

**Univerzita Karlova v Praze**

**1. lékařská fakulta**

Studijní program: Postgraduální doktorské studium biomedicíny

Studijní obor: Experimentální chirurgie



**MUDr. Ivo Skalský**

**Současné možnosti ovlivnění dlouhodobé průchodnosti koronárních  
bypassů**

**Current possibilities of influence long-term patency of coronary artery  
bypass grafts**

Disertační práce

Školitel: Doc. MUDr. Vilém Rohn, Csc.

Praha 2013

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze dne 31.10.2013

MUDr. Ivo Skalský

## **Poděkování**

Tímto chci poděkovat vedoucímu své práce Doc. MUDr. Vilému Rohnovi, Csc. za cenné připomínky při psaní této práce a podporu. Dále děkuji Mgr. Eleně Filové, PhD., MUDr. Ondřeji Szarszoiovi, PhD. , MVDr. Andryi Lytvinetsovi, PhD. , za skvělou a obětavou spolupráci při vytváření celého projektu, který byl součástí grantu IGA MZ . V neposlední řadě patří můj velký dík mému dlouholetému šéfovi v IKEM Prof. MUDr. Janu Pirkovi, DrSc., za podporu a cenné rady při vzniku základní hypotézy této experimentální práce.

## Abstrakt

Hlavní komplikací koronárních rekonstrukcí pomocí žilních štěpů je v průběhu času restenóza. Cílem práce bylo posoudit vliv perivaskulárního polyesterového systému, dlouhodobě uvolňující sirolimus na intimální hyperplazie autologní štěpů. Systém s řízeným uvolňováním tvoří polyesterová síťka potažená kopolymerem kyseliny L-mléčné a  $\epsilon$ -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*. Polyesterová síťka potažená kopolymerem uvolňovala *in vitro* sirolimus 6 týdnů. Sirolimus uvolňovaný ze síťky inhiboval růst hladkých svalových buněk i endotelových buněk v 7-denních *in vitro* experimentech. Počet hladkých svalových buněk klesl o 29% a počet endotelových buněk o 75% po 7 dnech uvolňování sirolimu ze síťky při zachování vysoké viability buněk. Implantovali jsme v. *jugularis ext.* do *a. carotis communis* u králíků. Žilní štěp byl buď samotný, nebo byl obalen čistou polyesterovou síťkou a nebo byl obalen síťkou uvolňující sirolimus. Žilní štěpy byly standardně histologicky vyšetřeny na tloušťku intimy, medie a komplexu intimy a medie za 3 a 6 týdnů po implantaci. Žilní grafty obalené síťkou uvolňující sirolimus nebo čistou síťkou snižovaly tloušťku intimy ve srovnání se samotným žilním štěpem o  $73\pm 11\%$  a  $73\pm 8\%$  po 3 týdnech a o  $73\pm 9\%$  nebo  $59\pm 12\%$  za 6 týdnů. Síťky uvolňující sirolimus redukovaly tloušťku medie o  $65\pm 9\%$  a  $20\pm 12\%$  za 3 a 6 týdnů. Žilní štěpy se síťkou uvolňující sirolimus snížily tloušťku komplexu medie a intimy o  $60\pm 6\%$  a  $30\pm 13\%$  za 3 a 6 týdnů ve srovnání s čistou polyesterovou síťkou. Systém řízeného uvolňování sirolimu určený na periadventiciální aplikaci u autologních žilních štěpů inhiboval růst hladkých svalových buněk *in vitro* a zabránil rozvoji neointimální hyperplazie *in vivo* u králíků. Periadventiciálně

aplikovaná polyesterová síťka uvolňující sirolimus má potenciál se stát efektivním prostředkem pro prevenci vzniku stenóz a uzávěrů autologních cévních štěpů.

**Klíčová slova:** Sirolimus, Perivaskulární obal, Kontrolované uvolňování léčiva, Autologní žíla, Intimální hyperplasie, Hladké svalové buňky cév, Restenosa

## Abstract

The main complication of aortocoronary reconstruction with vein grafts is restenosis in the course of time. The aim was to assess the effect of a periadventitial polyester system releasing sirolimus on intimal hyperplasia of autologous grafts. The controlled-release system comprises a polyester mesh coated with a sirolimus-eluting copolymer of L lactic acid and  $\epsilon$ -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. *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. We implanted *v. jugularis ext.* into *a. carotis communis* in rabbits. The vein graft was either intact, or was wrapped with a pure polyester mesh, or with a sirolimus-releasing mesh. Three and six weeks after surgery, the veins were subjected to standard histological staining and the thicknesses of the *tunica intima*, the media and the intima-media complex were measured. Wrapping the vein with a mesh releasing sirolimus or with a pure mesh decreased the thickness of the intima in comparison with a vein graft by  $73\pm 11\%$  or  $73\pm 8\%$  after 3 weeks, and by  $73\pm 9\%$  or  $59\pm 12\%$  after 6 weeks, respectively. Sirolimus-releasing meshes reduced the thickness of the media by  $65\pm 9\%$  and  $20\pm 12\%$  after 3 and 6 weeks. The thickness of the intima-media complex in grafts with sirolimus-releasing meshes decreased by  $60\pm 6\%$  and  $30\pm 13\%$  in comparison with pure PES meshes, after 3 and 6 weeks, respectively. 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. A periadventitial polyester mesh releasing sirolimus has the potential to become an effective device in preventing vein grafts restenosis and occlusions.

**Keywords:** Sirolimus, Perivascular wrap, Controlled drug release, Autologous vein, Intimal hyperplasia, Vascular smooth muscle cells, Restenosis

# Obsah

Seznam obrázků a tabulek	11
Seznam zkratk	15
1 Úvod	17
1.1 Úvod do problematiky	17
1.1.1 Žíly	18
1.1.2 Tepny	19
1.1.3 Protézy a jiné materiály	20
1.2 Patofyziologie selhání žilního štěpu	21
1.2.1 Faktory podílející se na procesu změn žilního štěpu	22
1.2.1.1 Chirurgická preparace – odběr žilního štěpu	22
1.2.1.2 Peptidové růstové faktory a metaloproteinázy	24
1.2.1.3 Oxidační stres - reaktivní kyslík	25
1.2.1.4 Rizikové faktory	27
1.2.2 Strategie proti selhání žilního štěpu	27
1.2.2.1 Chirurgické techniky	27
1.2.2.2 Vnitřní stenty a externí obaly	27
1.2.2.3 Genový přenos a cytostatické léky	28
1.2.2.4 Konvenční farmakoterapie	28
2 Hypotézy a cíle experimentu	30
2.1 Hypotéza	30
2.2 Podklady pro experiment	30
2.3 Cíle experimentu	33
2.4 Očekávané výsledky	33



3	Materiál a metodika	34
3.1	Materiál	34
3.1.1	Impregnace sítěk	34
3.1.2	Měření uvolňování sirolimu ze síťky	34
3.1.3	Kultivace buněk	35
3.1.4	Životaschopnost a počet buněk	36
3.2	Chirurgická technika	37
3.2.1	Metodika	37
3.2.2	Chirurgická technika anastomosisy	37
3.3	Histologie a imunohistochemie	39
3.4	Histologie	39
3.5	Imunohistochemie	40
3.5.1	Formolem fixované vzorky tkání zalité do parafínu	40
3.5.2	Zmrazené vzorky tkání	41
3.6	Tloušťka intimy, medie, komplexu medie-intimy, poměr medie-intima	42
3.7	Statistická analýza	42
4	Výsledky	43
4.1	Výsledky pokusů in vitro	43
4.1.1	Uvolňování sirolimu ze síťky	43
4.1.2	Inhibice proliferace buněk	44
4.2.	Výsledky pokusů in vivo	45
4.2.1	Histologie a imunohistochemie	45
4.2.1.1.	Tunica intima	45
4.2.1.2.	Tunica media	47
4.2.1.3.	Tunica adventicia	49
4.2.2	Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)	51

4.2.3	Tloušťka intimy,médie, komplexu intima-medie a poměr média/intima	52
5	Diskuze	55
5.1	Potvrzení hypotézy	55
5.2	Mechanická opora – zevní obal cévy	55
5.3	Sirolimus	56
6	Závěr	58
7	Literatura	59
	Přílohy	69

## Seznam obrázků, grafů a tabulek

- Obrázek 1 Tkáňové inženýrství při vytváření umělých cév pro klinickou praxi
- Obrázek 2 Přírozený průběh selhání žilního štěpu. Období den 0 až 1 týden: odběr žilního štěpu vede k endoteliálnímu poškození, které umožňuje adhezy destiček a formování trombu. Neutrofilů a monocytů, které uvolňují množství faktorů, které stimulují proliferaci a stimulaci hladkých svalových buněk (VSMC) (viz také obr.3). Období 1 týden až 1 měsíc : Ztlustění medie má na svědomí proliferace hladkých svalových buněk VSMC a ukládání matrixových metaloproteináz (MMP). Migrace hladkých svalových buněk přes vnitřní elastickou membránu vede k tvoření neointimy. V neointimě pozorujeme ojediněle se vyskytující makrofágy. Období měsíc až 3 roky: Charakteristickou známkou časných změn v neointimě jsou ateromatozní léze bohaté na pěnové buňky (foam cells). Období po 3 letech: Signifikantní zúžení cévního lumen je výsledkem progresivního ztlustění intimy a ateromových plátů. Jejich ruptura je obecně terminální stádium vedoucí k ztlustění intimy a ateromových plátů. Jejich ruptura je obecně terminální stádium vedoucí k trombotickému uzavření štěpu. ztlustění intimy a ateromových plátů. Jejich ruptura je obecně terminální stádium vedoucí k trombotickému uzavření štěpu. Přírozený průběh selhání žilního štěpu.
- Obrázek 3 Hlavní děje, které vedou k formování neointimy a pozdnímu selhání štěpu.  
(a) Časné děje pro vytvoření neointimy probíhají ihned. Poškození

endotelu má za následek adhezi krevních buněk, které uvolňují množství faktorů, které vyvolávají proliferaci a migraci hladkých svalových buněk (VSMC) a formují neointimu. Mezi ně patří endogenní peptidové růstové faktory, aktivace metaloproteináz (MMP) a oxidační stres. Hemodynamické síly působí synergicky s tímto procesem. (b) Jakmile je vytvořena neointima, monocyty do ní infiltrují a stávají se rezidentní makrofágy, progenitory pěnových buněk. Toto se stává epicentrem aterosklerotických plátů, které nakonec vedou k pozdnímu selhání žilního štěpu.

- Obrázek 4 Schema působení rapamycinu na mTOR
- Obrázek 5 Chirurgická technika implantace žilního graftu do arteriálního řečiště
- Obrázek 6 Žilní graft v arteriální řečišti před uvolněním krevního proudu do rekonstrukce (A), uvolnění krevního proudu a počáteční dilatace žilního štěpu – kontrolní skupina (B) a aplikace periadventiciálního obalu – sítěky na rozvinutou cévu (C)
- Obrázek 7 Kumulované uvolňování sirolimu z polyesterové sítěky ve fosfátovém pufru v průběhu 6-týdenní inkubace.
- Obrázek 8 Hladké svalové buňky barveny pomocí Live/dead eseje, tj. živé buňky zeleně, mrtvé červeně na polystyrenu pro tkáňové kultury (A), na polystyrenu po přidání polyesterové sítěky potažené purasorbem (B) a na

polystyrenu po přidání sítě uvolňující sirolimus (C) 7. den po přidání sítěk, tj. 8. den po nasazení.

Obrázek 9 Počet hladkých svalových buněk (A) a endotelových buněk (B) na polysterenu pro tkáňové kultury (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 sítěk, tj. 1., 3. a 8. den po nasazení.

Obrázek 10 Immunohistochemický průkaz CD31 (A-C) a (PCNA, D-F) v autologním štěpu (žíla\_3, A, D), autologním štěpu s polyesterovou sítí (sít'\_3, B, E), autologním štěpu s polyesterovou sítí uvolňující sirolimus (sirolimus\_3, C, F) 3 týdny po implantaci do králíka

Obrázek 11 Autologní žilní štep (žíla\_3, A; žíla\_6, D), autologní žilní štep s polyesterovou sítí (sít'\_3, B; Sít'\_6, E) a autologní žilní štep s polyesterovou sítí uvolňující sirolimus (sirolimus\_3, C; sirolimus\_6, F) po třech (A, B, C) a šesti týdnech (D, E, F) u králíků

Obrázek 12 Imunohistochemický průkaz CD4+ buněk v autologním štěpu (žíla\_3) po 3 týdnech po implantaci do králíka (A) Pearlova reakce k průkazu železa (B) v autologním štěpu s polyesterovou sítí uvolňující sirolimus (sirolimus\_3) po třech týdnech od implantace do králíka.

Obrázek 13 Počet buněk s pozitivním antigenem PCNA+ (Proliferating cell nuclear antigen) v autologním žilním graftu (žíla), v autologním žilním štěpu s

polyesterovou sítkou (síťka ) a v autologním žilním štetu s polyesterovou sítkou uvolňující sirolimus (sirolimus) po 3 a 6 týdnech u králíků.

Obrázek 14 Tloušťka intimy (A), medie (B), a komplexu intima-medie (C) autologního žilního štetu (žíla), autologního žilního štetu obaleného polyesterovou sítkou (síť), a autologního žilního štetu obaleného polyesterovou sítkou uvolňující sirolimus (sirolimus) po 3 a 6 týdnech u králíků; poměr media/intima(D).

Tabulka 1 Seznam monoklonálních protilátek pro imunohistochemické barvení

Tabulka 2 Počet CD4+, CD8+, plasmocytů, makrofágů z 10 mikroskopických polí na králíka vyjádřených jako střední odchylka  $\pm$  SEM ze 4-10 zvířat, zvětšení  $\times 600$ . Celkový počet králíků s jakýmkoli typem trombu , s obliterujícím trombem nebo rekanalizujícím se trombem

## Seznam zkratek a značek

ACE - angiotensin II converting enzyme (ACE)

ACB - aortokoronární bypass

CARACCASS - Complete Arterial Revascularization versus Conventional Coronary Artery Surgery Study

CE - cluster of differentiation , povrchové antigeny leukocytů

CD4+ cells - buňky s pozitivním povrchovým antigenem CD4

CD8+ cells - buňky s pozitivním povrchovým antigenem CD8

CD31 - buňky s pozitivním povrchovým antigenem CD3

DM - diabetes mellitus

DMEM - Dulbecco`s modified Eagle medium

EC - buňky endotelu (endothelial cells )

EDTA - ethylendiaminotetraoctová kyselina

ET - endotelin 1 (ET-1)

eNOS - Endothelial Nitric Oxide Synthase

FGF - růstový faktor fibroblastů ( fibroblast growth factor )

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - voda

ICAM - intracellular adhesion molecule

IgG – imunoglobulin typu G

IGF-1 - insulínu podobný růstový faktor ( insulin-like growth factor-1)

IL-1 - interleukin-1

IMA - internal mammary artery

j/kg - jednotek na kilogram

LIMA - a. thoracica interna (mammaria)

M - molární

MMP - matrixové metaloproteinázy

mTOR - mammalian target of rapamycin

Mw - molekulární hmotnost

NO - oxid dusnatý

nm – nanometr

PBS - fosfátový tlumivý roztok (pufr)

PCI - perkotánní koronární intervence

PCNA - Proliferating cell nuclear antigen

PDGF - růstový faktor z destiček (platelet-derived growth factor)

PES – polyester

PGI<sub>2</sub> - prostacyklin

pH - potential of hydrogen, acidobáze

PLA - poly(L-mléčná kyselina)

PCL - Polylaktidy i poly(ε-kaprolakton)

PS - polystyren (PS)

RA – a. radialis

RGEA – right gastroepiploic artery

RIA - ramus interventricularis anterior

rpm – otáčky za minutu (revolutions per minute)

SEM - střední odchylka

TIMPS - tkáňový inhibitor metaloproteináz (tissue inhibitor of metalloproteinases)

T 61 - roztok pro euthanasii laboratorních zvířat euthanasii T 61

VECAM - vascular endothelial cell adhesion molecule

VEGF - cévní endoteliální růstový faktor (vascular endothelial growth factor).

VSMC - hladké svalové buňky (vascular smoothmuscle cells)



# 1 Úvod

## 1.1 Úvod do problematiky

Aortokoronární bypassy jsou standartní indikovanou léčbou ischemické choroby srdeční (ICHS) a do klinické praxe byly zavedeny koncem 70. let minulého století. ICHS je od roku 2010 hlavní příčinou úmrtí ve světě, kdy zemřelo více než 7 milionů lidí ve srovnání s rokem 1990, kdy to bylo 5,2 milionu. ICHS může postihnout jedince v každém věku, ale její výskyt je častější u starších věkových skupin obyvatel. Její četnost narůstá s každou následnou dekádou života přibližně 3x. Častěji jsou postiženi muži než ženy.

Aortokoronární rekonstrukce je nejčastější kardiochirurgickou operací po celém světě. Provádí se pomocí žilních nebo arteriálních štěpů. Princip metody je velmi jednoduchý, stenosu či uzávěr koronární tepny, nebo její větve překleneme distálně našitým bypassem. Zpočátku se k aortokoronárním rekonstrukcím používaly hlavně žilní štěpy, postupně se hlavně u mladších pacientů začaly pro celkovou revaskularizaci srdečního svalu užívat jen štěpy arteriální. V současné době se v případě tzv. „konvenčního“ bypassu rutinně používá pro vytvoření přemostění na RIA( ramus interventricularis anterior ) levá vnitřní prsní tepna ( a. thoracica interna- mammae , LIMA) a na ostatní větve věnčitých tepen se používají žilní štěpy tak, aby bylo dosaženo úplné revaskularizace. Tento typ revaskularizace je nejvíce rozšířenou aortokoronární rekonstrukcí.

Ideální konduit pro vytvoření aortokoronárního bypassu by měl mít tyto parametry – nízkou frekvenci selhání průchodnosti v dlouhodobém průběhu, snadno získatelný, bez komplikací souvisejících s jeho odběrem, měl by mít dodatečnou délku k vytvoření rekonstrukce. Do dnešního dne máme jako nejlepší použitelný konduit *in situ* vnitřní prsní tepnu (IMA) s 95,8% průchodností v pětiletém sledování ve srovnání s volnými arteriálními (89,1%) nebo žilními (82,4%) štěpy (1) a 88% 15 ti letou průchodnost u levé vnitřní prsní

tepny (LIMA).(2) Další limitací užití autologních štěpů může být časová náročnost odběrů a samotné štěpy mohou být špatné kvality a také poškodeny během odběru. Vyšší četnost rekonstrukcí sternotomických ran je častější u oboustranného odběru IMA (1,9% vs. 0,6% u jednostranného).(3) Délka štěpů je zejména limitující u arteriálních rekonstrukcí, kdy byl nedostatek délky štěpů důvodem u 9,1% pacientů pro změnu léčebné techniky z chirurgického řešení - operace na PCI v registru studie Syntax.(4) Závěrem lze konstatovat, že klinické použití umělé cévy schopné nahradit malé arterie není v současné době ještě stále možné a jeho vytvoření je stále považováno za tzv. Svatý Grál cévních respektive kardiochirurgických rekonstrukcí.

### 1.1.1 Žíly

Uzávěr žilních štěpů je při aortokoronární rekonstrukci jednou z hlavních komplikací v dlouhodobém sledování, který se objevuje v 25% během 12 – 18 měsíců.(5) Z průchodných žilních štěpů jich 7 % jeví známky degenerace již během prvního roku a 77% za 10 let.(6) Časné selhání štěpu je nejčastěji spojeno s akutní trombózou a objevuje se v 18% případů (7-9) Střednědobé selhání žilních štěpů ( 30 dní až 2 roky po rekostrukci ) a pozdní selhání štěpů ( 2 a více let po rekostrukci) se objevuje v 20 -50 % za rok a po 10 ti letech je 40 % štěpů zavřených a dalších 30% rekostrukcí má omezené flow.(7-9) Hlavní příčinou střednědobého až pozdního selhání štěpů je neointimální a mediální hyperplazie, která se nejdříve objevuje zejména v proximálních a distálních anastomózách, kde dochází k akceleraci atherosklerozy. Kromě terapie snižování hladin lipidů v těle a no-touch techniky žilních rekonstrukcí není současnosti žádná, klinicky efektivní technika v prevenci pozdního selhání žilních štěpů.

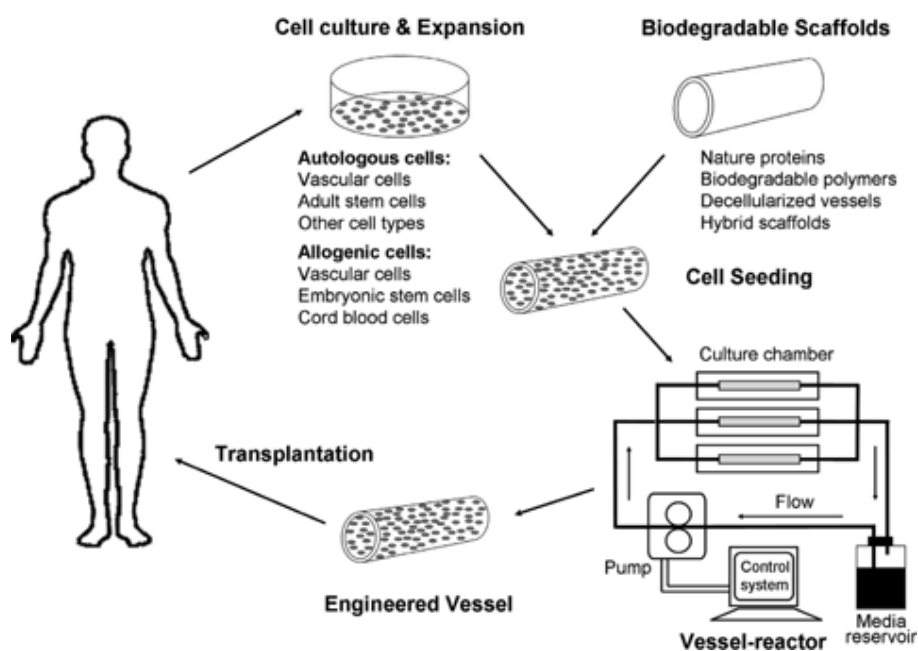
### 1.1.2 Tepny

Další možností jak revaskularizovat myokard je použití tepenných štěpů místo žilních. Při tzv. „TAR“ (totální arteriální revaskularizaci) jsou na revaskularizaci všech tří povodí věnčitých tepen použity tepenné štěpy. Přednostně jsou využívány obě a. mammae (IMA) a a. radialis z nedominantní končetiny, dá se také použít pravá a. gastroepiploica nebo a. epigastrica inferior. V praxi se rozhodnutí o typu revaskularizace opírá o osobní zkušenosti chirurga a také o výsledky studií. V roce 1999 byla publikována studie retrospektivní studie databaze pacientů Cleveland Clinic, kde bylo zjištěno v průběhu až 12letého sledování u pacientů pacientů s bypassy pomocí obou IMA statisticky nižší riziko smrti a menší počet reintervencí.(10) Taggart v metaanalýze sedmi studií dokumentuje významně lepší přiživání ve skupině pacientů s bypassy pomocí dvou IMA.(11) Jde však o retrospektivní, nerandomizované studie.

Dosud nebyly publikovány výsledky prospektivní randomizované studie, která by porovnávala výsledky úplné tepenné revaskularizace (TAR) a tzv. „konvenčního“ koronárního bypassu. V praxi tedy chyběly teoretické podklady pro rozhodování o TAR na úrovni tzv. evidence based medicine. Proto byla v roce 1999 zahájena studie s akronymem CARACCASS (Complete Arterial Revascularization versus Conventional Coronary Artery Surgery Study). V naší větvi studie, kterou jsme prováděli v IKEM jsme došli k těmto závěrům. Již v časném pooperačním období byla angiograficky ověřena průchodnost bypassů pomocí LIMA významně lepší než u žilních štěpů. Časná průchodnost ostatních tepenných konduktů (RIMA, RA, RGEA) se však od průchodnosti VSM nelišila. Po pěti letech byl rozdíl v průchodnosti tepenných a žilních štěpů větší, ukazuje to na horší dlouhodobou průchodnost žilních štěpů.(12)

### 1.1.3 Protézy a jiné materiály

Jako ideální štěp bychom mohli považovat umělé cévy vytvořené z živé tkáně. Poddajnost a roztažnost, malá thrombogenicita, odolnost vůči infekcím, stejně jako schopnost hojení, remodelace, kontraktility a sekrece přirozených produktů cévní stěny jsou teoretické výhody - přednosti takto získaných štěpů. Tři základní prvky jsou obecně nutné pro výstavbu umělé cévy: strukturální skelet, vyrobený buď z kolagenu nebo biologicky odbouratelného polymeru; cévní buňky a vhodné okolní prostředí. Mechanické vlastnosti umělých cév jsou upraveny pomocí bioreaktorů, které napodobují in vivo prostředí cévních buněk s pulzatickým krevním proudem. Alternativní postupy zahrnují výrobu fibrokolagenních vláken z vlastní tkáně příjemce (podkožní nebo peritoneum) a nebo vytvoření umělých cév z acelulární nativní tkáně, jako je decelulizovaná submukóza tenkého střeva, močovodu a allogenních nebo xenogenních tepen. (12) Dnes jsme schopni aplikovat techniky tkáňového inženýrství a postavit autologní cévní protézu pro chirurgické rekonstrukce. (13,14) (obr.1) K plnému komerčnímu nasazení jako alternativa klinického použití pro aortokoronární rekonstrukce mají tyto materiály ještě hodně daleko. Jako tzv. "chybějící článek", který by napodobil extracelulární prostředí jakož i poskytl pružnost nově vytvořené cévě, se jeví elastin. Při vytváření cévního konduitu je rekombinantní lidský tromboelastin velkým příslibem jako biokompatibilní povlak vnitřního povrchu a také jako pružná součást stěny konduitu.



**Obr. 1** Tkáňové inženýrství při vytváření umělých cév pro klinickou praxi (14)

## 1.2 Patofyziologie selhání žilního štěpu

Faktory selhání žilního štěpu jsou značně nesourodé, ale vzájemně úzce propojené. Mechanické namáhání žilního štěpu v arteriální cirkulaci vede ke změnám žilní stěny - remodelaci. Právě jednou z nejdůležitějších změn v žilní stěně, která se objevuje ihned po provedení bypassu je neointimální hyperplazie. Fatální sklerotické změny jsou příčinou selhání štěpu a konečným důsledkem tohoto procesu.(15) Remodelace autologních žil po jejich užití jako bypassu je charakterizována poškozením vrstvy endoteliálních buněk a expozicí hladkých svalových buněk (VSMC) na lumenální povrchu cévy, což způsobuje adhezi destiček, makrofágů a regenerujících endoteliálních buněk (EC) jakož i agregaci destiček. Destičky, EC a VSMC uvolňují růstové faktory a faktory podporující migraci, jako je thrombin, PDGF, IL-1, IGF-1, FGF-2 a VEGF. Tyto bioaktivní substance stimuluji migraci VSMC do intimy, jejich nadměrnou proliferační aktivitu 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

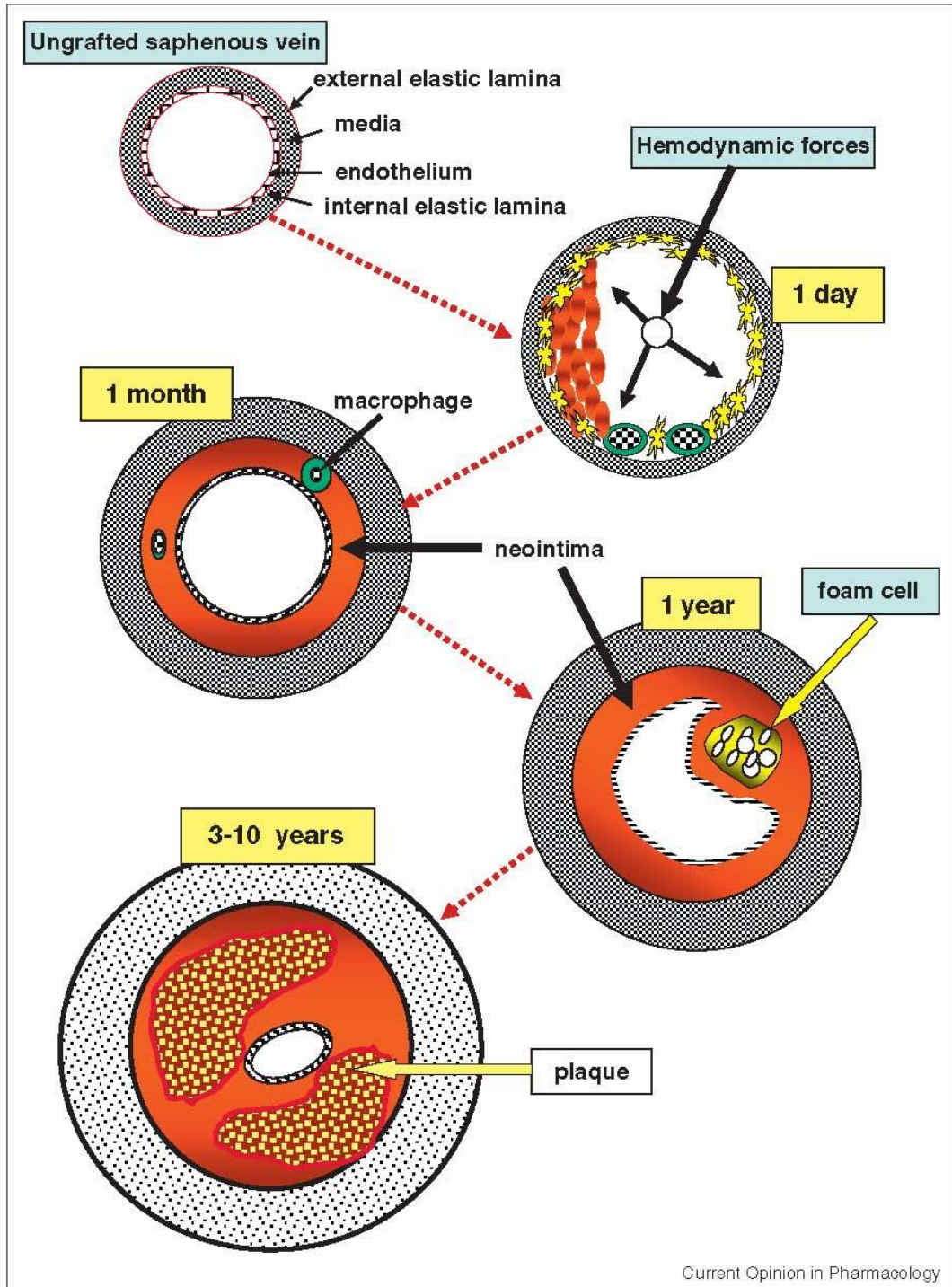
snížit proliferaci VSMC. Štěp bývá úplně endotelizován během několika týdnů po operaci.(16)

### **1.2.1 Faktory podílející se na procesu změn žilního štěpu**

#### **1.2.1.1 Chirurgická preparace – odběr žilního štěpu**

Chirurgická technika odběru žilního štěpu vede k poškození a odstranění endotelu a okamžité adhezi krevních destiček a leukocytů , které nejenom urychlují akutní trombózu, ale také spouští proces vzniku neointimální hyperplazie.(18,19) Ztrácí se protektivní endoteliální faktory – zejména oxid dusnatý (NO ) a prostacyklin (PGI<sub>2</sub> ), které inhibují adhezi krevních buněk , proliferaci a migraci hladkých svalových buněk , expresi MMP syntézu proteoglykanů , uvolňování tkáňový aktivátor plazminogenu a cholesterolový metabolismus. Endoteliální buňky ( možná i vzdáleného původu ) proliferují a migrují do žilních graftů, aby pokryly intraluminární povrch štěpu.(20) Žilní grafty jsou okamžitě vystaveny arteriálnímu tlaku, zvýšené tenzi stěny, shear stress a pulzatiálnímu krevnímu proudu.(21) Tento stav je spojen se zvýšenou expresí růstových faktorů , uvolněním adhezních molekul a buněčnou proliferací.(18) Proces remodelace žilního graftu skutečně ovlivňuje hemodynamiku uvnitř graftu. Asymetrická hyperplazie může vyvolat chaotický krevní proud , který směřuje krevní destičky a leukocyty k adhezi, tromboze a hyperplazii. Adheze leukocytů k cévním buňkám a krevních destiček navzájem je zprostředkován zejména selektiny , intracelulárními adhezními molekulami (ICAM) a cévní endoteliální adhezní molekulou (VECAM). Spojitost mezi uvolněním adhezních molekul a neointimální hyperplazií byla demonstrována. Adheze monocytů je další časná změna vedoucí k monocytární infiltraci do neointimální formace . Monocyty ale i hladké svalové buňky se mohou transformovat na makrofágy a které fagocytují tuky. Makrofágy se mění a stávají se

z nich tzv. pěnové buňky. Pěnové buňky stěsňují prvotní aterosklerotické změny vedoucí k vytvoření aterosklerotickým plaků. Tento postupný proces vede k zúžení až obliteraci - selhání žilního štěpu. (Obr.2)



**Obr. 2** Přirozený průběh selhání žilního štěpu. Období den 0 až 1 týden: odběr žilního štěpu

vede k endoteliálnímu poškození, které umožňuje adhezy destiček a formování trombu. Neutrofilů a monocytů, které uvolňují množství faktorů, které stimulují proliferaci a stimulaci hladkých svalových buněk (VSMC) (viz také obr.3). Období 1 týden až 1 měsíc : Ztlustění medie má na svědomí proliferace hladkých svalových buněk VSMC a ukládání matrixových metaloproteináz (MMP). Migrace hladkých svalových buněk přes vnitřní elastickou membránu vede k vytvoření neointimy. V neointimě pozorujeme ojediněle se vyskytující makrofágy. Období měsíc až 3 roky: Charakteristickou známkou časných změn v neointimě jsou ateromatozní léze bohaté na pěnové buňky (foam cells). Období po 3 letech: Signifikantní zúžení cévního lumen je výsledkem progresivního ztlustění intimy a ateromových plátů. Jejich ruptura je obecně terminální stádium vedoucí k ztlustění intimy a ateromových plátů. Jejich ruptura je obecně terminální stádium vedoucí k trombotickému uzavření štěpu. ztlustění intimy a ateromových plátů. Jejich ruptura je obecně terminální stádium vedoucí k trombotickému uzavření štěpu.(17)

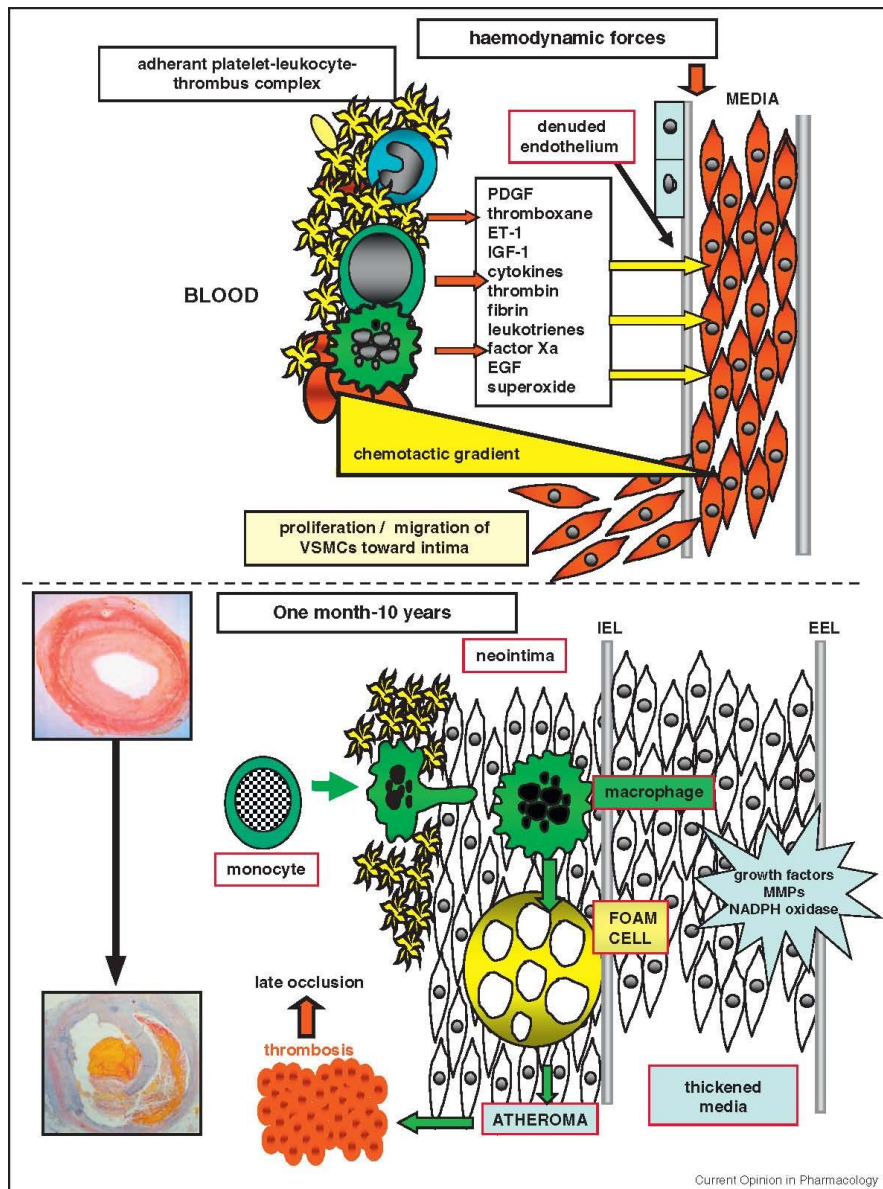
#### 1.2.1.2 Peptidové růstové faktory a metaloproteinázy

PGFs jsou rychle uvolňovány v žilních graftech a mezi ně patří - endotelin 1, PDGF, FGF a insulin like growth factor, které všechny podporují proliferaci a migraci hladkých svalových buněk. (18) *In situ* jsou VSMC obklopeny a současně jsou zakotveny v extracelulárních proteinech (zahrnují kolageny a elastin). Proteiny extracelulární matrix jsou takovou kostrou pro buněčnou a tkáňovou architekturu a mají také inhibiční vliv na proliferaci cévních hladkých svalových buněk. V žilních graftech je extracelulární matrix rozpuštěna metalloproteinázami (MMP) a jinými proteázami, které dovolí hladkým svalovým buňkám cév migrovat do intimy a formovat neointimální komplex. Upregulace a aktivace určitých metalloproteináz je zodpovědná za negativní remodelaci stěny žilního graftu.



### 1.2.1.3 Oxidační stres - reaktivní kyslík

Nadprodukce reaktivních forem kyslíku je také okamžitá a dlouhotrvající odpověď na implantaci žilního štěpu. (22,23,24) Superoxid ( $O_2^-$ ) podporuje migraci a proliferaci VSMCs a upreguluje MMPs. Superoxid také reaguje s NO a redukuje jeho působení což je také spojeno s poškozením žilní stěny graftu.(24) Superoxid indukuje hlavně NADPH oxidázu, která se vyskytuje ve zvýšeném množství v žilních graftech a její množství je regulováno látkami uvolněnými z destiček a leukocytů.(25,27) Chirurgická preparace žilního štěpu vede ke zrušení kontinuity vasa vasorum, které infiltrují a zásobují kyslíkem stěnu velkých cév. (27) Jestliže se rychle zvětší stěna žilního graftu, dochází k hypoxii vzhledem ke zvýšené potřebě kyslíku. Hypoxie podporuje vznik Superoxidu ( $O_2^-$ ) aktivací NADPH oxidázy, xantin oxidázy a mitochondriálního respiračního řetězce.(23) (obr.3)



**Obr. 3** Hlavní děje, které vedou k formování neointimy a pozdnímu selhání štěpu. (a) Časné děje pro vytvoření neointimy probíhají ihned. Poškození endotelu má za následek adhezi krevních buněk, které uvolňují množství faktorů, které vyvolávají proliferaci a migraci hladkých svalových buněk (VSMC) a formují neointimu. Mezi ně patří endogenní peptidové růstové faktory, aktivace metaloproteináz (MMP) a oxidační stres. Hemodynamické síly působí synergicky s tímto procesem. (b) Jakmile je vytvořena neointima, monocyty do ní infiltrují a stávají se rezidentní makrofágy, progenitory pěnových buněk. Toto se stává epicentrem aterosklerotických plátů, které nakonec vedou k pozdnímu selhání žilního štěpu.(17)

#### 1.2.1.4 Rizikové faktory

Rizikové faktory, které zvyšují selhání žilního štěpu jsou v podstatě identické jako ty, které podporují vznik aterosklerozy. Zahrnují DM, dyslipidémii, hypertenzi a hyperhomocysteinaemii, obezitu.(28,29) DM je spojena s daleko těžším průběhem ischemické choroby srdeční s více postižením koronárních arterií a také je spojena s vyšší perioperační morbiditou a nižším přežíváním po operaci.

#### 1.2.2 Strategie proti selhání žilního štěpu

##### 1.2.2.1 Chirurgické techniky

Chirurgická odbornost či kvalifikace je hlavní determinanta výsledku pro pacienta u ACB. No-touch technika zlepšuje průchodnost graftu. (30,31) V podstatě říká, že když ponecháme kolem žíly i tuk a okolí a dále se žíla nedilatuje po odběru tak při srovnání s klasickým odběrem má lepší dlouhodobou průchodnost.(31) Operační technika off pump není při srovnání s klasickou technikou na pumpě výhodnější v jednorroční průchodnosti žilních graftů.(32)

##### 1.2.2.2 Vnitřní stenty a externí obaly

Když srovnáme PCI žilních graftů s PCI nativních tepen je výsledek intervence pro žilní grafty horší. Příčiny jsou v periferní embolizaci, tzv. no reflow fenoménu a dále v časnější četnosti vzniku IM.(33) Je nutné opravdu zhodnotit výsledek PCI na žilním štěpu, abychom co nejvíce snížili rizika komplikací a pacienta naším výkonem spíše nepoškodili.

Několik studií na prasečím modelu při použití externí podpory (sheatu) zajistilo důrazný a dlouhodobě trvající efekt na inhibici neointimální a mediální hyperplazie,(34-36) efekt

zprostředkovaný angiogenezí a chemotaktickým gradientem. Naproti tomu pilotní klinická studie ukázala časnou trombózu u pacientů s aortokoronární rekonstrukcí žilou obalenou polyesterovou sítkou. (37) Byla to rigidní dakronová protéza a ještě k tomu s pružinovým stentem ve vrapech jako na podkožní bypassy. Sem můžeme dát naše studie.

### 1.2.2.3 Genový přenos a cytostatické léky

Pro genovou terapii nebo-li zásah na žilním štěpu je ideální když můžeme žilu ponechat např. hodinu mimo tělo v nějakém roztoku a tam na ni působit pomocí genového transferu, (38) nebo pomocí léků , které mohou inhibovat časně události vedoucí k neointimální hyperplazii.(39) Na zvířecím modelu genový přenos různých faktorů redukuje neointimální hyperplazii působením na eNOS a TIMPS. U člověka byla VSM před použitím k aortokoronárnímu bypasu vložena do roztoku s oligodeoxynukleotidem pro působení na E2F faktor. Tento transkripční faktor je zodpovědný za regulaci buněčného cyklu. Studie PREVENT IV ( zahrnovala 3014 pacientů s ex vivo léčbou VSM pomocí návnady pro E2F) ukázala za 12 – 18 měsíců po operaci, že zde nebyl žádný signifikantní rozdíl v uzávěru žilních štěpů. Několik studií naopak prokázalo, že inkubace VSM s cytostatickými léky prokazatelně redukovalo neointimální hyperplazii.(40- 43) Tyto léky zahrnovaly paclitaxel a rapamycin (sirolimus).

### 1.2.2.4 Konvenční farmakoterapie

Dnes je tu nadbytek léků , které mohou být efektivní v léčbě selhání štěpu.(38-40) Ideální lék by měl by inhibovat aktivitu destiček a leukocytů a redukovat trombózu , inhibovat replikaci a migraci hladkých svalových buněk cév a tvorbu neointimální hyperplazie, zánět a atherogenesu. Statiny působí na progresy atherosklerosy v žilním štěpu,

redukuje výskyt pooperační kardiiovaskulárních komplikací a zlepšuje celkovou mortalitu.(41) Léky proti působení krevních destiček – aspirin, ibustrin a clopidogrel redukuje časné selhání štěpu ovlivněním vzniku trombozy a zlepšuje průchodnost žilních štěpů během prvního roku po operaci. Tyto léky mají ale velmi malý efekt na neointimální proliferaci a pozdní selhání žilního štěpu.(44) Další léky , které inhibují neointimální proliferaci na zvířecích modelech a nebyly zatím použity u lidí. Jsou to například angiotensin II converting enzyme (ACE) inhibitor, antioxidanty, alpha adrenoceptor antagonist, inhibitory růstového faktoru, thromboxane A2 synthase inhibitory, iloprost, inhibitory fosfodiesterázy.(45,46)

## 2 Hypotézy a cíle

### 2.1 Hypotéza

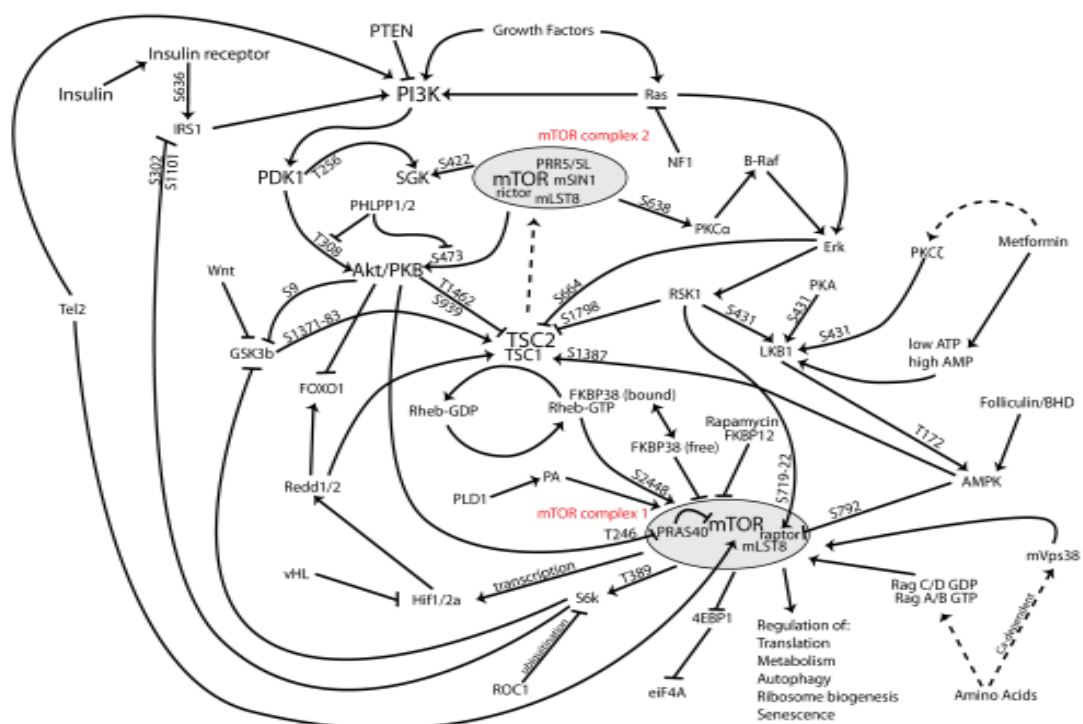
Dnes známe účinky působení zevního obalu a také působení antiproliferativních látek na žilní štěp v tepenném řečišti, kterým můžeme potlačit neintimální hyperplazii. Vytvoření zevního obalu autotranplantované cévy, který by obsahoval a uvolňoval antiproliferativní látky bychom chtěli dlouhodobě ovlivnit průchodnost žilních graftů používaných v kardiovaskulární chirurgii.

### 2.2 Podklady pro experiment

V klinické kardiologické praxi se stenóza autologního štěpu obvykle řeší vložením stentu (po perkutánní transluminální angioplastice) do lumina štěpu nebo nutností pacienta reoperovat a provést nový aortokoronární bypass. Pro prevenci proliferace VSMC a restenózy štěpu byly vyvinuty stenty uvolňující antiproliferativní léčiva, jako je sirolimus (Cypher™, Cordis J&J, NJ) nebo paclitaxel.<sup>(47)</sup> Použití stentů je však limitováno jejich relativně komplikovaným zaváděním, nebezpečím jejich uvolnění a pohybu uvnitř cévy, možnou periferní embolizací sklerotických hmot stěny štěpu, zvýšeným mechanickým namáháním cévní stěny i lokálním poškozením endotelu a VSMC, vedoucím k reaktivaci růstu VSMC 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.<sup>(48)</sup>

Z toho hlediska se externí, tj. mimocévní systém dodávky léčiva, umístěný na povrch 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 VSMC.(49) Již dříve byly objeveny jiné antiproliferativní látky inhibující neointimální hyperplazii žilních graftů na experimentálních modelech u zvířat pro jejich periadventiciální aplikaci například suramin , C-typ natriuretického peptidu , cilostazol , sirolimus.(50-52) Speciálně sirolimus (Rapamycin), je znám svým silným antiproliferativním účinkem. (53) Dále se tento makrocyclický lakton používá v drug eluting stentech (47) a při orgánových transplantacích jako imunosupresivum.(53) Mechanismus jeho antiproliferativního účinku je velice složitý a mnohostranný (54) a zahrnuje především blokádu přechodu buněk G1 do S- fáze buněčného cyklu, interakci se specifickým cílovým proteinem (mTOR, mammalian target of rapamycin) a inhibici jeho aktivace. (obr. 4)



**Obr. 4** Schema působení rapamycinu na mTOR (54)

Síťka určená k potahování vhodným polymerem s rozpuštěným léčivem musí mít potřebné mechanické vlastnosti dovolující jeho 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, jako i přítomnost bariér regulujících difuzi a velikost povrchu sítě. V naší studii zaměřené na kinetiku uvolňování sirolimu z polyesterových sítěk bylo po uvolňování sirolimu detekováno několik týdnů. Proliferace VSMC na buděčných kulturách byla inhibována sítěkami s navázaným sirolimem.(55) Naším předpokladem bylo, že tloušťka cévní stěny je dostatečně tenká, aby umožnila difuzi uvolněného sirolimu do tunica media a inhibici proliferace VSMC. Penetrace sirolimu je podporována jeho hydrofobií. Účinná koncentrace sirolimu potřebná k inhibici proliferace VSMC je relativně nízká ( $IC_{50} = 5 \text{ ng/ml}$ ) (56) a umožňuje v polymeru dispergovat příslušné množství léčiva nutné k dlouhodobému uvolňování (v rozmezí 4-6 týdnů).

Zevní obalení cévy polyesterovou sítěkou 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 sítěky kolem cévy sníží mechanické namáhání autologního štěpu ve srovnání se stentem. Dlouhodobé uvolňování antiproliferativního léčiva sirolimu během několika týdnů potlačí růst VSMC na dobu potřebnou k reendotelizaci štěpu. To by mělo snížit remodelaci autologního štěpu a nutnost následné léčby.

Předpokládá se, že ke ztluštění intimy žilních štěpů dochází v dilatovaných úsecích, kde je nízký průtok.(57) Ovinutí poměrně pevné sítěky kolem cévy sníží mechanické namáhání autologního štěpu ve srovnání se stentem, který působí zevnitř. Z tohoto hlediska jsou výsledky z *in vivo* studie na ovčích velmi povzbudivé. Žilní štěpy obalené sítěkou z tlaku- odolného polyesteru (torlen/dacron) měli signifikantně menší intimální hyperplazii ve srovnání s kontrolní skupinou žilních štěpů bez zevního obalu po 12 týdnech po implantaci.(58) Rovněž předpokládáme, že ovinutí sítěky kolem cévy slouží jako mechanická



opora žilní stěny, která zvyšuje rezistenci štěpu proti vysokému tlaku, snižuje tangenciální (tečné) napětí a zpomalí degeneraci štěpu.(35,58)

### **2.3 Cíle experimentu:**

1. Vyvinout modelový systém žilních graftů a dále je interponovat do tepenného řečiště u laboratorního zvířete k hodnocení neointimální hyperplazii u těchto graftů na základě morfologických kritérií.
2. In vitro otestovat kinetiku uvolňování sirolimu z nově vyvinutého systému stejně jako jeho vliv na tkáňové kultury cévního endotelu a hladkých svalových buněk.
3. Vyvinout nový duální a synergicky působící periadventiciální polymerní systém s kontrolovaným uvolňováním antiproliferativní látky (sirolimu) jako prevenci neointimální hyperplazie.
4. In vivo v pokusu na laboratorním zvířeti otestovat nově vyvinutý systém a hodnotit dynamiku změn v intimě žilních štěpů ve střednědobém sledování.

### **2.4 Očekávané výsledky**

Vytvoření zevního resorbovatelného obalu autotranplantované cévy, který by obsahoval a uvolňoval antiproliferativní látky a tím dlouhodobě ovlivnil průchodnost žilních graftů používaných v kardiovaskulární chirurgii.

Použití modelu na laboratorním zvířeti k přechodu do preklinické a klinické praxe vytvořením nové metody k léčení tzv. vein graft disease u žilních autologních či allogenních graftů.

## 3 Materiál a metodika

### 3.1 Materiál

Polyesterová síťka (Duratexol) byla získána z VÚP Brno, ČR, Purasorb PLC 7015, kopolymer kyseliny L-mléčné a  $\epsilon$ -kaprolaktonu (molární poměr 70/30,  $M_w \sim 200.000$  g/mol z PURAC Biomaterials) a sirolimus (Rapamycin from Streptomyces, kat.č. R0395) byl zakoupen z firmy Sigma-Aldrich (Německo). Polyesterová síťka (PE) byla vyrobená z příze o průměru 90  $\mu\text{m}$ , která se skládá z vláken o průměru 17,5  $\mu\text{m}$ . Purasorb při potahování pronikl mezi vlákna v přízi.

#### 3.1.1 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 zmesi chlorbenzen - etanol (1,75:1 v/v); *roztok 2*, 5,2 mg sirolimu a 36,4 mg purasorbu v 1 ml zmesi chlorbenzen - etanol (1,75:1 v/v). Síťka *sirolimus* obsahovala 0,14 mg sirolimu homogenně nanesených v 0,98 mg purasorbu na 1  $\text{cm}^2$ . Síťka byla sušena 3 týdny ve vakuové peci a potom následně sterilizována v ethylen oxidu ( síťka uvolňující sirolimus).

#### 3.1.2 Měření uvolňování sirolimu ze síťky

Připravené kousky síťky se sirolimem o velikosti 0,5  $\text{cm}^2$  nebo 1  $\text{cm}^2$  byly inkubovány v 5 ml fosfátového pufru (PBS) na  $\text{cm}^2$  síťky při 37 °C na třepačce. PBS bylo denně měněno. 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 3-4 vzorky.

Po vysušení sítěk byl polymer se sirolimem rozpuštěn v dichlormetanu, rozpouštědlo bylo následně odpařeno do sucha. Sirolimus byl rozpuštěn v 1 ml metanolu, centrifugován 5 min při 13 000 rpm a supernatant byl ihned analyzován pomocí Acquity UPLC systému vybaveném detektorem 2996 PDA. Chromatogramy analýz sirolimu byli extrahováni a následně kvantifikováni při 278 nm. Naměřené údaje byly zpracovány pomocí Empower 2 software (Waters). Vzorky byli injikovány na kolonu Waters BEH C18 column (50 × 2,1 mm I.D., velikost částic 1,7 μm); mobilní fáze: rozpouštědlo A, 10% acetonitrile a rozpouštědlo B, acetonitrile; lineární gradientová eluce (min/%B): 0/60, 1,5/100, 2/100; rychlost průtoku 0,4 ml. min<sup>-1</sup>; 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 sestrojena v lineárním rozmezí od 3,125 do 100 μg.ml<sup>-1</sup> pomocí metanolových roztoků sirolimu o koncentraci 100, 50, 25, 12,5, 6,3 a 3,1 μg.ml<sup>-1</sup>.

Množství zbytku neuvolněného sirolimu v síťce  $X$  [μg/cm<sup>2</sup>] bylo počítáno podle vzorce:  $X = C_{UPLC} * 3,97 / m$ , kde  $C_{UPLC}$  [μg.ml<sup>-1</sup>] představuje koncentraci sirolimu extrahovanou z 1 kusu síťky a měřené pomocí UPLC,  $m$  představuje hmotnost analyzované síťky po extrakci a bez vrstvy purasorbu se sirolimem, konstanta 3,97 představuje hmotnost 1 cm<sup>2</sup> čisté síťky bez purasorbu a sirolimu.

### 3.1.3 Kultivace buněk

Polyesterová síťka (*sít*), polyesterová síťka potažená purasorbem (*purasorb*) a síťka potažená purasorbem se sirolimem (*sirolimus*) byli sterilizováni etylenoxidem a sušeni ve vakuu 4 týdny při 35 °C. Do kultivačních komůrek (24-jamkové deštičky, TPP, Švýcarsko) byli nasazeni EB nebo VSMC v hustotě 16 tis. buněk/jamku, tj. asi 9000 bb/cm<sup>2</sup> v 1,5 ml kultivačního média. VSMC byly kultivovány v DMEM médiu (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 $\mu$ g/ml gentamicinu (LEK, Ljubljana, Slovinsko), EB v mediu (Minimum essential Eagle medium) obohaceném 2mM L-glutaminu, Earle's Balanced Salt Solution 1,5 g/l sodium bicarbonátu, 0,1 mM neesenciálních aminokyselin, 1,0 mM sodium pyruvátu (všechny chemikálie: Sigma, USA) a 20% FBS. VSMC byly získány explantační metodou z komplexu intima-media hrudní aorty 8-týdenních samců Wistar SPF potkanů (59) a použity v 5-10 pasáži. EB pocházely z hovězí plicní artérie (linie CPAE ATCC CCL-209, Rockville, MA, USA). Dvacet čtyři hodin po nasazení byly do media přidány vzorky sítěk; polystyren (PS) sloužil jako kontrola. Buňky byly kultivovány 1, 3 nebo 8 dní po nasazení ve zvlhčené atmosféře s 5% CO<sub>2</sub>. Tři vzorky byly použity pro každou skupinu a každý časový interval.

#### 3.1.4 Životaschopnost a počet buněk

Na vizualizování životaschopnosti (angl. *viability*) buněk byl použit Live/dead Viability/Cytotoxicity Kit (Molecular Probes, Invitrogen). Vzorky byly inkubovány s roztokem calceinu v PBS v inkubátoru s 5% CO<sub>2</sub> při 37 °C po dobu 15 min (živé buňky calcein metabolizují a svítí zeleně, excitace 488 nm, emise 505-535 nm) a s roztokem ethidium tetrametru (prochází membránou poškozených a mrtvých buněk a barví je červeně, excitace 539 nm, emise 638-699 nm). Pozorováno pod fluorescenční mikroskopem Olympus IX 71, kamera DP 71. Počet živých a mrtvých buněk byl počítán z 30-52 zorných polí a životaschopnost (viabilitu) buněk jako procento živých buněk.(60)

## 3.2 Chirurgická technika

### 3.3.1 Metodika

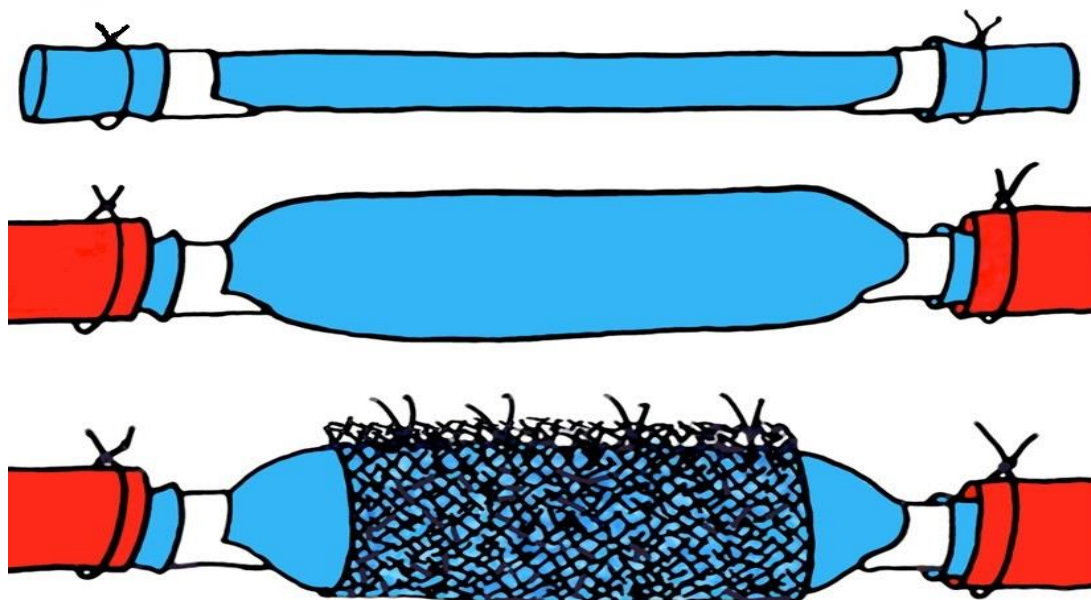
Studie byla před zahájením schválena odbornou komisí podle zákona na ochranu zvířat proti týrání. Z operovaných králíků jsme vytvořili 3 skupiny pro sledování po 3 respektive 6 týdnech. V každé skupině jsme vytvořili soubor kontrolní tj. autologní žílu bez sítě (žila\_3 , žila\_6), soubor pro sledování působení čisté polyesterové sítě bez sirolimu (sít\_3, sít\_6) a poslední soubor pro sledování působení sirolimu na nosiči s polyesterovým obalem (sirolimus\_3, sirolimus\_6). V každé skupině jsme měli 6-10 zvířat randomizovaných k jednotlivým pokusům. Dále jsme měli kontrolní skupinu žilního graftu ( žíla\_0).

### 3.3.2 Chirurgická technika anastomozy

K pokusu *in vivo* byl vybrán model implantace jugulární žíly do tepenného řečiště a. carotis communis u králíka. Jednak pro svoji jednoduchost a také 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 cefalexim 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 French. (Terumo Medical Corp, Elkton, Md) (Obr. 5) (61) 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 ligaturou fixovali. Po uvolnění krevního proudu jsme kontrolovali rozvinutí žilního štěpu a

dále dle určené skupiny pokračovali s obalením cévy sít'kou a její fixací (Obr. 6). Poté byla rána uzavřena po anatomických vrstvách. Odběr vzorků po 3 a 6 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.



**Obr. 5** Chirurgická technika implantace žilního graftu do arteriálního řečiště (13)



**Obr. 6** Žilní graft v arteriální řečišti před uvolněním krevního proudu do rekonstrukce (A), uvolnění krevního proudu a počáteční dilatace žilního štěpu – kontrolní skupina (B) a aplikace periadventiciálního obalu – sít'ky na rozvinutou cévu (C)

### 3.3 Histologie a imunohistochemie

Odebrané žilní štepy byly rozděleny na dvě části. Jedna část byla fixována v 10% formalinu a poté byla zalita do parafínu. Druhá část (nativní) byla umístěna do Tissue Tek<sup>®</sup> Cryomold holder (Sakura Finetek, Tokyo, Japan) a zalita média Tissue Tek<sup>®</sup> OCT (Sakura Finetek, Tokyo, Japan). Poté byla zmražena 2-methylbutanem (Fluka Chemika, Buchs, Switzerland), ponořením v mrazuvzdorné nádobě do tekutého dusíku. Zmražené vzorky byly uchovávány při teplotě  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.4 Histologie

Vzorky zalité do parafínu byly krájeny na 3-4  $\mu\text{m}$  tenké řezy a obarveny následujícími metodami: hematoxylin-eosin, Van Gieson s elastikou, von Kossa a Pearlsovou reakcí na průkaz železa. Úseky tkání vybrané pro analýzu byly odebrány ze středního segmentu vzorku, abychom se vyvarovali eventuální přítomnosti reakce na šicí materiál. Preparáty obarvené barvením Van Gieson s elastikou byli pozorováni pod mikroskopem Olympus IX 51, fotografie byly pořízeny digitálním fotoaparátem DP 70.

### 3.5 Immunohistochemie

Protilátky pro imunohistochemickou analýzu jsou uvedeny v následující tabulce. (Tab. 1)

Antigen	Původ	Firma	Ředění	Klon
CD4	Mouse	Novus Biological, CO, USA	50x	KEN-4
CD8	Mouse	LifeSpan Biosciences, WA, USA	100x	NA
Hladkosvalový aktin	Mouse	Sigma, MO, USA	900x	1A4
Makrofágy	Mouse	Abcam, UK	200x	MAC387
CD31	Mouse	Abcam, UK	20x	JC/70A
PCNA	Mouse	Dako, Denmark	6000x	PC 10

**Tab. 1.** Seznam monoklonálních protilátek použitých pro imunohistochemickou analýzu

#### 3.5.1 Formolem fixované vzorky tkání zalité do parafínu

Imunohistochemická vyšetření byla provedena na 4 µm tenkých parafinových řezech s využitím třístupňové nepřímé metody. Vzorky byly deparafinovány v xylynu a zavodněny v sestupné alkoholové řadě. Demaskování antigenů proběhlo podle protokolu v mikrovlnné troubě v 0,01 M citrátovém pufru pH 6 (detekce aktinu hladkých svalových buněk), v EDTA pufru pH 8 (detekce PCNA) nebo byla aplikována proteináza K (detekce makrofágů a CD31). Endogenní peroxidáza byla blokována 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v 70% metanolu po dobu 30 ti minut. Endogenní biotin byl blokován pomocí biotin blokujícího systému (Dako , Glostrup, Dánsko). Tkáně byly poté inkubovány s 10% koňským sérem (Vector laboratories, Burlingame, CA, USA), 20min, aby se zabránilo nespecifickým vazbám. Primární protilátky byly aplikovány na 30 min při pokojové teplotě, v případě CD 31 proběhla inkubace přes noc při 4° C. Detekce monoklonálních protilátek byla provedena pomocí biotinylovaného – anti myšího IgG ( Vector laboratories, Burlingame, CA, USA), ředěním 200x, po dobu 30 minut.



Vzorky byly poté inkubovány s R.T.U. Vectastain Elite ABC reagentem po dobu 30 minut. Nakonec byly vzorky inkubovány s roztokem s 3,3' diaminobenzidine (Liquid DAB+ Substrate-Chromogen Systém; Dako, Glostrup, Dánsko), 5 minut, a dobarvovány Harrisovým hematoxylinem (Merck, SRN). Poté byly zamontovány pomocí Entellanu (Merck, SRN).

### 3.5.2 Zmrazené vzorky tkání

Imunohistochemická vyšetření byla prováděna na 8µm tenkých řezech s využitím třístupňové nepřímé metody. Řezy byly fixovány po dobu 10 minut v ledovém acetonu. Následně byly řezy byly promyty v 0,2% roztoku Tritonu X100 a pufovaném fosfátovém fyziologickém roztoku, endogenní biotin byl blokován pomocí biotin blokujícího systému (Dako,Glostrup, Dánsko). Tkáňové vzorky byly poté inkubovány s 10% koňským sérem, následně byly aplikovány na 60 minut primární protilátky (anti CD4/CD8). Endogenní peroxidáza byla blokována 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v 70% metanolu po dobu 30ti minut. Vzorek byl dále inkubován se sekundární biotinylovanou koňskou anti myší protilátkou (Vector laboratories, Burlingame, CA, USA) následně byl inkubován s R.T.U.Vectastain Elite ABC Reagentem (Vector laboratories, Burlingame, CA,USA). Nakonec byly vzorky inkubovány po dobu 5ti minut s 3,3' diaminobenzidine (Dako Liquid DAB+ Substrate-Chromogen Systémem; Dako, Glostrup, Dánsko) a byly dobarveny Harrisovým hematoxylinem a zality v Entellanu (oba od Merck, Germany).

Absolutní počet CD4+ buněk, CD8+buněk, neutrofilů, plasmocytů, eosinofilů, makrofágů, obrovských mnohojaderných buněk typu cizích těles, Fe a Ca částic byl počítán celém příčném řezu žilních štěpů v 10 mikroskopických polích na jednoho králíka v 600x zvětšení.

### 3.6 Tloušťka intimy, medie, komplexu medie-intimy, poměr medie-intima

Byly měřeny následující parametry: tloušťka intimy od povrchu endotelu k vnitřnímu okraji tunica media, tloušťka medie od vnitřní hranice tunica media k hranici mezi tunica media a tunica adventicia a tloušťka komplexu intima-medie od povrchu endotelu k hranici medie-adventicie. Data byla shromážděna z 32-84 měření na jednoho králíka ve 12-28 zorných polí pomocí doplňkového modulu MeasureStackLines elipsa software (ViDiTo systémy, Slovensko). Poměr média/intima byl vypočten z naměřených hodnot. Střední hodnoty a standardní odchylka průměru ( $\text{mean} \pm \text{SEM}$ ) byly vypočteny pro každou žílu a pro každou skupinu zvířat. Štěpy s trombózou nebyly měřeny.

### 3.7 Statistická analýza

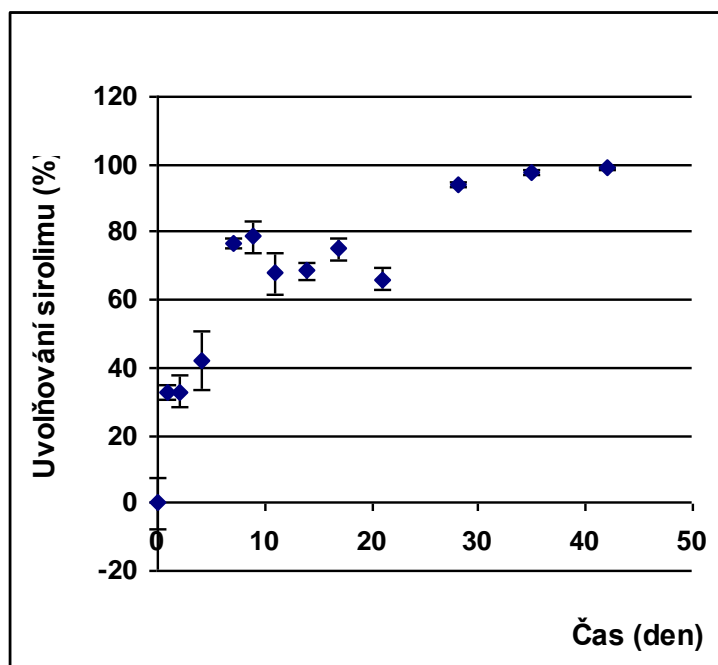
Pro hodnocení histologie a histomorfometrie byla použita neparametrická jednocestná metoda ANOVA podle Kruskal-Wallise. Dvoucestná ANOVA a Tukey – studentův rozptyl byl použit k analýze dat tloušťky intimy, medie, komplexu medie-intimy a poměru medie-intima. Proměnné byly hodnoceny pomocí testu na normální rozdělení pomocí Shapiro a Wilkovi statistiky. Vzhledem k tomu, že normální rozdělení bylo zamítnuto, byla použita logaritmická transformace. Působení času, léčiva a interakce mezi časem a léčivem byly testovány a  $p < 0,05$  byla považována za významnou.

## 4 Výsledky

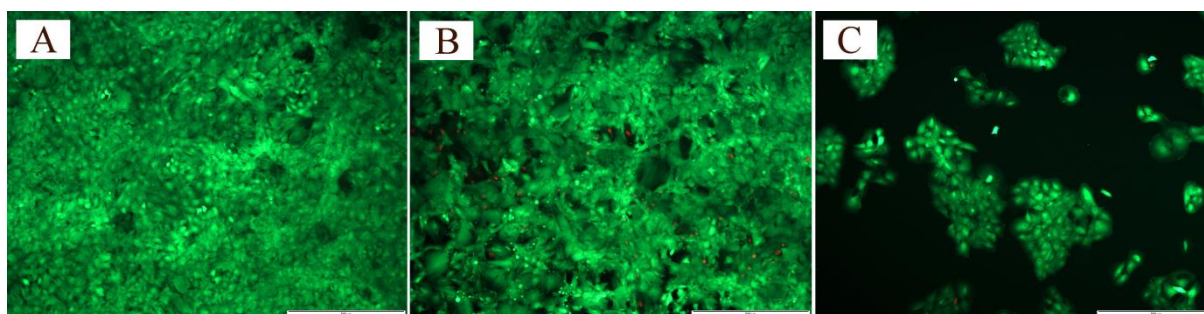
### 4.1 Výsledky pokusů in vitro

#### 4.1.1 Uvolňování sirolimu ze sítěky

Sirolimus se uvolňoval ze sítěky po dobu 6 týdnů, s iniciálním rychlým uvolněním asi 70% léčiva v průběhu prvních 7 dnů a pozvolným uvolňováním zbytku léčiva dalších 5 týdnů (Obr. 55). Live/dead barvení ukázalo výbornou životaschopnost VSMC v přítomnosti uvolněného sirolimu ze sítěky v kultuře, která byla 86,1% 2. den, respektive 97,6% 7. den po přidání sítěk (Obr. 56); u EB byla viabilita buněk 92,3% 2. den a 65% 7. den po přidání sítěk. U kontrolních čistých polyesterových sítěk (sít') a sítěk potažených kopolymerem (purasorb) byla životaschopnost obou typů buněk vyšší než 93,8%.



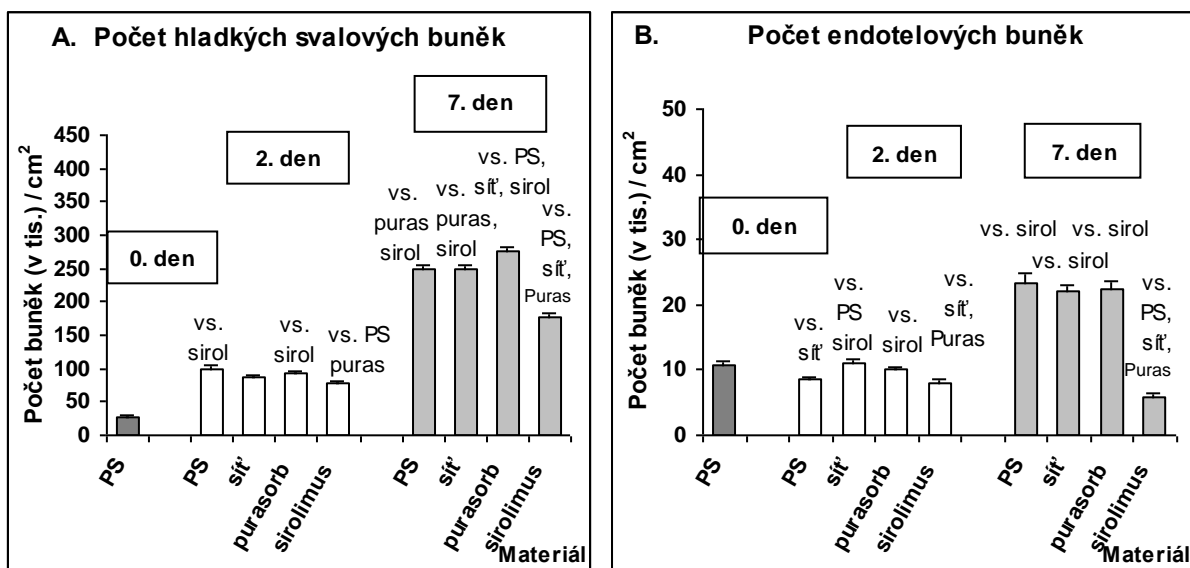
**Obr. 7** Kumulované uvolňování sirolimu z polyesterové sítěky ve fosfátovém pufru v průběhu 6-týdenní inkubace. Hodnoty jsou prezentovány jako aritmetický průměr  $\pm$  SEM.



**Obr. 8** Hladké svalové buňky barveny pomocí Live/dead eseje, tj. živé buňky zeleně, mrtvé červeně na polystyrenu pro tkáňové kultury (A), na polystyrenu po přidání polyesterové sítěky potažené purasorbem (B) a na polystyrenu po přidání sítěky uvolňující sirolimus (C) 7. den po přidání sítěk, tj. 8. den po nasazení. Měřítko = 500  $\mu$ m. Mikroskop Olympus, IX 71, kamera DP 71.

#### 4.1.2 Inhibice proliferace buněk

Uvolňující se sirolimus v *in vitro* experimentu inhiboval růst VSMC i EB buněk v průběhu 7-denní kultivace. Počet VSMC byl nižší o 22% 2. den, respektive o 29% 7. den kultivace se *sirolimem* v porovnání s polystyrenem (Obr.57A). Počet EB klesl o 7% 2. den a o 75% po 7 dnech po přidání sítěk (Obr 57B). U kontrolních vzorků sítěk (*sít'* a *purasorb*) byl počet buněk stejný jako u polystyrenu. (Obr.9)



**Obr. 9** Počet hladkých svalových buněk (A) a endotelových buněk (B) na polysterenu pro tkáňové kultury (PS), na PS po přidání polyesterové síťky (sít'), na PS po přidání polyesterové síťky potažené purasorbem (purasorb), na PS po přidání polyesterové síťky uvolňující sirolimus (sirolimus) 0., 2. a 7. den po přidání sítěk, tj. 1., 3. a 8. den po nasazení. Počty buněk jsou uváděny jako aritmetický průměr ± SEM. Hodnota  $p \leq 0,05$  je považována za významnou.

## 4.2 Výsledky pokusů in vivo

### 4.2.1 Histologie a imunohistochemie

#### 4.2.1.1 Tunica intima

Ve všech experimentálních skupinách zvířat byl vnitřní povrch žilního štěpu pokryt vrstvou endotelových buněk (obr. 10,11). U některých štěpů byly pozorovány tromby na vnitřním povrchu tunica intima (Tab. 2). Některé tromby zcela obliterovaly lumen štěpu,

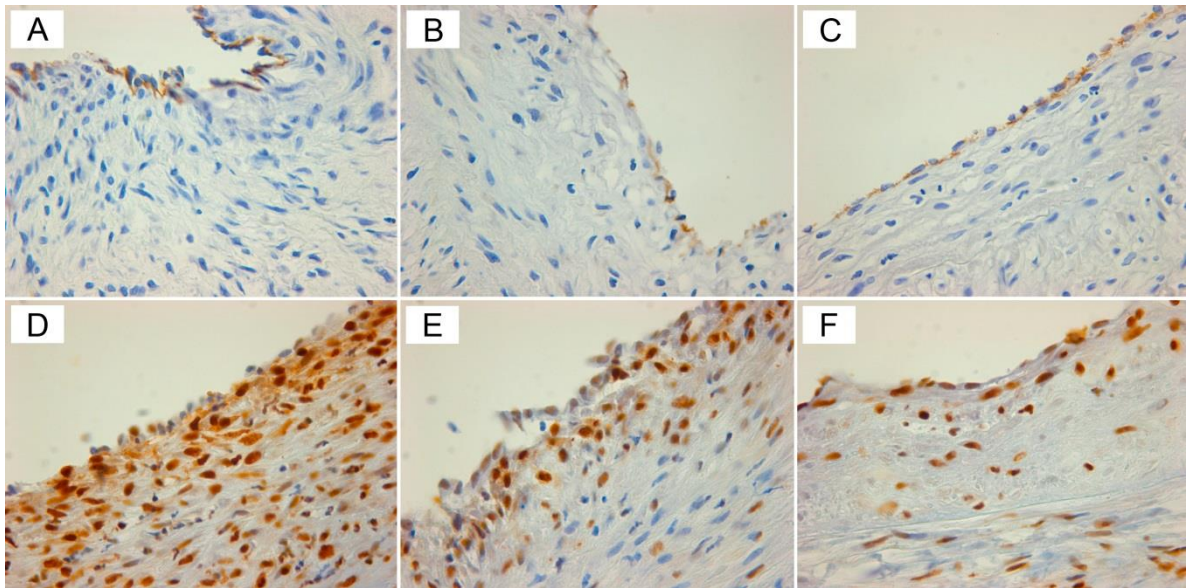
zatímco zbylé byly jen nástěnné nebo rekanalizované, ale nebyly nalezeny žádné signifikantní rozdíly mezi skupinami králíků. Nicméně byl zjištěn významný rozdíl v tloušťce intimy mezi vzorky (viz níže v části "Tloušťka intimy, medie, komplexu intima-medie a poměr medie/intima"). Ložiskově byly pozorovány v neointimě hladké svalové buňky, zejména ve vzorcích ze zvířat, kde nebyl aplikován sirolimus.

	1. žíla_3	2. sítě_3	3. sirolimus_3	4. žíla_6	5. sítě_6	6. sirolimus_6
Počet zvířat	7	4	9	11	8	10
CD4+	** vs. 3 50.7 ± 19.9	** vs. 3 29.3 ± 5.4	** vs. 1, 2 0.6 ± 0.4*	10.7 ± 1.1	12.8 ± 4.5	12.8 ± 3.8
CD8+	27.5 ± 17.3	* vs. 3 15.5 ± 4.8	* vs. 2,5 0.8 ± 0.4	2.9 ± 0.3	* vs. 3 10 ± 3.4	1.8 ± 0.5
Plazmocyty	4.6 ± 1.8	7.3 ± 2.6	** vs. 4 0 ± 0	** vs. 3, * vs. 6 6.9 ± 2.0	2.5 ± 0.7	* vs. 4 0.4 ± 0.4
Makrofágy	1.6 ± 1.1	12.8 ± 8.0	** vs. 6 0 ± 0	2.8 ± 1.3	1.2 ± 0.6	** vs. 3 13.2 ± 9.6
Králíci s tromby/ Počet zvířat	3 / 7	2 / 4	5 / 9	5 / 10	5 / 8	3 / 8
Králíci s obliterujícím/ rekanalizova ným trombem	0 / 1	0 / 1	0 / 1	3 / 0	1 / 2	0 / 0

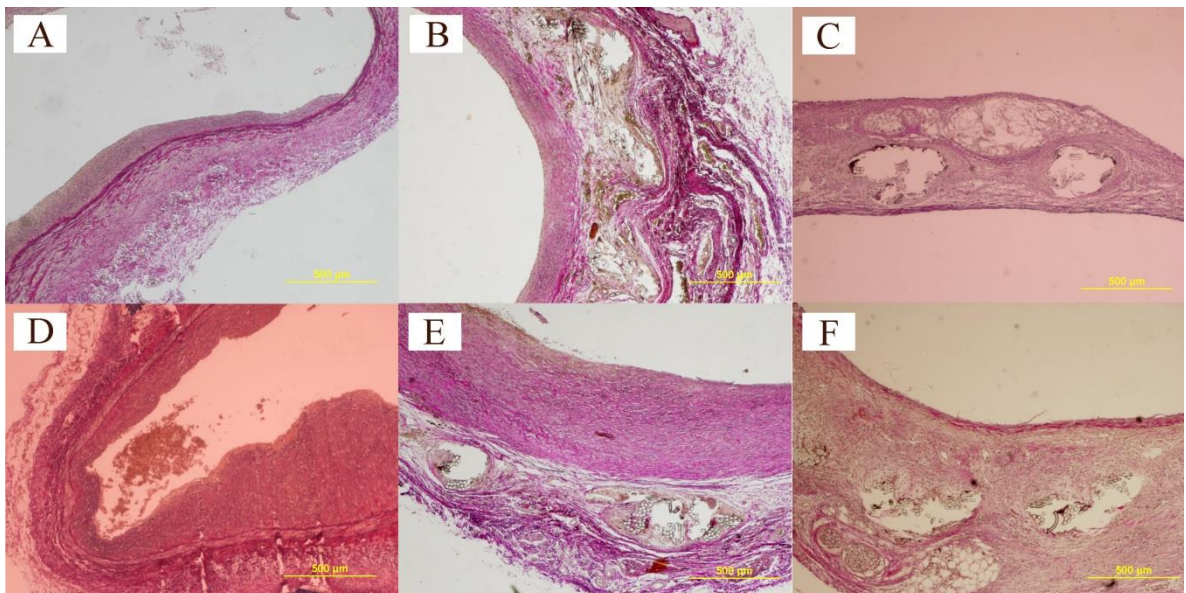
**Tab. 2** Počet buněk CD4+ , CD8+ , plasmocytů , makrofágů z 10 mikroskopických polí na králíka vyjádřených jako střední odchylka ± SEM ze 4-10 zvířat, zvětšení ×600. Celkový počet králíků s jakýmkoli typem trombu , s obliterujícím trombem nebo rekanalizujícím se trombem ; pro statistickou analýzu neparametrického testu Kruskal-Wallis ANOVA, byla užitá jednocestná variační analýza , \* je použita pro p<0.05, a \*\* jsou užity pro p<0.01 ve srovnání se vzorky stejného počtu.

#### 4.2.1. 2 **Tunica media**

Ve všech skupinách proces adaptace žilních štěpů na arteriální tlak vede k vytvoření více vrstev hladké svaloviny, které mělo za následek zesílení medie (obr.11; Viz také níže v části "Tloušťka intimy, medie, komplexu intima-medie a poměr medie-intima"). To bylo doprovázeno zvýšením počtu PCNA+ buněk (obr. 10, viz také níže v sekci PCNA). V žilním štěpu se sítkou uvolňující sirolimus (*sirolimus\_3*) pozoruhodně poklesla přítomnost infiltrujících buněk CD4 + a CD8 + v cévní stěně (tj komplex intimy, medie a adventicie) ve srovnání s žilním štěpem a štěpem obaleným prostou polyesterovou sítkou bez sirolimu (*sít'\_3*) po 3 týdnech (Tab. 2, obr. 12). Počet makrofágů a plasmocytů byl velmi malý ve všech skupinách. Bylo zde jen sporadické množství neutrofilních a eozinofilních leukocytů. Po 6 týdnech byl nalezen nižší počet plasmocytů v žilách obalených sítkou uvolňující sirolimus (*sirolimus\_6*) ve srovnání s autologním transplantátem. Ačkoli v žilách obalených sítkou uvolňující sirolimus počet makrofágů významně vzrostl mezi 3 až 6 týdnem, přesto bylo celkové množství makrofágů podobné v obou dalších skupinách (*žila\_6, sít'\_6*) po 6 týdnech (Tab. 2). V žádné z těchto skupin nebyla zastižena přítomnost kalciových krystalů.



**Obr.10** Immunohistochemický průkaz CD31 (A-C) a (PCNA, D-F) v autologním štepě (žila\_3, A, D), autologním štepě s polyesterovou síťkou (sít' 3, B, E), autologním štepě s polyesterovou síťkou uvolňující sirolimus (sirolimus\_3, C, F) 3 týdny po implantaci do králíka, zvětšení 400x, pozitivně zbarvené buňky jsou hnědé.



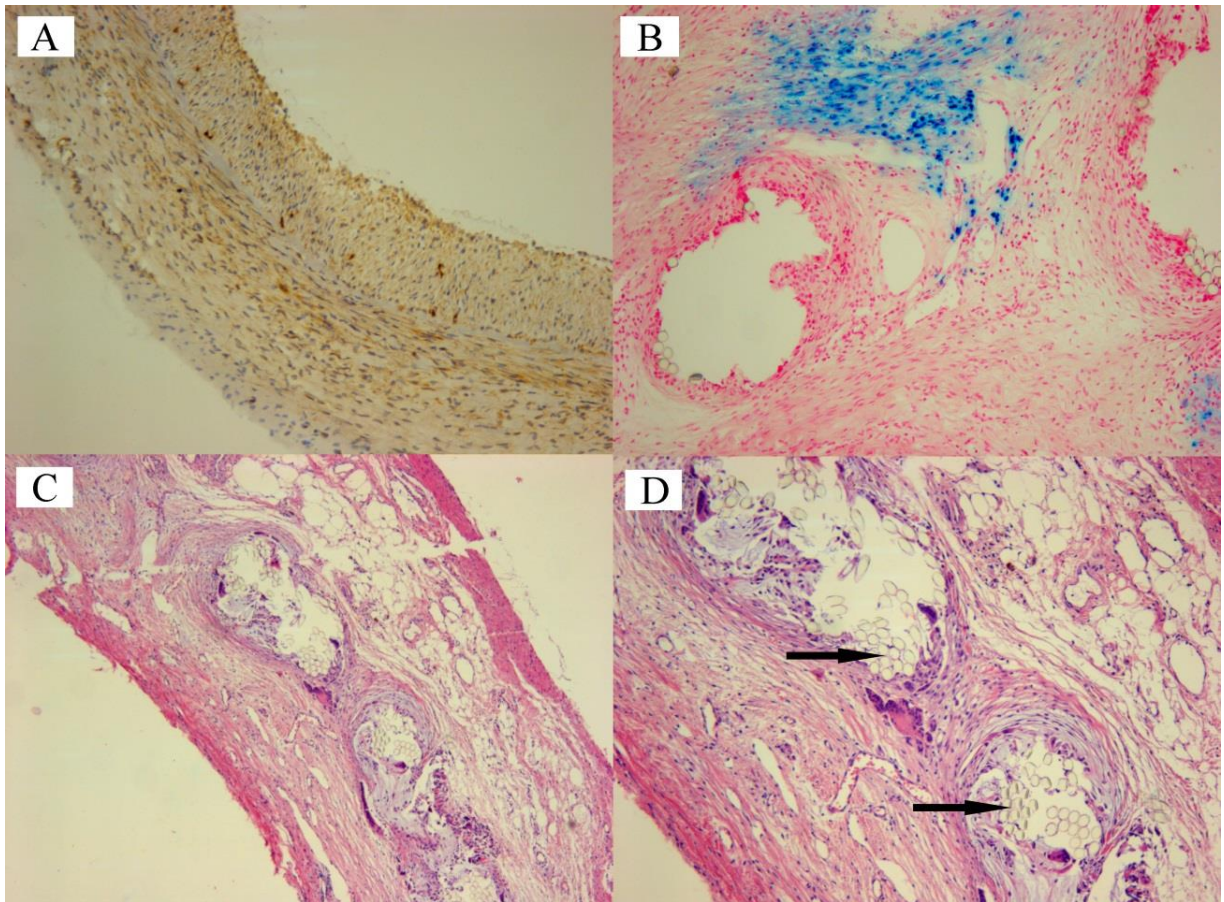
**Obr. 11** Autologní žilní štep (žila\_3, A; žila\_6, D), autologní žilní štep s polyesterovou síťkou (sít' 3, B; Sít' 6, E) a autologní žilní štep s polyesterovou síťkou uvolňující sirolimus (sirolimus\_3, C; sirolimus\_6, F) po třech (A, B, C) a šesti týdnech (D, E, F) u králíků,



barvení van Gieson s elastikou, objektiv  $\times 4$ , měřítko = 500  $\mu\text{m}$ , mikroskop Olympus IX51, digitální fotoaparát DP70.

#### 4.2.1. 3 **Tunica adventicia**

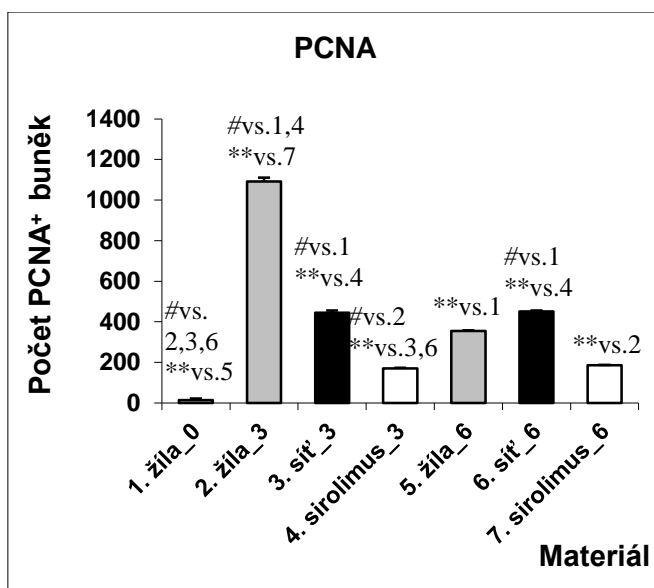
Histologické barvení odhalilo přítomnost polyesterové síťky a polyesterové síťky uvolňující sirolimus v adventicii žilních štěpů. Ve všech skupinách byla distribuce imunokompetentních buněk, tedy plasmocytů, CD4 + a CD8 + buněk, podobná jako jejich rozložení v tunica media (obr. 12A), viz též v části o Tunica media (Tab. 2 ). Jako histologický korelát resorpce hematomu byly občas nalezeny malá ložiska železitého pigmentu (obr. 12B). Kromě toho ve skupinách se štěpy s polyesterovými síťkami (*sít\_3*, *sít\_6*) a s polyesterovými síťkami uvolňující sirolimus (*sirolimus\_3*, *sirolimus\_6*) byly pozorovány kolem vláken síťek síťek obrovské mnohojaderné buňky typu cizích těles. (obr. 12 C, D).



**Obr. 12** Imunohistochemický průkaz CD4+ buněk v autologním štěpu (*žila\_3*) po 3 týdnech po implantaci do králíka (A) Pearlova reakce k průkazu železa (B) v autologním štěpu s polyesterovou sítkou uvolňující sirolimus (*sirolimus\_3*) po třech týdnech od implantace do králíka. Barvení hematoxylin-eosin u autologních štěpů s polyesterovou sítkou uvolňující sirolimus (*sirolimus\_3*) po 3 týdnech po implantaci do králíka (C - D), zvětšení 50x (A, C), 200x (B) a 100x (D); CD4+ buňky jsou hnědé (A), Fe se barví modře (B), šipky (D) označují vlákna polyesterových sítěk vrůstajících do štěpu; Obrovské mnohoaderné buňky typu z cizích těles jsou lokalizovány v okolí vláken polyesterové sítky.

#### 4.2.2 PCNA

Většina buněk PCNA+ byla nalezena v médii a intimě (obr. 10 a 13) a méně v adventicii. Nejvyšší počet PCNA+ buněk byl pozorován ve skupině čistých žilních štěpů za 3 týdny po implantaci (žila\_3). Po 3 týdnech žilní štěpy s polyesterovou sítkou (sít'\_3) měli o 59±15 % méně PCNA+ buněk a skupina se sirolimem (sirolimus\_3) dokonce o 84±13 % méně PCNA+ buněk. Po 6 týdnech se počet buněk PCNA+ výrazně snížil v kontrolní skupině čistých štěpů (žila\_6); čísla se však nezměnila ve skupině štěpů s polyesterovou sítkou (sít'\_6) a skupině se sirolimem (sirolimus\_6).



**Obr. 13** Počet buněk s pozitivním antigenem PCNA+ (Proliferating cell nuclear antigen) v autologním žilním graftu (žila), v autologním žilním štěpu s polyesterovou sítkou (sít'ka), a v autologním žilním štěpu s polyesterovou sítkou uvolňující sirolimus (sirolimus) po 3 a 6 týdnech u králíků. Hodnoty jsou uvedeny se střední směrodatnou odchylkou ± SEM (Standard Error of Mean). Obousměrný párový test ANOVA and Tukey jsme použili pro statistickou analýzu; \*  $p \leq 0.01$  a #  $p < 0.05$  jsou považovány za signifikantní pro srovnání stejného vzorku.

### 4.2.3 Tloušťka intimy, médie, komplexu intima-médie a poměr médie/intima

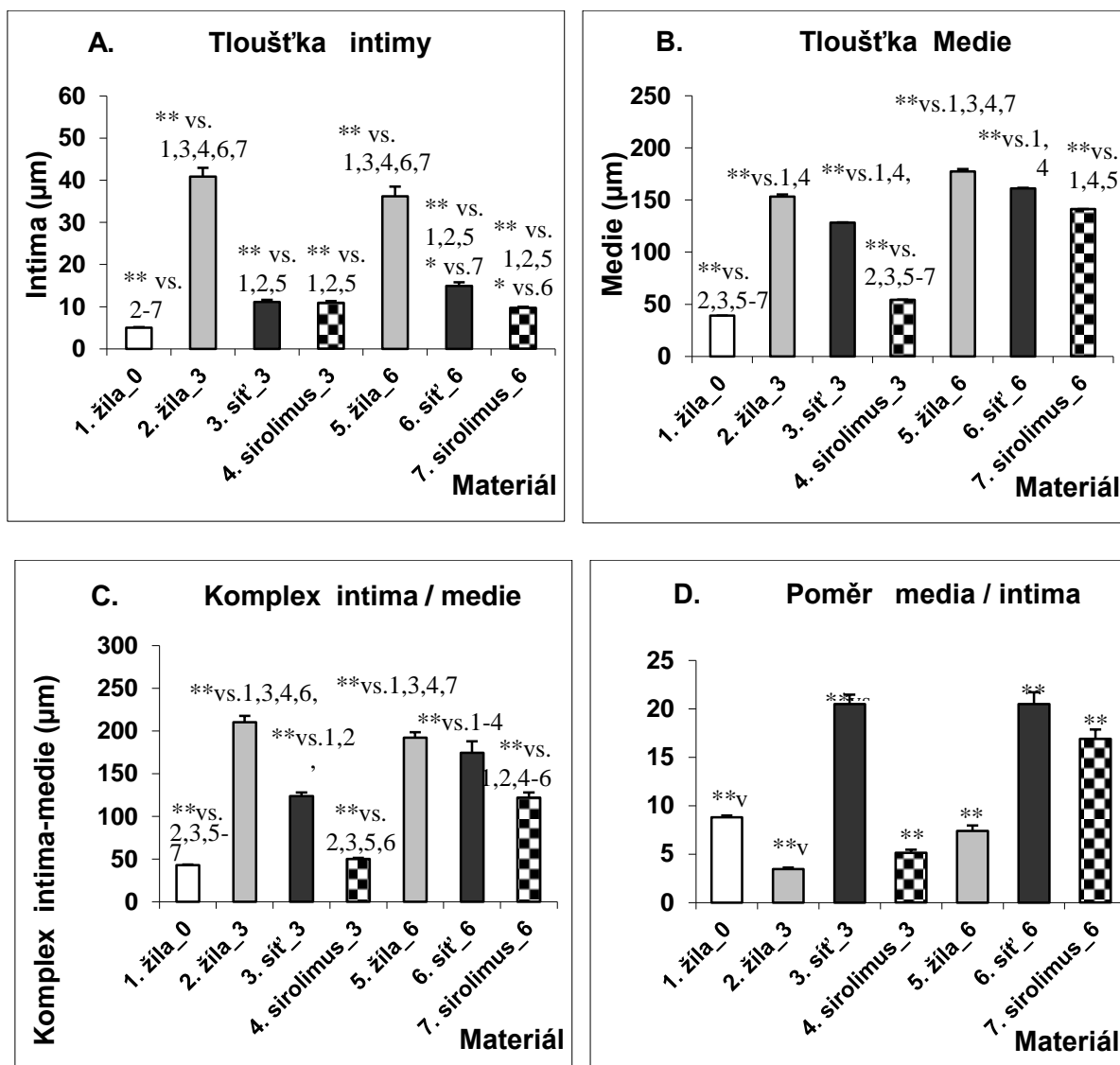
Měření intimy (obr. 14A) po třech týdnech ukázalo nejvyšší hodnoty tloušťky intimy v kontrolní skupině samotného žilního štěpu (*žila\_3*). U štěpů obalených sítkou s polyesterovou sítkou (*sít'\_3*) nebo sítkou s polyesterem a sirolimem (*sirolimus\_3*) byla tloušťka intimy snížena o  $73\pm 8$  a  $73\pm 11$  %, oproti kontrolní skupině samotného žilního štěpu. Mezi 3 a 6 týdnem zůstala tloušťka intimy u všech sledovaných skupin konstantní. Po 6 týdnech bylo snížení tloušťky intimy u štěpů s polyesterovou sítkou (*sít'\_6*) a štěpů s polyesterovou sítkou a sirolimem (*sirolimus\_6*) o  $59\pm 12\%$  a  $73\pm 9$  %, ve srovnání se samotným štěpem (*žila\_6*). Ve skupině štěpů s polyesterovou sítkou a sirolimem (*sirolimus\_6*) jsme pozorovali silnější efekt na intimální hyperplazii ve srovnání se skupinou štěpů jen s polyesterovou sítkou (*sít'\_6*) po 6 týdnech.

Nárůst tloušťky médie (obr. 14B) se významně snížil o  $65\pm 9$  % ve skupině štěpů polyesterovou sítkou se sirolimem (*sirolimus\_3*) po třech týdnech od implantace. Současně ve skupině graftů s polyesterovou sítkou (*sít'\_3,6*) nedošlo k ovlivnění hyperplazie médie, ve srovnání s kontrolní skupinou samotných žilních štěpů (*žila\_3,6*) a to v obou časových intervalech. Po šesti týdnech byla tunica média výrazně tenčí o  $20\pm 12$  % u štěpů s polyesterovou sítkou a sirolimem (*sirolimus\_6*), než ve skupině samotných žilních graftů (*žila\_6*). Tloušťka komplexu intima-médie (obr. 14C) byla markantně snížena o  $76\pm 5$  a  $37\pm 9$  % ve skupině polyesterovou sítkou se sirolimem (*sirolimus\_3,6*) ve srovnání s kontrolními štěpy (*žila\_3,6*) za tři a šest týdnů po implantaci. V intervalu 3 týdnů došlo ve skupině graftů s polyesterovou sítkou (*sít'\_3*) ke snížení komplexu intima-médie o  $41\pm 6$  % oproti kontrolní skupině samotného žilního štěpu (*žila\_3*).

Kontrolní skupina samotného žilního štěpu (*žila\_3*) a skupina s polyesterovou sítkou a sirolimem (*sirolimus\_3*) měla po třech týdnech poměr intima-médie podobný jako u zdravé nativní žíly, tj. skupina (*žila\_0*). Po třech týdnech se podařilo ve skupině štěpů

s polyesterovou sítkou a sirolimem (*sirolimus\_3*) udržet podobný poměr média-intimy jako ve skupině nativní žíly – (*žíla\_0*). Po šesti týdnech došlo u štěpů s polyesterovou sítkou (*síť\_6*) a polyesterovou sítkou se sirolimem (*sirolimus\_6*) k selektivnímu nárůstu tloušťky medie, které způsobilo zvýšení poměru média/intimy poměru, pravděpodobně v důsledku minimální koncentrace sirolimu v polyesterovém obalu v tomto časovém intervalu.(56)

Nejvyšší poměr média-intima byl pozorován ve skupině štěpů s polyesterovou sítkou (*síť\_3,6*) po 3 a 6 týdnech. V těchto skupinách byl poměr komplexu media-intima vyšší než tento poměr ve skupině samotných žilních graftů ve stejných časových intervalech.



**Obr. 14** Tloušťka intimy (A), medie (B), a komplexu intima-medie (C) autologního žilního štěpu (*žíla*), autologního žilního štěpu obaleného polyesterovou sítkou (*síť*), a autologního žilního štěpu obaleného polyesterovou sítkou uvolňující sirolimus (*sirolimus*) po 3 a 6 týdnech u králíků; poměr media/intima(D). Hodnoty jsou uvedeny se střední směrodatnou odchylkou ± SEM (Standard Error of Mean). Pro statistickou analýzu byla použita Scheffeho metoda dvojité neshody; \*  $p \leq 0.01$  a #  $p < 0.05$  jsou považovány za signifikantní pro srovnání stejného vzorku

## 5 Diskuze

### 5.1 Potvrzení hypotézy

V našem projektu jsme vytvořili jsme unikátní periadventiciální systém s postupným uvolňováním antiproliferativní látky (sirolimus), který inhiboval neointimální hyperplasii v žilních štěpech implantovaných do tepenného řečiště, jak jsme si předpokládali v naší hypotéze. Tato studie také potvrdila synergické působení mechanického obalu cévy a uvolňování sirolimu na remodelaci žilní stěny.

### 5.2 Mechanická opora – zevní obal cévy

Zevní obal cévy je vytvořený polyesterovou sítkou, která působí preventivně proti rozpínání žilního štěpu. Síťka 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 na stěnu cévy a vrátit se na normální hodnoty tlaků působících v lumen cévy. Mehta a spol (32) demonstroval ve své práci, že zevní umístění makroporézního, nerestriktivního polyesterového stentu redukuje neointimální hyperplasii na modelu prasečích žilních graftů. V případě identického tlaku uvnitř žíly s a bez zevního mechanického obalu, při předpokladu, že poloměr oka odpovídá 1/10 poloměru žíly, je napětí ve stěně v chráněném žilním štěpu 20x menší než napětí stěny v žíle bez ochrany.(58) V mechanismu tvorby neointimy hraje důležitou roli i adventicie.(62) 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.(63) K signifikantnímu snížení tloušťky intimy žilního štěpu s polyesterovou sítkou oproti kontrolní skupině došlo i v naší sérii a to jak v intervalu 3 tak i

6 týdnů od implantace. Je zajímavé, že při srovnání skupin po 3 a 6 týdnech již k dalšímu ovlivnění tloušťky intimy nedošlo a proces neointimální hyperplasie nepokračoval. Naopak u kontrolní žíly došlo k významnému nárůstu tloušťky intimy v čase.

### 5.3 Sirolimus

Druhým způsobem, kterým jsme ovlivnili proces neointimální hyperplasie 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 4 až 6 týdnů. Studie kinetiky uvolňování sirolimu ze sítěky do PBS ukázala, že sirolimus se uvolňoval po dobu až 6 týdnů, 70% léčiva se však uvolnilo do 7 dní. Perivaskulární manžeta z PCL uvolňovala rapamycin anebo paclitaxel 3 týdny.(64) Po obalení žíly sirolimus do ní difunduje a inhibuje růst hladkých svalových buněk. Histologie odhalila přítomnost sítěky v adventícii, což bylo způsobeno pravděpodobně nedostatečně hustou sítí, která se vtláčila do adventície při dilataci autologní žíly po implantaci. Tato neočekávaná pozice sítěky v těsné blízkosti média mohla paradoxně zvýšit koncentraci léčiva v médiu a snížit ztráty léčiva jeho difusí do prostoru kolem cévy. Na druhou stranu síťka může vyvolat odpověď tkáně na cizí materiál. V již vzpomenuté studii (21) perivaskulárně aplikovaný  $\epsilon$ -polykaprolakton bez léčiva způsobil tvorbu neointimy a granulačního tkaniva, naznačující probíhající zánětlivý proces.

U králíka byla pozorována redukce intimální hyperplasie závislá na dávce sirolimu ve stentech s obsahem 60  $\mu\text{g}$  až 200  $\mu\text{g}$  sirolimu.(65) Obsah sirolimu v stentech Cypher<sup>TM</sup> je v rozmezí od 70 do 300  $\mu\text{g}$ .(66) Obsah sirolimu v připravené síťce byl 140  $\mu\text{m}/\text{cm}^2$ . V *in vitro* experimentu takto připravená síťka uvolňovala sirolimus v koncentraci dostatečné k 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 sítěky ve vyšší koncentraci do medie, zatímco v intimě bude v nižších koncentraci, umožňující regeneraci endotelu. V *in vivo* experimentu jsme zjistili snížení tloušťky intimy o 47% po 3 týdnech a o 56% po 6 týdnech implantace v porovnání s autologní žílou. Perivaskulárně aplikovaný  $\epsilon$ -polykaprolakton uvolňující paclitaxel anebo rapamycin po dobu 3 týdnů snížil ztlustění intimy o 75 anebo 76 %, podle pořadí.(64) Pluronic gel s obsahem 200  $\mu$ g sirolimu aplikovaný do perivaskulárního prostoru u modelu žilního graftu v karotickém řečišti u myši snížil intimální hyperplázii o 41 % po 6 týdnech.(50) Další možností uplatněné u modelu žilního graftu jako interpozita femorální arterie u psa bylo užití tenkého filmu z kopolymeru PLA a PCL v poměru 1:1, s navázaným sirolimem, který obaloval žilní štěp.(67) V našem modelu jsme na potahování sítěky 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 hyperplasie, které je statisticky významné oproti skupině kontrolní a u skupin s polyesterovou sítěkou v obou časových intervalech. Tloušťka intimy u králíků se sítěkami se sirolimem se po 3 a 6 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.(68,69) Na základě tohoto průběhu intimální hyperplázie v čase je pravděpodobné, že nárazové uvolnění většího množství sirolimu v prvním týdnu po implantaci může mít výraznější protektivní účinek v rozvoji intimální hyperplázie jako jeho stejná, ale nižší koncentrace v průběhu celých 6 týdnů. Významný je nález snížení intimální hyperplasie po použití čisté polyesterové sítěky bez sirolimu o 35% po 3 týdnech a o 46% po 6 týdnech ve srovnání s autologní žílou. Toto indikuje možnost příznivého působení sítěky i po uvolnění celého množství sirolimu ze sítěky. Po uvolnění celého množství sirolimu plní sítěka pravděpodobně podpůrnou mechanickou funkci.

## 6 Závěr

Vytvoření cévní náhrady pro rekonstrukční výkony v kardiochirurgii, respektive v v kardiochirurgii je prozatím velmi obtížné. Zejméná u rekonstrukcí cév malého průměru je prakticky nepoužitelné, protože dochází velmi často k selhání – uzávěru bypassu. Stále se tedy orientujeme na náhrady autologní, popř. xenologní s možnou úpravou k vylepšení jejich vlastností – dlouhodobé průchodnosti. Jednou z takových možností je i náš nově vytvořený model cévní náhrady, který je použitelný jak v kardiochirurgii tak i v cévní chirurgii. Připravili jsme systém s řízeným uvolňováním sirolimu – polyesterovou síťku potahovanou degradabilním PLA – PCL kopolymerem, který uvolňuje účinnou látku sirolimus po dobu 6 týdnů. V *in vitro* testech byl prokázán inhibující účinek sirolimu na hladké svalové buňky. Obalení autologního žilního štěpu u králíka síťkou se sirolimem nebo síťkou bez sirolimu v *in vivo* experimentu významně snížilo tloušťku intimy štěpu a zabránilo rozvoji intimální hyperplazie, která vede v dalším průběhu ke stenóze nebo uzavření štěpu.

Synergický efekt 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 být optimální a po námi sledované období již k další hypertrofii intimy nedocházelo. Aplikace periadventiciální síťky se může stát v klinické praxi prevencí stenózy u autologních cévních štěpů. Pro klinické uplatnění tohoto modelu ovlivnění neointimální hyperplazie bude ještě dále zhodnotit jeho trvání v dlouhodobějším časovém úseku.

Výsledky našeho projektu se uplatní v klinické praxi kardiovaskulárních onemocnění . Je možné předpokládat prodloužení průchodnosti žilních bypassů, snížení počtu reoperací a trombotických komplikací a tím snížit náklady na léčbu.

## 7 Literatura

1. Hayward PA, Buxton BF. Contemporary coronary graft patency: 5-year observational data from a randomized trial of conduits. *Ann Thorac Surg* 2007;84:795-9.
2. Tatoulis J, Buxton BF, Fuller JA. Patencies of 2127 arterial to coronary conduits over 15 years. *Ann Thorac Surg* 2004;77:93-101.
3. Taggart DP, Altman DG, Gray AM, et al. Randomized trial to compare bilateral vs. single internal mammary coronary artery bypass grafting: 1-year results of the Arterial Revascularisation Trial (ART). *Eur Heart J* 2010;31:2470-81.
4. Serruys PW, Morice MC, Kappetein AP, et al. Percutaneous coronary intervention versus coronary-artery bypass grafting for severe coronary artery disease. *N Engl J Med* 2009;360:961-72.
5. Lopes RD, Mehta RH, Hafley GE, Williams JB, Mack MJ, Peterson ED, Allen KB, Harrington RA, Gibson CM, Califf RM, Kouchoukos NT, Ferguson TB Jr, Alexander JH. Relationship Between Vein Graft Failure and Subsequent Clinical Outcomes After Coronary Artery Bypass Surgery. *Circulation*. 2012 ;125(6): 749–756.
6. 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;28:616–26.

7. . Motwani JG, Topol EJ. Aortocoronary saphenous vein graft disease: pathogenesis, predisposition, and prevention. *Circulation* 1998;97:916–31.
8. Favaloro R. Critical analysis of coronary artery bypass graft surgery: a 30 year journey. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31:1B-63B.
9. Jeremy JY, Gadsdon P, Shukla N: On the biology of saphenous vein grafts fitted with external synthetic sheaths and stents. *Biomaterials* 2007; 28:895-908.
10. Lytle BW, Blackstone EH, Loop FD, et al. Two internal thoracic artery grafts are better than one. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999;117:855.
11. Taggart DP, D'Amico R, Altman DG. Effect of arterial revascularisation on survival: a systematic review of studies comparing bilateral and single internal mammary arteries. *Lancet* 2001;358:870.
12. Kakisis JD, Liapis CD, Breuer C, et al. Artificial blood vessel: the Holy Grail of peripheral vascular surgery. *J Vasc Surg* 2005;41:349-54.
13. Matsumura G, Hibino N, Ikada Y, Kurosawa H, Shin'oka T. Successful application of tissue engineered vascular autografts: clinical experience. *Biomaterials* 2003;24:2303-8.
14. Zhang WJ, Liu W, Cui L, Cao Y. Tissue engineering of blood vessel. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2007; 5: 945–957.

15. Schwartz SM, deBlois D, O'Brien RM. The intima. Soil for atherosclerosis and restenosis. *Circ Res* 1995;77:445–65.
16. 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.
17. Shukla N, Jeremy JY. Pathophysiology of saphenous vein graft failure: a brief overview of interventions. *Current Opinion in Pharmacology* 2012; 2: 114-120
18. Newby AC. Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiol Rev* 2005; 85:1-31.
19. Jeremy JY, Dashwood MR, Mehta D, Izzat MB, Shukla N, Angelini GD. Nitric oxide synthase, prostacyclin and cyclic nucleotide production in externally stented porcine vein grafts. *Atherosclerosis* 1998;141:297-305.
20. Thatte HS, Khuri SF. The coronary artery bypass conduit. I. Intraoperative endothelial injury and its implication on graft patency. *Ann Thorac Surg* 2001;72:S2245-S2252.
21. Caro C, Jeremy JY, Watkins N, Bulbulia R, Angelini G, Smith F, Wan S, Yim A, Sherwin S, Peiro' J et al. Geometry of unstented and stented pig common carotid artery bypass grafts. *Biorheology* 2002; 39:507-512.
22. Jeremy JY, Jackson CL, Bryan AJ, Angelini GD. Eicosanoids, fatty acids and restenosis following coronary artery bypass graft surgery and balloon angioplasty. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1996; 54:385-402.

23. Jeremy JY, Yim AP, Wan S, Angelini GD. Oxidative stress, nitric oxide and vascular disease. *Cardiovasc Surg* 2002;17:324-327.
24. Jeremy JY, Rowe D, Emsley AM, Newby AC. Nitric oxide and vascular smooth muscle cell proliferation. *Cardiovasc Res* 1999; 43:580-594.
25. Muzaffar S, Jeremy JY, Angelini GD, Shukla N. The role of the endothelium and nitric oxide synthases in modulating superoxide formation induced by endotoxin and cytokines in porcine pulmonary arteries. *Thorax* 2003; 58:598-604.
26. Muzaffar S, Shukla N, Angelini GD, Jeremy JY. Iloprost inhibits superoxide formation and NADPH oxidase expression induced by the thromboxane A2 analogue, U46619, and isoprostane F2a in cultured porcine pulmonary artery vascular smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 2004;141:488-496.
27. Campeau L. Lipid lowering and coronary bypass graft surgery. *Curr Opin Cardiol* 2000; 15:395-399.
28. Campeau L, Enjalbert M, Lespe'rance J, Bourassa MG, Kwiterovich P Jr, Wacholder S, Sniderman A. The relation of risk factors to the development of atherosclerosis in saphenous-vein bypass grafts and the progression of disease in the native circulation. A study 10 years after aortocoronary bypass surgery. *N Engl J Med* 1984; 311:1329-1332.

29. Bloor J, Shukla N, Smith FCT, Angelini GD, Jeremy JY. Folic acid administration reduces neointimal thickening, augments neo vasa vasorum formation and reduces oxidative stress in saphenous vein grafts from diabetic pigs. *Diabetologia* 2010; 53:980-988.
30. Dashwood MR, Savage K, Tsui JC, Dooley A, Shaw SG, Fernandez Alfonso MS, Bodin L, Souza DS. Retaining perivascular tissue of human saphenous vein grafts protects against surgical and distension-induced damage and preserves endothelial nitric oxide synthase and nitric oxide synthase activity. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2009; 138:334-340.
31. Souza DS, Johansson B, Bojo L, Karlsson R, Geijer H, Filbey D, Bodin L, Arbeus M, Dashwood MR. Harvesting the saphenous vein with surrounding tissue for CABG provides long-term graft patency comparable to the left internal thoracic artery: results of a randomized longitudinal trial. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006;132:373-378.
32. Mehta D, George SJ, Jeremy JY, Bryan AJ, Newby AC, Angelini GD. External stenting reduces long-term medial and neointimal thickening in a pig model of arteriovenous bypass grafting. *Nat Med* 1998; 4:235-239.
33. Brilakis ES, Saeed B, Banerjee S. Drug-eluting stents in saphenous vein graft interventions: a systematic review. *EuroIntervention* 2010; 5:722-730.
34. Mehta D, George SJ, Jeremy JY, Bryan AJ, Newby AC, Angelini GD. External stenting reduces long-term medial and neointimal thickening in a pig model of arteriovenous bypass grafting. *Nat Med* 1998; 4:235-239.

35. Jeremy JY, Bulbulia R, Vijayan V, Johnson JL, Gadsdon P, Angelini GD. A bioabsorbable external stent inhibits porcine saphenous vein graft thickening. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004; 127:1766-1772.
36. Vijayan V, Shukla N, Johnson JL, Jeremy JY. Long-term reduction of medial and intimal thickening in porcine saphenous vein grafts with a polyglactin biodegradable external sheath. *J Vasc Surg* 2004; 40:1011-1019.
37. Murphy GJ, Newby AC, Jeremy JY, Baumbach A, Angelini GD. A randomized trial of an external Dacron sheath for the prevention of vein graft disease: the extent study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2007; 134:504-505.
38. Jeremy JY, Thomas AC. Animal models for studying neointima formation and its consequences. *Curr Vasc Pharmacol* 2010; 8:198-219.
39. Schachner T, Zou Y, Oberhuber A, Tzankov A, Mairinger T, Laufer G, Bonatti JO. Local application of rapamycin inhibits neointimal hyperplasia in experimental vein grafts. *Ann Thorac Surg* 2004; 77:1580-1585.
40. Murphy GJ, Johnson TW, Chamberlain MH, Rizvi I, Wyatt M, George SJ, Angelini GD, Karsch KR, Oberhoff M, Newby AC. Short- and long-term effects of cytochalasin D, paclitaxel and rapamycin on wall thickening in experimental porcine vein grafts. *Cardiovasc Res* 2007; 73:607-617.
41. Kulik A, Ruel M. Statins and coronary artery bypass graft surgery: preoperative and postoperative efficacy and safety. *Expert Opin Drug Saf* 2009; 8:559-571.



42. Shukla N, Angelini GD, Wan I, Jeremy JY. Potential role of nitroaspirins in the treatment of vein graft failure. *Ann Thorac Surg* 2003; 75:1437-1442.
43. Wan S, Yim A, Shukla N, Johnson JL, Angelini GD, Jeremy JY. Nitric oxide donating aspirin (NCX 4016) inhibits neointimal thickening in a pig model of saphenous vein into carotid artery interposition grafting: a comparison with aspirin and morpholinonydnimine. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2007; 134:1033-1039.
44. Souza DS, Dashwood MR, Tsui JC, Filbey D, Bodin L, Johansson B, Borowiec J. Improved patency in vein grafts harvested with surrounding tissue: results of a randomized study using three harvesting techniques. *Ann Thorac Surg* 2002; 73:1189-1195.
45. Fulton GJ, Davies MG, Barber L. Localized versus systemic angiotensin II receptor inhibition of intimal hyperplasia in experimental vein grafts by the specific angiotensin II receptor inhibitor L158,809. *Surgery* 1998; 123:218-227.
46. Jeremy JY, George SJ, Wyatt M, Shukla N, Bloor J, Newby AC, Angelini GD. Toward the prevention of vein graft failure. In *Vascular Complications in Human Disease: Mechanisms and Consequences*. Edited by Handler C, Abraham D, Coghlan G, Dashwood M. Elsevier (pub); 2007:345-368.
47. Colombo A, Iakovou I. Drug-eluting stents: the new gold standard for percutaneous coronary revascularisation. *Eur Heart J* 2004;25:895–7.

48. 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;75:710–22.
49. 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;87:3773–7.
50. Schachner T, Zou Y, Oberhuber A et al. Local application of rapamycin inhibits neointimal hyperplasia in experimental vein grafts. *Ann Thorac Surg* 2004;77:1580–5.
51. 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.
52. Schachner T, Zou Y, Oberhuber A et al. Perivascular application of C-type natriuretic peptide attenuates neointimal hyperplasia in experimental vein grafts. *Eur J Cardio-thorac Surg* 2004;25:585–90.
53. 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.
54. Yakupoglu YK, Kahan BD. Sirolimus: a current perspective. *Exp Clin Transplant* 2003;1:8–18.

55. Finkelstein A, McClean D, Kar S, et al. Local drug delivery via a coronary stent with programmable release pharmacokinetics. *Circulation* 2003;107:777–84.
56. Owen SC, Li H, Sanders WG, Cheung AK, Terry CM: 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.
57. Dobrin PB, Mechanical Factors Associated With the Development of Intimal and Medial Thickening in Vein Grafts Subjected to Arterial Pressure: A Model of Arteries Exposed to Hypertension. *Hypertension*. 1995;26:38-43.
58. Krejca M, Skarysz J, Szmagała P, Plewka D, Nowaczyk G, Plewka A, Bochenek A, A new outside stent – does it prevent vein graft intimal proliferation? *Eur J Cardiothorac Surg* 2002;22:898–903.
59. 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.
60. Filova E, Parizek M, Olsovska J, Kamenik Z, Brynda E, Riedel T, Skalsky I, Szarszoi O, Vandrovcova M, Lisa V, Suchy T, Bacakova L, Perivascular sirolimus-delivery system. *Int. J. Pharm.* 2011; 404, 94–101.
61. 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;286:240–5.

62. 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;93:2178–87.
63. Khurana R, Zhuang Z, Bhardwaj S et al. Angiogenesis-dependent and independent phases of intimal hyperplasia. *Circulation* 2004;110:2436–43.
64. Pires NMM, van der Hoeven BL, de Vries MR et al. Local perivascular delivery of anti-restenotic agents from a drug-eluting poly( $\epsilon$ -caprolactone) stent cuff. *Biomaterials* 2005;26:5386–94.
65. Suzuki T, Kopia G, Hayashi S et al. Stent-based delivery of sirolimus reduced neointimal formation in a porcine coronary model. *Circulation* 2001;104:1188-93.
66. Venkatraman S, Boey F: Release profiles in drug eluting stents: Issues and uncertainties. *J Control Release* 2007;120:149–60.
67. Kawatsu S, Oda K, Saiki Y et al. Anastomotic Sites Inhibits Neointimal Hyperplasia in a Canine Model. *Ann Thorac Surg* 2007;84:560 –7.
68. 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;37:576-84.
69. Zwolak RM, Adams MC, Clowes AW. Kinetics of vein graft hyperplasia: association with tangential stress. *J. Vasc. Surg* 1987; 5: 126–136.

## Příloha 1

Identifikační záznam:

SKALSKÝ, Ivo. *Současné možnosti ovlivnění dlouhodobé průchodnosti koronárních bypassů. [Current possibilities of influence long-term patency of coronary artery bypass grafts]*. Praha, 2013. 72 s., Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, II. chirurgická klinika - kardiovaskulární chirurgie. Školitel Doc. MUDr. Vilém Rohn, Csc.