

Periadventiciální systém s řízeným uvolňováním sirolimu pro prevenci neointimální hyperplazie u autologních žilních štěpů

Ivo Skalský¹, Ondrej Szárszoi¹, Elena Filová^{2,3}, Martin Pařízek^{2,3}, Andriy Lytvynets², Jana Malušková⁴, Alena Lodererová⁴, Jana Olšovská^{5,8}, Zdeněk Kameník⁵, Eduard Brynda⁶, Zdeněk Plichta⁶, Tomáš Riedel⁶, Věra Lisá², Zuzana Burdíková², Martin Čapek², Ľubica Grausová², Tomáš Suchý⁷, Jan Pirk¹, Lucie Bačáková^{2,3}

¹ Klinika kardiovaskulární chirurgie, Institut klinické a experimentální medicíny, ² Fyziologický ústav, AV ČR,

³ Centrum výzkumu chorob srdce a cév, ⁴ Pracoviště klinické a transplantace patologie, Institut klinické a experimentální medicíny,

⁵ Mikrobiologický ústav, AV ČR, ⁶ Ústav makromolekulární chemie, AV ČR,

⁷ Ústav struktury a mechaniky hornin, AV ČR, ⁸ Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, Praha, Česká republika

Skalský I, Szárszoi O, Filová E, et al. **Periadventiciální systém s řízeným uvolňováním sirolimu pro prevenci neointimální hyperplazie u autologních žilních štěpů.** *Cor Vasa* 2011;53:84–90.

Cíl: Autologní žilní štěpy jako aortokoronární bypass často podléhají intimální hyperplazii a v důsledku toho vznikají zúžení a uzávěry. Cílem práce bylo zamezení intimální hyperplazie pomocí nově vyvinutého perivaskulárního systému, který dlouhodobě uvolňuje sirolimus.

Metodika: Systém s řízeným uvolňováním tvoří polyesterová síťka potažená kopolymerem kyseliny L-mléčné a ε-kaprolaktonu uvolňující sirolimus, která je určena na ovinutí kolem autologního žilního štěpu současně při jeho implantování. Hodnotili jsme uvolňování sirolimu a jeho účinky na hladké svalové a endoteliální buňky *in vitro*. Síťky s řízeným uvolňováním sirolimu byly implantovány do a. carotis com. králíků a následně byla hodnocena neointimální hyperplazie žilních graftů po třech a šesti týdnech.

Výsledky: Polyesterová síťka potažená kopolymerem uvolňovala *in vitro* sirolimus šest týdnů. Sirolimus uvolňovaný ze sítky inhiboval růst hladkých svalových buněk i endotelových buněk v sedmidenních experimentech *in vitro*. Počet hladkých svalových buněk klesl o 29 % a počet endotelových buněk o 75 % po sedmi dnech uvolňování sirolimu ze sítky při zachování vysoké viability buněk. Po implantaci sítěk uvolňujících sirolimus do králíků došlo ke snížení tloušťky intimy o 47 % po třech týdnech a o 56 % po šesti týdnech od implantace ve srovnání s žilou. Implantovaná čistá síťka bez sirolimu snížila tloušťku intimy o 35 % po třech týdnech a o 46 % po šesti týdnech.

Závěry: Systém řízeného uvolňování sirolimu určený k periadventiciální aplikaci u autologních žilních štěpů inhiboval růst hladkých svalových buněk *in vitro* a zabránil rozvoji neointimální hyperplazie *in vivo* u králíků. Perivaskulárně aplikovaná síťka uvolňující sirolimus je proto slibným prostředkem pro prevenci vzniku stenóz a uzávěrů autologních cévních štěpů.

Klíčová slova: Jugulární žíly – Sirolimus – Nosiče léků – Autologní transplantace – Restenóza

Skalský I, Szárszoi O, Filová E, et al. **A periadventitial sirolimus-eluting system in the prevention of neointimal hyperplasia in autologous venous grafts.** *Cor Vasa* 2011;53:84–90.

Aim: Autologous venous grafts such as coronary artery bypass grafts often develop intimal hyperplasia resulting in stenoses and occlusions. The aim of our study was to prevent the development of intimal hyperplasia using a novel perivascular system allowing for long-term release of sirolimus.

Method: The controlled-release system comprises a polyester mesh coated with a sirolimus-eluting copolymer of L lactic acid and ε-caprolactone system designed to be wrapped around an autologous venous graft during its implantation. *In vitro* sirolimus release and its effects on smooth muscle and endothelial cells were assessed. The sirolimus controlled-release mesh was implanted into the common carotid arteries of rabbits with subsequent assessment of venous graft neointimal hyperplasia at 3 and 6 weeks.

Results: *In vitro*, the copolymer-coated polyester mesh released sirolimus over a period of 6 weeks. Mesh-eluted sirolimus inhibited the growth of smooth muscle and endothelial cells in seven-day *in vitro* experiments. After seven days of sirolimus release from the mesh, smooth muscle and endothelial cell counts decreased by 29% and 75%, respectively, with the cells maintaining high viability. Implantation of the sirolimus-release mesh to rabbits resulted in a decrease in intimal thickness by 47% and 56% at 3 and 6 weeks, respectively, compared with the venous intima. After implantation of a sirolimus-free mesh, intimal thickness declined by 35% and 46% at 3 and 6 weeks, respectively.

Conclusion: A sirolimus controlled-release system intended for periadventitial use in autologous venous grafts inhibited the growth of smooth muscle cells *in vitro* and precluded the development of neointimal hyperplasia *in vivo* in rabbits. Hence, the perivascular sirolimus-eluting mesh holds promise for preventing the development of stenoses and occlusions in autologous vascular grafts.

Key words: Jugular veins – Sirolimus – Drug carriers – Autologous transplantation – Restenosis

Adresa: MUDr. Ivo Skalský, Klinika kardiovaskulární chirurgie, IKEM, Vídeňská 1958/9, 140 21 Praha 4, e-mail: ivo.skalsky@ikem.cz

Podporováno grantovou agenturou IGA MZ č. projektu ČR NR9358, Centrem výzkumu chorob srdce a cév č. 1M6798582302 a výzkumným záměrem AV0Z50110509.

Úvod

Jednou z hlavních komplikací po aortokoronární rekonstrukci žilními štěpy pro ischemickou chorobu srdeční (ICHS) je v dlouhodobém sledování jejich uzávěr. Během prvního roku po rekonstrukci se uzavírá 15 % žilních štěpů a dále se četnost uzávěrů zvyšuje až na 50 % za deset let od operace.¹ Z průchodných žilních štěpů jich 7 % jeví známky degenerace již během prvního roku a 77 % za deset let.² Jednou z nejdůležitějších morfologických změn v žilní stěně, která se objevuje ihned po provedení bypassu, je neointimální hyperplazie. Konečným důsledkem tohoto procesu a příčinou selhání štěpu jsou fatální sklerotické změny.³ Remodelace autologních žil po jejich užití jako bypassu v tepenném řečišti je charakterizována poškozením vrstvy endoteliálních buněk a expozicí hladkých svalových buněk (HSB) na lumenální povrch cévy, což způsobuje adhezi destiček, makrofágů a regenerujících endoteliálních buněk (EB), jakož i agregaci destiček. Destičky, EB a HSB uvolňují růstové faktory a faktory podporující migraci, jako je trombin, platelet-derived growth factor (PDGF), interleukin-1, insulin-like growth factor-1, fibroblast growth factor-2 a vascular endothelial cell growth factor. Tyto bioaktivní substance stimulují migraci HSB do intimy, jejich nadměrnou proliferaci a produkci extracelulární matrix, zejména kolagenu. Tyto jevy pak způsobí ztluštění stěny bypassu a stenózu štěpu. Aby se předešlo remodelaci autologního štěpu, je nutné podpořit proces jeho endotelizace a snížit proliferaci HSB. Štěp bývá úplně endotelizován během několika týdnů po operaci.⁴ V klinické kardiologické praxi se stenóza autologního štěpu obvykle řeší vložením stentu (perkutánní transluminální angioplastikou) do lumen štěpu, nebo je nutná reoperace pacienta a provedení nového aortokoronárního bypassu. Pro prevenci proliferace HSB a restenózy štěpu byly vyvinuty stenty uvolňující antiproliferační látky, jako je sirolimus (Cypher, Cordis Johnson & Johnson, Bridgewater, New Jersey) nebo paclitaxel.⁵ Použití stentů je však limitováno jejich relativně komplikovaným zaváděním, nebezpečím jejich uvolnění a pohybu uvnitř cévy, zvýšeným mechanickým namáháním cévní stěny i lokálním poškozením EB a HSB, vedoucím k reaktivaci růstu HSB a restenóze cévy. Podobné problémy by mohly být spojeny s polymerními filmy uvolňujícími léčivo, které pokrývají lumenální povrch cév, např. hydrogelové filmy s obsahem paclitaxelu.⁶ Z toho hlediska se externí, tj. mimocévní systém dodávky léčiva, umístěný na povrchu adventicie cévního štěpu, zdá být výhodnější. Periadventiciální dodávka léčiva z matrice umístěné těsně vedle karotických arterií potkana byla úspěšně použita u heparinu, o kterém je známo, že snižuje proliferaci HSB.⁷ Již dříve byly objeveny jiné antiproliferační látky inhibující neointimální hyperplazii žilních graftů na experimentálních modelech u zvířat při jejich periadventiciální aplikaci, například suramin, C-typ natriuretického peptidu, cilostazol a sirolimus.^{8–10} Speciálně sirolimus (rapamycin) je znám svým silným antiproliferačním účinkem.¹¹ Dále se tento makrocyclický

lakton používá v lékových stentech (drug-eluting stentech)⁵ a při orgánových transplantacích jako imunosupresivum.¹¹ Mechanismus jeho antiproliferačního účinku je velice složitý a mnohostranný¹² a zahrnuje především blokádu přechodu buněk G1 do S-fáze buněčného cyklu, interakci se specifickým cílovým proteinem (mammalian target of rapamycin – mTOR) a inhibici jeho aktivace.

Sítka určená k potahování vhodným polymerem s rozpuštěným léčivem musí mít potřebné mechanické vlastnosti dovolující ovinutí kolem cévy, důležitá je i pružnost polymerní vrstvy. Polylaktidy i poly(ϵ -kaprolakton) (PCL) degradují velmi pomalu, v řádu let; PCL je poměrně pružný a oba polymery jsou biokompatibilní. Kinetika uvolňování léčiva závisí na fyzikálních a chemických vlastnostech léčiva, volbě polymeru nebo kopolymeru a jejich uspořádání do vrstev s léčivem nebo bez něho, jakož i přítomnosti bariér regulujících difuzi a velikost povrchu sítky.¹³ Naším předpokladem bylo, že cévní stěna je dostatečně tenká, aby umožnila difuzi uvolněného sirolimu do tunica media a inhibici proliferace HSB. Penetrace sirolimu je podporována jeho hydrofobíí. Účinná koncentrace sirolimu potřebná k inhibici proliferace HSB je relativně nízká (IC₅₀ = 5 ng/ml)¹⁴ a umožňuje v polymeru dispergovat příslušné množství léčiva nutné k dlouhodobému uvolňování (v rozmezí čtyř až šesti týdnů). Zevní obalení cévy polyesterovou sítvou uvolňující sirolimus zabezpečí, že endoteliální vrstva bude touto látkou ovlivněna méně než v případě intravaskulárního stentu, který se těsně dotýká endotelu. Rovněž předpokládáme, že ovinutí poměrně pevné sítky kolem cévy sníží mechanické namáhání autologního štěpu ve srovnání se stentem. Dlouhodobé uvolňování antiproliferačního léčiva sirolimu během několika týdnů potlačí růst HSB na dobu potřebnou k reendotelizaci štěpu. To by mělo snížit remodelaci autologního štěpu a nutnost následné léčby.

Materiál a metody

Pokusy *in vitro*

Materiál

Polyesterová síťka (Duratexol) byla získána z VÚP Brno, ČR, Purasorb PLC 7015, kopolymer kyseliny L-mléčné a ϵ -kaprolaktonu (molární poměr 70/30, Mw 117 250 g/mol a Mn 85 000 g/mol z PURAC Biomaterials) a sirolimus (Rapamycin from Streptomyces, kat. č. R0395) byly zakoupeny z firmy Sigma-Aldrich (Německo). Polyesterová síťka byla vyrobena z příze o průměru 90 μ m, která se skládá z vláken o průměru 17,5 μ m. Purasorb při potahování pronikl mezi vlákna v přízi.

Impregnace sítěk

Čistá polyesterová síťka byla použita bez impregnace, nebo byla impregnována roztokem č. 1 s rozpuštěným purasorbem, nebo roztokem č. 2 s rozpuštěným purasorbem a sirolimem, vysušena, znovu impregnována a vysušena. *Roztok 1* obsahoval 36,4 mg purasorbu v 1 ml směsi chlor-

benzen–ethanol (1,75 : 1 v/v); roztok 2 5,2 mg sirolimu a 36,4 mg purasorbu v 1 ml směsi chlorbenzen–ethanol (1,75 : 1 v/v). Síťka *sirolimus* obsahovala 0,14 mg sirolimu homogenně nanesených v 0,98 mg purasorbu na 1 cm².

Měření uvolňování sirolimu ze sítěk

Připravené kousky sítěk se sirolimem o velikosti 0,5 cm² nebo 1 cm² byly inkubovány v 5 ml fosfátového pufru (PBS) na cm² sítěk při 37 °C na třepačce. Fosfátový pufr byl denně měněn. Vzorky byly odebírány po 0, 1, 4, 7, 9, 11, 14, 17, 21, 28, 35, a 42 dnech inkubace. Pro každý časový interval a každou skupinu jsme použili tři až čtyři vzorky.

Po vysušení sítěk byl polymer se sirolimem rozpuštěn v dichlormethanu, rozpouštědlo bylo následně odpařeno do sucha. Sirolimus byl rozpuštěn v 1 ml methanolu, centrifugován 5 min při 13 000 rpm a supernatant byl ihned analyzován pomocí systému Acquity UPLC vybaveného detektorem 2996 PDA. Chromatogramy analýz sirolimu byly extrahovány a následně kvantifikovány při 278 nm. Naměřené údaje byly zpracovány pomocí softwaru Empower 2 (Waters). Vzorky byly injikovány na kolonu Waters BEH C18 Column (50 × 2,1 mm I.D., velikost částic 1,7 μm); mobilní fáze: rozpouštědlo A, 10% acetonitril a rozpouštědlo B, acetonitril; lineární gradientová eluce (min/%B): 0/60, 1,5/100, 2/100; rychlost průtoku 0,4 ml/min; teplota kolony 50 °C; objem injekce 5 μl. Po každé analýze následovala ekvilibrace (0,5 min). Metoda kvantifikace sirolimu byla částečně validována; kalibrační křivka byla sestavena v lineárním rozmezí od 3,125 do 100 μg/ml pomocí methanolvých roztoků sirolimu o koncentraci 100, 50, 25, 12,5, 6,3 a 3,1 μg/ml.

Množství zbytku neuvolněného sirolimu v síťce X [μg/cm²] bylo počítáno podle vzorce: $X = C_{UPLC} \times 3,97 / m$, kde C_{UPLC} [μg/ml] představuje koncentraci sirolimu extrahovanou z jednoho kusu sítěk a měřenou pomocí UPLC, m představuje hmotnost analyzované sítěk po extrakci a bez vrstvy purasorbu se sirolimem, konstanta 3,97 představuje hmotnost 1 cm² čisté sítěk bez purasorbu a sirolimu.

Kultivace buněk

Polyesterová síťka (*síť*), polyesterová síťka potažená purasorbem (*purasorb*) a síťka potažená purasorbem se sirolimem (*sirolimus*) byly sterilizovány ethylenoxidem a sušeny ve vakuu čtyři týdny při 35 °C. Do kultivačních komůrek (24jamkové destičky, TPP, Švýcarsko) byly nasazeny EB nebo HSB v hustotě 16 000 buněk/jamku, tj. asi 9 000 buněk/cm² v 1,5 ml kultivačního média. HSB byly kultivovány v médiu DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium, Sigma, St. Louis, MO, USA; kat. č. D5648), obohaceném 10 % fetálního bovinního séra (FBS; Sebak GmbH, Aidenbach, Německo), a 40 μg/ml gentamicinu (Lek, Ljubljana, Slovinsko), EB v médiu (Minimum Essential Medium Eagle), obohaceném 2 mM L-glutaminu, Earle's Balanced Salt Solution 1,5 g/l sodium bikarbonátu, 0,1 mM neesenciálních aminokyselin, 1,0 mM sodium pyruvátu (všechny chemikálie: Sigma, USA) a 20% FBS. Hladké svalové buňky byly získány explantační metodou

z komplexu intima-media hrudní aorty osmítýdenních samců potkanů Wistar SPF15 a použity v 5–10 pasážích. Endoteliální buňky pocházely z hovězí plicní arterie (linie CPAE ATCC CCL-209, Rockville, MA, USA). Dvacet čtyři hodin po zahájení léčby byly do média přidány vzorky sítěk; polystyren (PS) sloužil jako kontrola. Buňky byly kultivovány 1, 3 nebo 8 dní po nasazení ve zvlhčené atmosféře s 5% CO₂. Tři vzorky byly použity pro každou skupinu a každý časový interval.

Životaschopnost a počet buněk

Pro vizualizaci životaschopnosti (angl. *viability*) buněk byl použit Live/Dead Viability/Cytotoxicity Assay Kit (Molecular Probes, Invitrogen). Vzorky byly inkubovány s roztokem calceinu v PBS v inkubátoru s 5% CO₂ při 37 °C po dobu 15 min (živé buňky calcein metabolizují a svítí zeleně, excitace 488 nm, emise 505–535 nm) a s roztokem tetrameru ethidia (prochází membránou poškozených a mrtvých buněk a barví je červeně, excitace 539 nm, emise 638–699 nm). K pozorování byl použit fluorescenční mikroskop Olympus IX 71, kamera DP 71. Počet živých a mrtvých buněk byl počítán z 30–52 zorných polí a životaschopnost (*viability*) buněk jako procento živých buněk.

Pokusy *in vivo*

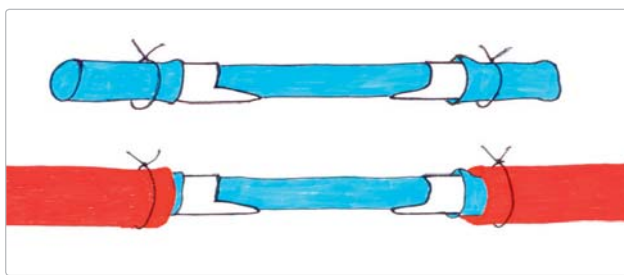
Metodika

Studie byla před zahájením schválena odbornou komisí podle zákona na ochranu zvířat proti týrání. Z operovaných králíků jsme vytvořili tři skupiny pro sledování po třech, respektive šesti týdnech. V každé skupině jsme vytvořili kontrolní soubor, tj. autologní žílu bez sítěk (žíla_3, žíla_6), soubor pro sledování působení čisté polyesterové sítěk bez sirolimu (síť_3, síť_6) a poslední soubor pro sledování působení sirolimu na nosiči s polyesterovým obalem (*sirolimus_3*, *sirolimus_6*). V každé skupině jsme měli šest až deset zvířat randomizovaných k jednotlivým pokusům.

Chirurgická technika

K pokusu *in vivo* byl vybrán model implantace jugulární žíly do tepenného řečiště a. carotis communis u králíka. Jednak pro svoji jednoduchost a jednak pro odpovídající velikost cév k poměru ok na polyesterové síťce.

Králíci byli uvedeni do anestezie intramuskulární injekcí ketaminu (30 mg/kg). Poté jsme pokračovali s inhalační anestézií pomocí isofluranu (2,5–3%). Operační výkon jsme prováděli za aseptických podmínek v chráněném koagulu (7 mg/kg cefalexin i.m.). Nejprve jsme z podélného řezu na krku vypreparovali v. jugularis externa a po podání heparinu v dávce (300 j./kg) jsme ji odebrali v délce cca 1,5 cm. Do odebrané cévy jsme postupně na oba konce pomocí ligatury Surgilene 8/0 přichytili stenty vyrobené z katetrizačních cévek vel. 4 Fr. (Terumo Medical Corp, Elkton, MD, USA) (*obrázek 1*).¹⁶ Poté jsme vypreparovali a. carotis communis na stejné straně a po zasvorkování jsme ji částečně natnuli a do proximálního a distálního konce jsme reverzně umístili připravenou žílu a opět přes stent



Obrázek 1 Chirurgická technika implantace žilního graftu jako interpozita do arteriálního řečiště¹³

ligaturou fixovali. Po uvolnění krevního proudu jsme kontrolovali rozvinutí žilního štěpu a dále dle určené skupiny pokračovali s obalením cévy sítvou a její fixací (obrázky 1, 2). Poté byla rána uzavřena po anatomických vrstvách.

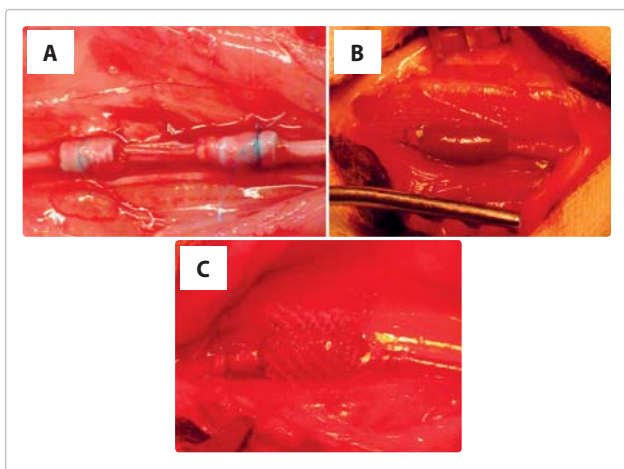
Odběr vzorků po třech a šesti týdnech jsme prováděli v celkové narkóze (ketamin 50 mg/kg + xylazin 4 mg/kg s.c.). Euthanasie byla provedena po odběru vzorků před probráním z narkózy podáním přípravku k euthanasii T 61.

Histologie a histomorfometrická analýza

Vzorky explantovaných štěpů z králíků byly zality do parafínu, pokrájeny na 3–4 µm řezy a obarveny podle van Giesona s elastikou. Obarvené preparáty byly nafoceny pod mikroskopem Olympus IX 51, DP 70. Tloušťka intimy byla měřena z 12–28 zorných polí na králíka, celkově 32–84 měření na jednoho králíka pomocí plug-in modulu MeasureStackLines softwaru Ellipse (ViDiTo Systems, Slovensko). Cévní štěpy s přítomnými tromby nebyly měřeny.

Statistická analýza

Kvantitativní data byla prezentována jako aritmetický průměr ± SEM (standard error of mean, standardní směrodatná odchylka). Na statistické analýzy byl použit program SigmaStat (Aspire Software International, Ashburn, VA, USA), postup mnohočetných analýz – jednocestná ANOVA a metoda podle Studenta-Newmana-Keulse. Za významnou byla považována hodnota významnosti $p \leq 0,05$.



Obrázek 2 Žilní graft v arteriálním řečišti před uvolněním krevního proudu do rekonstrukce (A), uvolnění krevního proudu a počáteční dilatace žilního štěpu – kontrolní skupina (B) a aplikace periadventiciálního obalu – sítky na rozvinutou cévu (C)

Výsledky

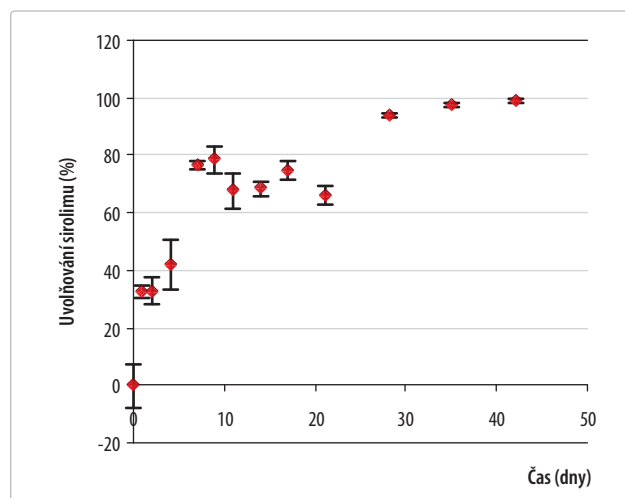
Uvolňování sirolimu ze sítvy a inhibice proliferace buněk

Sirolimus se uvolňoval ze sítvy po dobu šesti týdnů, s iniciálním rychlým uvolněním asi 70 % léčiva v průběhu prvních sedmi dnů a pozvolným uvolňováním zbytku léčiva dalších pět týdnů (obrázek 3). Live/Dead barvení ukázalo výbornou životaschopnost HSB v přítomnosti uvolněného sirolimu ze sítvy v kultuře, která byla 86,1 % druhý den, respektive 97,6 % sedmý den po přidání sítěk (obrázek 4); u EB byla viabilita buněk 92,3 % druhý den a 65 % sedmý den po přidání sítěk. U kontrolních čistých polyesterových sítěk (sít) a sítěk potažených kopolymerem (purasorb) byla životaschopnost obou typů buněk vyšší než 93,8 %.

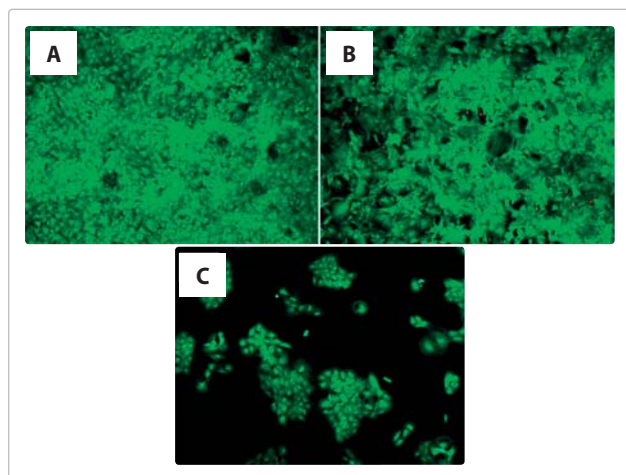
Uvolňující se sirolimus v *in vitro* experimentu inhiboval růst HSB i EB buněk v průběhu sedmidenní kultivace. Počet HSB byl nižší o 22 % druhý den, respektive o 29 % sedmý den kultivace se *sirolimem* v porovnání s polystyrenem (obrázek 5A). Počet EB klesl o 7 % druhý den a o 75 % po sedmi dnech po přidání sítěk (obrázek 5B). U kontrolních vzorků sítěk (sít) a purasorb) byl počet buněk stejný jako u polystyrenu.

Histologie a histomorfometrická analýza

Histologické barvení explantovaných cévních štěpů ukázalo vrůstání sítvy do adventicie cévy (obrázky 6B, 6C). Na základě histomorfometrické analýzy byla zjištěna u obou časových intervalů největší tloušťka intimy u samotné žíly bez sítvy, přičemž bylo pozorováno její další ztlustění o 26 % po šesti týdnech (obrázek 7). U autologních štěpů ovinutých sítvou bez sirolimu (sít) byla intima tenčí o 35 % po třech týdnech, respektive o 46 % po šesti týdnech. Signifikantně nejnižší hodnota byla naměřena u autologních štěpů ovinutých sítvou uvolňující sirolimus. Tloušťka intimy se oproti autologní žíle snížila o 47 % po třech týdnech, respektive o 56 % po šesti týdnech.



Obrázek 3 Kumulované uvolňování sirolimu z polyesterové sítvy ve fosfátovém pufru v průběhu šestitýdenní inkubace. Hodnoty jsou prezentovány jako aritmetický průměr ± SEM.

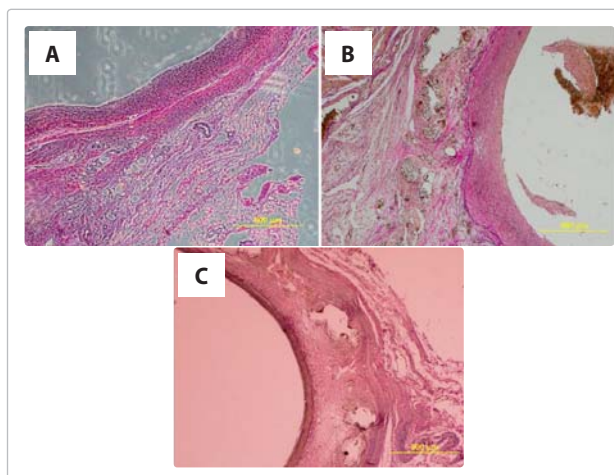


Obrázek 4 Hladké svalové buňky barveny pomocí „Live/Dead eseje“, tj. živé buňky zeleně, mrtvé červeně na polystyrenu pro tkáňovou kulturu (A), na polystyrenu po přidání polyesterové sítě potažené purasorbem (B) a na polystyrenu po přidání sítě uvolňující sirolimus (C) sedmý den po přidání sítě, tj. osmý den po zahájení léčby. Měřítka = 500 μ m. Mikroskop Olympus, IX 71, kamera DP 71.

Diskuse

V tomto sdělení jsme potvrdili naši hypotézu a vytvořili jsme unikátní periadventiciální systém s postupným uvolňováním antiproliferační látky (sirolimus), který inhiboval neointimální hyperplazii v žilních štěpech implantovaných do tepenného řečiště. Na mechanismu působení se podílely mechanický obal cévy a poté uvolňování sirolimu.

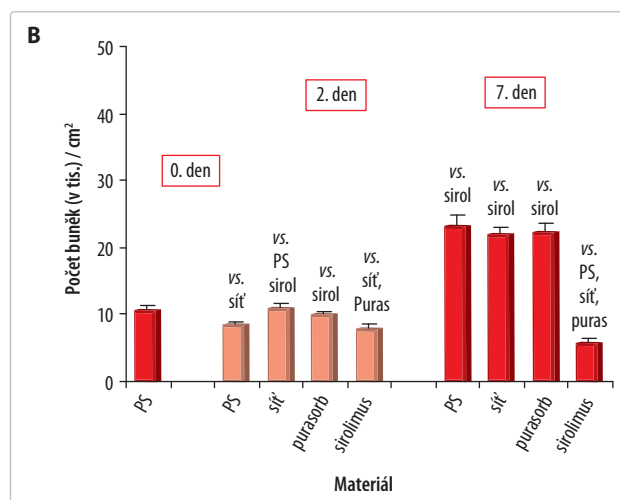
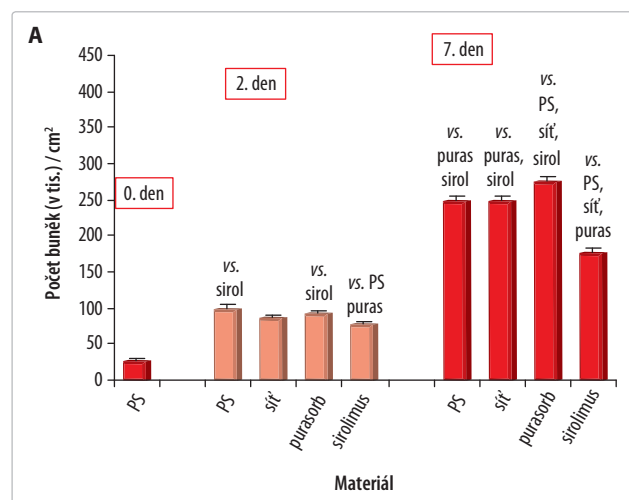
Zevní obal cévy je vytvořen polyesterovou sítí, která působí preventivně proti rozpínání žilního štěpu. Sítka působí podobně jako zevní elastická membrána nativních arterií, která jim pravděpodobně umožňuje snášet vyšší tlaky v tepenném řečišti. Remodelace je homeostatická odpověď normálních arterií na změny charakteru průtoku krve pomocí smrštění jejich stěny. To umožňuje snížit napětí a tlak



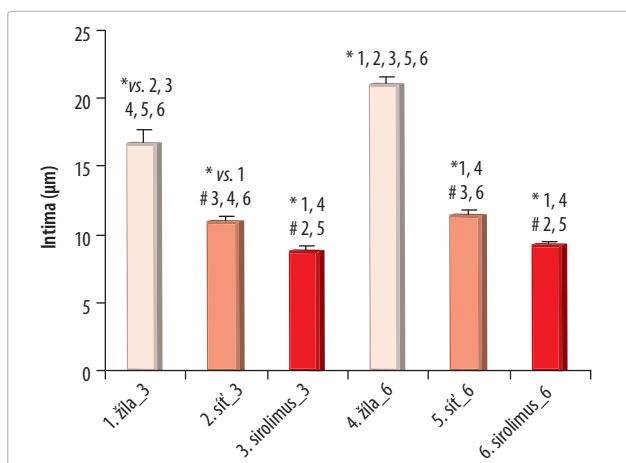
Obrázek 6 Autologní žilní štěp (žíla, A), autologní žilní štěp s polyesterovou sítí (sít, B) a autologní žilní štěp s polyesterovou sítí uvolňující sirolimus (sirolimus, C) po třech týdnech implantace v králících, barvení van Gieson a elastika, objektiv $\times 4$, měřítko = 500 μ m, mikroskop Olympus IX51, digitální kamera DP70

na stěnu cévy a vrátit se na normální hodnoty tlaků působících v lumen cévy. Mehta a spol.¹⁷ demonstrovali ve své práci, že zevní umístění makroporézního, nerestriktivního polyesterového stentu redukuje neointimální hyperplazii na modelu prasečích žilních graftů. V případě identického tlaku uvnitř žíly se zevním mechanickým obalem a bez něj, za předpokladu, že poloměr oka odpovídá 1/10 poloměru žíly, je napětí ve stěně v chráněném žilním štěpu 20krát menší než napětí stěny v žíle bez ochrany.¹⁸ V mechanismu tvorby neointimy hraje důležitou roli i adventicie.¹⁹ Mechanické poškození cévy indukuje angiogenetickou odpověď adventicie. Předpokládá se, že myofibroblasty z adventicie se podílejí na poškození cévy proliferací, syntézou růstových faktorů a migrací do neointimy.²⁰

K signifikantnímu snížení tloušťky intimy žilního štěpu s polyesterovou sítí oproti kontrolní skupině došlo



Obrázek 5 Počet hladkých svalových buněk (A) a endotelových buněk (B) na polystyrenu pro tkáňovou kulturu (PS), na PS po přidání polyesterové sítě (sít), na PS po přidání polyesterové sítě potažené purasorbem (purasorb), na PS po přidání polyesterové sítě uvolňující sirolimus (sirolimus) 0., 2. a 7. den po přidání sítě, tj. 1., 3. a 8. den kultivace. Počty buněk jsou uváděny jako aritmetický průměr $\pm$ SEM. Hodnota $p \leq 0,05$ je považována za významnou.



Obrázek 7 Tloušťka intimy měřená na explantovaných žilních štěpech (žíla), žilních štěpech ovinutých polyesterovou sítkou (sít) a žilních štěpech ovinutých polyesterovou sítkou uvolňující sirolimus (sirolimus) po třech a šesti týdnech u králíků.

Data jsou prezentována jako aritmetický průměr ± SEM, hodnoty * $p < 0,001$ a # $p < 0,05$ jsou považovány za statisticky významné v porovnání se vzorky se stejným číslem.

i v naší sérii, a to v intervalu tří i šesti týdnů od implantace. Je zajímavé, že při srovnání skupin po třech a šesti týdnech již k dalšímu ovlivnění tloušťky intimy nedošlo a proces neointimální hyperplazie nepokračoval. Naopak u kontrolní žíly došlo k významnému nárůstu tloušťky intimy v čase.

Druhým způsobem, kterým jsme ovlivnili proces neointimální hyperplazie, bylo dlouhodobé lokální působení sirolimu. Naším cílem bylo vytvořit systém řízeného uvolňování sirolimu, který by zajistil uvolňování po dobu potřebnou na regeneraci endotelové výstelky cév, tedy v rozmezí přibližně čtyř až šesti týdnů. Studie kinetiky uvolňování sirolimu ze sítky do PBS ukázala, že sirolimus se uvolňoval po dobu až šesti týdnů, 70 % léčiva se však uvolnilo do sedmi dnů. Perivaskulární manžeta z PCL uvolňovala sirolimus anebo paclitaxel tři týdny.²¹ Po obalení žíly do ní sirolimus difunduje a inhibuje růst hladkých svalových buněk. Histologie odhalila přítomnost sítky v adventicii, což bylo způsobeno pravděpodobně nedostatečně hustou sítí, která se vtlačila do adventicie při dilataci autologní žíly po implantaci. Tato neočekávaná pozice sítky v těsné blízkosti média mohla paradoxně zvýšit koncentraci léčiva v médiu a snížit ztráty léčiva jeho difúzí do prostoru kolem cévy. Na druhé straně sítky může vyvolat odpověď tkáně na cizí materiál. V již vzpomenuté studii²¹ perivaskulárně aplikovaný ϵ -polykaprolakton bez léčiva způsobil tvorbu neointimy a granulačního tkaniva, naznačující probíhající zánětlivý proces.

U králíka byla pozorována redukce intimální hyperplazie závislá na dávce sirolimu ve stentech s obsahem 60–200 µg sirolimu.²² Obsah sirolimu ve stentech Cypher je ve rozmezí od 70 do 300 µg.²³ Obsah sirolimu v připravené sítky byl 140 µg/cm². V *in vitro* experimentu takto připravená sítky uvolňovala sirolimus v koncentraci dostatečné ke snížení proliferace hladkých svalových buněk bez negativního vlivu na jejich životaschopnost (viabilitu).

In vitro testy ukázaly dobrou viabilitu endotelových buněk po přidání sirolimu po sedmi dnech. Předpokládáme, že sirolimus bude difundovat z periadventiciální sítky do medie ve vyšší koncentraci, zatímco v intimě bude v nižší koncentraci umožňující regeneraci endotelu. V *in vivo* experimentu jsme zjistili snížení tloušťky intimy o 47 % po třech týdnech a o 56 % po šesti týdnech od implantace v porovnání s autologní žílou. Perivaskulárně aplikovaný ϵ -polykaprolakton uvolňující paclitaxel anebo sirolimus po dobu tří týdnů snížil ztlustění intimy o 75 anebo 76 %, podle pořadí.²¹ Pluronic gel s obsahem 200 µg sirolimu aplikovaný do perivaskulárního prostoru u modelu žilního graftu v karotickém řečišti u myši snížil intimální hyperplazii o 41 % po šesti týdnech.²⁴

Další možností uplatněnou u modelu žilního graftu jako interpozita femorální arterie u psa bylo užití tenkého filmu z kopolymeru poly(L-mléčná kyseliny) (PLA) a PCL v poměru 1 : 1, s navázaným sirolimem, který obaloval žilní štěp.²⁵ V našem modelu jsme na potahování sítě použili stejný typ kopolymeru, ale v poměru PLA : PCL 70 : 30. Z výsledků sledované skupiny sirolimus_3 a sirolimus_6 je vidět další ovlivnění neointimální hyperplazie, které je statisticky významné oproti skupině kontrolní a u skupin s polyesterovou sítkou v obou časových intervalech. Tloušťka intimy u králíků se sítkami se sirolimem se po třech a šesti týdnech působení neliší. To je ve shodě s pozorováním, že největší počáteční nárůst proliferace EB a HSB se objevuje během prvního týdne po implantaci žilního graftu do tepenného řečiště a vrací se k normálu během 12. týdne po implantaci.²⁶ Na základě tohoto průběhu intimální hyperplazie v čase je pravděpodobné, že nárazové uvolnění většího množství sirolimu v prvním týdnu po implantaci může mít výraznější protektivní účinek v rozvoji intimální hyperplazie jako jeho stejná, ale nižší koncentrace v průběhu celých šesti týdnů. Významný je nález snížení intimální hyperplazie po použití čisté polyesterové sítky bez sirolimu o 35 % po třech týdnech a o 46 % po šesti týdnech ve srovnání s autologní žílou. To indikuje možnost příznivého působení sítky i po uvolnění celého množství sirolimu ze sítky. Po uvolnění celého množství sirolimu plní sítky pravděpodobně podpůrnou mechanickou funkci.

Závěry

Připravili jsme systém s řízeným uvolňováním sirolimu – polyesterovou sítkou potahovanou PLA–PCL kopolymerem, který uvolňoval účinnou látku sirolimus po dobu šesti týdnů. V *in vitro* testech byl prokázán inhibiční účinek sítky na hladké svalové buňky. Obalení autologního žilního štěpu u králíka sítkou se sirolimem nebo sítkou bez sirolimu v *in vivo* experimentu významně snížilo tloušťku intimy štěpu a zabránilo rozvoji intimální hyperplazie.

Synergický účinek periadventiciálního polyesterového obalu cévy spolu s řízeným uvolňováním sirolimu se jeví jako velmi slibná technika ovlivnění neointimální hyperplazie žilních graftů interponovaných do tepenného řečiště. Koncentrace a délka působení sirolimu se zdá jako

optimální a po námi sledované období již k další hypertrofii intimy nedocházelo. Aplikace periadventiciální sítě se může stát prevencí restenózy u autologních cévních štěpů.

Literatura

1. Motwani JG, Topol EJ. Aortocoronary saphenous vein graft disease: pathogenesis, predisposition, and prevention. *Circulation* 1998;97:916–931.
2. Fitzgibbon GM, Kafka HP, Leach AJ, et al. Coronary bypass graft fate and patient outcome: angiographic follow-up of 5,065 grafts related to survival and reoperation in 1,388 patients during 25 years. *J Am Coll Cardiol* 1996;28:616–626.
3. Schwartz SM, deBlois D, O'Brien RM. The intima. Soil for atherosclerosis and restenosis. *Circ Res* 1995;77:445–465.
4. Liuzzo JP, Ambrose JA, Coppola JT. Sirolimus- and taxol-eluting stents differ towards intimal hyperplasia and re-endothelialization. *J Invasive Cardiol* 2005;17:497–502.
5. Colombo A, Iakovou I. Drug-eluting stents: the new gold standard for percutaneous coronary revascularisation. *Eur Heart J* 2004;25:895–897.
6. Livnat M, Beyar R, Seliktar D. Endoluminal hydrogel films made of alginate and polyethylene glycol: physical characteristics and drug-eluting properties. *J Biomed Mater Res A* 2005;75:710–722.
7. Edelman ER, Adams DH, Karnovsky MJ. Effect of controlled adventitial heparin delivery on smooth muscle cell proliferation following endothelial injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:3773–3777.
8. Schachner T, Zou Y, Oberhuber A, et al. Local application of rapamycin inhibits neointimal hyperplasia in experimental vein grafts. *Ann Thorac Surg* 2004;77:1580–1585.
9. Hu Y, Zou Y, Dietrich H, et al. Inhibition of neointima hyperplasia of mouse vein grafts by locally applied suramin. *Circulation* 1999;100:861–868.
10. Schachner T, Zou Y, Oberhuber A, et al. Perivascular application of C-type natriuretic peptide attenuates neointimal hyperplasia in experimental vein grafts. *Eur J Cardiothorac Surg* 2004;25:585–590.
11. Roque M, Reis ED, Cordon-Cardo C, et al. Effect of p27 deficiency and rapamycin on intimal hyperplasia: in vivo and in vitro studies using a p27 knockout mouse model. *Lab Invest* 2001;81:895–903.
12. Yakupoglu YK, Kahan BD. Sirolimus: a current perspective. *Exp Clin Transplant* 2003;1:8–18.
13. Finkelstein A, McClean D, Kar S, et al. Local drug delivery via a coronary stent with programmable release pharmacokinetics. *Circulation* 2003;107:777–784.
14. Owen SC, Li H, Sanders WG, et al. Correlation of tissue drug concentrations with in vivo magnetic resonance images of polymer drug depot around arteriovenous graft. *J Control Release* 2010;146:23–30.
15. Bačáková L, Lisá V, Kubínová L, et al. UV light-irradiated collagen III modulates expression of cytoskeletal and surface adhesion molecules in rat aortic smooth muscle cells in vitro. *Virchow's Archiv* 2002;440:50–62.
16. Jiang Z, Wu L, Miller BL, et al. A novel vein graft model: adaptation to differential flow environments. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;286:240–245.
17. Mehta D, George SJ, Jeremy JY, et al. External stenting reduces long-term medial and neointimal thickening and platelet derived growth factor expression in a pig model of arteriovenous bypass grafting. *Nat Med* 1998;4:235–239.
18. Krejca M, Skarysz J, Szmaga P, et al. A new outside stent – does it prevent vein graft intimal proliferation? *Eur J Cardiothorac Surg* 2002;22:898–903.
19. Scott NA, Cipolla GD, Ross CE, et al. Identification of a potential role for the adventitia in vascular lesion formation after balloon overstretch injury of porcine coronary arteries. *Circulation* 1996;93:2178–2187.
20. Khurana R, Zhuang Z, Bhardwaj S, et al. Angiogenesis dependent and independent phases of intimal hyperplasia. *Circulation* 2004;110:2436–2443.
21. Pires NMM, van der Hoeven BL, de Vries MR, et al. Local perivascular delivery of anti-restenotic agents from a drug-eluting poly(ϵ -caprolactone) stent cuff. *Biomaterials* 2005;26:5386–5394.
22. Suzuki T, Kopia G, Hayashi S, et al. Stent-based delivery of sirolimus reduced neointimal formation in a porcine coronary model. *Circulation* 2001;104:1188–1193.
23. Venkatraman S, Boey F. Release profiles in drug eluting stents: Issues and uncertainties. *J Control Release* 2007;120:149–160.
24. Schachner T, Zou Y, Oberhuber A, et al. Local application of rapamycin inhibits neointimal hyperplasia in experimental vein grafts. *Ann Thorac Surg* 2004;77:1580–1585.
25. Kawatsu S, Oda K, Saiki Y, et al. Anastomotic sites inhibit neointimal hyperplasia in a canine model. *Ann Thorac Surg* 2007;84:560–567.
26. Kalra M, Miller VM. Early remodeling of saphenous vein grafts: proliferation, migration, and apoptosis of adventitial and medial cells occur simultaneously with changes in graft diameter and blood flow. *J Vasc Res* 2000;37:576–584.

Došlo do redakce 2. 1. 2011

Přijato 2. 1. 2011