

UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ CLUJ-NAPOCA
ȘCOALA DOCTORALĂ DE MEDICINĂ VETERINARĂ

TEZA DE DOCTORAT

Nanoparticule biodegradabile încărcate cu polifenoli pentru eliberarea controlată dintr-un cateter intravenos cu balon

(Rezumat al tezei de doctorat)

Doctorand : **Crăciun Ioana**

Conducător de doctorat : **Prof. univ. dr. Gheorghe Florinel Brudașcă**



Rezumat

Boala arterelor periferice (PAB) este o boală aterosclerotică sistemică care afectează 202 de milioane de oameni din întreaga lume și peste 8 milioane de americani, fiind una din cele mai frecvente cauze de mortalitate în Statele Unite (Beckman et al., 2011, Patel et al., 2015, Jaff et al., 2010, Song et al., 2019).

În prezent, există o tranziție epidemiologică semnificativă la nivel global, iar bolile cardiovasculare aterosclerotice reprezintă o preocupare majoră. Conform cercetărilor efectuate de Fowkes și colaboratorii săi (2017) (Fowkes et al., 2017), această afecțiune este caracterizată prin obstrucția arterelor de la extremitățile inferioare prin depozite aterosclerotice, ceea ce poate duce la ocluzie și scăderea fluxului sanguin în acea zonă, limitând astfel mobilitatea și funcționalitatea. Această afecțiune este considerată a fi una dintre principalele boli cardiovasculare (Marrocco and Bush, 2010, Song et al., 2019). Claudicația intermitentă este simptomul cel mai întâlnit la pacienții cu boală arterială periferică (PAB), însă acest simptom este frecvent ignorat și nu este tratat corespunzător, ceea ce duce la o scădere a calității vieții și a capacității funcționale a pacienților, chiar și atunci când este asimptomatic (Konishi et al., 2019, Patel et al., 2015). Ischemia poate cauza amputarea membrelor în cazurile cele mai severe (Beckman et al., 2011, Jaff et al., 2010, Patel et al., 2015). Persoanele care suferă de boală arterială periferică prezintă un risc ridicat de a dezvolta infarct miocardic, accident vascular cerebral sau de a deceda din cauza unor probleme cardiovasculare.

În tratamentul bolii arteriale periferice la nivelul membrelor inferioare, se recomandă procedura de revascularizare care poate fi realizată prin intermediul unei metode endovasculare numită angioplastie. Această procedură implică dilatarea obstrucțiilor din artere cu ajutorul unui balon și, în unele cazuri, plasarea unui stent (Barrett et al., 2017, Norgren et al., 2007, Tendera et al., 2011, Urasawa et al., 2011). Angioplastia este o procedură medicală care constă în lărgirea mecanică a unui vas de sânge îngustat sau obstrucționat, care este cauzat de depozitele aterosclerotice (Analysis, 2010). Întrucât arterele periferice au un diametru mic, se preferă efectuarea angioplastiei cu balon în locul implantării de stenturi metalice (Thukkani and Kinlay, 2015).

Angioplastia cu balon permite întinderea lentă a vasului pentru a spori mărirea lumenului (Analysis, 2010). Din nefericire, angioplastia cu balon poate să provoace întinderea și tensiunea pe peretele vasului de sânge, iar leziunea produsă poate declanșa o serie de evenimente celulare care conduc la formarea unei noi leziuni (Dugas et al., 2019). Fenomenul de restenoză (reîngustare a vasului sanguin) după implantarea stentului continuă să fie un aspect important în practica clinică (Ali et al., 2019). Se consideră că restenoza precoce și dezvoltarea lentă a hiperplaziei miointimale în vasele de sânge stentate pot fi asociate cu leziuni profunde ale vaselor de sânge, care implică o fractură a lamelei elastice interne (Van Den Berg, 2017). Hiperplazia implică procese inflamatorii, migrația și diviziunea celulelor musculare netede, precum și acumularea de matrice extracelulară (Dugas et al., 2019, Goyal et al., 2012). Aceste procese contribuie la creșterea grosimii peretelui vasului de sânge, ceea ce poate conduce la obstrucția fluxului sanguin (Van Den Berg, 2017).

Protocoalele actuale pentru prevenirea și terapia restenozei după angioplastie sau stenting vascular se bazează pe eliberarea susținută a medicamentului antiproliferativ în peretele vasului de sânge (Werk et al., 2008). Baloanele acoperite cu medicamente (DCB) au apărut treptat în tratamentul bolii arteriale periferice (Cortese et al., 2016, Tepe et al., 2015,

Tepe et al., 2008, Werk et al., 2008) și a restenozei coronare in-stent (Doshi et al., 2019). Conceptul de DCB se bazează pe vindecarea rapidă a peretelui vasului datorită eliberării rapide a medicamentului. DCB-urile necesită trei elemente fundamentale: un balon de angioplastie semicompliant, un medicament anti proliferativ și un nou sistem de eliberare a substanței active (Doshi et al., 2019). DCB care eliberează agentul de chimioterapie paclitaxel a fost aprobat de FDA.

Paclitaxelul este un tratament lipofil care se leagă rapid și strâns de țesut, determinând absorbția și retenția rapidă la nivel celular la locul de administrare. Cu toate acestea, utilizarea paclitaxelului are dezavantaje majore, printre care se numără toxicitatea sistemică (Dugas et al., 2019; Marzullo et al., 2009), eliberarea prematură a paclitaxelului înainte de ajungerea la locul leziunii din cauza aplicării directe a medicamentului pe suprafața balonului (Dugas et al., 2019; Marzullo et al., 2009) și întârzierea re-endoțelizării, ceea ce a fost demonstrat în studii pe animale utilizând stenturi acoperite cu paclitaxel (McFadden et al., 2004; Farb et al., 2001), intervențională, care este esențială pentru prevenirea proliferării neointimale excesive. Reendoțeliazarea este un proces fundamental în leziunile vasculare după terapia (Liu et al., 2019). De curând, FDA a emis o serie de avertismente cu privire la utilizarea baloanelor acoperite cu paclitaxel în tratamentul periferic al bolii arteriale, după ce s-a identificat un semnal tardiv de creștere a mortalității la pacienții tratați cu astfel de dispozitive. Conform studiilor, riscul relativ de creștere a mortalității la 5 ani a fost de 1,57, ceea ce reprezintă o creștere relativă de 57% a mortalității la pacienții tratați cu baloane acoperite cu paclitaxel. Acest semnal a ridicat preocupări cu privire la siguranța și eficacitatea utilizării paclitaxelului în tratamentul periferic al bolii arteriale (Fda, 2019). Astfel, cercetările s-au concentrat pe dezvoltarea unor metode de livrare controlată a altor agenți anti-proliferativi în locul paclitaxelului.

Pe baza celor menționate mai sus în prima parte a acestei teze este structurată în 2 capitole și este prezentat un rezumat al informațiilor disponibile din literatură cu privire la utilizarea nanotehnologiei în medicina umană și cea veterinară, precum și sintetizarea nanoparticulelor PLGA. Acesta oferă o imagine de ansamblu a stării actuale a cunoștințelor în domeniul nanotehnologiei. Primul capitol prezintă aspecte generale despre nanotehnologie, inclusiv sinteza și încapsularea substanțelor active în nanoparticule polimerice. De asemenea, se examinează avantajele și dezavantajele utilizării nanoparticulelor, în special nanoparticulele biodegradabile PLGA. În final, sunt discutate aplicațiile nanomedicinii. Capitolul doi se concentrează pe sinteza nanoparticulelor PLGA și prezintă trei metode: Difuziunea Emulsiei, Nanoprecipitarea și Evaporarea Emulsiei, fiecare descriind concentrația polimerilor, masa moleculară a polimerilor, raportul molar al copolimerului, solvenții, surfactantul, viteza și timpul de omogenizare, precum și crioprotectorii. Toate acestea sunt prezentate împreună cu metodologia, avantajele și dezavantajele acestora. Aceste două capitole oferă o imagine completă asupra utilizării nanotehnologiei în medicină și importanța acestui domeniu în prezent.

Partea a doua a tezei de doctorat se concentrează pe scopul și motivația acesteia, precum și pe trei studii originale care au drept scop implementarea unui sistem de livrare nou al substanțelor anti-proliferative, reprezentate de quercetin și resveratrol, prin utilizarea nanoparticulelor PLGA. Incluse sunt și concluziile, recomandări și aspecte inovatoare. Teza se încheie cu o bibliografie care citează 137 de titluri.

Scopul primului studiu a fost acela de a dezvolte un sistem eficient de livrare a substanțelor active cu proprietăți anti-proliferative, pentru a fi utilizat în tratarea minim invazivă a bolilor arterelor periferice, fără a cauza efecte adverse. Acest sistem de livrare trebuie să permită o captare eficientă a substanțelor active și să demonstreze o activitate anti-proliferativă crescută și o toxicitate minimă pentru celulele vasculare. Pentru realizarea acestui deziderent s-au sintetizat nanoparticule PLGA goale fără substanță activă înglobată,

nanoparticule PLGA încărcate cu quercetin respectiv triacetil resveratrol prin utilizarea unei singure tehnici de sintetizare, tehnica de evaporare a emulsiei. Nanoparticulele au fost caracterizate din punct de vedere al morfologiei prin Microscopie electronică de transmisie (TEM), iar distribuția mărimii și potențialul Zeta au fost determinate folosind Difuzarea dinamică a luminii (DLS). În același studiu a fost evaluată proliferarea celulară prin imunotest colorimetric pentru cuantificarea proliferării celulare, pe baza măsurării încorporării Invitrogen Hoechst substanță nucleară cu permeabilitate celulară care emite fluorescență albastră atunci când este legată de ADN-ul celulelor musculare netede aortice de șobolan. Celulele au fost fotografiate cu ajutorul microscopiei imunoflorescente Zoe. Testul de viabilitate celulară luminescent a evaluat nivelurile relative de ATP și a fost efectuat pentru a testa citotoxicitatea nanoparticulelor încărcate cu substanțe active. Toate rezultatele au fost analizate statistic și prezentate ca valori medii \pm deviație standard. În majoritatea studiilor biologice, experimentele au comparat efectele celor două tipuri de doze și nanoparticule. Astfel, datele au fost evaluate prin intermediul ANOVA bidirecțional cu teste posthoc Bonferroni folosind GraphPad Prism9. Prin adăugarea unui polimer cationic în timpul sintezei nanoparticulelor PLGA s-a reușit ajustarea cantității de sarcină pozitivă a sistemului de livrare a substanțelor active astfel că nanoparticulele au fost concepute pentru a fi biocompatibile și biodegradabile. Dimensiunea acestora a îndeplinit specificațiile necesare pentru a fi înglobate în celule. Nanoparticulele PLGA cu quercetin și triacetil resveratrol au fost sintetizate la o dimensiune de 102 nm. Ambii polifenoli au fost înglobați separat în nanoparticulele PLGA pentru a permite compararea acestora. Viabilitatea celulară a fost evaluată pe celulele musculare netede, deoarece acestea sunt celulele asociate intim cu nanoparticulele încărcate cu substanțe active, deoarece balonul denudă endoteliul în momentul inflației acestuia. Un efect semnificativ al tratamentului, timpului și interacțiunii semnificative dintre tratament și timp a fost evidențiat la diferite concentrații de nanoparticule. O proliferare excesivă celulară a putut fi de asemenea evidențiată altături de o moarte celulară precoce în unele godeuri evaluate. Având în vedere că s-a folosit o cultură de celule primare putem suspecta că moartea celulară observată sau proliferarea excesivă poate fi datorată instabilității acestora. Evaluarea nanoparticulelor goale cu catități diferite de surfactant (PVA) a fost efectuată pentru a vedea dacă cantitatea acestora nu a contribuit la moartea celulară din anumite godeuri.

Studiul 2 a vizat îmbunătățirea noului sistem de livrare realizat în Studiul 1. Astfel s-au sintetizat nanoparticule PLGA iar substanțele active cu caracter antiproliferativ au fost reprezentate de polifenoli: quercetin, quercetin acetilat, rhamnazin și triacetil resveratrol. Prin ajustarea sarcinii pozitive a sistemului de livrare, nanoparticulele vor fi proiectate pentru a fi biocompatibile și biodegradabile. S-a realizat modificarea altor parametri pentru a oferi eliberarea susținută a polifenolilor înglobați (acetilarea quercetinei în laborator pentru a obține o înglobare adecvată și o eliberare a substanței active îndelungată). Nanoparticulele PLGA încărcate cu polifenoli au fost caracterizate utilizând prin DLS și TEM. În acest studiu s-a dorit evaluarea eliberării controlate a substanțelor active din nanoparticulele sintetizate. Protocolul de eliberare a vizat dializarea probelor și analiza acestora prin intermediul cromatografiei lichide de înaltă performanță (HPLC). Efectul nanoparticulelor încărcate cu polifenoli a fost evaluată prin imunotest colorimetric pentru cuantificarea proliferării celulare, pe baza măsurării încorporării BrdU în timpul sintezei ADN-ului. Incorporarea 5-bromo-2'-deoxi-uridinei (BrdU) în celulele musculare netede aortice de șobolan a fost măsurată folosind un kit comercial de testare a proliferării celulare. Citotoxicitatea sistemului de livrare este o barieră majoră pentru livrarea de substanțe active de aceea viabilitatea celulară va fi evaluată pe celulele musculare netede, deoarece acestea vin în contact cu patul vascular fiind evaluate nivelurile relative de ATP a fost efectuat pentru a testa citotoxicitatea nanoparticulelor. Nanoparticulele polimerice sintetizate ce conțin quercetin și resveratrol au prezentat o formă sferică. După resuspendarea în apă nanopură nanoparticulele aveau o dimensiune medie de 83.6 ± 3.2 și un indice de polidispersare (PDI) de 0.177 ± 0.027 . Sarcina pozitivă a nanoparticulelor a fost concepută pentru a spori interacțiunea nanoparticulelor cu membrana fosfolipidică încărcată negativ a

celulelor vasculare. Nanoparticulele PLGA cu pNP(Q) și pNP(TAR) au fost sintetizate la o dimensiune de 102.7 nm respectiv 90.6 nm. Dimensiunea acestora a îndeplinit specificațiile necesare pentru a fi înglobate în celule. Toți polifenolii au fost înglobați separat în nanoparticulele PLGA pentru a permite compararea acestora însă s-a efectuat și o combinație a acestora. Tratamentul cu nanoparticule PLGA încărcate cu rhamnazin au redus semnificativ proliferarea celulară cu până la 40% la 24 ore la toate concentrațiile. Tot la 24 de ore o inhibare a proiferării celulare a fost observată la combinația de nanoparticule încărcate cu ramnazina și triacetilul resveratrol (TAR). La 48 de ore, nanoparticulele încărcate cu TAR la o concentrație de 0.3mg/km s-a observat o inhibare a proliferării cu aproximativ 20%. Numai particulele încărcate cu substanțe active au redus semnificativ proliferarea și la 72 de ore, numai pNP încărcate cu quercetină acetilată și-a menținut efectul inhibitor. De remarcat este faptul că la 72 de ore, nanoparticulele au prezentat o creștere semnificativă a proliferării celulare. Viabilitatea celulară a fost evaluată pe celulele musculare netede ca și în primul studiu și a fost evaluată ca niveluri relative de ATP comparativ cu celulele fără tratament cu nanoparticule. Aceasta a fost menținută sau chiar crescută la majoritatea dozelor. Cu toate acestea, la concentrația de 0.1 mg/ml în cazul nanoparticulelor încărcate cu quercetin, valorile ATP au scăzut cu 5-10%. Profilul de eliberare pentru toate cele 3 substanțe active captate în nanoparticule a fost măsurat pe parcursul a 6 zile. Un efect semnificativ al tratamentului, timpului și interacțiunii semnificative dintre tratament și timp a fost evidențiat la diferite concentrații de nanoparticule încărcate cu substanțe active. Având în vedere că s-a folosit o cultură de celule primare putem suspecta că moartea celulară observată sau proliferarea excesivă poate fi datorată instabilității acestora. Formulările cu substanțe active înglobate au prezentat o eliberare accentuată în prima zi, urmată de o eliberare mai treptată a substanțelor active pe întreaga perioadă de 6 zile. În timp ce ramnazina a fost eliberată rapid, eliberarea a fost ușor întârziată atunci când s-a utilizat quercetină acetilată, 85 % fiind eliberată până în ziua 3.

Prin studiul 2 s-a realizat ameliorarea sistemului nou de livrare a substanțelor active efectuat în primul experiment. Substanțele active încărcate în nanoparticule au fost reprezentate de quercetin acetilat, ramnazina (un derivat de quercetină) și resveratrol. S-a realizat sintetizarea nanoparticulelor la o dimensiune ce permite înglobarea acestora prin endocitoză celulară și au prezentat o perioadă extinsă de eliberare. Viabilitatea celulară a fost menținută sau chiar crescută la anumite concentrații iar efectul antiproliferativ a fost demonstrat prin încorporarea coloratului BrDU. Eliberarea substanțelor active din nanoparticule a demonstrat că ramnazina a fost eliberată rapid, eliberarea a fost ușor încetinită când a fost utilizată quercetină acetilată.

Ultimul studiu a avut ca scop încorporarea de quercetină în nanoparticule PLGA ce va fi realizată cu alte formulări față de primele 2 studii în vederea îmbunătățirii caracteristicilor acestora. Scopul final al acestui studiu a fost acela de a proiecta un nou balon acoperit cu substanțe active folosind un sistem de nanolivrare polimeric pentru o eliberare susținută de polifenoli care reduce restenoza, dar cu toxicitate redusă în comparație cu agenții de chimioterapie. S-a dorit dezvoltarea nanoparticulelor PLGA cu quercetină prinsă, o dimetoxi quercetină (ramnizină), precum și quercetină atașată covalent la PLGA. În acest studiu s-a realizat sinteza nanoparticulelor PLGA-Eudragit RL-100 respectiv conjugarea nanoparticulelor PLGA cu quercetin. Nanoparticulele PLGA încărcate cu polifenoli au fost caracterizate utilizând prin DLS și TEM. Protocolul de eliberare a substanțelor active înglobate în nanoparticulele PLGA a fost realizat cu același cel folosit în studiul 1 și 2. Pentru evaluarea proliferării celulare pe celulele musculare netede aortice de șobolan s-a efectuat o scurtă simulare de umflare a balonului și livrare a nanoparticulelor folosind un mediu de cultură DMED cu o incubare de 2 ore la 37°C (Dulbecco's Modified Eagle Medium) conform rezultatelor obținute în studiul 1 și studiul 2. Au fost selectate 2 ore deoarece observațiile studiilor pilot (Studiul 1 și Studiul 2) au determinat că 2 ore a fost timpul minim necesar pentru ca pNP să

cadă la fundul godeului și să adere. Proliferarea celulară a fost evaluată prin urmărirea ratei de sinteză a ADN-ului, determinată ca cantitate de încorporare de 5-bromo-20-deoxi-uridină (BrdU). Citotoxicitatea a fost evaluată la 24, 48 și 72 de ore folosind testul de viabilitate celulară luminescentă CellTiter-Glo1 (Promega). Pentru a testa dacă pNP-urile care conțin quercetină ar putea avea un impact asupra restenozei după o scurtă umflare a balonului, celulele au fost crescute până la o confluență de 50-60% în plăci cu 24 de godeuri care conțineau mediu de creștere DMEM cu glucoză scăzută. Absorbanța a fost citită la 450 nm (referință 690 nm) folosind un cititor de microplaci Biotek Synergy.

Un scop secundar al studiului prezent a fost acela de a permite aderența pNP la leziunile calcificate. Calcificarea vasculară este o afecțiune comună în cazul PAB și poate fi mai extinsă decât în cazul bolii coronariene (Narula et al., 2020). Acumularea de calciu și fosfat în straturile intinale și mediale ale vasului este tipică pacienților cu PAD, în special celor cu boală renală cronică și diabet zaharat (Karwowski et al., 2012). Calcificarea poate fi o complicație frecventă după angioplastie, ceea ce poate duce la rezultate mai puțin favorabile. Aceasta se datorează faptului că calcificarea poate duce la o reducere a complianței arterei, ceea ce poate limita capacitatea vasului de a se extinde pentru a permite un flux sanguin adecvat. De asemenea, calcificarea poate duce la disecții ale arterei, ceea ce poate duce la un flux sanguin redus sau la obstrucție. În plus, calcificarea poate duce la reculul acut al vaselor, ceea ce poate fi problematic pentru intervenția chirurgicală și poate necesita tratament suplimentar (Fitzgerald et al., 1992). Mai mult, pierderea tardivă a lumenului după angioplastia cu balon acoperit cu paclitaxel a demonstrat o corelație cu calcificarea circumferențială (Fanelli și colab., 2014), iar ipotezele spun că astfel de rezultate se datorează incapacității leziunii calcificate de a absorbi paclitaxel. Astfel, în experimentele vizate în studiul 3, a fost testat dacă acoperirea cu pNP a fost capabilă de aderență puternică la celulele în care acumularea de calciu a fost indusă experimental. Cateterile cu balon au fost acoperite cu nanoparticule polimerice folosind o metodă ultrasonică fiind determinate caracteristicile nanoparticulelor, încărcarea cu substanță activă, uniformitatea acoperirii și eliberarea substanțelor active. Cuantificarea pNP și încărcarea substanțelor active au utilizat analiza gravimetrică și HPLC. În ceea ce privește statistica toate datele din figuri sunt exprimate ca medii \pm deviație standard. Pentru majoritatea studiilor biologice, experimentele au fost concepute pentru a compara efectele ambelor tipuri de doză și pNP. Astfel, datele au fost analizate folosind ANOVA bidirecțional cu testele posthoc ale lui Bonferroni folosind software-ul GraphPad Prism. Excepția este aceea că, pentru experimentele care vizează testarea aderenței celulare în condiții de creștere calcifiante, au fost comparate trei condiții: calcificarea, spălarea și tratarea pNP. Astfel, în acest caz, a fost efectuat un ANOVA cu trei căi (cu testele posthoc ale lui Bonferroni). Caracteristicile cationice ale pNP au fost furnizate prin adăugarea unui polimer cationic Eudragit RL100 în timpul sintezei pNP. Prin ajustarea cantității de sarcină pozitivă a sistemului, pNP-ul a fost concepute pentru a fi biocompatibile și biodegradabile și s-a dovedit a îndeplini specificațiile ideale pentru absorbția celulară și menținerea unei perioade continue de eliberare. Nanoparticulele PLGA cu pNP(eQ), pNP(eR), precum și quercetina conjugată (pNP(cQ)), au fost dezvoltate la o dimensiune de 101 nm. Toți polifenolii au fost prinși separat în pNP PLGA pentru a permite compararea acestora. Similar experimentelor anterioare, quercetina înglobată s-a eliberat rapid în primele 24 de ore, cu excepția faptului că de data aceasta substanța activă a fost prinsă separat în pNPs. Aceasta nu a mai fost înglobată împreună cu resveratrol în forma sa metoxilată (Dugas et al., 2019). Cu toate acestea, atașarea covalentă a quercetinului a întârziat eliberarea sa, lucru indicat de neeliberarea în rafală și un profil de eliberare mai prelungit. Derivatul metoxilat de quercetină (rhamnazin) cu hidrofobie crescută a oferit o eliberare ceva mai susținută de quercetină, deși nu a fost la fel de prelungit ca pNP care conține Q atașat covalent. În acest din urmă caz, eliberarea a fost susținută pentru un total de 6 zile, ceea ce este benefic deoarece vindecarea vasculară, precum și evenimentele celulare care contribuie la restenoză încep în primele 7 zile de la angioplastie (Kenagy, 2011).

În acest experiment a fost folosită o metodă de acoperire cu ultrasunete care a permis noului sistem de livrare să genereze un strat uniform. Această tehnică de acoperire trebuie să minimizeze eliberarea nespecifică a substanței active în sânge și să îmbunătățească retenția pe termen lung a substanței active în țesutul vascular, dar o astfel de limitare trebuie studiată în experimente viitoare pe animale. Pentru a crea un balon de angioplastie eficient cu substanțe active, trebuie luați în considerare câțiva factori cheie, cum ar fi livrarea optimă a substanțelor active, utilizarea nanoparticulelor biocompatibile, cu o eliberare îndelungată, și utilizarea particulelor cu quercetină atașată chimic. De asemenea, se poate folosi microscopia cu fluorescență pentru a verifica uniformitatea suprafeței și a încărcării cu substanțe active. Studiile au prezentat anumite limitări, cum ar fi concentrarea pe observații pe termen scurt, utilizarea de metode in vitro, variabile necontrolate și testarea pe un număr redus de baloane. De asemenea, producerea de fisuri în straturile de nanoparticule în timpul uscării ar putea afecta eficacitatea tratamentului. Sunt necesare studii suplimentare pentru a investiga fisurarea acoperirilor de nanoparticule pentru baloanele de angioplastie, deoarece acest fenomen apare doar la straturile groase de nanoparticule. Uniformitatea suprafeței poate fi afectată de numărul de straturi, dar metodele actuale de evaluare a uniformității pot fi neconcludente. Manipularea baloanelor și a altor materiale acoperite cu nanoparticule poate duce la defecte ale stratului de acoperire, iar investigațiile viitoare ar trebui să compare rezultatele microscopiei cu fluorescență cu alte metode de imagistică. Este necesară efectuarea unor studii in vivo cu modele de angioplastie cu balon pentru a testa farmacocinetica eliberării de medicamente la nivelul peretelui vascular. În cazul în care fisurarea reprezintă o problemă, se poate lua în considerare utilizarea de compuși plastifianți în formulările suplimentare pentru a reduce fragilitatea acoperirilor la uscare.

Bibliografia

1. ANALYSIS, A. E.-B. 2010. *Stenting for peripheral artery disease of the lower extremities: An evidence-based analysis.*
2. BARRETT, C., BARSHES, N. R., CORRIERE, M. A., DRACHMAN, D. E., FLEISHER, L. A., GERRY FOWKES, F. R., HAMBURG, N. M., KINLAY, S., LOOKSTEIN, R., MISRA, S., MUREEBE, L., OLIN, J. W., PATEL, R. A. G., REGENSTEINER, J. G., SCHANZER, A., SHISHEHBOR, M. H., STEWART, K. J., TREAT-JACOBSON, D. & EILEEN WALSH, M. 2017. 2016 AHA/ACC Guideline on the Management of Patients With Lower Extremity Peripheral Artery Disease. *Circulation*, 135, 726-779.
3. BECKMAN, J. A., FINDEISS, L. K., GOLZARIAN, J., GORNIK, H. L., HALPERIN, J. L., JAFF, M. R., MONETA, G. L., OLIN, J. W., STANLEY, J. C., WHITE, C. J., WHITE, J. V., EUGENE ZIERLER, R., CREAGER, M. A., HIRATZKA, L. F., C MURPHY, W. R., PUSCHETT, J. B., ROSENFELD, K. A., SACKS, D., TAYLOR, L. M., WHITE, R. A., TASK FORCE MEMBERS ALICE JACOBS, A. K., ANDERSON, J. L., ALBERT, N., ETTINGER, S. M., GUYTON, R. A., HOCHMAN, J. S., KUSHNER, F. G., MAGNUS OHMAN, E., STEVENSON, W. & YANCY, C. W. 2011. This article is copublished in *Circulation, Catheterization and Cardiovascular Interventions*, the *Journal of Vascular Surgery*, and *Vascular Medicine*. *Jac*, 58, 2020-2045.
4. CORTESE, B., GRANADA, J. F., SCHELLER, B., SCHNEIDER, P. A., TEPE, G., SCHEINERT, D., GARCIA, L., STABILE, E., ALFONSO, F., ANSEL, G. & ZELLER, T. 2016. Drug-coated balloon treatment for lower extremity vascular disease intervention: An international positioning document. *European Heart Journal*, 37, 1096-1103.
5. DOSHI, M., SOJITRA, P., SHAH, D., DANI, S. & ABIZAID, A. 2019. Technical Insights on Drug-Coated Balloons II. *Drug-Coated Balloons*, 45-57.
6. DUGAS, T. R., BREWER, G., LONGWELL, M., FRADELLA, T., BRAUN, J., ASTETE, C. E., JENNINGS, M. H. & SABLIOV, C. M. 2019. Nanoentrapped polyphenol coating for sustained drug release from a balloon catheter. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 107, 646-651.
7. FDA 2019. August 7, 2019 UPDATE: Treatment of Peripheral Arterial Disease with Paclitaxel-Coated Balloons and Paclitaxel-Eluting Stents Potentially Associated with Increased Mortality. 57, 13-15.
8. FITZGERALD, P. J., PORTS, T. A. & YOCK, P. 1992. Contribution of localized calcium deposits to dissection after angioplasty. An observational study using intravascular ultrasound. *Circulation*, 86, 64-70.
9. FOWKES, F. G. R., ABOYANS, V., FOWKES, F. J. I., MCDERMOTT, M. M., SAMPSON, U. K. A. & CRIQUI, M. H. 2017. Peripheral artery disease: epidemiology and global perspectives. *Nature Reviews Cardiology*, 14, 156-170.
10. GOYAL, S. N., BHARTI, S., KRISHNAMURTHY, B., AGRAWAL, Y., OJHA, S. K. & ARYA, D. S. 2012. Impact of metabolic syndrome on re-stenosis development: Role of drug-eluting stents. *Diabetes and Vascular Disease Research*, 9, 177-188.
11. JAFF, M. R., CAHILL, K. E., YU, A. P., BIRNBAUM, H. G. & ENGELHART, LUELLA M. M. 2010. Clinical Outcomes and Medical Care Costs Among Medicare Beneficiaries Receiving Therapy for Peripheral Arterial Disease. *Annals of Vascular Surgery*, 24, 577-587.
12. KARWOWSKI, W., NAUMNIK, B., SZCZEPAŃSKI, M. & MYŚLIWIEC, M. 2012. The mechanism of vascular calcification—a systematic review. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, 18, RA1.

13. KENAGY, R. D. 2011. 7• Biology of Restenosis and Targets for Intervention. *Mechanisms of Vascular*, 115.
14. KONISHI, A., MITSUTAKE, Y., HO, M., HANDA, N., KOIKE, K., MOCHIZUKI, S. & ISHII, K. 2019. Patient and lesion characteristics in late/very late stent thrombosis with everolimus-eluting stents from real-world adverse event reporting. *Journal of Cardiology*, 3-8.
15. LIU, J., JIANG, C., MA, X., FENG, L., WANG, J. & PENG, Z. 2019. Notoginsenoside Fc Accelerates Reendothelialization following Vascular Injury in Diabetic Rats by Promoting Endothelial Cell Autophagy. *Journal of Diabetes Research*, 2019.
16. MARROCCO, C. J. & BUSH, H. R. L. 2010. Peripheral arterial disease. *High Risk Diabetic Foot: Treatment and Prevention*, 358, 1-8.
17. NARULA, N., OLIN, J. W. & NARULA, N. 2020. Pathologic disparities between peripheral artery disease and coronary artery disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 40, 1982-1989.
18. NORGREN, L., HIATT, W. R., DORMANDY, J. A., NEHLER, M. R., HARRIS, K. A., FOWKES, F. G. & RUTHERFORD, R. B. 2007. Inter-society consensus for the management of peripheral arterial disease. *International angiology : a journal of the International Union of Angiology*, 26, 81-157.
19. PATEL, M. R., CONTE, M. S., CUTLIP, D. E., DIB, N., GERAGHTY, P., GRAY, W., HIATT, W. R., HO, M., IKEDA, K., IKENO, F., JAFF, M. R., JONES, W. S., KAWAHARA, M., LOOKSTEIN, R. A., MEHRAN, R., MISRA, S., NORGREN, L., OLIN, J. W., POVSIC, T. J., ROSENFIELD, K., RUNDBACK, J., SHAMOUN, F., TCHENG, J., TSAI, T. T., SUZUKI, Y., VRANCKX, P., WIECHMANN, B. N., WHITE, C. J., YOKOI, H. & KRUCOFF, M. W. 2015. Evaluation and treatment of patients with lower extremity peripheral artery disease: Consensus definitions from peripheral academic research consortium (PARC). *Journal of the American College of Cardiology*, 65, 931-941.
20. SONG, P., RUDAN, D., ZHU, Y., FOWKES, F. J. I., RAHIMI, K., FOWKES, F. G. R. & RUDAN, I. 2019. Global, regional, and national prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2015: an updated systematic review and analysis. *The Lancet Global Health*, 7, e1020-e1030.
21. TENDERA, M., ABOYANS, V., BARTELINK, M. L., BAUMGARTNER, I., CLMENT, D., COLLET, J. P., CREMONESI, A., DE CARLO, M., ERBEL, R., FOWKES, F. G. R., HERAS, M., KOWNATOR, S., MINAR, E., OSTERGREN, J., POLDERMANS, D., RIAMBAU, V., ROFFI, M., ROTHER, J., SIEVERT, H., VAN SAMBEEK, M., ZELLER, T., BAX, J., AURICCHIO, A., BAUMGARTNER, H., CECONI, C., DEAN, V., DEATON, C., FAGARD, R., FUNCK-BRENTANO, C., HASDAL, D., HOES, A., KNUUTI, J., KOLH, P., MCDONAGH, T., MOULIN, C., POPESCU, B., REINER, Z., SECHTEM, U., SIRNES, P. A., TORBICKI, A., VAHANIAN, A., WINDECKER, S., AGEWALL, S., BLINC, A., BULVAS, M., COSENTINO, F., DE BACKER, T., GOTTSTER, A., GULBA, D., GUZIK, T. J., JNSSON, B., KSMRKY, G., KITSIOU, A., KUCZMIK, W., LARSEN, M. L., MADARIC, J., MAS, J. L., MCMURRAY, J. J. V., MICARI, A., MOSSERI, M., MLLER, C., NAYLOR, R., NORRVING, B., OTO, O., PASIERSKI, T., PLOUIN, P. F., RIBICHINI, F., RICCO, J. B., RUILOPE, L., SCHMID, J. P., SCHWEHR, U., SOL, B. G. M., SPRYNGER, M., TIEFENBACHER, C., TSIOUFIS, C. & VAN DAMME, H. 2011. ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of peripheral artery diseases. *European Heart Journal*, 32, 2851-2906.
22. TEPE, G., LAIRD, J., SCHNEIDER, P., BRODMANN, M., KRISHNAN, P., MICARI, A., METZGER, C., SCHEINERT, D., ZELLER, T., COHEN, D. J., SNEAD, D. B., ALEXANDER, B., LANDINI, M. & JAFF, M. R. 2015. Drug-coated balloon versus standard percutaneous transluminal angioplasty for the treatment of superficial femoral and popliteal peripheral artery disease 12-month results from the IN.PACT SFA randomized Trial. *Circulation*, 131, 495-502.
23. TEPE, G., ZELLER, T., ALBRECHT, T., HELLER, S., SCHWARZWÄLDER, U., BEREGI, J. P., CLAUSSEN, C. D., OLDENBURG, A., SCHELLER, B. & SPECK, U. 2008. Local delivery of paclitaxel to inhibit restenosis during angioplasty of the leg. *New England Journal of Medicine*, 358, 689-699.
24. THUKKANI, A. K. & KINLAY, S. 2015. Endovascular Intervention for Peripheral Artery Disease. *Circulation Research*, 116, 1599-1613.
25. URASAWA, K., SATO, K., KOSHIDA, R. & HONMA, Y. 2011. [Endovascular therapy for peripheral arterial disease]. *Nippon rinsho. Japanese journal of clinical medicine*, 69, 318-321.
26. VAN DEN BERG, J. C. 2017. In-stent restenosis management: The best is yet to come. *Journal of Cardiovascular Surgery*, 58, 508-517.

27. WERK, M., LANGNER, S., REINKENSMEIER, B., BOETTCHER, H. F., TEPE, G., DIETZ, U., HOSTEN, N., HAMM, B., SPECK, U. & RICKE, J. 2008. Inhibition of restenosis in femoropopliteal arteries. Paclitaxel-coated versus uncoated balloon: Femoral paclitaxel randomized pilot trial. *Circulation*, 118, 1358-1365.