ούρα (39).

Το ουροθήλιο επικάθεται σε μια πολύ λεπτή βασική μεμβράνη η οποία μόλις διακρίνεται με το φωτομικροσκόπιο. Η βασική μεμβράνη του ουροθηλίου είναι ανωμάλου σχήματος με οδοντωτή παρυφή, λόγω των θηλών του υποκείμενου χορίου στις οποίες παρατηρούνται τριχοειδή. Η

εικόνα αυτή δίνει την ψευδή εντύπωση ότι τα τριχοειδή εισέρχονται στο ουροθήλιο και στο παρελθόν αυτό αποτέλεσε αιτία να δημιουργηθεί η εσφαλμένη εντύπωση ότι το ουροθήλιο είναι η εξαίρεση του κανόνα, ότι τα επιθήλια στερούνται αιμοφόρων αγγείων. Έχει όμως σημασία το γεγονός αυτό γιατί ερμηνεύει ίσως την επιθετική συμπεριφορά του ενδοεπιθηλιακού (in situ) καρκινώματος του ουροθηλίου. Το χόριο (Εικόνα 3) αποτελείται από άφθονα ινίδια κολλαγόνου , έχει πολυάριθμα αιμοφόρα και λεμφοφόρα αγγεία, καθώς επίσης και νεύρα.



Εικόνα 3: Χόριο (μαύρη γραμμή) περιέχει άφθονα ινίδια κολλαγόνου , πολυάριθμα αιμοφόρα και λεμφοφόρα αγγεία, καθώς επίσης και νεύρα.

Οι μυϊκές στιβάδες αποτελούνται από λείες μυϊκές ίνες που στον ουρητήρα διατάσσονται σε δύο στιβάδες: την εσωτερική επιμήκη και την εξωτερική κυκλοτερή. Στο κατώτερο τριτημόριο του ουρητήρα βρίσκεται και μια άλλη εξωτερική επιμήκης στιβάδα. Η δομή αυτή του μυϊκού χιτώνα συνεχίζεται και στην ουροδόχο κύστη (39).

Το πολύστιβο επιθήλιο

Το πολύστιβο επιθήλιο έχει κυρίως προστατευτική λειτουργία, αν και μερικοί τύποι εμφανίζονται μετρίως διαπερατοί στο νερό και σε μικρομοριακές ενώσεις (39).

- **Πολύστιβο πλακώδες επιθήλιο:**

διακρίνεται σε κερατινοποιημένο και μη

1. Το μη κερατινοποιημένο πολύστιβο πλακώδες επιθήλιο επενδύει επιφάνειες κοιλοτήτων που διατηρούνται υγρές από αδενικές εκκρίσεις, όπως το στόμα, ο κόλπος και ο τράχηλος της μήτρας κ.α.

2. Το κερατινοποιημένο πολύστιβο πλακώδες επιθήλιο σχηματίζει την επιφάνεια του δέρματος (επιδερμίδα). Σ' αυτό το επιθήλιο τα επιφανειακά του κύτταρα, μετά την ωρίμανσή τους, εισέρχονται σε μια διαδικασία που καλείται κερατινοποίηση, κατά την οποία χάνουν τους πυρήνες τους και μετατρέπονται σε ένα ακυτταρικό υλικό με κύριο συστατικό την πρωτεΐνη κερατίνη. Η τελευταία είναι πολύ ανθεκτική σε μηχανική τριβή και αφυδάτωση.

• **Πολύστιβο κυβοειδές επιθήλιο:**

παρατηρείται στους μεγάλους εκφορητικούς πόρους εξωκρινών αδένων, όπως στο πάγκρεας ή στους σιελογόνους αδένες.

• **Πολύστιβο κυλινδρικό επιθήλιο:**

είναι εξαιρετικά σπάνιο και βρίσκεται σε περιορισμένης έκτασης περιοχές, όπως στον οφθαλμό και πιο συγκεκριμένα στον επιπεφυκότα.

• **Μεταβατικό επιθήλιο:**

απαντάται αποκλειστικά στην αποχετευτική μοίρα του ουροποιητικού συστήματος και γι' αυτό καλείται και ουροθήλιο. Χαρακτηρίζεται από τη μεταβολή του σχήματος των επιφανειακών του κυττάρων από κυβοκυλινδρικό σε πλακώδες, ανάλογα με την κατάσταση του οργάνου (διάταση - σύσπαση).

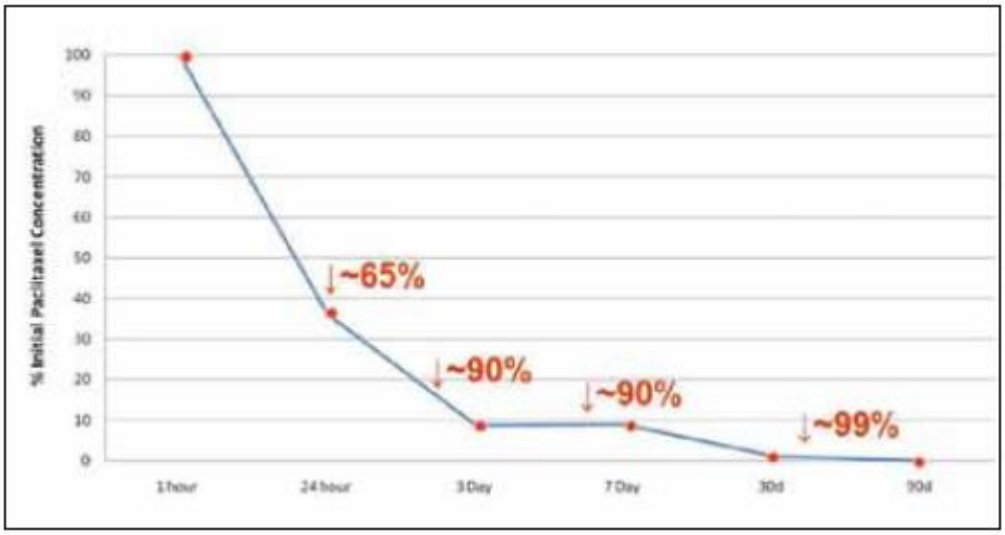
4. ΜΠΑΛΟΝΙΑ ΕΠΙΚΑΛΥΜΜΕΝΑ ΜΕ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ – ΡΟΛΟΣ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ

Τα επικαλυμμένα με φαρμακευτικές ουσίες μπαλόνια (drug-coated balloons -DCBs) έχουν αποδειχθεί ιδιαίτερα αποτελεσματικά στην πρόληψη της επαναστένωσης των στεφανιαίων αγγείων, στα οποία είχε τοποθετηθεί αγγειακό stent, καθώς επίσης και σε περιπτώσεις περιφερεικής αγγειακής νόσου (40, 41). Παρόλο που υπάρχουν αρκετά πειραματικά και κλινικά δεδομένα (7-9), δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα σχετικά με την επίδραση της επικάλυψης του μπαλονιού στο μηχανισμό δράσης του και στο τελικό κλινικό αποτέλεσμα (42-44). Σε σύγκριση με τα εμποτισμένα με φάρμακο stents (DES), τα DCBs έχουν τα ακόλουθα πλεονεκτήματα:

1. Βραχυπρόθεσμη τοπική αποδέσμευση φαρμάκου χωρίς τη χρήση πολυμερικού υλικού
2. Δεν αφήνουν στη θέση δράσης τους μόνιμη μεταλλική πρόθεση
3. Βελτιωμένη επούλωση του αγγείου λόγω μικρής διάρκειας παραμονής του φαρμάκου στο αγγειακό τοίχωμα.

Αυτά τα πλεονεκτήματα είναι ιδιαίτερα σημαντικά διότι τα εμφυτεύσιμα πολυμερικά υλικά που χρησιμοποιούνται στα DESs έχουν συσχετιστεί με

μηχανισμούς αντίδρασης ξένου σώματος και επακόλουθη θρόμβωση του DES (45, 46). Συγκριτικά με τα DESs, τα DCBs εμφανίζουν υψηλότερη βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου στους ιστούς χάρη στη μεγαλύτερη επιφάνεια επαφής του φαρμάκου με το αγγειακό τοίχωμα (47). Πολλά από τα DCBs που υπάρχουν στη αγορά χρησιμοποιούν πακλιταξέλη (paclitaxel-PTX). Πρέπει να σημειωθεί ότι το φαρμακοκινητικό προφίλ των PTX- coated balloons (PCBs) σχετίζεται με τον τύπο της επικάλυψης και την αλληλεπίδραση της PTX με αυτή. Το σύστημα του μπαλονιού με την επικάλυψη διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στη μεταφορά της PTX στο αγγειακό τοίχωμα από την επιφάνεια του μπαλονιού. Σκοπός της επικάλυψης είναι να επιτρέπει ένα αναπαραγώγιμο φαρμακοκινητικό προφίλ της ουσίας μετά τη διαστολή του μπαλονιού. Κατά κάποιους μελετητές σχεδόν το 10-12% της ουσίας που φέρει το PCB μεταφέρεται στις φυσιολογικές χοίρειες αρτηρίες. Τα επίπεδα της ουσίας στον αγγειακό ιστό μειώνονται πάνω από 80% στις πρώτες 24 ώρες 17-18 (48). Στις 72 ώρες, υπάρχει σταθεροποίηση των επιπέδων του φαρμάκου στον αγγειακό ιστό (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Φαρμακοκινητική της κρυσταλλικής πακλιταξέλης τις πρώτες ώρες μετά την απελευθέρωση στο τοίχωμα των αγγείων (48).

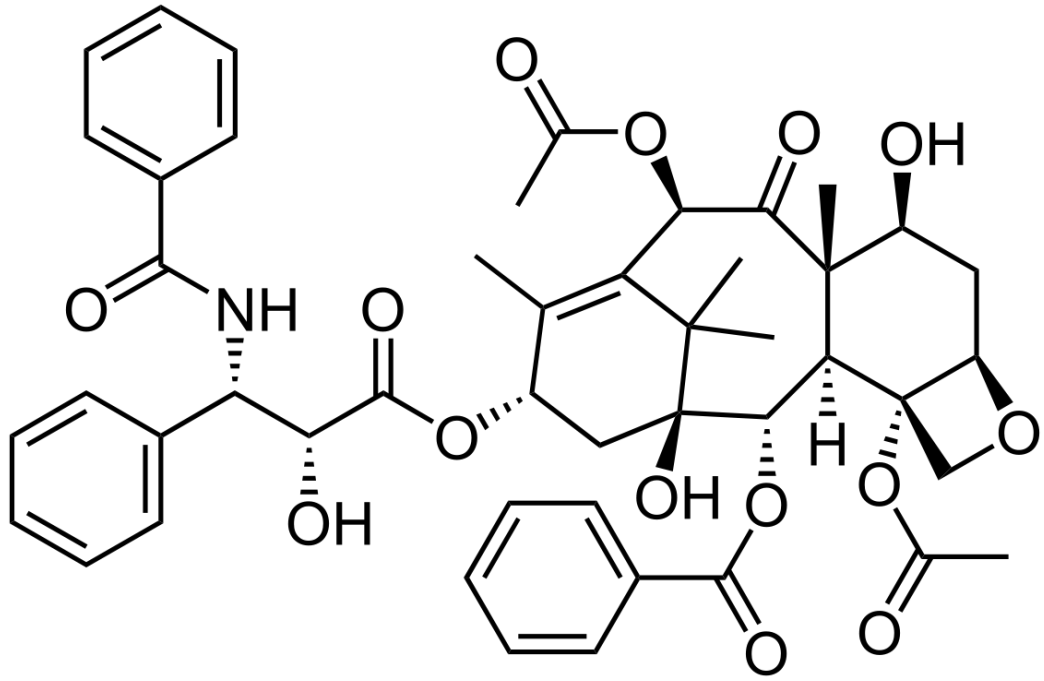
Οι Cremers και συνεργάτες έδειξαν ότι τα επίπεδα του φαρμάκου στον ιστό συνεχίζουν να μειώνονται αλλά παραμένουν ανιχνεύσιμα έως και 180 μέρες μετά τη διαστολή σε φυσιολογικές χοίρειες αρτηρίες (49).

Όταν η PTX μεταφέρεται στη διάμεση ουσία των αγγείων, η κάθαρση του φαρμάκου εξαρτάται από ένα σαφές φαρμακοκινητικό προφίλ. Ο Creel και συνεργάτες έδειξαν ότι μετά την απελευθέρωση της PTX ,η μεγαλύτερη ποσότητα του φαρμάκου προσδένεται σε συγκεκριμένα υδρόφοβα σημεία πρόσδεσης και μία μικρότερη ποσότητα μεταφέρεται με μηχανισμό διάχυσης (50, 51). Στην περίπτωση των αγγείων η μεταφορά του φαρμάκου μπορεί να σχετίζεται και με την αλληλεπίδραση της ουσίας με τα vasa vasorum (50).

Από τη στιγμή που η PTX μεταφέρεται μέσα στο αγγειακό τοίχωμα δρα διαφοροποιώντας τον κυτταροσκελετό και αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων (SMCs) του αγγειακού τοιχώματος (52). Αυτός ο μοναδικός μηχανισμός δράσης καθώς επίσης τα λιπόφιλα χαρακτηριστικά του φαρμάκου, το καθιστούν ιδανικό για τέτοιες εφαρμογές αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων μετά από μια χρήση (53).

5. ΠΑΚΛΙΤΑΞΕΛΗ- ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ

Η πακλιταξέλη ανήκει στην οικογένεια των ταξανών και αποτελεί έναν από τα πιο σημαντικούς και αποτελεσματικούς αντινεοπλασματικούς παράγοντες όλων των εποχών (Εικόνα 5) (54). Οι ταξάνες αρχικά προήλθαν από φυτά του γένους *Taxus*. Οι ταξάνες εμφανίζουν μία μοναδική δυνατότητα πρόκλησης ύφεσης των συμπτωμάτων πολλών τύπων προχωρημένου καρκίνου, καθώς και αποτελεσματικότητα στη θεραπεία καρκινικών μορφών αρχικού σταδίου.



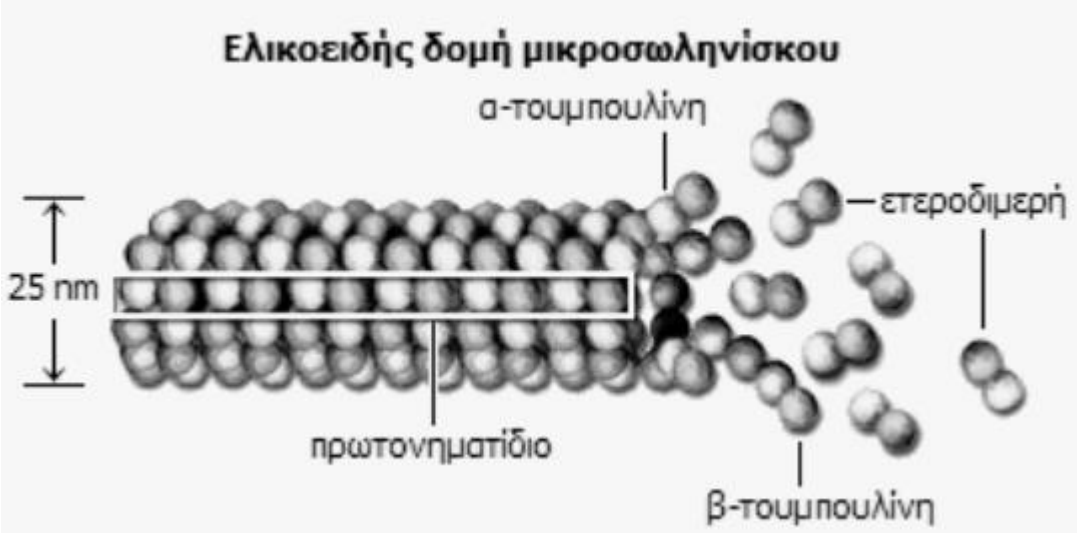
Εικόνα 5: Ο χημικός τύπος της πακλιταξέλης.

Η πακλιταξέλη αρχικά απομονώθηκε τον φλοιό του Ελάτου του Ειρηνικού (Pacific Yaw tree), με τη συστηματική ονομασία *Taxus brevifolia* (54), ενός μεσαίου μεγέθους αειθαλούς δέντρου των Βορειοδυτικών ΗΠΑ. Παρά τα ενθαρρυντικά αρχικά ευρήματα, μετέπειτα κλινικές δοκιμές δεν πραγματοποιήθηκαν εξαιτίας του υψηλού οικολογικού κόστους: για την παραγωγή θεραπευτικών δόσεων πακλιταξέλης απαιτούνται μεγάλες ποσότητες από το φλοιό των δέντρων, με αποτέλεσμα την απώλεια τους. Προκειμένου λοιπόν να λυθεί το εν λόγω πρόβλημα , αναπτύχθηκαν μέθοδοι ημισυνθετικής παραγωγής της φαρμακευτικής ουσίας από παράγωγα καλλιεργημένων δέντρων, ώστε αυτά να μην τελέσουν υπό εξαφάνιση. Η πακλιταξέλη τελικά εγκρίθηκε για ιατρική χρήση το 1992. (55).

Μηχανισμός δράσης

Η ταξόλη έγινε ευρύτερα γνωστή το 1979, μετά τη δημοσίευση των ερευνητικών αποτελεσμάτων της ερευνήτριας Susan B. Horwitz (Albert Einstein College of Medicine). Οι έρευνες της ομάδας της Horwitz απέδειξαν ότι η ταξόλη δρα με έναν άγνωστο μέχρι τότε μηχανισμό: προκαλούσε ένα είδος υπερβολικής σταθεροποίησης των κυτταρικών μικροσωληνίσκων (hyperstabilization of microtubules) (56).

Οι μικροσωληνίσκοι είναι σωληνοειδείς διατάξεις από ετεροδιμερή των πρωτεΐνων α- και β-τουμπουλίνης (Εικόνα 6). Αποτελούν κύριες δομές του κυτταροσκελετού και διαδραματίζουν σημαντικό οργανωτικό και λειτουργικό ρόλο σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Η ταξόλη είχε τη ασυνήθιστη ικανότητα να προκαλεί πολυμερισμό των τουμπουλινών, χωρίς να απαιτείται η δράση της τριφωσφορικής γουανοσίνης (GTP), που υπεισέρχεται στο φυσιολογικό μηχανισμό πολυμερισμού.



Εικόνα 6: Σχηματική παράσταση ενός μικροσωληνίσκου.

Η υπερσταθεροποίηση των μικροσωληνίσκων οφείλεται στην πρόσδεση της ταξόλης με τη β-τουμπουλίνη. Αυτή η ανεπιθύμητη σταθεροποίηση των μικροσωληνίσκων καθιστά αδύνατο το "κόψιμό" τους κατά τη μίτωση (mitosis) και ειδικά κατά τη φάση διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων (μπλοκάρισμα στα στάδια μετάφασης και ανάφασης). Έτσι, το κύτταρο δεν μπορεί να διαιρεθεί και πεθαίνει. Πέρα από τη σταθεροποίηση των

μικροσωληνίσκων, η ταξόλη δρα ως "μοριακή σκούπα" δεσμεύοντας την ελεύθερη β-τουμπουλίνη, με αποτέλεσμα να μειώνει την παροχή μονομερών και διμερών τουμπουλίνης στο κύτταρο ανακόπτοντας την ανανέωση των μικροσωληνίσκων.

Νεότερες έρευνες έδειξαν ότι εκτός από τον προηγούμενο τρόπο δράσης, η ταξόλη επάγει την απόπτωση, δηλ. τον προγραμματισμένο (φυσιολογικό) θάνατο του κυττάρου, στα καρκινικά κύτταρα. Αυτό οφείλεται στη σύνδεσή της με την πρωτεΐνη Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) και την αχρήστευσή της. Η πρωτεΐνη Bcl-2 ευθύνεται για τη διακοπή του μηχανισμού απόπτωσης και η παρουσία της ευνοεί την ανεπιθύμητη "αθανασία" των καρκινικών κυττάρων (57). Επιπλέον, έχει αναφερθεί μηχανισμός δράσης της ταξόλης μέσω δέσμευσης της τουμπουλίνης πάνω σε μικροκρυστάλλους της (58).

Η ταξόλη είναι καλό αντικαρκινικό φάρμακο για τους "επιθετικούς καρκίνους" (aggressive cancers), που απαιτούν διαίρεση κυττάρων και αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού τους. Αν και επηρεάζει συγχρόνως και τα φυσιολογικά κύτταρα, τα καρκινικά κύτταρα, επειδή διαιρούνται πιο γρήγορα, καταστρέφονται σε μεγαλύτερο βαθμό από την πακλιταξέλη.

Κλινικές έρευνες - Περιβαλλοντικά και πολιτικά προβλήματα - Εμπορική εκμετάλλευση

Το 1982 ολοκληρώθηκαν οι μελέτες αντικαρκινικής δράσης της ταξόλης σε πειραματόζωα (ποντίκια). Τον ίδιο χρόνο το NCI υπέβαλε αίτηση για κλινικές μελέτες σε ανθρώπους. Το 1984 ξεκίνησε η Φάση Ι των κλινικών ερευνών και αργότερα το ίδιο έτος αποφασίστηκε η έναρξη της Φάσης ΙΙ.

Οι έρευνες αυτές απαιτούσαν μεγάλες ποσότητες φλοιού του ελάτου. Μέχρι το τέλος του 1986 χρειάστηκαν σχεδόν 6 τόνοι για τις δοκιμές, αλλά για την ολοκλήρωση της Φάσης ΙΙ θα χρειάζονταν ακόμη τουλάχιστον 30 τόνους φλοιού. Οι τεράστιες αυτές ποσότητες απαιτούσαν την κοπή μεγάλου αριθμού ελάτων. Το γεγονός αυτό προκάλεσε διαμαρτυρίες των δασικών υπηρεσιών, των πολιτικών και των κατοίκων των περιοχών και το θέμα της ταξόλης έγινε πλέον πολιτικό και περιβαλλοντικό θέμα.

Τα αποτελέσματα της Φάσης ΙΙ (Μάιος 1988) έδειξαν ικανοποιητική δράση σε περιπτώσεις μελανωμάτων και εξαιρετικά αποτελέσματα σε περιπτώσεις καρκίνου των ωοθηκών. Ωστόσο, το κόστος των ερευνών ήταν τεράστιο, εξαιτίας των απαιτούμενων μεγάλων ποσοτήτων φλοιού *Taxus*. Οι υπεύθυνοι του NCI σκέφθηκαν ότι θα έπρεπε το ινστιτούτο να συνεργασθεί με κάποια μεγάλη φαρμακευτική εταιρεία για να συμβάλλει οικονομικά και να λύσει το πρόβλημα του ανεφοδιασμού με φλοιό του

ελάτου. Σε αντάλλαγμα, το NCI θα εκχωρούσε στην εταιρεία όλα τα ερευνητικά αποτελέσματα που είχε συλλέξει μέχρι εκείνη την εποχή. Τέσσερις εταιρείες έδειξαν ενδιαφέρον.

Αντιρρήσεις. Ήταν αναμενόμενο να υπάρξουν πολλές αντιρρήσεις από διάφορους επιστήμονες για τους όρους του συμβολαίου και τις διαπραγματεύσεις. Το NCI έγινε στόχος επικρίσεων. Το θέμα της ταξόλης έγινε αφορμή για ομιλίες στο Κογκρέσο των ΗΠΑ κατά το 1991 και 1992 λόγω των αμφισβητήσεων ως προς τη σκοπιμότητα ή και τη νομιμότητα της συμφωνίας με πολυεθνική φαρμακευτική εταιρεία.

Τελικά, το 1992 υπεβλήθη αίτηση για νέο αντικαρκινικό φάρμακο και το FDA της έδωσε την απαραίτητη έγκριση για τη συνέχιση των κλινικών μελετών. Αν και δεν υπήρξε κάποιο δίπλωμα ευρεσιτεχνίας για τα δικαιώματα στο φάρμακο ταξόλη (επειδή πρόκειται για φυσική ουσία), η εταιρεία BMS απόκτησε αποκλειστικά δικαιώματα 5 ετών. Το 1993, άρχισε τη διάθεση της ταξόλης στην αγορά, ως ισχυρότατου χημειοθεραπευτικού φαρμάκου κατά του καρκίνου.

Το πρόβλημα με την ονομασία. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι πρόβλημα προέκυψε ακόμη και με το όνομα της ουσίας. Η μέχρι τότε χρησιμοποιούμενη επιστημονική ονομασία ταξόλη (Taxol), "ξαφνικά" κατοχυρώθηκε ως εμπορική ονομασία από την πολυεθνική εταιρεία που είχε τα δικαιώματα του μορίου. Η επιστημονική κοινότητα αναστατώθηκε

θεωρώντας αυτήν την κατοχύρωση σαν ένα ακόμη σκάνδαλο. Το περιοδικό Nature διαμαρτυρήθηκε για αυτήν τη "δέσμευση" του ονόματος, αφού αυτό το όνομα είχε ήδη χρησιμοποιηθεί ως "επιστημονική ονομασία" της ουσίας σε περισσότερα από 600 επιστημονικά άρθρα. Η πολυεθνική εταιρεία επιχειρηματολόγησε στα δικαστήρια ότι ενδεχόμενη αλλαγή του ονόματος θα προκαλούσε σύγχυση στους γιατρούς ογκολόγους και θα οδηγούσε σε εμπορική αποτυχία του παρασκευάσματος. Έτσι σήμερα η ονομασία Taxol είναι πλέον κατοχυρωμένη εμπορική ονομασία, ενώ η generic ονομασία της χημικής ένωσης είναι Paclitaxel (59).

Ημισυνθετική οδός παρασκευής ταξόλης και νέες φυσικές πηγές

Μετά από τα επιτυχή πειράματα των κλινικών φάσεων, η ταξόλη αναγνωρίσθηκε οριστικά ως ένα επιτυχημένο αντικαρκινικό φάρμακο. Ωστόσο, παρέμενε το πρόβλημα των τεράστιων ποσοτήτων φλοιού του *Taxus* που χρειάζονταν (60).

Η περιεκτικότητα σε ταξόλη του ξηρού εσωτερικού φλοιού του *Taxus brevifolia*, όπου κυρίως βρίσκεται η ουσία, είναι πολύ μικρή (0,01-0,03%). Αυτό σήμαινε πως για την απομόνωση 1 kg ταξόλης χρειάζονταν σχεδόν 10 τόνοι φλοιού, που θα λαμβάνονταν από 2 έως 3 χιλιάδες δέντρα τα οποία έτσι θα καταστρέφονταν.

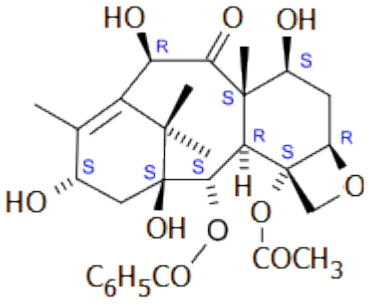
Για μια πλήρη θεραπευτική αγωγή με ταξόλη χρειάζονται μέχρι και 2 g ταξόλης (σε 4 έως 6 ενέσεις). Έτσι, υπολογίσθηκε ότι κάθε χρόνο θα

έπρεπε να κόβονται 360 χιλιάδες δέντρα. Ο *Taxus* αναπτύσσεται πολύ αργά, είναι ένα σχετικά σπάνιο δέντρο που βρίσκεται σε απόμακρες περιοχές, δεν σχηματίζει μεγάλες συστάδες και έτσι δεν είναι εύκολη η δημιουργία φυτειών του. Όλα αυτά καθιστούσαν το πρόβλημα μη αντιμετωπίσιμο (61). Τότε ξεκίνησε μια άλλη αναζήτηση: Η συνθετική και η ημισυνθετική παρασκευή του φαρμάκου.

Από τα τέλη της δεκαετίας του 1970 Γάλλοι και Αμερικανοί επιστήμονες άρχισαν να ενδιαφέρονται για τη συνθετική παρασκευή της ταξόλης. Ο Αμερικανός χημικός Robert A. Holton (Florida State University) ξεκίνησε την ολική σύνθεση της ταξόλης από απλές χημικές ουσίες, θέλοντας να δοκιμάσει τα επιμέρους στάδια της σύνθεσης και τις σχετικές τεχνικές και όχι για πρακτική εφαρμογή σε μεγάλη κλίμακα. Αντίθετα, ο Γάλλος χημικός Potier Pierre (CNRS Centre de la Reserche Scientific) εξαρχής σκόπευσε στην καλή απόδοση, ώστε η σύνθεση αυτή να είναι εφαρμόσιμη στη φαρμακευτική βιομηχανία.

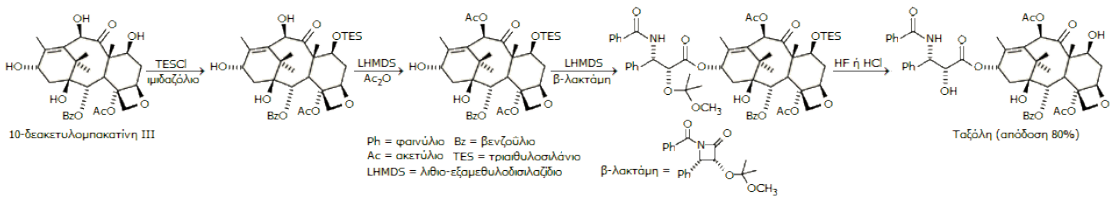
Ημισυνθετική πορεία. Η ομάδα του Holton, έχοντας την εμπειρία της ολικής σύνθεσης, παρουσίασε μια σχετικά εύχρηστη ημισυνθετική μέθοδο. Χρησιμοποίησε ως πρώτη ύλη τη φυσική ουσία 10-δεακετυλομπακατίνη (10-deacetylbaccatin, 10-DAB) (Εικόνα 7), η οποία βρίσκεται σε αρκετή ποσότητα στο Ευρωπαϊκό έλατο *Taxus baccata*. Η 10-DAB εμπεριέχει το κύριο ("συνθετικά δύσκολο") τμήμα της δομικής

πολυπλοκότητας της ταξόλης (τους 9 ασύμμετρους άνθρακες από τους 11 της ταξόλης). Τα βελονοειδή φύλλα και τα κλαδιά του ελάτου περιείχαν αρκετή ποσότητα (περίπου 0,1% σε ξηρά βάση) της 10-DAB. Το έλατο δεν χρειαζόταν πλέον να κοπεί και επομένως η πηγή της 10-DAB ήταν ανανεώσιμη και δεν υπήρχε κάποια βλάβη για το οικοσύστημα.



Εικόνα7:10-δεακετυλομπακατίνη III (10-DAB)

Το τμήμα των ανθράκων 1', 2' και 3' (*N*-βενζοϋλο-2'R,3'S-3-φαινυλο-ισοσερίνη), που συνδέεται με τον άνθρακα 13 του συγκροτήματος των δακτυλίων, συχνά αναφέρεται απλά ως "ουρά" του μορίου. Για το τμήμα αυτό, παρασκευάζεται χωριστά μια β-λακτάμη, γνωστή ως <u>λακτάμη Ojima</u>, η οποία στη συνέχεια συνδέεται με την 10-DAB, αφού προηγουμένως "προστατευθούν" ορισμένες ομάδες της τελευταίας. Η σειρά των αντιδράσεων (δεν περιλαμβάνεται η σύνθεση της β-λακτάμης) είναι η ακόλουθη:



Κρισιμότητα των επιμέρους ομάδων του μορίου. Η επίδραση και η χρησιμότητα των διάφορων χαρακτηριστικών ομάδων του μορίου στη βιοδραστικότητα της ταξόλης εξετάσθηκε με τη σύνθεση διάφορων τροποποιημένων μορφών της. Ορισμένα από τα συμπεράσματα στα οποία οι έρευνες αυτές κατέληξαν έχουν ως εξής (62):

Σε ό,τι αφορά στην "ουρά", την ομάδα δηλαδή που είναι συνδεδεμένη με τον C13 του κεντρικού συγκροτήματος των δακτυλίων:

- Προστασία του υδροξυλίου του C2' με εστεροποίηση, που απενεργοποιεί τη δραστικότητα ως προς τη σταθεροποίηση των κυτταροσκελετικών μικροσωληνίσκων, όχι όμως την κυτταροτοξικότητα της ένωσης.
- Η αμιδική-ακυλική ομάδα του C3' είναι απαραίτητη, ωστόσο δεν έχει σημασία αν έχει αρωματική ομάδα ή αλκύλιο.
- Το άζωτο που συνδέεται με τον C3' μπορεί να αντικατασταθεί με οξυγόνο χωρίς απώλεια της βιοδραστικότητας.
- Το αρύλιο που συνδέεται με τον C3' είναι απαραίτητο. Αντικατάστασή του με μεθύλιο μειώνει τη βιοδραστικότητα κατά 19 φορές.

Σε ό,τι αφορά στο σύστημα των τεσσάρων δακτυλίων:

- Ο οξετανικός δακτύλιος D είναι ιδιαίτερα κρίσιμος. Διάνοιξή του παρέχει ένωση με δραματικά μειωμένη βιοδραστικότητα.
- "Στένεμα" του 8-μελούς δακτυλίου B σε 7-μελή παρέχει ένωση με την ίδια βιοδραστικότητα ως προς τη σταθεροποίηση των μικροσωληνίσκων.

- Απομάκρυνση της ακετυλικής ομάδας από τον C10 παρέχει ένωση με την ίδια βιοδραστικότητα.
- Απομάκρυνση της Ο-βενζοϋλικής ομάδας από τον C2 παρέχει ένωση με εξαιρετικά μειωμένη βιοδραστικότητα ταξόλης.

Η αδυναμία της εξασφάλισης των απαραίτητων ποσοτήτων ταξόλης εξαρχής έθεσε το ερώτημα του κατά πόσο είναι δυνατή μια ολική σύνθεση της ένωσης. Δηλαδή μιας σύνθεσης, όπου θα γινόταν χρήση απλών (μικρομοριακών) και εμπορικά διαθέσιμων χημικών ουσιών, ως πρώτων υλών.

Εξαρχής οι επιστήμονες που ασχολήθηκαν με την ολική σύνθεση της ταξόλης δεν έτρεφαν αυταπάτες. Σε καμιά περίπτωση οποιοδήποτε σχήμα ολικής σύνθεσης δεν θα μπορούσε να οδηγήσει σε μια "οικονομικώς βιώσιμη" παρασκευή της ουσίας σε μεγάλες ποσότητες. Η ολική σύνθεση ήταν περισσότερο ένα είδος "επιστημονικής πρόκλησης" και ένα πεδίο δοκιμών, βελτίωσης των υπαρχουσών τεχνικών οργανικής σύνθεσης και εισαγωγής νέων, αλλά και ένα πεδίο ανταγωνισμού των μεγαλύτερων συνθετικών οργανικών χημικών της εποχής μας.

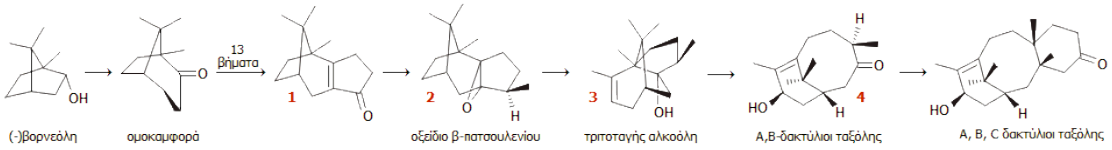
Θα πρέπει να τονισθεί ότι η ολική σύνθεση της ίδιας της ταξόλης δεν έχει μόνο θεωρητικό ενδιαφέρον ("σύνθεση για τη σύνθεση"). Οι συνθέσεις

αυτές, εύκολα μπορούν να τροποποιηθούν σε κάποια στάδιά τους και να οδηγήσουν σε τροποποιημένες μορφές ταξόλης, που συλλογικά αναφέρονται ως ταξοειδή (taxoids). Πολλά ταξοειδή θα μπορούσαν να αποδειχθούν κατά πολύ δραστικότερες από την ίδια.

Κατά τη δεκαετία του 1990, ασχολήθηκαν με την ολική σύνθεση της ταξόλης περίπου 30 ερευνητικές ομάδες σε όλο τον κόσμο. Αυτές οι συνθέσεις της ταξόλης περιλαμβάνονται πλέον στις αριστουργηματικές και μνημειώδεις οργανικές συνθέσεις. Οι ερευνητικές ομάδες των καθηγητών Holton, Nicolaou και Danishefsky κατάφεραν να συνθέσουν την ουσία.

Σύνθεση κατά Holton: Το 1994, η ομάδα του Holton χρησιμοποίησε μια γραμμική (linear) συνθετική οδό, δηλαδή σταδιακές αλλαγές και προσθήκες σε ένα αρχικό μόριο. Χρησιμοποιεί τη φυσική ουσία (-)βορνεόλη ως πρώτη ύλη, την οποία μετατρέπει στην ακόρεστη κετόνη **1** σε 13 χημικά στάδια. Στην **1** πραγματοποιείται εισαγωγή της εποξειδικής ομάδας για να ληφθεί η ένωση **2**, το οξείδιο του β-πατσουλενίου (β-patsoulene), μια εμπορικά διαθέσιμη φυσική ένωση, παράγωγο της πατσουλόλης, συστατικού του αρωματικού αιθέριου ελαίου πατσουλί. Η **2** ήδη περιέχει τα 15 από τα 20 άτομα άνθρακα του συστήματος των δακτυλίων ABCD. Η **2** μετά από σκελετική αντιμετάθεση παρέχει την τριτοταγή αλκοόλη **3**. Η **3** με νέα εποξείδωση και θραυσματοποίηση

οδηγεί στην ένωση **4** που περιλαμβάνει πλέον το χαρακτηριστικό σύστημα των δακτυλίων Α και Β της ταξόλης. Ακολουθεί εισαγωγή του δακτυλίου C με τη μεθοδολογία σχηματισμού δακτυλίου (annulation) Robinson-Stock (Εικόνα 8).

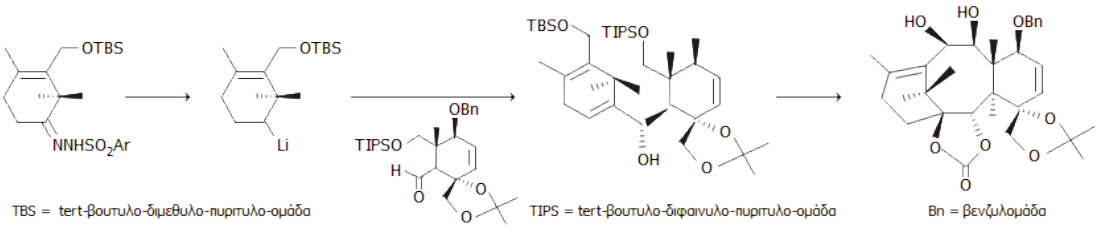


Εικόνα 8: Σύνθεση κατά Holton

Άλλα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ως "πρώτες ύλες" ήταν: η 4-πεντενάλη, το m-χλωροϋπερβενζοϊκό οξύ, το μεθυλομαγνησιοβρωμίδιο και το φωσγένιο (63).

Σύνθεση κατά Nicolaou: Το 1994, η ομάδα του Nicolaou χρησιμοποίησε μια συγκλίνουσα (convergent) συνθετική οδό. Οι δακτύλιοι Α και C παρασκευάστηκαν χωριστά (συνθόνες) και στη συνέχεια συνδέθηκαν μεταξύ τους μέσω μιας αντίδρασης Shapiro (μετατροπή κετόνης ή αλδεΰδης σε αλκένιο, μέσω ενδιάμεσου σχηματισμού υδραζόνης). Ακολούθησε μια σύζευξη McMurray (σύζευξη δύο καρβονυλικών ενώσεων προς σχηματισμό αλκενίου, γνωστή και "πινακολινική σύζευξη") για να "κλείσει" ο οκταμελής δακτύλιος Β. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η εισαγωγή του οξετανικού δακτυλίου D και η συνθόνη της "ουράς" (λακτάμη Ojima) του άνθρακα 13 (Εικόνα 9).

Περισσότερες λεπτομέρειες θα πρέπει να αναζητηθούν στις αρχικές δημοσιεύσεις (64).

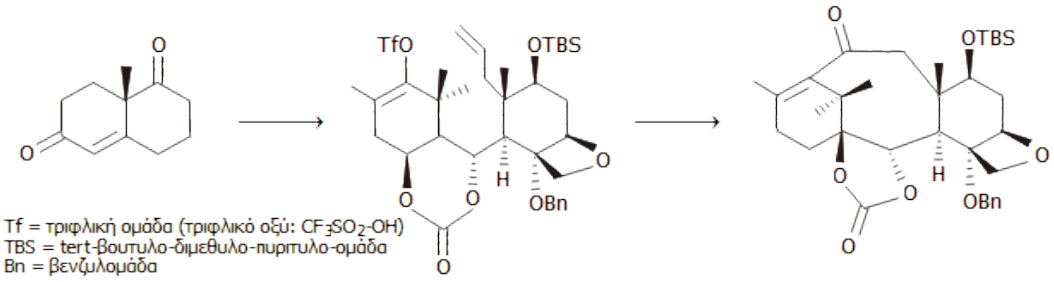


Εικόνα 9: Σύνθεση κατά Nicolaou

Χρησιμοποιήθηκε ένα πλήθος αντιδραστηρίων ως πρώτες ύλες, ως προστατευτικά μέσα ομάδων κ.α. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται τα: βλενικό οξύ (mucic acid), 2-χλωροακρυλονιτρίλιο, υδρίδιο αργιλίου-λιθίου, φωσγένιο, γλυκολικό οξύ, βενζαλδεΰδη, εξαμεθυλοφωσφοραμίδιο (HMPA), προπιονικός αιθυλεστέρας, αλλυλική αλκοόλη, ακετόνη, ακετυλακετόνη, μεθυλοβρωμίδιο, οξικό οξύ, φαινυλολίθιο και χλωροχρωμικό πυριδίνιο.

Σύνθεση κατά Danishefsky: Το 1996, η ομάδα του Danishefsky χρησιμοποίησε μια επίσης συγκλίνουσα συνθετική οδό με πολλές ομοιότητες με εκείνη της σύνθεσης της ομάδας Nicolaou. Μία από τις αρχικές ενώσεις ήταν η κετόνη Wieland-Miescher, μια εξαιρετικά χρήσιμη και εμπορικά διαθέσιμη συνθόνη, η οποία έχει χρησιμοποιηθεί σε μεγάλο αριθμό ολικών συνθέσεων φυσικών προϊόντων. Μια επιπλέον διαφορά της συνθετικής πορείας -σε σχέση με τη σύνθεση της ομάδας Nicolaou- είναι η προηγούμενη εισαγωγή του οξετανικού δακτυλίου D στον

κυκλοεξανολικό δακτύλιο C, πριν από το "κλείσιμο" του κεντρικού οκταμελούς δακτυλίου B (Εικόνα 10).



Εικόνα 10: Σύνθεση κατά Danishefsky

Και στη σύνθεση αυτή χρησιμοποιήθηκε ένα πλήθος αντιδραστηρίων ως πρώτες ύλες, ως προστατευτικά μέσα ομάδων κ.α., όπως τα: κετόνη Wieland-Miescher, 2-μεθυλο-3-πεντανόνη, υδρίδιο αργιλίου-λιθίου, τετροξείδιο του οσμίου, φαινυλολίθιο, ακρυλοϋλοχλωρίδιο και χλωροχρωμικό πυριδίνιο. Κύριες αντιδράσεις μετασχηματισμών ήσαν η αντίδραση Johnson-Corey-Chaykovsky (μετατροπή καρβονυλικής ομάδας σε εποξειδική) και η αντίδραση Heck (εισαγωγή ομάδων σε αλκένια). Περισσότερες λεπτομέρειες θα πρέπει να αναζητηθούν στις αρχικές δημοσιεύσεις (45).

Παραγωγή της ταξόλης από την BMS μέσω φυτικών κυττάρων

Η ημισυνθετική μέθοδος της ομάδας Holton κάλυψε τις ανάγκες σε ταξόλη για πολλά χρόνια (από το 1993). Ωστόσο, και αυτή ήταν πολύπλοκη. Χρειάζονταν 11 χημικές μετατροπές και 7 απομονώσεις. Ακόμη

απαιτούσε τη χρήση 13 διαλυτών και 13 οργανικών αντιδραστηρίων και πολλά άλλα υλικά απαραίτητα για τους διαχωρισμούς και τους καθαρισμούς. Τελικά, η εταιρεία κάτοχος των διακαιωμάτων της πακλιταξέλης προτίμησε μια βιοτεχνολογική μέθοδο ζύμωσης με κύτταρα φυτών (Plant Cell Fermentation Technology, PCF).

Η μέθοδος αυτή ξεκινάει με μάζες αδιαφοροποίητων κυττάρων (calluses) του ελάτου *taxus*, τα οποία πολλαπλασιάζονται σε υδατικό διάλυμα σε μεγάλους αντιδραστήρες ζύμωσης με προσθήκη θρεπτικών συστατικών (σάκχαρα, αμινοξέα, βιταμίνες, ιχνοστοιχεία) και υπό ελεγχόμενες συνθήκες. Η ταξόλη εκχυλίζεται άμεσα, καθαρίζεται με χρωματογραφία και απομονώνεται με κρυστάλλωση.

Σε σύγκριση με την ημι-συνθετική, η βιοτεχνολογική μέθοδος είναι πολύ καλύτερη, δεν χρησιμοποιεί τοξικές χημικές ουσίες και διαλύτες και καταναλώνει ελάχιστη ενέργεια. Στην ουσία η μέθοδος είναι μια τυπική μέθοδος "πράσινης χημείας" (green chemistry) και αποδίδει τα ίδια προϊόντα με λιγότερα προβλήματα από περιβαλλοντική άποψη.

Το 1993 ανακαλύφθηκε ότι η ταξόλη παράγεται στο έλατο από μύκητες που ζουν στο φλοιό του ελάτου, αλλά βρέθηκε ότι και άλλοι ενδοφυτικοί μύκητες (όπως ο *Nodulisporium sylviforme*) μπορούν να παράγουν την ταξόλη (61).

Κλινικές εφαρμογές - Χορήγηση (65)

Η ταξόλη έχει εγκριθεί ως αντικαρκινικό φάρμακο για τους καρκίνους των ωοθηκών, του μαστού και των πνευμόνων. Επίσης έχει χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία του σαρκώματος Kaposi. Έχει εκτιμηθεί ότι το κόστος της θεραπείας ασθενούς με έγκαιρα διαγνωσμένο καρκίνο του μαστού (για 4 κύκλους θεραπείας) είναι περίπου 6000 δολάρια ΗΠΑ, ενώ το κόστος της καθαρής (99,5%) ουσίας είναι περίπου 235 δολάρια ΗΠΑ για ποσότητα 1 g (τιμή Αυγούστου 2009).

Η ταξόλη χορηγείται ενδοφλεβίως πάντοτε υπό ιατρική επίβλεψη. Ένα από τα μειονεκτήματα του φαρμάκου είναι η χαμηλή διαλυτότητά του στο νερό αλλά και στους περισσότερους φαρμακευτικώς αποδεκτούς διαλύτες.

Στο εμπόριο διατίθεται σε φιαλίδια ως διάλυμα σε μίγμα (1:1) αιθανόλης και μιας υγρής μη-ιοντικής επιφανειακώς ενεργού ουσίας, με την εμπορική ονομασία Cremophor L (προϊόν της BASF). Το Cremophor L είναι ένα υδατοδιαλυτό, πολυοξυαιθυλιωμένο παράγωγο του καστορέλαιου. Παρασκευάζεται με αντίδραση του καστορέλαιου με αιθυλενοξείδιο σε γραμμομοριακή αναλογία 1 προς 35. Το Cremophor L δρα ως γαλακτωματοποιητής (emulsifier), είναι ικανοποιητικά ανεκτός από τον οργανισμό. Πριν από την ενδοφλέβια χορήγηση, το διάλυμα αυτό

αραιώνεται με φυσιολογικό ορό (διάλυμα NaCl 0,9%) ή διάλυμα γλυκόζης 5%, οπότε δημιουργείται ένα εναιώρημα ταξόλης.

Έχουν προταθεί αρκετοί άλλοι βελτιωμένοι τρόποι χορήγησης της ταξόλης (περισσότερο ανεκτοί από τους ασθενείς, ταχύτερη διαδικασία χορήγησης), όπως υπό τη μορφή λιποσωμάτων ή νανοσωματιδίων. Υδατοδιαλυτά είναι και ορισμένα συμπλέγματα ταξόλης με δεξτράνες και κυκλοδεξτρίνες. 'Ενα σκεύασμα με την εμπορική ονομασία Abraxane είναι σύζευγμα ταξόλης-αλβουμίνης και διατίθεται σε μορφή σκόνης μετά από λυοφιλίωση. Το Abraxane υπόκειται σε ανασύσταση με νερό και παρέχει ενέσιμο εναιώρημα λίγο πριν από τη χορήγηση σε ασθενείς.

Η ταξόλη, ως δραστικότατο αντικαρκινικό χημειοθεραπευτικό φάρμακο, προκαλεί σοβαρές και δυσάρεστες παρενέργειες παροδικού χαρακτήρα. Σε αυτές περιλαμβάνονται: πλήρης απώλεια τριχοφυΐας, αναιμία, αιμορραγίες, μυαλγίες και αρθραλγίες, διάρροια, έμετοι, βραδυκαρδία, υπόταση, αλλά και υπέρταση.

Ορισμένα φαρμακοκινητικά δεδομένα: Βιοδιαθεσιμότητα (από το στόμα): 6,5%, δέσμευση πρωτεΐνης: 89-98%, μεταβολισμός: ηπατικός (CYP28, CYP3A4), ημιζωή: 5,8 ώρες, απέκκριση: κόπρανα, ούρα.

Αντικαρκινικά φάρμακα παρόμοιας δομής - Ταξάνια (66)

Τα τελευταία χρόνια έχουν εγκριθεί παρόμοια αντικαρκινικά φάρμακα παρόμοιας δομής και δράσης με εκείνη της ταξόλης. Τυπικό παράδειγμα αποτελεί το φάρμακο ντοκοταξέλη (docotaxel) με την εμπορική ονομασία Taxotere (της φαρμακευτικής εταιρείας Sanofi-Aventis).

Η ντοκοταξέλη διαφέρει δομικά από την ταξόλη σε δύο μόνο σημεία που την καθιστά περισσότερο υδατοδιαλυτή σε σχέση με την ταξόλη: Το υδροξείδιο του C-10 είναι ελεύθερο και στην "ουρά" του C-13 υπάρχει μια ομάδα καρβαμιδικού εστέρα της t-βουτυλικής αλκοόλης αντί της ομάδας του βενζυλαμιδίου.

Η ομάδα των φαρμάκων αυτών ονομάζονται συλλογικά ταξάνια (taxanes) και η φυσιολογική τους δράση είναι παρόμοια. Όλα τα ταξάνια περιλαμβάνουν ως κύριο δομικό στοιχείο το διτερπένιο ταξαδιένιο, το οποίο παράγεται από τα έλατα του γένους Taxus. Η βιοσύνθεση του ταξαδιενίου και της ταξόλης έχει αποτελέσει αντικείμενο έντονης έρευνας και τα κύρια στάδιά της έχουν διευκρινισθεί.

Οι 3 φάσεις της επαναστένωσης και η δράση της Πακλιταξέλης

Κατά το παρελθόν, η διαδερμική ενδοαυλική αγγειοπλαστική (percutaneous transluminal angioplasty-PTA) θεωρήθηκε πρωτοποριακή για την αντιμετώπιση της περιφερικής αποφρακτικής αρτηριοπάθειας (67). Ωστόσο, η πιθανή επαναστένωση σε ποσοστό 20% με 50% , αναλόγως της εντόπισης και του τύπου της αγγειακής βλάβης, αποτελεί σημαντικό μειονέκτημα το οποίο περιορίζει τα ικανοποιητικά αποτελέσματα της μεθόδου (68). Η διαδικασία της επαναστένωσης δεν έχει ακόμα πλήρως μελετηθεί και αποτελεί μία σύνθετη βιολογική απάντηση του αγγειακού τοιχώματος στην εστιακή βλάβη που προκαλείται μετά την αγγειοπλαστική και την τοποθέτηση του stent. Παρόλα αυτά, υπάρχουν τόσο κλινικά όσο και πειραματικά δεδομένα βάσει των οποίων η κύρια διαδικασία της επαναστένωσης περιλαμβάνει την εκσεσημασμένη υπερπλασία των λείων μυϊκών κυττάρων (smooth muscle cells-SMCs) και των ινοβλαστών, τη μετανάστευση των κυττάρων προς τον αυλό των αγγείων και τέλος την υπέρμετρη παραγωγή διάμεσης ουσίας (matrix) 5.

Η τοποθέτηση των ενδαγγειακών stents φαίνεται ότι μειώνει την πιθανότητα επαναστένωσης περισσότερο αποτρέποντας την οξεία ελαστική αντίδραση, παρά αναστέλλοντας την ανάπτυξη των λείων μυϊκών κυττάρων και την παραγωγή νεοενδοθηλίου. Αντιθέτως, αναλόγως του σχήματος τους, τα stents όχι μόνο επάγουν τη συσσώρευση

αιμοπεταλίων (69) αλλά και αυξάνουν τις τοπικές πιέσεις που ασκούνται στα τοιχώματα των αγγείων και κατ' επέκταση την πιθανότητα ρήξης του αυλού (70). Όλα αυτά έχουν σαν αποτέλεσμα την αναντιστοιχία της ευενδοτότητας των αρτηριών με και χωρίς stent (71), γεγονός που δυνητικά οδηγεί σε επαναστένωση.

Κατά το παρελθόν, ακολουθήθηκαν δύο μέθοδοι αντιμετώπισης της επαναστένωσης: 1) η ραδιενεργή και 2) η φαρμακολογική. Αν και η ενδαγγειακή βραχυθεραπεία και τα ραδιενεργά stents ήταν πολλά υποσχόμενα, ακόμα μένουν να αντιμετωπισθούν κάποια σημαντικά προβλήματα όπως το επονομαζόμενο candy-wrapper effect (72), θρομβώσεις, δημιουργία ανευρυσμάτων, καθώς και καθυστέρηση ή ακόμα και αναστολή της επανενδοθηλιοποίησης του αγγειακού αυλού.

Συστηματικές φαρμακολογικές προσεγγίσεις δεν έχουν αποδειχθεί πιο αποτελεσματικές. Ωστόσο, η τοπική εφαρμογή αντιϋπερπλαστικών ουσιών, όπως για παράδειγμα Sirolimus (73) ή πακλιταξέλη (74), παρέχει ενθαρρυντικά αποτελέσματα.

Η παθοφυσιολογία της επαναστένωσης μετά από PTA δεν έχει καταστεί πλήρως κατανοητή. Υπάρχει ομοφωνία σχετικά με τους κύριους μηχανισμούς που συμμετέχουν στην ανάπτυξη επαναστένωσης (75).

1. Σχηματισμός θρόμβου στο σημείο της αγγειακής βλάβης μετά τη διαστολή.
2. Συσσώρευση SMCs και μυοϊνοβλαστών ως αποτέλεσμα της δράσης κυτταροκινών που απελευθερώνονται από μακροφάγα, ενδοθηλιακά κύτταρα και SMCs. Έτσι, SMCs και μυοϊνοβλαστες πολλαπλασιάζονται και μεταναστεύουν στο ενδοθήλιο.
3. Η διαδικασία της επαναστένωσης ολοκληρώνεται με υπερπαραγωγη εξωκυτταριου matrix από τα SMCs και ινοβλάστες.

Διάφορες στρατηγικές έχουν αναπτυχθεί στο παρελθόν για την αντιμετώπιση της επαναστένωσης. Ωστόσο, οι περισσότερες από αυτές απέτυχαν να μειώσουν αποτελεσματικά το βαθμό επαναστένωσης μετά από αγγειοπλαστική. Ουσιαστικά, δύο κύριες φαρμακευτικές ουσίες φαίνεται να είναι αποτελεσματικές και να περιορίζουν την επαναστένωση μετά από PTA, το sirolimus και η PTX. Το sirolimus είναι ευρέως γνωστό για τις ανοσοτροποποιητικές ιδιότητες του, καθώς χρησιμοποιείται συχνά ως ανοσοκατασταλτικό μετά από μεταμόσχευση. In vitro και in vivo μελέτες επιβεβαιώνουν τη δράση του ως παράγοντα αναστολής της ανάπτυξης των κυττάρων (75).

Η PTX είναι ικανός κυτταροστατικός παράγοντας που χρησιμοποιείται στην ογκολογία και στην άκτινο-ογκολογία. Δρα σταθεροποιώντας τους μικροσωληνίσκους (68). Έτσι, τροποποιεί αποτελεσματικά την λειτουργία

τους. Αναστέλλονται ενδοκυττάριες διαδικασίες που σχετίζονται με τις λειτουργικότητα των μικροσωληνίσκων όπως η μίτωση, η μετανάστευση των κυττάρων και η παραγωγή πρωτεϊνών του εξωκυττάριου χώρου.

Έχει περιγραφεί μείωση του βαθμού της επαναστένωσης καθώς και διάταση του αγγείου σε μοντέλο χοίρειας καρδιάς μετά την απελευθέρωση PTX με μπαλόνι διπλού αυλού στο αγγειακό τοίχωμα (76). Επιπλέον, έχει περιγραφεί πλήρης αναστολή της ενδοθηλιακής υπερπλασίας σε καρωτίδες ποντικού μέσω περιαγγειακής αποδέσμευσης PTX (77). Με τη χρήση PTX coated stents έχει παρατηρηθεί αποτελεσματική μείωση της επαναστένωσης τόσο σε μοντέλο χοίρου όσο και κουνελιού (78, 79). Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι εξαιτίας της τοπικής απελευθέρωσης φαρμακευτικών ουσιών, η επούλωση του αγγειακού τοιχώματος παρατείνεται και παραμένει ατελής σε σχέση με τα controls (78). Παράλληλα, πολλές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί με στόχο τη βελτίωση του συνδυασμό της PTX με το όχημα μεταφοράς της στο όργανο στόχο (80-82).

Ωστόσο, μέχρι το 2002 δημοσιεύτηκαν οι πρώτες μελέτες βάσει των οποίων η επαναστένωση μπορεί να καθυστερήσει και όχι να αποφευχθεί με τη χορήγηση PTX (83-85). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι Hwang και συνεργάτες έδειξαν ότι η επίδραση των τοπικών φυσιολογικών δυνάμεων στο τοίχωμα του αγγείου (αιματική ροή) μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική

διαφοροποίηση των συγκεντρώσεων της φαρμακευτικής ουσίας σε σχέση με τη μέση αναμενόμενη συγκέντρωση (83). Παρ'όλα αυτά, οι Scheller και συνεργάτες παρατήρησαν ότι σκιαγραφικό που περιέχει PTX το οποίο προσκολλάται στο τοίχωμα του αγγείου μπορεί να μειώσει το βαθμό επαναστένωσης σε στεφανιαία αγγεία χοίρων που φέρουν stent (84).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΤΗΣ ΠΑΚΛΙΤΑΞΕΛΗΣ, ΜΕ ΤΙΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ ΤΗΣ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ, ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΜΠΑΛΟΝΙΩΝ ΑΓΓΕΙΟΠΛΑΣΤΙΚΗΣ ΚΑΛΥΜΜΕΝΩΝ ΜΕ ΤΗ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΟΥΣΙΑ ΣΕ ΟΥΡΗΤΗΡΑ ΧΟΙΡΟΥ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός: Το ουροθήλιο αποτελεί τον «πιο σφιχτό και αδιαπέραστο φραγμό στο ανθρώπινο σώμα». Μελετήσαμε την κατανομή της πακλιταξέλης (paclitaxel –PTX) στο ουρητηρικό τοίχωμα μετά από τη διαστολή ενός μπαλονιού αγγειοπλαστικής επικαλυμμένου με paclitaxel (Paclitaxel-eluting balloons - PEB), με σκοπό να διερευνηθεί η δυνατότητα κλινικής χρήσης των PEBs σε ουρητήρες.

Υλικά και μέθοδοι: Χρησιμοποιήθηκαν εννέα οικόσιτοι χοίροι. Πραγματοποιήθηκε διαστολή εννέα PEBs και εννέα συμβατικών μπαλόνιων αγγειοπλαστικής (Conventional angioplasty balloons- CB) στο δεξιό και αριστερό ουρητήρα του κάθε ζώου, αντιστοίχως. Ο ουρητήρας ο οποίος έφερε το CB αποτέλεσε το control για τον αντίπλευρο ουρητήρα.

Ακολούθησε η εξέταση των δειγμάτων: άμεσα μετά τη διάταση του μπαλονιού (Group A), μετά από 12 ώρες (Group B) και μετά από 24 ώρες (Group C). Δύο δείγματα απομονώθηκαν από κάθε ουρητήρα των Groups A,B και C. Το ένα δείγμα μελετήθηκε με τη μέθοδο της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού. Το άλλο υποβλήθηκε σε ιστοπαθολογική μελέτη και ανοσοϊστοχημική ανάλυση (IHC), χρησιμοποιώντας ειδικό πολυκλωνικό αντίσωμα για την πακλιταξέλη.

Αποτελέσματα: Παρατηρήθηκε μειωμένη φλεγμονή στα δείγματα των ουρητήρων των Group B και C σε σύγκριση με τα controls τους. Η πακλιταξέλη εμφάνισε μεγαλύτερη κατανομή στο ουροθήλιο και στον υποβλεννογόνιο χιτώνα, στα δείγματα του Group A (IHC). Στα δείγματα των Group B και C, η πακλιταξέλη επίσης ανιχνεύθηκε στο ουροθηλιακό, υποβλεννογόνιο και μυικό τοίχωμα. Η συγκέντρωση της πακλιταξέλης (NMR) ήταν μειωμένη στο Group C, σε σύγκριση με τα δείγματα του Group B.

Συμπεράσματα: Παρατηρείται κατανομή της πακλιταξέλης στο ουροθήλιο, στον υποβλεννογόνιο ιστό και στις λείες μυικές στιβάδες. Μείωση της φλεγμονής ανιχνεύθηκε στις περιπτώσεις στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν PEBs.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα μπαλόνια αγγειοπλαστικής καλυμμένα με φαρμακευτική ουσία (drug-eluting balloons – DEBs) έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στη διαχείριση περιπτώσεων αγγειακής στένωσης (86, 87). Χάρη σε αυτά τα μέσα εξασφαλίζεται αφενός μεν η διάνοιξη των στενωμένων αγγείων, με παρόμοιο τρόπο δράσης με αυτόν των CBs, ενώ αφετέρου είναι δυνατή η τοπική αποδέσμευση κυτταροστατικών παραγόντων, η οποία θα οδηγήσει σε μείωση της φλεγμονής, καθώς και του βαθμού επαναστένωσης (88). Επί του παρόντος, τα DEBs θεωρούνται ως εναλλακτική επιλογή παρέμβασης στις αγγειακές στενώσεις, οι οποίες θα αντιμετωπίζονταν με τη χρήση ενδοπροθέσεων που εκλύουν φαρμακευτικές ουσίες (drug-eluting stents- DESs) (86, 87, 89). Τα DEBs εξασφαλίζουν την τοπική παροχή ουσιών χωρίς να χρειάζεται να παραμένει ενδοπρόθεση στη θέση που γίνεται η αγγειοπλαστική. Έτσι, διατηρούν τη δράση κατά της υπερπλασίας του ενδοθηλίου των DESs, χωρίς τους περιορισμούς που αυτά επιβάλλουν (86)

Τα μπαλόνια που χρησιμοποιούνται για τη διάταση και την ελάχιστα επέμβατική διαχείριση των ουρητηρικών στενωμάτων είναι παρόμοιας λογικής με αυτά που χρησιμοποιούνται στην αγγειοπλαστική (11). Η ελάχιστα επεμβατική αντιμετώπιση των ουρητηρικών στενωμάτων

σχετίζεται με ποικίλα ποσοστά επιτυχίας (11, 12, 90-92). Η επαναστένωση των ουρητηρικών στενωμάτων, παρά την προηγηθείσα αντιμετώπιση, σχετίζεται με την παρουσία συνδετικού ιστού πλούσιου σε κολλαγόνο, λίγους ινοβλάστες και λεία μυϊκά κύτταρα στην περιοχή της στενωτικής ουλής (93). Η περίσσεια κολλαγόνου τύπου 3 , που έχει εντοπισθεί σε στενώματα ουρητήρα (σε σχέση με το κολλαγόνο τύπου 1), έχει συσχετισθεί με την πρόκληση ουρητηρικής ίνωσης και στένωσης του αυλού (94-97). Το κολλαγόνο στον ουρητήρα παράγεται κυρίως από λεία μυϊκά κύτταρα (smooth muscle cells –SMCs) (97). Η πακλιταξέλη αποτελεί έναν χημειοθεραπευτικό παράγοντα που σταθεροποιεί τους κυτταρικούς μικροσωληνίσκους και οδηγεί στην αναστολή της κυτταρικής αντιγραφής (98-100). Επίσης, εμφανίζει δοσοεξαρτώμενη επίδραση στα λεία μυϊκά κύτταρα του ουρητήρα, καθώς και στην υπερπλασία των κυττάρων του ουροθηλίου. Η αντιυπερπλαστική επίδραση της πακλιταξέλης στα λεία μυϊκά κύτταρα οδηγεί σε μείωση της παραγωγής κολλαγόνου τύπου 3 από τα εν λόγω κύτταρα. Αυτό το γεγονός αποτελεί ουσιαστικά τον μηχανισμό πρόληψης της ινωτικής αντίδρασης που κατ' επέκταση οδηγεί σε στενώσεις του ουρητήρα (101).

Δεδομένων των προαναφερθέντων, η χρήση των DEBs με πακλιταξέλη αποτελεί μία ενδιαφέρουσα προοπτική για τη βελτιστοποίηση των αποτελεσμάτων της ελάχιστα επεμβατικής θεραπείας των ουρητηρικών

στενωμάτων. Ωστόσο, η εν λόγω επιλογή ίσως δυσχεραίνεται λόγω των ιδιαιτέρων ιδιοτήτων του ουροθηλίου. Το πολύστοιβο ουροθήλιο δημιουργεί έναν φραγμό ο οποίος μπορεί να προσαρμοστεί στις μεγάλες εναλλαγές του όγκου των ούρων, ενώ ταυτόχρονα ρυθμίζει την ανταλλαγή στοιχείων ανάμεσα στην κυκλοφορία του αίματος και τα ούρα (39) Επιπλέον, το ουροθήλιο εμφανίζει εξαιρετικά χαμηλή διαπερατότητα σε παράγοντες, όπως το νερό και τα ιόντα, τα οποίοι φυσιολογικά διαπερνούν μεμβράνες με ταχύ ρυθμό (102). Ο ανωτέρω φραγμός δημιουργείται από το στρώμα των κυττάρων «τύπου ομπρέλας» του ουροθηλίου τα οποία έχουν στενή κυτταρική σύνδεση μεταξύ τους, με τις λεγόμενες «tight junctions». Επιπροσθέτως, υπάρχει ένα στρώμα γλυκανών, καθώς και μία μεμβράνη με χαρακτηριστική λιπιδιακή και πρωτεινική σύσταση (98, 103-107). Τα εν λόγω κύτταρα «τύπου ομπρέλας» έχουν τη δυνατότητα να μεταβάλλουν την επιφάνεια τους με μηχανισμούς εξωκυττάρωσης και ενδοκυττάρωσης (108-111).

Τα παραπάνω ιστολογικά στοιχεία είναι αυτά που καθιστούν το ουροθήλιο «τον πιο σφιχτό και αδιαπέραστο φραγμό στο σώμα». (20) Το πρώτο βήμα για την αξιολόγηση των PEBs σε στενώματα ουρητήρα αποτελεί η μελέτη της κατανομής της πακλιταξέλης στο ουρητηρικό τοίχωμα και η επιβεβαίωση της διείσδυσης της ουσίας στα λεία μυϊκά κύτταρα.

Μελετήσαμε την κατανομή της πακλιταξέλης που απελευθερώνεται από τα DEBs σε μοντέλο ουρητήρα χοίρου.

2. ΥΛΙΚΑ και ΜΕΘΟΔΟΙ

Ζώα και Υλικά

Ζώα.

Εννέα οικόσιτοι θηλυκοί χοίροι βάρους μεταξύ 20 και 25 κιλών χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία. Το πρωτόκολλο έλαβε έγκριση από τις αρμόδιες Δημόσιες Υπηρεσίες.

Υλικά.

Εννέα PEBs (IN Pact Admiral, Medtronic Inc., Minneapolis, MN) και εννέα CBs (Admiral Xtreme, Medtronic Inc.) χρησιμοποιήθηκαν στον δεξιό και αριστερό ουρητήρα του κάθε χοίρου, αντιστοίχως. Ο ουρητήρας ο οποίος έφερε το CB αποτέλεσε το control για τον ετερόπλευρο ουρητήρα. Οι διαστάσεις των μπαλονιών ήταν 80mm το μήκος και 6mm η διάμετρος.

Μέθοδοι

Αναισθησία

Η εισαγωγή στην αναισθησία περιλάμβανε ένα συνδυασμό κεταμίνης, ξυλαζίνης και θειικού άλατος ατροπίνης. Όλοι οι χοίροι διασωληνώθηκαν

και υπεβλήθησαν σε μηχανικό αερισμό. Χορηγήθηκε ενδοφλεβίως προποφόλη 5% προκειμένου να παραμείνουν σε καταστολή. Χορηγήθηκε επίσης μετεγχειρητική αναλγησία και περιεγχειρητική αντιβιοτική προφύλαξη.

Επέμβαση

Όλοι οι χοίροι τοποθετήθηκαν σε ύπτια θέση. Υπεβλήθησαν σε κυστεοσκόπηση και τοποθετήθηκαν σε κάθε ουρητήρα υδρόφιλα οδηγά σύρματα 0.035 ιντσών ,υπό ακτινοσκοπική καθοδήγηση. Ένας ουρητηρικός καθετηρας 7Fr τοποθετήθηκε πάνω από τα τα υδροφιλα οδηγά σύρματα τα οποία αντικαταστάθηκαν με άκαμπτα οδηγά σύρματα. Τα μπαλόνια τοποθετήθηκαν πάνω από τα άκαμπτα σύρματα, διανοίχθηκαν στη μέγιστη διάμετρό τους για 5 λεπτά και αφαιρέθηκαν. Όλες οι διαστολές έγιναν στο απώτερο τμήμα του ουρητήρα. Προηγήθηκε η διαστολή των CB για να αποφευχθεί η επιμόλυνση του ουρητήρα control με PTX.

Αφαίρεση των δειγμάτων

Τα ζώα θυσιάστηκαν και οι ουρητήρες τους αφαιρέθηκαν κατά τις παρακάτω χρονικές περιόδους:

Group A: t0 - άμεσα μετά τη διάταση του μπαλονιού

Group B: t1- μετά από 12 ώρες

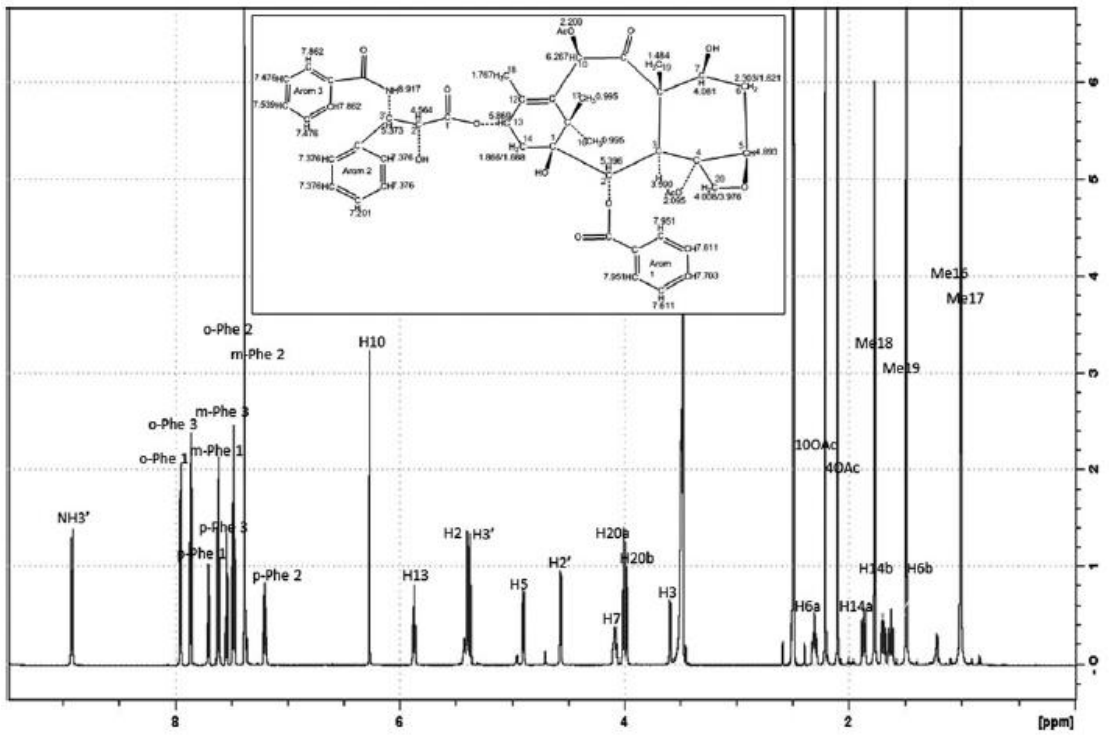
Group C: t2- μετά από 24 ώρες

Δείγματα από ουρητήρες όλων των ομάδων εξετάστηκαν με NMR φασματοσκοπία και ιστοπαθολογικά (ανοσοϊστοχημεία).

Εξέταση των δειγμάτων

Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy-NMR)

Η παρουσία της πακλιταξέλης στα δείγματα επιβεβαιώθηκε με NMR, η οποία επιτρέπει την ανίχνευση συγκεκριμένων μορίων σε ένα διάλυμα ουσιών. Ένα φάσμα αναφοράς ^{1}H 1D NMR της πακλιταξέλης ελήφθη με το ξέπλυμα της ουσίας από ένα PEB με 2 ml διαλύματος DMSO-d_6. Το ξέπλυμα της πακλιταξέλης έγινε σε 15ml falcon σωλήνα με την ουσία να διαλύεται σε DMSO. Τότε, 0.6 mL του διαλύματος μεταφέρθηκαν σε σωληνάριο 5mm του NMR και ακολούθησε καταγραφή των φασμάτων ^{1}H 1D & ^{1}H-^{13}C *Heteronuclear Single Quantum Coherence (*HSQC) NMR. Βάσει προηγούμενων αναφορών για τη μελέτη της πακλιταξέλης με NMR (112-114), μπορέσαμε να αναγνωρίσουμε το συντονισμό όλων των πρωτονίων της πακλιταξέλης (Εικόνα 11).



Εικόνα 11: Φάσμα NMR που δείχνει το συντονισμό της πακλιταξέλης.

Μετά την επιτυχή αναγνώριση των φασμάτων αναφοράς της πακλιταξέλης, δείγματα του ενός γραμμαρίου από όλους τους ουρητήρες των Groups B and C υποβλήθηκαν σε επεξεργασία ως ακολούθως: 900 mg από ιστό (wet weight) ομογενοποιήθηκαν σε 2 ml διαλύματος A (50% CH_3CN σε νερό) σε θερμοκρασία 4°C, και φυγοκεντρήθηκαν στις 12,000×g στην ίδια θερμοκρασία για 20 λεπτά. Το υλικό αυτό φυγοκεντρήθηκε ξανά με 2 ml διαλύματος A. Τα υπερκείμενα υλικά από τις δύο φυγοκεντρήσεις συλλέχθηκαν μαζί, στέγνωσαν με τη χρήση SpeedVac και χρησιμοποιήθηκαν για να διαπιστωθεί η παρουσία πακλιταξέλης στο υδατοδιαλυτό κλάσμα του ιστικού εκχυλίσματος. Το

υπόλοιπο του δοχείου της φυγοκέντρησης εκπλύθηκε δύο φορές με 2 ml διάλυμα Α για να αφαιρεθεί κάθε ίχνος υδατοδιαλυτής πακλιταξέλης. Κατόπιν, ομογενοποιήθηκε 2 φορές σε 2 ml διάλυμα Β (75% $CHCl_3$ σε μεθανόλη) και φυγοκεντρήθηκε με τον παραπάνω τρόπο. Τα υπερκείμενα υλικά συλλέχθηκαν μαζί, αφυδατώθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση της πακλιταξέλης στο λιπιδικό κλάσμα ιστού. Πριν από την ανάλυση με NMR, και τα δύο αφυδατωμένα παράγωγα διαλύθηκαν σε DMSO-d_6 και φυγοκεντρήθηκαν σε 12,000×g για 20 λεπτά. Τα υπερκείμενα υλικά μεταφέρθηκαν σε σωληνάρια 5 mm NMR. Τα φάσματα ^{1}H 1D NMR καταγράφηκαν χρησιμοποιώντας τα φάσματα αναφοράς και ίδιες πειραματικές παραμέτρους. Τα φάσματα καταγράφηκαν σε θερμοκρασία 298K με τη χρήση ενός Bruker Avance III HD 700 MHz φασματόμετρου εξοπλισμένου με κρυοθάλαμο. Τα φάσματα ^{1}H 1D NMR καταγράφηκαν με φασματικό πλάτος των 12-18 ppm, με καταστολή του υπολειμματικού σήματος νερού ,χρησιμοποιώντας ειδικές ακολουθίες (pre-saturation or excitation sculpting water suppression pulse sequences). Τα ετεροπυρηνικά φάσματα ^{1}H-^{13}C (heteronuclear spectra) καταγράφηκαν με ένα φασματικό πλάτος 200 ppm σε διάσταση F1. Η καθυστέρηση της χαλάρωσης (Relaxation delay) ορίστηκε σε 2 ή 3 δευτερόλεπτα. Οι συστοιχίες δεδομένων 1D (1D data sets) ελήφθησαν με σημεία δεδομένων 16k ή 32k (data points). Η επεξεργασία των δεδομένων και φασμάτων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Topspin 3.2 & 3.3 versions (Bruker Corp,

Coventry, UK).

Ιστοπαθολογική εξέταση και ανοσοϊστοχημεία

Ένα δείγμα ελήφθη από κάθε ουρητήρα όλων των groups στη θέση της διαστολής. Ο παθολογοανατόμος που εξέτασε τα δείγματα δεν γνώριζε την ομάδα του εκάστοτε δείγματος.

Ιστοπαθολογική εξέταση

Τα δείγματα μονιμοποιήθηκαν σε φορμόλη και υπεβλήθησαν σε συνήθη διαδικασία μονιμοποίησης με παραφίνη. Ακολούθησε χρώση τομών 4μm με αιματοξυλίνη - εωσίνη και τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες καλυμμένες με ζελατίνη.

Ανοσοϊστοχημεία

Η χρήση της ανοσοϊστοχημείας (IHC) ως στόχο είχε να διαλευκάνει την κατανομή της πακλιταξέλης στους διάφορους χιτώνες του ουρητήρα. Πραγματοποιήθηκε σε ιστολογικές τομές πάχους 4μm. Η αφαίρεση της παραφίνης, η ενυδάτωση και προετοιμασία των αντιγόνων έγινε σε

ηλεκτρικό βραστήρα υπό πίεση με τη χρήση διαλύματος Trilogy (Cell Marque, Hot Springs,AR) για 30 λεπτά. Χρησιμοποιήθηκε πολυκλωνικό αντίσωμα για την ταξόλη (NBPI-05003, Novus Medical, Cambridge , UK) σε διάλυση 1:3000. Τα δείγματα επωάστηκαν με το αντίσωμα για μία ώρα, ενώ ακολούθως για 30 λεπτά με το Dako EnVision Labelled Polymer (Dako North America Inc., Carpinteria, CA). Η διαμινοβενζιδίνη (Dako North America Inc.) χρησίμευσε ως χρωμογόνο. Για τον έλεγχο της χρώσης χρησιμοποιήθηκε η αιματοξυλίνη Harris (Vector, Burlingame, CA). Στα αρνητικά control, ακολουθήθηκε η ίδια μέθοδος με το αντίσωμα να αντικαθίσταται από 1% TBS.

Αξιολόγηση των δειγμάτων

Οι τομές μελετήθηκαν σε κοινό μικροσκόπιο φωτός στο οποίο είχε προσαρμοστεί φωτογραφική μηχανή (Nikon ECLIPSE 50i και Nikon HD color camera head DS-Fi2, Nikon GmbH, Dusseldorf, Germany). Τρεις τομές ελήφθησαν από κάθε δείγμα για ιστοπαθολογική εξέταση και τρία δείγματα για ανοσοϊστοχημική μελέτη. Κατά την ιστοπαθολογική εξέταση αξιολογήθηκαν οι όποιες μορφολογικές αλλοιώσεις καθώς και η ύπαρξη φλεγμονής. Η φλεγμονή στο ουρητηρικό τοίχωμα βαθμονομήθηκε σύμφωνα με τη μελέτη των Nakada και των συνεργατών του (115). Η φυσιολογική απεικόνιση του ουρητηρικού τοιχώματος στο μικροσκόπιο

φωτός βαθμονομήθηκε με 0, ενώ η σοβαρή φλεγμονή με 3. Η παρουσία και η εντόπιση της πακλιταξέλης στα υπό εξέταση δείγματα μελετήθηκε με τη βοήθεια της ανοσοϊστοχημείας.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ανάλυση

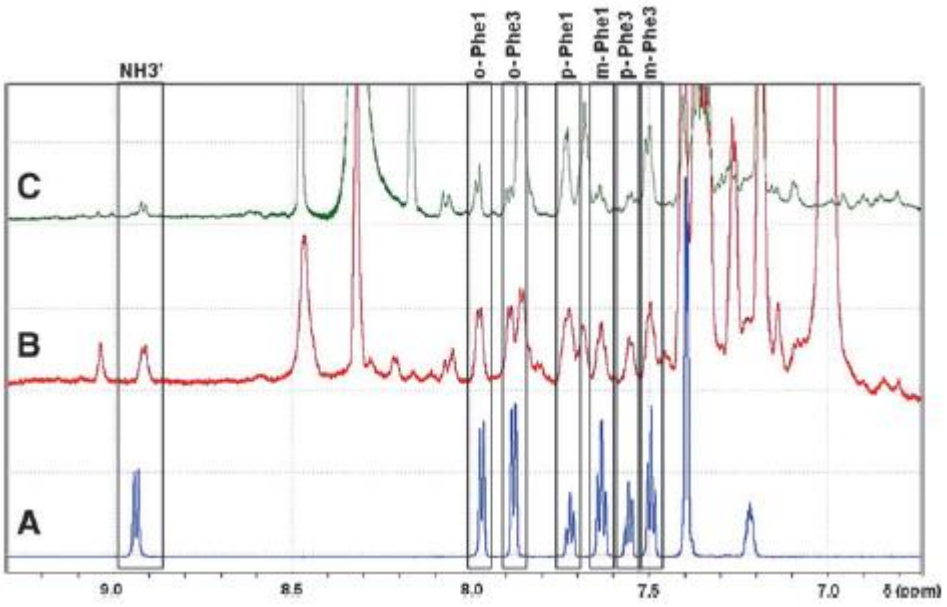
NMR

Η πακλιταξέλη αναγνωρίστηκε επιτυχώς με τη χρήση των φασμάτων αναφοράς στο ^{1}H NMR (Πίνακας 1, Εικόνα 11). Αυτά τα φάσματα ελήφθησαν από εκχύλισμα ουρητηρικού ιστού δειγμάτων που ελήφθησαν 12 και 24 ώρες μετά τη διαστολή με PEB και κατέδειξαν την ύπαρξη συντονισμού πρωτονίων της πακλιταξέλης. Τα φάσματα συντονισμού της πακλιταξέλης δεν παρατηρήθηκαν σε κανένα από τα εκχυλίσματα δειγμάτων προερχόμενων από ουρητήρες στους οποίους χρησιμοποιήθηκαν CB. Παρά τη δυσκολία πραγματοποίησης ποσοτικής ανάλυσης της συγκέντρωσης της πακλιταξέλης σε δείγματα εκχυλισμάτων ιστού με DMSO, η σχέση του θορύβου προς σήμα σε συνδυασμό με την ανάλυση της έντασης του συντονισμού πρωτονίων, (ειδικά για NH3’ και κάποιες Phe1 & Phe3 ομάδες της πακλιταξέλης, Εικόνα 12), υποδεικνύουν ότι η συγκέντρωση της ουσίας ήταν μειωμένη σε δείγματα του Group C (Εικόνα 12C) σε σύγκριση με την ποσότητα της πακλιταξέλης στα εκχυλίσματα των δειγμάτων Group B (Εικόνα 12B).

a/a	^{13}C	*Shift*	^{1}H	*Shift (multiplicity)*
1	C 16	21.87	Me 16	0.995 (complex doublet)
2	C 17	26.90	Me 17	0.995 (complex doublet)
3	C 19	10.10	Me 19	1.484 (singlet)
4	C 6	?	H6b	1.622 (complex triplet)
5	C 14	?	H14b	1.688 (quartet)
6	C 18	14.20	Me 18	1.767 (singlet)
7	C 14	?	H14a	1.866 (quartet)
8	Me 4-OAc	22.65	4-OAc	2.095 (singlet)
9	Me 10-OAc	21.05	10-OAc	2.201 (singlet)
10	C 6	?	H6a	2.304 (complex)
11	C 3	?	H 3	3.590 (doublet)
12	C 13	69.67	H 13	5.869 (triplet)
13	C 20	?	H20b	3.976 (doublet)
14	C 20	?	H20a	4.008 (doublet)
15	C 7	70.77	H 7	4.081 (heptet)
16	C 2′	73.92	H 2′	4.565 (doublet)
17	C 5	84.00	H 5	4.893 (doublet)
18	C 3′	56.62	H 3′	5.373 (triplet)
19	C 2	74.70	H 2	5.396 (doublet)
20	C 10	75.00	H 10	6.267 (singlet)
21	p-Phe 2	132.00	p-Phe 2	7.201 (heptet)
22	m-Phe 2	128.04	m-Phe 2	7.376 (complex)
23	o-Phe 2	128.04	o-Phe 2	7.376 (complex)
24	m-Phe 3	129.30	m-Phe 3	7.476 (triplet)
25	p-Phe 3	128.00	p-Phe 3	7.539 (triplet)
26	m-Phe 1	129.00	m-Phe 1	7.611 (triplet)
27	p-Phe 1	134.30	p-Phe 1	7.703 (triplet)
28	o-Phe 3	128.00	o-Phe 3	7.862 (doublet)
29	o-Phe 1	130.30	o-Phe 1	7.951 (doublet)
30			NH 3′	8.917 (doublet)

^{1}H & ^{13}C chemical shifts (in ppm, 298K, DMSO-d_6, 700M Hz) of paclitaxel in dimethyl sulfoxide (DMSO).

Πίνακας 1: Χημικές μεταβολές των ^{1}H και ^{13}C της πακλιταξέλης σε DMSO.



Εικόνα 12: Περιοχές των ^{1}H 1D NMR φασμάτων στα 298K και 700MHz. Α) Φάσμα της πακλιταξέλης που προήλθε από τα DEBs. Β) Φάσμα της πακλιταξέλης που προήλθε από τον ουρητηρικό ιστό μετά από 12 ώρες από την διαστολή με μπαλόνι (Group B). C) Φάσμα της πακλιταξέλης που προήλθε από τον ουρητηρικό ιστό μετά από 24 ώρες από την διαστολή με μπαλόνι (Group C). Τα κουτιά δείχνουν χαρακτηριστικούς συντονισμούς πρωτονίων που ανιχνεύτηκαν και στα τρία δείγματα. Αντίστοιχα φάσματα διαπθιστώθηκαν και στα υπόλοιπα δείγματα που εξετάστηκαν. Βάσει των εικονιζόμενων φασμάτων, θα μπορούσε να ειπωθεί ότι η συγκέντρωση της πακλιταξέλης είχε μειωθεί στο Group C σε σχέση με το Group B.

Ιστοπαθολογική ανάλυση.

Μελετήθηκαν συνολικά εβδομήντα δύο (72) τομές (2 τομές από τον ουρητήρα control και 2 από τον ουρητήρα στον οποίο χρησιμοποιήθηκε το DEB). Η διάνοιξη του ουρητήρα με τη χρήση του μπαλονιού είχε μηχανικές επιπτώσεις στο ουροθήλιο, οι οποίες αναγνωρίστηκαν ιστοπαθολογικά (με τη χρώση αιματοξυλίνης-εωσίνης), καθώς η εστιακή συμπίεση και ρήξη του ουροθηλίου ήταν εμφανής ανεξαρτήτως του τύπου του μπαλονιού που χρησιμοποιήθηκε (Πίνακας 2). Ευρήματα οξείας φλεγμονής καθώς και κοκκιώδης ιστός παρατηρήθηκαν σε όλα τα δείγματα των Group B και Group C. Στα δείγματα του Group A ανεδείχθησαν μόνον ελάχιστα στοιχεία φλεγμονής. Η φλεγμονώδης αντίδραση στις περιπτώσεις που χρησιμοποιήθηκε PEB ήταν πιο περιορισμένη στα δείγματα από το Group C σε σύγκριση με αυτά του Group B. Αντιθέτως, στις περιπτώσεις που χρησιμοποιήθηκε CB, η φλεγμονή ήταν εντονότερη στα δείγματα του Group C σε σύγκριση με τα δείγματα του Group B.

Ανοσοϊστοχημεία.

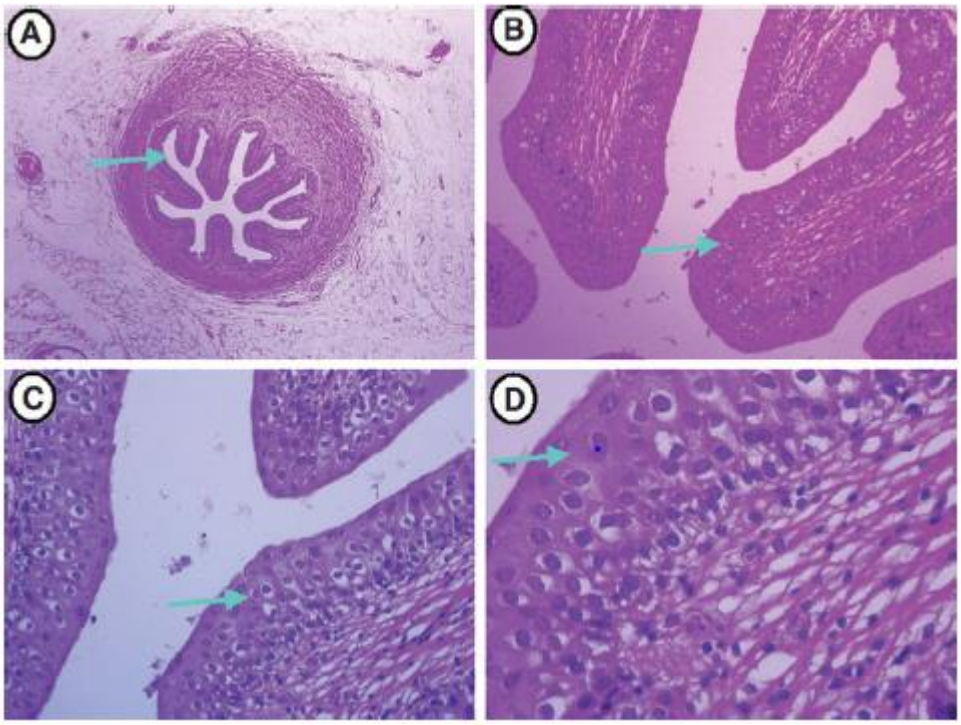
Συνολικά μελετήθηκαν τριάντα τρία τομές (27 τομές από ουρητήρες στους οποίους χρησιμοποιήθηκαν DEB και 6 τομές από τους ουρητήρες control). Όσον αφορά στα δείγματα του Group A, η πακλιταξέλη ανιχνεύθηκε στο ουροθήλιο και στην υποβλεννογόνια στιβάδα. Τόσο στα δείγματα από το Group B όσο και στα δείγματα από το Group C , η πακλιταξέλη κατανεμήθηκε όχι μόνο στην υποβλεννογόνια στιβάδα, αλλά και στο μυϊκό τοίχωμα. Η παρουσία της πακλιταξέλης ήταν περισσότερο εμφανής στην περίπτωση του Group B συγκριτικά με το Group C. Η ουσία ήταν παρούσα στο ουροθήλιο των δειγμάτων των Group B και C. Παρόλα αυτά, η παρουσία της ουσίας ήταν εντονότερη στο ουροθήλιο του Group A σε σχέση με τα άλλα δύο group. Τα αποτελέσματα των ιστοπαθολογικών αλλοιώσεων και της κατανομής της πακλιταξέλης συνοψίζονται στον Πίνακα 2.

Οι εικόνες 3-8 δείχνουν ιστολογικές τομές και ανοσοϊστοχημικές χρώσεις από όλα τα group της μελέτης.

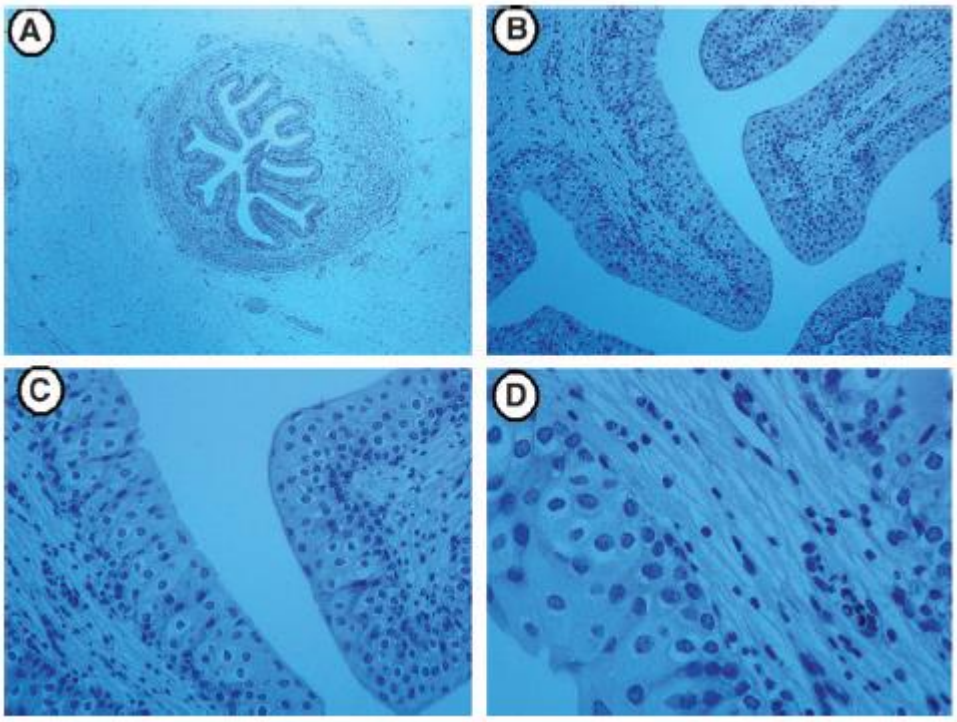
	Case	Morphologic alterations[a]		Inflammation grading		Distribution of paclitaxel
		DEB	Control	DEB	Control	DEB
Group A	1	Compressed urothelium	Compressed urothelium	N/A	N/A	Urothelial and submucosal layers
	2	Compressed and ruptured urothelium	Compressed and ruptured urothelium	N/A	N/A	Urothelial, submucosal, and muscular layers
	3	Compressed and ruptured urothelium	Compressed urothelium	N/A	N/A	Urothelial and submucosal layers
Group B	4	Compressed and ruptured urothelium; granular tissue	Compressed and urothelium; inflammation and granular tissue	2	2	Urothelial, submucosal, and muscular layers
	5	Compressed urothelium; inflammation and granular tissue	Compressed and ruptured urothelium; inflammation and granular tissue	1	3	Urothelial, submucosal, and muscular layers
	6	Compressed and ruptured urothelium; inflammation and granular tissue	Compressed and ruptured urothelium; inflammation and granular tissue	2	3	Urothelial, submucosal, and muscular layers
Group C	7	Compressed and ruptured urothelium; inflammation and granular tissue	Compressed and ruptured urothelium; inflammation and granular tissue	1	3	Urothelial, submucosal, and muscular layers
	8	Compressed and ruptured urothelium; inflammation and granular tissue	Compressed and ruptured urothelium; inflammation and granular tissue	1	3	Urothelial, submucosal, and muscular layers
	9	Compressed and ruptured urothelium; inflammation and granular tissue	Compressed and ruptured urothelium; inflammation and granular tissue	1	3	Urothelial, submucosal, and muscular layers

[a]All alterations were focally observed. DEB, drug-eluting balloons.

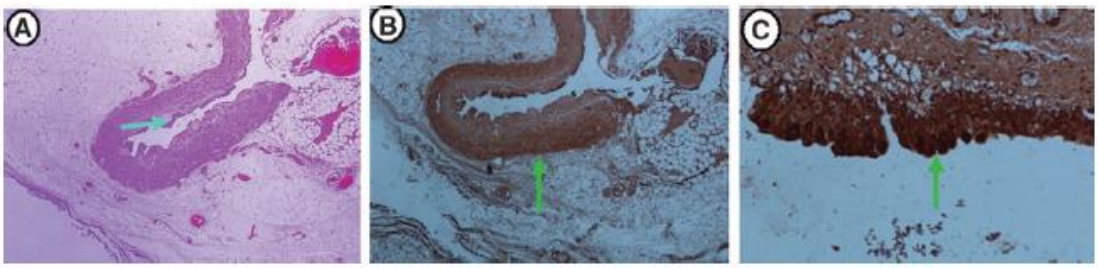
Πίνακας 2: Περιγραφή των ιστοπαθολογικών και ανοσοϊστοχημικών αποτελεσμάτων για κάθε δείγμα.



Εικόνα 3: (A,B,C,D) Ουρητήρας που υποβλήθηκε σε διαστολή με συμβατικό μπαλόνι αγγειοπλαστικής (CB) και άμεση αφαίρεση του δείγματος (Group A, t0). Το φυσιολογικό ουροθήλιο καταδεικνύεται με βέλη στις εικόνες με διάφορες μεγεθύνσεις (A:20×, B:100×, C:200×, D: 400×).

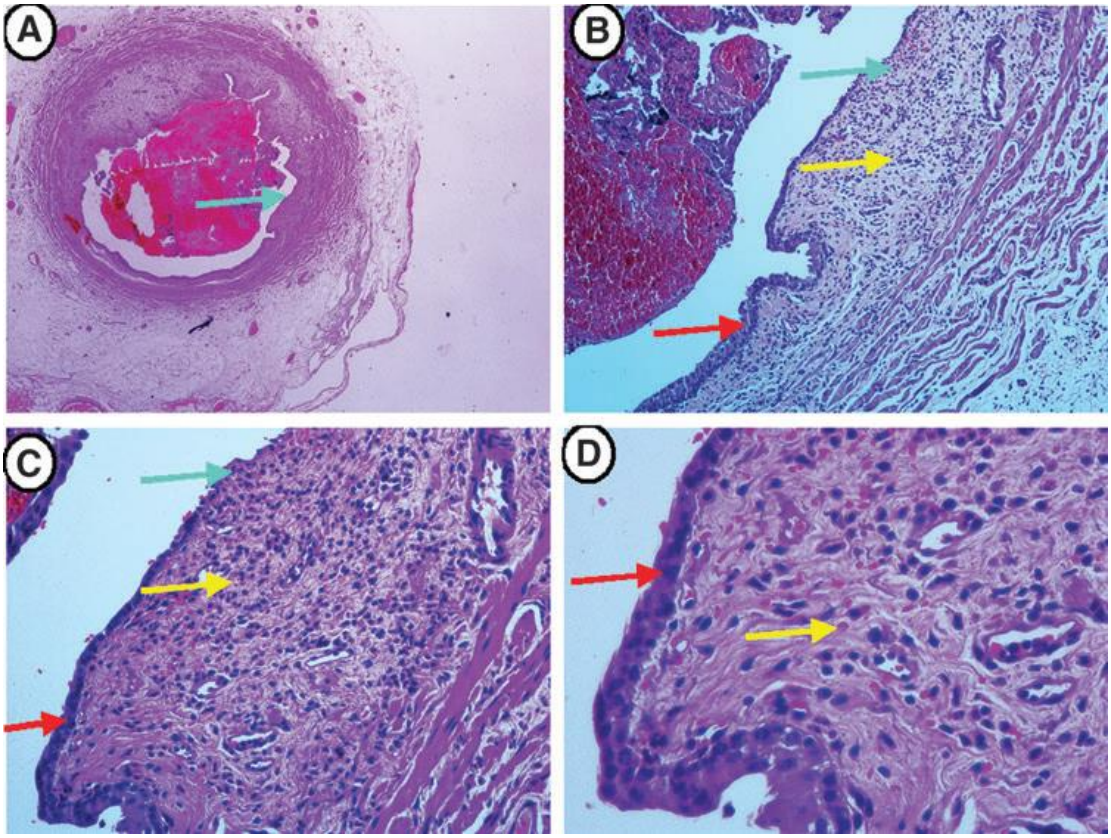


Εικόνα 4: (A,B,C,D) Ουρητήρας που υποβλήθηκε σε διαστολή με συμβατικό μπαλόνι αγγειοπλαστικής (CB) και άμεση αφαίρεση του δείγματος (Group A, t0). Οι εικόνες αντιπροσωπεύουν το ίδιο δείγμα με την Εικόνα 3. Πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημεία για την πακλιταξέλη και χρώση streptavidin biotin peroxidase και έδειξε αρνητικά αποτελέσματα για την ανίχνευση πακλιταξέλης. Οι εικόνες έχουν αντίστοιχες μεγεθύνσεις (A:20×, B:100×, C:200×, D: 400×). Οι εικόνες 3 και 4 πρακτικά αντιπροσωπεύουν το negative control για την ανοσοϊστοχημεία της πακλιταξέλης.

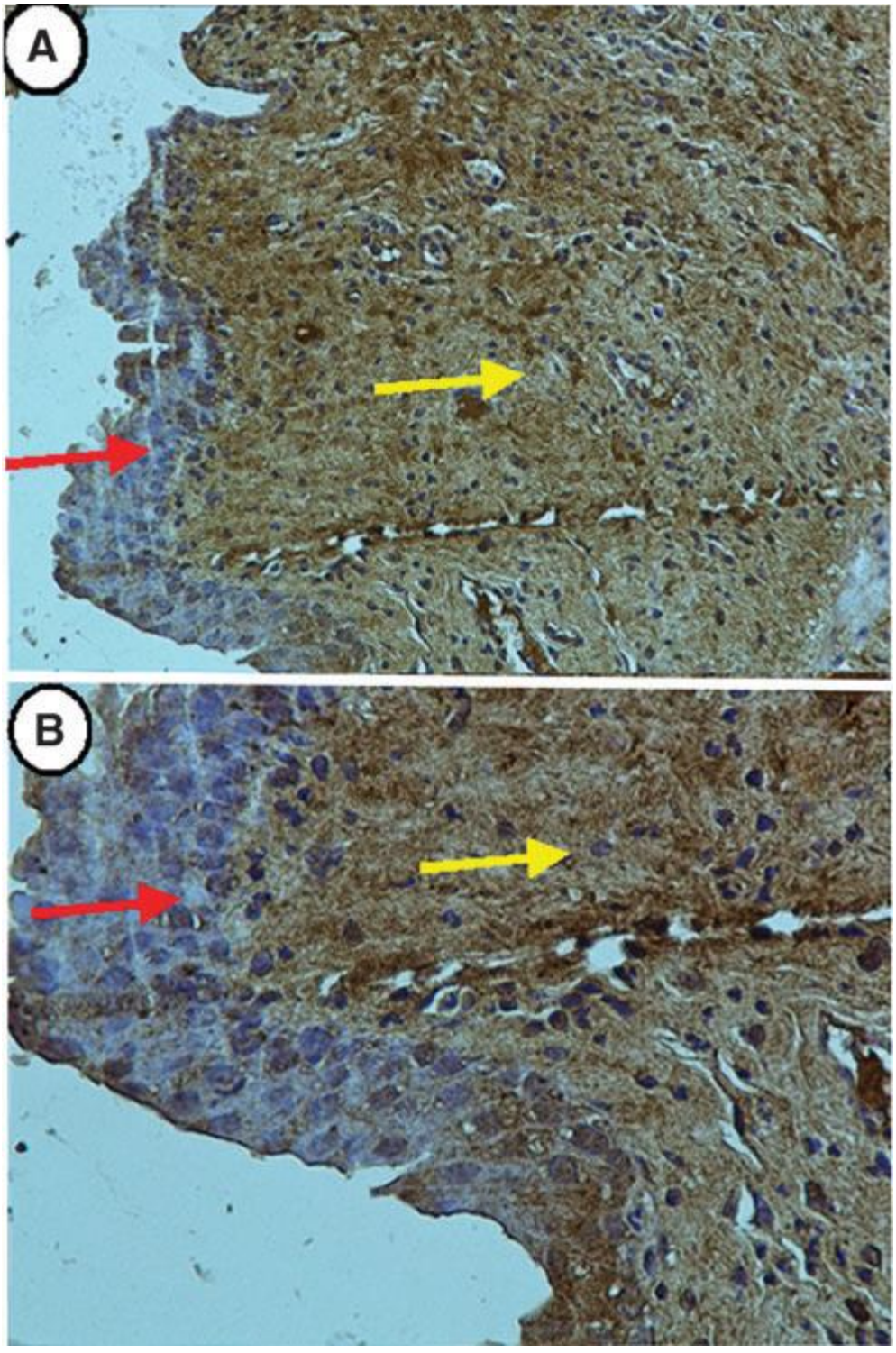


Εικόνα 5: Ουρητήρας που υποβλήθηκε σε διαστολή με μπαλόνι με πακλιταξέλη (DCB) και άμεση αφαίρεση του δείγματος (Group A, t0).

Α) Το πράσινο βέλος δείχνει περιοχές ανάπλασης του ουροθηλιακού στρώματος σε χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης σε μεγέθυνση 20×. Β,C) Ανοσοϊστοχημεία για την πακλιταξέλη και χρώση streptavidin biotin peroxidase δείχνει ότι η πακλιταξέλη βρίσκεται στα επιφανειακά επιθυλιακά κύτταρα. Μεγέθυνση Β: 20×, C: 400×.

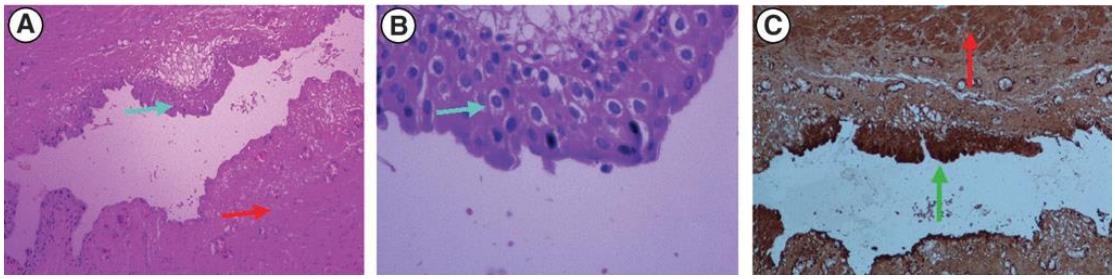


Εικόνα 6: (A,B,C,D) Ουρητήρας που υποβλήθηκε σε διαστολή με μπαλόνι με πακλιταξέλη (DCB) και αφαίρεση του δείγματος μετά 12 ώρες (Group B, t1). Το πράσινο βέλος δείχνει την αποβολή του φυσιολογικού ουροθηλίου. Το ουροθήλιο που έχει διατηρηθεί είναι σε κάποιο βαθμό συμπιεσμένο και καταδεικνύεται από τα κόκκινα βέλη. Οξεία φλεγμονή και κοκκιωματώδης ιστός (κίτρινα βέλη). Χρήση χρώσης αιματοξυλίνης-ηωσίνης και μεγεθύνσεις A: 20×, B: 100×, C: 200×, D: 400×.



Εικόνα 7: A,B) Ουρητήρας που υποβλήθηκε σε διαστολή με μπαλόνι με πακλιταξέλη (DCB) και αφαίρεση του δείγματος μετά από 12 ώρες (Group B, t1). Οι εικόνες δείχνουν το ίδιο δείγμα με την εικόνα 6. Ανοσοϊστοχημεία για την πακλιταξέλη και χρώση streptavidin biotin

peroxidase δείχνει ότι η πακλιταξέλη βρίσκεται κυρίως στη βασική μεμβράνη (κίτρινα βέλη) και όχι στο ουροθήλιο (κόκκινα βέλη). Μεγεθύνσεις A: 200×, B: 400×.



Εικόνα 8: Ουρητήρας που υποβλήθηκε σε διαστολή με μπαλόνι με πακλιταξέλη (DCB) και αφαίρεση του δείγματος μετά από 24 ώρες (Group C, t2). A,B) Τα πράσινα βέλη δείχνουν την αναγέννηση του ουροθηλίου. Σημαντικά λιγότερη οξεία φλεγμονή και δημιουργία κοκκιωματώδους ιστού (κοκκινα βέλη). Χρήση χρώσης αιματοξυλίνης-ηωσίνης και μεγεθύνσεις (A: 200×, B: 400×). C) Η ανοσοϊστοχημεία για την πακλιταξέλη και χρώση streptavidin biotin peroxidase δείχνει ότι η πακλιταξέλη βρίσκεται κυρίως στα επιφανειακά επιθηλικά κύτταρα (πράσινα βέλη) και στη μυϊκή στιβάδα (κόκκινο βέλος). Μεγεθύνσεις C: 200×.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα μελέτη στοχεύει στο να απαντήσει ερωτήματα σχετικά με τη διείσδυση της πακλιταξέλης στο σχεδόν αδιαπέρατο φραγμό του ουροθηλίου και να προσφέρει στοιχεία σχετικά με την κατανομή της ουσίας σε στιβάδες του ουρητηρικού τοιχώματος και την επίδρασή της στην τοπική φλεγμονή. Η διείσδυση της ουσίας στο μυϊκό τοίχωμα θα πρέπει να θεωρηθεί πολύ σημαντική εξαιτίας της προαναφερθείσας σχέσης των λείων μυϊκών κυττάρων με την παραγωγή κολλαγόνου και τελικά τη δημιουργία στενώματος (97).

Η επιλογή της πακλιταξέλης βασίστηκε στη γνωστή επίδραση του παράγοντα στον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων (101). Ωστόσο, η ανίχνευση της πακλιταξέλης με ανοσοιστοχημεία στον ουρητήρα χοίρου αποτέλεσε μια σημαντική πρόκληση καθώς η ουσία δεν είχε προηγουμένως ανιχνευτεί σε μοντέλο ουρητήρα. Η NMR χρησιμοποιήθηκε να ανιχνεύσει την πακλιταξέλη στα δείγματα και να επιβεβαιώσει την παρουσία της ουσίας σε διάφορες χρονικές περιόδους. Επιπλέον η NMR παρείχε ποιοτικά δεδομένα σχετικά με τη συγκέντρωση πακλιταξέλης στον υπό εξέταση ιστό κατά τις προαναφερθείσες περιόδους. Από όσο γνωρίζουμε δεν έχει χρησιμοποιηθεί ξανά η NMR για την ανίχνευση πακλιταξέλης σε ουρητηρικό ιστό χοίρου.

Η μελέτη έδειξε ότι η πακλιταξέλη κατανεμήθηκε βαθύτερα από το ουροθήλιο προς στην υποβλεννογόνια στιβάδα και έφτασε το μυϊκό στρώμα. Η πακλιταξέλη ήταν παρούσα στην υποβλεννογόνια στιβάδα αμέσως μετά τη διαστολή και αυτό το φαινόμενο μάλλον θα πρέπει να αποδοθεί στη μηχανική βλάβη που προκαλεί το μπαλόνι στο ουρητηρικό τοίχωμα. Η παρουσία εστιακής ουροθηλιακής βλάβης και ρήξης ήταν εμφανής σε όλα τα δείγματα. Παρόλα αυτά, η ρήξη των βαθύτερων στρωμάτων δεν ήταν σαφής πιθανώς λόγω της μικρής διαμέτρου των μπαλονιών που χρησιμοποιήθηκαν. Η επιλογή της διαμέτρου των μπαλονιών βασίστηκε στο ότι η διάμετρος του ουρητήρα του χοίρου είναι 3-4mm και είναι παρόμοια με αυτή του ανθρώπινου ουρητήρα (116). Ήταν επίσης σημαντικό να αποφευχθεί η ρήξη του ουρητήρα ή οποία θα οδηγούσε σε διασπορά της πακλιταξέλης σε διάφορα στρώματα ακόμα και εκτός του αυλού παρέχοντας λανθασμένες πληροφορίες.

Δεδομένης της απουσίας ρήξης στα βαθύτερα ουρητηρικά στρώματα καθώς και της τοπικής βλάβης, θα μπορούσε να υποστηριχθεί ότι τα μπαλόνια δεν οδήγησαν σε σημαντική μηχανική κάκωση του ουρητήρα και η κατανομή της ουσίας σχετίστηκε με τα ιδία χαρακτηριστικά της παρά με τα μηχανικά αποτελέσματα των μπαλονιών. Επιπροσθέτως, ακόμα και στην περίπτωση της χρήσης των DEB σε αγγεία, η ρήξη του αγγειακού ενδοθηλίου είναι σημαντική για την κατανομή της ουσίας και η κατανομή

της πακλιταξέλης λαμβάνει χώρα με διάφορους μηχανισμούς από ότι γνωρίζουμε από τη χρήση της στα αγγεία (117, 118). Οι μηχανικές επιδράσεις της διαστολής με μπαλόνι και ίσως των υπολοίπων χειρισμών όπως η τοποθέτηση του οδηγού σύρματος, μπορεί να σχετίζονται με τη επαγωγή της οξείας φλεγμονής η οποία παρατηρήθηκε σε όλα τα στρώματα του ουρητηρικού τοιχώματος των group Β και C.

Οι ουρητήρες στους οποίους χρησιμοποιήθηκαν PEB εμφάνισαν ηπιότερη οξεία φλεγμονή σε σύγκριση με αυτούς στους οποίους χρησιμοποιηθήκαν CB (Πίνακας 1). Επιπλέον, η αύξηση του βαθμού της φλεγμονής στους ουρητήρες χρησιμοποιήθηκες CB μεταξύ 12 και 24 ωρών, έδειξε ότι η φλεγμονή εξελισσόταν. Η μείωση της φλεγμονής στους ουρητήρες που χρησιμοποιήθηκαν PEB κατά τις ίδιες χρονικές περιόδους θα μπορούσε να θεωρηθεί ως ύφεση της φλεγμονής και να αποδοθεί στην δράση της πακλιταξέλης.

Η πακλιταξέλη ανιχνεύθηκε στο μυϊκό τοίχωμα των δειγμάτων των group Β και C. Ανιχνεύτηκε μόνο σένα δείγμα του group Α. Έτσι, η κατανομή της πακλιταξέλης ίσως πρέπει να συσχετισθεί με ένα συνδυασμό της μηχανικής ρήξης του ουροθηλίου και της διάχυσης της ουσίας εξαιτίας της λιπόφιλης ιδιότητας της. Έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία ότι η αρχική σύνδεση της ουσίας στο ενδοθήλιο των αγγείων είναι πολύ σημαντική για τη μετέπειτα κατανομή της (119, 120). Κάτι αντίστοιχο φαίνεται να

συμβαίνει με την κατανομή της στον ουρητήρα. Η ουσία αρχικά κατανεμήθηκε στον ουροθήλιο και έφτασε στα βαθύτερα στρώματα στις επόμενες ώρες. Ένα ενδιαφέρον εύρημα αποτελεί ότι η πακλιταξέλη ήταν πιο εμφανής στην υποβλεννογόνια και μυϊκή στιβάδα του group B σε σύγκριση με το group C. Αυτό το εύρημα σε συνδυασμό με την παρουσία λιγότερης φλεγμονής στην περίπτωση του group C σε σχέση με το group B πιθανόν αποδεικνύει μεταβολική δραστηριότητα και επίδραση της πακλιταξέλης στον ουρητηρικό ιστό.

Οι παραπάνω παρατηρήσεις δε βασίστηκαν σε ποσοτικές μετρήσεις στις τομές ανοστοϊστοχημείας. Παρόλα αυτά, οι παρατηρήσεις αυτές ενισχύονται με την ποιοτική αξιολόγηση των φασμάτων της NMR τα οποία έδειξαν ότι η συγκέντρωση της πακλιταξέλης ήταν μειωμένη στο group C συγκριτικά με το group B. Η πακλιταξέλη ήταν λιγότερο εμφανής στο ουροθήλιο των group B και C σε σύγκριση με το group A στην ανοσοϊστοχημική μελέτη. Αυτό μάλλον σχετίζεται με το ξέπλυμα της πακλιταξέλης με τα ούρα. Αξίζει να αναφερθεί ότι η παρούσα μελέτη αποτελεί το χειρότερο σενάριο γιατί το ουρητηρικό τοίχωμα δεν υπέστη σημαντική βλάβη (ρήξη των βαθύτερων ουρητηρικών τοιχωμάτων) και η διάταση του ουρητήρα προσαρμόστηκε στη διαστολή με μπαλόνι. Έτσι, οι προαναφερθείσες παρατηρήσεις αντικατοπτρίζουν την δυνατότητα

κατανομής της πακλιταξέλης που απελευθερώνεται από ένα DEB τουλάχιστον σε φυσιολογικό ουρητήρα χοίρου.

Η μικρή χρονική περίοδος παρατήρησης (24 ώρες) αποτελεί έναν περιορισμό στην παρούσα μελέτη. Κατά την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας, ακόμα και η διεισδυτικότητα της πακλιταξέλης ήταν αμφισβητήσιμη. Επιπροσθέτως, οι ερευνητές είχαν την πεποίθηση ότι τα ούρα πολύ πιθανόν να ξέπλεναν την πακλιταξέλη από το ουροθήλιο. Τα επίπεδα της πακλιταξέλης που απελευθερώθηκε από ένα DEB σε αγγεία χοίρου μειώθηκαν σε ποσοστό άνω του 80% τις πρώτες 24 ώρες και η διάρκεια του πειράματος πιθανόν να θεωρήθηκε επαρκής (121). Δεδομένων των προαναφερθέντων στοιχείων, μία μεγαλύτερη χρονική διάρκεια παρατήρησης θα παρουσίαζε μεγάλο ενδιαφέρον. Επιπλέον, ένας μεγαλύτερος αριθμός δειγμάτων σίγουρα θα προσέφερε περισσότερη αξιοπιστία στη μελέτη. Παρόλα αυτά η ομοιογένεια των αποτελεσμάτων για κάθε group καθώς και η διπλή επιβεβαίωση της κατανομής της πακλιταξέλης με τις μεθόδους της ανοσοϊστοχημείας και NMR οδηγούν στην ασφαλή εξαγωγή συμπερασμάτων από την εν λόγω μελέτη.

Πέρα από αυτά, οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη είναι σχεδιασμένες να παρέχουν περιγραφική αξιολόγηση της παρουσίας της πακλιταξέλης στον ουρητηρικό ιστό και όχι μόνο ποσοτική εκτίμηση της συγκέντρωσης της ουσίας. Έτσι, κάθε συμπέρασμα σχετικά με τις

διαφορές στις συγκεντρώσεις της πακλιταξέλης ανάμεσα στις διάφορες χρονικές περιόδους βασίστηκε σε ποιοτική ανάλυση, μετά από τον συνδυασμό των αποτελεσμάτων της ανοσοϊστοχημείας και της NMR. Δεν έγιναν ποσοτικές μετρήσεις. Το χοίρειο πειραματικό μοντέλο έχει τα μειονεκτήματα που έχουν τα ζωικά πειραματικά μοντέλα και τα αποτελέσματα μίας πειραματικής μελέτης σε ζώα ίσως να μη μπορούν να αναπαραχθούν σε κλινικό επίπεδο. Επιπλέον, η παρούσα μελέτη δεν αξιολογεί την κατανομή και την επίδραση της πακλιταξέλης στις περιπτώσεις των ουρητηρικών στενωμάτων, οι οποίες αποτελούν την πιο ενδιαφέρουσα προοπτική κλινικής εφαρμογής των DEBs.

Άλλον έναν περιορισμό για τη συγκεκριμένη μελέτη αποτελεί το γεγονός ότι τα DEBs είναι σχεδιασμένα για χρήση σε αγγεία. Η ιστολογία της αρτηριακής στένωσης διαφέρει από αυτή του ουρητηρικού στενώματος. Οι ιστολογικές αλλοιώσεις της αθηροσκληρυντικής βλάβης σχετίζονται με τη φυσική πορεία της νόσου (122). Η ιστολογία της αθηρωματικής πλάκας εμφανίζει μεγάλη ετερογένεια και οι θεραπευτικές επιλογές βασίζονται στην ταξινόμηση αυτών των πλακών in vivo. Η ταξινόμηση αυτή πραγματοποιείται με απεικονιστικές μεθόδους, όπως η οπτική τομογραφία συνοχής (optical coherence tomography, OCT)(123). Μετά τη θεραπεία της αγγειακής στένωσης, τα κύρια κύτταρα που εμπλέκονται στην επαναστένωση του αγγείου είναι τα λεία μυικά κύτταρα των αγγείων, τα

οποία ενεργοποιούνται εξαιτίας της φλεγμονής που επάγεται από τη διαστολή με μπαλόνι και τον τραυματισμό(124). Αυτή η φλεγμονώδης διαδικασία και η επακόλουθη επαναστένωση αναστέλλεται με τη δράση του παράγοντα που απελευθερώνεται από τα DEBs. Η δημιουργία του ουρητηρικού στενώματος έγκειται στη δράση των λείων μυικών κυττάρων και στο σχηματισμό συνδετικού ιστού. Η επαναστένωση του ουρητήρα μετά από διαστολή είναι επίσης αποτέλεσμα της δράσης των λείων μυικών κυττάρων και σχετίζεται με τη φλεγμονή που προκαλείται από τον τραυματισμό του ουρητήρα (93-95, 97).

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα παραπάνω ευρήματα, φαίνεται ότι ο μηχανισμός που σχετίζεται με την επαναστένωση του ουρητήρα έχει ομοιότητες με αυτόν που οδηγεί σε επαναστένωση και στην περίπτωση των αγγείων, κάτι που δικαιολογεί την κατ' αντιστοιχία χρήση των DEBs. Η χρήση ενός υλικού που είναι σχεδιασμένο για ενδαγγειακή εφαρμογή δεν αποτελεί την κατάλληλη επιλογή για τον σχεδιασμό μιας αποτελεσματικής θεραπευτικής στρατηγικής. Ωστόσο, η χρήση του για την πειραματική αξιολόγηση της κατανομής της πακλιταξέλης μέσω του σχεδόν αδιαπέρατου ουροθηλιακού φραγμού, οδήγησε σε ενδιαφέροντα αποτελέσματα και ο στόχος της πειραματικής μελέτης επετεύχθη: μελετήθηκε η κατανομή και η επίδραση της πακλιταξέλης που απελευθερώθηκε από ένα DEB σε ουρητήρα χοίρου.

Οι προαναφερθείσες διαφορές στη σύσταση των ιστών και οι μηχανικές ιδιότητες (δυνατότητα σημαντικής διάτασης) των στενωμένων ουρητήρων καταδεικνύουν την ανάγκη για περαιτέρω έρευνα με στόχο την ασφαλή εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την κατανομή και επίδραση της πακλιταξέλης στις περιπτώσεις ουρητηρικών στενωμάτων. Μια πιθανή εφαρμογή των DEB του αγγειακού συστήματος στον ουρητηρα πρέπει να αξιολογηθεί λαμβάνοντας υπόψιν τις ιστολογικές διαφορές μεταξύ του ουρητήρα και του υπερπλαστικού ενδοθηλίου ή αθηρωματικής στένωσης των αγγείων. Επίσης είναι αναγκαία η συστηματική διερεύνηση του μηχανισμού δράσης και της αποτελεσματικότητας των DEB στον ουρητήρα.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Η πακλιταξέλη κατανεμήθηκε στο ουροθήλιο , υποβλεννογονίως και στα λεία μυικά τοιχώματα. Η φλεγμονή ήταν λιγότερο εμφανής στην περίπτωση της χρήσης των DEB σε σύγκριση με τη χρήση των CB στις 12 και στις 24 ώρες μετά τη διάταση των ουρητήρων. Η επίδραση της πακλιταξέλης θεωρείται ότι ευθύνεται για αυτό το αποτέλεσμα.

Βιβλιογραφία

1. Schimpf MO, Wagner JR. Robot-assisted laparoscopic Boari flap ureteral reimplantation. J Endourol. 2008;22(12):2691-4.
2. Soares RS, de Abreu RA, Jr., Tavora JE. Laparoscopic ureteral reimplant for ureteral stricture. Int Braz J Urol. 2010;36(1):38-43.
3. Steffens J, Stark E, Haben B, Treiyer A. Politano-Leadbetter ureteric reimplantation. BJU Int. 2006;98(3):695-712.
4. Stolzenburg JU, Kallidonis P, Kyriazis I, Kotsiris D, Ntasiotis P, Liatsikos EN. Robot-Assisted Simple Prostatectomy by an Extraperitoneal Approach. J Endourol. 2018;32(S1):S39-s43.
5. Stolzenburg JU, Rai BP, Do M, Dietel A, Liatsikos E, Ganzer R, et al. Robot-assisted technique for Boari flap ureteric reimplantation: replicating the techniques of open surgery in robotics. BJU Int. 2016;118(3):482-4.
6. Allaparthi S, Ramanathan R, Balaji KC. Robotic distal ureterectomy with boari flap reconstruction for distal ureteral urothelial cancers: a single institutional pilot experience. J Laparoendosc Adv Surg Tech A. 2010;20(2):165-71.
7. Castillo OA, Travassos J, Escobar JF, Lopez-Fontana G. Laparoscopic ureteral replacement by Boari flap: Multi-institutional experience in 30 cases. Actas Urol Esp. 2013.
8. Do M, Kallidonis P, Qazi H, Liatsikos E, Ho Thi P, Dietel A, et al. Robot-assisted technique for boari flap ureteral reimplantation: is robot assistance beneficial? J Endourol. 2014;28(6):679-85.
9. Gozen AS, Cresswell J, Canda AE, Ganta S, Rassweiler J, Teber D. Laparoscopic ureteral reimplantation: prospective evaluation of medium-term results and current developments. World J Urol. 2010;28(2):221-6.
10. Gundeti MS, Kojima Y, Haga N, Kiriluk K. Robotic-assisted laparoscopic reconstructive surgery in the lower urinary tract. Curr Urol Rep. 2013;14(4):333-41.
11. Koukouras D, Petsas T, Liatsikos E, Kallidonis P, Sdralis EK, Adonakis G, et al. Percutaneous minimally invasive management of iatrogenic ureteral injuries. J Endourol. 2010;24(12):1921-7.
12. Ku JH, Kim ME, Jeon YS, Lee NK, Park YH. Minimally invasive management of ureteral injuries recognized late after obstetric and gynaecologic surgery. Injury. 2003;34(7):480-3.
13. Lucas JW, Ghiraldi E, Ellis J, Friedlander JI. Endoscopic Management of Ureteral Strictures: an Update. Curr Urol Rep. 2018;19(4):24.
14. Reus C, Brehmer M. Minimally invasive management of ureteral strictures: a 5-year retrospective study. World J Urol. 2018.
15. Zhao P. Endoscopic Management of Ureteral Stricture: NYU Case of the Month, August 2018. Rev Urol. 2018;20(3):140-2.
16. Fam XI, Singam P, Ho CCK, Sridharan R, Hod R, Bahadzor B, et al. Ureteral stricture formation after ureteroscope treatment of impacted calculi: a prospective study. Korean journal of urology. 2015;56(1):63-7.
17. Roberts WW, Cadeddu JA, Micali S, Kavoussi LR, Moore RG. Ureteral stricture formation after removal of impacted calculi. The Journal of urology. 1998;159(3):723-6.
18. Tyritzis SI, Wiklund NP. Ureteral strictures revisited…trying to see the light at the end of the tunnel: a comprehensive review. Journal of endourology. 2015;29(2):124-36.

19. Byun S-S, Kim JH, Oh S-J, Kim HH. Simple retrograde balloon dilation for treatment of ureteral strictures: etiology-based analysis. Yonsei medical journal. 2003;44(2):273-8.
20. Chang R, Marshall FF, Mitchell S. Percutaneous management of benign ureteral strictures and fistulas. The Journal of urology. 1987;137(6):1126-31.
21. Junior NR, Ferreira U, Lemos GC, Claro JF, J. Netto Endourological management of ureteral strictures. 1990;144(3 SRC - BaiduScholar):631-4.
22. Lang EK, Glorioso LW. Antegrade transluminal dilatation of benign ureteral strictures: long-term results. AJR American journal of roentgenology. 1988;150(1):131-4.
23. Richter F, Irwin RJ, Watson RA, Lang EK. Endourologic management of malignant ureteral strictures. Journal of endourology. 2000;14(7):583-7.
24. Hafez KS, Wolf JS. Update on minimally invasive management of ureteral strictures. Journal of endourology. 2003;17(7):453-64.
25. Kachrilas S, Bourdoumis A, Karaolides T, Nikitopoulou S, Papadopoulos G. Current status of minimally invasive endoscopic management of ureteric strictures. Therapeutic Advances in Urology. 2013;5(6):354-65.
26. Goldfischer ER, Gerber GS. Endoscopic management of ureteral strictures. The Journal of urology. 1997;157(3):770-5.
27. Yossepowitch O, Lifshitz DA, Dekel Y, Gross M, Keidar DM, Neuman M, et al. Predicting the success of retrograde stenting for managing ureteral obstruction. The Journal of urology. 2001;166(5):1746-9.
28. Wenzler DL, Kim SP, Rosevear HM, Faerber GJ, Roberts WW, Wolf JS. Success of ureteral stents for intrinsic ureteral obstruction. Journal of endourology. 2008;22(2):295-9.
29. Rosevear HM, Kim SP, Wenzler DL, Faerber GJ, Roberts WW, Wolf JS. Retrograde ureteral stents for extrinsic ureteral obstruction: nine years' experience at University of Michigan. Urology. 2007;70(5):846-50.
30. Schmidt JD, Hawtrey CE, Flocks RH, Culp DA. Complications, results and problems of ileal conduit diversions. The Journal of urology. 1973;109(2):210-6.
31. Schondorf D, Meierhans-Ruf S, Kiss B, Giannarini G, Thalmann GN, Studer UE, et al. Ureteroileal strictures after urinary diversion with an ileal segment-is there a place for endourological treatment at all. 2013;190(2 SRC - BaiduScholar):585-90.
32. Duty BD, Conlin MJ, Fuchs EF, Barry JM. The current role of endourologic management of renal transplantation complications. Advances in urology. 2013;2013:246520.
33. Mano R, Golan S, Holland R, Livne PM, Lifshitz DA. Retrograde endoureterotomy for persistent ureterovesical anastomotic strictures in renal transplant kidneys after failed antegrade balloon dilation. Urology. 2012;80(2):255-9.
34. Streeter EH, Little DM, Cranston DW, Morris PJ. The urological complications of renal transplantation: a series of 1535 patients. BJU international. 2002;90(7):627-34.
35. Gil-Sousa D, Oliveira-Reis D, Teves F, Príncipe P, Castro-Henriques A, Soares J, et al. Ureteral Stenosis After Renal Transplantation-A Single-Center 10-Year Experience. Transplantation proceedings. 2017;49(4):777-82.
36. Uflacker A, Sheeran D, Khaja M, Patrie J, Elias G, Saad W. Outcomes of Percutaneous Management of Anastomotic Ureteral Strictures in Renal Transplantation: Chronic Nephroureteral Stent Placement with and without Balloon Dilatation. Cardiovascular and interventional radiology. 2015;38(3):693-701.
37. Bromwich E, Coles S, Atchley J, Fairley I, Brown JL, Keoghane SR. A 4-year review of balloon dilation of ureteral strictures in renal allografts. Journal of endourology. 2006;20(12):1060-1.
38. Gdor Y, Gabr AH, Faerber GJ, Wolf JS. Holmium:yttrium-aluminum-garnet laser endoureterotomy for the treatment of transplant kidney ureteral strictures. Transplantation. 2008;85(9):1318-21.

39. Khandelwal P, Abraham SN, Apodaca G. Cell biology and physiology of the uroepithelium. American journal of physiology Renal physiology. 2009;297(6):F1477-501.
40. Tepe G, Zeller T, Albrecht T, Heller S, Schwarzwälder U, Beregi J-P, et al. Local delivery of paclitaxel to inhibit restenosis during angioplasty of the leg. The New England journal of medicine. 2008;358(7):689-99.
41. Werk M, Langner S, Reinkensmeier B, Boettcher H-F, Tepe G, Dietz U, et al. Inhibition of restenosis in femoropopliteal arteries: paclitaxel-coated versus uncoated balloon: femoral paclitaxel randomized pilot trial. Circulation. 2008;118(13):1358-65.
42. Albrecht T, Speck U, Baier C, Wolf K-J, Böhm M, Scheller B. Reduction of stenosis due to intimal hyperplasia after stent supported angioplasty of peripheral arteries by local administration of paclitaxel in swine. Investigative radiology. 2007;42(8):579-85.
43. Scheller B, Speck U, Abramjuk C, Bernhardt U, Böhm M, Nickenig G. Paclitaxel balloon coating, a novel method for prevention and therapy of restenosis. Circulation. 2004;110(7):810-4.
44. Speck U, Scheller B, Abramjuk C, Breitwieser C, Dobberstein J, Boehm M, et al. Neointima inhibition: comparison of effectiveness of non-stent-based local drug delivery and a drug-eluting stent in porcine coronary arteries. Radiology. 2006;240(2):411-8.
45. Danishefsky SJ, Masters JJ, Young WB, Link JT, Snyder LB, Magee TV, et al. Total Synthesis of Baccatin III and Taxol. Journal of the American Chemical Society. 1996;118(12):2843-59.
46. Virmani R, Guagliumi G, Farb A, Musumeci G, Grieco N, Motta T, et al. Localized hypersensitivity and late coronary thrombosis secondary to a sirolimus-eluting stent: should we be cautious? Circulation. 2004;109(6):701-5.
47. Zeller T, Schmitmeier S, Tepe G, Rastan A. Drug-coated balloons in the lower limb. The Journal of cardiovascular surgery. 2011;52(2):235-43.
48. Thim T, Milewski K, Tellez A, J. Biological effect on coronary restenosis of bare metal stents crimped on paclitaxel coated balloons: preliminary animal data in the porcine overstretch model. Am 177. 2009;104 SRC - BaiduScholar.
49. Cremers B, Milewski K, Clever YP, Aboodi MS, Biedermann M, Thim T, et al. Long-term effects on vascular healing of bare metal stents delivered via paclitaxel-coated balloons in the porcine model of restenosis. Catheter Cardiovasc Interv. 2012;80(4):603-10.
50. Creel CJ, Lovich MA, Edelman ER. Arterial paclitaxel distribution and deposition. Circulation research. 2000;86(8):879-84.
51. Lovich MA, Creel C, Hong K, Hwang CW, Edelman ER. Carrier proteins determine local pharmacokinetics and arterial distribution of paclitaxel. Journal of pharmaceutical sciences. 2001;90(9):1324-35.
52. Herdeg C, Goehring-Frischholz K, Zuern C, Geisler T, Hartmann U, Hoevelborn T, et al. Local catheter-based delivery of antithrombotic or antiproliferative drugs: a new concept for prevention of restenosis. Thrombosis research. 2008;123(2):236-43.
53. Axel DI, Kunert W, Göggelmann C, Oberhoff M, Herdeg C, Küttner A, et al. Paclitaxel inhibits arterial smooth muscle cell proliferation and migration in vitro and in vivo using local drug delivery. Circulation. 1997;96(2):636-45.
54. Heinig U, Scholz S, Jennewein SJFD. Getting to the bottom of Taxol biosynthesis by fungi. 2013;60(1):161-70.
55. Weaver BA, Bement W. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. Molecular Biology of the Cell. 2014;25(18):2677-81.
56. Horwitz SB. Personal recollections on the early development of taxol. J Nat Prod. 2004;67(2):136-8.
57. Haldar S, Jena N, Croce CM. Inactivation of Bcl-2 by phosphorylation. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92(10):4507-11.

58. Foss M, Wilcox BW, Alsop GB, Zhang D. Taxol crystals can masquerade as stabilized microtubules. PLoS One. 2008;3(1):e1476.
59. Goodman J WV. The Story of Taxol. Nature and Politics in the Pursuit of An Anti-Cancer Drug. Cambridge University Press, Cambridge. 2001;Google e-book.
60. Mangatal L, Adeline MT, Guénard D, Guéritte-Voegelein F, Potier P. Application of the vicinal oxyamination reaction with asymmetric induction to the hemisynthesis of taxol and analogues. Tetrahedron. 1989;45(13):4177-90.
61. Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by Taxomyces andreanae, an endophytic fungus of Pacific yew. Science. 1993;260(5105):214-6.
62. Ezrahi S, Aserin A, Garti N. Basic principles of drug delivery systems - the case of paclitaxel. Adv Colloid Interface Sci. 2019;263:95-130.
63. Holton RA, Somoza C, Kim HB, Liang F, Biediger RJ, Boatman PD, et al. First total synthesis of taxol. 1. Functionalization of the B ring. Journal of the American Chemical Society. 1994;116(4):1597-8.
64. Nicolaou KC, Yang Z, Liu JJ, Ueno H, Nantermet PG, Guy RK, et al. Total synthesis of taxol. Nature. 1994;367(6464):630-4.
65. BASF. Chemophor L. Technical leaflet. 1997.
66. Lamb HM, Wiseman LR. Docetaxel. A pharmacoeconomic review of its use in the treatment of metastatic breast cancer. PharmacoEconomics. 1998;14(4):447-59.
67. Dotter CT, Judkins MP. TRANSLUMINAL TREATMENT OF ARTERIOSCLEROTIC OBSTRUCTION. DESCRIPTION OF A NEW TECHNIC AND A PRELIMINARY REPORT OF ITS APPLICATION. Circulation. 1964;30:654-70.
68. Kuntz RE, Safian RD, Levine MJ, Reis GJ, Diver DJ, Baim DS. Novel approach to the analysis of restenosis after the use of three new coronary devices. Journal of the American College of Cardiology. 1992;19(7):1493-9.
69. Robaina S, Jayachandran B, He Y, Frank A, Moreno MR, Schoephoerster RT, et al. Platelet adhesion to simulated stented surfaces. J Endovasc Ther. 2003;10(5):978-86.
70. Sullivan TM, Taylor SM, Blackhurst DW, Langan EM, Cull DL, Carsten CG, et al. Has endovascular surgery reduced the number of open vascular operations performed by an established surgical practice? Journal of vascular surgery. 2002;36(3):514-9.
71. Vernhet H, Jean B, Lust S, Laroche JP, Bonafé A, Sénac JP, et al. Wall mechanics of the stented extracranial carotid artery. Stroke. 2003;34(11):e222-4.
72. Albiero R, Nishida T, Adamian M, Amato A, Vaghetti M, Corvaja N, et al. Edge restenosis after implantation of high activity (32)P radioactive beta-emitting stents. Circulation. 2000;101(21):2454-7.
73. Serruys PW, Regar E, Carter AJ. Rapamycin eluting stent: the onset of a new era in interventional cardiology. Heart (British Cardiac Society). 2002;87(4):305-7.
74. Grube E, Silber S, Hauptmann KE, Mueller R, Buellesfeld L, Gerckens U, et al. TAXUS I: six- and twelve-month results from a randomized, double-blind trial on a slow-release paclitaxel-eluting stent for de novo coronary lesions. Circulation. 2003;107(1):38-42.
75. Wiskirchen J, Schober W, Schart N, Kehlbach R, Wersebe A, Tepe G, et al. The effects of paclitaxel on the three phases of restenosis: smooth muscle cell proliferation, migration, and matrix formation: an in vitro study. Invest Radiol. 2004;39(9):565-71.
76. Herdeg C, Oberhoff M, Baumbach A, Blattner A, Axel DI, Schröder S, et al. Local paclitaxel delivery for the prevention of restenosis: biological effects and efficacy in vivo. Journal of the American College of Cardiology. 2000;35(7):1969-76.
77. Signore PE, Machan LS, Jackson JK, Burt H, Bromley P, Wilson JE, et al. Complete inhibition of intimal hyperplasia by perivascular delivery of paclitaxel in balloon-injured rat carotid arteries. Journal of vascular and interventional radiology : JVIR. 2001;12(1):79-88.
78. Farb A, Heller PF, Shroff S, Cheng L, Kolodgie FD, Carter AJ, et al. Pathological analysis of local delivery of paclitaxel via a polymer-coated stent. Circulation. 2001;104(4):473-9.

79. Heldman AW, Cheng L, Jenkins GM, Heller PF, Kim DW, Ware M, et al. Paclitaxel stent coating inhibits neointimal hyperplasia at 4 weeks in a porcine model of coronary restenosis. Circulation. 2001;103(18):2289-95.
80. Chandy T, Rao GH, Wilson RF, Das GS. Development of poly(Lactic acid)/chitosan co-matrix microspheres: controlled release of taxol-heparin for preventing restenosis. Drug delivery. 2001;8(2):77-86.
81. Scheller B, Speck U, Schmitt A, Clauss W, Sovak M, Böhm M, et al. Acute cardiac tolerance of current contrast media and the new taxane protaxel using iopromide as carrier during porcine coronary angiography and stenting. Investigative radiology. 2002;37(1):29-34.
82. Suh H, Jeong B, Rathi R, Kim SW. Regulation of smooth muscle cell proliferation using paclitaxel-loaded poly(ethylene oxide)-poly(lactide/glycolide) nanospheres. Journal of biomedical materials research. 1998;42(2):331-8.
83. Hwang CW, Wu D, Edelman ER. Physiological transport forces govern drug distribution for stent-based delivery. Circulation. 2001;104(5):600-5.
84. Scheller B, Speck U, Schmitt A, Böhm M, Nickenig G. Addition of paclitaxel to contrast media prevents restenosis after coronary stent implantation. Journal of the American College of Cardiology. 2003;42(8):1415-20.
85. Virmani R, Liistro F, Stankovic G, Di Mario C, Montorfano M, Farb A, et al. Mechanism of late in-stent restenosis after implantation of a paclitaxel derivate-eluting polymer stent system in humans. Circulation. 2002;106(21):2649-51.
86. Waksman R, Pakala R. Drug-eluting balloon: the comeback kid? Circulation Cardiovascular interventions. 2009;2(4):352-8.
87. Sharma S, Kukreja N, Christopoulos C, Gorog DA. Drug-eluting balloon: new tool in the box. Expert review of medical devices. 2010;7(3):381-8.
88. Axel DI, Kunert W, Goggelmann C, Oberhoff M, Herdeg C, Kuttner A, et al. Paclitaxel inhibits arterial smooth muscle cell proliferation and migration in vitro and in vivo using local drug delivery. Circulation. 1997;96(2):636-45.
89. Sharma S, Christopoulos C, Kukreja N, Gorog DA. Local drug delivery for percutaneous coronary intervention. Pharmacology & therapeutics. 2011;129(3):260-6.
90. Zuban ON, Skorniakov SN, Borodin EP, Novikov BI, Madvinskii ID, Arkanov LV, et al. [Endoscopic methods for the correction of ureteral strictures]. Urologiia (Moscow, Russia : 1999). 2013(3):57-60.
91. Hafez KS, Wolf JS, Jr. Update on minimally invasive management of ureteral strictures. J Endourol. 2003;17(7):453-64.
92. Punekar SV, Rao SR, Swami G, Soni AB, Kinne JS, Karhadkar SS. Balloon dilatation of ureteric strictures. Journal of postgraduate medicine. 2000;46(1):23-5.
93. Schmeller N, Leitl F, Arnholdt H. Histology of ureter after unsuccessful endoscopic intubated incision. The Journal of urology. 1992;147(2):450-2.
94. Baskin LS, Constantinescu SC, Howard PS, McAninch JW, Ewalt DH, Duckett JW, et al. Biochemical characterization and quantitation of the collagenous components of urethral stricture tissue. J Urol. 1993;150(2 Pt 2):642-7.
95. Cavalcanti AG, Costa WS, Baskin LS, McAninch JA, Sampaio FJ. A morphometric analysis of bulbar urethral strictures. BJU Int. 2007;100(2):397-402.
96. Sergi F, Flammia GP, Alcini A, Perrone G, Guaglianone S, Forastiere E, et al. Collagen changes in the ureteropelvic junction after failed antegrade endopyelotomy. J Endourol. 2007;21(1):103-7.
97. Wolf JS, Jr., Soble JJ, Ratliff TL, Clayman RV. Ureteral cell cultures II: Collagen production and response to pharmacologic agents. The Journal of urology. 1996;156(6):2067-72.

98. Acharya P, Beckel J, Ruiz WG, Wang E, Rojas R, Birder L, et al. Distribution of the tight junction proteins ZO-1, occludin, and claudin-4, -8, and -12 in bladder epithelium. American journal of physiology Renal physiology. 2004;287(2):F305-18.
99. Donaldson KL, Goolsby GL, Kiener PA, Wahl AF. Activation of p34cdc2 coincident with taxol-induced apoptosis. Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research. 1994;5(10):1041-50.
100. Schiff PB, Fant J, Horwitz SB. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. Nature. 1979;277(5698):665-7.
101. Will TA, Polcari AJ, Garcia JG, Ouwenga MK, Voelzke BB, Greisler HP, et al. Paclitaxel inhibits ureteral smooth muscle cell proliferation and collagen production in the absence of cell toxicity. The Journal of urology. 2011;185(1):335-40.
102. Kreft ME, Hudoklin S, Jezernik K, Romih R. Formation and maintenance of blood-urine barrier in urothelium. Protoplasma. 2010;246(1-4):3-14.
103. Hu P, Meyers S, Liang FX, Deng FM, Kachar B, Zeidel ML, et al. Role of membrane proteins in permeability barrier function: uroplakin ablation elevates urothelial permeability. American journal of physiology Renal physiology. 2002;283(6):F1200-7.
104. Hurst RE, Rhodes SW, Adamson PB, Parsons CL, Roy JB. Functional and structural characteristics of the glycosaminoglycans of the bladder luminal surface. The Journal of urology. 1987;138(2):433-7.
105. Lewis SA, Eaton DC, Diamond JM. The mechanism of Na+ transport by rabbit urinary bladder. The Journal of membrane biology. 1976;28(1):41-70.
106. Negrete HO, Lavelle JP, Berg J, Lewis SA, Zeidel ML. Permeability properties of the intact mammalian bladder epithelium. The American journal of physiology. 1996;271(4 Pt 2):F886-94.
107. Varley CL, Garthwaite MA, Cross W, Hinley J, Trejdosiewicz LK, Southgate J. PPARgamma-regulated tight junction development during human urothelial cytodifferentiation. Journal of cellular physiology. 2006;208(2):407-17.
108. Apodaca G. The uroepithelium: not just a passive barrier. Traffic (Copenhagen, Denmark). 2004;5(3):117-28.
109. Kreft ME, Jezernik K, Kreft M, Romih R. Apical plasma membrane traffic in superficial cells of bladder urothelium. Annals of the New York Academy of Sciences. 2009;1152:18-29.
110. Lewis SA, de Moura JL. Incorporation of cytoplasmic vesicles into apical membrane of mammalian urinary bladder epithelium. Nature. 1982;297(5868):685-8.
111. Truschel ST, Wang E, Ruiz WG, Leung SM, Rojas R, Lavelle J, et al. Stretch-regulated exocytosis/endocytosis in bladder umbrella cells. Molecular biology of the cell. 2002;13(3):830-46.
112. Chmurny GN, Hilton BD, Brobst S, Look SA, Witherup KM, Beutler JA. 1H- and 13C-nmr assignments for taxol, 7-epi-taxol, and cephalomannine. J Nat Prod. 1992;55(4):414-23.
113. Nicolaou KC, Nantermet PG, Ueno H, Guy RK, Couladouros EA, Sorensen EJ. Total Synthesis of Taxol. 1. Retrosynthesis, Degradation, and Reconstitution. Journal of the American Chemical Society. 1995;117(2):624-33.
114. Williams HJ, Moyna G, Scott AI, Swindell CS, Chirlian LE, Heerding JM, et al. NMR and molecular modeling study of the conformations of taxol 2'-acetate in chloroform and aqueous dimethyl sulfoxide solutions. J Med Chem. 1996;39(7):1555-9.
115. Nakada SY, Soble JJ, Gardner SM, Wolf JS, Figenshau RS, Pearle MS, et al. Comparison of acucise endopyelotomy and endoballoon rupture for management of secondary proximal ureteral stricture in the porcine model. J Endourol. 1996;10(4):311-8.
116. Soria F, Sanchez FM, Sun F, Ezquerra J, Duran E, Uson J. Comparative study of ureteral stents following endoureterotomy in the porcine model: 3 vs 6 weeks and 7F vs 14F. Cardiovascular and interventional radiology. 2005;28(6):773-8.

117. Lovich MA, Creel C, Hong K, Hwang CW, Edelman ER. Carrier proteins determine local pharmacokinetics and arterial distribution of paclitaxel. Journal of pharmaceutical sciences. 2001;90(9):1324-35.
118. Creel CJ, Lovich MA, Edelman ER. Arterial paclitaxel distribution and deposition. Circulation research. 2000;86(8):879-84.
119. Kolachalama VB, Pacetti SD, Franses JW, Stankus JJ, Zhao HQ, Shazly T, et al. Mechanisms of tissue uptake and retention in zotarolimus-coated balloon therapy. Circulation. 2013;127(20):2047-55.
120. Granada JF, Stenoien M, Buszman PP, Tellez A, Langanki D, Kaluza GL, et al. Mechanisms of tissue uptake and retention of paclitaxel-coated balloons: impact on neointimal proliferation and healing. Open heart. 2014;1(1):e000117.
121. Thim T MK TA, et al. TCT-480: Biological Effect on Coronary Restenosis of Bare Metal Stents Crimped on Paclitaxel Coated Balloons: Preliminary Animal Data in the Porcine Overstretch Model. The American Journal of Cardiology. 2009;104(6, Supplement):177D.
122. Stary HC. Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2000;20(5):1177-8.
123. Kubo T, Tanaka A, Kitabata H, Ino Y, Tanimoto T, Akasaka T. Application of optical coherence tomography in percutaneous coronary intervention. Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society. 2012;76(9):2076-83.
124. Curcio A, Torella D, Indolfi C. Mechanisms of smooth muscle cell proliferation and endothelial regeneration after vascular injury and stenting: approach to therapy. Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society. 2011;75(6):1287-96.