

## 돼지 관상동맥 스텐트 재협착 모형에서 Probucol 부착 BiodivYsio™ 스텐트의 신생내막 증식 억제 효과

전남대학교 의과대학 전남대학교병원 심장센터,<sup>1</sup> 전남대학교 의과대학 연구소,<sup>2</sup>  
동아대학교 의과대학 동아대학교병원 순환기내과,<sup>3</sup> 서남대학교 의과대학 서남대학교병원 순환기내과<sup>4</sup>

김 원<sup>1</sup> · 정명호<sup>2</sup> · 차광수<sup>3</sup> · 이승현<sup>1</sup> · 임지현<sup>1</sup> · 김한균<sup>1</sup> · 박형욱<sup>1</sup> · 홍영준<sup>1</sup>  
박옥영<sup>4</sup> · 김주환<sup>1</sup> · 안영근<sup>1</sup> · 박종태<sup>2</sup> · 김무현<sup>3</sup> · 조정관<sup>2</sup> · 박종춘<sup>2</sup> · 강정채<sup>2</sup>

### The Effect of the Probucol-Loaded BiodivYsio™ DD Stent on Inhibition of Neointimal Proliferation in Porcine Coronary Stent Restenosis Model

Weon Kim, MD<sup>1</sup>, Myung Ho Jeong, MD<sup>2</sup>, Kwang Soo Cha, MD<sup>3</sup>, Seung Hyun Lee, MD<sup>1</sup>,  
Ji Hyun Lim, MD<sup>1</sup>, Han Gyun Kim, MD<sup>1</sup>, Hyung Wook Park, MD<sup>1</sup>, Young Jun Hong, MD<sup>1</sup>,  
Ok Young Park, MD<sup>4</sup>, Ju Han Kim, MD<sup>1</sup>, Young Keun Ahn, MD<sup>1</sup>, Jong Tae Park, MD<sup>2</sup>,  
Moo Hyun Kim, MD<sup>3</sup>, Jeong Gwan Cho, MD<sup>2</sup>, Jong Chun Park, MD<sup>2</sup> and Jung Chae Kang, MD<sup>2</sup>

<sup>1</sup>The Heart Center of Chonnam National University Hospital, Gwangju,

<sup>2</sup>Chonnam National University Research Institute of Medical Sciences, Gwangju,

<sup>3</sup>Department of Cardiovascular Medicine, Dong-A University Hospital, Busan, <sup>4</sup>Seonam University Hospital

#### ABSTRACT

**Background and Objectives** : In a recent multicenter trial probucol was found to reduce stent restenosis by improving the lumen dimension. The probucol was administered for 2 weeks before, and 4 weeks after, stenting. The release of the drug at the site of a vascular injury, via polymer-coated stents, helps achieve an effective local concentration. The feasibility of a probucol stent coating in reducing in-stent restenosis was assessed. **Materials and Methods** : The probucol loading and in vitro release were assessed using BiodivYsio™ stents, in a 50 mg/mL probucol solution. After being dip-coated with probucol (n=8), or a control (n=8) solution, the stents were implanted in 8 pigs. Angiography and histopathological analyses were performed 28 days later. **Results** : The total probucol loading was  $52 \pm 16$   $\mu$ g/stent, with no release for up to 72 hours after loading. No pig died until sacrifice. On angiography, the reference and minimum lumen diameters showed no significant differences between the two groups, with similar diameters stenosis ( $8.7 \pm 3.68$  vs.  $13.3 \pm 4.18\%$ ,  $p=0.120$ ). On histomorphometry, the injury scores, vessel, lumen and neointimal areas showed no significant differences between the groups, with similar areas of stenosis ( $23.1 \pm 12.39$  vs.  $25.2 \pm 8.22\%$ ,  $p=0.671$ ). The degrees of re-endothelialization, inflammation and smooth muscle cell proliferation were not significantly different. **Conclusion** : Probucol can be loaded onto a polymer-coated stent, and does not release from the stent for up to 72 hours after loading. About 52  $\mu$ g probucol per stent does not reduce in-stent restenosis in porcine coronary arteries. (Korean Circulation J 2003;33(11):1028-1035)

**KEY WORDS** : Probucol ; Coronary disease ; Restenosis ; Stents ; Antioxidants.

논문접수일 : 2003년 4월 30일

수정논문접수일 : 2003년 7월 4일

심사완료일 : 2003년 7월 31일

교신저자 : 정명호 501-757 광주광역시 동구 학1동 8 전남대학교 의과대학 전남대학교병원 심장센터

전화 : (062) 220-6243 · 전송 : (062) 228-7174 · E-mail : myungho@chollian.net

## 서론

관상동맥 스텐트(stent) 시술은 풍선확장술 후 발생할 수 있는 급성 혈관 합병증과 재협착을 감소시킴으로써 관상동맥 중재술의 보편적인 한 치료방법으로 확립되었으나,<sup>1)</sup> 아직까지 시술 후 스텐트 재협착이 약 20~30%에서 발생하고 있어 해결해야 할 문제이다.<sup>2)</sup>

Probucol은 1960년대에 항산화제로 발견된 후 지질강하제로 개발 및 판매되었으나,<sup>3)</sup> 콜레스테라민에 비하여 이점이 없고, 새로운 스타틴계 지질강하제가 사용됨으로써 미국에서는 잘 사용되지는 않으나, 일본 등지에서는 여전히 지질 강하를 목적으로 사용되고 있으며, 또한 재협착에 관한 3상 임상시험이 진행되고 있는 약제이다. Probucol은 지질강하 효과, 항산화 효과,<sup>4)</sup> 그리고 풍선확장술 후 재협착을 감소시키는 효과<sup>5-8)</sup>가 잘 규명되어 있는 장점이 있으며, 최근 '혈관 보호자(vascular protectant)'로 재인식되고 있다.<sup>9)</sup> 스텐트와 관련된 연구로서는 최근의 한 다기관연구에서 스텐트 시술부위의 혈관 내강(lumen dimension)을 호전시키는 기전에 의하여 스텐트 시술 후 재협착을 감소시키는 것으로 보고하였다.<sup>10)</sup> Probucol의 투여 기간에 대하여는 일반적으로 시술 전 3주 이상의 투여가 필요한 것으로 받아들여지고 있으나, 이 다기관연구에서는 스텐트 시술 전 2주부터 시술 후 4주까지 투여하였다.

폴리머 부착 스텐트(polymer-coated stent)를 이용하여 혈관손상 부위에 국소적으로 약물을 전달하는 방식은 전신 독성 없이 국소 부위에 고농도의 약물을 효과적으로 전달할 수 있는 방법으로 여겨진다. 저자들은 스텐트에 probucol 부착 여부의 가능성과 스텐트에 부착된 probucol의 스텐트 재협착의 억제 효과를 돼지 모델을 이용하여 알아보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### Probucol의 스텐트 부착 용량(loading amount) 및 *in vitro* release kinetics의 측정

스텐트에 부착되는 probucol 용량의 측정은 5개의 길이 11 mm의 BiodivYsio™ DD stent를 이용하여 실시하였다. 임의로 선택한 50 mg/mL probucol 용액은 99.9% 메탄올 용액 10 mL에 probucol 500 mg (Boehringer Mannheim, Germany)을 상온에서 용해시켜 제조하였다.

스텐트를 probucol 용액에 5분간 담근 후 꺼내어 공기 중에 5분간 말린 후 초음파 수조(ultrasound bath)에 30분간 담그고 나서 High Performance Liquid Chromatography (HPLC) 법을 이용하여 정량적인 측정을 하였다.

시간에 따라 스텐트에서 방출되는 probucol 용량을 측정하기 위하여, probucol이 부착된 스텐트를 100 mL의 phosphate-buffered saline 용액에 담가둔 후, 여러 시간대에서 이 용액에 방출된 probucol의 용량을 HPLC 법으로 측정하였다. Probucol의 부착 용량 및 방출 측정은 한 검사실(Biocompatibles Ltd, Farnham, UK)의 *In vitro* 실험실에서 시행되었다.

### 스텐트 재협착 모형 및 Probucol 부착 스텐트 시술

동물실험은 전남대학교병원 임상연구소 윤리위원회의 허가 후 시행하였으며, 관상동맥 스텐트 재협착 모형은 기존의 방법을 이용하였다.<sup>11)</sup> 시술 3일전부터 실험용 돼지(25~35 kg)에게 aspirin(100 mg/day)과 ticlopidine(250 mg/day)을 투여한 후, ketamine(12 mg/kg)과 xylazine(8 mg/kg)을 근육 주사하여 전신마취를 유도하였다. 필요에 따라 시술 중 midazolam을 추가로 정주하여 마취상태를 유지하였다. 무균상태 하에서 2% lidocaine으로 국소마취를 한 후 좌측 경동맥을 절개하여 8 Fr 동맥 유도초를 삽입하였다. Heparin sodium 10,000 U를 투여한 후 관상동맥 유도도자로써 C-arm(Phillips사, BV-25 Gold)의 투시하에 관상동맥 조영술을 시행하였다.

스텐트 시술 직전에 스텐트를 50 mg/mL probucol 용액(n=8) 또는 메탄올 대조 용액(n=8)이 든 syringe에 5분간 담가서 완전히 적셔지도록 지도록 하였다. 이 후 스텐트를 공기 중에서 5분 동안 두어 메탄올이 증발하도록 하였다. 스텐트 시술은 혈관이 약간 과확장되도록 적당한 직경의 관상동맥을 선택하여 스텐트를 위치시키고 8~12기압의 압력으로 30초간 풍선을 확장시켜 삽입하였다. 스텐트는 길이 15 mm, 직경 3.0 mm 혹은 3.5 mm의 BiodivYsio™ DD stent (Biocompatibles Ltd., Farnham, UK)를 사용하였다. 스텐트 시술은 무작위로 관상동맥 세 혈관 중 두 혈관에 삽입하였으며, 관상동맥의 크기가 2.5 mm 이상인 근위부 혈관에 시술하였다. 스텐트 시술 전후로 관상동맥 조영술을 실시하여 CD에 녹화 기록하였고, 저장된 영상을 Philips H5000 DCI program을 이용하여 정량분석을 하였다. 시술 후 경동맥을 결찰한 후 목의 피부를 봉합하였고, 사육사에서 4주

동안 관찰하였다. 이 기간 동안 계속 aspirin과 ticlopidine을 투여하였다. 스텐트 시술 4주 후에 우측 경동맥을 이용하여 동일한 방법으로 관상동맥 조영술을 시행한 후 희생시켜 조직병리검사를 실시하였다.

### 조직형태 검사(Histomorphometry)

추출한 돼지의 심장에서부터 스텐트를 함유하고 있는 관상동맥을 분리하여 즉시 관류고정 하였다. 스텐트 상부 및 하부 1 cm까지의 혈관 조직을 포함하는 동맥 분절을 만들어 플라스틱에 임베딩(embedding)한 후, 합성수지 포매제(methyl methacrylate : MMA)를 사용하여 침투 및 포매를 한 후 염색하였다. 동맥 분절의 절단면은 정량적 조직형태학적 측정을 위하여 hematoxyline and eosin 염색을 하였고, 혈관 평활근 세포(smooth muscle cell)의 증식 및 세포외 기질(extracellular matrix)의 성분을 관찰하기 위하여 스텐트 필라멘트를 2~3 mm 간격으로 절단하고 현미경 시야에서 혈관이 변형되거나 손상되지 않도록 제거한 후 면역조직화학적 염색을 하였다. 모든 검사는 스텐트 시술에 참여하지 않은 병리학자와 함께 하였다.

조직형태 검사는 컴퓨터 시스템인 Visus 2000 Visual Image Analysis System을 이용하여 기존의 방법대로 측정하였다.<sup>11)12)</sup> 외탄력층(external elastic lamina ; EEL) 면적(EEL area), 내탄력층(internal elastic lamina ; IEL) 면적(IEL area), 내강 면적(lumen area), 신생내막 면적 등을 측정하였다. 스텐트 혈관의 면적 협착(area stenosis)은  $100 \times (1 - \text{lumen area} / \text{IEL area})$ 의 공식을 이용하여 계산하였다. 혈관 손상 및 염증 반응의 정도는 손상 지수(1점 ; IEL 파괴된 경우, 2점 ; 중막이 파괴된 경우, 3점 ; EEL이 파괴된 경우)와 염증 지수(1점 ; 염증세포가 산재한 경우, 2점 ; 스텐트 스트럿 주위의 절반 정도에 밀집한 경우, 3점 ; 스트럿 주위 전체에 밀집한 경우)를 이용하여 평가하였다.<sup>12)</sup> 스텐트 내의 상피재생화(reendothelialization) 정도는 상피재생화 지수(내막세포에 의해 덮혀지는 내강[내막]의 percentage를 기준으로 하여 25% 이하는 1점, 25%에서 75% 사이는 2점, 75% 이상은 3점)로 평가하였다.<sup>12)13)</sup>

### 면역조직화학 검사(Immunohistochemistry)

형성된 신생내막에서 혈관 평활근 세포의 증식 정도

를 평가하기 위하여 조직을 증식세포 핵항원(proliferating cell nuclear antigen ; PCNA)으로 염색하였다. 400 배율 현미경하에서 각각 12시, 3시, 6시, 9시 방향에서 PCNA 양성 평활근 세포의 수를 세어 총 평활근 세포수에 대한 비율로서 PCNA index를 계산하였다.

신생내막에서 세포외 기질의 성분을 측정하기 위하여는 먼저 조직을 Modified Movat 염색을 하였다.<sup>14)</sup> 파라핀 포매체의 조직을 xylene과 alcohol로 함수처리한 후 오븐에서 60°C로 가열하였고, 매염작용을 하는 bovine solution에 담근 후 microwave에 45초간 처리하였다. 순차적으로 1% alcian blue와 alkaline alcohol, Musto working solution으로 처리하였고 각 단계 중간에는 흐르는 물에 씻었고, 그 후 Crocein Scarlet/Acid fuchsin에 1분 간, 5% phosphotungstic acid에 5분 간 담근 후 alcoholic Saffron으로 처리하였다. 면역조직화학염색은 조직을 탈파라핀 후 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 methanol 용액을 사용하여 조직에 내재하는 peroxidase 활성을 억제시키고 10% 정상 염소 혈청으로 항체의 비특이적 결합을 차단하였다. 조직을 일차항체와 반응시킨 후 avidin biotin peroxidase technique을 이용하였으며, DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, Sigma, St. Louis, MO, USA) 발색제를 사용하였다.

### 통계학적 분석

모든 자료는 평균±표준편차로 표시하였으며, 양 군에서 변수의 비교는 MS Window® SPSS-PC 11.0 프로그램을 이용하여 Student's unpaired t-test로 하였다. p값이 0.05 미만인 경우에 통계학적으로 유의하다고 판정하였다.

## 결 과

### Probucol의 스텐트 부착 용량 및 *in vitro* release kinetics

50 mg/mL probucol 용액에서 폴리머 부착 스텐트 (BiodivYsio™ DD)에 부착되는 probucol의 용량은  $52 \pm 16 \mu\text{g}$ 이었고, 폴리머에 부착된 probucol의 방출은 약물 부착 72시간까지 이루어지지 않았다(Fig. 1).

### 정량적 관상동맥 조영술

8마리의 돼지에서 16개 스텐트가 성공적으로 삽입되었고, 28일까지 사망한 돼지는 없었다. Probucol 군과

대조군 사이에 시술 전 혈관 내경, 스텐트/혈관 직경비, 시술 직후 및 추적 검사시의 최소혈관내경은 유의한 차이가 없었고, 추적 검사 시 내경 협착은 유사하였다( $8.7 \pm$

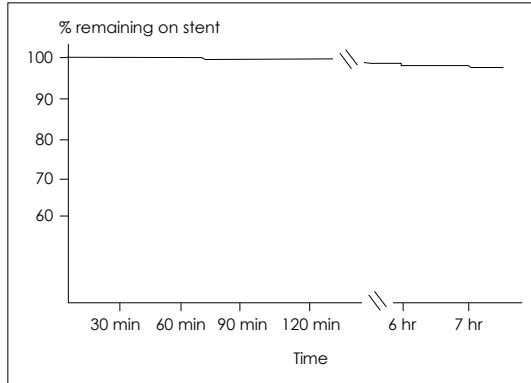
$3.68$  vs.  $13.3 \pm 4.18\%$ ,  $p=0.120$ ) (Table 1).

#### 조직형태 검사

병리검사에서 외관상 심근경색증의 증거는 보이지 않았고, 스텐트 시술한 모든 혈관들은 개통되어 있었다. Probucol 군에서 22개, 대조군에서 25개의 조직 절편을 제작하여 조직형태 검사를 하였다. 양 군에서 손상 지수, 외탄력층 면적, 내강 면적, 신생내막 면적은 유의한 차이가 없었고, 유사한 면적 협착이 관찰되었다( $23.1 \pm 12.39$  vs.  $25.2 \pm 8.22\%$ ,  $p=0.671$ ) (Table 2) (Fig. 2).

#### 면역조직화학 검사

스텐트 분절의 상피재생화는 양 군에서 완전하게 비슷하게 이루어졌고, 상피재생화 지수는 차이가 없었다 (Table 2). 양 군에서 스텐트 스트럿 주위에 혈전 형성



**Fig. 1.** In vitro screening of probucol release from Biodivysio DD stent.

**Table 1.** Quantitative coronary angiographic findings of porcine coronary arteries after probucol stent (Group I) and control stent delivery (Group II)

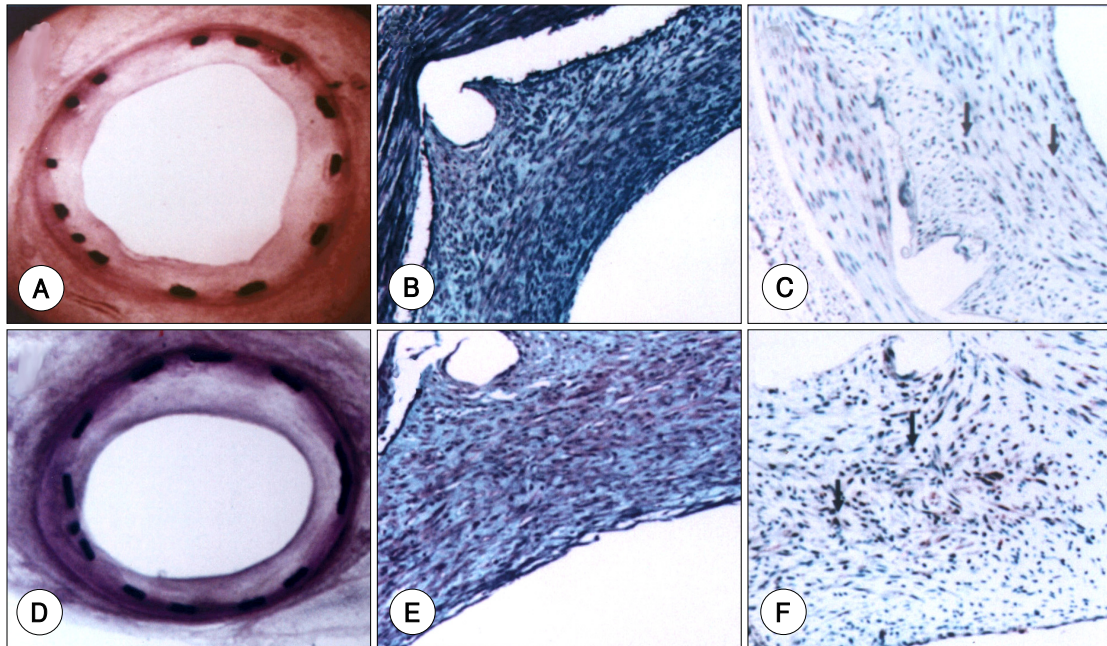
|                                    | Probucol (n=8)  | Control (n=8)    | p    |
|------------------------------------|-----------------|------------------|------|
| <b>Baseline (mm)</b>               |                 |                  |      |
| Proximal diameter                  | $3.10 \pm 0.14$ | $3.03 \pm 0.14$  | 0.48 |
| Distal diameter                    | $2.58 \pm 0.25$ | $2.42 \pm 0.22$  | 0.25 |
| Reference diameter                 | $2.94 \pm 0.12$ | $2.91 \pm 0.17$  | 0.73 |
| Post-stenting diameter             | $3.37 \pm 0.12$ | $3.33 \pm 0.10$  | 0.62 |
| <b>4 weeks after stenting (mm)</b> |                 |                  |      |
| Proximal diameter                  | $3.04 \pm 0.15$ | $3.06 \pm 0.12$  | 0.69 |
| Distal diameter                    | $2.63 \pm 0.13$ | $2.49 \pm 0.19$  | 0.11 |
| Target RD                          | $2.83 \pm 0.22$ | $2.80 \pm 0.13$  | 0.90 |
| Minimal luminal diameter           | $2.68 \pm 0.44$ | $2.58 \pm 0.18$  | 0.27 |
| Diameter stenosis (%)              | $8.74 \pm 3.68$ | $13.38 \pm 4.18$ | 0.12 |

RD : reference diameter

**Table 2.** Histomorphometric and immunohistochemistic assessment of porcine coronary arteries

|   | Probucol (n=22)   | Control (n=25)   | p     |
|---|-------------------|------------------|-------|
| Injury score                                    | $1.90 \pm 0.56$   | $1.80 \pm 0.63$  | 0.714 |
| Vessel area (mm <sup>2</sup> )                  | $7.74 \pm 1.04$   | $8.49 \pm 2.45$  | 0.386 |
| Internal elastic lamina area (mm <sup>2</sup> ) | $6.39 \pm 1.08$   | $6.58 \pm 1.99$  | 0.788 |
| Lumen area (mm <sup>2</sup> )                   | $4.99 \pm 1.44$   | $4.95 \pm 1.71$  | 0.961 |
| Neointima area (mm <sup>2</sup> )               | $1.39 \pm 0.62$   | $1.63 \pm 0.56$  | 0.398 |
| Histopathologic stenosis (%)                    | $23.19 \pm 12.39$ | $25.22 \pm 8.22$ | 0.671 |
| PCNA index (%)                                  | $15.94 \pm 1.91$  | $17.82 \pm 1.45$ | 0.191 |
| Endothelialization score                        | $3.0 \pm 0.0$     | $3.0 \pm 0.0$    | 1.00  |
| Inflammation score                              | $1.08 \pm 0.72$   | $1.16 \pm 0.58$  | 0.756 |
| Collagen content in neointima                   | $23.3 \pm 4.2$    | $25.2 \pm 5.1$   | 0.538 |

PCNA : proliferating cell nuclear antigen



**Fig. 2.** Photomicrograph of Hematoxylin/Eosin staining for neointima, Movat pentachrome stain and immunohistochemical staining for proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Hematoxylin/Eosin staining, Movat staining and PCNA staining at 28 days after stenting of control stent (A, B, and C), probucol-loaded BiodivYsio DD stent (D, E, and F). Neointima, histopathologic area stenosis, and PCNA-positive cells were no difference between control stent and probucol-loaded stent. In Movat pentachrome stain, predominant blue colored proteoglycan with minimal yellow colored collagen are shown in the neointima of both stented artery. Magnification  $\times 40$  in A and D,  $\times 200$  in B and E,  $\times 400$  in C and F.

이나 심한 염증 세포의 침착은 관찰되지 않았다(Table 2) (Fig. 2). 양 군에서 신생내막 조직에서 섬유화 조직 및 평활근 세포는 유사하였다. PCNA index로 평가한 신생내막에서의 평활근 세포의 증식은 양 군에서 유의한 차이가 없었다( $15.94 \pm 1.91$  vs.  $17.82 \pm 1.45\%$ ,  $p=0.191$ ). 세포의 기질은 Modified Movat 염색에서 proteoglycan은 청색, collagen은 황색으로 염색되었고, collagen과 proteoglycan이 혼합된 부분은 녹색으로 염색되었다. 양 군에서 신생내막 내 세포의 기질 성분의 차이는 없었다(Table 2) (Fig. 2).

## 고 찰

본 연구는 최근 혈관 보호자의 하나로 재인식되고 있는 probucol이 폴리머 부착 스텐트에 부착 가능하며, in vivo 방출 실험에서 부착 후 72시간까지 폴리머에 부착되어 있는 특징이 있음을 보여 주었다. 그러나 임의로 선택한 50 mg/mL probucol 용액으로부터 폴리머 부착 스텐트에 부착시킨 약 52 ug probucol은 돼지 관상동맥

에서 스텐트 내 재협착 발생을 감소시키는데 효과적이지는 못하였다.

Probucol은 관상동맥 풍선확장술 후 재협착의 발생을 감소시키는데 효과적인 약제이다.<sup>5)6)15)16)</sup> MVP 연구<sup>5)</sup>에서는 probucol은 대조군에 비하여 재협착율은 47%, 그리고 혈관재개통술은 58%를 감소시켰으며, 그 주요 기전은 항산화 효과 등이 확장술 후 혈관 재구도(remodeling)에 이롭게 작용하여 지속적으로 혈관을 확장시키는 것으로 알려진다. 그러나 확장술 전 약 2~4주 동안의 투약이 필요한 점, 풍선확장술 후에 발생하는 탄력 반동(elastic recoil)을 억제하여 혈관 재구도를 향상시키는 스텐트 사용이 증가한 점, 지질강화제로서의 매력의 감소 등으로 인하여 probucol에 대한 관심은 증가되지 못하였다. 그러나 항산화제는 동맥경화 형성의 감소,<sup>17)18)</sup> 혈관 평활근 세포 증식 억제 효과가 있으며,<sup>7)19)20)</sup> probucol은 돼지 관상동맥의 풍선확장술 실험에서 실험 2일 전부터 투여하여 신생내막의 증식을 억제하였다.<sup>7)</sup>

스텐트 재협착에 대한 probucol의 효과에 대한 연구는 많지 않다. Sekiya 등<sup>21)</sup>의 연구에서 스텐트 시술 5

일 전부터 probucol과 cilostazol의 병합 투여는 스텐트 재협착을 감소시켰으나, probucol 단독 투여는 스텐트 재협착 감소 효과가 없었다. 김 등<sup>22)23)</sup>의 연구에서도 probucol은 스텐트 재협착을 억제하지 못하였다. 그러나 최근에 발표된 한 다기관연구(CART-1)에서는 probucol은 스텐트 재협착 발생을 32% 감소시켰다(대조군 37.5%, probucol군 25.5%).<sup>10)</sup> 스텐트 시술 전 2주부터 시술 후 4주 동안 probucol(500 mg, bid)을 투여한 군은 대조군에 비하여 스텐트 시술한 분절에서 lumen volume의 증가와 stent volume의 증가를 초래하였으나, in-stent neointimal volume은 양 군에서 유의한 차이가 없었다. 참조 혈관 분절에서 total vessel volume의 변화, lumen volume의 변화, plaque volume의 변화는 양 군에서 유의한 차이가 없었다. 그래서 probucol 투여 환자에서 스텐트 재협착이 적게 발생하는 기전으로 probucol의 신생내막 증식에 대한 영향보다 probucol에 의하여 스텐트를 시술한 분절의 lumen dimension이 호전되는 것으로 생각하였다. 이러한 probucol에 의한 lumen dimension의 호전 기전으로는 첫째, 풍선확장 직후 유리되는 reactive oxygen species에 의한 oxidative stress를 차단하여 내피기능의 호전과 vasomotor tone의 감소가 즉각적으로 이루어졌으리라는 것과 둘째, probucol이 죽상반을 확장한 부위에서 인접한 혈관으로 종축으로 재분포시키는 역할을 하였으리라는 것으로 추정하였다.

약제부착형 스텐트(drug-coated stent)는 스텐트에 한 가지 이상의 약제를 부착하여 스텐트가 위치하는 조직 내 혹은 주위로 지속적으로 약제가 방출되게 하는 스텐트로서 전신 독작용 없이 혈관손상 부위에 약제를 유효한 고농도로 전달할 수 있는 한 방법이다.<sup>24)</sup> 본 기초 연구는 probucol은 친지질 성질(lipophilic property)이 있어 폴리머에 부착 가능하며 천천히 방출되리라는 가정 하에 스텐트를 이용하여 혈관 벽에 probucol을 전달할 수 있으면 기왕의 연구에서 보여준 시술 전 최소 2주 정도 필요한 probucol의 투여의 효과를 대체할 수 있으리라는 생각에서 시작되었다. 그러나 본 연구에서 probucol이 폴리머 부착 스텐트에 부착 가능하며 in vitro 실험에서 천천히 방출되는 특징을 보여 주었지만, BiodivYsio<sup>TM</sup> DD stent에 부착된 약 52 ug probucol은 돼지 관상동맥에서 스텐트내 협착 발생을 감소시키는 데는 효과적이지 못하였다. 스텐트에 부착한 probucol

이 스텐트 내 협착 발생의 예방에 효과가 없었던 점은 여러 가지의 이유로 생각해 볼 수 있다. 첫째로, probucol의 작용 기전의 문제이다. 비록 CART-1 연구에서 보여준 스텐트 분절의 lumen dimension의 호전에 대한 전신적 효과를 스텐트 부착 probucol로는 보기 어렵다는 점이다. 기존의 임상연구에서 스텐트 재협착 예방에 효과를 보인 약제들은 세포주기의 진행(cell cycle progression)을 억제하여 평활근 세포의 이동과 증식을 억제하는 기전을 가진 약제들이었다.<sup>25-28)</sup> 둘째로, probucol에 노출되는 기간의 문제이다. CART-1 연구<sup>10)</sup>에서 스텐트 시술 직후에서도 probucol 투여군에서 대조군에 비하여 lumen dimension 및 stent area가 증가되어 있는데, 이는 시술 2주 전부터 투여한 probucol의 효과로 설명하였다. 또한 시술 후 4주 동안 투여한 probucol은 신생내막 형성의 감소에는 효과가 없을지라도 oxidative stress와 염증 반응을 감소시켜 추적 검사시 더 양호한 결과를 얻게 되었으리라 생각하였다. 비록 스텐트에 부착한 probucol이 천천히 오랫동안 방출되기는 하나 시술 후 4주 동안 투여한 효과에 미치기는 어려울 것이다. 그러나 약제 부착 스텐트에 이용된 다른 약제들과는 달리 probucol은 경구 복용이 가능하므로 스텐트 시술 전에 probucol의 투여 없이 probucol 부착 스텐트의 시술 후에 4주 동안의 probucol의 병합 투여하는 효과는 향후 연구할 과제이다. 셋째로, 폴리머에서 probucol의 방출 장애의 문제이다. Probucol은 약 40분 내지 60분 이내에 대부분의 양이 방출되는 다른 약제들<sup>29)30)</sup>과는 달리 72시간이 경과하여도 BiodivYsio<sup>TM</sup> DD stent에서 약제 방출이 거의 이루어지지 않았다. 이는 폴리머에서의 약제 방출은 확산(diffusion) 기전에 의하는 것을 생각하면 이례적인 것으로 probucol의 친지질 성질이 in vitro에서 폴리머 부착 스텐트에서의 probucol의 방출에 영향을 미쳤으리라 생각된다. 넷째로, 부적절한 probucol 용량의 문제이다. 본 연구는 임의로 선택한 50 mg/mL probucol 용액으로부터 스텐트에 부착시킨 약 52 ug probucol 단일 용량으로만 진행되었으므로 이보다 고용량 또는 저 용량으로 부착된 probucol의 효과에 대한 연구가 함께 진행되지 못하였다. 더구나, in vivo 방출 특징 및 조직에서의 probucol 농도를 함께 측정하지 못한 제한점이 있다. 또한, 더 많은 숫자의 스텐트를 사용하여 약물 loading test를 시행하지 못하였다.

결론적으로, 본 기초연구는 probucol이 폴리머 부착

스텐트에 부착 가능하며, in vivo 방출 실험에서 부착 후 72시간까지 폴리머에 부착되어 있는 성질을 보여 주었으나, 임의로 선택한 50 mg/mL probucol 용액으로부터 폴리머 부착 스텐트에 부착시킨 약 52 ug probucol은 돼지 관상동맥에서 스텐트 내 협착 발생을 감소시키는데 효과적이지는 못하였다. 그러나 probucol은 혈관 재구도를 향상시킬 뿐 만 아니라 중재술 후 내막상피 재생을 촉진하며 내막 두께를 감소시키는 기능이 새로이 발견되었고 혈관 보호자로 재인식되고 있어서 혈관 중재술 분야에서 새로운 연구 과제로 인식되고 있다.

## 요 약

### 배경 및 목적:

Probucol은 지질강하 효과, 항산화 효과, 그리고 풍선 확장술, 스텐트 시술 후 재협착을 감소시키는 효과 등이 있으며, 최근 '혈관 보호자(vascular protectant)'로 재인식되고 있다. 저자들은 스텐트에 probucol 부착 여부의 가능성과 스텐트에 부착된 probucol의 스텐트 재협착의 억제 효과를 돼지 모형을 이용하여 알아보고자 하였다.

### 방 법:

25~35 kg의 암돼지를 aspirin과 ticlopidine으로 전 처치하고, 스텐트 시술 직전 BiodivYsio DD 스텐트를 50 mg/mL probucol 용액 또는 메탄올(control) 용액이 든 syringe에 5분간 담가서 완전히 적셔지도록 하여 probucol 부착 스텐트를 제작하였다. 총 8마리의 돼지에서 16개의 적당한 직경의 관상동맥을 선택하여 각각 8개의 스텐트를 8~12 기압의 압력으로 혈관이 과확장되도록 삽입하였다. 추적 관상동맥 조영술을 시행 후 돼지를 희생시켜, 스텐트를 함유하고 있는 관상동맥을 분리, 관류고정 한 후 조직병리 관찰 및 측정, 면역조직화학 검사 등을 시행하였다.

### 결 과:

시술과 관련된 합병증은 없었다. 정량적 관상동맥 조영술에서 양 군 간의 차이는 없었다. 조직형태학적 검사에서 양 군에서 세포손상 지수, 외탄력층 면적, 내강 면적, 신생내막 면적은 유의한 차이가 없었고, 유사한 면적 협착이 관찰되었다. 스텐트 분절의 상피재생화는 양 군에서 완전하게 비슷하게 이루어졌고, 상피재생화 지수는 차이가 없었다. 양 군에서 신생내막 조직에서 섬유화

조직 및 평활근 세포는 유사하였다. PCNA index로 평가한 신생내막에서의 평활근 세포의 증식은 양 군에서 유의한 차이가 없었다( $15.94 \pm 1.91$  vs.  $17.82 \pm 1.45\%$ ,  $p=0.191$ ).

### 결 론:

Probucol은 폴리머 부착 스텐트에 부착 가능하며, 또한 부착 후 72시간까지 폴리머에 부착되어 있는 성질을 보여 주었으나, 스텐트에 부착시킨 약 52 ug probucol은 돼지 관상동맥에서 스텐트 내 협착 발생을 감소시키는데 효과적이지는 못하였다.

**중심 단어:** 프로부콜; 관상동맥 질환; 재협착; 스텐트; 항산화제.

## REFERENCES

- 1) Serruys PW, de Jaegere P, Kiemeneij F, Macaya C, Rutsch W, Heyndrickx G, Emanuelsson H, Marco J, Legrand V, Materne P. A Comparison of balloon-expandable stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary heart disease. *N Engl J Med* 1994;331:489-95.
- 2) Fischman DL, Leon MB, Baim DS, Schatz RA, Savage MP, Penn I, Detre K, Veltri L, Ricci D, Nobuyoshi M. A randomized comparison of coronary stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. *N Engl J Med* 1994;331:496-501.
- 3) Pfuetze KD, Dujovne CA. Probucol. *Curr Atheroscler Rep* 2000;2:47-57.
- 4) Parthasathy S, Young SG, Witztum JL, Pittman RC, Steinberg D. Probucol inhibits oxidative modification of low density lipoprotein. *J Clin Invest* 1986;77:641-4.
- 5) Tardif JC, Cote G, Lesperance J, Bourassa M, Lambert J, Doucet S, Bilodeau L, Nattel S, de Guise P. Probucol and multivitamins in the prevention of restenosis after coronary angioplasty. *N Engl J Med* 1997;337:365-72.
- 6) Watanabe K, Sekiya M, Ikeda S, Miyagawa M, Hashida K. Preventive effects of probucol on restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Am Heart J* 1996;132:23-9.
- 7) Cote G, Tardif JC, Lesperance J, Lambert J, Bourassa M, Bonan R, Grosselin G, Joyal M, Tanguay JF, Nattel S, Gallo R, Crepeau J. Effect of probucol on vascular remodeling after coronary angioplasty. *Circulation* 1999;99:30-5.
- 8) Schneider JE, Berk BC, Gravanis MB, Santoian EC, Cipolla GD, Tarazona N, Lassegue B, King SB 3rd. Probucol decreases neointimal formation in a swine model of coronary artery balloon injury: a possible role for anti-oxidants in restenosis. *Circulation* 1993;88:628-37.
- 9) Wasserman MA, Sundell CL, Kunsch C, Edwards D, Meng CQ, Medford RM. Chemistry and pharmacology of vascular protectants: a novel approach to the treatment of atherosclerosis and coronary artery disease. *Am J Cardiol* 2003;91:344-40A.
- 10) Tardif JC, Gregoire J, Schwartz L, Title L, Laramée L, Reeves F, Lesperance J, Bourassa MG, L'Allier PL, Glass M,

- Lambert J, Guertin MC. *Effects of AGI-1067 and probucol after percutaneous coronary interventions. Circulation* 2003; 107:552-8.
- 11) Ahn YK, Jeong MH, Kim JW, Kim SH, Cho JH, Park CS, Jung SW, Park JC, Kang JC. *Preventive effects of heparin-coated stent on restenosis in the porcine model. Catheter Cardiovasc Interv* 1999;48:324-30.
- 12) Kornowski R, Hong MK, Tio FO, Bramwell O, Wu H, Leon MB. *In-stent restenosis: contributions of inflammatory responses and arterial injury to neointimal hyperplasia. J Am Coll Cardiol* 1998;31:224-30.
- 13) Suzuki T, Kopia G, Hayashi S, Bailey LR, Llanos G, Wilensky R, Klugherz BD, Papandreou G, Narayan P, Neon MB, Yeung AC, Tio F, Tsao PS, Falotico R, Carter AJ. *Stent-based delivery of sirolimus reduces neointimal formation in a porcine coronary model. Circulation* 2001;104:1188-93.
- 14) Tjurnin AV, Ananyeva NM, Smith EP, Gao Y, Hong MK, Leon MB, Haudenschild CC. *Studies on the histogenesis of myxomatous tissue of human coronary lesions. Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:83-97.
- 15) Yokoi H, Daida H, Kuwabara Y, Nishikawa H, Takatsu F, Tomihara H, Nakata Y, Kutsumi Y, Ohshima S, Nishiyama S, Seki A, Kato K, Nishimura S, Kanoh T, Yamaguchi H. *Effectiveness of an antioxidant in preventing restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. J Am Coll Cardiol* 1997;30:855-62.
- 16) Lee YJ, Daida H, Yokoi H, Miyano H, Takaya J, Sakurai H, Mokuno H, Yamaguchi H. *Effectiveness of probucol in preventing restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. Jpn Heart J* 1996;37:327-32.
- 17) Kita T, Nagano Y, Yokode M, Ishii K, Kume N, Ooshima A, Yoshida H, Kawai C. *Probucol prevents the progression of atherosclerosis in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit, an animal model for familial hypercholesterolemia. Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:5928-31.
- 18) Carew TE, Schwenke DC, Steinberg D. *Antiatherogenic effect of probucol unrelated to its hypercholesterolemic effect: evidence that antioxidants in vivo can selectively inhibit low density lipoprotein degradation in macrophage-rich fatty streaks slowing the progression of atherosclerosis in the WHHL rabbit. Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:7725-9.
- 19) Freyschuss A, Stiko-Rahm A, Swedenborg J, Henriksson P, Bjorkhem I, Berglund L, Nilsson J. *Antioxidant treatment Inhibits the development of intimal thickening after balloon injury of the aorta in hypercholesterolemic rabbits. J Clin Invest* 1993;91:1282-8.
- 20) Boscoboinik D, Szweczyk A, Hensey C, Azzi A. *Inhibition of cell proliferation by alpha-tocopherol: role of protein kinase C. J Biol Chem* 1991;266:6188-94.
- 21) Sekiya M, Furuda J, Watanabe K, Miyagawa M, Akutsu H. *Effects of probucol and cilostazol alone and in combination on frequency of poststenting restenosis. Am J Cardiol* 1998; 82:144-7.
- 22) Kim NH, Jeong MH, Kim W, Kim YR, Lee SU, Kim KH, Cho JH, Park JC, Na KJ, Ahn YK, Cho JG, Ahn BH, Kang JC. *The effects of probucol combined with antiplatelets on the coronary stented patients. Korean Circ J* 2000;30:811-8.
- 23) Kim MH, Cha KS, Han JY, Kim HJ, Kim JS. *Effect of antioxidant probucol for preventing stent restenosis. Catheter Cardiovasc Intervent* 2002;57:424-8.
- 24) Schwartz RS, Edelman ER, Carter A, Chronos N, Rogers C, Robinson KA, Waksman R, Weinberger J, Wilensky RL, Jensen DN, Zuckerman BD, Virmani R. *Drug-eluting stents in preclinical studies: recommended evaluation from a consensus group. Circulation* 2002;106:1867-73.
- 25) Braum-Dullaues RC, Mann MJ, Dzau VJ. *Cell cycle progression: new therapeutic target for vascular proliferative disease. Circulation* 1998;98:82-9.
- 26) Sousa JE, Costa MA, Sousa AG, Abizaid AC, Seixas AC, Abizaid AS, Feres F, Mattos LA, Falotico R, Jaeger J, Popma JJ, Serruys PW. *Two-year angiographic and intravascular ultrasound follow-up after implantation of sirolimus-eluting stents in human coronary arteries. Circulation* 2003;107:381-3.
- 27) Hong MK, Mintz GS, Lee CW, Song JM, Han KH, Kang DH, Song JG, Kim JJ, Weissman NJ, Fearnot NE, Park SW, Park SJ. *Paclitaxel coating reduces in-stent intimal hyperplasia in human coronary arteries. Circulation* 2003;107:517-20.
- 28) Park SJ, Shim WH, Ho DS, Raizner AE, Park SW, Hong MK, Lee CW, Choi D, Jang Y, Lam R, Weissman NJ, Mintz GS. *A paclitaxel-eluting stent for the prevention of coronary restenosis. N Engl J Med* 2003;348:1537-45.
- 29) Armstrong J, Gunn J, Arnold N, Malik N, Chan KH, Vick T, Stratford P, Cumberand DC, Holt CM. *Angiopeptin-eluting stents: observations in human vessels and pig coronary arteries. J Invasive Cardiol* 2002;14:230-8.
- 30) New G, Moses JW, Roubin GS, Leon MB, Colombo A, Iyer SS, Tio FO, Mehran R, Kipshidze N. *Estrogen-eluting, phosphorylcholine-coated stent implantation is associated with reduced neointimal formation but no delay in vascular repair in a porcine coronary model. Catheter Cardiovasc Interv* 2002;57:266-71.