

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI VERONA

**FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI MEDICINA**

**SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE DELLA VITA E DELLA SALUTE
DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MEDICHE CLINICHE E SPERIMENTALI**

**Direttore della scuola: Prof. Corrado Vassanelli
Coordinatore: Prof. Enzo Bonora**

TESI DOTTORALE

**MODULAZIONE DELLA RISPOSTA INFIAMMATORIA
NELLA PREVENZIONE DELLA RESTENOSI POST
STENT CORONARICO: IL TRIAL CLINICO
MULTICENTRICO RANDOMIZZATO "CEREA-DES"**

Relatore: Prof. Flavio Luciano Ribichini

**Dottorando:
Dott. Gabriele Pesarini**

**ANNO ACCADEMICO 2010-2011
CICLO DOTTORATO DI RICERCA XXIII**

INDICE

Introduzione	pag. 3
Materiali e metodi	pag. 24
Risultati	pag. 37
Discussione.....	pag. 57
Conclusioni.....	pag. 64
Bibliografia.....	pag. 65

INTRODUZIONE

Premessa

L'aterosclerosi coronarica si configura come la principale manifestazione cardiaca di un processo patologico sistemico iniziato ed alimentato da meccanismi cellulari ed umorali di natura infiammatoria. Anche le manifestazioni cliniche piu' temibili di questa patologia, come l'infarto miocardico acuto e le sue complicanze, sono quindi il risultato dell'azione di un complesso network flogistico che culmina e si concentra nell'evento acuto ma coinvolge l'intero organismo ed in particolare l'apparato cardio-vascolare. Questo concetto chiave ha ormai rivoluzionato il modo di interpretare anche la cardiopatia ischemica e focalizza l'interesse scientifico nei confronti degli attori della risposta infiammatoria, in particolare i leucociti ed i mediatori che modulano e sostengono il processo. Sebbene le conoscenze al riguardo non ci forniscano ancora un quadro esaustivo del modello infiammatorio in vivo, molte cellule della serie bianca sono in esso coinvolte. I macrofagi, ad esempio, sono stati rinvenuti nelle placche ateromasiche in diversi stadi di sviluppo e, a partire dagli anni '80, se ne è documentata la presenza con tecniche immunoistochimiche¹. Da allora è stato possibile ottenere numerose informazioni sulla migrazione di queste cellule a livello intimale e sulla loro attivazione con conseguente espressione di molteplici citochine ad azione paracrina e sistemica. Altre cellule immunocompetenti, soprattutto i linfociti T, partecipano alla risposta infiammatoria anche se rinvenibili in minor numero a livello delle placche ateromasiche. Il loro ruolo potrebbe essere importante nell'orchestrare il processo ed influenzare il comportamento degli stessi macrofagi nelle diverse fasi della patologia. Altre popolazioni cellulari, come i mastociti, stanno attualmente emergendo come attori nella progressione dell'ateroma e nella fissurazione e rottura della placca che possono

poi portare alle note conseguenze cliniche delle sindromi coronariche acute. Anche queste cellule possono secernere citochine pro-infiammatorie e liberare, mediante degranolazione, mediatori ed enzimi in grado di determinare e far progredire il danno vascolare e di alterare la biologia del vaso (es. istamina, proteasi, eparina, ecc...). In virtù di quanto fin'ora esposto parrebbe poco ragionevole ritenere che una terapia locale sull'ateroma sia in grado di influenzare profondamente la storia naturale di un processo patologico sistemico. Nella realtà clinica, d'altro canto, l'elevata morbi-mortalità della cardiopatia ischemica e soprattutto delle sue forme acute, ha reso necessario lo sviluppo di tecniche e materiali d'avanguardia per la risoluzione della trombosi coronarica acuta ed il trattamento degli ateromi sintomatici o a rischio elevato di complicazione. Le metodiche di cardiologia interventistica più diffuse, come l'angioplastica e lo stenting coronarico, si sono evolute negli anni per rispondere sempre meglio alle esigenze di efficacia, durata e sicurezza richieste per il trattamento della cardiopatia ischemica. Tuttavia la loro natura locale, il rischio comunque presente di proliferazione neointimale e conseguente restenosi sintomatica o, ancor peggio, di trombosi protesica acuta e da ultimo il costo crescente delle nuove tecnologie, come quella degli stent a rilascio di farmaco (DES), suggeriscono l'utilità intrinseca di un efficace trattamento sistemico concomitante che agisca sulle basi dell'aterosclerosi.

La potente azione anti-infiammatoria dei corticosteroidi, come il prednisone somministrato a dosaggi adeguati per via sistemica, potrebbe interferire nei fenomeni infiammatori della malattia aterosclerotica ed in particolare potrebbe risultare efficace nel ridurre l'incidenza della restenosi clinicamente ed angiograficamente evidente dopo l'impianto di stents metallici intracoronarici, attraverso molteplici meccanismi d'azione che verranno in seguito dettagliati.

Obiettivo della ricerca

Come verrà dettagliato più avanti, alcuni studi su animali ed alcune evidenze cliniche supportano l'efficacia anti restenotica della terapia steroidea somministrata per un breve periodo a dosi immunosoppressive dopo l'impianto di stent coronarici metallici (Bare Metal Stent, BMS). Tuttavia, le informazioni disponibili al momento sono limitate, soprattutto a causa della scarsa numerosità di pazienti inclusi in queste casistiche.

Questa ricerca, ha lo scopo di chiarire l'efficacia clinica della terapia steroidea sistemica somministrata in pazienti con nota cardiopatia ischemica e sottoposti a stenting coronarico e di valutare, in un sottogruppo del campione analizzato, l'eventuale modulazione della risposta infiammatoria attraverso l'analisi dell'espressione di alcune citochine pro-infiammatorie e del pattern di attivazione monocitaria mediata dalla via del fattore trascrizionale NFκB.

L'acronimo dello studio clinico oggetto della presente tesi è il seguente: "CEREA-DES" (Cortisone plus BMS or DES versus BMS alone to Eliminate Restenosis Study). Il paper è attualmente in pubblicazione sulla rivista American Journal of Medicine e ne è prevista l'uscita nel numero di Maggio 2011.

Il sottostudio sull'attivazione monocitaria, anch'esso descritto in questa tesi dottorale, è già pubblicato sulla rivista Atherosclerosis².

Il processo ateromasico in sintesi

L'aterosclerosi è un processo patologico che si intreccia intimamente con la struttura e la biologia vascolare: per comprendere la sua insorgenza e progressione dobbiamo infatti considerare l'arteria come un organo dinamico e complesso, costituito da diversi attori cellulari e molecolari, piuttosto che come un semplice condotto che garantisce il trasporto del sangue ove ve ne sia bisogno. Probabilmente l'aterosclerosi è la malattia con il più lungo "periodo di incubazione" che si conosca ed in effetti i primi segni

anatomopatologici del processo ateromasico si possono rinvenire già in età adolescenziale. Tra la comparsa di tali alterazioni (come la “stria lipidica”) e le manifestazioni cliniche della malattia possono quindi intercorrere decine di anni durante i quali l’aterosclerosi permane del tutto asintomatica. Per meglio illustrare i punti chiave dello sviluppo dell’aterosclerosi verrà brevemente descritta la struttura dei vasi arteriosi coronarici e la sua correlazione con il processo.

Come le altre arterie, anche le coronarie possiedono una struttura a triplice strato, costituita dalle tuniche intima, media ed avventizia. Il più interno di questi strati, la tunica intima è prevalentemente costituita da uno singolo strato di cellule endoteliali in diretto contatto con il torrente ematico. Tale strato forma una parete a bassa resistenza di cellule poligonali appiattite unite tra loro da giunzioni strette. Questa tonaca endoteliale presiede a svariate funzioni spesso tenute in scarsa considerazione; tra le più importanti vi sono l’attività antiaggregante ed anticoagulante che garantiscono il mantenimento del tessuto sanguigno allo stato liquido. Questo compito è svolto grazie alla capacità degli endotelioцитi di sintetizzare ed esprimere una varietà di molecole quali proteoglicani eparino-simili che attivano l’antirombina III o la trombomodulina, che agisce sul sistema trombolitico proteina C – proteina S. Questo tappeto di cellule endoteliali poggia su di una sottile lamina basale costituita da collagene non fibrillare ed altre molecole, quali fibronectina e laminina. Con l’invecchiamento ed il danno vascolare, la tunica intima può andare incontro ad ispessimento ed alcuni tipi cellulari, originariamente non presenti (quali le cellule muscolari lisce), possono migrare al suo interno. Tali cellule sono in grado di iniziare la produzione di nuova matrice extracellulare che aumenta ulteriormente lo spessore intimale: tale pattern è molto comune anche in adulti sani. Esternamente alla lamina basale troviamo la membrana elastica interna, che separa la tunica intima dalla media. Quest’ultima è lo strato più spesso dei tre che costituiscono la parete arteriosa. La sua composizione può variare in rapporto al calibro dell’arteria

esaminata e condiziona il comportamento funzionale del vaso. Le arterie di grosso calibro, come l'aorta, che hanno un diametro medio tra i 7 ed i 30 millimetri, sono sovente chiamate arterie elastiche in virtù del fatto che la loro tunica media è formata da strati concentrici di cellule muscolari lisce (SMC) separate da abbondante matrice extracellulare ricca in elastina. Queste arterie presentano un comportamento passivo rispetto alla pompa cardiaca: l'onda sfigmica generate dalla sistole dilata il vaso e trasferisce alla parete energia elastica che viene quindi rilasciata nella fase diastolica del ciclo cardiaco. Le arterie di medio e piccolo calibro, usualmente con diametro tra gli 0,1 ed i 7 millimetri, hanno una tunica media formata principalmente da gruppi di cellule muscolari lisce miste ad una matrice di collagene ed una minor quantità di fibre elastiche. All'analisi microscopica le SMC sono circondate da una membrana basale che si interrompe nei siti di contatto intercellulari: tale struttura permette la trasmissione dell'impulso nervoso tra i vari elementi cellulari. Così queste arterie "muscolari" possono regolare il loro diametro ed essere conseguentemente in grado di modulare il flusso sanguigno da loro gestito. Tale meccanismo è alla base del sistema di autoregolazione del flusso adottato da molti organi, ma è anche la base anatomica per il fenomeno del vasospasmo coronarico. Al confine tra tunica media e tunica avventizia si trova la lamina elastica esterna. Tale struttura è costituita da gruppi più numerosi di fibre elastiche a disposizione in prevalenza longitudinale, a formare un disegno simile ad una rete. L'ultimo e più esterno strato della parete arteriosa è la tunica avventizia. Nelle arterie di grande calibro essa è in prevalenza formata da tessuto connettivo ricco in collagene che continua nel tessuto perivascolare. Le fibre elastiche sono condensate al confine con la lamina elastica esterna. Nelle arterie più piccole la tunica avventizia è ben sviluppata ed è costituita da una rete di collagene e fibre elastiche che continua gradualmente nel connettivo perivascolare. A questo livello si ritrovano i piccoli vasi sanguiferi detti vasa vasorum e le terminazioni nervose. Anche se è lo strato su cui sono

stati compiuti meno studi, la tunica avventizia riveste importanti funzioni nel mantenimento dell'omeostasi vascolare.

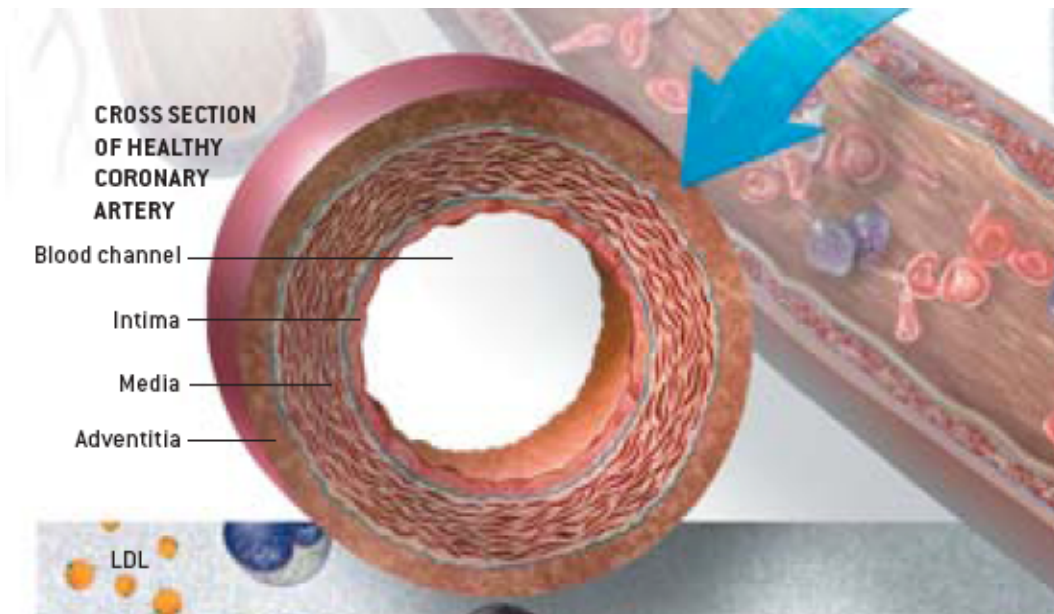


Figura 1 – Sezione di arteria coronaria con i diversi strati descritti nel testo

La tunica intima è la sede delle più precoci alterazioni ateromasiche vascolari. L'assunzione di una dieta ricca di colesterolo e grassi saturi facilita la localizzazione intimale di lipoproteine a bassa densità che, adese allo strato proteoglicanico³ di questa tunica, tendono a formare aggregati che più difficilmente vengono rimossi da tale sede⁴. La prolungata permanenza nell'intima espone le lipoproteine allo stress ossidativo che ne induce modificazioni chimiche ritenute importanti per la progressione del processo aterosclerotico⁵. Le lipoproteine ossidate sono in grado di attivare la produzione locale di citochine che stimolano l'espressione di molecole di adesione e fattori di crescita da parte delle cellule endoteliali. L'endotelio normofunzionante non esprime tali segnali e resiste all'adesione ed alla migrazione delle cellule infiammatorie circolanti. Nella disfunzione endoteliale tipica dell'aterosclerosi invece si ha aumentata espressione di molecole della classe delle immunoglobuline come VCAM-1 (Vascular Cells Adhesion

Molecole-1) ed ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecole-1) e di quella delle selectine (E-selectin, P-selectin). E' interessante notare come VCAM-1 sia il recettore per un integrina (VLA-4) espressa selettivamente sulle cellule che più precocemente si localizzano nell'ateroma nascente, cioè monociti e linfociti T, e che alcuni studi su animali⁶ confermino la presenza di VCAM-1 sulla superficie di cellule endoteliali sovrastanti lesioni ateromasiche molto precoci. In generale le molecole della superfamiglia immunoglobulinica promuovono l'adesione e l'immobilizzazione delle cellule circolanti⁷, mentre il ruolo delle selectine, il particolare P-selectin, è legato alla migrazione dei leucociti attraverso lo strato endoteliale⁸. Oltre alle molecole di adesione, alcuni fattori chemoattrattivi sono importanti per la migrazione intima dei leucociti adesi all'endotelio; le LDL-ossidate ed altri fattori espressi nell'ateroma nascente stimolano la produzione da parte dell'endotelio e delle SMC di MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) che è un potente attivatore della chemotassi monocitaria. L'importanza della migrazione mediata da questa molecola è sostenuta da alcuni studi animali che dimostrano come topi knock-out per MCP-1 o CCR-2 (il suo recettore) con dislipidemia geneticamente determinata, abbiano una drammatica riduzione nella formazione di placche ateromasiche rispetto ai controlli⁹. Diverse altre molecole ed i relativi recettori sono state più recentemente studiate per il loro ruolo nella fase di migrazione leucocitaria; tra queste le più rilevanti sembrano essere MCP-2 (CCL8), KC (CXCL1), MIP-1 α (CCL3), MIP-1 β (CCL4), RANTES (CCL5) e Fractalchine (CX3CL1), anche se la lista è destinata ad espandersi con il progredire delle conoscenze¹⁰. Alcuni fattori fisici potrebbero influenzare l'espressione di queste molecole di adesione e di chemotassi in particolari zone dell'albero arterioso, specialmente in siti in cui il flusso passa da un regime laminare ad uno vorticoso e lo stress di parete aumenta. In effetti il flusso laminare potrebbe aumentare l'espressione di fattori vasoprotettivi; tra questi l'ossido nitrico (NO) ha proprietà vasodilatanti ed anti-

infiammatorie (attraverso l'aumento di produzione della proteina inibitoria per l'NFkB)¹¹. E' interessante notare che in questi siti, come le biforcazioni delle arterie coronarie, è più facile la localizzazione delle placche ateromasiche. Come già menzionato, le cellule infiammatorie maggiormente presenti nell'ateroma nascente sono i macrofagi ed i linfociti-T. Una volta localizzatisi nell'intima, i macrofagi iniziano ad assumere lipidi dando inizio alla loro trasformazione in cellule schiumose (foam cells). Dal momento che la formazione di placche ateromasiche non è ostacolata in soggetti knock-out per il recettore delle LDL, i macrofagi non accumulano lipidi attraverso questa via: in effetti esiste un meccanismo di down-regulation di LDL-r che inibisce la sintesi del recettore al raggiungimento di adeguati valori endocellulari di colesterolo. Esiste però una diversa famiglia recettoriale, gli "scavenger receptors", che ha affinità per lipoproteine modificate, come ad esempio le ox-LDL, e non possiede un meccanismo di regolazione come quello testè citato per LDL-r. I sottotipi di scavenger receptors più studiati sono quelli appartenenti alla famiglia scavenger-A ed il CD36. Ratti iperlipidemicici con delezioni per i geni di questi recettori sviluppano aterosclerosi molto meno severa rispetto ai controlli¹². Una volta accumulati lipidi ed assunto la forma di foam cells, questi macrofagi modificati si riproducono più frequentemente nell'ateroma, dove vengono secrete citochine e fattori di crescita quali MCSF (Macrophage Colony Stimulating Factor), GM-CSF (Granulocyte Macropage Colony Stimulating Factor) e IL-3. Con l'aumentare del numero delle foam cells nell'intima disfunzionante si organizza la prima lesione aterosclerotica anatomopatologicamente rilevante e potenzialmente reversibile: la stria lipidica. Le foam cells della stria lipidica fungono da promotori per il processo infiammatorio di parete, sintetizzando e liberando citochine, fattori chemotattici, derivati dell'arachidonato e molti radicali ossidanti. Questo sistema di cellule immunitarie non necessita di stimolo antigenico per sostenersi, ed è perciò innato, anche se un ruolo per l'immunità acquisita sembra essere sempre più probabile.

Agenti infettivi, lipoproteine modificate, heat-shock proteins ed altri tipi molecolari potrebbero essere processati da APC (antigen presentino cells) nella placca nascente, e stimolare così i linfociti T ad attivarsi, processo che amplifica notevolmente la produzione di mediatori infiammatori ed il processo nel suo assieme. TNF- α , IL-2, IL-6, IFN- γ , CD40-L ed altri fattori pro-infiammatori sono prodotti in quantità dalla sottopopolazione Th1, mentre i linfociti Th2, tra gli altri fattori secreti, sintetizzano e liberano IL-10, la principale citochina ad azione anti-infiammatoria. Il ruolo dell'immunità acquisita, ed in particolare dei linfociti T helper, potrebbe essere dunque quello di orchestrare il processo infiammatorio innescato nella placca in crescita. I linfociti T citotossici potrebbero mediare la liberazione di sostanze lipolitiche, proteolitiche, ossidanti ed indurre l'apoptosi di alcuni tipi cellulari quali macrofagi, endotelociti e SMC, portando alla progressione ed alla instabilizzazione dell'ateroma. Questo substrato infiammatorio attiva i macrofagi che, a loro volta aumentano e differenziano la quantità e la tipologia delle molecole secrete. Tra queste PDGF (Platelet Derived Growth Factor) è una potente proteina chemotattica per le cellule muscolari lisce, che causa la migrazione delle SMC nell'intima del sito di placca e ne favorisce la replicazione, anche se questo fenomeno non avviene in maniera costante, ma è più o meno favorito dai rimaneggiamenti interni alla placca e dall'esposizione delle SMC a fattori endoteliali e circolanti (es. trombina). In ogni caso la popolazione delle cellule muscolari lisce nell'ateroma è in costante evoluzione, ed alla replicazione fa da contraltare il già citato processo apoptotico orchestrato dalle cellule T principalmente attraverso la via del FAS - FAS-ligand. Nelle fasi avanzate della crescita dell'ateroma, il volume della placca aumenta progressivamente, soprattutto per la produzione in situ di matrice extracellulare mediata dalle SMC sotto stimolazione citochinica (PDGF, TNF- β) e costituita prevalentemente da collagene (Tipo I e III), fibre di elastina e proteoglicani. Anche per questi elementi non cellulari esiste un'evoluzione dinamica legata alla

produzione di sostanze litiche (come le metalloproteinasi MMPs) in grado di degradare la matrice e determinare i vari gradi di rimodellamento della parete arteriosa che accompagnano la crescita della placca: la stenosi luminale arteriosa vera e propria è infatti generalmente preceduta da una fase di crescita della placca verso l'esterno del vaso, il cosiddetto "rimodellamento positivo". Nell'ateroma in crescita le SMC non sono le uniche cellule non immunitarie a migrare e replicarsi, anche cellule endoteliali si localizzano nella placca e, sotto la stimolazione di molecole come VEGF e FGF (vascular-endothelial e fibroblast growth factor) si organizzano a formare microscopici plessi neovascolari ricchi in molecole di adesione che aumentano la migrazione cellulare. Anche queste strutture vascolari sembrano importanti per la progressione della placca, come dimostrato dal fatto che fattori anti-neoangiogenetici hanno la capacità di limitarne lo sviluppo¹³. Episodi di emorragia locale e trombosi intrapacca legate allo sviluppo di tali neovasi potrebbero, come accennato in precedenza, favorire l'insorgenza di una fase di elevata replicazione delle SMC e contribuire alla progressione dell'ateroma. Le SMC attivate sono anche in grado di secernere fattori strutturalmente simili al TGF- β , ad azione pro-calcificante e proteine in grado di legare il calcio: queste molecole contribuiscono quindi ad un fenomeno comune nelle placche ateromatiche avanzate: la mineralizzazione. Quando la placca si estende oltre la capacità di rimodellamento positivo del vaso coinvolto, comincia a determinare stenosi luminale, che restringendo progressivamente il diametro interno dell'arteria può causare una riduzione del flusso sanguigno e, nel caso specifico delle coronarie, un impairment tra domanda e richiesta di ossigeno al miocardio, cosa che può portare allo sviluppo degli equivalenti clinici della cardiopatia ischemica cronica. Le sindromi coronariche acute sono invece in gran parte dovute a fenomeni trombotici endovascolari legati alla complicazione ed alla degenerazione della placca ateromatica: in particolare la rottura del "cap fibroso" che ricopre il nucleo dell'ateroma. Questo rivestimento è costituito in prevalenza da

collagene interstiziale, la cui sintesi e degradazione sono regolate in prevalenza dalle molecole elencate in precedenza a proposito della matrice extracellulare. I macrofagi attivati presenti nelle placche di grado avanzato sono in grado di produrre elevate quantità di metalloproteinasi e catepsine capaci di espletare azione litica su collagene, elastina e proteoglicani: queste cellule hanno quindi un ruolo di primo piano nell'assottigliamento del "cap fibroso" e nella conseguente instabilizzazione della placca¹⁴. In virtù del fatto che il collagene e le altre componenti del cap fibroso sono in gran parte sintetizzate dalle SMC, un'accelerata apoptosi di questo tipo cellulare, con i meccanismi sopra riportati, porta verosimilmente ad una placca più propensa alla rottura ed alle complicanze trombotiche. Inoltre i macrofagi e le cellule muscolari lisce in apoptosi possono rilasciare fattore tissutale, un potente agente pro-trombotico qualora venga in contatto con il torrente ematico. Ulteriore caratteristica delle placche particolarmente prone alle complicanze è la presenza di un ricco nucleo lipidico, che esercita una azione biomeccanica di stress su zone potenzialmente deboli del cap fibroso, aumentandone la probabilità di rottura. In ogni caso fenomeni di fissurazione e successiva riparazione delle placche aterosclerotiche con conseguente generazione di trombosi locale limitata sono frequenti e spesso non portano ad equivalenti clinici degni di note, rimanendo asintomatici. In sintesi: ricco core lipidico, elevata presenza di macrofagi attivati, marcata apoptosi cellulare e rivestimento fibroso sottile sono le principali caratteristiche anatomo-patologiche delle cosiddette "placche vulnerabili", che non corrispondono necessariamente a quelle più voluminose, che determinino stenosi luminali emodinamicamente significative.

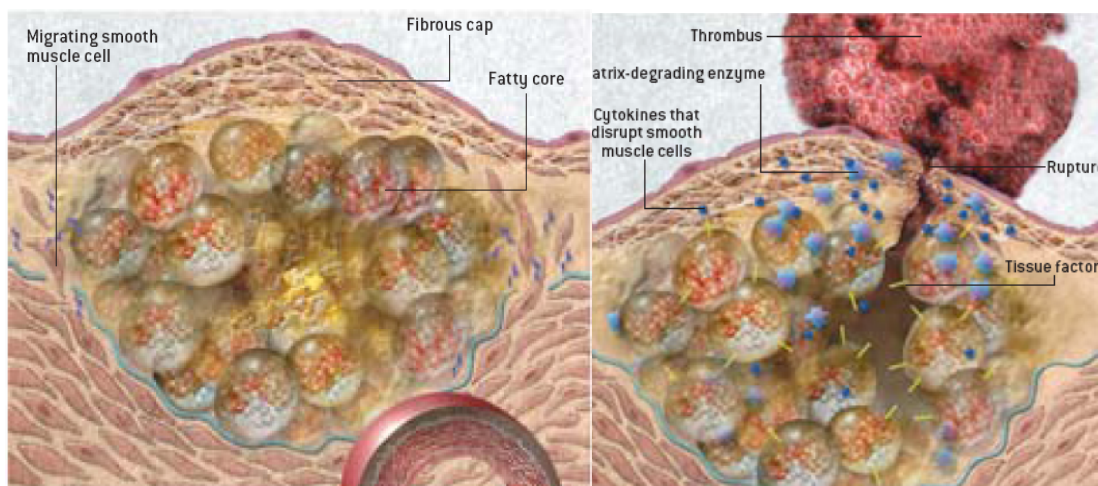


Figura 2 –Principali componenti della placca ateromastica e la sua complicazione trombotica

L'aterosclerosi come patologia del sistema vascolare e dell'individuo

Il senso comune di intendere l'aterosclerosi, soprattutto nella comunità della cardiologia interventistica, è spesso focalizzato al trattamento della placca responsabile in quel momento della sindrome coronarica acuta: la cosiddetta “culprit lesion”. Più recentemente, il concetto di “placca vulnerabile” ha portato i cardiologi a cercare le caratteristiche morfologiche e biochimiche in grado di aumentare le probabilità di individuare singole placche che avessero elevate probabilità di complicarsi nel breve periodo¹⁵. Metodiche avanzate di imaging ed ecografia intravascolare, come IVUS, OCT, palpografia, angioscopia e tecniche di risonanza magnetica acquisite nel recente passato hanno contribuito alla caratterizzazione morfologica e funzionale di queste formazioni ateromastiche. Tuttavia, in quest'ottica di prevenzione delle possibili complicanze delle placche vulnerabili, l'approccio tradizionale al trattamento interventistico delle lesioni ateromastiche risulta verosimilmente riduttivo¹⁶. Tra i motivi di questa affermazione vi è il recente riscontro che le placche vulnerabili sono molto spesso multiple nel paziente con cardiopatia ischemica e che il processo infiammatorio è diffuso nell'albero arterioso e nel miocardio di questi soggetti. Una ricerca IVUS-guidata di placche fissurate in 24 pazienti con primo episodio di sindrome coronarica acuta ha mostrato che l'80% di

questi soggetti aveva più di una placca con tali caratteristiche anche in aree lontane dalla culprit lesion¹⁷. Un'analisi di markers biochimici di infiammazione vascolare¹⁸ (HLA-DR) e di distribuzione delle principali cellule coinvolte nel processo (macrofagi CD68+ e linfociti-T CD3+) ha fornito risultati interessanti mostrando come il processo infiammatorio sia molto attivo nell'arteria correlata all'infarto(IRA), ma che i livelli dei markers studiati non differivano di molto nelle altre arterie (non-IRA). Ripetendo una simile analisi sugli endotelioцитi del microcircolo miocardico¹⁹, emerge la presenza di bassi markers infiammatori in individui sottoposti a chirurgia valvolare in assenza di CAD. In pazienti con angina stabile vi erano segni di infiammazione moderata, mentre negli individui affetti da angina instabile i markers HLA-DR erano molto più concentrati nel miocardio ischemico. Il processo ateromasico sembra dunque essere sostenuto da quello infiammatorio, e l'infiammazione non si limita alla culprit lesion, ma si estende nel letto vascolare dell'individuo affetto, sia a livello delle coronarie epicardiche, sia a livello del microcircolo. Proseguendo l'analisi del sistema vascolare del soggetto con cardiopatia ischemica, è possibile rilevare come la malattia tenda a localizzarsi anche in zone diverse dal distretto cardiaco, come le carotidi, le arterie renali ed il circolo periferico. Ad esempio, un'analisi sulle placche carotidee in pazienti con CAD, ha mostrato la presenza di placche carotidee ulcerate nel 41.8% dei pazienti con angina instabile, contro solo l'8% dei soggetti con angina stabile ($p < 0.002$).

L'aterosclerosi è dunque un processo diffuso che si estende ben oltre i confini della lesione responsabile o del distretto coronarico. L'azione con presidi locali è attualmente indispensabile per limitare morbilità e mortalità derivanti da tale patologia, ma è necessario prendere coscienza che una terapia efficace per tale condizione non può ignorare la natura sistemica ed immunitaria del sottostante processo infiammatorio.

Fattori trascrizionali ad attività pro-infiammatoria: la famiglia NFκB

Come descritto in precedenza, i macrofagi sono elementi cellulari fondamentali nello sviluppo dell'ateroma e, una volta attivati, sono in grado di sostenere il processo infiammatorio mediante la liberazione di grandi quantità di citochine. Una delle principali vie attraverso cui il macrofago aumenta la produzione di tali sostanze è dipendente da una famiglia di fattori di trascrizione: NFκB/Rel. Questa famiglia include NFκB/RelA (p65), NFκB1 (p50 e p105), NFκB2 (p52 e p100), c-REL ed infine NFκB/RelB²⁰. Questi fattori trascrizionali sono usualmente ritenuti nel citoplasma in forma inattiva, legati ad un inibitore proteico IκB, appartenente ad una larga famiglia di molecole simili comprendente IκBα, IκBβ, IκBγ ed IκBε, che ne impedisce la migrazione nel nucleo ed i conseguenti effetti trascrizionali. La stimolazione macrofagica da parte di segnali extracellulari, verosimilmente attraverso la via dei TLR (Toll Like Receptors), causa l'attivazione di una serie di specifiche protein-chinasi (IKKα ed IKKβ) che mediante fosforilazione ed ubiquitinazione di siti specifici di IκB, ne provocano la rapida degradazione proteolitica e conseguentemente liberano l'NFκB per la migrazione nel nucleo, prevalentemente in forma etero-dimerica p65/p50. Un vasto numero di geni implicati nella cascata infiammatoria possiedono siti di ancoraggio per i fattori NFκB nelle loro regioni introniche promoters. Tuttavia è interessante notare come i macrofagi siano in grado di contrapporre alla produzione di citochine pro-infiammatorie (es. IL-1, IL-6, IL-12, TNFα) anche fattori ad azione anti-infiammatoria (principalmente IL-10) e che l'espressione di IL-10 sia controllata da un complesso sistema comprendente anche lo stesso NFκB. In particolare, non tutte le subunità della famiglia Rel sono in grado di stimolare la produzione del segnale anti-infiammatorio (IL-10), ma alcuni esperimenti molto raffinati indicano che solo p50 possiede questa capacità²⁰. Quindi i macrofagi sarebbero dotati di un sistema regolato di attivazione, il

cui bilancio tra attività pro- ed antinfiammatoria sarebbe fortemente influenzato dallo stato funzionale del sistema trascrizionale NF κ B.

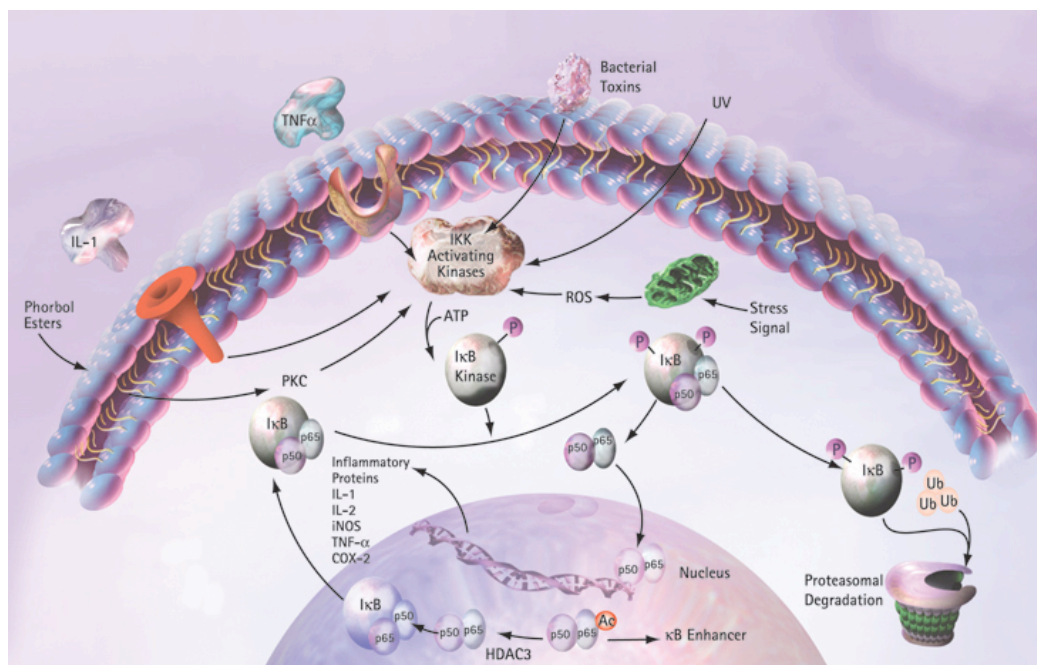


Figura 3 – Vie di attivazione dell'eterodimero NF- κ B p65/p50

Meccanismi immunomodulatori dei glucocorticoidi

I glucocorticoidi, come il prednisone, sono potenti agenti anti-infiammatori ed agiscono sulle cellule immunocompetenti, come i macrofagi, attraverso un complesso sistema che vede coinvolti numerosi meccanismi d'azione. Queste molecole lipofile attraversano la barriera cellulare e si legano a specifici recettori citoplasmatici (GR) formando dei complessi che successivamente traslocano nel nucleo cellulare. L'interpretazione tradizionale dell'azione di questi steroidi è basata sulla capacità dei complessi steroide-recettore (GC-GR) di effettuare il binding a regioni specifiche del DNA responsabili della trascrizione di numerosi fattori proinfiammatori, riducendo sostanzialmente la produzione delle principali citochine: IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL6, IL-8, IL-11, IL-12, IL-16, IFN- γ e TNF α . Tuttavia, sempre maggiori evidenze stanno emergendo circa il

fatto che i glucocorticoidi possano agire anche attraverso la modulazione dei fattori di trascrizione, in particolare la famiglia dell'NF κ B²¹. Ciò avviene secondo numerose modalità. Il complesso GC-GR può legarsi direttamente a siti del DNA che legano NF κ B, impedendone il binding. Diversi studi documentano anche la capacità del complesso glucocorticoidi-recettore di attivare la sintesi di fattore inibitorio per l'NF κ B (IKB)²². Ancora, il complesso GC-GR potrebbe legarsi direttamente a siti specifici dell'eterodimero attivato NF κ B, prevenendone il binding al DNA o causando il suo distacco dalle regioni promoter (modello "semplice"). Inoltre GC-GR potrebbe legarsi al complesso NF κ B-DNA senza causarne il distacco, ma inibendone l'attività (modello "composito"). Un ultimo meccanismo d'azione implicherebbe l'induzione da parte dei glucocorticoidi dell'espressione di proteine in grado di prevenire la traslocazione di NF κ B nel nucleo (GILZ) e ridurre quindi l'attività. Al di là dell'inevitabile complessità dei meccanismi con i quali i glucocorticoidi inibiscono l'infiammazione, la loro azione sulle cellule immunocompetenti, come i macrofagi, oggetto della presente ricerca, potrebbe essere utile per ridurre l'attività infiammatoria di placca e la conseguente progressione e complicazione degli ateromi.



Figura 4 – Modello tridimensionale e formula di struttura del prednisone

Il razionale per l'utilizzo della terapia steroidea

La risposta infiammatoria immuno-mediata implicata nel processo aterosclerotico primitivo e nella restenosi dopo un intervento di angioplastica percutanea o stenting coinvolge sia il sistema umorale (citochine, anticorpi, immunocomplessi e derivati dell'arachidonato) che l'immunità cellulare (linfociti, macrofagi, mastociti, granulociti) ed altre popolazioni cellulari ematiche e vascolari (piastrine, cellule endoteliali, fibroblasti, cellule muscolari lisce). Questi attori cellulari, ed in particolare la linea monocito macrofagica, svolgono un ruolo preminente nello sviluppo dell'ateroma. La risposta monocitaria è molto rapida in conseguenza del danno endoteliale: vengono prodotti fattori chemotattici endoteliali e derivati dalle piastrine che attivano la migrazione dei monociti circolanti e dei macrofagi di parete nel sito dell'insulto vascolare. Una volta migrate queste cellule vengono attivate e contribuiscono in maniera fondamentale a sostenere il processo mediante la produzione ed il rilascio di ulteriori citochine, l'aumento dell'attività e la proliferazione di altre cellule (fibroblasti, cellule muscolari lisce). Come dettagliato in precedenza, i glucocorticoidi sono noti per la potente azione anti-infiammatoria e la loro struttura lipofilica ne permette la diffusione attraverso le barriere lipidiche cellulari. Una volta localizzato nel citoplasma lo steroide si lega ad uno specifico recettore formando un complesso che, migrato nel nucleo, può esplicare effetti trascrizionali effettuando un binding diretto a specifici siti del DNA, ovvero attraverso la modulazione di elementi nucleari intermedi. L'effetto dei glucocorticoidi sulle cellule infiammatorie ne causa una riduzione del numero nel sito di lesione, sia per diminuita migrazione che per minor produzione midollare, ed una ridotta attivazione funzionale²³. Sulle cellule non linfoidi lo steroide esplica la sua azione riducendo l'espressione di fattori chemotattici, molecole adesive ed enzimi lipolitici e proteolitici e limitando la produzione dei derivati dell'arachidonato e di altre sostanze in

grado di alterare la permeabilità vasale, tutte attività potenzialmente in grado di ridurre l'infiammazione sistemica e nel sito dell'ateroma.

Le esperienze cliniche pregresse sull'utilizzo dei glucocorticoidi come terapia anti-restenotica sono state effettuate sia con trattamento sistemico, che mediante devices a rilascio locale controllato del farmaco. Tali studi, condotti a partire dall'inizio degli anni '90, hanno peraltro fornito risultati contrastanti. Nello specifico, due trials randomizzati e controllati versus placebo^{24,25} hanno mostrato come una singola dose endovenosa di 1 gr di metilprednisolone, somministrata 2-24 ore prima dell'esecuzione di una procedura interventistica coronarica percutanea non sia in grado di influenzare l'insorgenza di restenosi a 6 mesi. Inoltre in precedenza un piccolo studio randomizzato²⁶ aveva mostrato una tendenza non statisticamente significativa di riduzione della ricorrenza di angina pectoris a 1.2 anni di follow-up in pazienti trattati con alte dosi di metilprednisolone (125 mg) per via intramuscolare la sera prima di una PCI e la mattina stessa, seguiti da un trattamento orale di durata limitata (60 mg / die per 1 settimana). Tali esperienze hanno portato la comunità cardiologica a ritenere che il trattamento con steroidi fosse inefficace a scopo anti-restenotico. In realtà gli effetti immunosoppressivi dei glucocorticoidi sono notoriamente dose-dipendenti e legati ad una corretta durata del periodo di somministrazione^{27,28}. In effetti nello studio IMPRESS-LD l'efficacia clinica del trattamento con prednisone veniva persa quando la dose di farmaco era ridotta di circa il 50% o più rispetto al trattamento "standard" ad alte dosi. Questo a dimostrare l'importanza del raggiungimento di un effetto immunosoppressivo con dosaggi adeguati per ottenere l'attesa riduzione di eventi cardiaci a seguito di una PCI. Gli stessi studi IMPRESS^{29,30} hanno confermato che il prednisone somministrato a dosaggi derivati dagli usuali standard di trattamento per il trapianto cardiaco³¹ (1 mg/kg per 10 giorni, seguito da 0.5 mg/kg per 20 giorni e 0.25 mg/kg per ulteriori 15 giorni) era efficace nel ridurre gli eventi cardiovascolari e la

restenosi valutata angiograficamente a 6 mesi sia in pazienti mono- che multivasali rispetto al placebo. I risultati di una simile terapia steroidea sono promettenti anche nel trattamento delle biforcazioni, siti notoriamente gravati da outcome peggiori³². L'esperienza con l'utilizzo locale dei glucocorticoidi nel sito di lesione si basa invece sull'impiego di stents a rilascio di dexametasone (BiodivYsio Dexamet – un device in acciaio inossidabile). Il Dexamet è ricoperto di fosforilcolina e 0.5 mcg/mm² di dexametasone, che viene rilasciato per l'80% nell'arco delle prime tre ore dall'impianto; il rilascio termina comunque entro una settimana. Lo studio STRIDE³³, che ha utilizzato questo stent in 60 pazienti non diabetici con angina stabile ed instabile, ha mostrato risultati angiografici lievemente migliori nei pazienti con l'ultima condizione. Questa osservazione supporterebbe il suo utilizzo nell'ambito delle sindromi coronariche acute, ma l'analisi del late-loss all'angiografia quantitativa (0.57 ± 0.48 mm per stent singoli e peraltro corti) non è in favore di un efficace effetto anti-restenotico del device. Simili risultati in termini di restenosi sono stati ottenuti da Hoffmann et al.^{34,35} utilizzando devices non commerciali ricoperti manualmente con dexametasone (supporto che chiaramente offre minori garanzie di standardizzazione del dosaggio rilasciato nell'unità di tempo) in 30 pazienti con prevalente angina stabile. Il Dexamet è stato indagato anche nel setting delle sindromi coronariche acute senza soprasslivellamento del tratto ST nella popolazione dello studio DESIRE (Dexametasone Eluting Stent Italian REgistry)^{36,37} che ha arruolato 334 pazienti indirizzati a trattamento percutaneo precoce. L'end point primario era un composito di morte cardiaca, infarto miocardico e TVR legate a evidenza di ischemia a 6 mesi, mentre come end-point secondario vi era la restenosi binaria valutata angiograficamente. Questo studio mette in evidenza la bassa incidenza di eventi cardiaci nella popolazione in studio (11.5%) possibilmente per l'azione locale dello steroide su un substrato di placca instabile, ma conferma la relativa inefficacia del

Dexamet nel ridurre la re-stenosi a 6 mesi (33% con un late loss di 0.95 ± 0.64 mm – dati comparabili con quelli relativi ai BMS).

Da quanto esposto e dai risultati apparentemente contrastanti degli studi presentati, parrebbe ragionevole ritenere che l'efficacia dei glucocorticoidi nel prevenire la restenosi e, in parte, gli eventi clinici seguenti una procedura interventistica percutanea sia ascrivibile a diversi fattori: particolarmente importanti sono la dose, il tempo di somministrazione ed il trattamento per via sistemica.

*Trattamento dell'aterosclerosi coronarica e razionale della ricerca:
il trial clinico "CEREA DES"*

Il trattamento percutaneo delle lesioni ateromasiche in pazienti con cardiopatia ischemica è evoluto negli anni ed affianca sempre più spesso all'angioplastica coronarica l'impianto endoarterioso degli "stents", devices protesici cilindrici premontati su cateteri dotati di palloni espandibili in grado di dilatare e rilasciare la protesi nel vaso interessato. A partire dalla loro nascita, verso la fine degli anni '80, gli stents coronarici hanno subito un notevole sviluppo tecnologico sia nel disegno, sia nella struttura e composizione. Con la loro evoluzione cresceva la deliverability (possibilità di portare e rilasciare con successo lo stent nel punto desiderato) e la loro sicurezza di utilizzo sia nel breve che nel lungo termine. Tuttavia il problema della restenosi coronarica permane, seppur ridimensionato, anche dopo l'utilizzo di uno stent per trattare la patologia di parete: l'incidenza della restenosi intrastent si attesta infatti attorno al 25%. Per fronteggiare questo evento l'industria medicale ha sviluppato quello che è fino ad oggi lo strumento locale anti-restenotico più efficace: lo stent medicato (DES – Drug Eluting Stent). Due principali devices sono stati approvati dall'FDA rispettivamente nel 2003 e 2004: il "Cypher" stent, ad opera di Cordis a rilascio di sirolimus, analogo della rapamicina, ed il "Taxus" stent di Boston Scientific, che rilascia invece paclitaxel, un derivato del taxolo.

Il “late lumen loss”, cioè la differenza tra il diametro luminale minimo del tratto interessato subito dopo l’impianto dello stent ed al follow-up è assolutamente favorevole nei confronti degli stents medicati (tra 0.17 ± 0.45 e 0.39 ± 0.5 mm circa, a seconda dello stent analizzato) rispetto ai tradizionali stents metallici (BMS – Bare Metal Stent; $0.8-1.1 \pm 0.6 - 0.92 \pm 0.58$ mm)³⁸ e questo fatto risulta in una minor incidenza della restenosi binaria (generalmente inferiore al 4% negli studi con DES). L’incidenza degli eventi avversi durante il follow-up è ridotta con l’utilizzo di questi nuovi devices, soprattutto grazie ad un significativo decremento delle TLR (Target Lesion Revascularization) e delle conseguenti ricorrenze ischemiche³⁹⁻⁴², ma non si è ancora dimostrata una differenza nell’incidenza di “hard end points” (mortalità ed infarto) tra i due gruppi di trattamento^{43,44}. A fronte di ciò va riportato come manchino tuttora dati definitivi sulla sicurezza a lungo termine degli stents a rilascio di farmaco, in particolare con riferimento alla possibilità dell’aumentata incidenza di trombosi intrastent tardive soprattutto in caso di interruzione precoce di una corretta terapia antiaggregante, eventi per la verità molto rari, ma dalle conseguenze spesso fatali⁴⁵⁻⁴⁷.

Posto il background infiammatorio dell’aterosclerosi in generale e della restenosi intrastent nello specifico e riconosciuta l’infiammazione stessa come un processo patologico sistemico, sarebbe di indubbio valore una terapia in grado di ridurre il substrato infiammatorio dopo l’esecuzione del trattamento percutaneo locale con impianto di stents, così da diminuire il rischio di restenosi intrastent e la progressione dell’aterosclerosi in siti diversi. Se tale terapia consentisse, nei pazienti adeguati, di evitare l’utilizzo di DES a favore dei più studiati BMS, si avrebbe un indubbio vantaggio in termini farmaco economici ed un probabile beneficio derivante dalla riduzione degli eventi tardivi inattesi che potrebbero derivare dall’utilizzo degli stents medicati o dall’inadeguata assunzione o efficacia della terapia antiaggregante.

Per saggiare la possibilità dell' utilizzo di una terapia che offra i vantaggi testè citati, la divisione di Cardiologia dell'Università di Verona ha condotto, come centro di riferimento, un trial clinico multicentrico randomizzato: il CEREAS-DES. Questo studio ha arruolato pazienti con cardiopatia ischemica nota sottoposti ad indagine coronarografica e suscettibili di trattamento percutaneo con angioplastica e stenting.

MATERIALI E METODI

Disegno dello studio:

Il trial "CEREAS-DES" e' disegnato come uno studio clinico prospettico multicentrico randomizzato in aperto di natura indipendente, realizzato senza finanziamenti ottenuti da industrie e comunque senza grant o scopo lucrativo alcuno da parte degli investigatori o delle loro strutture di afferenza.

Centri partecipanti allo studio:

Hanno arruolato attivamente e seguito attivamente pazienti nello studio clinico le seguenti strutture, dopo approvazione dei relativi comitati etici:

- Ospedale Civile Maggiore di Borgo Trento - Verona
- Ospedale Maggiore della Carità – Novara
- Istituto Clinico Humanitas – Milano
- Ospedale San Giovanni Bosco – Torino
- European Hospital – Roma

Principali criteri di inclusione:

- CAD accertata sia mono- che multivasale trattabile per via percutanea
- Vasi nativi o grafts, lesioni de novo o restenosi
- Lesioni determinanti stenosi luminale >50% nelle arterie coronarie epicardiche principali o nei loro rami di divisione più significativi
- Occlusioni croniche ricanalizzate con successo

Criteri di esclusione:

- Pazienti affetti da Diabete Mellito
- Età superiore ad 80 anni
- Infarto transmurale recente (< 2 settimane)
- Ipertensione severa e non controllata in terapia medica
- Ulcera gastrica o gastrite sintomatica
- Malattie Neoplastiche o infiammatorie croniche
- Insufficienza renale (creatinina > 2.5 mg/dl)
- Malattia del tronco comune o malattia tronco-equivalente
- Malattia coronarica travasale con coinvolgimento del tratto prossimale dei 3 vasi
- Controindicazioni all'uso di steroidi ad alte dosi (immunosoppressione, malattie infettive, osteoporosi, recente terapia steroidea ad alti dosaggi)
- Controindicazione all'utilizzo di doppia terapia antiaggregante per almeno 6 mesi

Numerosità del campione e gruppi di trattamento:

Lo studio CEREAS-DES ha arruolato complessivamente 375 pazienti suddivisi nei seguenti tre gruppi:

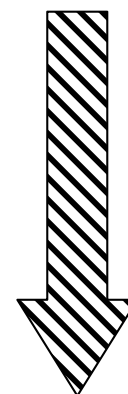
- Gruppo BMS (controllo): 125 pazienti trattati con impianto di stent metallico (BMS)

- Gruppo DES: 125 pazienti trattati con impianto di stent medicato (DES) Cypher o Taxus
- Gruppo BMS+Prednisone: 125 pazienti trattati con impianto di stent metallico (BMS) e terapia steroidea con prednisone, secondo lo schema dettagliato di seguito.

Protocollo di trattamento con prednisone:

Nel gruppo di pazienti randomizzati a BMS + terapia steroidea i soggetti hanno assunto un dosaggio immunosoppressivo del farmaco (circa 1 mg/kg/die) a partire dal giorno dell'angioplastica secondo il seguente schema generale:

- Per i pazienti > 80 kg Deltacortene Forte 25 mg 2 cp + 2 per 15 g: 1 mg/kg
- Per i pazienti < 80 kg Deltacortene Forte 25 mg 2 cp + 1 per 15 gg
- Deltacortene Forte 25 mg 1 cp + 1 per 15 gg: 0.5 mg/kg
- Deltacortene Forte 25 mg 1 cp per 10 gg: 0.25 mg/kg



Terapia medica concomitante:

Prima della procedura interventistica i pazienti dovevano assumere dosi standard di ASA (100-160 mg nel setting elettivo). La doppia terapia di antiaggregazione includeva una tienopiridina come la ticlopidina (500 mg/die da almeno 48 ore) o il clopidogrel (dose carico di 300 mg almeno 6 ore prima della PCI seguita da 75 mg/die per il mantenimento). Tale doppia antiaggregazione è stata mantenuta per un mese nei pazienti randomizzati a ricevere BMS, mentre per almeno 6 mesi in quelli trattati con DES, salvo diversa indicazione clinica. A tutti i pazienti era raccomandata l'assunzione di statine con i target raccomandati per la condizione clinica. L'eparina non frazionata veniva somministrata al momento della PCI, secondo le consuetudini del laboratorio (in genere con bolo di 70-100 UI/Kg). L'utilizzo degli inibitori del sistema glicoproteico GPIIb/IIIa (Tirofiban, Abciximab ed Eptifibatide) era consentito secondo il setting clinico con

strategia up- o downstream. Queste raccomandazioni generali erano comunque da considerare “on top” rispetto alla migliore terapia raccomandata dalle più recenti linee guida per il tipo di cardiopatia ischemica del paziente. Nei pazienti in terapia con prednisone si raccomandava anche l’assunzione di inibitori di pompa protonica e diuretici (possibilmente tiazidici al fine di evitare eccessiva perdita di ioni calcio) per limitare i più frequenti effetti collaterali di tale regime terapeutico (gastralgia e sanguinamenti gastrici, ritenzione idro-salina, demineralizzazione ossea).

Controlli e determinazioni biochimiche:

In tutti i pazienti arruolati nello studio sono state eseguite le determinazioni biochimiche riportate in tabella I, con il timing indicato. Ulteriori analisi sono state eseguite nel sottogruppo di soggetti inclusi nel sottostudio sull’attivazione monocitaria, come verrà in seguito dettagliato.

Prelievo Basale (Routine) <i>Prima della PCI</i>	Prelievo Post PCI <i>La mattina seguente</i>	Prelievo al Follow-Up <i>a 8-10 gg e 28-30 gg</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Emocromo completo con formula • Colesterolemia frazionata e trigliceridi • Creatinina • TnI e CK-MB • ALT, GGT 	<ul style="list-style-type: none"> • Emocromo completo con formula • HS-PCR • Fibrinogeno • ACE • Creatinina • TnI e CK- MB • ALT, GGT 	<ul style="list-style-type: none"> • Emocromo completo con formula • HS-PCR • Fibrinogeno • ACE • Creatinina • TnI e CK- MB • ALT, GGT

Tabella I – *Determinazioni biochimiche eseguite nello studio principale*

Il prelievo ad 8 giorni di follow-up è stato eseguito sui pazienti in terapia steroidea. Le determinazioni a 28-30 giorni sono state importanti anche per monitorizzare eventuali

effetti ematici avversi della terapia con tienopiridine o dell'interazione tienopiridina-prednisone.

Controlli Clinici e strumentali di Follow-Up:

Tutti i pazienti arruolati nello studio CEREAS-DES sono stati sottoposti alle seguenti visite ambulatoriali di follow-up:

- ad 1 mese dalla PCI
- a 6 mesi dalla PCI
- ad 1 anno dalla PCI
- a 3 anni dalla PCI (ongoing follow-up)

Il controllo clinico ad un mese ha avuto anche lo scopo di verificare l'effettiva adesione del paziente alla terapia prescritta, con particolare riferimento alla terapia con prednisone ed alla doppia terapia di antiaggregazione. Sono stati valutati gli esami a 28 gg per escludere i già citati effetti collaterali sulla crasi ematica possibilmente causati da tienopiridine e prednisone⁴⁸. Inoltre sono stati ricercati e possibilmente risolti gli effetti clinici avversi della terapia steroidea (disturbi gastrici, infezioni, ipertensione, ritenzione idro-salina, sanguinamenti) qualora non correttamente prevenuti dalle misure farmacologiche già descritte.

I controlli strumentali previsti erano i seguenti:

- ECG a 12 derivazioni ad ogni visita di follow-up
- Test da sforzo al cicloergometro o ricerca di ischemia mediante stress-imaging (ove appropriato) a circa 6 mesi dalla PCI
- Angiografia coronarica elettiva a 9-12 mesi dalla PCI con valutazione quantitativa nei pazienti consenzienti

Tutti i dati raccolti durante lo studio sia nel periodo di ospedalizzazione, sia durante i controlli di follow-up, sono stati archiviati su supporto elettronico a mezzo di Case

Report Form Elettroniche basate sull'interfaccia WEB e sono stati resi disponibili in rete per l'accesso sicuro da parte dei centri partecipanti all'arruolamento.

End Points

L'end point primario dello studio "CEREA-DES" è clinico, e cioè la sopravvivenza libera da MACES (Major Adverse Cardiovascular Events) a 12 mesi di follow-up, definiti come morte per causa cardiaca, infarto miocardico, insorgenza di angina e necessità di nuova rivascolarizzazione sui vasi trattati durante il follow-up. Scopo del lavoro è infatti il confronto tra il gruppo considerato di controllo (BMS) ed i 2 gruppi in trattamento anti restenotico (BMS + Prednisone o DES) per quanto riguarda questo end-point clinico composito.

La morte viene considerata come cardiaca salvo dimostrazione inequivoca di diversa causa. L'infarto periprocedurale è identificato come un aumento di oltre 3 volte il limite superiore di normalità dell'isoenzima MB della creatinafosfochinasi (CPK-MB), che avvenga tra le 6 e le 24 ore dopo l'intervento percutaneo. L'infarto spontaneo durante il follow-up viene definito come la comparsa di onde Q significative (almeno 0.4s di durata) in almeno 2 derivazioni contigue associato ad aumento di CPK-MB o, in assenza di modifiche elettrocardiografiche, ad un aumento isolato di CPK-MB di oltre 3 volte il limite superiore di normalità. La necessità di nuova rivascolarizzazione a carico della stessa lesione trattata (Target Lesion Revascularization – TLR) viene considerata come una procedura ripetuta all'interno dello stent o nei 5 millimetri prossimali e distali ad esso, per comparsa di una stenosi determinante riduzione di almeno il 50% del lume vascolare. La necessità di rivascolarizzazione a carico del vaso trattato invece (Target Vessel Revascularization – TVR) è stata considerata come una nuova procedura a carico del vaso trattato, ove sia comparsa una stenosi di almeno il 70% del lume vascolare. La conferma dell'ischemia funzionale nel caso di lesioni borderline in assenza di angina è

stata effettuata mediante stress-test, stress-imaging o metodica invasiva (riserva di flusso frazionato-FFR).

End points secondari sono principalmente tre e non sono oggetto di descrizione nell'ambito di questa tesi, in quanto la ricerca è tutt'ora in corso. Il primo è un'estensione temporale dell'end-point primario, e cioè il controllo dell'efficacia a lungo termine della terapia, valutando la sopravvivenza libera da eventi clinici fino a 3 anni di follow-up (follow-up attualmente ongoing). Il secondo di questi end-points è di natura farmaco-economica e valuterà il rapporto globale costo/beneficio delle strategie terapeutiche in studio. Ultimo end-point secondario è invece angiografico: verrà valutata la presenza di re-stenosi intra-stent definita come un late loss all'angiografia quantitativa ≥ 0.75 mm. Posti i late loss di BMS e DES sopra riportati e ed assunti late loss per la strategia BMS + prednisone tra 0.4 ± 0.04 e 0.61 ± 0.35 mm^{26,27,29}, un sottogruppo di 50 pazienti per braccio di trattamento può essere sufficiente per dimostrare eventuali differenze significative.

Sottostudio: Analisi dell'attivazione monocitaria

Sono stati inclusi nell'analisi 40 pazienti. Lo scopo di questa particolare ricerca è l'indagine del pattern di attivazione dei monociti circolanti nei pazienti sottoposti a stenting coronarico con BMS ed in quelli randomizzati a terapia steroidea nello studio principale. Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad angiografia coronarica quantitativa (QCA) con una nuova coronarografia di follow-up a 9-12 mesi dalla procedura indice: ciò ha permesso di valutare, in questo limitato campione, l'eventuale associazione tra riduzione dei mediatori infiammatori o di attivazione monocitaria e la proliferazione neointimale intrastent, dato correlabile allo sviluppo di restenosi.

Oltre ai prelievi già elencati in precedenza e previsti dal protocollo, in questi soggetti sono stati determinati il giorno dopo la coronarografia (prelievo basale) a 8 giorni dalla

procedura ed a 30 giorni anche IL-6, TNF- α e la forma nucleare attiva di NF- κ B, tipicamente l'eterodimero p65/p50. In tabella II sono riassunti i parametri misurati ed analizzati in questo sottostudio.

Prelievo Basale (il giorno dopo la PCI)	Prelievo a 8 giorni	Prelievo a 30 giorni
- Emocromo (leucociti)	- Emocromo (leucociti)	- Emocromo (leucociti)
- Hs-PCR		- Hs-PCR
- TNF- α	- TNF- α	- TNF- α
- IL-6	- IL-6	- IL-6
- NF- κ B p65/p50	- NF- κ B p65/p50	- NF- κ B p65/p50

Tabella II – Parametri biochimici e marcatori analizzati in questo studio

Il prelievo per IL-6, TNF- α ed NF- κ B veniva raccolto prelevando circa 40 cc di sangue venoso periferico in siringhe pre-eparinate e preso in carico per l'analisi da un tecnico di laboratorio dedicato a tale compito. Per eseguire questi dosaggi sono stati isolati pool adeguati di monociti periferici secondo le tecniche descritte nella seguente sezione. Tali cellule venivano saggiate per il rilascio di IL-6, TNF- α e l'attivazione di NF- κ B sia in assenza di stimolazione (monociti controllo) sia con l'aggiunta di lipopolisaccardi (LPS) o forbolo miristato acetato (PMA). Il protocollo prevedeva anche il dosaggio di IL-10 e l'esecuzione della prednisonemia (nei pazienti randomizzati a BMS+PREDNISONA), ma i dati sull'IL-10 sono stati ottenuti su pochi pazienti e non sono oggetto di descrizione in questa tesi. Tutti i pazienti venivano sottoposti a controllo clinico a 30 giorni dalla procedura, contestualmente al prelievo ematico.

Metodi di laboratorio

Isolamento dei monociti

I monociti periferici vengono isolati da 30-40 ml di sangue venoso eparinato con tecniche standard di precipitazione in destrano e successiva sedimentazione e centrifugazione (400 x g, 30 min, temperatura ambiente) in gradiente di densità (densità=1.077 g/cm³) in Ficoll-Paque. I monociti vengono poi recuperati dal centrifugato e sottoposti a duplice lavaggio con soluzione salina tamponata con fosfato e quindi risospesi in numero pari a $1-2 \times 10^7$ cell/ml in mezzo RPMI 1640 con aggiunta del 10% di siero fetale bovino inattivato a caldo, 2 mM di glutamina, 10 mM di HEPES, 50 µg/ml di streptomicina e 5 U/ml di penicillina. In questo modo si assicura una vitalità cellulare >98%.⁴⁹ Le sospensioni cellulari sono quindi incubate in piastre da coltura (diametro 35 mm, Costar, UK) a volumi di 100 µl e lasciate aderire per 90 minuti a 37 gradi centigradi in atmosfera umidificata contenente il 5% di CO₂ per isolare i monociti purificati. Le cellule non aderenti (principalmente linfociti) vengono quindi scartate.

Stimolazione dei monociti isolati

I monociti così ottenuti, in numero approssimativo di $0.5 - 1 \times 10^6$ cellule, sono sottoposti a stimolazione per 24 ore con concentrazioni standard di PMA (forbolo 12-miristato 13-acetato) oppure LPS (lipopolisaccaride derivato da Salmonella Typhimurium) per valutare il rilascio di TNF- α e l'attivazione di NF- κ B. Esperimenti preliminari con curve dose-risposta hanno dimostrato che le concentrazioni adeguate di PMA sono dell'ordine del 10^{-7} M, e di 100 ng/ml per quanto riguarda LPS, per ottenere la massima stimolazione monocitaria alla produzione di TNF- α . Il supernatante di questa incubazione viene quindi prelevato e conservato a -80 °C fino al momento dell'analisi. Per l'analisi riguardante l'attivazione di NF κ B, le concentrazioni utilizzate per la stimolazione erano di 10^{-6} M e 500 ng/ml rispettivamente per PMA e LPS, con utilizzo di

un maggior numero di monociti ($5-10 \times 10^6$ cellule) incubati per 1 ora. Tests quantitativi di tipo ELISA per le subunità p50 e p65/RelA o la frazione citosolica vengono quindi eseguiti rispettivamente sugli estratti nucleari e citoplasmatici.

Preparazione delle frazioni citoplasmatica e nucleare

Le cellule isolate e stimulate vengono raccolte in presenza di fosfato-inibitori per limitare possibili modificazioni proteiche e sono quindi ri-sospese in un buffer ipotonico per rigonfiare la membrana cellulare e renderla fragile, cosicchè le proteine citoplasmatiche passino nel supernatante dopo l'aggiunta di detergente. In questo modo si può raccogliere la frazione citoplasmatica e passare quindi alla lisi dei nuclei. Le proteine nucleari vengono quindi separate dalle frazioni rimanenti per centrifugazione in presenza di inibitori delle proteasi. Prima di ulteriori analisi la concentrazione proteica degli estratti ottenuti viene misurata con kit commerciali per l'analisi proteica quantitativa.

Misurazione delle citochine: TNF- α ed IL-6

La misurazione del TNF- α nei campioni saggati viene eseguita con un kit ELISA commerciale (Pelikine Kompakt human TNF- α ELISA kit) secondo il protocollo suggerito dal produttore. La minima concentrazione rilevabile dichiarata con questo test è di 1.4 pg/ml. Non esistono problemi di cross-reattività con le altre citochine conosciute. Il risultato finale dell'esperimento, espresso in picogrammi per millilitro, si ricava sottraendo il valore di controllo ottenuto dall'analisi con il medesimo kit su monociti non stimolati e per successiva media dei dati ottenuti da molteplici determinazioni sugli stessi campioni. Test sostanzialmente analoghi sono stati adottati per il dosaggio di IL-6 (kit commerciali ELISA).

Misurazione delle subunità nucleari di NFκB

Gli estratti nucleari ottenuti secondo il metodo descritto, vengono sottoposti ad analisi immunoenzimatica mediante il kit Trans-AMκ NF-κB p50 e NF-κB p65 (Active Motif Europe) per la ricerca delle subunità p50 e p65/RelA. Il lisato nucleare viene incubato in piastre pretrattate con un oligonucleotide contenente la sequenza di consensus per NFκB (5V-GGGACTTTCC-3V), che lega specificamente le già citate subunità dell'NFκB attivato. L'analisi in spettrofotometria a 450 nm viene quindi usata per saggiare le attività di p50 e p65/RelA.

Analisi coronarica quantitativa (QCA)

L'analisi angiografica quantitativa delle arterie coronariche (Quantitative Coronary Analysis, QCA) è una metodica che consente di ottenere informazioni quantitative sui vasi coronarici e le lesioni ateromasiche riscontrate. Tra i 9 ed i 12 mesi dalla procedura indice, la gran parte dei pazienti arruolati nello studio CEREAS-DES (>85%) hanno effettuato un nuovo controllo mediante coronarografia per verificare l'efficacia a medio termine dei presidi utilizzati. Le immagini angiografiche utilizzate per l'analisi, che si basa su un sistema computerizzato dotato di software dedicato certificato, sono quelle ottenute al momento della manovra diagnostica (basali), subito dopo lo stenting (post-procedurali) ed al momento del follow-up angiografico. L'analisi è stata effettuata presso un core-laboratory centralizzato, come da protocollo⁵⁰. Per i 40 pazienti inclusi nel sottostudio sull'attivazione monocitaria i dati QCA sono già disponibili. I dati ottenibili si dividono in parametri misurati e parametri calcolati. I parametri misurati principali sono i diametri di riferimento del vaso nei segmenti distale e prossimale alla lesione: da questi valori è ottenibile per interpolazione il cosiddetto Interpolated Reference Diameter (IRD), cioè il diametro di riferimento teorico del vaso nel sito di stenosi. Misure dirette della severità della lesione sono il diametro luminale minimo (MLD) e la

percentuale di stenosi, calcolabile come rapporto percentuale di MLD e IRD. Con metodica analoga si possono misurare anche le lunghezze ed i diametri degli stent impiantati nelle immagini post-procedurali. L'Acute Gain è definito come il guadagno, espresso in millimetri, del diametro vascolare dopo lo stenting, e cioè la differenza tra MLD post-procedurale ed MLD basale. Infine il Late Lumen Loss è la differenza tra MLD post-procedurale ed MLD nella lesione target al follow-up. Questo parametro è espressione della proliferazione neointimale intrastent ed è stato valutato in passato dai maggiori trial come dato di efficacia anti-restenotica. Per eseguire l'analisi è stato utilizzato il software commerciale CAAS versione 5 su piattaforma windows (Pie Medical Imaging, Olanda).

I risultati del follow-up angiografico dell'intero studio CEREAS-DES sono in fase di elaborazione e saranno oggetto di prossima pubblicazione.

Metodologia statistica

I dati continui sono stati espressi come media \pm 1 deviazione standard, a meno che non deviassero significativamente dalla gaussiana nel qual caso venivano utilizzati mediana e range interquartile. Le variabili categoriche sono riportate come numero e percentuale. L'omogeneità dei dati basali e di quelli procedurali e relativi alla terapia medica è stata saggiata con l'utilizzo di test multi-comparativi. Il test di Brandt-Snedecor è stato utilizzato per le variabili categoriche e l'analisi della varianza (ANOVA con la correzione di Bonferroni) è stata impiegata per i dati continui. Così, ogni variabile dei due gruppi trattamenti è stata confrontata con il gruppo controllo (BMS), con la generazione di due livelli di significatività relativi ai confronti BMS-BMS+Prednisone (p1) e BMS-DES (p2).

Sono state generate le curve di Kaplan-Meier per la valutazione della sopravvivenza cumulativa libera dagli eventi inclusi nell'end-point primario. L'associazione tra ogni forma di trattamento e l'end-point primario a 12 mesi è stata saggiata mediante una regressione di Cox uni e multivariata.

L'incidenza degli eventi cardiaci maggiori inclusi nell'end-point primario è stata desunta dalla letteratura disponibile al momento della preparazione del protocollo di studio^{39-42, 51-53}. Per correggere la potenziale eterogeneità di follow-up, per gli studi che riportassero gli eventi in-hospital separatamente dal resto degli eventi^{39-41,51,52}, è stata calcolata una estrapolazione lineare per gli eventi post-dimissivi. Nel caso gli studi riportassero solo il tasso complessivo di eventi^{42,51,53,54} l'estrapolazione lineare era calcolata sulla base di questi dati. La media delle percentuali stimate di eventi a 12 mesi era quindi del 9.9% nei pazienti in trattamento DES e del 24% nei pazienti in trattamento BMS.

Inoltre da esperienze precedenti con il prednisone somministrato per via orale^{29,30,55,56} si è stimata una percentuale di eventi per il gruppo BMS+Prednisone simile a quella del gruppo DES. Sulla base di questi dati è stata calcolata la numerosità campionaria.

In base al calcolo un numero di pazienti pari a 118 per gruppo (BMS, DES, BMS+Prednisone) risultava sufficiente per ottenere una potenza statistica dell'80% nel rilevare differenze sull'end-point primario a 12 mesi di follow-up. Il numero di pazienti è stato incrementato a 125 pazienti per gruppo al fine di evitare incongruenze statistiche in caso di drop-out al follow-up.

Per l'analisi dei dati relativi al sottostudio sull'attivazione monocitaria sono stati utilizzati il Test T o le varianti non parametriche in base alla distribuzione delle variabili continue. Per valutare la relazione tra prednisonemia e riduzione del rilascio di citochine o attivazione di NF- κ B dal basale al giorno 10 (picco del dosaggio del prednisone), è

stata utilizzata l'analisi in regressione lineare. La stessa metodica è stata impiegata per saggiare la relazione tra TNF- α e proliferazione neointimale (late lumen loss).

Una probabilità di $p \leq 0.05$ veniva considerata come statisticamente significativa. Per l'analisi informatica dei valori sono stati utilizzati il programma SPSS per windows nella versione 15 ed il programma Microsoft Excel 2003.

RISULTATI

Arruolamento e caratteristiche dei pazienti

L'arruolamento dei pazienti nello studio clinico CEREAS-DES ha avuto una durata di circa due anni, realizzandosi tra il Settembre 2006 ed il Settembre 2008. Sono stati complessivamente arruolati 375 pazienti, come previsto, nei cinque centri italiani partecipanti; nel dettaglio sono stati arruolati 169 pz. a Verona, 46 pz. a Milano, 39 pz. a Novara, 88 pz. a Roma e 33 pz. a Torino. L'età media della popolazione in studio è risultata di 63.77 ± 9.43 anni con una prevalenza di soggetti di sesso maschile che rappresentavano circa l'85% dei pazienti.

Secondo il protocollo, la randomizzazione ha suddiviso i soggetti in tre gruppi da 125 pazienti ciascuno: gruppo BMS (gruppo controllo), gruppo BMS+Prednisone e gruppo DES. L'actual treatment di questi pazienti differiva di poco dal previsto: - Gruppo di randomizzazione BMS: un paziente non ha ricevuto alcuno stent per insuccesso procedurale, mentre altri due hanno invece ricevuto l'impianto di due DES per problematiche legate agli specifici casi.

- Gruppo di randomizzazione DES: tutti i pazienti hanno ricevuto il trattamento previsto.

- Gruppo di randomizzazione BMS+Prednisone: tre pazienti non hanno di fatto ricevuto il corretto trattamento con lo steroide, pur avendo ricevuto l'impianto di almeno un BMS. Di conseguenza il trattamento effettivo dei pazienti è stato così suddiviso: 125 pazienti per il gruppo BMS (-3, +3); 127 pazienti per il gruppo DES (+2); 122 pazienti per il gruppo BMS+Prednisone (-3). La figura 5 sottostante chiarifica il processo di arruolamento.

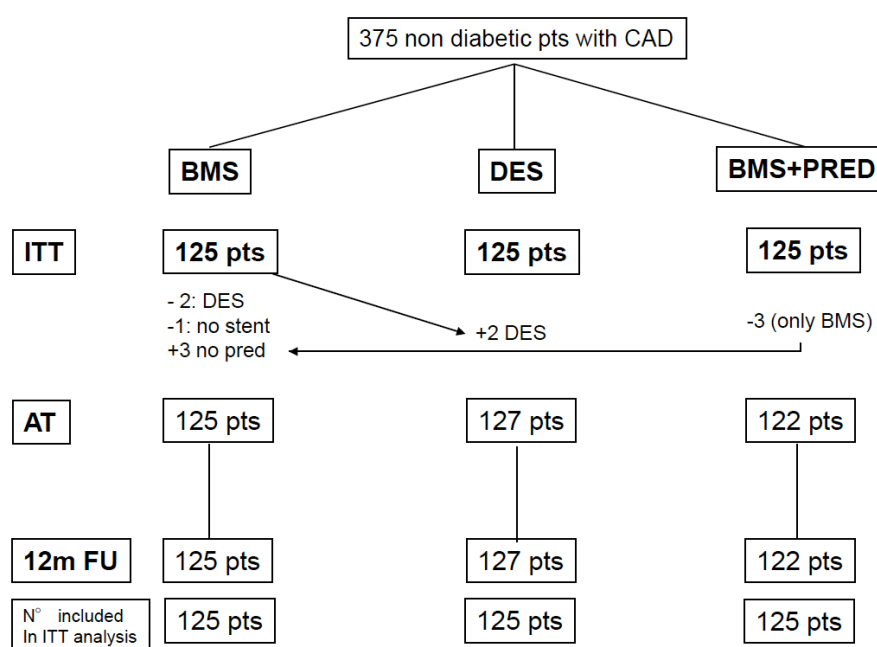


Figura 5: Arruolamento dei pazienti, bracci di randomizzazione e cross-over.

La tabella III riporta le caratteristiche basali dei pazienti suddivisi nei tre gruppi di arruolamento di natura clinica, biochimica ed angiografica. È stato utilizzato il test statistico di Brandt-Snedecor per confrontare ciascuno dei due gruppi in trattamento (DES e BMS+Prednisone) con il gruppo di controllo (BMS) ed i livelli di significatività, riportati in tabella nelle colonne P1 e P2, mostrano una sostanziale omogeneità dei parametri basali, come atteso dalla natura randomizzata dello studio.

	BMS n= 125	PRED. n= 125	DES n= 125	P1	P2
Clinical					
Male gender	102 (81.6%)	108 (86.4%)	109 (87.2%)	0.28	0.21
Age (years)	64.08 ±9.67	63.34±9.03	63.89±9.6	1	1
Body mass index	26.60±3.48	26.99±3.08	26.72±3.68	1	1
Family history of CAD	43 (34.4%)	58 (46.4%)	42 (33.6%)	0.05	0.89
Hypertension	84 (67.2%)	91 (72.8%)	84 (67.2%)	0.33	1
Smoking habit	85 (68.0%)	79 (63.2%)	78 (62.4%)	0.43	0.35
Dyslipidemia	79 (63.2%)	71 (56.8%)	78 (62.4%)	0.30	0.90
Previous MI	18 (14.4%)	28 (22.4%)	30 (24.0%)	0.11	0.05
Peripheral artery disease	8 (6.4%)	10 (8.0%)	7 (5.6%)	0.61	0.80
Previous CABG	13 (10.4%)	7 (5.6%)	9 (7.2%)	0.15	0.34
Previous PCI (>3m)	22 (17.6%)	18 (14.4%)	21 (16.8%)	0.49	0.86
Stable angina	37 (29.6%)	34 (27.2%)	37 (29.6%)	0.67	1
Silent ischemia	13 (10.4%)	13 (10.4%)	19 (15.2%)	1	0.24
Unstable angina	44 (35.2%)	44 (35.2%)	33 (26.4%)	1	0.13
NSTEMI	31 (24.8%)	34 (27.2%)	36 (28.8%)	0.67	0.47
LV ejection fraction	57±8	58±9	58±7	1	1
Biochemical					
Elevated CRP	59 (47%)	61 (49%)	64 (51%)	0.80	0.53
Positive Tn-I	23 (18.4%)	24 (19.2%)	20 (16%)	0.87	0.62
CPK-MB (ng/L)	27.58±61.46	17.31±47.97	16.59±28.31	0.22	0.11
Fibrinogen (UI/L)	405±115	397±92	388±107	1	0.94
Creatinine	0.98±0.19	0.97±0.18	1.02±0.22	0.99	0.47
Total cholesterol	190.30±47.04	183.83±38.66	187.62±44.13	0.78	0.99
GGT	38.59±33.15	33.86±30.43	44.14±58.88	0.99	0.99
Haemoglobin	13.59±1.48	13.74±1.28	13.80±1.37	0.72	1
White blood cells	6.91±2.05	6.98±2.48	6.82±2.39	1	1
Neutrophiles	4.62±1.46	4.89±2.24	4.52±1.52	1	1
Platelets	217.38±51.20	216.12±56.68	216.53±52.90	1	1
Angiographic					
N° of diseased vessels	1.53±0.71	1.54±0.69	1.66±0.73	1	0.47
Single-vessel disease	75 (60%)	71 (57%)	62 (50%)	0.10	0.10
Two-vessel disease	34 (27%)	40 (32%)	44 (35%)	0.61	0.17
Three-vessel disease	16 (13%)	14 (11%)	19 (15%)	0.41	0.57
Multi -vessel disease	50 (40%)	54 (43%)	63 (50%)	0.96	0.27
N° of treated lesions	178	192	190	0.71	0.64
LM	2 (2%)	0 (0%)	1 (1%)	0.06	0.20
LAD	73 (41%)	83 (43%)	82 (43%)	0.63	0.64
LCx	42 (23%)	52 (27%)	45 (24%)	0.42	0.96
RCA	51 (28%)	51 (27%)	58 (31%)	0.68	0.66
Coronary bypass grafts	10 (6%)	6 (3%)	4 (2%)	0.20	0.07
Type A	19 (11%)	15 (8%)	18 (9%)	0.35	0.70
Type B1	73 (40%)	75 (39%)	74 (39%)	0.73	0.72
Type B2	62 (35%)	73 (38%)	73 (38%)	0.50	0.45
Type C	25 (14%)	29 (15%)	25 (14%)	0.75	0.82
B2/C lesions	87 (49%)	102 (53%)	98 (52%)	0.38	0.57
CTO	5 (3%)	8 (4%)	3 (2%)	0.43	0.48
Thrombotic lesions	9 (5%)	19 (10%)	16 (19%)	0.08	0.22
Moderate calcification	40 (22%)	43 (22%)	32 (17%)	0.99	0.19
Severe calcification	6 (3%)	6 (3%)	3 (2%)	0.89	0.29
Restenotic lesions	2 (1%)	8 (4%)	8 (4%)	0.09	0.09

Tabella III: Caratteristiche basali dei pazienti arruolati. Abbreviazioni: MI=myocardial infarction; CABG=coronary artery bypass grafts; PCI=percutaneous coronary interventions; NSTEMI= non-ST elevation myocardial infarction; LV=left ventricle; CRP=C-reactive protein; Tn-I: troponin-I; CPKMB=cardiac-phosphocreatinekinase; GGT=gamma-glutamyl-transferase; LM=left main; LAD=left anterior descending; LCx=left circumflex; RCA=right coronary artery; CTO=chronic total occlusion.

In tabella IV sono invece riportati i parametri procedurali e post-procedurali relativi agli interventi coronarici nei tre gruppi di pazienti. Le significatività statistiche di confronto sono state ottenute mediante il medesimo test di Brandt-Snedecor. I pazienti inclusi nel gruppo BMS+Prednisone mostravano un diametro di riferimento vascolare misurato alla QCA tendenzialmente minore. Il fatto che, a fronte di lunghezze di lesione omogenee, i pazienti nel gruppo DES avessero una maggiore lunghezza media degli stent utilizzati non è sorprendente: infatti gli investigatori hanno raccomandato una diversa strategia per l'utilizzo dei devices. In particolare in caso di impianto di DES era raccomandato l'impianto di stent di lunghezza sufficiente a coprire completamente la lesione target, mentre per i BMS si consigliava di utilizzare la minima lunghezza necessaria ad ottenere un buon risultato. Questo in base alla diversa attesa di potenziale restenotico per i due tipi di device.

Anche le differenze nella conta leucocitaria sono tra le variazioni previste: in considerazione della precoce somministrazione della dose immunosoppressiva di steroide è infatti lecito attendersi un incremento dei leucociti e dei neutrofilo nelle ore successive alla procedura per il gruppo in trattamento. Similmente, la riduzione significativa dei livelli di fibrinogeno può essere spiegata dalla potente azione anti-infiammatoria del prednisone.

	BMS n=125 lesions=178	PRED. n=125 lesions=192	DES n=125 lesions=190	P1	P2
Procedural					
Mean lesion length (mm)	15.64±9.39	15.02±7.37	15.70±6.35	1	1
Reference diameter	3.18±0.56	3.01±0.51	3.07±0.41	0.03	0.32
N° of lesion treated per pt	1.42±0.71	1.54±0.67	1.52±0.56	0.71	0.64
Total N° of stent	191	200	196	1	1
N° of stent per pt	1.53±0.88	1.60±0.78	1.57±0.77	1	1
N° of stents per lesion	1.07±0.30	1.08±0.36	1.06±0.27	1	1
Mean stent length	16.79±4.85	16.08±4.88	18.45±5.30	0.80	0.03
Max in-stent diameter	3.20±0.49	3.05±0.51	3.07±0.40	0.04	0.08
Direct stenting	46 (26%)	46 (24%)	51 (27%)	0.70	0.80
Balloon only	4 (2%)	17 (9%)	7 (4%)	0.003	0.52
N° of BMS	191 (100%)	200 (100%)	0 (0%)	-	-
N° of Cypher stents	0 (0%)	0 (0%)	74 (38%)	-	-
N° of Taxus stents	0 (0%)	0 (0%)	122 (62%)	-	-
Complete anatomic revascularization	89 (71%)	93 (74%)	98 (78%)	0.56	0.19
Complete functional revascularization	24 (19%)	21 (17%)	16 (13%)	0.61	0.17
Incomplete revascularization	12 (10%)	11 (9%)	11 (9%)	0.83	0.83
Biochemical					
Positive Tn-I	33 (26%)	29 (23%)	36 (29%)	0.56	0.66
CPK-MB (ng/L)	10.63±11.76	9.92±8.49	12.06±18.94	1	1
Fibrinogen (UI/L)	429.77±111.69	356.80±125.6	418.19±85.16	<0.001	1
Creatinine	0.98±0.19	1.00±0.24	1.05±0.21	1	0.09
GGT	43.06±56.27	44.31±38.32	41.24±38.05	1	1
Haemoglobin	13.46±1.53	13.51±1.46	13.48±1.34	0.4	0.8
White blood cells	7.03±3.06	9.45±5.44	7.40±2.36	<0.001	1
Neutrophiles	5.15±1.90	8.48±4.33	5.00±1.77	<0.001	1
Platelets	221±58	238±68	217±68	0.51	1

Tabella IV: Caratteristiche procedurali e post-procedurali nei tre gruppi di trattamento.

Il trattamento medico al momento del ricovero, dopo la procedura di angioplastica e stenting ed ai follow-up di 6 e 12 mesi e' descritto in tabella V. Al basale, come atteso, non sono apprezzabili differenze significative in termini di terapia medica tra i tre gruppi di randomizzazione. Alla dimissione il maggior utilizzo di diuretici ed inibitori di pompa protonica nei pazienti trattati con steroide e' legato alla raccomandazione del loro utilizzo per la prevenzione dei piu' comuni effetti collaterali della terapia con prednisone, quali la dispepsia e la ritenzione idrica. Analoga considerazione e' applicabile al maggiore utilizzo dei sartanici, per il controllo della possibile ipertensione steroide-indotta. A sei e dodici mesi la doppia terapia antiaggregante piastrinica con aspirina ed una tienopiridina e' significativamente maggiore nei pazienti con impianto di DES per la

necessita' di prevenzione della trombosi intrastent che richiede, solitamente, 12 mesi di tale terapia dopo l'impianto di uno stent medicato mentre si limita ad un mese dopo l'impianto di uno stent metallico. Degno di nota il dato sulla terapia medica alla dimissione, che prevedeva l'utilizzo di statine nel 90% circa e di ACE-inibitori o sartanici nel 91% circa dei pazienti.

	BMS n=125	PRED. n=125	DES n=125	P1	P2
Before PCI					
Aspirin	119 (95%)	120 (96%)	123 (98%)	0.73	0.16
Ticlopidine	14 (11%)	17 (14%)	17 (14%)	0.57	0.57
Clopidogrel	103 (82%)	95 (76%)	98 (78%)	0.21	0.44
GP IIb/IIIa inhibitors	23 (18%)	18 (14%)	21 (17%)	0.39	0.73
LMWH	32 (26%)	28 (22%)	28 (22%)	0.55	0.55
Unfractionated heparin	107 (86%)	109 (87%)	114 (91%)	0.70	0.17
Statins	81 (65%)	91 (73%)	90 (72%)	0.16	0.21
At discharge					
Aspirin	120 (96%)	120 (96%)	123(98%)	0.8	0.9
Thienopyridines	122 (98%)	125 (100%)	124(99%)	0.9	0.9
Nitrates	48 (38%)	38 (30%)	49 (39%)	0.19	0.89
CCB	26 (21%)	32 (26%)	15 (12%)	0.33	0.08
ACE-inhibitors	75 (60%)	64 (51%)	83 (66%)	0.15	0.30
ARBs	19 (15%)	36 (29%)	15 (12%)	0.006	0.51
Beta blockers	83 (66%)	89 (71%)	94 (75%)	0.40	0.12
Statins	110 (88%)	116 (93%)	110 (88%)	0.21	1
Diuretics	14 (11%)	92 (74%)	20 (16%)	<0.001	0.42
PPI	80 (64.0%)	113 (90%)	95 (76%)	<0.001	0.02
Antiplatelet at 6m					
Aspirin	119 (95%)	117 (94%)	123 (98%)	0.53	0.21
Thienopyridines	67 (54%)	59 (47%)	117(94%)	0.28	<0.001
Dual antiplatelet	63 (50%)	51 (41%)	116 (93%)	0.12	<0.001
At 12m					
Aspirin	105 (84%)	111 (89%)	114 (91%)	0.24	0.08
Thienopyridines	28 (22%)	25 (20%)	83 (66%)	0.69	<0.001
Nitrates	28 (22%)	20 (16%)	35 (28%)	0.22	0.28
CCB	21 (17%)	30 (24%)	20 (16%)	0.14	0.87
ACE-inhibitors	59 (47%)	62 (50%)	73 (58%)	0.70	0.08
ARBs	17 (14%)	26 (21%)	19 (15%)	0.13	0.73
Beta blockers	73 (58%)	76 (61%)	87 (70%)	0.69	0.07
Statins	103 (82%)	95 (76%)	110 (88%)	0.19	0.24
Diuretics	19 (15%)	36 (29%)	22 (18%)	0.008	0.64
PPI	66 (53%)	66 (53%)	76 (61%)	1	0.20
Dual antiplatelet	28 (22.4%)	25 (20%)	54 (43.2%)	0.61	0.001

Tabella V: Trattamento medico pre e post-procedurale. Abbreviazioni: ACE=angiotensin-II converting enzyme; ARB=angiotensin-II receptor blockers; CCB=calcium-channels blockers; LMWH= low molecular-weight heparin; m=months; PCI= percutaneous coronary intervention; PPI=proton pump inhibitors.

Eventi clinici

La tabella VI mostra gli eventi clinici dettagliati a 30 giorni ed un anno di follow-up, conteggiati come singolo evento piu' importante per paziente (hierarchical) o come conteggio complessivo (cumulative). Durante la degenza ed a 30 giorni non si e' verificato alcun decesso. A 30 giorni si sono verificati 1 infarto con comparsa di onde q (QWMI) nel gruppo BMS e 2 infarti senza comparsa di onde q (NQWMI) distribuiti nei gruppi BMS e DES. Solo un paziente ha dovuto subire una TVR in assenza di infarto, ed apparteneva al gruppo BMS.

Ad un anno di follow-up si sono verificati due decessi, concentrati nel gruppo BMS. E' interessante notare che, come atteso, il gruppo DES ha avuto il minor numero di TLR al follow-up. Tale differenza raggiunge la significativita' statistica nei confronti del gruppo BMS (2.1 vs 7.3%, $p=0.01$). Anche il gruppo BMS+Prednisone ha mostrato meno incidenza di TLR, ma la differenza con il gruppo BMS non era statisticamente significativa (4.7 vs 7.3%, $p=NS$). Un ulteriore interessante rilievo consiste nel riscontro di una tendenziale minor TVR nei pazienti trattati con steroide rispetto ai pazienti randomizzati negli altri due gruppi: tale osservazione potrebbe trovare giustificazione nel potenziale effetto inibitorio sulla progressione aterosclerotica imputabile ad una terapia anti-infiammatoria sistemica, vantaggio non condiviso da presidi locali quali BMS e DES.

	BMS n=125	PRED. n=125	DES n=125	P1	P2
30-days (hierarchical)	125	125	125		
Cardiac death	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	-	-
QWMI*	1 (0.8%)	0 (0%)	0 (0%)	0.22	0.22
NQWMI	1 (0.8%)	0 (0%)	1 (0.8%)	0.38	1
TVR*	1 (0.8%)	0 (0%)	0 (0%)	0.22	0.22
1-year hierarchical	125	125	125		
All death	1 (0.8%)	0 (0%)	0 (0%)	0.22	0.22
Cardiac death	1 (0.8%)	0 (0%)	0 (0%)	0.22	0.22
QWMI	2 (1.6%)	0 (0%)	0 (0%)	0.08	0.08
NQWMI	2 (1.6%)	1 (0.8%)	1 (0.8%)	0.54	0.54
TVR	19 (15.2%)	14 (11.2%)	13 (10.4%)	0.24	0.18
TLR	13 (7.3%)	9 (4.7%)	4 (2.1%)	0.23	0.01
Non-TVR	4 (3.3%)	0 (0%)	5 (4%)	0.09	0.67
1-year cumulative	125	125	125		
All death	1 (0.8%)	0 (0%)	0 (0%)	0.22	0.22
Cardiac death	1 (0.8%)	0 (0%)	0 (0%)	0.22	0.22
QWMI	2 (1.6%)	0 (0%)	0 (0%)	0.08	0.08
NQWMI	2 (1.6%)	1 (0.8%)	1 (0.8%)	0.54	0.54
TLR	15 (12%)	10 (8%)	4 (3.2%)	0.23	0.009
TVR	22 (17.6%)	15 (12%)	14 (11.2%)	0.19	0.14
Non-TVR	5 (4%)	3 (2.4%)	8 (6.6%)	0.53	0.34

Tabella VI: Dettaglio degli eventi clinici a 30 giorni ed un anno di follow-up. Abbreviazioni: NQWMI= non Q-waves myocardial infarction; Pred: prednisone; QWMI= Q-wave myocardial infarction; TLR=target lesion revascularization; TVR=target vessel revascularization. *Eventi ascrivibili a trombosi subacuta intrastent.

End Point Primario

L'end point primario, cioè la sopravvivenza libera da MACES come definiti in precedenza, è stato significativamente maggiore nei pazienti arruolati a trattamento (DES o BMS+Prednisone), rispetto a quelli randomizzati nel gruppo di controllo (BMS). Le curve di sopravvivenza cumulativa sono graficate in figura 6 e mostrano una sopravvivenza libera da MACES ad un anno dell'88.8% nel gruppo DES e dell'88% nel gruppo BMS+Prednisone, contro l'80.8% del gruppo di controllo (rispettivamente HR: 0.388; 95% CI: 0.197–0.764, p=0.006 e HR: 0.505; 95% CI: 0.260–0.981, p=0.04). All'analisi per-protocol la differenza in termini di endpoint primario si rafforza ulteriormente (gruppo DES HR: 0.375; 95% CI: 0.192-0.764, p=0.004 - gruppo BMS+Prednisone HR: 0.455; 95% CI: 0.232-0.839, p=0.02).

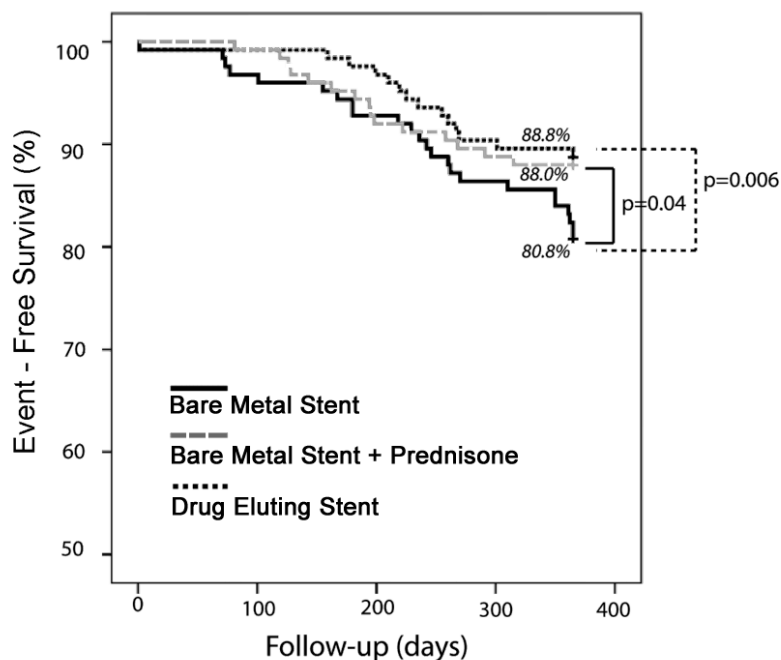


Figura 6: Curve di sopravvivenza cumulativa secondo Kaplan-Meier per l'END-point primario nei gruppi di trattamento. Il livello di Significativita' si riferisce al modello in regressione di Cox previsto dal protocollo di studio.

Le tabelle VII e VIII riportano rispettivamente i principali risultati dell'analisi univariata ed il modello multivariato impiegato, entrambi in regressione di Cox.

Parametro	Chi-Square	p	Hazard Ratio
Sesso	0.94	0.33	1.404
Età	0.24	0.62	1.007
Fumo attivo	5.19	0.02	1.853
Malattia periferica	0.75	0.39	0.698
Pregresso Bypass AO-CO	0.01	0.94	0.960
Pregressa PCI	0.38	0.58	0.820
Pregresso infarto miocardico	0.09	0.77	1.090
Hs-PCR elevata	0.01	0.93	0.970
Troponina I elevata	1.77	0.18	1.766
SCA alla diagnosi	4.90	0.03	1.826
Creatinina	1.55	0.21	2.250
Leucociti	6.15	0.01	0.830
Frazione di eiezione	1.92	0.16	0.980
N. di vasi malati	1.91	0.16	1.287
Uso di Beta-bloccanti	0.27	0.87	1.050
Uso di ACE-I/Sartani	0.18	0.67	0.866
Uso di Statine	0.09	0.76	0.867
Body Mass Index	1.32	0.25	1.045
Lunghezza stent	3.62	0.06	1.050
Diametro stent	9.93	0.002	0.387
Gruppo di trattamento	3.87	0.1	0.613

Tabella VII: Principali risultati dell'analisi univariata. In evidenza i parametri con livello di significatività $\leq 10\%$, impiegati nel modello multivariato.

Covariate	p	Odds Ratio	95%CI
Fumo attivo	0.04	1.784	1.030 – 3.088
SCA alla diagnosi	0.02	1.885	1.091 – 3.256
Lunghezza stent	0.01	1.066	1.013 – 1.121
Diametro stent	<0.001	0.297	0.153 – 0.578
Gruppo di trattamento	0.01		
DES	0.006	0.388	0.197 – 0.764
BMS+Prednisone	0.04	0.505	0.260 – 0.981

Tabella VIII: Il modello multivariato in regressione di Cox utilizzato.

Dal momento che il razionale per l'utilizzo della terapia steroidea risulta piu' evidente nei pazienti con infiammazione attivata abbiamo condotto una sotto-indagine nel gruppo di soggetti (n=186; 49.6%) che presentava una proteina C reattiva (PCR) elevata, determinata con metodica ad alta sensibilita' (cutoff: 3 mg/L). In questo sottogruppo di pazienti in realta' l'incidenza di eventi maggiori era significativamente minore per coloro che assumevano lo steroide (8%, n=61) rispetto ai pazienti trattati con DES (14%, n=64) e BMS (23%, n=61). I confronti tra gruppi di trattamento e controlli risultavano significativi solo per i pazienti in terapia steroidea (BMS vs DES p=0.2; BMS vs BMS+Prednisone p=0.03). Il vantaggio appariva completamente perduto nei pazienti con HS-PCR nei limiti. Questi dati sono rappresentati graficamente nella figura 7a per i pazienti con HS-PCR in range e 7b per quelli con HS-PCR elevata. Interessante notare come, in questo stesso sottogruppo di pazienti con HS-PCR elevata il dato sulla rivascularizzazione in siti diversi dalla lesione colpevole (TVR e non-TVR) mostrava una differenza significativa di eventi tra i pazienti trattati con prednisone (3.3%) ed i pazienti trattati con DES (12.5%, p=0.05). In questo caso il gruppo di controllo si attestava su un' incidenza di TVR+non-TVR dell'8.2% ad un anno.

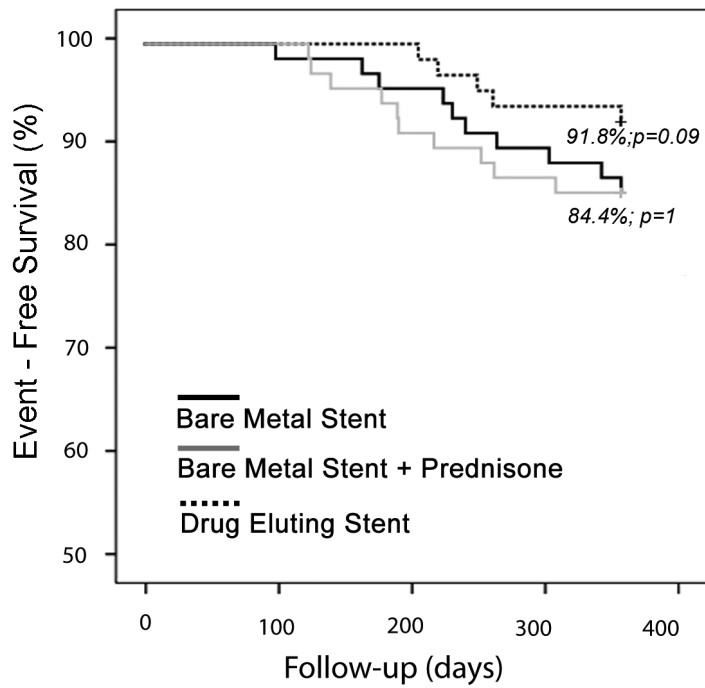
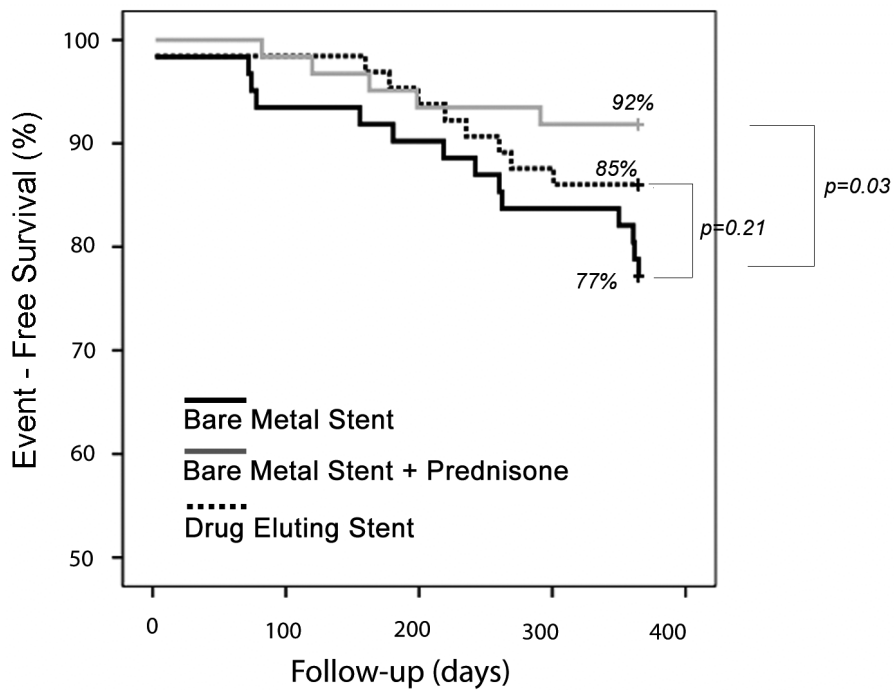
a**b**

Figura 7: Sopravvivenza cumulativa libera da eventi inclusi nell'End-Point primario. Analisi per sottogruppi di pazienti con HS-PCR normale (a) o elevata (b).

Effetti collaterali nel gruppo in trattamento steroideo

In 19 pazienti del gruppo BMS+Prednisone (15%) sono stati segnalati alcuni effetti indesiderati ascrivibili all'utilizzo del prednisone. Tali effetti collaterali sono peraltro stati quasi tutti di lieve entità e rappresentati prevalentemente da ritenzione idrica moderata con qualche caso di edema facciale (7%) ed iperglicemia transitoria (5%). In ogni caso, tutti i pazienti hanno potuto completare la fase di terapia steroidea a dosaggio immunosoppressivo, cioè quella cruciale per l'effetto anti-restenotico. Il dettaglio degli eventi si trova nella sottostante tabella IX.

Effetto collaterale	N (%)
Edema	9/125-7,2%
Iperglicemia	6/125-4,8%
Leucocitosi e febbre	2/125- 1,6%
Neutropenia	1/125-0,8%
Agitazione psicomotoria	1/125-0,8%

Tabella IX: Effetti indesiderati nel gruppo BMS+Prednisone espressi come numero e percentuale.

Sottostudio sull'attivazione monocitaria

Pazienti

Nel sottostudio riguardante l'attivazione monocitaria sono stati inclusi 40 pazienti, egualmente divisi tra i gruppi BMS (n=29) e BMS+Prednisone (n=20), con età media di circa 64 anni ed in prevalenza di sesso maschile. Non vi era differenza in termini di presentazione clinica, fattori di rischio e parametri biochimici basali nei due gruppi. Al follow-up di 30 giorni non vi era alterazione significativa dei livelli di HS-PCR nei pazienti nel gruppo BMS, mentre la riduzione era chiara in quelli trattati con il prednisone, pur essendo i livelli sierici molto differenti nei vari soggetti (3.88 vs 0.87

mg/L, $p=0.02$). In termini di conta leucocitaria, come atteso, il prelievo effettuato a 30 giorni quando il prednisone era somministrato al dosaggio più basso metteva in evidenza solo un lieve aumento nei pazienti in gruppo trattamento. Questi dati sono dettagliati in tabella X.

Controllo della prednisonemia

Al fine di aumentare la correttezza metodologica e confermare l'effettiva assunzione dello steroide abbiamo dosato la prednisonemia ed i livelli di cortisolo endogeno a diversi tempi di follow-up in 15 pazienti appartenenti al gruppo in trattamento ed in 5 volontari sani, con una metodica descritta in precedenza⁵⁷, lievemente modificata. Nei pazienti in terapia a 10 giorni dall'inizio del trattamento, e cioè al massimo dosaggio immunosoppressivo, i livelli di prednisone e cortisolo endogeno erano rispettivamente di 21.21 ± 10.78 ng/ml e 32.06 ± 36.97 nmol/l, mentre a 30 giorni risultavano di 18.9 ± 16.74 ng/ml e 25.74 ± 12.83 nmol/l. Questi risultati sono comparabili con i dati, peraltro scarsi, rinvenibili in letteratura⁵⁸. Come atteso inoltre, nei soggetti con livelli inferiori di prednisonemia il dosaggio di cortisolo endogeno era maggiore, e viceversa. Nei cinque volontari sani arruolati come controllo, mentre il prednisone non risultava dosabile, la nostra metodica riportava i seguenti risultati per il cortisolo endogeno: 277.23 ± 101.66 nmol/l.

	BMS (n=20)	BMS+PREDNISONE (n=20)	p
Fattori di rischio			
Età (anni)	64.5 ± 6.8	63.6 ± 10.8	NS
Sesso maschile (n - %)	15 (75%)	16 (80%)	NS
Familiarità per CAD (n - %)	9 (45%)	10 (50%)	NS
Ipertensione (n - %)	14 (70%)	16 (80%)	NS
Fumo (n - %)	12 (60%)	16 (80%)	NS
Ipercolesterolemia (n - %)	12 (60%)	15 (75%)	NS
Pregressa CAD (n - %)	8 (40%)	10 (50%)	NS
Presentazione clinica			
Ischemia silente (n - %)	2 (10%)	3 (15%)	NS
Angina stabile (n - %)	4 (20%)	5 (25%)	NS
Angina instabile (n - %)	10 (50%)	9 (45%)	NS
NSTEMI (n - %)	4 (20%)	3 (15%)	NS
IMA Progresso (n - %)	2 (10%)	3 (15%)	NS
Frazione di eiezione (%)	50.3 ± 18.9	47.6 ± 22.8	NS
Terapia prima della PCI			
Aspirina (n - %)	20 (100%)	20 (100%)	NS
Tienopiridine (n - %)	20 (100%)	20 (100%)	NS
ACE-inibitori (n - %)	18 (90%)	16 (80%)	NS
Sartani (n - %)	2 (10%)	4 (20%)	NS
Calcio antagonisti (n - %)	5 (25%)	6 (30%)	NS
Statine (n - %)	17 (85%)	18 (90%)	NS
Beta-bloccanti (n - %)	12 (60%)	13 (65%)	NS
Dati biochimici			
Leucociti al basale (cellx10 ³)	7.6 ± 1.14	8.87 ± 3.24	NS
Leucociti a 30 gg (cellx10 ³)	9.15 ± 4.03	10.51 ± 6.40	NS
Emoglobina (g/dl)	13.7 ± 1.4	14.3 ± 1.1	NS
HS-PCR al basale (mg/L)	3.22 ± 4.35	3.44 ± 3.52	NS
HS-PCR a 30 giorni (mg/L)	3.88 ± 3.57	0.87 ± 19.95	0.02
Fibrinogeno (mg/dl)	439.6 ± 80.6	433.5 ± 89.6	NS
Gamma-GT (U/L)	45.9 ± 47.9	50.4 ± 40.3	NS
GPT (U/L)	20.3 ± 12.4	22.5 ± 14.1	NS
Creatinina (mg/dl)	0.90 ± 0.24	0.75 ± 0.41	NS
Colesterolo totale (mg/dl)	184.7 ± 43.41	180.11 ± 57.31	NS
Colesterolo LDL (mg/dl)	126.32 ± 32.61	125.46 ± 35.14	NS
Colesterolo HDL (mg/dl)	48.65 ± 13.89	45.86 ± 14.31	NS
Troponina-I positiva (n - %)	5 (25%)	4 (20%)	NS

Tabella X: Caratteristiche cliniche e biochimiche della popolazione arruolata nel sottostudio sull'attivazione monocitaria (n=40).

Citochine e mediatori infiammatori

La figura 8 rappresenta graficamente il rilascio di IL-6, TNF- α ed NF- κ B dai monociti isolati non stimolati e stimolati con LPS o PMA. Le rilevazioni, come da protocollo, sono state effettuate prima della coronarografia (basale) ed a 10 e 30 giorni dalla procedura. Si può notare come non vi siano differenze basali significative tra i gruppi di trattamento, mentre il rilascio di citochine (IL-6 e TNF- α) decresce a 10 e 30 giorni in entrambi i gruppi. Ciò testimonia la riduzione della risposta infiammatoria nel tempo, ma assume differenze statisticamente significative nei due gruppi al follow-up, essendo la diminuzione dei livelli citochinici prodotti più marcata nei pazienti in terapia steroidea (Fig. 8 a-f).

Le differenze nello stato di attivazione della via di segnalazione mediata da NF- κ B sono state saggiate, come detto, attraverso l'analisi della traslocazione nucleare della subunità p-50 dell'eterodimero. Anche in questo caso non si sono riscontrate differenze basali tra i gruppi e la presenza di subunità p50 nel nucleo tendeva a decrescere nel tempo (Fig. 8 g-i). Similmente a quanto avveniva per le citochine, anche nel caso di NF- κ B le differenze a 30 giorni erano statisticamente significative, essendo più bassi i livelli della subunità p-50 nei pazienti trattati con prednisone, espressione di un minor stato di attivazione monocitaria, per lo meno attraverso questa importante via di segnalazione.

La sottostante tabella XI riporta il dettaglio dei dosaggi di citochine ed NF- κ B ottenuti dai monociti isolati non stimolati e con i due agenti stimolanti (LPS e PMA) ai diversi tempi di prelievo.

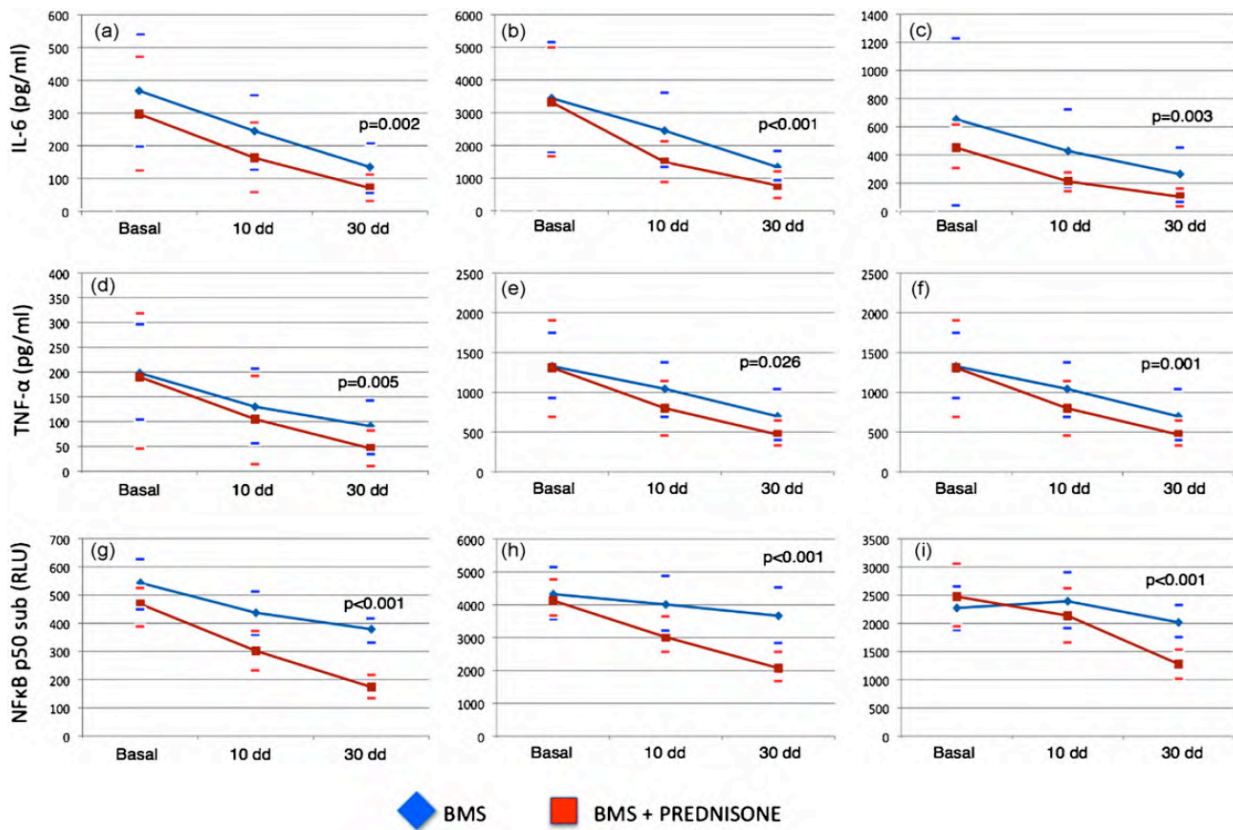


Figura 8: Valutazione della risposta infiammatoria nei monociti dei pazienti afferenti ai gruppi BMS e BMS+Prednisone. Il rilascio di IL-6 (a–c) e TNF- α (d–f), e la traslocazione nucleare della subunità p50 di NF- κ B (g–i) sono stati valutati nel tempo (al basale, a 10 e 30 dopo la procedura coronarica) in isolati monocitari non stimolati (a, d, g) stimolati con LPS (b, e, h) o stimolati con PMA (c, f, i) nei due gruppi di trattamento. I dati sono rappresentati come media \pm deviazione standard. I livelli di significatività si riferiscono alle differenze a 30 giorni tra i gruppi.

	BMS (n=20)	BMS+PRED (n=20)	p
IL-6 Controllo basale (pg/ml)	368± 168	297 ± 172	NS
IL-6 LPS basale (pg/ml)	3446 ± 1722	3325 ± 1670	NS
IL-6 PMA basale (pg/ml)	653 ± 613	452 ± 190	NS
IL-6 Controllo 10 giorni (pg/ml)	245 ± 113	163 ± 106	0.044
IL-6 LPS 10 giorni (pg/ml)	2454 ± 1109	1494 ± 610	0.004
IL-6 PMA 10 giorni (pg/ml)	428 ± 274	212 ± 64	0.003
IL-6 Controllo 30 giorni (pg/ml)	135 ± 70	71 ± 35	0.002
IL-6 LPS 30 giorni (pg/ml)	1341 ± 408	779 ± 406	<0.001
IL-6 PMA 30 giorni (pg/ml)	264 ± 190	103 ± 58	0.003
TNF- α Controllo basale (pg/ml)	198 ± 97	190 ± 147	NS
TNF- α LPS basale (pg/ml)	1328± 405	1309 ± 620	NS
TNF- α PMA basale (pg/ml)	540 ± 268	420 ± 256	NS
TNF- α Controllo 10 giorni (pg/ml)	130 ± 77	105 ± 88	NS
TNF- α LPS 10 giorni (pg/ml)	1043 ± 369	800 ± 330	0.05
TNF- α PMA 10 giorni (pg/ml)	406 ± 198	235 ± 182	0.013
TNF- α Controllo 30 giorni (pg/ml)	91 ± 50	46 ± 35	0.005
TNF- α LPS 30 giorni (pg/ml)	698 ± 343	469 ± 213	0.026
TNF- α PMA 30 giorni (pg/ml)	333 ± 158	143 ± 127	0.001
NF- κ B Controllo basale (RLU)	543 ± 85	468 ± 85	NS (0.07)
NF- κ B LPS basale (RLU)	4324 ± 804	4129 ± 612	NS
NF- κ B PMA basale (RLU)	2273 ± 382	2475 ± 557	NS
NF- κ B Controllo 10 giorni (RLU)	437 ± 68	302 ± 67	<0.001
NF- κ B LPS 10 giorni (RLU)	4010 ± 905	3016 ± 527	0.008
NF- κ B PMA 10 giorni (RLU)	2393 ± 486	2137 ± 487	NS
NF- κ B Controllo 30 giorni (RLU)	379 ± 48	174 ± 40	<0.001
NF- κ B LPS 30 giorni (RLU)	3665 ± 785	2073 ± 478	<0.001
NF- κ B PMA 30 giorni (RLU)	2018± 232	1279 ± 259	<0.001

Tabella XI: Dettaglio dei dosaggi di IL-6, TNF- α ed NF- κ B/p50 nucleare nei due gruppi di trattamento da monociti non stimolati e stimolati con PMA o LPS.

Analisi angiografica quantitativa ed inferenze sulla restenosi

Nei pazienti inclusi in questo sottogruppo abbiamo effettuato l'analisi angiografica quantitativa (QCA) su immagini adeguate ottenute in tre diversi momenti: all'esame diagnostico, subito dopo lo stenting ed infine ad un follow-up medio di 10 ± 1.8 mesi dalla procedura indice. La tabella XII riporta nel dettaglio i parametri rilevati e calcolati

secondo le definizioni accettate dalla comunità scientifica internazionale. La sezione dei metodi descrive le definizioni dei vari parametri utilizzati.

QCA	BMS (n=20)	BMS+PREDNISONE(n=20)	<i>p</i>
Valori basali			
Lunghezza lesione (mm)	16.57 ± 8.15	14.44 ± 7.75	NS
IRD (mm)	3.46 ± 0.50	2.56 ± 0.51	NS
MLD (mm)	0.62 ± 0.66	0.68 ± 0.35	NS
DS% (%)	80.85 ± 17.41	75.27 ± 9.85	NS
Valori post-PCI			
Lunghezza stent (mm)	18.42 ± 6.18	17.40 ± 6.78	NS
MLD (mm)	2.97 ± 0.44	2.37 ± 0.38	NS
DS% (%)	11.42 ± 9.76	10.83 ± 7.76	NS
Acute Gain (mm)	2.37 ± 0.59	1.69 ± 0.42	NS
Valori al follow-up			
MLD (mm)	2.11 ± 0.72	2.09 ± 0.69	NS
DS% (%)	40.98 ± 12.99	19.74 ± 23.29	0.03
Late Loss (mm)	0.80 ± 0.53	0.44 ± 0.35	0.02

Tabella XII: Parametri QCA al basale, dopo PCI ed al follow-up. IRD=Interpolated Reference Diameter; MLD=Minimum Lumen Diameter; DS%=Diameter Stenosis%;

Si nota una sostanziale omogeneità nei valori basali e post-procedurali dei parametri QCA, particolarmente per quanto riguarda diametro luminale minimo e lunghezza di lesioni e stent utilizzati. Appaiono invece statisticamente differenti i valori di stenosi luminale percentuale (40.98±12.99% vs 19.74±23.29%, $p = 0.03$) e late loss (0.80±0.53mm vs 0.44±0.35mm, $p = 0.02$) al follow-up angiografico. Questo dato si inserisce nel quadro generale della ricerca come una potenziale conferma, seppur su un numero molto limitato di pazienti, dell'efficacia antiproliferativa della terapia steroidea che si potrebbe tradurre sul piano clinico in un minor numero di eventi cardiaci legati alla restenosi intrastent.

La figura 9 a-c illustra le relazioni in regressione lineare tra i livelli di prednisonemia ed il rilascio di IL-6, TNF- α e l'attivazione di NF- κ B, nei pazienti del gruppo in trattamento sottoposti alla sua determinazione come descritto in precedenza ed nel periodo di massimo dosaggio del farmaco. Nello specifico, livelli crescenti di prednisone correlano con una maggior riduzione del rilascio di IL-6 ($R^2 = 0.45$, $p = 0.04$), TNF- α ($R^2=0.69$, $p=0.005$) ed NF- κ B/p50 ($R^2=0.58$, $p=0.01$). La figura 9d illustra invece una simile relazione anche tra i livelli di TNF- α e l'attivazione di NF- κ B ($R^2 = 0.56$, $p = 0.01$), mentre per IL-6 l'associazione risultava meno forte.

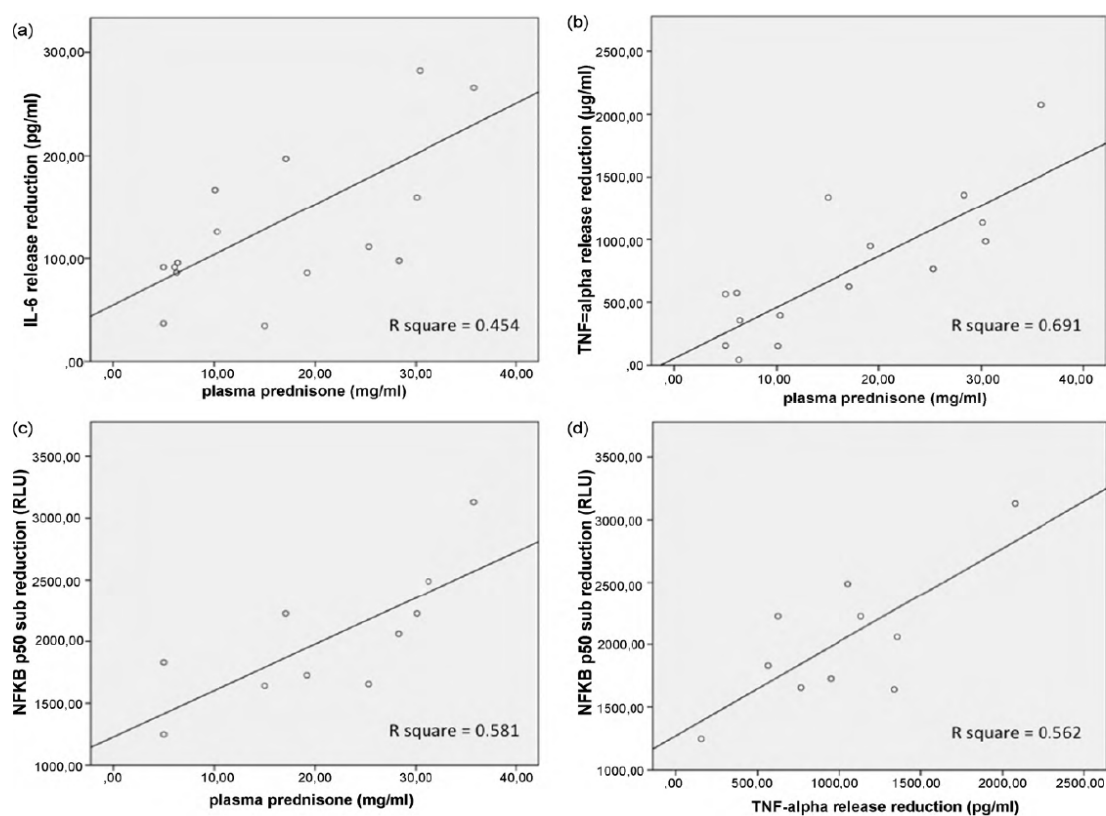


Figura 9: Regressione lineare: i livelli plasmatici di prednisone a 10 giorni correlavano con la riduzione di IL-6 (a), TNF- α (b) and subunità NF- κ B/p50 nucleare (c) in monociti stimolati (LPS) in 10 pazienti appartenenti al gruppo BMS+ prednisone. (d) Mostra la relazione tra riduzione di TNF- α e l'attivazione di NF- κ B. Ogni cerchio rappresenta un singolo paziente. Sono riportati i coefficienti di determinazione.

Un'ultima osservazione molto interessante è rappresentata dalla relazione tra la riduzione dei livelli di TNF- α ed il late lumen loss nel gruppo di pazienti di questo sottostudio (n=40), che risulta essere significativa ($R^2=0.41$, $p=0.01$), come graficato in figura 10. Il dato suggerisce un possibile diretto effetto della terapia anti-infiammatoria sulla proliferazione neointimale e, conseguentemente, sulla probabilità dello sviluppo di restenosi significativa.

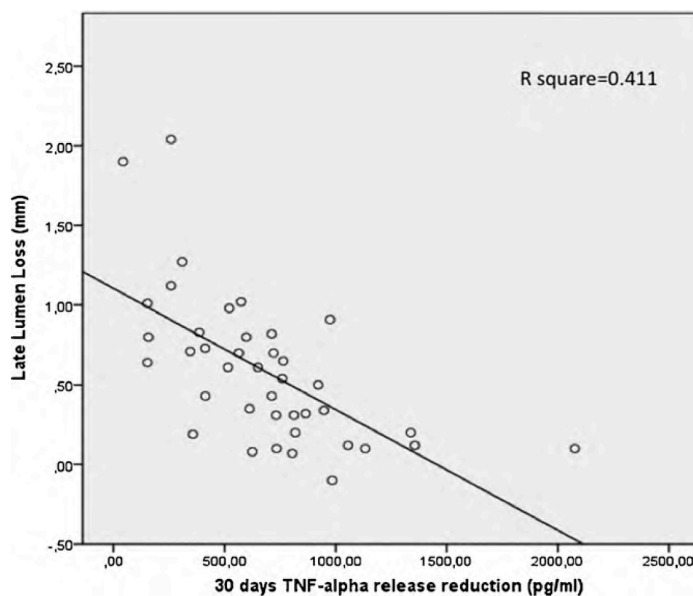


Figura 10: Regressione lineare: il rilascio di TNF- α in monociti stimolati (LPS) sembra correlare con l'entità del late lumen loss (LLL) al controllo angiografico di follow-up.

DISCUSSIONE

Lo studio clinico multicentrico randomizzato controllato “CEREA-DES” ha mostrato come l’utilizzo di stent a rilascio di Sirolimus (Cypher) o Paclitaxel (Taxus) ed il trattamento con alte dosi di Prednisone dopo impianto di stent metallici, assieme ad una terapia medica ottimale, ha determinato una riduzione del 40% circa in termini di eventi avversi maggiori di origine cardiaca rispetto al solo utilizzo della terapia medica e l’impianto di stent metallici. Una prima considerazione può riguardare l’incidenza globale degli eventi che è, in questa esperienza, relativamente bassa (14%). In particolare, mentre l’incidenza degli eventi rilevati nei pazienti randomizzati ai gruppi di trattamento era paragonabile all’atteso, i pazienti inclusi nel gruppo di controllo mostravano un event-rate minore (19% contro un atteso del 24%). Non si sono verificati casi di trombosi intrastent tardiva o molto tardiva, mentre due pazienti ha avuto una trombosi subacuta nel gruppo BMS. Da quanto sopra esposto non possiamo che confermare l’efficacia dei DES di prima generazione (Cypher e Taxus), per lo meno ad un anno di follow-up, nel contesto di uno studio clinico non sponsorizzato. Inoltre i risultati ottenuti supportano il razionale dell’utilizzo della terapia steroidea sistemica per la prevenzione della restenosi in pazienti non diabetici.

In questo studio i pazienti con BMS hanno ottenuto ottimi risultati, come detto, in termini di eventi clinici rispetto alle precedenti casistiche disponibili in letteratura. Quest’osservazione potrebbe essere legata all’impegno di tutti gli investigatori dello studio nell’osservazione dei migliori standard procedurali e terapeutici: in particolare nell’impianto di BMS sono state utilizzati i migliori stent disponibili nelle strutture di arruolamento con le minime lunghezze possibili, assieme ai massimi diametri adatti alle dimensioni vascolari. Il miglioramento negli anni delle tecnologie produttive dei BMS, ha indotto una progressiva riduzione dello spessore delle maglie metalliche, noto

parametro inducente dell'iperplasia neointimale: è probabile che l'utilizzo di BMS con spessore delle maglie più sottili possa aver avuto un ruolo effettivo nella riduzione degli eventi clinici ⁵⁹. Allo stesso modo, l'utilizzo di terapia medica ottimale è, nel presente studio, superiore a quello rinvenibile in studi simili pubblicati in precedenza. In effetti, alcune evidenze focalizzano l'interesse sull'efficacia della terapia medica nei pazienti ischemici, in particolare nelle forme stabili ⁶⁰. La mancanza di dati circa la terapia medica somministrata al follow-up in diversi studi pregressi ^{39-51,53,54}, potrebbe essere quindi un aspetto sottostimato nell'interpretazione dei risultati clinici di queste ricerche.

Rispetto ai lavori precedenti che hanno utilizzato il prednisone dopo l'impianto di BMS, lo studio "CEREA-DES" conferma l'efficacia, la sicurezza, le limitazioni e la riproducibilità dei risultati di questo trattamento steroideo in pazienti non diabetici. In particolare, l'analisi per sottogruppi dimostra, come razionalmente atteso, una maggior efficacia del trattamento nei pazienti con evidenza di attivazione dell'infiammazione in termini di hs-PCR elevata. Tale considerazione è interessante e conferma quanto emerso dagli studi IMPRESS ^{28-30,56}, anche se il presente trial non è adeguatamente dimensionato per questa analisi di sottogruppo e, di conseguenza, tale interpretazione appare attualmente speculativa. D'altro canto è noto come la risposta individuale ad interventi terapeutici farmacologici sia mediata da fattori genetici o caratteristiche biochimiche: a tale proposito anche farmaci di largo utilizzo nella terapia della cardiopatia ischemica, come le statine, hanno mostrato vantaggi maggiori dell'atteso sulla base della riduzione del colesterolo in sottogruppi di individui con proteina C-reattiva elevata, come nel largo studio randomizzato Jupiter ⁶¹.

Anche il nostro studio conferma la superiore efficacia dei DES nel ridurre la restenosi intrastent intesa come fenomeno localizzato, grazie alla loro potente azione anti-proliferativa sulla zona trattata. In effetti l'incidenza di TLR era minore nei pazienti randomizzati a DES, ed in modo particolare in coloro che ricevevano il trattamento di

multiple lesioni. Tuttavia, al follow up di 12 mesi, la necessità di nuova rivascularizzazione a livello del vaso trattato (TVR non-TLR) o in altre sedi vascolari (non-TVR) non differiva significativamente con quelle del gruppo in trattamento con BMS. Differentemente, i pazienti in terapia con prednisone hanno mostrato una tendenziale riduzione della necessità di rivascularizzazione su altri vasi o sul vaso responsabile al di fuori della lesione colpevole (non-TVR e TVR non-TLR). Questa osservazione suggerisce un potenziale effetto benefico sistemico della terapia steroidea, rispetto all'azione locale di BMS e DES. Prova del beneficio sistemico con riduzione del pattern infiammatorio e potenziale azione sul vaso della terapia steroidea deriva dal sottostudio sull'attivazione monocitaria presente in questo stesso lavoro, anche se tale ipotesi richiederà ulteriori conferme in futuro.

Un interrogativo importante riguarda la capacità di un ciclo breve di terapia steroidea, come quello utilizzato in questo studio, di migliorare l'evoluzione dell'aterosclerosi e la prognosi a lungo termine di questi pazienti. A tale proposito il follow-up a tre anni dello studio "CEREA-DES" è in fase di ultimazione.

Il sottostudio sull'attivazione monocitaria, pur non essendo in grado di fornire evidenze definitive sull'azione del prednisone nel contesto infiammatorio dei pazienti ischemici trattati con stenting coronarico, fornisce spunti speculativi sul possibile effetto anti-restenotico della modulazione dell'infiammazione e riporta il problema dal piano locale al piano sistemico. Dalla formazione della stria lipidica con accumulo di foam-cells, alla produzione di mediatori pro-infiammatori fino al rilascio di sostanze ossidanti e proteolitiche, i monociti/macrofagi sono tra i tipi cellulari maggiormente presenti nel sito di lesione e più studiati nel loro contribuire alla patogenesi della malattia aterosclerotica. E' noto come, in pazienti con malattia coronarica, specialmente in fase instabile, i monociti circolanti siano attivati⁶² e possano rimanerli anche a distanza di tempo dall'evento acuto⁶³. I monociti attivati sono in grado di produrre citochine che

mantengono ed amplificano la cascata infiammatoria, tra cui molto importanti sono TNF- α ed IL-6. La principale via di attivazione molecolare attraverso la quale i monociti esplicano l'azione infiammatoria è quella mediata dal fattore di trascrizione NF- κ B, a sua volta stimolata dall'azione paracrina delle citochine proinfiammatorie (come TNF- α , IL-1 ed IL-6), e potenzialmente inibita da alcune classi di farmaci, i più importanti ed efficaci dei quali sono i glucocorticoidi come il prednisone ed il dexametazone⁶⁴.

E' stato ampiamente descritto in precedenza come il complesso eterodimerico di NF- κ B attivato (costituito in prevalenza dalle isoforme p65/p50 liberate dall'inibizione esercitata dalle I κ B) sia in grado di migrare nel nucleo e stimolare l'espressione di geni della cascata infiammatoria, tra cui quelli delle citochine in analisi. Si è anche posta l'attenzione sui molteplici meccanismi attraverso i quali i glucocorticoidi sono in grado di inibire la pathway infiammatoria di NF- κ B e di inibire quindi la sintesi di TNF- α , IL-1 ed IL-6: ciò è stato in precedenza dimostrato anche in vitro analizzando pool monocitari stimolati sia con LPS che con PMA²¹. A proposito, è generalmente accettato che l'azione anti-infiammatoria dei glucocorticoidi sia principalmente dovuta proprio all'inibizione della sintesi citochinica NF- κ B mediata⁶⁵, cosicché il dosaggio di NF- κ B attivato, TNF- α ed IL-6 dovrebbe fornire informazioni appropriate sul pattern di attivazione del pool monocitario considerato.

Le concentrazioni plasmatiche di prednisone misurate nell'ambito di questo sottostudio si sono rivelate simili a quanto riportato precedentemente in studi di farmacocinetica⁵⁸. Il nostro esperimento suggerisce che le concentrazioni ottenute dalla somministrazione di prednisone secondo lo schema illustrato sono efficaci nel ridurre i dosaggi sierici di hs-PCR, la produzione IL-6, TNF- α e l'attivazione di NF- κ B da parte dei monociti circolanti. PCR, IL-6 e TNF- α sono mediatori importanti nel determinismo della restenosi e nella progressione dell'aterosclerosi: studi precedenti hanno messo in relazione l'insorgenza di restenosi coronarica e la over-espressione di questi fattori^{66,67, 68}.

Come detto poco sopra, hs-PCR misurata a 30 giorni è significativamente ridotta nei pazienti in trattamento con prednisone rispetto ai pazienti del gruppo di controllo. In un recente lavoro di Crea ed altri, si rileva l'azione della PCR sull'attivazione della via infiammatoria NF- κ B mediata nei monociti circolanti⁶³. E' noto inoltre come, sia in modelli animali che su monociti umani, la proteina C reattiva sia in grado di esplicare molteplici azioni pro-infiammatorie sia dirette che indirette, prima tra tutte l'aumento dell'attivazione di NF- κ B anche a dosaggi compatibili con quelli rilevati nel setting aterosclerotico^{69,70}. PCR può aumentare l'instabilità di placca attivando la via classica del complemento, stimolando la produzione di fattore tissutale pro-trombogeno, inducendo l'espressione endoteliale di MCP-1 ed altre adesine ed infine stimolando la produzione di AT-1, ET-1 ed IL-6⁶³. Quindi, l'utilizzo di una terapia anti-infiammatoria/immunosoppressiva, come il prednisone potrebbe esplicare effetti benefici sull'aterosclerosi nativa e la restenosi intrastent anche attraverso l'inibizione del rilascio di PCR.

Il nostro studio conferma che, nei pazienti trattati con BMS, la somministrazione orale di prednisone a dosaggio immunosoppressivo per un breve periodo inibisce il rilascio di citochine pro-infiammatorie dai monociti attivati in maniera significativamente più rapida rispetto a quanto avviene nei pazienti non trattati. In particolare, si è visto che il TNF- α si riduce drasticamente dopo somministrazione di corticosteroidi, specialmente nei monociti stimolati con PMA, che potrebbe riflettere l'utilizzo di vie di segnalazione intracellulare parzialmente differenti rispetto a quelle indotte da LPS⁶⁴. La via trasduttiva mediata dal fattore di trascrizione NF- κ B riveste un ruolo fondamentale nella progressione dell'aterosclerosi e la sua attivazione porta ad un incremento di produzione delle principali citochine pro-infiammatorie, tra cui IL-6 e TNF- α ^{63,64}. Nel nostro studio, abbiamo misurato la subunità p50 dell'eterodimero perché presente in maniera più cospicua rispetto alla subunità p65 e per gli studi che l'hanno già legata in precedenza

all'aterosclerosi umana ⁷¹. La riduzione più marcata a 30 giorni di p50 nei pazienti trattati con prednisone rispetto a quelli del gruppo BMS riflette la molteplicità dei meccanismi anti-infiammatori dei corticosteroidi, in larga parte attribuibile all'inibizione di NF-κB ^{21,22,72}. In questo lavoro si è confermata una correlazione positiva tra l'attivazione di NF-κB ed il rilascio di TNF-α, citochina che si è dimostrata tendenzialmente correlata ad una maggior proliferazione neointimale alla QCA nei pazienti indagati. Infatti TNF-α è probabilmente il più potente mediatore proliferativo rilasciato dai monociti attivati, e quindi uno dei più probabili obiettivi della terapia steroidea. L'inibizione, verosimilmente NF-κB mediata, della produzione di TNF-α e la conseguente riduzione dell'iperplasia neointimale espressa dal late lumen loss, supporta il razionale dell'inibizione dell'infiammazione nella prevenzione della restenosi dopo stenting coronarico.

Limiti dello studio

La principale limitazione del trial "CEREA-DES" è di carattere statistico: lo studio è stato disegnato come uno studio di superiorità che compara entrambi i gruppi di trattamento (BMS+Prednisone e DES) con un gruppo di controllo (BMS). In effetti la comparazione diretta dei tre gruppi sarebbe stata più utile ed interessante, ma avrebbe richiesto una dimensione campionaria non ipotizzabile nel contesto di uno studio clinico indipendente e non sponsorizzato.

Dal punto di vista clinico, la terapia con prednisone, ed in generale l'utilizzo di corticosteroidi a dosaggi elevati seppur per un periodo temporale limitato, ha richiesto un protocollo in aperto per la necessità di monitorare e prevenire i possibili effetti collaterali indotti dal farmaco.

Un nodo importante di non facile soluzione è la controindicazione all'immunosoppressione con l'utilizzo di steroidi in pazienti diabetici, che rappresentano effettivamente una fetta rilevante dei cardiopatici ischemici.

Commentando il sottostudio sull'attivazione monocitaria risulta evidente che la ridotta numerosità dei pazienti inclusi permette solo parzialmente di confermare le ipotesi avanzate e solleva l'esigenza di ulteriori studi di più ampio respiro. Inoltre in questo lavoro è stato indagato quello che ad oggi è il versante meglio conosciuto della via di attivazione monocitaria e, più in generale, infiammatoria nell'aterosclerosi coronarica. Rimane chiaro che la via dell NF- κ B non è l'unica a regolare l'infiammazione locale e sistemica in questi pazienti, e che IL-6, TNF- α e PCR ci forniscono solo un'immagine parziale, per quanto dettagliata, del network molecolare che regola questo complesso sistema.

CONCLUSIONI

Nel contesto di un trial clinico indipendente multicentrico, randomizzato e controllato si confermano i dati di efficacia e sicurezza dell'utilizzo di un ciclo limitato di terapia con prednisone a dosaggio immunosoppressivo nella prevenzione di eventi cardiaci maggiori in pazienti con cardiopatia ischemica sottoposti a stenting coronarico. Il vantaggio dell'utilizzo della terapia steroidea appare essere più evidente nei pazienti con infiammazione maggiormente attivata.

Gli stent medicati di prima generazione risultano sicuri ed efficaci, in linea con quanto fin'ora rinvenibile in letteratura, soprattutto per l'aspetto riguardante la riduzione della necessità di nuova rivascolarizzazione sulla lesione responsabile.

La prognosi dei pazienti trattati con stent metallici è migliorata rispetto ai dati storici in letteratura, verosimilmente grazie all'utilizzo di devices sempre migliori ed all'accorto impiego di tecniche procedurali e terapie mediche ottimizzate.

La terapia costicosteroidica secondo lo schema esposto si è dimostrata in grado di modulare efficacemente il pattern infiammatorio dei soggetti trattati riducendo i livelli sistemici di hs-PCR e determinando una maggior inibizione della produzione di IL-6 e TNF- α , verosimilmente attraverso la ridotta attivazione monocitaria mediata dalla via di NF- κ B.

La riduzione della liberazione di citochine pro-infiammatorie dai monociti attivati (prevalentemente TNF- α) sembra correlare con una riduzione della proliferazione neointimale al follow-up angiografico, confermando l'azione antirestenotica della terapia steroidea.

BIBLIOGRAFIA

- ¹ Libby P, Guo-Ping S; “Mast Cells as Mediators and Modulators of Atherogenesis”
Circulation. 2007;115:2471-2473
- ² Pesarini G, Amoruso A, Ferrero V et al “Cytokines release inhibition from activated monocytes, and reduction of in-stent neointimal growth in humans”; Atherosclerosis 2010; 211: 242–248
- ³ Camejo G, Hurt-Camejo E, Wiklund O, et al. “Association of apo B lipoproteins with arterial proteoglycans: Pathological significance and molecular basis”; Atherosclerosis 1998; 139: 205
- ⁴ Libby P. The vascular biology of atherosclerosis. Chapter in book: Braunwald’s Heart disease, 7th Edition, Elsevier-Saunders, Philadelphia 2005. Chapter 35: 921-93
- ⁵ Rong JX, Rangaswamy S, Shen L, et al. “Arterial injury by cholesterol oxidation products causes endothelial dysfunction and arterial wall cholesterol accumulation”
Atheroscler Thromb Vasc Biol 1998; 18:1885
- ⁶ Iiyama K, Hajra L, Iiyama M, et al. “Patterns of vascular cells adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion formation”; Circ Res 1999; 85:199
- ⁷ Ley K, Huo Y. “VCAM-1 is critical in atherosclerosis”; J Clin Invest 2001; 107:1209
- ⁸ Dong ZM, Chapman SM, Brown AA, et al. “The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis”; J Clin Invest 1998; 102:145
- ⁹ Gu L, Okada Y, Clinton S, et al “Absence of monocytes chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low-density lipoprotein deficient mice”; Mol Cell 1998; 2:275
- ¹⁰ Ravi M. Rao, Lin Yang, Guillermo Garcia-Cardena, Francis W. Luscinskas. “Endothelial-Dependent Mechanisms of Leukocyte Recruitment to the Vascular Wall”; Circ Res. 2007;101:234-247
- ¹¹ Gimbrone MA, Resnick N, et al. “Hemodynamics, endothelial gene expression and atherogenesis”; Ann N Y Acad Sci 1997; 811:1
- ¹² Sakaguchi H, Takeya M, Suzuki H, et al. “Role of macrophage scavenger receptors in diet-induced atherosclerosis in mice”; Lab Invest 1998; 78:423
- ¹³ Moulton KS, Heller E, Konerding MA, et al. ”Angiogenesis inhibitor endostatin or TNP-470 reduce intimal neovascularization and plaque growth in apolipoprotein E deficient mice”; Circulation 1999; 99:1726
- ¹⁴ Virmani R, Burke AP, Farb A, et al. “Pathology of the unstable plaque”; Prog Cardiovasc Dis 2002; 44:349
- ¹⁵ Morteza Naghavi, Peter Libby, Erling Falk, S. Ward Casscells, et al. “From Vulnerable Plaque to Vulnerable Patient: A Call for New Definitions and Risk Assessment Strategies: Part I”; Circulation 2003;108:1664-1672
- ¹⁶ Libby P. “Atherosclerosis: Disease Biology Affecting the Coronary Vasculature”; Am J Cardiol 2006;98[suppl]:3Q–9Q
- ¹⁷ Rioufol G, Finet G, Ginon I, Andre-Fouet X, Rossi R, Vialle E, Desjoyaux E, Convert G, Huret JF, Tabib A. “Multiple atherosclerotic plaque rupture in acute coronary syndrome: a three-vessel intravascular ultrasound study”; Circulation 2002;106:804–808.

- ¹⁸ Spagnoli LG, Bonanno E, Mauriello A, Palmieri G, Partenzi A, Sangiorgi G, Crea F. "Multicentric inflammation in epicardial coronary arteries of patients dying of acute myocardial infarction"; *J Am Coll Cardiol* 2002;40:1579–1588.
- ¹⁹ Neri Serneri GG, Boddi M, Modesti PA, Cecioni I, Coppo M, Papa ML, Toscano T, Marullo A, Chiavarelli M. "Immunomediated and ischemia-independent inflammation of coronary microvessels in unstable angina"; *Circ Res* 2003;92:1359–1366.
- ²⁰ Cao S, Zhang X, Edwards JP, Mosser DM; "NFKB1 (p50) Homodimers Differentially Regulate Pro- and Anti-inflammatory Cytokines in Macrophages"; *Journal of biological Chemistry* 2006; 281-36: 26041-26050
- ²¹ Almawi WY, Melemedjian OK; "Molecular mechanisms of glucocorticoids antiproliferative effects: antagonism of transcription factor activity by glucocorticoid receptor"; *Journal of Leukocyte Biology*, 2002;71: 9-15
- ²² Auphan N, Didonato J, et al. "Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NFkB activity by induction of IKB synthesis"; *Science* 1995; 270:286-289
- ²³ Ferrero V, Ribichini F, Pesarini G, Brunelleschi S, Vassanelli C. "Therapeutic potential of glucocorticoids in the prevention of restenosis after coronary angioplasty"; *Drugs* 2007; 67: 1243-55
- ²⁴ Pepine CJ, Hirshfeld JW, Macdonald RG et al. "A controlled trial of corticosteroids to prevent restenosis after coronary angioplasty". *Circulation* 1990; 81: 1753, 61
- ²⁵ Lee CW, Chae J, Lim H et al. "Prospective randomized trial of corticosteroids for the prevention of restenosis after coronary stents implantation"; *Am Heart J* 1999;138: 60-63
- ²⁶ Stone JW, Rutherford BD, McConahay DR, et al. "A randomised trial of corticosteroids in the prevention of restenosis in 102 patients undergoing repeat coronary angioplasty"; *Cathet Cardiovasc Diagn* 1989; 18: 227-31
- ²⁷ Frey FJ, Rueggsegger MK, Frey BM. "The dose-dependent systemic availability of prednisone: one reason for the reduced biological effect of alternate-day prednisone"; *Br J Clin Pharmacol* 1986; 21: 193-9
- ²⁸ Ferrero V, Ribichini F, Rognoni A et al. "Comparison of efficacy and safety of lower dose to higher dose oral prednisone after percutaneous coronary intervention: the IMPRESS-LD study"; *Am J Cardiol* 2007; 20(3): 209-213
- ²⁹ Versaci F, Gaspardone A, Tomai F, et al. "Immunosuppressive therapy for the prevention of restenosis after coronary artery stent implantation (IMPRESS Study)"; *J Am Coll Cardiol* 2002; 40: 1935-42
- ³⁰ Ribichini F, Tomai F, Ferrero V et al. "Immunosuppressive oral prednisone after percutaneous interventions in patients with multivessel coronary artery disease: the IMPRESS 2/MVD study"; *Eurointervention* 2005; 2:173-80
- ³¹ Lindenfeld JA, Miller GG, Shakar SF, et al.; "Drug therapy in the heart transplant recipient, part II: immunosuppressive drugs"; *Circulation* 2004; 110: 3858-65
- ³² Ribichini F, Ferrero V, Rognoni A et al. "Percutaneous treatment of coronary bifurcations: lesion preparation before provisional bare metal stenting and subsequent immunosuppression with oral prednisone"; *J Intervent Cardiol* 2007; 20: 114-21
- ³³ Liu X, Huang Y, Hanet C, et al. "Study of antirestenosis with the BiodivYsio dexamethasone-eluting stent (STRIDE): first-in human multicenter pilot trial"; *Catheter Cardiovasc Interv* 2003; 60: 172-8
- ³⁴ Hoffmann R, Langenberg R, Radke P, et al. "Evaluation of a high-dose dexamethasone-eluting stent"; *Am J Cardiol* 2004; 94: 193-5

- ³⁵ Hoffmann R, Radke PW, Ortlepp JR, et al. „Intravascular ultrasonic comparative analysis of degree of intimal hyperplasia produced by four different stents in the coronary arteries”; *Am J Cardiol* 2004; 94: 1548-50
- ³⁶ Ribichini F, Tomai F, Paloscia L et al. “Steroid-eluting stents in patients with acute coronary syndrome: the dexamethasone eluting stent Italian registry”; *Heart* 2007; 93(5):598-600
- ³⁷ Pesarini G, Ferrero V, Tomai F et al. “Steroid-eluting stents in patients with acute coronary syndromes. Angiographic results of DESIRE: Dexamethasone-Eluting Stent Italian Registry”; *J Invasive Cardiol.* 2009; 21(3):86-91.
- ³⁸ Mauri L, Orav J, Kuntz RE. “Late loss in lumen diameter and binary restenosis for drug-eluting stent comparisons”; *Circulation* 2005;111:3435-42
- ³⁹ Morice MC, Serruys PW, Sousa JE, et al. A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization. *N Engl J Med* 2002;346:1773-80
- ⁴⁰ Moses JW, Leon MB, Popma JJ, et al for the SIRIUS Investigators. Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in native coronary arteries. *N Engl J Med* 2003;349:1315-23
- ⁴¹ Stone GW, Ellis SG, Cox DA, et al for the TAXUS-IV Investigators. “A Polymer-based, Paclitaxel-eluting stent in patients with coronary artery disease”; *N Engl J Med* 2004;350:221-31
- ⁴² Morice MC, Colombo A, Meier B, Serruys P, Tamburino C, Guagliumi G, Sousa E, et al. “Sirolimus vs Paclitaxel-eluting stents in de novo coronary artery lesions. The reality trial: a randomized controlled trial”; *JAMA* 2006;295:895-904
- ⁴³ Babapulle MN, Joseph L, Belisle P, et al. “A hierarchical Bayesian meta-analysis of the randomized clinical trials of drug-eluting stents”; *Lancet* 2004;364:583-91
- ⁴⁴ Kastrati A, Dibra A, Erberle S, Mehilli J, Suarez de Lezo J, et al. “Sirolimus-eluting stents vs paclitaxel-eluting stents in patients with coronary artery disease : meta-analysis of randomized trials”; *JAMA* 2005; 294: 819-825
- ⁴⁵ Nordmann AJ, Briel M, Bucher HC. „Mortality in randomized controlled trials comparing drug-eluting stents vs. bare metal stents in coronary artery disease: a meta-analysis”; *Eur Heart J* 2006; 23:2784-814
- ⁴⁶ Lagerqvist B, James SK, Stenestrand U, et al. “Long-term outcomes with drug-eluting stents versus bare-metal stents in Sweden”; *N Engl J Med* 2007;356:1009-19
- ⁴⁷ Eisenstein EL, Anstrom KJ, Kong DF, Shaw LK, Tuttle RH, Mark DB, et al. “Clopidogrel use and long-term clinical outcomes after drug-eluting stent implantation”; *JAMA* 2007;297:159-68
- ⁴⁸ Ribichini F, Ferrero V, Feola M, Rognoni A, Brunelleschi S, Vacca G, Vassanelli C. “Neutropenia in patients treated with thienopyridines and high-dose oral prednisone after percutaneous coronary interventions”; *J Intervent Cardiol* 2007; 20: 209-13
- ⁴⁹ Brunelleschi, S., Penengo, L., Lavagno, L., Santoro, C., Colangelo, D., Viano, I., Gaudino, G. “Macrophage Stimulating Protein (MSP) evokes superoxide anion production by human macrophages of different origin”; *Br. J. Pharmacol.* 2001;134:1285–1295.
- ⁵⁰ Ribichini F, Tomai F, De Luca G, et al. ”A multicenter, randomized study to test immunosuppressive therapy with oral prednisone for the prevention of restenosis after percutaneous coronary interventions:cortisone plus BMS or DES versus BMS alone to eliminate restenosis (CEREA-DES) - study design and rationale”; *J Cardiovasc Med.* 2009;10:192-9
- ⁵¹ Schofer J, Schluter M, Gershilck AH, et al for the E-SIRIUS Investigators. “Sirolimus-eluting stents for the treatment of patients with long atherosclerotic lesions in small coronary arteries: a double-blind, randomised controlled trial (E-SIRIUS)”; *Lancet* 2003;362:1093-99

- ⁵² Windecker S, Remondino A, Eberli FR, et al. “Sirolimus-eluting and paclitaxel-eluting stents for coronary revascularization”; *N Engl J Med* 2005;353:653-62
- ⁵³ Kaiser C, Brunner-La Rocca HP, Buser PT, et al for the BASKET Investigators. “Incremental costeffectiveness of drug-eluting stents compared with a third-generation bare-metal stent in a real-world setting: randomised Basel Stent Kosten Effektivitäts Trial (BASKET)”; *Lancet*. 2005;366:921-9
- ⁵⁴ Pfisterer M, Brunner-La Rocca HP, Buser PT, et al for the BASKET-LATE Investigators. “Late clinical events after clopidogrel discontinuation may limit the benefit of drug-eluting stents”; *J Am CollCardiol* 2007; 48: 2584-91
- ⁵⁵ Ferrero V, Tomai F, Versaci F, et al. “Long-Term Results of Immunosuppressive Oral Prednisone After Coronary Angioplasty in Non-Diabetic Patients with Elevated C-Reactive Protein Levels”; *Eurointervention* 2009;5:250-4
- ⁵⁶ Ribichini F, Ferrero V, Rognoni A, et al. “Percutaneous treatment of coronary bifurcations: lesion preparation before provisional stenting and subsequent immunosuppression with oral prednisone. The IMPRESS-Y study”; *J Interv Cardiol* 2007;20:114-21
- ⁵⁷ Gai MN, Pinilla E, Paulos C, Chavez J, Puelles V, Arancibia A. “Determination of prednisolone and prednisone in plasma, whole blood, urine and bound to plasma proteins by high-performance liquid chromatography”; *J ChromatogrSci* 2005;43:201–6.
- ⁵⁸ Ferry JJ, Horvath AM, Bekersky I, Heath EC, Ryan CF, Colburn WA. “Relative and absolute bioavailability of prednisone and prednisolone after separate oral and intravenous doses”; *J Clin Pharmacol* 1988;28:81–7.
- ⁵⁹ Pache J, Kastrati A, Mehilli J, et al. “Intracoronary stenting and angiographic results: strut thickness effect on restenosis outcome (ISAR-STEREO-2) trial”; *J Am Coll Cardiol*. 2003;41:1283-8
- ⁶⁰ Boden WE, O'Rourke RA, Teo KK, et al. for the COURAGE Trial Research Group. “Optimal medical therapy with or without PCI for stable coronary disease”; *N Engl J Med*. 2007;356:1503-16
- ⁶¹ Ridker PM, Danielson E, Fonseca FA, et al. for the JUPITER Study Group. “Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein”; *N Engl J Med*. 2008;359:2195-207
- ⁶² Ritchie ME. “Nuclear factor kappa B is selectively and markedly activated in humans with unstable angina pectoris”; *Circulation* 1998; 98:1707-1713
- ⁶³ Liuzzo G, Crea F et al. “Persistent activation of Nuclear Factor Kappa-B signaling pathway in patients with unstable and elevated levels of C-reactive protein”; *J AM COLL CARDIOL*. 2007; 49:185-194
- ⁶⁴ Lavagno L, Gunella G, Bardelli,C, Spina S, Fresu LG, Viano I, Brunelleschi S; “Anti-inflammatory drugs and tumor necrosis factor- α production from monocytes: role of transcription factor NF-kB and implication for rheumatoid arthritis therapy”; *Europ. J. Phram.*2004; 501:199-208
- ⁶⁵ De Bosscher, K., Vanden Berghe, W., Haegeman, G.; “The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression”; *Endocr.Rev.* 2003; 24: 488– 522.
- ⁶⁶ Hojo Y, Ikeda U, Katsuki T, et al. ”Interleukin 6 expression in coronary circulation after coronary angioplasty as a risk factor for restenosis”; *Heart* 2000;84: 83–7.
- ⁶⁷ Szkodzinski J, Blazelonis A, Wilczek K, et al. “The role of interleukin-6 and transforming growth factor-beta1 in predicting restenosis within stented infarct-related artery”; *Int J Immunopathol Pharmacol* 2009;22:493–500.

- ⁶⁸ Murayama H, Takahashi M, Takamoto, et al. "Deficiency of tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma in bone marrow cells synergistically inhibits neointimal formation following vascular injury"; *Cardiovasc Res* 2008;80:175-80.
- ⁶⁹ Hattori Y, Matsumura M, Kasai K. "Vascular smooth muscle cell activation by C-reactive protein"; *Cardiovasc. Res*; 2003; 58:186-195
- ⁷⁰ Devaraj S, Kumaresan PR, Jialal I. "Effects of C-reactive protein on chemokine expression in human aortic endothelial cells"; *J Mol Cell Cardiol* 2004; 36:405-410
- ⁷¹ Brunelleschi S, Bardelli C, Amoruso A, et al. "Minor polar compounds in extravirgin olive oil extract (MPC-OOE) inhibits NF- κ B translocation in human monocyte/macrophages". *Pharmacol Res* 2007;56:542-9.
- ⁷² Amoruso A, Bardelli C, Gunella G, Ribichini F, Brunelleschi S. "A novel activity for substance P: stimulation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ in human monocytes and macrophages"; *Br J Pharmacol* 2008;154:144-52.