

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Autoreferát dizertační práce



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

Vývoj třívrstvé cévní protézy pro nízké průtoky

MUDr. Petr Mitáš

Praha 2020

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor: Experimentální chirurgie

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Zdeněk Krška, DrSc

Školící pracoviště: II.chirurgická klinika - klinika kardiovaskulární chirurgie 1. LFUK a VFN

Školitel: MUDr. Miroslav Špaček, PhD.

Konzultant: doc. MUDr. Tomáš Grus, Ph.D.

Dizertační 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

SOUHRN	str. 4
SUMMARY	str. 5
1. ÚVOD	str. 6
2. HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE	str. 7
3. MATERIÁL A METODY	str. 7
4. VÝSLEDKY	str. 12
5. DISKUZE	str. 14
6. ZÁVĚR	str. 15
7. LITERATURA	str. 17
8. VLASTNÍ PUBLIKAČNÍ AKTIVITA	str. 18

SOUHRN

Vývoj cévní náhrady pro nízké průtoky je aktuální otázkou. Představovaná náhrada se skládá ze tří částí – nevstřebatelného scaffoldu představujícího medii, a dvou vstřebatelných kolageních vrstev – pseudointimy a pseudoadventicie. Cílové parametry protézy byly určeny výsledky testů základní metody fyzikálního testování – jednoosou tahovou zkoušku a inflačně-extenzní test, stejně jako další postupy, u humánních vzorků safeny. Autor se zabývá problematikou vývoje nové kolegení složky třívrstvé cévní protézy z českého kapra, který se vyznačuje nižší antigenicitou ve srovnání s kolagenem bovinním. Porovnává standardní a purifikovaný kapří kolagen, který má nižší zastoupení reziduálního tuku s otázkou porovnání průchodnosti při experimentální implantaci ve dvou skupinách na ovčím modelu.

Celkem bylo implantováno 14 protéz ve skupině A sedmi ovčím (standardní kapří kolagen) a 18 protéz ve skupině B devíti ovčím (purifikovaný kapří kolagen). Vždy u každé ovce byla pravostranná náhrada arteficiálně zúžena za účelem prokázání průchodnosti protézy v nízkoprůtokovém řečišti. Průtok protézami ve skupině A poklesl z původních 297 ± 118 ml/min na 158 ± 159 ml/min ($p=0.041$) po uplatnění arteficiální stenózy, a stejně tak od 330 ± 164 ml/min na 97 ± 29 ml/min ($p=0.0052$) ve skupině B ($p=0.27$ mezi oběma skupinami). Ve skupině A došlo u přeživších pěti ovcí k uzávěru dvou cévních protéz a to 3 a 14 den od implantace. Ve skupině B, z šesti přeživších ovcí, pouze jedna protéza na levé straně krku zůstala průchodná ($p=0.0017$). Histologie explantovaných náhrad ukázala degradaci intimální vrstvy v centru s endotelizací od periferie (anastomóz) ve skupině A a formování silné fibrosní intimální vrstvy ve skupině B. Experimentální práce ukázala, že poměr mezi kolagenem a obsahem tuku u nově vyvinuté třívrstvé cévní protézy určené pro nízké průtoky, hraje zásadní roli ve smyslu průchodnosti a vzniku strukturálních změn po implantaci na ovčím modelu.

SUMMARY

The development of vascular replacement for low flow rates is a topical issue. The presented replacement, which is the result of the work of the author's team, consists of three parts - a non-absorbable scaffold representing the media, and two absorbable collagen layers - pseudointima and pseudoadventitia. Target parameters of the prosthesis were determined by test results of the basic physical testing method - uniaxial tensile test and inflation-extension test, as well as other procedures in human saphenous specimens. Furthermore, the author deals with the development of a new female component of the three-layer vascular prosthesis of the Czech carp, which is characterized by lower antigenicity compared to bovine collagen. It compares standard and purified carp collagen, which has a lower residual fat ratio with the question of comparing patency in experimental implantation in two groups on a sheep model.

A total of 14 prostheses in group A were implanted in seven sheep (standard carp collagen) and 18 prostheses in group B in nine sheep (purified carp collagen). For each sheep, the right-hand restoration was artificially narrowed to demonstrate patency of the prosthesis in the low-flow bed. Group A flow of prostheses decreased from original 297 ± 118 ml / min to 158 ± 159 ml / min ($p = 0.041$) after application of artificial stenosis, as well as from 330 ± 164 ml / min to 97 ± 29 ml / min ($p = 0.0052$) in group B ($p = 0.27$ between the two groups). In group A, two vascular prostheses were occluded at five and three days after implantation in five sheep. In Group B, out of six surviving sheep, only one prosthesis on the left neck remained open ($p = 0.0017$). Histology of explanted exposures showed intimal layer degradation at the endothelial endothelial endpoint (anastomosis) in group A and the formation of a strong fibrous intimal layer in group B. it plays a crucial role in the patency and the formation of structural changes after implantation in the sheep model.

1. ÚVOD

Jedním z pilířů rekonstrukční cévní chirurgie jsou cévní náhrady. Snaha o jejich nalezení se datuje již do druhé poloviny devatenáctého století. Za zásadní příspěvek v této oblasti (cévní steh) byl Carrel v roce 1912 oceněn Nobelovou cenou (Carrel A., 1912). První pokusy s cévní rekonstrukcí byly vynuceny válečnými zraněními, ale po skončení druhé světové války se již rekonstrukční cévní chirurgie začala rozvíjet jako samostatný obor. Jako první náhrady se začaly používat tepenné alotransplantáty a nejčastější indikací výkonu byly výdutě, zejména na břišní aortě. Poměrně brzy se však začaly objevovat problémy v důsledku imunologicky vyvolaných změn – rejekce, s uzávěrem nebo fatální rupturou. V roce 1952 publikoval Kunlin (Kunlin J., 1953) úspěch při použití vlastní žíly nemocného (vena saphena magna) k tepenné rekonstrukci. Dodnes zůstává žilní autotransplantát jednou z nejlepších náhrad. Jeho využití je však limitováno kvalitou a dostupností u řady nemocných. Celou tuto dobu přetrvávala snaha vytvořit umělou cévní náhradu, což se podařilo v roce 1954, kdy Voorhes a spol. publikovali zkušenosti s porézní cévní náhradou vytvořenou textilním způsobem ze syntetických vláken.

Naše koncepce prototypu cévní náhrady je konstruovat takovou náhradu, která se jak stavbou, tak i fyzikálně-chemickými vlastnostmi bude blížit humánní cévě. Cílem tedy bylo vytvořit kompozitní třívrstvou trubici se sendvičově uspořádanou stěnou. Stěna této cévní náhrady je tvořena: prostřední nevstřebatelnou vrstvou o různé porozitě (tzv. scaffoldu) a dvou vstřebatelných vrstev zevní a vnitřní z biologického materiálu (pseudointima a pseudo-adventicie). Vzájemně však jsou tyto vrstvy propojeny mezi sebou, aby nedošlo k jejich separaci při implantaci do tepenného řečiště. Cíle bylo vyvinout a otestovat optimální složení cévní náhrady, testovat kolagen z treboňského kapra a vytvořenou cévní náhradu ověřit na ovčím modelu.

2. HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE

3.

HYPOTÉZY

1. Kolagen získaný ze sladkovodních ryb se vyznačuje nižší antigenicitou a vhodnými fyzikálními a chemickými vlastnostmi.
2. Vlastnosti protézy Cybergraft, vyvinuté v rámci dosavadního výzkumu autorského kolektivu, jsou do značné míry determinovány použitím bovinního kolagenu.
3. Ovčí model je vhodným způsobem experimentálního ověření vlastností protézy určené pro nízké průtoky.

CÍLE PRÁCE

1. Vývoj metodiky k získávání kolagenní hmoty z tuzemských sladkovodních ryb, včetně analýz mechanických, chemických a biologických vlastností.
2. Vytvoření nového prototypu sendvičové cévní protézy pro nízké průtoky s použitím kolagenu ze sladkovodních ryb.
3. Experimentální ověření nového prototypu cévní protézy na ovčím modelu.

3. MATERIÁL A METODY

Z námi vybraného vlákna na základě celé řady testů pod technickým označením TDA jsme nechali naplést velmi tenký pletený scaffold s určitou porozitou, kde z důvodů patentové ochrany udáváme jen interval: minimální hranice porozity 5000 a dolní hranice optimální porozity maximálně do 10 000 ml H₂O/cm²/min/120mmHg.

Testování fyzikálních vlastností biologických cévních náhrad

Inflačně-extenzní test je vhodnou metodou k testování fyzikálních vlastností cévních náhrad. Jedná se o cyklické zatěžování tubulárního vzorku vnitřním tlakem, kdy jsou pozorovány deformace vzorku v obvodovém a podélném směru. Sledováno je i torzní chování vzorku. Všechny deformace jsou ve vazbě s monitorovaným interním tlakem ve vzorku a s rychlostí cyklického zatěžování simulující různé tepové frekvence. Princip je blíže vysvětlen na Schématu 1. Test začíná upnutím vzorku mezi dva trny. Horní trn je spojen s dávkovačem kapaliny, který je kotven na lineární elektrické motory, jejichž pohyb je řízen měřicím počítačem. Deformace vzorku během zatěžování vnitřním tlakem je sledována pomocí dvou na sebe kolmo ustavených kamer. Následně je ze získaného experimentu zpracován graf závislosti napětí - deformace nebo tlak – deformace.

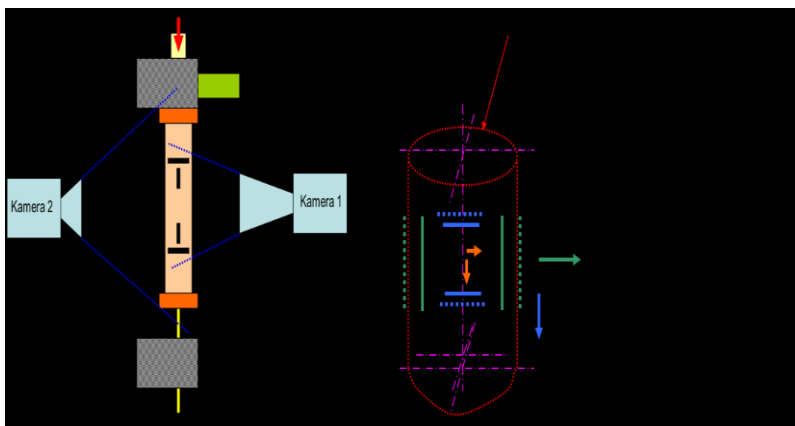


Schéma 1.: schematický pohled na upnutý vzorek instalovaný do konzol. Vpravo: schéma deformování tubulárního vzorku během

inflačně-extenzního testu. Jsou zde naznačené markery (linky) na kterých se identifikovala obvodová a axiální deformace.

Testování kompozitních celků

Dalším krokem ve vývoji cévní náhrady je mechanický test náhrady jako kompozitního celku v různých sendvičových uspořádáních (Schéma 2 vlevo). Rozdílná uspořádání vrstev cévní náhrady se promítají do různých vlastností, které tímto uspořádáním náhrada dostává. Z provedených měření vzešla doporučená struktura cévní náhrady. Takto utvořená náhrada se svými fyzikálními vlastnostmi nejvíce přibližuje nativní safěně. Jde o uspořádání stěny trubice, kdy je kolagenní trubice uvnitř síťky. Na náhradě byla vytvořena i vnější kolagenní vrstva – pseudoadventicie, aby byl scaffold překryt kolagenní hmotou. Pro lepší přiblížení mechanické odezvy cévní náhrady humánní žíle bylo nutno zmenšit tloušťku stěny náhrady, která se u testovaných vzorků pohybovala kolem 0,45 mm, a to zhruba cca o 50 %, tj. na hodnotu 0,2 až 0,3 mm. Důvodem je, aby závislost deformace na tlaku byla méně strmá a posunula se v grafu směrem doprava, tj. do oblastí větších obvodových deformací při stejném zatížení vnitřním tlakem. Provedená redukce tloušťky stěny vedla ke zmiňovanému efektu posuvu deformačních charakteristik cévní náhrady do oblastí větších deformací.

Výroba kolagenu ze sladkovodních ryb

Izolace kolagenu z rybích kůže třebaňského kapra byla prováděna dle předchozích analýz: Mladí kapři do 2 kg váhy – lysci bez šupin. Použity byly pouze kůže bez šupin. Kůže byly ihned po zabití a vykuchání ryb částečně mechanicky očištěny od masa a tuku, zchlazeny a poté zamrazeny. Kůže byly ve zmrazeném stavu pomlety na mlýnku na maso (oka velikosti 3 mm) a hmota byla uložena v chladničce (4 °C) do druhého dne. Část hmoty bylo posláno do laboratoře na rozbor (tuk, kolagen). Zbytek byl dále zpracováván. Ve hmotě byl určen obsah sušiny na 49,3 %. Po-

mletý materiál (cca 1 kg) byl zalit v uzavíratelné sklenici 3 litry 0,1 M NaOH. Tato směs byla umístěna do chladničky a zchlazena na cca 4 °C. Poté vždy třepána 2 hodiny na třepačce, opět zchlazena a třepána. Uvolněný tuk (ztuhlý kotouč na hladině) byl mechanicky odstraněn. Zbytek byl odfiltrován na síte a promýván demi vodou až do neutrální reakce (pH papírek). Následně byly kůže opět naloženy do 0,1 M NaOH a podrobeny stejné proceduře. Celkem tedy byly promývány 3 krát 3 litry 0,1 M NaOH. Takto vyčištěné kůže byly zality 2 litry 10% n-butanolu. Směs byla zachlazena a třepána na třepačce, v 2 hodinových intervalech. Následně byly přefiltrovány přes síto, propláchnuty demi vodou a opět naloženy do 10% n-butanolu. Celkem byly použity 3 cykly. Poté následovala filtrace přes síto a několikeré (5krát) propírání demi vodou až do úplného odstranění n-butanolu. Získaný materiál byl zvážen a byla stanovena sušina vzorku. Tímto způsobem přečištěné kůže byly naloženy do roztoku 0,5M kyseliny octové. Poměr kůže vers. roztok cca 1:6 (w/w). Při přepočtu na sušinu se jedná cca o 3 % ní roztok (30 g sušiny kůží na 1 litr 0,5 M kys. octové). Plastový barel se směsí byl zachlazena a následně míchán na homogenizátoru vlastní výroby a opětovně chlazen. Takto celkem po asi 36 hodinách naležení, byla směs přefiltrována na vakuové vývěvě přes jemnou nylonovou tkaninu. Zbytek po filtraci (cca 5 %) byl vyhozen. Přefiltrovaná kolagenová „kaše“, byla vysrážena pomocí roztoku 2,5 M NaCl (poměr kolagen vers. roztok cca 3:2 (V/V)). Poté byl vysrážený kolagen přefiltrován na velké Büchnerově nálevce přes papírový filtr + podložka z uhelony (nylonová tkanina). Zfiltrovaný kolagen byl následně ještě dodatečně vymačkán ručně přes tkaninu. Byla změřena sušina a výtěžek zvážen. Získaná hmota obsahuje cca 30 % sušiny. V dalším kroku byla hmota dialyzována přes dialyzační hadice (MWCO = 14 kDa). Směs byla zředěna demi vodou v poměru 1:1, tak, aby vznikl cca 12 % ní kolagenový roztok. Takto připravený hustý kolagenový roztok byl podroben dialýze nejprve proti demi vodě (24 hodin v chladničce, občasné míchání, 1 krát výměna vnějšího roztoku) a následně proti 0,1 M kyselině octové (24

hodin). Během dialýzy došlo k dalšímu naředění kolagenu na výslednou koncentraci cca 10 %. Takto vzniklá hmota byla po zachlazení na 4 °C finálně zhomogenizována ručním mixerem a v uzavřeném PE sáčku skladována v chladničce až do použití pro extruzi cévních protéz.

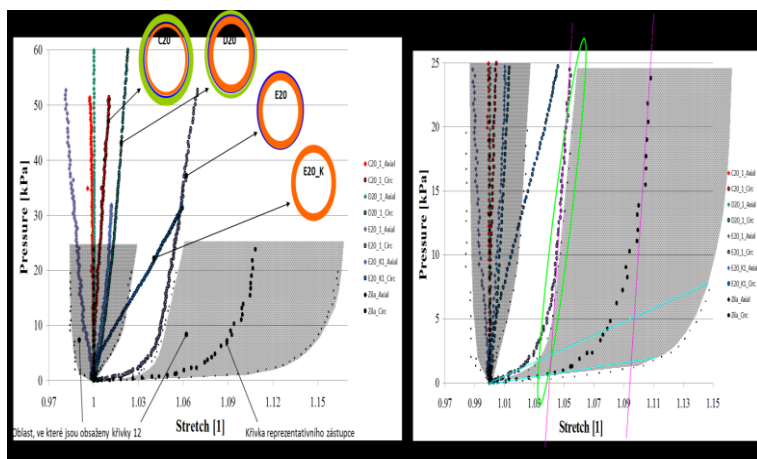


Schéma 2.: Inflačně-extenční testy cévních náhrad jako kompozitních trubic s různým sendvičovým uspořádáním stěny. Vlevo: testované varianty sendvičového uspořádání stěny náhrady, kde modrá barva reprezentuje síťku (scaffold) a zelená s oranžovou vnější a vnitřní stěnu náhrady tvořenou kolagenní hmotou. Vpravo: detail obrázku vlevo v rozsahu fyziologických hodnot.

Extruze kolagenní hmoty z rybího kolagenu je klíčovým procesem výroby cévní protězy. Principem metody je proces, při kterém dochází k protlačování kolagenní hmoty určité konzistence ze zásobníku přes speciální matrici. Na konci matrice se nachází pohyblivý trn, který může rotovat a který je určitou rychlostí tažen ve svislém směru. Na tomto trnu se nachází silikonová kolagenní trubice, na jejíž povrch je kolagenní hmota vytlačována. Matrice zajistí konstantní průřez vytlačované vrstvy kolagenu.

4. VÝSLEDKY

Finální technologický postup výroby nové cévní náhrady pro nízké průtoky

Protězy byly vyrobeny v rozměrech: vnitřní průměr 4 a 5 mm, délka 15 a 20 cm

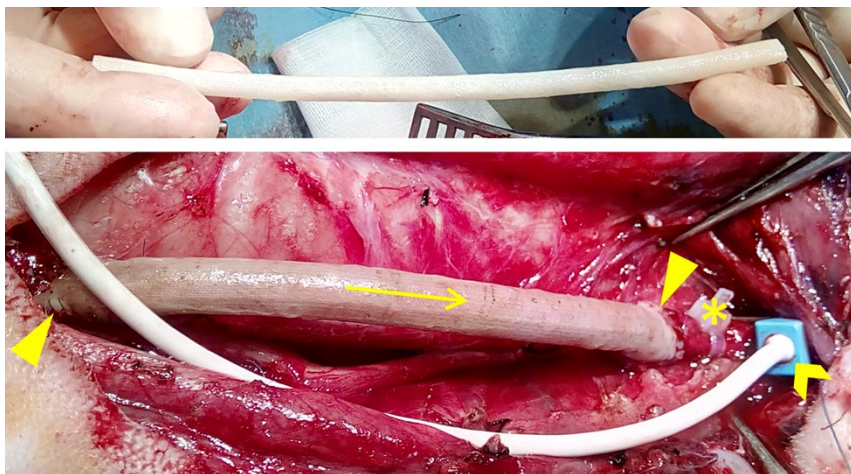
1. Kolagenní hmota byla po zachlazení na 4 °C v uzavřeném PE sáčku skladována v chladničce až do použití pro extruzi cévních protéz
2. Danému množství kolagenní hmoty rybího kolagenu jsme upravili koncentraci na potřebnou hodnotu a do této kolagenní hmoty byly rovnoměrně vmísены farmakologicky účinné látky
3. Na speciálním extruzním zařízení, navrženém doc. Krajičkem, byly prováděny extruze samonosné kolagenní trubice výše uvedených rozměrů. Tuto primární vrstvu v kompozitní cévní náhradě označujeme jako „*pseudointima* „
4. Tyto kolagení trubice byly sušeny při pokojové teplotě do úplného vyschnutí
5. Následným krokem bylo navlečení pleteného scaffoldu na tuto vysušenou kolagenní trubici pomocí speciálního zařízení. Tuto druhou vrstvu označujeme jako „*pseudomedia*“
6. Identickým způsobem, jak již bylo popsáno v bodu 2., jsme připravili kolagenní hmotu o stejné koncentraci k vytvoření zevní vrstvy kompozitní cévní náhrady
7. Na vysušenou kolagenní trubici s pleteným scaffoldem byla naextrudována zevní vrstva kolagenu z treboňského kapra. Tuto vrstvu označujeme jako „*pseudoadventicia*“

8. Tyto kompozitní třívrstvé kolagenní trubice jsme sušili při pokojové teplotě do úplného vyschnutí.
9. Následně jsme tyto vysušené kompozitní třívrstvé trubice podstoupili k aplikaci tvrdidla po určitou dobu a po této době jsme důkladně přebytek tvrdícího činidla vymyli.
10. Poté opět tyto kompozitní vytvrzené kolagenní trubice podstoupili sušení při pokojové teplotě.
11. Po vysušení byly tyto prototypy cévních protéz tuhé a museli být po určitou dobu měkkěny v lázni glycerinu při jeho dané koncentraci.
12. Po změkčení jsme protézy nastříhali na délky 15 a 20 cm. Tyto délky jsme volili s ohledem na specifické testy tohoto prototypu cévní protezy a na experimenty „in vitro“ a „in vivo“.
13. Vytvořené vzorky prototypů cévní protézy byly samostatně zabaleny do dvojitého sterilizačního obalu a opatřeny identifikačním štítkem, který určoval šarži, rozměry, datum výroby, datum sterilizace, indikátor provedené sterilizace a další informace.
14. Takto zabalené cévní protézy byly odeslány ke sterilizaci. Sterilizace byla na základě předchozího testování (i s ohledem dalšího prokroslinkování vzorku) zvolena ozářením pomocí gamma paprsků v *BIOSTER Veverská Bítýška*.

Experimentální ověření vyvinuté cévní náhrady na modelu velkého zvířete:

Celkem bylo implantováno 32 prototypů cévních náhrad u 16 pokusných zvířat – ovcí. Dvě ovce byly z důvodů nezotavení se z anestezie a prvním nedokonalým prototypům cévní protezy z rybího kolagenu ze sledované skupiny vyjmuty. Náš soubor tedy čítal 14 implantovaných zvířat – ovcí, kde došlo časně mortalitě u 6 zvířat v důsledku nezotavení se z anestezie, vzniku plicního edému nebo neprospívání zvířete, kde podrobnosti jsou uvedeny Tabulce 2. Celkem tedy bylo implantováno 18 prototypů cévních protéz z rybího kolagenu třeboňského kapra. Prototyp cévní protezy s kolagenem typu 1 jsme implantovali v deseti případech a cévní protezu s rybím kolagenem typu 2 jsme implantovali v osmi

případech. Počet průchodných cévních protéz s kolagenem typu jedna byl 8 protéz z deseti implantovaných (80%) a s kolagenem typu 2 zůstal průchodný jen jeden prototyp cévní protézy (12,5%). Průměrná doba sledování v souboru s rybím kolagenem byla 196 dní. Pro srovnání, v případě protézy z bovinního kolagenu Cybergraft zůstalo průchodných při průměrné době sledování 212 dní 11 protéz z 13-ti implantovaných tedy 84,6%. Tedy dlouhodobá průchodnost prototypů cévních protéz z rybího kolagenu třeboňského kapra byla srovnatelná s průchodností protézy Cybergraft z bovinního kolagenu i v tomto malém souboru implantovaných cévních protéz (80% vs. 84,6%).



Na fotografii je graft před na šitím (nahore) a po našití (dole). Proximální a distální anastomóza je označena trojúhelníky a šipka na bypassu ukazuje tok krve. Hvězdička označuje místo naložení PVC pásky, kterou jsme vytvářeli stenózu a snižovali jsme tak průtok bypassem na hodnoty kolem 100 ml/min. Za PVC páskou byla na karotickou tepnu naložena ultrazvuková sonda – opět označena šipkou.

5. DISKUZE

Tato studie ukázala, že rybí kolagen z třeboňského kapra s nižším obsahem tuků používaným v nové trojvrstevné cévní protéze vede k lepšímu průchodnosti. Cévní protézy jak skupiny A tak skupiny B vykazovali dobré známky vhojení se do okolních tkání. Cévní protézy s nízkým obsahem tuků v extrudovaném kolagenu vykazují časnější odbourání této kolagenní vrstvy tvořící pseudointimu, a epitelizaci z periferie, která je však pomalejší na dané délce protézy, než odbourávání intraluminální vrstvy rybího kolagenu. Po úpravě kolagenu této pseudointimy je proces odbourání kolagenu intraluminálně v časové shodě s procesem endotelizace. Pro cévní protézy s vyšším obsahem tuků bylo charakteristické vyvinutí silné vláknité intimální vrstvy a časný uzávěr těchto prototypů.

V této studii jsme ukázali, že modifikace jen jednoho kroku, v našem případě zastoupení čistého kolagenu a tuků v kolagenní hmotě, ze které je prováděna extruze na polyesterovou síťku, ovlivňuje rovnováhu mezi degradací kolagenní pseudointimy, neoendotelizací, proliferací a hypertrofií této vrstvy. Primární myšlenka modifikace poměru mezi obsahem kolagenu a zbytkovým tukem byla snížení smáčivosti vnitřní vrstvy, protože čistý kolagen je vlastně hemostatickým činidlem. Tato hypotéza, jak plyne z výsledků projektu, se však nepotvrdila. Podrobná histologická analýza je pro vývoj prototypu protézy z rybího kolagenu zcela klíčová, protože poukáže na slabá místa, která by měla být v následujícím vývoji řešena. Výše uvedené histologické nálezy jsou jen ukázkou z podstatně rozsáhlejšího souboru vyšetření. Vhojení cizích těles v organismu je v případě cévních protéz komplexnější děj, kde tyto materiály jsou vystaveny různým dočasným, ale i trvalým vlivům, jejichž obdoba se jinde v organismu nevyskytuje. Z našich zkušeností vyplývá, že jakákoli cévní náhrada ve srovnání s nativní cévou zabezpečuje prozatím jen mechanickou funkci medie, a to zejména odolnosti vůči krevnímu

tlaku, zatím co ostatní vrstvy arteficiální cévní náhrady nesmí komplikovat proces vhojování a vždy vznikají nebo jsou po implantaci do organismu ovlivňovány hostitelem. I to byl jeden z důvodů, proč jsme vybrali právě rybí kolagen a snažili se z něj vyvinout kolagenní hmotu, ze které byla vytvořena pseudointima a pseudoadventicie, která tuto podmínku splňovala. Pro nově se vytvářející cévní stěnu v místě implantované arteficiální cévní náhrady je klíčové zajištění výživy tkání, kde radiálními perfuzními proudy živiny pronikají z lumina protezy směrem ven a odpadové produkty metabolismu jsou odváděny adventicií. Z těchto důvodů byla navržena vnitřní vrstva tak, aby tyto děje umožnila, což v praxi představovalo správnou bobtnavost kolagenu a optimální porozita pleteného scaffoldu, která nevytváří perfuzní stíny, tedy překážky volného pohybu produktů metabolismu a buněk.

6. ZÁVĚR

Souhrnem lze říci, že vyvíjenou cévní protézu lze jako kompozitní trubici „naprogramovat“ následujícími kroky: 1) volbou vhodné geometrie scaffoldu (velikost ok síťoviny a tloušťka vlákna), 2) vhodně zvoleným sendvičovým uspořádáním kompozitní trubice (pozice scaffoldu vůči matrici), 3) technologií výroby kolagenních vrstev náhrady, kdy může dojít k plánované řízené změně uspořádání vnitřní struktury materiálu, např. extruzí, s dopadem na fyzikální vlastnosti, 5) dobou tvrzení kolagenní hmoty matrice náhrady (vznik přídatných vazeb mezi kolagenními vlákny – crosslink), 6) vhodným ošetřením vnitřního povrchu cévní náhrady ve smyslu nízké trombogenicity a 7) volbou typu sterilizace hotové cévní protézy (vznik dalších přídatných vazeb mezi kolagenními vlákny). Experimentálně získaná data a ověření modelu cévní náhrady na zvířecím modelu dává naději na budoucí použití v klinické praxi (Grus T. et al., 2018; Špaček M. et al., 2019).

Lze konstatovat, že byly splněny cíle předkládané práce:

1. Vývoj metodiky k získávání kolagenní hmoty z tuzemských sladkovodních ryb, včetně analýz mechanických, chemických a biologických vlastností
2. Vytvoření nového prototypu sendvičové cévní protézy pro nízké průtoky s použitím kolagenu ze sladkovodních ryb.
3. Experimentální ověření nového prototypu cévní protézy na ovčím modelu.

Byl vyvinut zcela nový typ kolagenu ze sladkovodních ryb – třeboňského kapra, který byl analyzován po stránce mechanických, chemických a biologických charakteristik. Byla vyvinuta kompozitní třívrstevná kolagenní trubice z kolagenu sladkovodních ryb, která v případě našeho projektu plnila funkci cévní protézy pro nízké průtoky. Tento prototyp cévní protézy z rybiho kolagenu byl úspěšně implantován šestnácti ovčím se sledováním až 275 dnů. Byly zhodnoceny makroskopické i mikroskopické nálezy. Výsledky práce byly publikovány v časopisech s IF.

7. LITERATURA

1. Beran M, Drahorad J, Molik P. Site-specific thrombolytic and anticoagulant biomaterials. Proceedings of AMN7. Int J Nanotechnology 2017;14:31–7.
2. Blakemoore AH, Voorhees AB Jr. The use of tubes constructed from vinyon N cloth in bridging arterial defects; experimental and clinical. Ann Surg. 1954;140:324–34.
3. Grus T, Lambert L, Mlcek M, et al. In vivo evaluation of short-term performance of new three-layer collagen-based vascular graft designed for low-flow peripheral vascular reconstructions. Biomed Res Int. 2018. doi:10.1155/2018/3519596
4. Heyligers JMM, Arts CHP, Verhagen HJM, et al. Improving small-diameter vascular grafts: From the application of an en-

- dothelial cell lining to the construction of a tissue-engineered blood vessel. *Ann Vasc Surg.* 2005;19:448–56.doi. 10.1007/s10016-005-0026-0.
5. Chlupáč J, Filová E, Bačáková L. Blood Vessel Replacement: 50 years of Development and Tissue Engineering Paradigms in Vascular Surgery. *Physiol. Res.* 58 (Suppl. 2): S119-S139 (2009).
 6. Kakou A, Louis H, Cattan V, Lacolley P, Thornton SN. Correlation between arterial mechanical properties, vascular biomaterial and tissue engineering. *Clin Hemorheol Microcirc.* 37 (1-2): 71-5 (2007).
 7. Song E, Yeon Kim S, Chun T, Byun H-J, Lee XM. “Collagen scaffolds derived from a marine source and their biocompatibility,” *Biomaterials*, vol. 27, no. 15, pp. 2951–2961, 2006.
 8. Veselý J, Horný L, Chlup H, et al. Constitutive modeling of human saphenous veins at overloading pressures. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2015;45:101–8.
 9. Widmer MS, Gupta PK, Lu L, Meszlenyi RK, Evans GRD, Brandt K, Savel T, Gurlek A, Patrick Jr ChW, Mikos AG. Manufacture of porous biodegradable polymer conduits by an extrusion process for guided tissue regeneration. *Biomaterials* 19: 1945-1955 (1998).
 10. Yamada S, Yamamoto K, Ikeda T, Yanagiguchi K, Hayashi Y. “Potency of Fish Collagen as a Scaffold for Regenerative Medicine,” *BioMed Research International*, vol. 2014, Article ID 302932

8. VLASTNÍ PUBLIKAČNÍ AKTIVITA

Publikace se vztahem k tématu dizertační práce

a) impaktované

1. **Mitáš P**, Grus T, Lambert L, Mlček M, Honsová E, Dohnalová M, Suchý T, Burgetová A, Lindner J, Špaček M. The influence of purification of carp collagen used in a novel composite graft with sandwich construction of the wall on its biological properties and graft patency rates, *Physiological Research* 68:603-610, 2019, DOI [10.33549/physiolres.934117](https://doi.org/10.33549/physiolres.934117) IF (2019) = 1.697
2. Špaček M, Chlup H, **Mitáš P**, Veselý J, Lambert L, Mlček M, Krajíček M, Lindner J, Grus T. Three-layer collagen vascular graft designer for low-flow peripheral vascular reconstructions. *Journal of Applied Biomedicine* 17:52, 2019, DOI: 10.32725/jab.2019.002 IF= 1.783

b) neimpaktované

1. **Mitáš P**, Špaček M, Grus T, Chlup H, Mlček M, Lambert L, Krajíček M, Lindner J. Vývoj cévní náhrady pro nízké průtoky – přehled (Development of vascular substitutes for low flow peripheral bypass grafting – review), *Rozhledy v chirurgii* 2019, 98:233-238, DOI:10.33699/PIS.2019.98.6.233–238

Ostatní publikace v časopisech s IF

1. Špaček M, Jindrák V, Špunda R, Štádler P, Lindner J, **Mitáš P**, Bělohávek O. Current Trends in the Diagnosis of Vascular Prosthesis Infection. *Acta Chirurgica Belgica*. 2012, 112(6), 405-413. ISSN 0001-5458. IF = 0.359 (2012)

2. **Mitáš P**, Vejražka M, Hrubý J, Špunda R, Pecha O, Lindner J, Špaček M. Prediction of Compartment Syndrome Based on Analysis of Biochemical Parameters. *Annals of Vascular Surgery*. 2014, **28**(1), 170-177. ISSN 0890-5096. DOI: [10.1016/j.avsg.2012.12.006](https://doi.org/10.1016/j.avsg.2012.12.006)
IF = 1.170 (2014)
3. Novotný R, Hrubý J, Hlubocký J, **Mitáš P**, Brlíková L, Valešová J, Janák D, Lindner J. Giant paratracheal ancient schwannoma in 57-year-old male patient: case report. *European Surgery-Acta Chirurgica Austriaca*. 2015, **47**(1), 35-38. ISSN 1682-8631. DOI: [10.1007/s10353-014-0287-3](https://doi.org/10.1007/s10353-014-0287-3) **IF = 0.533** (2015)
4. Grus T, Lambert L, Banerjee R, Grusová G, Rohn V, Vidim T, **Mitáš P**. Intercondylar Route of Prosthetic Infra-genicular Femoropopliteal Bypass Has Better Primary, Assisted, and Secondary Patency but Not Limb Salvage Rate Compared to the Medial Route. *BioMed Research International*. 2016, (August), nestránkováno. ISSN 2314-6133. DOI: [10.1155/2016/1256414](https://doi.org/10.1155/2016/1256414) **IF = 2.476** (2016)
5. Špaček M, **Mitáš P**, Hrubý J, Špunda R, Vejražka M, Lindner J. Lower extremity acute compartment syndrome diagnosis - review. *European Surgery-Acta Chirurgica Austriaca*. 2016, **48**(Suppl 3), 188-190. ISSN 1682-8631. DOI: [10.1007/s10353-016-0442-0](https://doi.org/10.1007/s10353-016-0442-0)
IF = 0.287 (2016)
6. Novotný R, Slížová D, Hlubocký J, Krs O, Špatenka J, Burkert J, Fiala R, **Mitáš P**, Měříčka P, Špaček M, Hlubocká Z, Lindner J. Cryopreserved human aortic root allografts arterial wall: Structural changes occurring during thawing. *PLoS One*. 2017, **12**(4), nestránkováno. ISSN 1932-6203. DOI: [10.1371/journal.pone.0175007](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175007) **IF = 2.766** (2017)
7. Novotný R, Hlubocký J, **Mitáš P**, Lindner J. Fibrin sealants in cardiac surgery: The last five years of their devel-

opment and application. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*. 2018, **27**(6), 857-862. ISSN 1899-5276. DOI: [10.17219/acem/68981](https://doi.org/10.17219/acem/68981)

IF = 1.262 (2017)

8. Špaček M, Měříčka P, Janousek L, Stadler P, Adamec M, Vlachovsky R, Guňka I, Navrátil P, Thieme F, **Mitáš P**, Špunda R, Špatenka J, Staffa R, Nemeč P, Lindner J. Organization model for allotransplantations of cryo-preserved vascular grafts in Czech Republic. *Cell and Tissue Banking*. 2018, **19**(3), 437-445. ISSN 1389-9333. DOI: [10.1007/s10561-018-9691-4](https://doi.org/10.1007/s10561-018-9691-4)
IF = 1.527 (2017)
9. Novotný R, Slížová D, Hlubočký J, Krs O, Špatenka J, Burkert J, Fiala R, **Mitáš P**, Měříčka P, Špaček M, Hlubočká Z, Lindner J. Structural changes arising from different thawing protocols on cryopreserved human allograft's aortic valve leaflets. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*. 2018, **27**(8), 1033-1036. ISSN 1899-5276. DOI: [10.17219/acem/73713](https://doi.org/10.17219/acem/73713) **IF = 1.262** (2017)
10. Hartinger J, Novotný R, Bílková J, Kvasnička T, **Mitáš P**, Šíma M, Hlubočký J, Kvasnička J, Slanař O, Lindner J. Role of Dipyron in the High On-Treatment Platelet Reactivity amongst Acetylsalicylic Acid-Treated Patients Undergoing Peripheral Artery Revascularisation. *Medical Principles and Practice*. 2018, **27**(4), 356-361. ISSN 1011-7571. DOI: [10.1159/000489970](https://doi.org/10.1159/000489970) **IF = 1.536** (2017)

Publikace bez IF, v časopisech s recenzním řízením

1. Lacina L, Kodet O, **Mitáš P**, Štork J. Chronická venózní insuficience a její léčba. *Praktické lékařství*. 2011, **7**(4), 160-165. ISSN 1801-2434.
2. Paleček T, Beran S, Šmíd O, **Mitáš P**. Subakutní uzávěr arteria axillaris, vzniklý na podkladě embolizace z tumoru plic prorůstajícího do levé síně. *Cor et Vasa*. 2009, **51**(2), 136-136. ISSN 0010-8650.

3. Šlais M, **Mitáš P**, Semrád M, Hrubý J, Lindner J, Štádler P. Vícenásobná sekvenční revaskularizace infrapopliteálních tepen při záchraně kriticky ischemické končetiny. *Rozhledy v chirurgii*. 2010, **89**(1), 59-63. ISSN 0035-9351.
4. Špaček M, Jindrák V, Štádler P, Bělohávek O, Balák J, **Mitáš P**, Semrád M, Lindner J. Příspěvek k diagnostice infekce cévní protězy. *Rozhledy v chirurgii*. 2010, **89**(1), 33-38. ISSN 0035-9351.
5. Špaček M, **Mitáš P**, Lacina L, Krajsová I, Hodková G, Salmay M, Špunda R, Brlicová L, Lindner J. Cytostatická hypertermická perfuze izolované končetiny (HILP) ve VFN. *Rozhledy v chirurgii*. 2011, **90**(1), 62-66. ISSN 0035-9351.
6. Špaček M, Petruželka L, Lacina L, **Mitáš P**, Krajsová I, Trnka J, Kubinyi J, Matějovský Z, Lindner J. Tasonermin jako součást izolované perfuze končetin. *Farmakoterapie*. 2011, **7**(5), 498-500. ISSN 1801-1209.
7. Hrubý J, Semrád M, Vidim T, **Mitáš P**, Dostál O, Skalická L, Lindner J. Výsledky kombinované chirurgické a endovaskulární léčby žilního thoracic outlet syndromu v letech 2000 – 2007 na II. chirurgické klinice VFN a 1. LF UK v Praze. *Rozhledy v chirurgii*. 2010, **89**(1), 69-72. ISSN 0035-9351.
8. Hrubý J, Novotný R, Špaček M, **Mitáš P**, Hlubocký J, Janák D, Povýšil C, Lindner J. Surgical extirpation of glomus tumor from rare localization on the upper extremity. *Case Reports in Vascular Medicine*. 2013, (Sep 25), nestránkováno. ISSN 2090-6994. DOI: [10.1155/2013/570945](https://doi.org/10.1155/2013/570945)
9. Novotný R, Hlubocký J, **Mitáš P**, Brlicová L, Lindner J. Aortic Valve Sparing Surgery: The Use of the Coroneo Extra-Aortic Annuloplasty Ring. *Medical Research Archives*. 2015, -(2), nestránkováno. ISSN 0000-0000. DOI: [10.18103/mra.v0i2.61](https://doi.org/10.18103/mra.v0i2.61)

10. Novotný R, Brlíková L, Slavíková M, Valešová J, **Mitáš P**, Hlubočský J, Lindner J. Arteriovenous graft used as a vascular access for hemodialysis: 15 years of experience. *Chirurgia*. 2015, **28**(5), 169-172. ISSN 0394-9508.
11. Trnka J, Špaček M, Šírová V, **Mitáš P**, Hodková G, Kubinyi J, Špunda R, Lindner J. Hypertermická izolovaná perfuze končetin v kombinaci s tasonerminem – technika monitorování úniku perfuzátu. *Klinická onkologie*. 2016, **29**(5), 375-379. ISSN 0862-495X. DOI: [10.14735/amko2016375](https://doi.org/10.14735/amko2016375)
12. Novotný R, Slavíková M, Hlubočský J, **Mitáš P**, Hrubý J, Lindner J. Basilic Vein Transposition Used as a Tertiary Vascular Access for Hemodialysis: 15 Years of Experience. *Open Journal of Cardiovascular Surgery [Online]*. 2016, **8**(February), 1-4. ISSN 1179-0652. DOI: [10.4137/OJCS.S34837](https://doi.org/10.4137/OJCS.S34837)
13. Novotný R, Lesenský J, Hrubý J, Hlubočský J, **Mitáš P**, Lindner J. Chondrosarcoma resection followed by a branched crural revascularization of the right calf: Case report. *Cor et Vasa*. 2016, **58**(5), e470-e473. ISSN 0010-8650. DOI: [10.1016/j.crvasa.2016.02.005](https://doi.org/10.1016/j.crvasa.2016.02.005)
14. Novotný R, **Mitáš P**, Hlubočský J, Hrubý J, Slautin A, Špunda R, Lindner J. Juxtarenal Modular Aortic Stent Graft Infection Caused by Staphylococcus aureus. *Case Reports in Vascular Medicine [online]*. 2016, **Neuveden**(January), nestránkováno. ISSN 2090-6994. DOI: [10.1155/2016/7597265](https://doi.org/10.1155/2016/7597265)
15. Špaček M, **Mitáš P**, Vočka M, Lacina L, Hodková G, Špunda R, Kodet O, Krajsová I, Petruželka L, Trnka J, Kubinyi J, Matějovský Z, Lambert L, Lindner J. Izolovaná perfuze horní končetiny s TNF- α - dvojitá kanylace žilního systému. *Klinická onkologie*. 2017, **30**(3), 213-219. ISSN 0862-495X. DOI: [10.14735/amko2017213](https://doi.org/10.14735/amko2017213)

16. Novotný R, Hlubocký J, Kovárník T, **Mitáš P**, Hlubocká Z, Rulíšek J, Gülmez SI, Ghotra SK, Lindner J. Failed TAVI in TAVI Implantation: TAVI Dislocation Followed by Ensuing Surgical Graft Resection. *Case Reports in Cardiology*. 2017, **Neuveden**(April), nestránkováno. ISSN 2090-6404. DOI: [10.1155/2017/5086586](https://doi.org/10.1155/2017/5086586)
17. Špaček M, **Mitáš P**, Hrubý J, Špunda R, Měříčka P, Lambert L, Lindner J. Composite venous allograft for femoropedal bypass grafting in critical limb ischaemia. *Cor et Vasa*. 2018, **60**(3), E317-E320. ISSN 0010-8650. DOI: [10.1016/j.crvasa.2017.03.003](https://doi.org/10.1016/j.crvasa.2017.03.003)
18. Novotný R, **Mitáš P**, Hlubocký J, Hlubocká Z, Lindner J. Surgical resection of occluded abdominal stent graft followed by aorto-bi-iliac vascular reconstruction with Intergard Synergy vascular prosthesis. *Cor et Vasa*. 2018, **60**(5), e547-e550. ISSN 0010-8650. DOI: [10.1016/j.crvasa.2017.11.003](https://doi.org/10.1016/j.crvasa.2017.11.003)
19. Grus T, **Mitáš P**, Lukáč P, Hrubý J, Lindner J, Grusová G, Lambert L. Větvený pedální bypass v léčbě kritické končetinové ischemie - zkušenosti našeho centra. *Rozhledy v chirurgii*. 2018, **97**(11), 509-513. ISSN 0035-9351.

Kapitola v monografii

1. Zeman M, Krška Z, Antoš F, Černý J, Dlouhý M, Duda M, Dvořák J, Fík Z, Grus T, Gryga A, Hlubocký J, Chovanec M, Král V, Leamerová E, Lindner J, Mazánek J, Michalský D, **Mitáš P**, Pleva L, Schwarzbacherová I, Škába R, Šnajdauf J, Špaček M, Štulík J, Šváb J, Tvrdek M, Valenta J. *Speciální chirurgie*. 3 vyd. Praha: Galén, 2014. 511 s. ISBN 978-80-7492-128-5.
2. Karetová D, Chochola M, Adla T, Ambrož D, Bělohávek J, Broulíková A, Bultas J, Dytrych V, Heller S, Herman J, Hirmerová J, Holý M, Horáková J, Hrušková Z, Charvát

F, Jansa P, Jirát S, Klika T, Knotková V, Král A, Kučera D, Kvasnička J, Lacman J, Lambert L, Lindner J, Linhart A, Lubanda J-CM, Malík J, Marek J, Matuška J, **Mitáš P**, Muchová I, Musil D, Novotný K, Pavliňák V, Piřha J, Piřhová P, Pospíšilová A, Procházka P, Ranná K, Roček M, Roztočil K, Ručka D, Spáčil J, Staffa R, Staněk F, Šmíd O, Tesař V, Vařejka P, Vidim T, Vlachovský R, Zámečník L, Zeman J, Zogala D. *Vaskulární medicína*. 1 vyd. Praha: Maxdorf, 2017. 381 s. ISBN 978-80-7345-536-1.

3. Krajsová I, Bauer J, Kodet O, Lacina L, **Mitáš P**, Plzáková Z, Procházková I, Staňková Š, Špaček M, Štork J, Šuk J, Šuková T. *Maligní kožní nádory: průvodce diagnostikou a léčbou nemelanomových kožních nádorů a melanomu*. 1 vyd. Praha: Mladá fronta, 2017. 287 s. ISBN 978-80-204-4186-7.