

Univerzita Karlova v Praze
1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



**Současné možnosti ovlivnění dlouhodobé průchodnosti koronárních
bypassů**

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

MUDr. Ivo Skalský

Praha 2013

Doktorské studijní programy v biomedicíně

Universita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: Experimentální chirurgie

Předseda oborové rady : Prof. MUDr. Jaroslav ŽIVNÝ, DrSc.

Školící pracoviště : II. chirurgická klinika - kardiovaskulární chirurgie, 1. LF UK a VFN Praha

Školitel : Doc. MUDr. Vilém ROHN, Csc.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. Lékařské fakulty

OBSAH

Abstrakt	4
Abstract.....	5
Úvod.....	6
Hypotézy a cíle	8
Materiál a metodika	9
Výsledky.....	9
Diskuze	14
Závěry.....	17
Použitá literatura.....	18
Seznam publikací.....	19
1. publikace in extenso, které jsou podkladem disertace	19
a) články s IF	
b) články bez IF	
2. publikace in extenso bez vztahu k tématu dizertace	
a) články s IF	
b) články bez IF	
Kapitola v monografii	

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 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*. 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 standartně 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 neintimální 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 hyperplazie, 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 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. *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

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 povrchu 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 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 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 angioplastika) do lumina štěpu nebo je nutná reoperace pacienta a provedení nového aortokoronárního bypassu. Pro prevenci proliferace HSB a restenózy štěpu byly vyvinuty stenty uvolňující antiproliferativní léčiva, jako je sirolimus (Cypher™, Cordis J&J, NJ) 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 antiproliferativní látky inhibující neointimální hyperplázii 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 antiproliferativním účinkem (11). Dále se tento makrocyclický lakton používá v drug-eluting stentech (5) a při orgánových transplantacích jako imunosupresivum (11). Mechanismus jeho anti-proliferativního účinku je velice složitý a mnohostranný (12) 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.

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 difusi a velikost povrchu síťky (13). Naším předpokladem bylo, že tloušťka cévní stěny je dostatečně tenká, aby umožnila difusi uvolněného sirolimu do tunica media a inhibici proliferace HSB. Penetrace sirolimu je podporována jeho hydrofobií. Účinná koncentrace sirolimu potřebná k inhibici proliferace HSB je relativně nízká ($IC_{50} = 5 \text{ ng/ml}$) (14) a umožňuje v polymeru dispergovat příslušné množství léčiva nutné k dlouhodobému uvolňování (v rozmezí 4-6 týdnů). Zevní obalení cévy polyesterovou síťkou 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 síťky kolem cévy sníží mechanické namáhání autologního štěpu ve srovnání se stentem. Dlouhodobé uvolňování antiproliferativního 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.

HYPOTÉZY A CÍLE

Pracovní hypotéza:

Periadventiciálně umístěný polymerní systém s postupným uvolňováním sirolimu pozitivně ovlivní neointimální hyperplázi a tím průchodnost žilních graftů.

Cíle projektu:

1. Vyvinout modelový systém žilních graftů a dále je interponovat do společné karotidy u králíka k hodnocení (vysvětlení) neointimální hyperplazii u těchto graftů na základě morfologických kritérií.
2. Hodnotit dynamiku změn v intimě žilních štěpů ve střednědobém sledování.
3. Vyvinout nový periadventiciální polymerní systém s kontrolovaným uvolňováním antiproliferativní látky (sirolimu) jako prevenci neointimální hyperplazie.
4. In vitro otestovat kinetiku uvolňování sirolimu z nově vyvinutého systému stejně jako jeho vliv na tkáňové kultury cévního endotelu a hladkých svalových buněk.

MATERIÁL A METODIKA

Materiál

Polyesterová síťka (Duratexol) byla získána z VÚP Brno, ČR, Purasorb PLC 7015, kopolymer kyseliny L-mléčné a ϵ -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 byla vyrobená z příze o průměru 90 μm , která se skládá z vláken o průměru 17,5 μm . 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 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 cm^2 . Síťka byla sušena 3 týdny ve vakuové peci a potom následně sterilizována v ethylen oxidu (síťka uvolňující sirolimus). (Filová et all.)

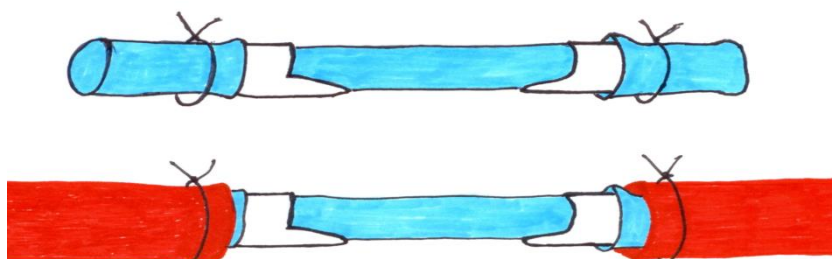
Chirurgická technika

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 síťky (žíla_3 , žíla_6), soubor pro sledování působení čisté polyesterové síťky 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 6-10 zvířat randomizovaných k jednotlivým pokusům. Dále jsme měli kontrolní skupinu žilního graftu (žíla_0).

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. 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 ligaturou fixovali. Po uvolnění krevního proudu jsme kontrolovali rozvinutí žilního štěpu a dále dle určené skupiny pokračovali s obalením cévy sítkou a její fixací (Obr. 1, 2). 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. 1. Chirurgická technika implantace žilního graftu jako interpozita do arteriálního řečiště (13)



Obr. 2. 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 – síťky na rozvinutou cévu (C)

Histologie a imunohistochemie

Odebrané žilní štepy byly rozděleny na dvě části. Jedna část byla fixována v 10% formalinu a poté byla vložena do parafínu. Druhá část byla vložena do speciální nádoby (Sakura Finetek, Tokyo, Japan) a zalita fixační látkou (Sakura Finetek, Tokyo, Japan). Vzorky jsme poté zmrazili v 2-methylbutanu (Fluka Chemika, Buchs, Switzerland) chlazeném v tekutém dusíku a uchovávané při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Histologie

Vzorky zalité do parafínu, byly pokráceny na 3-4 μm řezy a obarveny pomocí barvení haematoxylin-eosin, Van Gieson s elastikou, von Kossa a Pearl's barvením. Sekce vybrané pro analýzu byly odebrané ze středního segmentu, abychom se vyvarovali eventuální reakce šicího materiálu. Preparáty obarvené barvením Van Gieson s elastikou byli nafoceny pod mikroskopem Olympus IX 51, digitálním fotoaparátem DP 70.

Imunohistochemie

Protilátky použité v pro imuno histochemickou analýzu jsou v tabulce 2

Specificity	Origin	Company	Dilution	Clone
CD4+ cells	Mouse	Novus Biological, CO, USA	50x	KEN-4
CD8+ cells	Mouse	LifeSpan Biosciences, WA, USA	100x	NA
α Smooth Muscle Actin	Mouse	Sigma, MO, USA	900x	1A4
Macrophage	Mouse	Abcam, UK	200x	MAC387
CD31	Mouse	Abcam, UK	20x	JC/70A
PCNA	Mouse	Dako, Denmark	6000x	PC 10

Tab. 2. Seznam monoklonálních protilátek pro imunohistochemické barvení

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

Byly měřeny následující parametry: tloušťka intimy z povrchu endotelu na vnitřním okraji tunica media, tloušťka medie z vnitřní hranice tunica media na hranici mezi tunica media a adventicie a tloušťka komplexu medie-intimy z povrchu endotelu k hranici medie-adventicie. Byly shromážděny data z 32-84 měření na jednoho králíka v 12-28 zorných mikroskopických 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.

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 testovány na normalnost pomocí Shapiro a Wilkovi statistiky. Vzhledem k tomu, že normalita byla zamítnuta, byla použita logaritmická transformace. Působení času, léčiva a interakce mezi časem a léčivem byly testovány a $p < 0,05$ byla považována za významnou.

VÝSLEDKY

Histologie a imunohistochemie

Tunica intima

Ve všech experimentálních skupinách zvířat byl vnitřní povrch žilního štěpu pokryt vrstvou endotelových buněk (obr. 2, 3). U některých štěpů byly pozorovány tromby na vnitřním povrchu tunica intima (Tab. 1). Některé tromby zcela obliterovaly lumen štěpu, zatímco zbylé měli jen nástěnné nebo rekanalizované tromby, 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, média, komplexu intima-média a poměr média/intima"). Ložiskově byly pozorovány v neointimě hladké svalové buňky, zejména ve vzorcích ze zvířat, kde nebyl aplikován sirolimus.

Tunica media

Ve všech skupinách, proces adaptace žilních štěpů na arteriální tlak vede k vytváření více vrstev hladké svaloviny, které mělo za následek zesílení média (obr. 3; Viz také níže v části "Tloušťka intimy, média, komplexu intima-média a poměr média-intima"). To bylo doprovázeno zvýšením počtu PCNA+ buněk (obr. 2, viz také níže v sekci "Proliferating cell nuclear antigen"). V žilním graftu se sítkou uvolňující sirolimus (sirolimus_3) pozoruhodně poklesla infiltrace buněk CD4 + a CD8 + v cévní stěně (tj komplex intimy, média a adventicie) ve srovnání s žilním štěpem a štěpem obaleným prostou PES sítkou bez sirolimu (sít_3) po 3 týdnech (Tab. 1, obr. 4). Počet makrofágů a plasmocytů byl velmi malý ve všech skupinách. Bylo zde jen sporadické množství neutrofilů a eozinofilů v žilní štěpů (údaje nejsou uvedeny). 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 (žíla_6, sít_6) po 6 týdnech (Tab. 1). V žádné z těchto skupin nebyly nalezeny částice kalcia. V žádné ze skupin zvířat nebyly pozorovány ranné infekce. Jeden králík zemřel během operace a dva králíci z důvodu systémové infekce.

Tunica adventicia

Histologické barvení odhalilo přítomnost PES sítky a PES sítky 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. 4A), naleznete v části o Tunica media (Tab. 1). Jako histologický korelát resorpce hematomu byly občas nalezeny malá ložiska železa (obr. 4B). Kromě toho ve skupinách se štěpy s PES sítkami (sít'_3, sít'_6) a PES sítkami uvolňující sirolimus (sirolimus_3, sirolimus_6) byly pozorovány kolem vláken sítěk obří buňky cizích těles. (obr. 4 C, D).

Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)

Většina buněk s PCNA+ byla nalezena v médii a intimě (obr. 2 a 5) a méně v adventicii. Nejvyšší počet PCNA+ buněk byl pozorován ve skupině čistých žilních graftů za 3 týdny po implantaci (žíla_3). Po 3 týdnech žilní štěpy se sítkou PES (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 (žíla_6); čísla se však nezměnila ve skupině štěpů s PES sítkou (sít'_6) a skupině se sirolimem (sirolimus_6).

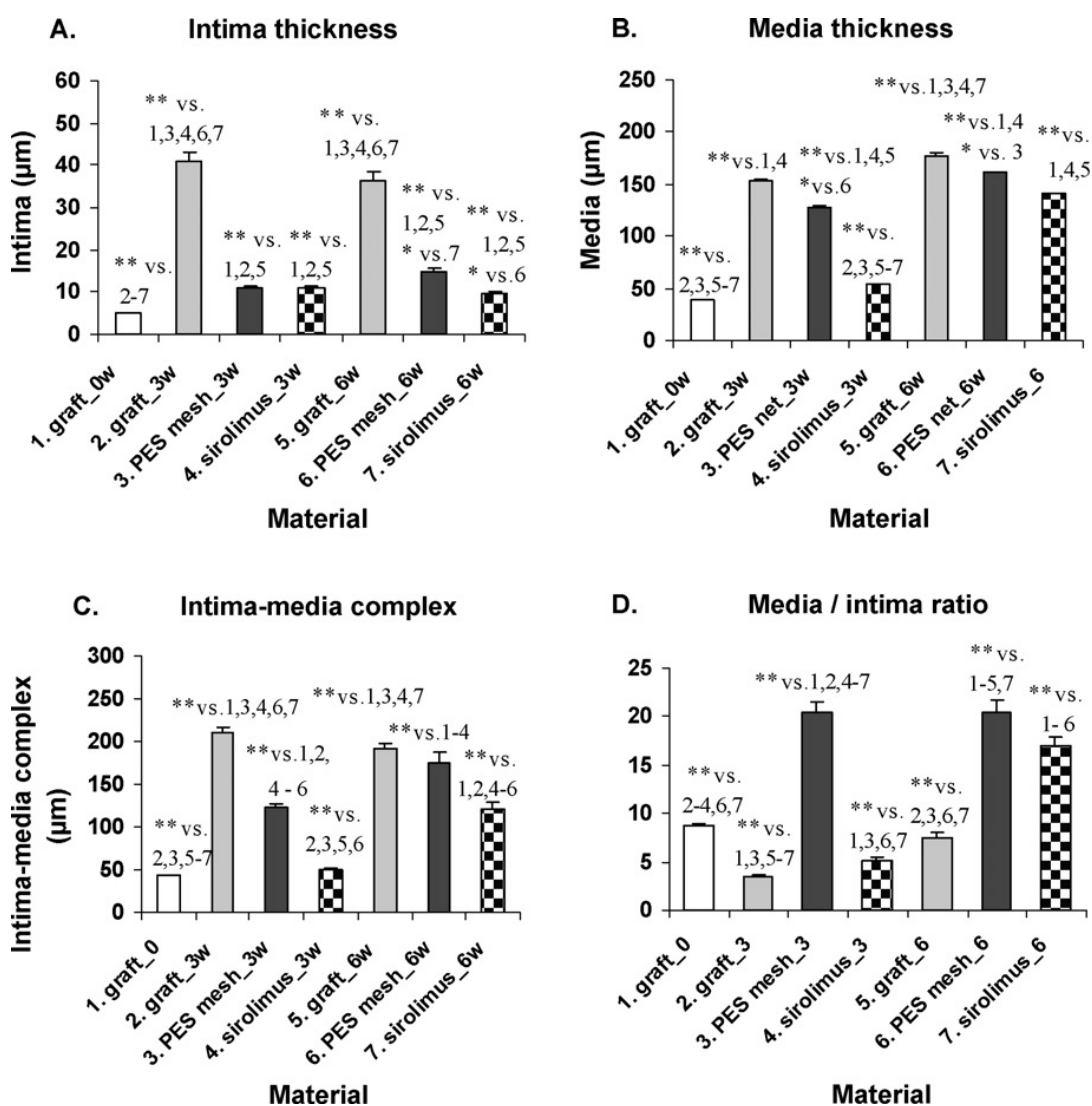
Tloušťka intimy, médie, komplexu intima-médie a poměr médie/intima

Měření intimy (obr. 6A) po třech týdnech ukázalo nejvyšší hodnoty tloušťky intimy v kontrolní skupině samotného žilního štěpu (žíla_3). U štěpů obalených sítkou s PES (sít'_3) nebo sítkou s PES a sirolimem (sirolimus_3) byla tloušťka intimy snížena o 73±8 a 73±11 %, oproti kontrolní skupině samotného žilního štěpu. Mezi 3 a 6 týdnem zůstala tloušťka intimy u všech sledovaných skupin konstatní. Po 6 týdnech bylo snížení tloušťky intimy u štěpů s PES (sít'_6) a štěpů s PES a sirolimem (sirolimus_6) o 59±12% a 73±9 %, ve srovnání se samotným štěpem (žíla_6). Ve skupině štěpů s PES a sirolimem (sirolimus_6) jsme pozorovali silnější efekt na intimální hyperplazii ve srovnání se skupinou štěpů s PES (sít'_6) po 6 týdnech.

Nárůst tloušťky médie (obr. 6B) se významně snížila o 65±9 % ve skupině štěpů PES se sirolimem (sirolimus_3) po třech týdnech od implantace. Současně ve skupině graftů s PES (sít'_3,6) nedošlo k ovlivnění hyperplazie médie, ve srovnání s kontrolní skupinou samotných žilních štěpů (žíla_3,6) a to v obou časových intervalech. Po šesti týdnech byla tunica média výrazně tenčí o 20±12 % u štěpů s PES a sirolimem (sirolimus_6), než ve skupině samotných žilních graftů (žíla_6). Tloušťka komplexu intima-médie (obr. 6 c) byla markantně snížena o 76±5 a 37±9 % ve skupině PES se sirolimem (sirolimus_3,6) ve srovnání s kontrolními štěpy (žíla_3,6) za tři a šest týdnů po implantaci. V intervalu 3 týdnů došlo ve skupině graftů s PES (sít'_3) ke snížení komplexu intima-médie o 41±6 % oproti kontrolní skupině samotného žilního štěpu (žíla_3).

Kontrolní skupina samotného žilního štěpu (žíla_3) a skupina s PES a sirolimem (sirolimus_3) měla po třech týdnech poměr intima-médie podobný jako u zdravé nativní žíly, tj. skupina (žíla_0). Po třech týdnech se podařilo ve skupině štěpů s PES a sirolimem (sirolimus_3) udržet podobný poměr média-intimy jako ve skupině nativní žíly – (žíla_0). Po šesti týdnech došlo u štěpů s PES (sít'_6) a sirolimem (sirolimus_6) k selektivnímu nárůstu tloušťky medie, které způsobilo zvýšení poměru média/intimy poměru, pravděpodobně v důsledku minimální koncentrace sirolimu v PES obalu v tomto časovém intervalu [14].

Nejvyšší poměr média-intima byl pozorován ve skupině štěpů s PES (sít'_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.



DISKUSE

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

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 (17) 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 (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 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.

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 sítky 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 (21). Po obalení žíly sirolimus do ní difunduje a inhibuje růst hladkých svalových buněk. Histologie odhalila přítomnost sítě v adventícii, což bylo způsobeno pravděpodobně nedostatečně hustou sítí, která se vtlačila do adventície při dilataci autologní žíly po implantaci. Tato neočekávaná pozice sítě v těsné blízkosti média mohla paradoxně zvýšit koncentraci léčiva v médiu a snížit ztráty léčiva jeho difúzí do prostoru kolem cévy. Na druhou stranu síťka může vyvolat odpověď tkáně na cizí materiál. V již vzpomenuté studii (21) 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 μg až 200 μg sirolimu (22). Obsah sirolimu v stentech CypherTM je v rozmezí od 70 do 300 μg (23). 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 sítě ve vyšší koncentraci do média, 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 ϵ -polykaprolakton uvolňující paclitaxel anebo rapamycin po dobu 3 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 hyperplázii o 41 % po 6 týdnech (24). 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 (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 sítí v obou časových intervalech. Tloušťka intimy u králíků se sítí 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 (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 hyperplázie jako jeho stejná, ale nižší koncentrace v průběhu celých 6 týdnů. Významný je nález snížení intimální hyperplázie po použití čisté polyesterové síťky bez sirolimu o 35% po 3 týdnech a o 46% po 6 týdnech ve srovnání s autologní žilou. Toto indikuje možnost příznivého působení síťky i po uvolnění celého množství sirolimu ze síťky. Po uvolnění celého množství sirolimu plní síťka pravděpodobně podpůrnou mechanickou funkci.

ZÁVĚRY

Připravili jsme systém s řízeným uvolňováním sirolimu – polyesterovou síťku potahovanou PLA – PCL kopolymerem, který uvolňoval účinnou látku sirolimus po dobu 6 týdnů. V *in vitro* testech byl prokázán inhibující účinek síťky 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 hyperplázie.

Synergický efekt periadventiciálního polyesterového obalu cévy spolu s řízeným uvolňováním sirolimu se jeví jako velmi slibná technika ovlivnění neointimální hyperplázie 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 síťky se může stát prevencí restenózy u autologních cévních štěpů.

POUŽITÁ LITERATURA

1. Motwani JG, Topol EJ. Aortocoronary saphenous vein graft disease: pathogenesis, predisposition, and prevention. *Circulation* 1998;97:916–31.
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;28:616–26.
3. Schwartz SM, deBlois D, O'Brien RM. The intima. Soil for atherosclerosis and restenosis. *Circ Res* 1995;77:445–65.
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;25:895–7.
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;75:710–22.
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;87:3773–7.
8. Schachner T, Zou Y, Oberhuber A et al. Local application of rapamycin inhibits neointimal hyperplasia in experimental vein grafts. *Ann Thorac Surg* 2004;77:1580–5.
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;25:585–90.
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;107:777–84.

14. 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), doi:10.1016/j.jconrel.2010.05.005.
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;286:240–5.
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;4:235–9.
18. 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.
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;93:2178–87.
20. Khurana R, Zhuang Z, Bhardwaj S et al. Angiogenesis dependent and independent phases of intimal hyperplasia. *Circulation* 2004;110:2436–43.
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;26:5386–94.
22. Suzuki T, Kopia G, Hayashi S et al. Stent-based delivery of sirolimus reduced neointimal formation in a porcine coronary model. *Circulation* 2001;104:1188-93.
23. Venkatraman S, Boey F: Release profiles in drug eluting stents: Issues and uncertainties. *J Control Release* 2007;120:149–60.
24. Schachner T, Zou Y, Oberhuber A et al. Local application of rapamycin inhibits neointimal hyperplasia in experimental vein grafts. *Ann Thorac Surg* 2004;77:1580–5.
25. Kawatsu S, Oda K, Saiki Y et al. Anastomotic Sites Inhibits Neointimal Hyperplasia in a Canine Model. *Ann Thorac Surg* 2007;84:560 –7.
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;37:576-84.

SEZNAM PUBLIKACÍ

1. publikace in extenso, které jsou podkladem disertace

a) články s IF

Skalský I., Szárszoi O, Filová E., Pařízek M., Lytvynets A., Malušková J., Lodererová A., Brynda E., Lisá V., Burdíková Z., Čapek M., Pirk J., Bačáková L. A Perivascular System Releasing Sirolimus Prevented Intimal Hyperplasia in a Rabbit Model in a Medium-Term Study. *International Journal of Pharmaceutics* 2012, vol.427, p. 311-319. ISSN: 0378-5173 **IF = 3,607**

Skalský I., Filová E., Szárszoi O., Pařízek M., Lytvynets A., Malušková J., Lodererová A., Brynda E., Lisá V., Burdíková Z., Čapek M., Pirk J., Bačáková L. A periadventitial sirolimus-releasing mesh decreased intimal hyperplasia in a rabbit model. *Physiological Research*, 2011, roč. 60, č. 3, s. 585-588. ISSN 0862-8408. **IF 1,430.**

Filova E, Parizek M, Olsovska J, Kamenik Z, Brynda E, Riedel T, Vandrovцова M, Lisa V, Machova L, **Skalsky I**, Szarszoi O, Suchy T, Bacakova L. Perivascular sirolimus-delivery system. *International Journal of Pharmaceutics* 2011, vol. 404, p. 94-101. ISSN 0378-5173 **IF 2,962**

b) články bez IF ve vztahu k disertační práci

Skalský, I., Szárszoi, O., Filová, E., Pařízek, M., Lytvynets, A., Malušková, J., Lodererová, A., Olšovská, J., Kameník, Z., Brynda, E., Plichta, Z., Riedel, T., Lisá, V., Burdíková, Z., Čapek, M., Grausová, E., Suchý, T., Pirk, J., Bačáková, L., Periadventiciální systém s řízeným uvolňováním sirolimu pro prevenci neointimální hyperplazie u autologních žilních štěpů. *Cor et Vasa*, 2011, roč. 53, č. 1-2, s. 84-90. ISSN 0010-8650.

Rohn V, Simon P, Devyatko E, Vodičková J, Pirk J, **Skalský I**, Úplná tepenná revaskularizace myokardu vs. konvenční koronární bypass – průběžné výsledky studie CARACCASS. . *Cor et Vasa*, 2005, roč. 47, č. 12, s. 463-469. ISSN 0010-8650.

2. publikace in extenso bez vztahu k tématu dizertace

a) články s IF

Pirk, J., Bytešník, J., Kautzner, J., Peichl, P., Vančura, V., Lefflerová, K., **Skalský, I.**, Vinduška, V. Surgical ablation of post-infarction ventricular tachycardia guided by mapping in sinus rhythm: long term results. *Eur.J.cardiothorac.Surg.*, 2004, vol. 26, no. 2, p. 323-329. ISSN 1010-7940. **IF 1,616**

Šochman, J., Bytešník, J., **Skalský, I.**, Peregrin, J. Percutaneous extraction of a severed and frayed permanent pacing lead. *Pacing clin. Electrophysiol.(PACE)*, 2004, vol. 27, no. 3, p. 412-414. ISSN 0147-8389. **IF 1,019**

Dufková, B., Málek, I., Vymětalová, Y., Hošková, L., **Skalský, I.**, Pirk, J., Vrbská, J., Marek, T., Bohuslavová, R., Hubáček, J. Kautzner, J., Myxoma of donor origin in a transplanted heart. *Journal of heart and lung transplantation*, 2007, vol. 26, no. 8, p. 865-867. ISSN 1053-2498. **IF 3,087**

Malý, J., Kautzner, J., Krausová, R., Rokošný, S., Netuka, I., Szárszoi, O., **Skalský, I.**, Pirk, J. Long-term outcomes of surgical radiofrequency ablation for atrial fibrillation in 3 groups of patients. *Heart surgery forum*, 2008, vol. 11, no. 2, p. E110-E116. ISSN 1098-3511. **IF 0,488.**

Netuka, I., Malý, J., Szárszoi, O., **Skalský, I.**, Říha, H., Kotulák, T., Novotný, J., Pirk, J. Single-stage Extensive Chronic type a dissecting aortic aneurysm repair and continuous-flow ventricular assist device implantation. *Journal of heart and lung transplantation*, 2009, vol. 28, no. 5, p. 523-526. ISSN 1053-2498. **IF 3,541.**

Kettner J, **Skalský, I.**, Levčík M. Levitronix CentriMag pump as perioperative left ventricular support in a patient with critical aortic stenosis, mitral regurgitation, and cardiogenic shock. *Heart surgery forum*, 2011, vol. 14, no. 1, p. E64-E66. ISSN 1098-3511. **IF 0,634.**

Kettner J, Dorazilová Z, Netuka I, Malý J, Al-Hiti H, Melenovský V, **Skalský, I.**, Říha H, Málek I, Kautzner J, Pirk J. Is severe pulmonary hypertension a contraindication for orthotopic heart transplantation? Not any more. , *Physiol Res*. 2011;60(5):769-75. **IF 1,430**

Straka F, Pirk J, Pindák M, **Skalský, I.**, Vančura V, Cihák R, Marek T, Lupínek P, Schorník D, Mašín J, Zeman M, Skrobáková J, Dorazilová Z, Skibová J. , Biventricular pacing in the early postoperative period after cardiac surgery. , *Physiol Res*. 2011 Dec 22;60(6):877-85. **IF 1,430**

Skalský, I., Urban M, Malouskova J, Szarszoi O, Pirk J, Netuka I, Aortic dissections following heart transplantations. *J Card Surg*. 2012 Jan;27(1):125-7 **IF 0,557**

Melenovsky V, Al Hiti H, Lupinek P, Marek T, Veiser T, **Skalský, I.**, Kettner J. Intermittent cardiogenic shock in a man with mechanical prosthesis of the aortic valve. *Circulation*. 2011 Jul 5;124(1): **IF 14,429**

Straka F, Pirk J, Pindak M, **Skalský, I.**, Vancura V, Cihak R, Marek T, Lupinek P, Masin J, Schornik D, Zeman M, Skrobakova J, Dorazilova Z, Skibova J. The hemodynamic effect of right ventricle (RV), RT3DE targeted left ventricle (LV) and biventricular (BIV) pacing in the early postoperative period after cardiac surgery. *Pacing Clin Electrophysiol*. 2011 Oct;34(10):1231-40 **IF 1,353**

b) články bez IF

Hejnal, J. , Pirk, J. , Pavel, P. , Rohn, V. , **Skalský, I.**, Parciální sternotomie při výkonech na aortální chlopni *Cor et Vasa* 1998 , roč. 40 (3) , s . 122-124 , ISSN 0010-8650.

Bytešník, J. , Pirk, J. , Staněk, V. , Čihák, R. , Krausová, R. , Lefflerová, K. , **Skalský, I.**, Vančura, V. : Ovlivnění rizika náhlé arytmiické smrti po infarktu myokardu, *Časopis Lék. Čes.* , 136 , 1997 , č.5 , s 162-163, ISSN 0008-7335.

Bytešník, J. , Pirk, J., Lefflerová, K. , **Skalský, I.** , Hýža, Z. , Lexa, J. , Stupka, J. Výsledky ovlivnění možného arytmogenního substrátu komorových tachykardií , lokalizovaného mapováním při sinusovém rytmu.6. výroční sjezd ČKS , abstrakta , *Cor et Vasa* , 1998, roč. 40 , s 180 , ISSN 0010-8650.

Gürlich, R., Oliverius, M., Ryska, M., Sixta, B., Pirk, J., **Skalský, I.**, Hošková, L., Špičák, J. Chirurgické výkony na gastrointestinálním traktu po transplantaci srdce. *Časopis lékařů českých*, 2007, roč. 146, č. 12, s. 934-937. ISSN 0008-7335.

Březina, A., Wurmová, Š., Říha, H., Pindřák, M., Kellovský, P., Hošková, L., Málek, I., Vrbská, J., Pirk, J., **Skalský, I.**, Hytych, V., Vašáková, M. První kombinovaná transplantace srdce a plic v České republice z pohledu anesteziologa a intenzivisty. *Anesteziologie a intenzivní medicína*, 2008, roč. 19, č. 6, s. 304-307. ISSN 1214-2158.

Adamíra, M., Juštík, P., Pirk, J., **Skalský, I.**, Kotulák, T., Lánská, V. Náhrada aortální chlopně u nemocných ve věku nad 80 let. *Cor et Vasa*, 2009, roč. 51, č. 5, s. 322-326. ISSN 0010-8650.

Szárszoi, O., Netuka, I., Malý, J., Bešík, J., **Skalský, I.**, Říha, H., Kotulák, T., Pirk, J. Vliv "CorCap Cardiac Support Device" na remodelaci levé komory srdeční: jednoleté sledování u prvního pacienta v IKEM. *Cor et Vasa*, 2009, roč. 51, č. 10, s. 717-719. ISSN 0010-8650.

[12]Říha, H., Netuka, I., Kotulák, T., Malý, J., Pindřák, M., Kellovský, P., Kopáč, F., Hodr, D., Szárszoi, O., Kettner, J., Al-Hiti, H., Dorazilová, Z., Marek, T., **Skalský, I.**, Pirk, J. Dysfunkce pravé komory po implantaci levostranné mechanické srdeční podpory. *Vnitřní lékařství*, 2010, roč. 56, č. 1, s. 30-36. ISSN 0042-773X.

Sedláček, K., Vančura, V., **Skalský, I.**, Martinča, T., Čihák, R., Bytešník, J., Kautzner, J. Optimální lokalizace elektrodového systému při srdeční resynchronizační léčbě. *Cor et Vasa*, 2010, roč. 52, č. 1-2, s. 49-54. ISSN 0010-8650.

Želízko, M., **Skalský, I.**, Netuka, I., Vrbská, J. Stenóza kmene levé koronární arterie po chirurgické náhradě ascendentní aorty a reimplantaci aortální chlopně. *Intervenční a akutní kardiologie*. 2010, roč. 9, suppl. E, s. E14-E18. ISBN 978-80-87327-50-0.

Dorazilová, Z., Kettner, J., Netuka, I., Hegarová, M., **Skalský, I.**, Říha, H., Al-Hiti, H., Kautzner, J., Pirk, J. Levostranná mechanická srdeční podpora v léčbě závažné plicní hypertenze u kandidátů srdeční transplantace v IKEM. *Cor et Vasa*, 2011, roč. 53, č. 1-2, s. 48-54. ISSN 0010-8650.

Marek, T., Dorazilová, Z., Straka, F., Netuka, I., Pirk, J., **Skalský, I.**, Role echokardiografie v péči o pacienty s mechanickou srdeční podporou HeartMate II. *Cor et Vasa*, 2011, roč. 53, č. 1-2, s. 55-59. ISSN 0010-8650.

Netuka, I., Malý, J., Říha, H., Szárszoi, O., Dorazilová, Z., **Skalský, I.**, Turek, D., Urban, M., Kettner, J., Pirk, J. Přínos dlouhodobé pulzatilní mechanické srdeční podpory u multiorgánově selhávajících pacientů v terminálním srdečním selhání. *Časopis lékařů českých*, 2011, roč. 150, č. 1, s. 44-48. ISSN 0008-7335.

Netuka, I., Malý, J., Szárszoi, O., Říha, H., Turek, D., Urban, M., **Skalský, I.**, Kotulák, T., Dorazilová, Z., Pirk, J. Technika implantace a zkušenosti s dočasnou mechanickou srdeční podporou při selhání pravé komory. *Rozhledy v chirurgii*, 2011, roč. 90, č. 2, s. 88-94. ISSN 0035-9351.

Szárszoi, O., Netuka, I., Janák, D., Urban, M., Malý, J., Bešík, J., Turek, D., Kačer, P., **Skalský, I.**, Pirk, J. Kardiochirurgické operace u pacientů odmítajících krevní transfuze: výsledky v IKEM. *Rozhledy v chirurgii*, 2011, roč. 90, č. 2, s. 102-105. ISSN 0035-9351.

Urban, M., Pirk, J., **Skalský, I.**, Szárszoi, O., Netuka, I. Výsledky kombinované plastiky mitrální a náhrady aortální chlopně v IKEM Praha. *Rozhledy v chirurgii*, 2011, roč. 90, č. 2, s. 95-101. ISSN 0035-9351.

Szarszoi O, Maly J, Turek D, Urban M, **Skalsky I**, Riha H, Maluskova J, Pirk J, Netuka I. Implantation of left ventricular assist device complicated by undiagnosed thrombophilia. *Tex Heart Inst J*. 2012;39(5):615-7. ISSN 0730-2347

Kapitola v monografii

Skalský, I., Kombinované transplantace srdce a dalších orgánů. In: Pirk, J., Málek, I a kol, .. *Transplantace srdce*. Praha : Karolinum, 2008, s. 232-249. ISBN 978-80-246-1606-3. (Kapitola v monografii).