

ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ СИРОЛИМУС-ЭЛЮИРУЮЩИХ КОРОНАРНЫХ СТЕНТОВ

DOI: 10.17691/stm2017.9.1.06

УДК 616.132.2–007.271–089.819.5–07

Поступила 9.10.2015 г.



А.Д. Кручинина, инженер-исследователь;
О.Д. Любченко, инженер-исследователь;
Я.П. Ястремская, инженер-исследователь;
А.Н. Шатров, управляющий

ООО «НаноМед», Пенза, 440068, ул. Центральная, 1

Цель исследования — изучить влияние разработанного сиролимус-элюирующего кардиоваскулярного стента на гематологические и биохимические параметры крови в эксперименте.

Материалы и методы. Выполнена ангиопластика аортально-подвздошного сегмента бедренной артерии 6 кроликам с имплантацией голометаллических кобальт-хромовых стентов МС 2,5×11 мм и 6 кроликам с имплантацией стентов такой же модели с покрытием линейно-цепочечным углеродом и лекарственным покрытием (содержание сиролимуса — 2 мкг/мм²), разработанных ООО «НаноМед» (Россия). Состояние животных оценивали визуально и по изменению гематологических и биохимических параметров крови через 1, 2, 4, 7 нед после имплантации в сравнении с показателями в интактной и контрольной группах.

Результаты. Применение стентов с покрытием линейно-цепочечным углеродом и лекарственным покрытием снижает риск возникновения рестеноза. Постепенное разрушение полимерного покрытия обеспечивает дозированное, локальное выделение лекарственного вещества в зону стентированной сосудистой стенки, что ингибирует гиперплазию неоинтимы. Имплантация сиролимус-элюирующих стентов по сравнению с имплантацией голометаллических стентов не вызывает достоверных изменений биохимических параметров крови кроликов и не влияет на ее гематологические показатели. Изменения в анализах крови животных контрольной группы по сравнению с интактной объясняются хирургическим вмешательством в организм. Все это позволяет начать клинические испытания сиролимус-элюирующих коронарных стентов.

Ключевые слова: сиролимус-элюирующий стент; антипролиферативное покрытие стентов; лекарственное покрытие стентов; гематология; биохимия крови.

Как цитировать: Kruchinina A.D., Lyubchenko O.D., Yastremskaya Y.P., Shatrov A.N. Evaluating biological effects of sirolimus-eluting cardiovascular stents. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2017; 9(1): 56–61, <https://doi.org/10.17691/stm2017.9.1.06>

English

Evaluating Biological Effects of Sirolimus-Eluting Cardiovascular Stents

A.D. Kruchinina, Research Engineer;
O.D. Lyubchenko, Research Engineer;
Y.P. Yastremskaya, Research Engineer;
A.N. Shatrov, Office Manager

NanoMed, 1 Tsentralnaya St., Penza, 440068, Russian Federation

Для контактов: Кручинина Анастасия Дмитриевна, e-mail: a.d.kruchinina@mail.ru

The aim of the investigation was to study the influence of the sirolimus-eluting cardiovascular stents on hematological and biochemical blood parameters *in vitro*.

Materials and Methods. Angioplasty of aorta-iliac segment of the femoral artery was performed to six rabbits with implantation of MS 2.5×11 mm bare metal Cobalt-Chromium stents and stents of the same model developed by NanoMed (Russia) with linear-chain carbon and drug-eluting coatings (2 µg/mm² of sirolimus) to other six rabbits. Animal condition was assessed visually and by hematological and biochemical blood parameters 1, 2, 4, and 7 weeks after implantation compared to the rabbits of intact and control groups.

Results. Application of the stents with linear-chain carbon and drug-eluting coatings reduces the risk of restenosis. Gradual destruction of the polymeric coating provides local dosed release of the drug substance in the area of the stented vessel wall, inhibiting thereby the neointimal hyperplasia. Implantation of sirolimus-eluting stents did not cause significant changes in biochemical and hematological blood parameters of rabbits in comparison with bare metal stents. Changes in the blood tests of the control animals compared to the intact ones are likely to be the result of surgical intervention. This fact allows us to pass over to the clinical trials of sirolimus-eluting coronary stents.

Key words: sirolimus-eluting stent; antiproliferative stent coatings; drug-eluting stents; hematology; blood biochemistry.

В лечении ишемической болезни сердца, стенокардии, болезней периферических артерий широко применяются методы коронарной ангиопластики и стентирование [1].

Основной проблемой при их использовании является возникновение рестеноза в отдаленном периоде [1, 2]. Вероятность этого осложнения уменьшается при применении стентов с лекарственным покрытием: значительно улучшается клиническая картина ишемической болезни сердца, увеличивается эффективность вмешательств на периферических артериях, снижаются частота рецидивов стенокардии и потребность в повторных реваскуляризациях миокарда [3–5].

Использование полимерного покрытия металлического стента в качестве матрицы для инкапсуляции лекарственного препарата обусловлено необходимостью точечной доставки активного вещества с целью уменьшения интенсивности пролиферации клеток интимы сосуда: постепенная резорбция покрытия обеспечивает локальное высвобождение достаточного количества препарата, необходимого для ограничения гиперплазии в ответ на имплантацию.

Полимерный слой, содержащий лекарственное вещество, должен быть биodeградируемым, биосовместимым и неиммуногенным, а также сохранять свойства после стерилизации. Наиболее полно этим требованиям соответствуют сополимеры молочной и гликолевой кислот, широко применяемые при создании различных медицинских изделий [6, 7]. Конечные продукты их разрушения являются обычными метаболитами клеток млекопитающих, не оказывающими токсического влияния на организм.

Для снижения риска возникновения рестеноза используют следующие лекарственные препараты: иммунодепрессанты (сиrolimus и его аналоги), противовоспалительные препараты (паклитаксел и его аналоги) и т.д. [8].

Применение лекарственных стентов прочно вошло в практику восстановления функций сосудов, однако широко представлены на рынке лишь зарубежные изделия [9]. В условиях импортозамещения актуальным для нашей страны является создание собствен-

ных аналогов, не уступающих по качеству мировым лидерам. В связи с этим компанией «НаноМед» были разработаны сиrolimus-элюирующие коронарные стенты с полилактид-ко-гликолидом в качестве полимера. Лекарственное покрытие наносится на стенты поверх слоя из линейно-цепочечного углерода — инновационного материала, придающего изделию высокую биосовместимость и тромборезистентность. Высвобождение сиrolimуса на ранних сроках после операции позволит снизить избыточную пролиферацию клеток в ответ на травматизацию сосудистой стенки, а наличие инертного покрытия из линейно-цепочечного углерода обеспечит снижение рисков рестеноза и тромбоза на более поздних этапах.

При создании нового медицинского изделия в России необходимым этапом является проведение исследований согласно ГОСТ Р ИСО 10993 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий». Соблюдение положений стандартов данной серии позволяет обеспечить системный подход к исследованию биологического действия медицинских изделий, поскольку они являются руководящими документами для прогнозирования и исследования на стадии выбора материалов, предназначенных для изготовления, а также для исследований готовых изделий.

Цель исследования — изучение влияния разработанного сиrolimus-элюирующего кардиоваскулярного стента на гематологические и биохимические параметры крови для оценки биологического действия медицинского изделия на организм в эксперименте.

Материалы и методы. Эксперимент проводили на 12 самцах кроликов в возрасте 8–10 мес массой 3,5–4,5 кг. Все этапы работы проходили в соответствии с ГОСТ Р ИСО 10993. Содержание животных соответствовало ГОСТ Р ИСО 10993-2-2011, они прошли карантин и акклиматизацию в условиях вивария в течение 14 дней. В работе руководствовались этическими принципами, установленными Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (принятой в Страсбурге 18.03.1986 г. и подтвержденной в Страсбурге 15.06.2006 г.).

Экспериментальные группы формировали методом простой фиксированной рандомизации по 6 животных. Перед проведением операции был произведен забор крови с последующим определением гематологических и биохимических параметров, которые использовали в качестве интактной группы значений.

На базе Центра доклинических исследований (Пенза) сотрудниками Федерального центра сердечно-сосудистой хирургии Министерства здравоохранения Российской Федерации (Пенза) была выполнена ангиопластика аортально-подвздошного сегмента бедренной артерии кроликов с имплантацией голометаллических кобальт-хромовых стентов МС 2,5×11 мм и стентов такой же модели с покрытием линейно-цепочечным углеродом и лекарственным покрытием (содержание сиролимуса — 2 мкг/мм²), разработанных ООО «НаноМед» (Россия).

После установки стентов на контрольной ангиографии артерия в месте имплантации стентов была проходима, система доставки и проводники удалены, ушивание ран проводили послойно.

Основываясь на времени резорбции покрытия в условиях *in vitro* [10], для исследования влияния лекарственных стентов на гематологические и биохимические показатели крови были определены сроки забора биологического материала: 1, 2, 4, 7 нед после имплантации.

Забор крови производили из вены уха кролика. Объем взятой крови составлял 4–5 мл; 250 мкл отбирали в микрокуветы для взятия крови ЭДТА-К2 (Sarsted, Германия), гематологическое исследование проводили с использованием анализатора BC-2800 Vet Auto Hematology Analyzer (Mindray, Китай). Сыворотку получали центрифугированием крови в течение 15 мин при 4000 об./мин в медицинской лабораторной центрифуге ОПН-8 («Аналит-Нева», Россия). В полученной сыворотке определяли активность ферментов и концентрацию веществ, рекомендованных

к анализу ГОСТ Р ИСО 10993-11-2011 (приложение D.2): аланинаминотрансферазы (АлАТ), аспартатаминотрансферазы (АсАТ), γ-глутамилтрансферазы, щелочной фосфатазы, альбумина, глюкозы, кальция, креатинина, неорганического фосфора, калия, натрия, общего и прямого билирубина, общего белка, триглицеридов, мочевины, хлорида, общего холестерина.

Биохимические показатели сыворотки крови определяли унифицированными методами [11] с использованием клинических наборов («Ольвекс Диагностикум», Россия). Оптическую плотность образцов измеряли на фотометре КФК-3 (Загорский оптико-механический завод, Россия) с использованием кюветы с длиной оптического пути 1 см («Аналит-Нева», Россия).

При оценке полученных экспериментальных данных использовали методы статистической обработки. Результаты выражали в виде среднего арифметического (X) и статистической девиации (SD). Проверку гипотезы о равенстве средних выборочных величин проводили с применением t-критерия Стьюдента. Анализ отсроченного влияния имплантации образцов осуществляли с использованием дисперсионного анализа. Принадлежность подгрупп животных к разным гомогенным группам оценивали с помощью метода Шеффе.

Результаты и обсуждение. Гематологическое исследование крови кроликов в выбранные сроки после стентирования не выявило отклонений значений параметров от таковых в интактной группе, что свидетельствует о хорошем состоянии здоровья животных после проведения ангиопластики. Результаты анализов показали отсутствие ярко выраженной воспалительной реакции во все сроки после проведения операции и реакций отторжения имплантата на более поздних сроках (см. таблицу).

Анализ биохимических показателей крови кроликов на всех этапах исследования (рис. 1, 2) показал отсутствие системного токсического влияния нового

Результаты гематологического исследования крови кроликов после имплантации сиролимус-элюирующих стентов (n=6, X±SD)

Параметр	Интактные животные	Через 1 нед (опыт/контроль)	Через 2 нед (опыт/контроль)	Через 4 нед (опыт/контроль)	Через 7 нед (опыт/контроль)
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	7,25±0,70	9,96±0,40/10,12±0,50	8,4±0,5/8,9±0,5	7,80±0,42/8,24±0,40	7,75±0,34/7,89±0,39
Эритроциты, 10 ¹² /л	6,08±0,22	6,70±0,48/6,76±0,43	5,74±0,21/6,01±0,27	5,77±0,25/5,94±0,20	5,72±0,23/6,12±0,20
Гемоглобин, г/л	131,17±7,52	139,80±12,26/138,40±10,47	125,33±6,11/127,80±7,21	121,0±6,24/122,9±5,9	126,0±3,84/122,0±3,51
Гематокрит, %	40,45±1,75	42,84±3,44/40,67±2,50	39,33±1,50/41,30±1,71	39,8±2,1/39,5±3,1	39,5±1,1/41,69±1,70
Средний объем эритроцита, фл	66,50±2,04	65,56±2,49/66,20±3,21	68,70±5,02/69,10±4,98	71,4±4,2/68,95±4,20	70,6±3,3/69,4±2,5
Тромбоциты, 10 ⁹ /л	373,0±125,59	358,20±45,57/ 358,7±44,1	364,2±32,1/ 363,9±34,0	346,33±56,04/ 347,11±55,20	359,33±46,04/ 359,86±45,06
Средний объем тромбоцита, фл	6,75±1,08	7,2±0,9/7,4±0,8	7,3±0,6/7,28±0,70	6,83±2,74/6,89±2,60	6,94±0,76/7,03±0,72
Тромбокрит, %	0,17±0,11	0,19±0,06/0,20±0,05	0,20±0,05/0,18±0,07	0,24±0,03/0,26±0,02	0,21±0,03/0,23±0,02

Параметр	Интактные животные	Через 1 нед (опыт/контроль)	Через 2 нед (опыт/контроль)	Через 4 нед (опыт/контроль)	Через 7 нед (опыт/контроль)
Нейтрофилы, 10 ⁹ /л	1,90±0,04	3,10±0,04/3,20±0,03	2,80±0,05/2,88±0,06	2,30±0,07/2,50±0,06	2,52±0,08/2,60±0,07
Лимфоциты, 10 ⁹ /л	4,12±0,06	6,34±1,98/6,37±2,0	6,60±1,78/6,78±1,54	5,77±2,83/5,89±2,75	6,67±1,82/6,70±1,91
Моноциты, 10 ⁹ /л	0,36±0,07	0,36±0,09/0,39±1,0	0,67±0,05/0,70±0,05	0,30±0,17/0,36±0,18	0,46±0,07/0,47±0,09
Эозинофилы, 10 ⁹ /л	0,18±0,11	0,10±0,05/0,10±0,06	0,20±0,03/0,22±0,05	0,20±0,02/0,23±0,02	0,24±0,04/0,27±0,03
Базофилы, 10 ⁹ /л	0,61±0,23	0,70±0,11/0,78±0,10	0,65±0,01/0,70±0,02	0,68±0,08/0,70±0,06	0,72±0,07/0,75±0,08
Гранулоциты, 10 ⁹ /л	4,20±0,65	5,60±1,28/5,63±1,32	6,23±1,27/6,27±1,50	3,73±0,91/3,75±0,90	5,53±0,61/5,61±0,80

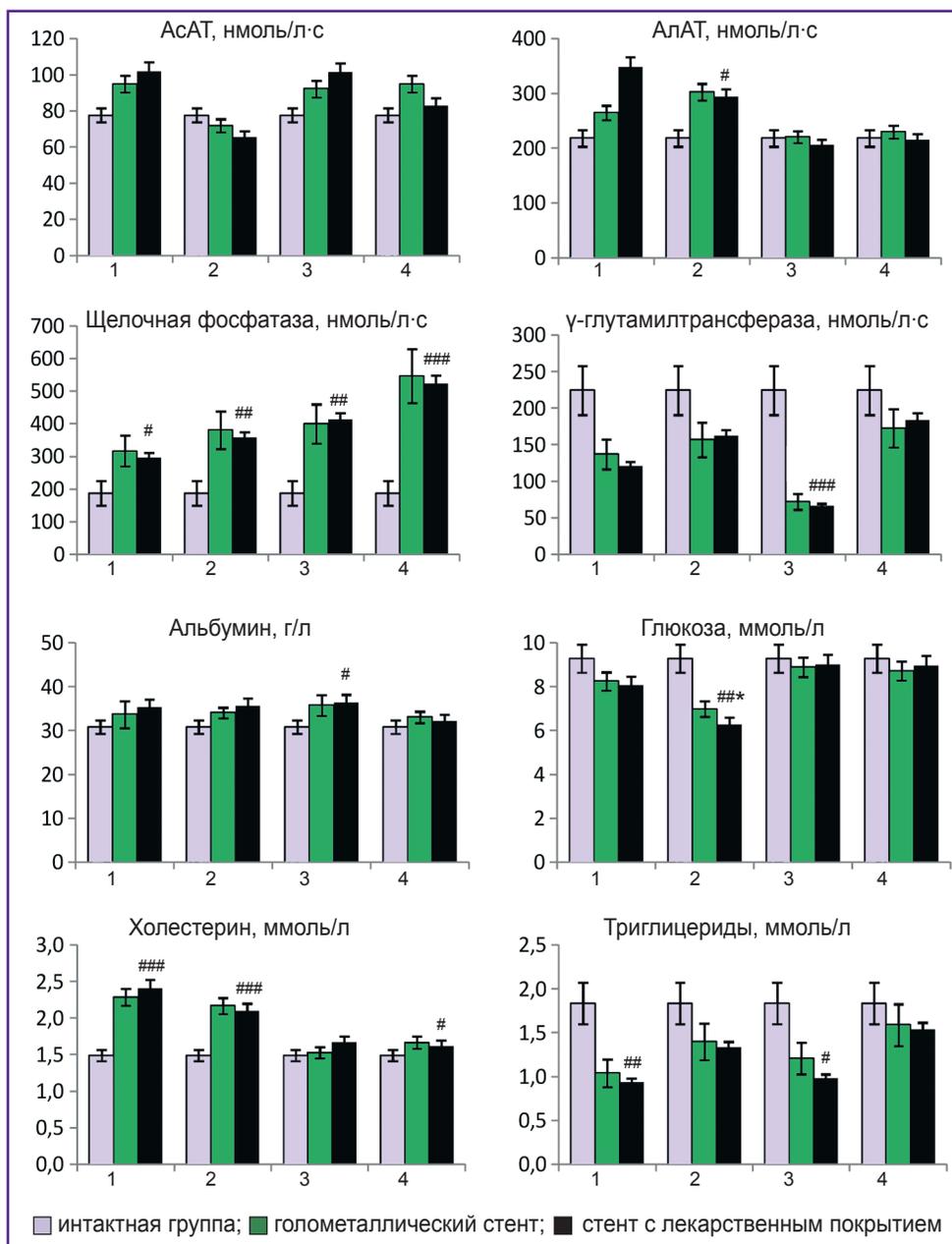


Рис. 1. Активность ферментов и концентрация альбумина, глюкозы, общего холестерина, триглицеридов в сыворотке крови кроликов в разные сроки после стентирования (n=6, X±SD): 1 — 1 нед; 2 — 2 нед; 3 — 4 нед; 4 — 7 нед; статистическая значимость различий значений по сравнению с интактной группой: # — p<0,05; ## — p<0,01; ### — p<0,001; по сравнению с контрольной группой: * — p<0,05

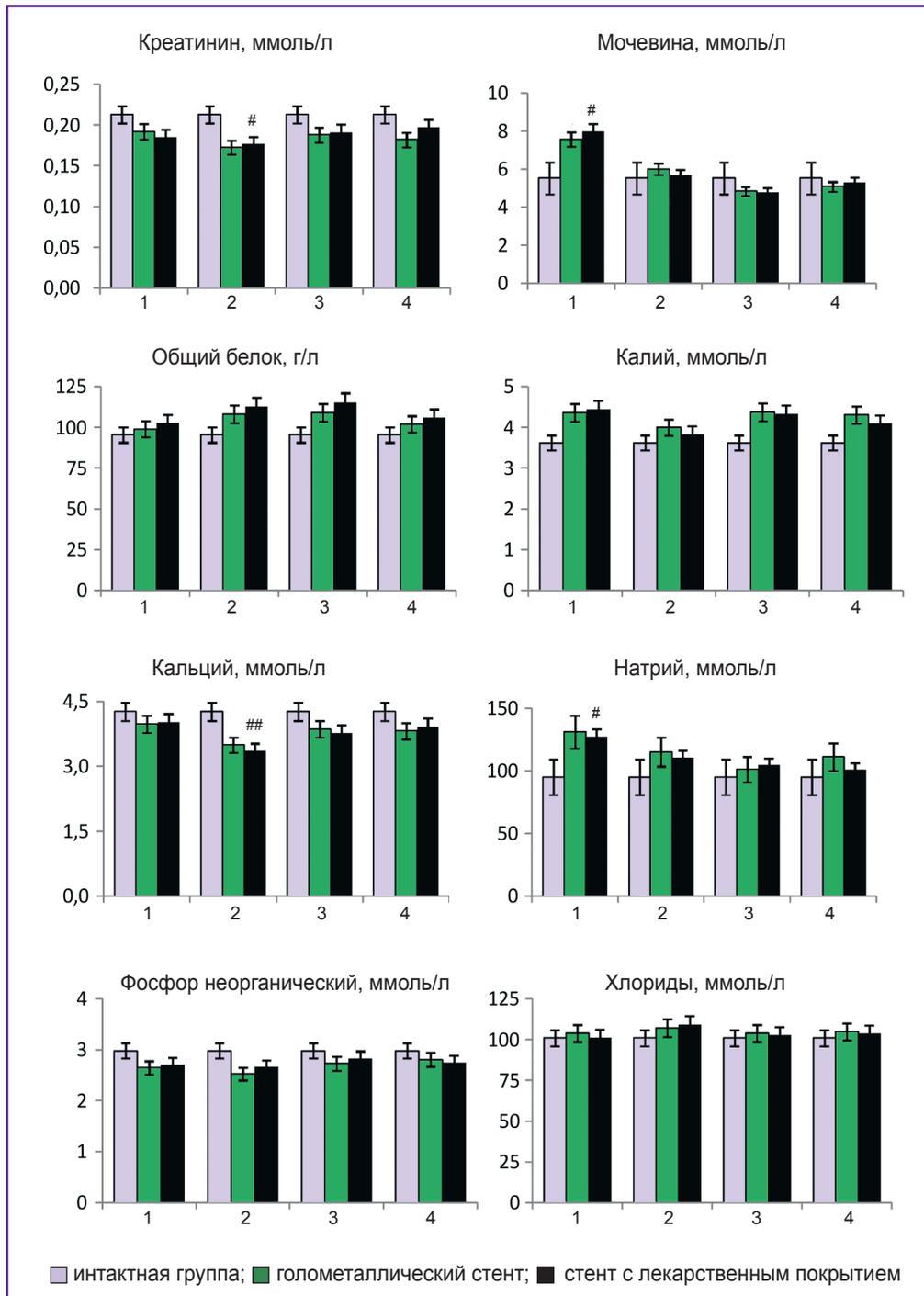


Рис. 2. Концентрации креатинина, мочевины, общего белка, ионов калия, кальция, натрия, фосфатов и хлоридов в сыворотке крови кроликов в разные сроки после стентирования (n=6, X±SD): 1 — 1 нед; 2 — 2 нед; 3 — 4 нед; 4 — 7 нед; статистическая значимость различий значений по сравнению с интактной группой: # — p<0,05; ## — p<0,01

стента с лекарственным покрытием на организм животных. В раннем постоперационном периоде наблюдалось некоторое изменение ряда биохимических параметров, что могло быть следствием оперативного вмешательства. По сравнению с контрольной группой животных, которым ангиопластику выполняли с ис-

пользованием голометаллических кобальт-хромовых стентов, значения биохимических показателей крови кроликов после имплантации сиролимус-элюирующих стентов статистически значимо не отличались.

Полученные данные свидетельствуют также о положительной динамике восстановления и об отсутствии

отсроченной негативной реакции на имплантат со стороны организма животного.

Заключение. Результаты проведенного экспериментального исследования свидетельствуют об отсутствии токсического действия разработанного медицинского изделия на организм животного, что подтверждает соответствие стентов с покрытием из линейно-цепочечного углерода и лекарственным покрытием, разработанных ООО «НаноМед», требованиям биологической безопасности и токсичности, предъявляемым к медицинским изделиям.

Финансирование исследования и конфликт интересов. Исследование не финансировалось какими-либо источниками, и конфликты интересов, связанные с данным исследованием, отсутствуют.

Литература/References

1. Карпов Ю.А., Самко А.Н., Буза В.В. Коронарная ангиопластика и стентирование. М: МИА; 2010. Karпов Yu.A., Samko A.N., Buza V.V. *Koronarnaya angioplastika i stentirovanie* [Coronary angioplasty and stenting]. Moscow: MIA; 2010.
2. Федорченко А.Н. Рестеноз как основная проблема после чрескожных коронарных вмешательств. Автореф. дис. ... докт. мед. наук. Новосибирск; 2009. Fedorchenko A.N. *Restenoz kak osnovnaya problema posle chreskoznykh koronarnykh vmeshatel'stv.* Avtoref. dis. ... dokt. med. nauk [Restenosis as the main problem following percutaneous coronary interventions. DSc Thesis]. Novosibirsk; 2009.
3. Бокерия Л.А., Алекян Б.Г., Голухова Е.З., Бузиашвили Ю.И., Никитина Т.Г., Стаферов А.В., Закарян Н.В. Применение стентов с лекарственным антипролиферативным покрытием в лечении больных ишемической болезнью сердца. Креативная кардиология 2007; 1–2: 183–199. Bokeriya L.A., Alekyan B.G., Golukhova E.Z., Buziashvili Yu.I., Nikitina T.G., Staferov A.V., Zakaryan N.V. Application of stents with antiproliferative drug-eluting coatings in managing patients with ischemic heart disease. *Kreativnaya kardiologiya* 2007; 1–2: 183–199.
4. Бокерия Л.А., Алекян Б.Г., Закарян Н.В., Стаферов А.В. Коронарное стентирование: современное состояние вопроса. В кн.: Руководство по рентгеноэндоваскулярной хирургии сердца и сосудов. Т. 3. Под ред. Бокерия Л.А., Алеяна Б.Г., Анри М. М; 2008; с. 206–219. Bokeriya L.A., Alekyan B.G., Zakaryan N.V., Staferov A.V. *Koronarnoe stentirovanie: sovremennoe sostoyanie voprosa.* V kn.: *Rukovodstvo po rentgenoendovaskulyarnoy khirurgii serdtsa i sosudov.* Т. 3. [Coronary stents: current status. In: Textbook of endovascular surgery for cardiovascular diseases]. Pod red. Bokeriya L.A., Alekyana B.G., Anri M. [Bokeriya L.A., Alekyan B.G., Anri M. (editors)]. Moscow; 2008; p. 206–219.
5. Ли Ч.Х., Сепруйз П.У. Стенты с лекарственным покрытием. Международный журнал интервенционной кардиоангиологии 2003; 1: 9–18. Li Ch.Kh., Serruuz P.U. Stents with drug-eluting coatings. *Mezhdunarodnyy zhurnal interventsionnoy kardioangiologii* 2003; 1: 9–18.
6. Адамян А.А. Основные направления и перспективы в создании и клиническом применении полимерных имплантатов. Биосовместимость 1994; 2: 97–107. Adamyan A.A. Main directions and perspectives in creation and clinical application of polymer implants. *Biosovmestimost'* 1994; 2: 97–107.
7. Севастьянов В.И., Кирпичников М.П. Биосовместимые материалы. М: МИА; 2011; 544 с. Sevast'yanov V.I., Kirpichnikov M.P. *Biosovmestimye materialy* [Biocompatible materials]. Moscow: MIA; 2011; 544 p.
8. Yin R.-X., Yang D.-Z., Wu J.-Z. Nanoparticle drug- and gene-eluting stents for the prevention and treatment of coronary restenosis. *Theranostics* 2014; 4(2): 175–200, <https://doi.org/10.7150/thno.7210>.
9. Ielasi A., Latib A., Colombo A. Current and future drug-eluting coronary stent technology. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2011; 9(4): 485–503, <https://doi.org/10.1586/erc.11.5>.
10. Любченко О.Д., Кручинина А.Д., Шатров А.Н. Кинетика деградации антипролиферативного полимерного покрытия стентов в условиях in vitro. Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Естественные науки 2015; 2(10): 55–61. Lyubchenko O.D., Kruchinina A.D., Shatrov A.N. Kinetics of degradation of antiproliferative polymer coating of stents in vitro. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedeniy. Povolzhskiy region. Estestvennye nauki* 2015; 2(10): 55–61.
11. McPherson R.A., Pincus M.R. *Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods: 22nd edition.* Elsevier Saunders, Philadelphia; 2011.