

# Univerzita Karlova

## 1. lékařská fakulta

Postgraduální doktorské studium v biomedicině

Oborová rada: Experimentální chirurgie

předseda: prof. MUDr. Zdeněk Krška, DrSc.



UNIVERZITA KARLOVA  
1. lékařská fakulta

**MUDr. Petr Mitáš**

## **Vývoj třívrstvé cévní protézy pro nízké průtoky**

## **Development of vascular substitutes for low flow peripheral vascular reconstructions**

Dizertační práce

Školitel: MUDr. Miroslav Špaček, PhD.

Školitel – konzultant: doc. MUDr. Tomáš Grus, Ph.D.

Praha, 2020

## **Čestné prohlášení**

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

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

V Praze dne 15.1.2020

---

MUDr. Petr Mitáš

MITÁŠ, Petr. *Vývoj třívrstvé cévní protézy pro nízké průtoky. [Development of vascular substitutes for low flow peripheral vascular reconstructions]*. Praha, 2020. Počet stran 105, počet příloh 3.

Dizertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, II. chirurgická klinika kardiiovaskulární chirurgie. Vedoucí práce Špaček, Miroslav

## SOUHRN

Vývoj cévní náhrady pro nízké průtoky je aktuální otázkou. Model hledání vývoje náhrady optimálních vlastností, který vychází z myšlenky převzetí charakteristiky biologického modelu – veny safeny, a naprogramování těchto vlastností do modelu konstruované náhrady, je jedním z možných směrů vývoje. Představovaná náhrada, která je výsledkem práce autorského kolektivu doktoranda, se skládá ze tří částí – nevstřebatelného scaffoldu představujícího medii, a dvou vstřebatelných kolagenních 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. Klíčovou otázkou je technologie výroby kolagenní vrstvy protézy. I další postupy výroby však mohou mít nezanedbatelný vliv na vlastnosti cévní protézy – mezi takové patří tvrzení kolagenu, antitrombogenní ošetření vnitřního povrchu cévní náhrady a použití metody sterilizace.

Autor se zabývá problematikou vývoje nové kolagenní 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  $297 \pm 118$  ml/min na  $158 \pm 159$  ml/min ( $p=0.041$ ) po uplatnění arteficiální stenozy, a stejně tak od  $330 \pm 164$  ml/min na  $97 \pm 29$  ml/min ( $p=0.0052$ ) ve skupině B ( $p=0.27$  mezi oběma skupinami). Ve skupině A došlo u přeživších pěti ovčí k uzavěru dvou cévních protéz a to 3 a 14 den od implantace. Ve skupině B, z šesti přeživších ovčí, 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.

**KLÍČOVÁ SLOVA:** Kolagenní cévní protéza, protéza pro nízké průtoky inflačně extenzní test, zesílení, kompozitní trubice, ovce, umělá cévní náhrada

## SUMMARY

The development of vascular replacement for low flow rates is a topical issue. The model for developing the development of replacement properties, which are based on the idea of assuming the characteristics of the biological model - vena saphena and programming these properties into a model of constructed replacement is one of the possible directions of development. 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 pseudoadventice. 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. The key issue is the technology of producing the collagen layer of the prosthesis. However, other manufacturing processes can also have a significant impact on vascular prosthesis properties, such as collagen hardening, antithrombogenic treatment of the inner surface of the vascular replacement, and the use of a sterilization method.

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  $297 \pm 118$  ml / min to  $158 \pm 159$  ml / min ( $p = 0.041$ ) after application of artificial stenosis, as well as from  $330 \pm 164$  ml / min to  $97 \pm 29$  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.

**KEY WORDS:** Collagen based vascular graft, low-flow graft, inflation-extension text, crosslinking, composite tube, sheep, artificial blood vessel

## **PODĚKOVÁNÍ**

Poděkovat bych chtěl především mému školiteli MUDr. Miroslavu Špačkovi, PhD. a školiteli-konzultantovi doc.MUDr. Tomáši Grusovi, Ph.D., kteří mi umožnili podílet se na řešení grantového úkolu a vedli projekt, jehož součástí je i předložená práce. Dále bych chtěl poděkovat prof. MUDr. Jaroslavu Lindnerovi, CSc., který mne v průběhu celého studia nemalou měrou podporoval a pomohl sloučit odbornou práci s výzkumem a studiem. MUDr. Mikuláši Mlčkovi, PhD. bych rád poděkoval za pomoc při realizaci experimentů/operací a další péči o experimentální zvířata v prostorách Fyziologického ústavu 1. LF UK. V neposlední řadě bych rád poděkoval zesnulému doc. MUDr. Milanu Krajíčkovi, DrSc., kdy spolupráce s ním byla velkou inspirací a jehož práci můžeme dále rozvíjet. Za technickou pomoc chci poděkovat Mgr. Lence Pluhařové a Ing. Jaromíru Fichtlovi.

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK (seřazeno abecedně)

ANOVA	analysis of variance, metoda matematické statistiky
AEL	Neionogenní tenzid (roztok v kterém byl připravován scaffoldu)
bFGF	růstový faktor fibroblastů
°C	stupeň Celsia
CN	alternativní cévní náhrada = extrudovaná kolagenní trubice s integrovaným scaffoldem
D-, L-	pravo-, levo- točivá struktura
DEMI	demineralizovaná voda (purifikovaná)
EDC	N-(3 dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimid hydrochlorid
ELFO	elektroforéza
ePTFE	expandovaný polytetrafluorethylen
FGF-1	růstový faktor fibroblastů – 1
FTIR	infračervená spektrometrie
g	gram
H & E	barvení preparátu (hematoxilin-eozin)
IF	impakt faktor
Kolagenní materiál:	
SIGMA	kolagen typu I., krysí ocas
CTU	kolagen typu I., rybí kůže
IRSM	kolagen typu I., rybí kůže izolován ÚSHM
kPa	kilopascal
KTN	extrudované kolagenní trubice nesterilní
KTS	extrudované kolagenní trubice sterilní
M	mililitr, litr
mol ml, l	
MES	2-morfolinosulfonová kyselina
min	minuta
mikroCT	vyšetření výpočetní tomografií mikro rozlišení (experimentální)
mmHg	milimetr rtuťového sloupce
mm, cm, m	milimetr, centimetr, metr
MWCO	Molecular Weight Cut Off – nejnižší molekulová hmotnost testovacího polymeru (kDa)
NO	oxid dusnatý
NHS	N-hydroxysuccinimid
PCL	polykaprolakton
PE	polyethylen
PES vlákno	polyesterové vlákno
PEG	Polyethylen glykol
PLA	polylactic acid
PLGA	polylactic-co-glycolic acid
PMS Steripack	obal pro zatavení protézy
PVA	polyvinyl alkohol
PVC	polyvinylchlorid
PTFE	polytetrafluorethylen
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti detergentu SDS
TDA	Typ polyesterového vlákna použitého k pletení scaffoldu
UV- Vis spektrometrie	Ultrafialovo-viditelná spektroskopie
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor

VUP  
ÚSMH AV ČR (IRSM)

Ts  
TUL

Výzkumný ústav pletářský  
Ústav struktury a mechaniky hornin, Akademie věd České  
republiky  
teplota smrštění  
Technická univerzita Liberec



# 1. OBSAH

1. OBSAH.....	8
1. ÚVOD .....	11
1.1. Historický úvod .....	11
1.2. Vlastní koncepce cévní náhrady .....	12
1.3. Současný stav poznání.....	13
1.3.1. Komerčně používané syntetické nebiodegradovatelné materiály .....	13
1.3.2. Komerčně používané biodegradovatelné materiály .....	13
1.3.3. Přehled používaných metodik pro konstrukci cévních náhrad .....	13
1.3.4. Biopolymerní implantáty a implantáty připravené metodami tkáňového inženýrství .....	14
1.3.5. Testované syntetické materiály pro konstrukci cévních náhrad .....	15
2. METODIKA KONSTRUKCE PROTOTYPU NOVÉ CÉVNÍ PROTÉZY .....	17
2.1. Vytvoření a testování pleteného scaffoldu s použitím nového vlákna .....	17
2.2. Porozita pleteného scaffoldu cévní náhrady pro nízké průtoky.....	20
2.3. Výroba nosného scaffoldu protézy.....	23
2.4. Pseudointima a pseudoadventicie – kolagenní vrstvy .....	24
2.5. Kolagen .....	25
2.6. Kolagen, jeho extruze z různých živočišných druhů a porovnání imunitní reakce, která upravený kolagen vyvolává při implantaci do jiného živočišného druhu (imunogenicita kolagenu).....	26
2.7. Přehled charakteristik typického čistého bovinního kolagenu .....	28
2.8. Rybí kolagen .....	30
2.9. Antitrombogenní ošetření vnitřního povrchu cévní náhrady.....	31
3. VÝSLEDKY - TESTOVÁNÍ, ANALÝZY .....	32
3.1. Testování fyzikálních vlastností biologických cévních náhrad.....	32
3.2. Testování kompozitních celků .....	32
3.3. Analýza rybího kolagenu – třeboňský kapr .....	33
3.3.1. FTIR analýza sekundární struktury kolagenových vzorků.....	33
3.3.2. Elektroforetická analýza kolagenových vzorků .....	36
3.3.3. Návrh heparinizace kolagenových materiálů a způsobu analýzy uvolňování .....	38
3.3.4. Shrnutí analýz kolagenní hmoty .....	39
3.4. Analýza účinků vybraných technologických procesů na kolagenní hmotu .....	39
3.4.1. Extrudovaná kolagenní hmota, vznik anizotropie, vliv dávky radiace.....	39
3.4.2. Analýzy vybraných technologických postupů u testovaných vzorků KTN, KTS, CN.....	41
3.5. Výroba kolagenu ze sladkovodních ryb .....	43
3.6. Konstrukce cévních protéz s využitím rybího kolagenu sladkovodních ryb a technologické zvládnutí impregnace kompozitních cévních protéz rybím kolagenem.....	44
3.6.1. Technologický proces extruze .....	45
3.6.2. Technologický postup vytvrzování (síťování) protéz .....	47

3.6.3.	Technologický postup - měkčení protéz.....	48
3.6.4.	Balení protéz.....	48
3.6.5.	Radiační sterilizace a transport .....	48
4.	VÝSLEDKY – EXPERIMENT NA VELKÝCH LABORATORNÍCH ZVÍŘATECH.....	48
4.1.	Implantace cévních protéz experimentálním zvířatům.....	48
4.2.	Shrnutí výsledků experimentu na velkých laboratorních zvířatech: .....	57
4.3.	Explantované cévní protezy – mikroskopické nálezy .....	64
4.4.	Vytvoření finálních technologií.....	69
5.	DISKUSE .....	70
6.	ZÁVĚR .....	71
7.	LITERATURA .....	73
8.	VLASTNÍ PUBLIKAČNÍ AKTIVITA .....	80
8.1.	Publikace se vztahem k tématu dizertační práce .....	80
8.2.	Ostatní publikace v časopisech s IF .....	80
8.3.	Publikace bez IF, v časopisech s recenzním řízením .....	82
8.4.	Kapitola v monografii .....	84
9.	PŘÍLOHY .....	85

## **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.

# 1. ÚVOD

## 1.1. Historický 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 (Blakemoore AH, Voorhees AB Jr., 1954). Tento základní průlom byl následován dynamickým vývojem a konstrukcí škály cévních protéz z různých materiálů, různých charakteristik a rozměrů, takže je bylo možno použít téměř ve všech anatomických oblastech tepenného systému.

Obecnou nevýhodou cévních protéz je nízká průchodnost v případě nízkého průtoku rekonstrukce, limitem jsou průtoky nižší než 100–200 ml/min. Druhou zásadní nevýhodou je citlivost polyesterového vlákna vůči infekci. Na základě dlouhodobých zkušeností s cévními náhradami vycházejí autoři z představy, že klíčovou charakteristikou pro úspěch žilního autotransplantátu v tepenných oblastech s nízkým průtokem jsou její fyzikální vlastnosti, které umožňují dokonalé technické provedení anastomóz a též umožňují náhradě přizpůsobit se průtokovým a tlakovým poměrům v rekonstruovaném tepenném úseku (Kakisis JD et al., 2005; Kannan RY et al., 2005; Chlupáč J. et al., 2009; Heyligers JMM et al., 2005; Berglund JD et al., 2003). Přibližování vlastností syntetických cévních náhrad biologickým autologním materiálům je tedy jednou z možných cest vývoje.

## 1.2. Vlastní koncepce cévní náhrady

Současně používané cévní náhrady mají z obecného hlediska několik nevýhod, kterým se v průběhu konstrukce našeho prototypu budeme snažit vyhnout. Mezi tyto obecné nevýhody řadíme zejména:

- 1) Omezené užití pro oblasti nízkého průtoku – tepny bérce, koronární tepny
- 2) Možnost imunologické odpovědi organismu, poruchy vhojování
- 3) Vnímavost k infekci cévní protézy s nutností odstranění materiálu z těla
- 4) Problematika hyperplazie v anastomosách
- 5) Problematika tromboz cévní protézy

Mezi základní požadavky na cévní náhrady patří biokompatibilita, vhodné mechanické vlastnosti – dostatečná pevnost a viskoelastické vlastnosti podobné jako nativní cévy a schopnost adaptace na měnící se podmínky krevního průtoku. Dalším nezbytným požadavkem je nízká trombogenicita vnitřního povrchu cévních náhrad (Sarkar S. et al., 2006). Nejnáročnější požadavky jsou na cévní náhrady s malým průtokem a malým průměrem, které jsou velmi náchylné k uzávěru v důsledku intraluminální nástěnné trombozy. V současné době nejsou na trhu skutečně spolehlivé syntetické cévní náhrady pro tyto malé průtoky pohybující se pod 150ml/min. Chan-Park a spol. (Chan-Park MB et al., 2009) popisují postupy tkáňového inženýrství vedoucí k požadovaným vlastnostem cévních náhrad. Diskutují zde i požadavky na biodegradovatelné materiály.

Cévní náhrady s malým průtokem jsou naléhavě vyžadovány zejména pro pacienty s potřebou náhrady infragenikulárních cév. Současné terapie zahrnují použití autologních cév a syntetických náhrad (Nerem RM, 2000; Nerem RM, 2003; Nerem RM, 2004; Nerem RM, Seliktar D., 2001). Požadovanými mechanickými vlastnosti infrainguinálních bypassů se zabývá publikace Sarkarova (Sarkar S. et al., 2007). Ideální biomateriál pro tuto oblast tkáňového inženýrství by se měl mechanickými vlastnostmi blížit nativním cévám, ale také podporovat buněčný růst, podporovat produkci extracelulární matrix a inhibovat trombogenicitu (Ravi S., Chaikof EL, 2010). Kaibara popsali metodu in vitro hodnocení trombogenicity biomateriálů (Kaibara M. et al., 1995).

Naše koncepce prototypu cévní náhrady je konstruovat prototyp cévní náhrady, který se jak stavbou, tak i fyzikálně-chemickými vlastnostmi bude blížit humáním cévám. 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 dvěma vstřebatelných vrstev

zevní a vnitřní z biologického materiálu (pseudointima a pseudoadventicie). Vzájemně však jsou tyto vrstvy propojeny mezi sebou, aby nedošlo k jejich separaci při implantaci do tepenného řečiště.

### **1.3. Současný stav poznání**

Při důkladné literární rešerši jsem se zaměřil zejména na přehled používaných materiálů a jednotlivých metodických postupů používaných v současnosti ke konstrukci cévních protéz. V níže uvedeném přehledu jsou zahrnuty nejmodernější pohledy na danou problematiku, včetně metod tkáňového inženýrství a příslušných literárních odkazů.

#### **1.3.1. Komerčně používané syntetické nebiodegradovatelné materiály**

Harrison publikoval přehled a srovnávací studii syntetických materiálů komerčně využívaných pro výrobu cévních protéz s velkým průměrem – nylonu, Dacronu, Orlonu, Ivalonu (PVAc) a teflonu (Harrison JH, 1958, Roll YP et al., 2008). Mezi komerčně využívané syntetické nebiodegradovatelné materiály patří také polytetrafluoroethylen (PTFE), různé typy polyesterů, či GORETEX. Jsou to rigidní materiály, které jsou nevhodné pro konstrukci cévních náhrad s malými průtoky (Tiwari A. et al., 2002). Schutte a Nerem publikovali podrobný přehled materiálů, používaných pro výrobu cévních protéz, včetně přehledných tabulek použitých materiálů s odkazy na publikace (Schutte SC, Nerem RM 2013).

#### **1.3.2. Komerčně používané biodegradovatelné materiály**

Nejčastěji využívaný biopolymer pro konstrukci cévních náhrad je kolagen. Použití kolagenu pro výrobu cévních náhrad a v dalších oblastech rekonstrukční medicíny bylo popsáno v přehledu - níže (Khan R. et al., 2011).

#### **1.3.3. Přehled používaných metodik pro konstrukci cévních náhrad**

Pro přípravu biologicky funkčních cévních náhrad se v současné době testuje celá řada postupů a materiálů. Mezi tyto metody patří konstrukce cévních náhrad s použitím přírodních gelů a syntetických tzv. skafoldů, osídlených živými buňkami cévních tkání a bezbuněčné techniky (Shaikh FM et al., 2008). Son a Kim popisují přípravu polymerních skafoldů s mikrostrukturovanými povrchem s použitím 3D tisku (Son J., Kim G., 2009). Využitím postupů 3D tisku („rapid prototyping“) pro účely tkáňového inženýrství se zabývají i další publikace (Peltola SM et al., 2008). Sarkar a spol. použili pro výrobu cévních náhrad s nízkým průtokem z nanokompozitního polymeru,

obsahujícího polykarbonát uretan a polyhedrální oligomerní silsesquioxan, novou metodu automatické extruze („extrusion-phase-inversion method“) (Sarkar S. et al., 2009).

Vyrobené vzorky měly dobré antitrombogenní vlastnosti a biostabilitu. Lovett a spol opakovaně popsali postup výroby tkáňových náhrad z hedvábného fibroinu metodou nástřiku vláken z gelu na rotující hřídel („gel spinning“) (Lovett M. et al., 2008; Lovett M. et al., 2010). Vyrobené cévní náhrady při in vitro i in vivo testování předčily v některých aspektech komerční PTFE cévní protézy. Singha publikoval přehled metod a materiálů pro výrobu cévních protéz v komerční i výzkumné sféře (Singha K., Singha M. 2012). Chaouat a spol. popsali přípravu PVA cévních náhrad pro malé průtoky prostým nabalováním materiálů z roztoku na teflonovou tyčinku. (Chaouat M. et al., 2008) Možnostmi využívání nanovláknenných struktur vyrobených elektrostatickým zvlákňováním pro konstrukci cévních protéz se zabývají v přehledové publikaci Kizildag a Yalcin (Kizildag N., Yalcin P., 2012). Vaz a spol. popsali konstrukci cévních protéz s morfologickou architekturou napodobující nativní cévy s použitím postupného ukládání různě orientovaných PLA a PCL nanovláken, připravených elektrostatickým zvlákňováním, na sběrač ve formě rotujícího hřídele. (Vaz CM et al., 2005)

Konstrukce cévních protéz s použitím kombinované technologie elektrostatického zvlákňování a zvlákňování tavenin kopolymeru L-laktidu a kaprolaktonu je popsána v článku Chunga a spol. (Chung S. et al., 2010). Widmer a spol. použili k výrobě tubulárních skafoldů směsi PLGA a PLA technologii extruze. (Widmer MS et al., 1998). Skardal a spol. použili pro konstrukci cévních náhrad z hydrogelů kyseliny hyaluronové, síťovaných tetrahedrálními PEG tetraakryláty, postupy 3D tisku. (Skardal A. et al., 2010). Pro výrobu cévních náhrad byly použity i postupy elektrohydrodynamické atomizace (Stankusa JJ et al., 2007). Lee a spol. použili pro přípravu biomateriálů pro cévní protézy polymer připravený kondenzační polymerací kyseliny jablečné a 1,12 – dodekandiolu a metodu výroby pěn superkritickým oxidem uhličitým. (Lee LY et al., 2009).

#### **1.3.4. Biopolymerní implantáty a implantáty připravené metodami tkáňového inženýrství**

Kannan publikoval výčet nových úspěšně testovaných materiálů pro konstrukci cévních náhrad biologického i syntetického původu, pro využití zejména u bypassů (Kannan RY et al., 2005). Kakou publikoval přehled materiálů testovaných pro konstrukci tzv. skafoldů pro cévní tkáňové inženýrství (Kakou A. et al., 2007). Některé z nich jsou využívány i komerčně, např. kolagen. Mezi intenzivně zkoumané biomateriály biologického původu patří také bílkovina fibrin, která se, podobně jako kolagen, vyskytuje v nativních cévách. Fibrin má výborné mechanické vlastnosti i biokompatibilitu, nevýhodou je vysoká cena. Možnostmi využití chitosanu v oblastech tkáňového inženýrství a

regenerativní medicíny se zabývají v přehledové publikaci (Jiang T. et al., 2008). Aplikaci kyseliny polymléčné pro výrobu plně resorbovatelných stentů popisuje van Aalst a spol. (Van Aalst M. et al., 2009). Nové trendy v oblasti tkáňového inženýrství souhrnně popisují Nemen-Guanzon a spol. (Nemen-Guanzon JG et al., 2012). Nadějně výsledky při testování cévních protéz pro malé krevní průtoky, připravených z biodegradovatelného chitosanu, popisuje recentně Kong a spol. (Kong X. et al., 2012). Vrana a spol. testovali vliv střihového stresu na endotelizované kompozitní hydrogely, připravené z PVA a želatiny (Vrana NE et al., 2010). Elastin je klíčovou bílkovinou strukturální matrix, poskytující ji elasticitu. Kromě toho má řadu regulačních funkcí a ovlivňuje buněčné fenotypy a aktivity. Funkce elastinu byla prozatím v cévním inženýrství většinou podceňována (Patel A. et al., 2006). Koens a spol. popsali postup výroby 3 vrstevných cévních graftů obsahujících kolagen a elastin (Koens MJW et al., 2010).

Ravi a Chaikof publikovali přehled biomateriálů používaných pro tkáňové inženýrství cév. Ideální biomateriál pro tuto oblast tkáňového inženýrství by se měl mechanickými vlastnostmi blížit nativním cévám, ale také podporovat buněčný růst, podporovat produkci extracelulární matrix a inhibovat trombogenicitu (Ravi S., Chaikof EL, 2010). Jiný přehled materiálů pro tkáňové inženýrství cév byl publikován autorským kolektivem Jaroslava Chlupáče v ČR (Chlupáč J. et al., 2009). Bakteriální celulózu pro přípravu cévních náhrad pro mikrochirurgii použili Klemm a spol. (Klemm D. et al., 2001). Možnosti využití bakteriální celulózy pro konstrukci cévních náhrad, zejména z hlediska interakce tohoto biopolymeru s krví a endoteliálními buňkami. Tkáňovým inženýrstvím cév s nízkými průtoky a používanými biomateriály se v přehledovém článku zabývají Heyligers (Heyligers JMM et al., 2005). Velmi perspektivním materiálem pro konstrukci cévních náhrad s malým průměrem je hedvábný fibroin (Lovett M. et al., 2007). A konečně Xiang a kol. (Xiang P. et al., 2011) použili pro přípravu tubulárních skafoldů kompozitní nanovlákná, obsahující rekombinantní bílkovinu pavoučího hedvábí, PCL a želatinu.

### **1.3.5. Testované syntetické materiály pro konstrukci cévních náhrad**

Přehled syntetických biomateriálů používaných pro cévní tkáňové inženýrství publikoval Schmedlen (Schmedlen RH et al., 2003). Tiwari a kol. publikoval přehledovou publikaci zaměřenou na možnost využití nebiodegradovatelných polyuretanových materiálů při konstrukci cévních náhrad s malým průtokem (Tiwari A. et al., 2002). Tento typ materiálů se jeví jako velmi perspektivní. Relativně novým biomateriálem testovaným pro konstrukci cévních náhrad jsou oligomerní nanokompozity silsesquioxanu (Solouk A. et al., 2011; Cozza ES et al., 2012). Domurado a kol již před řadou let ukázali, že vlastnosti pletených cévních náhrad z Dakronu, včetně osídlení protéz buňkami a vývoje kolagenového opouzdrnění, byly zlepšeny impregnací albuminem (Domurado D. et al., 1978).



Schneider a kol popisují postup úpravy goretexových cévních náhrad s pomocí fibrinu a/nebo exocelulární matrix, s následným osídlením buněk z endotelu hovězí aorty (Schneider A. et al., 1993).

Využitím potenciálně biodegradovatelných PVA hydrogelů pro konstrukci cévních protéz se zabývá v disertační práci T. Elshazly (Elshazly T., 2004). Izhar a kol testovali s velmi dobrými výsledky cévní protézy s nízkým průtokem, připravené z PU vláken (Lycra) s biodegradovatelným potahem PELA (poly(ethylene glycol)/poly(lactic acid) (Izhar U., et al. 2001). Niekraszewicz zlepšovali vlastnosti cévních protéz připravených z polyesterové pleteniny impregnací polymerem poly [D,L-(laktid-ko-glykolid)] (Niekraszewicz A. et al., 2009). Fiorica a kol. připravili skafoldy z kompozitních kopolymerních PE-PA vláken připravených elektrostatickým zvlákňováním a na jeho povrchu imobilizovali heparin (Fiorica C. et al., 2012). Heparin váže několik růstových faktorů, včetně vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF) a růstového faktoru pro fibroblasty (bFGF) a zvyšuje tak osídlení biomateriálů příslušnými buňkami a zlepšuje jejich proliferacifunkcionalizovali fyzikálně síťovaný PVA fibronectinem s cílem zlepšit buněčnou adhezi s proliferací vepřových arteriálních a vaskulárních endoteliálních buněk (Millon IE et al., 2012).

Účinnost funkcionalizace byla experimentálně potvrzena. Choi a kol. funkcionalizovali ePTFE skafoldy porézní vrstvou biodegradovatelného PLGA s použitím uhličitanu amonného, jako porogenu (Choi Y-J, Noh I., 2005). Pro zlepšení tkáňové regenerace byl PLGA povrch ještě potažen vrstvou želatiny. Huanga a kol. použili prostorově uspořádanou síť nanovláken kolagenu, chitosanu a termoplastického polyuretanu, připravenou elektrostatickým zvlákňováním s následným síťováním glutaraldehydem, s cílem napodobit strukturu nativní extracelulární matrix (Huanga CH. et al., 2011). Testy ukázaly dobrou biokompatibilitu skafoldů. Prostorové uspořádání nanovláken ovlivňuje buněčnou morfologii. Greislertt impregnovali ePTFE graft fibrinovým lepidlem, obsahujícím FGF-1 růstový faktor a heparin. Autorům se tímto způsobem podařilo zvýšit proliferaci endoteliálních buněk a buněk hladkého svalstva po implantaci cévních náhrad psům (Greislertt HP et al., 1996).

Mezi nevýhody popisovaných řešení patří především cena a nedostupnost větší části popisovaných cévních náhrad v klinické praxi. U biomateriálu zajišťujících vyšší proliferaci endoteliálních buněk a buněk hladkého svalstva chybí dlouhodobé ověření průchodnosti v klinické praxi, ve vztahu k možné hyperplazii a částečné obliteraci průtočného lumina, zejména u protéz určených pro oblasti s nízkými průtoky.

## 2. METODIKA KONSTRUKCE PROTOTYPU NOVÉ CÉVNÍ PROTÉZY

### 2.1. Vytvoření a testování pleteného scaffoldu s použitím nového vlákna

Celý vývoj cévních protéz započatý v šedesátých letech charakterizovaný hledáním stále nových typů cévních náhrad je v současné době vázán zejména na nové typy materiálů. V posledních letech od vzniku PTFE litých cévních náhrad kombinovaných na svém povrchu s pleteninou, jako by stagnoval. Vyjímku snad tvoří v současné době ojedinělé pokusy vývoje cévních protéz za použití nanovláken, které však jsou zatím ještě v počátcích. Vývoj, jak vypadá, se zcela odklonil od klasického pojetí samonosné vstřebatelné kolagenní trubice se zevně umístěnou polyesterovou pleteninou. My jsme se snažili naopak tento klasický, dobře fungující a léty vyzkoušený model kolagenní trubice s pleteným scaffoldem obohatit o nové materiály a nové technologie.

Základem cévní protezy je ve většině případů vlákno, které se vyznačuje celou řadou fyzikálních, chemických a dalších charakteristik, které ovlivňují chování protézy, která je z něho vyrobena. Mezi zcela zásadní vlastnosti patří mechanické charakteristiky vlákna, zejména pak zachování trvalé pevnosti. Pokud dojde v důsledku dlouhodobého zatěžování intraluminálním tlakem a velkého množství pulzových vln k přechodu z oblasti elastické deformace vlákna do trvalé deformace dochází ke snížení pevnosti použitého vlákna což je spojeno se vznikem výdutí nebo ruptury, jak jsme mohli pozorovat u cévních protez vyráběných v minulosti.

Místo klasického polyesterového polyfilního vlákna běžně používaného k výrobě pleteného scaffoldu současných cévních protéz jsme použili zcela nové vlákno monofilní polyesterové. Původnímu vláknu, které jsme používali na pletení scaffoldu pro Cybergraft, vypršela certifikace a dodavatelská firma přestala vlákno vyrábět, proto jsme byli nuceni vlákno, které bylo relativně dobré, vyměnit a najít jinou alternativu. Naším cílem bylo najít především vlákno s lepší pružností, pevností, kdy ani při delším namáhání nedochází k jeho trvalé deformaci, které je biokompatibilní není cytotoxické, není kancerogenní, nemá dráždivé účinky na kůži, minimálně absorbuje vodu a zejména povrch vlákna je absolutně hladký. Právě hladký povrch vlákna nevyvolává dráždění okolních tkání, které bývá doprovázeno celulární reakcí včetně jizvení různého rozsahu. Toto jizvení, zejména v oblasti anastomozy v podobě neointimální hyperplasie posléze vede ke vzniku významné stenózy až uzávěru cévní protezy.

Neméně důležitý je i průměr a struktura vlákna, která může bránit pohybu látek mezi lumenem protezy a neoadventicií, kde mluvíme o takzvaných perfuzních stínech. Tyto perfuzní stíny poté zhoršují vhojování cévní protezy, vedou k regresivním změnám buněk, nahromadění lipidů a často až vzniku kalcifikací po obou stranách vlákna. Většina v současnosti používaných vláken je

polyfilamentových, kde v prostorech mezi filamenty vlákna se hromadí odpadní produkty metabolismu v důsledku nemožného průniku buněk do těchto prostor, které by tyto odpadní látky eliminovaly, a dochází tak k následné iritaci okolí se všemi patogenetickými následky. Právě z těchto důvodů považujeme za optimální vlákno monofilní s dokonale hladkým povrchem a určitou pružností, umožňující alespoň částečný přenos pulzové vlny, což hraje významnou roli v tlakové ztrátě zejména u protéz delších 40 cm s nízkým průtokem pod 200 ml/min. Po poměrně složitém výběru bylo vybráno vlákno polyesterového monofilu o průměru 34  $\mu\text{m}$  připraveného elektrospínáním.

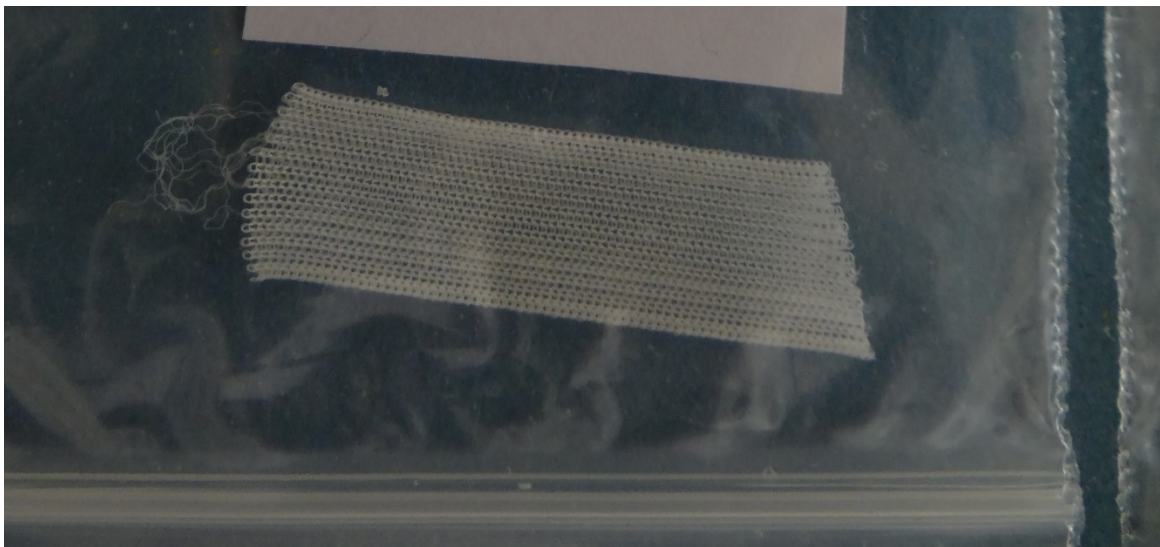
Z námi vybraného vlákna na základě celé řady testů pod technickým označením TDA jsme nechali naplést velmi tenký pletený scaffold s určitou porozitou, kde z důvodů patentové ochrany udáváme jen interval: minimální hranice porozity 5000 a dolní hranice optimální porozity maximálně do 10 000 ml  $\text{H}_2\text{O}/\text{cm}^2/\text{min}/120\text{mmHg}$ . Je nutné si uvědomit, že správná porozita tkaniny je důležitý předpoklad prorůstání tkáně do pleteného scaffoldu a vede tak k optimálnímu vhojení protezy do organismu. Neméně důležitá je i fixace pseudointimy, ze které se později vyvíjí neointima a která se přes oka pletenného scaffoldu postupně spojuje s neoadventicií jinak neustále přetrvává riziko odloupení („disekce“) této vnitřní výstelky se všemi důsledky.

Pletené protézy mají sice vyšší porozitu oproti protézám tkaným, ale po sestřížení nedochází k třepení okrajů protézy, což je výraznou výhodou u tepen malého kalibru, kde lze steh zakládat velmi blízko sestříženému okraji, aniž by docházelo k jeho prořezávání. Vyšší porozitu u pletených protéz eliminujeme impregnací pleteniny kolagenem s různou dobou vstřebávání a různým stupněm vytvrzení a měkčení, čímž je zaručena určitá flexibilita protezy při ohybu.



*Obr.1: Způsob pletení nevstřebatelné střední vrstvy prototypu cévní protézy*

Pletenina našeho prototypu cévní protézy o průměru 5 mm byla vyrobena ve spolupráci s textilní univerzitou v Liberci – TUL z monofilního PES vlákna, parametr pletení: 16 jehel, 32 smyček. Před vlastním použitím byla promočena a vyprána v roztoku s 4 g / l AEL, 0,5 g / l  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  při 80 ° C po dobu jedné hodiny a promyta v chloroformu z důvodu odmaštění pleteniny. Následně byla po vysušení fixována na nerezovém trnu (průměr 5 mm) při teplotě 145 °C po dobu 15 minut nebo 160 °C po dobu 10 min.



*Obr.2: Detail pleteného scaffoldu pro prototypy cévních protéz z rybího kolagenu*

Tento polyesterový scaffold vytváří trvalou oporu zbylých vstřebatelných vrstev kompozitní kolagenové trubice a umožňuje postupné vrůstání okolní tkáně do pleteného scaffoldu po odbourání

zevní kolagenové vrstvy v řádech několika týdnů, která vyplní pory v postupně se obnažující pletenině. Vlákno a vytvořený pletený scaffold jsme podstoupili celé řadě testování – viz níže.

Nicméně z dosažených zkušeností vyplývá, že stále tato původní technologie pletení a nové poznatky jak v oblasti používaných materiálů či vylepšením technologických postupů má své nezaměnitelné místo v konstrukci nových cévních náhrad.

## **2.2. Porozita pleteného scaffoldu cévní náhrady pro nízké průtoky**

Naším záměrem bylo vytvořit prototyp alternativní cévní protézy s ohledem na akceptaci hemodynamických a mechanických podmínek při nízkých průtocích krve pod 100 ml/min. Důraz byl kladem zejména na eliminaci tlakových ztrát při pulzačním toku krve a jistou elasticitu, poddajnost protézy, zejména v obvodovém směru. Tohoto bylo docíleno kompozitní strukturou stěny protézy a technologií výroby. Intimální část náhrady je velmi hladká. Nosná část protézy, její mediální část, je tvořena speciální pleteninou integrovanou do matrice tvořenou modifikovanou kolagenní hmotou. Konstrukce, technologie výroby a následné úpravy této cévní protézy generují vlastnosti, které této kompozitní trubici propůjčují určitou schopnost přenosu pulzní vlny a tím snižují i výše zmíněnou tlakovou ztrátu a riziko tvorby intraluminálního uzávěru. V oblasti anastomóz dochází k velmi dobrému hojení.

Pletení je vzájemné proplétání kliček a oček pro vytvoření pleteniny. Zátěžné pleteniny vznikají postupným provlékáním niti vazebními prvky ve směru řádků. Polyesterová trubice byla upletena na plochém dvoulůžkovém pletacím stroji s dělením 30E.

Mimo biokompatibility polyesterového monofilního vlákna je důležitým parametrem pleteniny schopnost zachovat pevnost a neméně pak také porozita. Porozita bývá vyjádřena číselně (0-1) nebo jako množství vody procházející skrz jeden centimetr náhrady za jednotku času při standardním tlaku, tzv. propustnost (ml/cm<sup>2</sup>/min/120 mm Hg).

Porozita je ovlivněna počtem vláken, jejich průměrem, nastavením parametrů pletení na pletacím stroji a vlastnostmi kolagenu použitého k uzavření porů mezi vlákny. Kolagen je nanášen pro snížení porozity a také pro rychlejší osídlení stěny trubice buňkami. Poměrně brzy, během týdnů, je kolagen odbourán a nahrazen vlastní tkání. Ideální kolagen je neantigenní, u rybího kolagenu je proto předpoklad pro dobré vhojení.

Pletené náhrady mají větší rozsah porozity než náhrady tkané. Porozita ovlivňuje propojení vnější stěny, organizaci lumenálního povrchu, a podporuje prorůstání tkání, které náhradu obklopují. Vysoká

porozita znamená vyšší riziko krvácení. Velké póry také omezují pevnost pleteniny, zvyšují riziko vzniku výdutí. Optimální porozita kombinuje v sobě dobrou manipulovatelnost, pevnost trubice i vytvoření vhodných podmínek pro potažení stěny cévy fibroblasty.

V našem experimentu jsme použili 4 typy vzorků pletení a technologické upravy nevstřebatelné prostřední vrstvy – pseudomedie:

#### Popis vzorků:

K analýze byly předloženy čtyři tubulární pleteniny s označením:

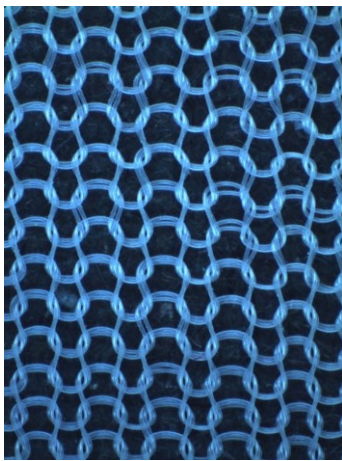
- průměr 5mm původní
- průměr 5mm praná\_fix
- průměr 5mm\_nepraná
- průměr 5mm\_praná

#### Výsledky měření:

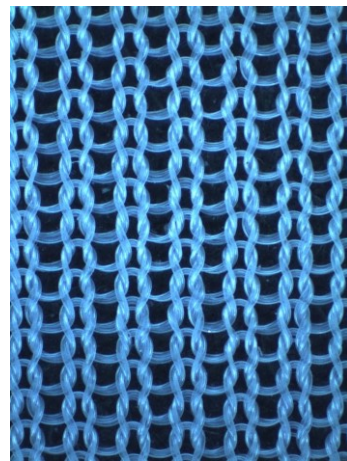
Z každého vzorku tubulární pleteniny bylo nasnímáno deset obrazů. U standardního měření je potřeba nasnímat alespoň sto obrazů, aby mohly být výsledky prezentovány s určitou statistickou platností. V našem případě byly k dispozici jen malé vzorky (okolo 2 cm) a z nich nelze nasnímat více obrazů. Data byla i tak statisticky zpracována. Níže jsou uvedeny průměrné hodnoty porosity doplněné o interval spolehlivosti na hladině významnosti 0,05. Pro ilustraci jsou uvedeny obrazy zachycující vzhled struktury předložených jedolících pletenin.

Označení	Celkový počet oček	Porosita [-]	Interval spolehlivosti
průměr 5 mm stará	24	0,59	0,585 – 0,604
průměr 5mm praná fixovaná	28	0,42	0,411 – 0,436
průměr 5mm nepraná	28	0,47	0,468 – 0,478
průměr 5mm praná	28	0,35	0,339 – 0,354

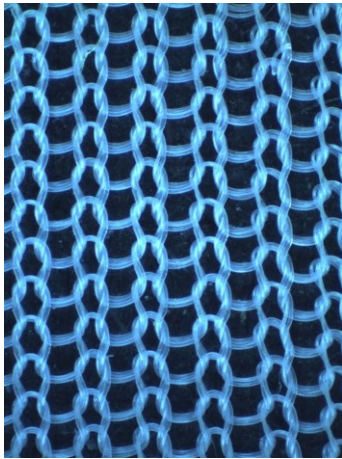
*Tabulka 1: Typy pleteného scaffoldu cévní náhrady s různým způsobem pletení a různou porositou.*



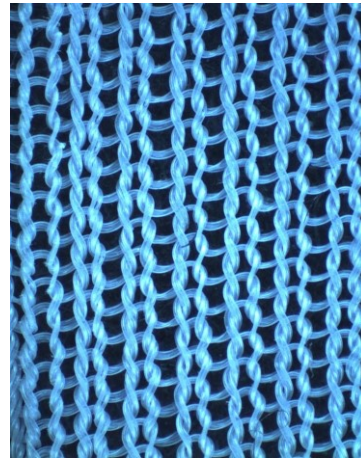
*průměr 5mm staré vlákno*



*průměr 5mm praná fixovaná*



*průměr 5 nepraná*

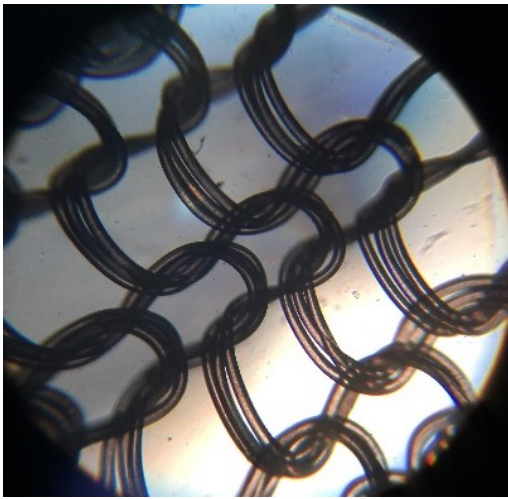


*průměr 5 praná*

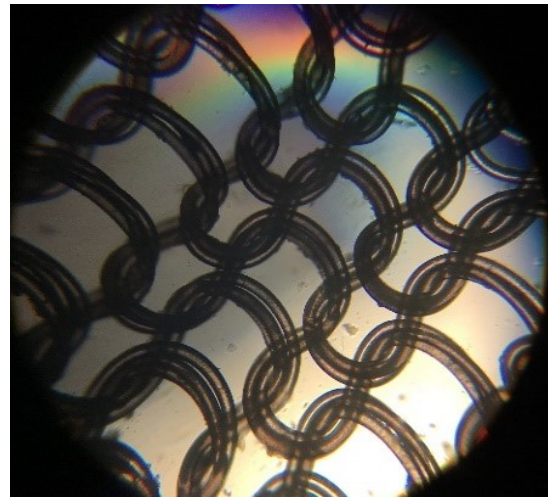
*Obr. 3: Typy pleteného scaffoldu*

Označení	Celkový počet oček	Porosita [-]
průměr 5mm praná fixovaná	32	0,36
průměr 5mm nepraná	32	0,40
průměr 5mm praná	32	0,30

*Tabulka 2: Typy pleteného scaffoldu cévní náhrady s různým způsobem pletení a různou porositou*



průměr 5mm 28 oček



průměr 5mm 32 oček

Obr. 4: Typy pleteného scaffoldu - mikroskopie

a) porozita pleteniny na obrázku  
s 28 očky byla naměřena 46,1%

b) porozita pleteniny na obrázku  
s 32 očky byla naměřena 42,5%

Všechny výše uvedené hodnoty jsou pouze ukázkami měření, na statistické vyhodnocení nebylo dostatečné množství vzorků.

Nicméně i z obrázků je vidět, že parametry pletení i úprava pleteniny ovlivňují porovitost (velikost porů), návazně porozitu (poměr porů k celkové ploše) (vysv. *měřili jsme plošnou porozitu, ne objemovou*) a tím pádem i propustnost stěny cévní náhrady pro kapaliny. Všechny vlastnosti implantátu se odvíjejí od druhu použitého vlákna, a konečné úpravy cévní náhrady.

### 2.3. Výroba nosného scaffoldu protézy

Pro výrobu scaffoldu bylo použito monofilní polyesterové vlákno o průměru 0.034 mm. Toto vlákno bylo v pletacím stroji sdružováno do svazků po 2 a byla z něj vytvořena pleteninová trubice. Než se dospělo k finální konstrukci pleteniny, bylo testováno několik variant. Ty se lišily počtem sdružovaných monofilních polyesterových vláken a hustotou, tím i velikostí ok pleteniny. Před integrací pleteninového scaffoldu do kolagenní hmoty, byla pletenina ještě chemicky ošetřena praním a předsrážením. Pletenina jako scaffold byla zvolena pro své mechanické vlastnosti. Pleteninová trubice se dokáže vhodně deformovat v obvodovém i podélném směru. Tím by měla být umožněna dobrá poddajnost alternativní cévní protézy zejména v obvodovém směru. To je mimo jiné důležité pro přenos pulzací v krevním systému a propagaci pulzní vlny. Vzhledem k dobrým mechanickým vlastnostem a biokompatibilitě je polyester využíván jak v chirurgii, tak v tkáňovém inženýrství.



## 2.4. Pseudointima a pseudoadventicie – kolagenní vrstvy

Na základě podrobné analýzy vlastností byl vybrán bovinní a rybí kolagen vyrobený za kontrolovaných podmínek. Kolagen je typická vláknitá bílkovina, která je spolu s retikulinem hlavní součástí fibrilárních struktur vaziva, kůže, kostí a podpůrného skeletu všech orgánů a tkání. Antigenní vlastnosti nativního kolagenu jako heterologní bílkoviny vyvolávají vazbu komplementu, aglutinaci, anafylaxi a další reakce. Kolagenní hmota byla při výrobě protéz vystavena tvrzení, v tomto případě pomocí chemických činidel vytvářejících příčné vazby na molekulární úrovni struktury kolagenu typu I. Tato materiálová úprava je klíčová pro ovlivnění vlastní kolagenu, zejména bobtnavosti, stupně denaturace a doby vstřebávání. V této oblasti je zcela zásadní spolehlivá kontrola stupně vytvrzení (Martinez AW et al., 2014; Chaouat M. et al., 2008). Stupeň vytvrzení se hodnotí podle takzvané teploty smrštění ( $T_s$ ) nebo též denaturační teploty. U každého kolagenu je teplota smrštění jiná: například u vláken netvrzeného bovinního kolagenu dojde ke smrštění kolagenních vláken obvykle při teplotě v rozmezí 30 až 40 °C. Teplota smrštění nám také charakterizuje kvalitu výchozí suroviny.

Dochází také k denuraci a změně fyzikálních vlastností hmoty, např. poklesu mechanických vlastností. Úměrně se stupněm vytvrzení stoupá i teplota, při které ke smrštění dochází. Bylo jednoznačně prokázáno, že antigenicita nativního kolagenu klesá úměrně se stupněm vytvrzení (hodnoceno podle  $T_s$ ) až k bezvýznamným hodnotám. Podobný trend byl pozorován u trombogenicity. Je však nezbytné uváděné výhodné faktory korelovat s mechanickými vlastnostmi a hledat optimální konfiguraci úpravy kolagenní hmoty.

Vzhledem k tomu, že kolagen patří k nejpodrobněji zkoumaným látkám, je řada jeho charakteristik známa a jsou rovněž zažité metody, jak tyto údaje zjistit. Základem předkládaného výzkumu využití rybího kolagenu je podrobnou analýzou ověřit, do jaké míry jsou z hlediska fyzikálně-mechanického, fyzikálně-chemického, technologického a biologického shodné s kolagenem bovinním. Klíčovou otázkou zde bude především antigenicita, schopnost vyvolat alergickou reakci a toxicita. Současně byly zahájeny práce na výrobě kolagenu z ryb sladkovodních, kterých máme značnou zásobu, a to v celé řadě druhů, kde se výtěžnost, a tedy i ekonomická stránka, mohou podstatně lišit. V další části práce po analýzách rybího kolagenu jsme přistoupili k další etapě – aplikace rybího kolagenu ze sladkovodních což je v našem případě stěžejní aplikací využití rybího kolagenu při konstrukci vnitřní a zevní vrstvy protezy. V této oblasti má náš interdisciplinární tým rozsáhlé zkušenosti opřené o řadu publikací a patentů. Modifikovanými postupy používanými při konstrukci těchto protéz jsme navrhli protézu s použitím rybího kolagenu. Vlastní výroba byla zadána externímu dodavateli s dlouholetými zkušenostmi (VUP Brno, DCM collagen s.r.o. Kyjov a Collado s.r.o. Hovorany). Výsledný typ

kolagenu, který je použit pro výrobu prototypu prověříme jednak rigorózními testy in vitro, jednak in vivo.

## 2.5. Kolagen

Jako kolageny jsou obecně označovány vláknité bílkoviny s charakteristickým obsahem aminokyselin (13-14% hydroxyprolinu, 2% hydroxylysinu) s typickým žíháním. Tyto struktury jsou detekovatelné na snímcích pořízených např. elektronovým mikroskopem (v řádu nanometrů) nebo na rentgenových obrazech s molekulární vahou kolem 200.000. Základním stavební složkou kolagenní molekuly je trihelix řetězců aminokyselin. Trihelixy se shlukují do drobných fibril, které se slučují do větších fibril a nakonec vytváří typické kolagenní vlákno. Důležitou roli při tvorbě kolagenní struktury hraje mezi-vláknitá hmota, která je tvořena vysoce hydratovanými mukopolysacharidy. I když dnes chemicky rozeznáváme celou řadu nejrůznějších typů kolagenu, je pro medicínské využití nejdůležitější kolagen I.

Popis kolagenní hmoty pro její aplikační využití se v zásadě se opírá o tři základní charakteristiky:

- 1) *fyzikálně-mechanická* – odezva materiálu při mechanickém zatěžování s akceptací jeho vnitřní struktury (např. odolnost v tahu, malá pružnost, orientace vláken)
- 2) *fyzikálně-chemická* – kontrolovatelnost příčných vazeb a s tím spojenou rozpustností, nasákavostí a resorbí, funkce přenašeče iontů
- 3) *biologická* – ovlivnitelná antigenicita ovlivnitelná tkáňová reakce, semipermeabilita.

Pro kvalitu kolagenu a jeho použitelnost v různých aplikacích je kromě podílu hydroxyprolinu nejdůležitější tzv. teplota smrštění ( $T_s$ ). Vlákna nativního kolagenu se smršťují při teplotě kolem 30°C a to určuje jeho vlastnosti.

V medicíně se kolagen uplatňuje od šedesátých let minulého století. Drtivá většina využívaného kolagenu je bovinního původu, ať ze škáry kůže hovězího dobytka nebo jeho šlach. Vlákna a vláknité svazky kolagenu ze škáry jsou mnohem robustnější než vlákna ze šlach (Achilova šlacha je téměř čistý kolagen). To má vliv především na vyšší mechanickou odolnost.

Pro medicínské účely - cévní protézy, hemostatické pěny, krytí ran atd. – je zásadní, že vlastnosti kolagenu lze cíleně ovlivňovat. Základem je tak zvané „tvrzení“ nebo též „sítování“. Podstata spočívá v aktivním působení některých tvrdících, sítovacích (crosslink) činidel (např. glutaraldehyd, tanin, genipin, NDGA) na strukturu kolagenní hmoty. Zejména se jedná o nárůst počtu příčných vazeb (nebo též crosslinků, zesítování) mezi jednotlivými molekulami kolagenu. Tímto způsobem lze do

jisté míry materiál programovat, jak po stránce mechanické odezvy při zatěžování, tak ve smyslu chemickém nebo biologickém. V medicíně se jako biologicky přijatelná tvrdící činidla uplatnil především glutaraldehyd nebo speciální pryskyřice. Úměrně se stupněm vytvrzení roste i  $T_s$  a to je přímo úměrné době vstřebávání kolagenní hmoty v organismu. Současně se mění i elasticita, bobtnavost, rozpustnost a další vlastnosti.

Jak je patrné ze základního popisu, je bovinní kolagen desetiletí hojně využíván v řadě oblastí včetně medicíny a jeho vlastnosti jsou dobře známé. V naší práci navazujeme na nezměřitelné zkušenosti české kolagenní školy vyjádřené i řadou publikací a patentů (Cz.pat. 116540, Cz.pat. 132737, Cz.pat. 148134, Cz.pat. 153852, Cz.pat. 194576). Právě na základě těchto zkušeností jsme si vědomi dvou základních problémů využití bovinního kolagenu u lidí – je to jeho mírná, i když do jisté míry ovlivnitelná antigenita a také alergizující vliv na některé jedince. Nativní bovinní kolagen je lehce antigenní, což se přisuzuje tyrosinu v telopeptidech. Jak prokázala řada prací, tuto antigenitu lze snížit vhodným tvrzením, takže se klinicky neprojevuje. Nativní kolagen je proto v medicíně prakticky nepoužitelný. Daleko závažnější skutečností je, že řada lidí je alergická na hovězí bílkoviny a tuto alergenní vlastnost kolagenu nelze jakýmkoliv způsobem odstranit (cca 3-4% populace, Charriere et al. 1989) a pro tyto pacienty představuje užití zdravotnických prostředků s obsahem kolagenu určité riziko. Další nevýhodou je přenos zoonoz, který je stále častěji v literatuře diskutován a kterým se v případě použití rybího kolagenu vyhneme. Při tepelném a chemickém zpracování rybího kolagenu je naprosto minimalizován přenos infekčních původců těchto studenokrevních živočichů na člověka.

## **2.6. Kolagen, jeho extruze z různých živočišných druhů a porovnání imunitní reakce, která upravený kolagen vyvolává při implantaci do jiného živočišného druhu (imunogenicita kolagenu)**

Kolagen je typická vláknitá bílkovina, která je spolu s retikulinem hlavní součástí fibrilárních struktur vaziva, kůže, kostí a podpůrného skeletu všech orgánů a tkání. Antigenní vlastnosti nativního kolagenu jako heterologní bílkoviny vyvolávají vazbu komplementu, aglutinaci, anafylaxi a další reakce. Většina prací však byla a je zaměřena na vzorky získané extrakcí z různých tkání nebo na rekonstituovatelný nativní kolagen (Pati F. et al., 2012; Lee CH et al., 2001).

Primární důvody pro použití kolagenu zahrnují jeho vynikající biologickou kompatibilitu, nízkou antigenicitu, vysokou úroveň přímé buněčné adheze a vysoký stupeň biologické rozložitelnosti ve srovnání s chitinem / chitosanem a syntetickými polymery.

Charakteristiky bovinního kolagenu jsou podrobně rozebrány v následující subkapitole: “Přehled charakteristik typického čistého bovinního kolagenu.“

Existuje předpoklad, že oproti bovinnímu kolagenu, který je standardně využíván, by kolageny získané z ryb (mořských či sladkovodních) mohly být při humánní implantaci ještě méně imunogenní, a tato vlastnost by mohla souviset s nižším rizikem trombozy, zejména v cévních protézách, které jsou určené pro nízkoprůtokové oblasti.

Touto myšlenkou se zabývá pouze několik málo prací, a vzájemné porovnání výsledků je obtížné. Pro úplnost uvádíme rešerši literatury v této oblasti s krátkým komentářem dosažených výsledků.

- 1) Atelokolagen je zpracovaný přírodní biomateriál produkovaný kolagenem skotu typu I. Je charakterizován užitečnými vlastnostmi biomateriálů z kolagenu, včetně nízké míry zánětlivých reakcí, vysoké úrovně biologické kompatibility a vysokého stupně biologické rozložitelnosti. Komponenty kolagenu, které jsou přiřazeny jeho imunogenicitě, totiž telopeptidy, jsou eliminovány během výroby atelokolagenů. Proto atelokolagen vykazuje malou imunogenicitu. Schopnost získat podstatné množství kolagenu z odpadu z ryb (váhy, kůže a kosti) by vedla k vývoji alternativy k bovinnímu kolagenu pro použití v potravinách, kosmetice a biomedicínských materiálech (Miyata T. et al., 2008; Hanai K. et al., 2006; Sano A. et al., 2003)
- 2) Kolagen získaný z medúz, které jsou jedním z mořských organismů, vykazují vysoce porézní a vzájemně propojenou strukturu pórů, která je vhodná pro osídlení buňkami a poskytuje účinný zdroj živin a kyslíku buňkám kultivovaným v takových trojrozměrných maticích (Song E. et al., 2006; Yamada S. et al., 2014).  
Aby se zjistilo, zda kolagen medúzy vyvolá vyšší specifickou zánětlivou odezvu ve srovnání s bovinním kolagenem nebo želatinou, byly hodnoceny hladiny prozánětlivých cytokinů a protilátek a vyhodnoceny změny v populaci imunitních buněk po implantaci in vivo. Následně bylo zjištěno, že kolagen ze medúzy vyvolává imunitní odpověď srovnatelnou s imunitní odpovědí stimulovanou kolagenem skotu a / nebo želatinou
- 3) Vaskulární grafty připravené s kolagenem, který byl získaný z lososa (připraveny inkubací směsí kyselého roztoku a pufru indukujícího fibrillogenezi obsahujícího zesíťovací činidlo, ve vodě rozpustný karbodiimid) (Nagai N. et al., 2008). Následně bylo provedeno opětivé zesíťování (crosslinking) v roztoku ethanolu. Takto připravený kolagen byl testován s ohledem na imunitní reakci kterou vyvolá na potkanech (podkožní implantace). Reakce byla velmi mírná. Podobné výsledky byly získány při implantaci kolagenu získaného z tialpie (Sugiura H. et al., 2009), pokud byly implantovány do oblasti paravertebrálního svalstva králíků.

## 2.7. Přehled charakteristik typického čistého bovinního kolagenu

Kolagen je ve vodě nerozpustná bílkovina, která je základní stavební hmotou pojivových tkání. Ve formě kolagenních vláken je významnou složkou mezibuněčné hmoty. Je tvořen aminokyselinami glycinem, prolinem, hydroxyprolinem a hydroxylisinem. Tyto aminokyseliny vytváří kolagenní řetězce, které dále tvoří trojitou spirální strukturu, kterou nazýváme tropokolagen. Tropokolagen je základní jednotkou kolagenu, jehož skládáním dochází k vytvoření kolagenního vlákna. Tato vlákna jsou ohebná, měkká, vysoce pevná v tahu a jsou uspořádána do sítí nebo svazků (šlach). Jak je uvedeno výše, existuje celá řada typů kolagenu. Zdaleka nejrozšířenější je typ I., který představuje 90 % kolagenu v organismu, je přítomen v pokožce, šlachách, kostech a zubech.

Bovinní kolagen je vláknitá bílkovina, jejíž zdrojem je buď škára nebo achilovy šlachy mladého hovězího dobytka. Tyto typy se mezi sebou liší svými vlastnostmi. Kolagen ze šlach má jemnější a kratší vlákna, kdy tato vláknitá struktura mu zajišťuje strukturální stabilitu, která dalece převyšuje jiné látky. Trihlexová struktura molekuly tropokolagenu umožňuje zvýšením počtu příčných vazeb, ať už síťovacími látkami tak i gama zářením používaným při sterilizaci, ovlivnění řízeného vstřebávání organismem. Je nutné mít na mysli, že se jedná o heterogenní bílkovinu, která s sebou nese určitý stupeň antigenicity. Antigenní vlastnosti nativního bovinního kolagenu byly prokázány celou řadou reakcí: vazbou komplementu, aglutinací, anafylaxí atd. Již v šedesátých letech doc. MUDr. Milan Krajíček, DrSc. prokázal, že takto amorfní surový bovinní kolagen, i když mírně antigeně působí, dochází k postupnému poklesu jeho antigenicity úměrně stupni vytvrzení. Nicméně i takto upravený bovinní kolagen obsahuje určitý podíl mukopolysacharidů a dalších vysokomolekulárních látek, které přeci jen mohou vést k určitému antigennímu efektu. Za tuto antigenicitu mohou být zodpovědné koncové skupiny tropokolagenu, které spojují jednotlivé peptidové řetězce – telopeptidy.

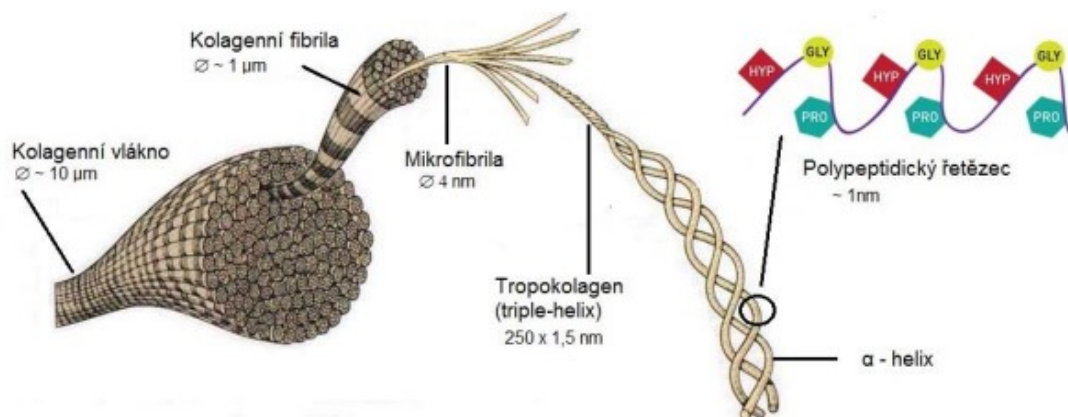
Strukturu bovinního kolagenu můžeme sledovat ze třech hledisek:

- a) *Morfologická struktura* – jedná se o složitý systém, který zahrnuje kolagen nativní, mladý nezralý kolagen – kolastromin, metakolagen, prokolagen retikulin, prekolagen, tropokolagen a řadu jiných
- b) *Makromolekulární struktura* – aminokyseliny v kolagenu jsou mezi sebou vzájemně propojeny **peptidovými vazbami**, na rozdíl od ostatních bílkovin, které jsou propojeny vazbami amidovými, se vazby v kolagenu liší prostorovým uspořádáním. Další významnou strukturou v kolagenu jsou **vodíkové můstky**, které se nacházejí jak intermolekulární, tak intramolekulární lokalizaci. Tyto můstky jsou zodpovědné například za denuraci a

agregační stavy. **Vedlejší řetězce** jsou další makromolekulární strukturou, které ovlivňují sferický tvar molekuly, především svojí prostorovou náročností a polaritou. Kolagenní bílkoviny obsahující velké množství prolinu a hydroxiprolinu nemají volný vodík pro vytvoření vodíkového můstku čímž se zdůrazňuje význam sférických faktorů pro stabilitu struktury.

- c) *Chemická struktura* – zahrnuje zastoupení aminokyselin, jejich pořadí a vzájemný poměr v polypeptidových řetězcích

Základní strukturální jednotkou nativního bovinního kolagenu je tuhá rozpustná tyčinka, která je nazývána tropokolagen. Tato molekula je tvořena třemi spirálovitě stočenými polypeptidickými řetězci, z nichž dva (alfa 1 řetězce) jsou zcela stejné a třetí (alfa 2 řetězec) se liší zastoupením aminokyselin. Spojováním řetězců tropokolagenu se vytváří mikrofibrily (protofibrily) jejichž sdružováním vzniká kolagenní fibrila, kde větší množství těchto fibril vytváří kolagenní vlákno (obrázek)



*Obr.5: Prostorové uspořádání polypeptidického řetězce kolagenu do kolagenního vlákna (obrázek zapůjčen z práce: Kůže, ušně, Pergamen, autorů: Gabriela Vyskočilová, Alois Orlita, Magda Součková, Richard Ševčík, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno 2016)*

Vzniklé vazby mezi jednotlivými molekulami jsou jak elektrostatické povahy, tak i spojení vodíkovými můstky, které spolu s rigiditou polypeptidových řetězců v oblasti cyklických aminokyselin mají zásadní význam při hydrotermální stabilitě kolagenu. V literatuře je uváděno, že tyto vláknité bílkoviny mají velkou strukturální stabilitu. Z hlediska mechanismů, které se na této stabilitě podílí, rozlišujeme čtyři typy:

- A) **Fyzikální stabilita** – je dána architektonickým uspořádáním kolagenního vlákna a základní kolagenní hmotou, která spojuje jednotlivá vlákna a která zároveň udává stupeň pružnosti a pevnosti kolagenu (šlacha z bovinního kolagenu o průřezu 1mm<sup>2</sup> unese 8-15 kg).
- B) **Fyzikálně chemická** – je dána počtem a povahou vazebných sil mezi jednotlivými vlákny tropokolagenu, avšak netýká se mechanické pevnosti vlákna. Zvýšením počtu příčných vazeb mezi vlákny kolagenu některým z technologických procesů dochází ke zvýšení teploty smrštění, ale pevnost vlákna se nemění. Tímto zvýšením počtu vazeb nebo naopak jejich štěpením ovlivňujeme rozpustnost, bobtnavost, ale i denaturaci, která přímo souvisí se vstřebáváním tohoto kolagenu.
- C) **Hydrolitická stabilita** – Hydrolitickou stabilitu zajišťují peptidové, glykosidové vazby a mukopolysacharidy. Kolagen je specificky v organismu štěpen tkáňovými kolagenázami, kde právě rychlost štěpení je dána i zesíťováním molekul kolagenu.
- D) **Metabolická stabilita** – je zabezpečována komplexními mechanismy a stanovuje se metabolickým obratem zralých nerozpustných bílkovin. Mladé vývojové formy kolagenu vykazují naopak čilý metabolismus, který je srovnatelný například s obratemkrevních bílkovin. Poměr zralých a mladých forem kolagenu je například využíván ke stanovení stáří organismu.

## 2.8. Rybí kolagen

Poslední léta se na trhu objevila řada kolagenů z mořských ryb, který je používán převážně v potravinářství a kosmetice. Pro uplatnění kolagenu z mořských ryb v medicíně byly již vypracovány některé studie, především se jedná o využití v tkáňovém inženýrství (N. Nagai, Y. Nakayama, 2008), ale také počátky využití ve stomatologii (Yanagiguchi 2001, Yang 2001). Zatím se však v literatuře nevyskytují žádné systematické informace ani studie o širším využití rybího kolagenu v medicíně v oblasti popáleninové medicíny, hojení ran a zejména v konstrukci cévních protéz.

Podle dosavadních dílčích zpráv je rybí kolagen oproti bovinnímu, získanému ze škály nebo šlach, nízce antigenní, vykazuje vynikající biokompatibilitu a vysokou úroveň přímé buněčné adheze. Peptidy rybího kolagenu jsou také považovány za lepší při celkovém zastoupení hladiny kolagenu v těle. Jeho mechanické, chemické a biologické charakteristiky jsou ve srovnání s běžně využívanými typy kolagenů odolnější vůči chemickým a fyzikálním poškozením, patrně díky prostředí, ve kterém

ryby žijí (střídání teplot, tlaků). Protože si zachovává svou triple-helix strukturu, zůstávají polypeptidy a amino-acidy nedotčené, čímž se zvyšuje efektivita tohoto kolagenu.

Zatím však chybí jednoznačně definovaný typ kolagenu z mořských ryb a také u žádného producenta nenajdeme podrobnou analýzu čistoty kolagenu. Příčina je v tom, že tento „fishcollagen“ se získává asi z dvaceti druhů mořských živočichů, takže jednotný kalibrační vzorek je teprve nutno hledat. V současné době technologie získávání kolagenu z ryb sladkovodních není ještě ani není universálně zpracována a nepochybně bude druhově specifická.

Systematicky popsat a doložit různé charakteristiky rybího kolagenu je v současnosti komplikované vzhledem relativně malému a útržkovitému množství publikovaných informací. Vzhledem k malému množství informací o medicinském využití rybího kolagenu a jeho podrobných vlastnostech (jak je známe u kolagenu bovinního) byl připraven tento projekt tak, aby se spolehlivě a vědeckými metodami prokázalo, zdali je pro medicinské využití stejně vhodný či vhodnější než kolagen bovinní. Neméně podstatné z hlediska ekonomického je fakt, že Česká republika má daleko snazší přístup k rybám sladkovodním. Nemalé potenciální zdroje kolagenu ze sladkovodních ryb a rozsáhlá tradice rybářství a rybníkářství v našem regionu dává tomuto směru výzkumu a vývoje velmi dobrý materiální základ a potenciál.

## **2.9. Antitrombogenní ošetření vnitřního povrchu cévní náhrady**

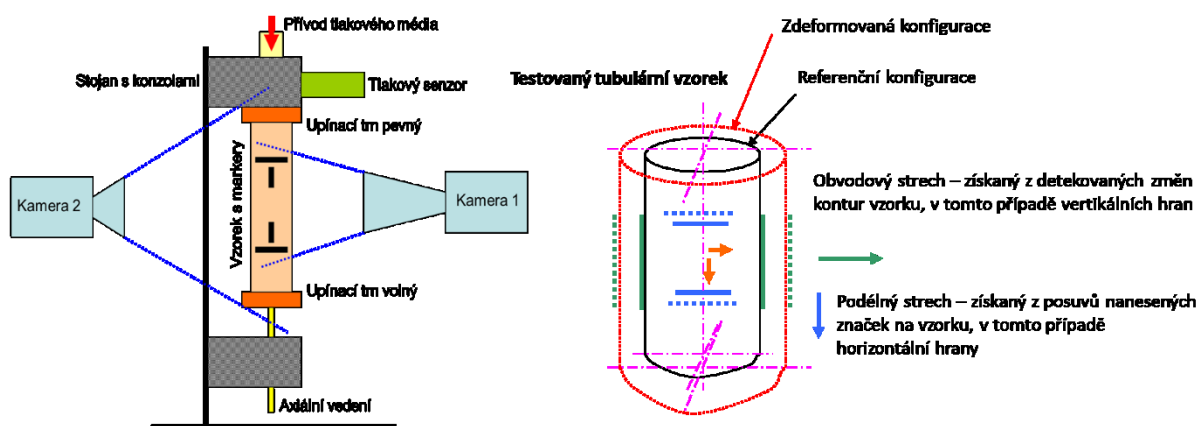
Lokální aplikace antitrombotických látek může zpomalovat počáteční nekontrolované ukládání fibrinu na vnitřní stěnu cévních náhrad, které u cév s malým průtokem může vést až k jejich uzávěru. Také postupné uvolňování heparinu do krevního řečiště může významně prodloužit životnost cévních náhrad. V průběhu roku 2014 byly autory vyvinuty antitrombotické biomateriály s postupným uvolňováním heparinu a/nebo streptokinázy (Beran M. et al., 2017). Obě tyto látky jsou již široce využívány v klinické praxi (Fernandes EG et al., 2006). V posledních letech je věnována zvýšená pozornost možnosti využití jiného antitrombotického činidla, oxidu dusnatého (NO). Přírozená endoteliální výstelka cév uvolňuje NO, který inhibuje aktivaci krevních destiček a polymorfonukleárních leukocytů, brání tak jejich agregaci a působí preventivně proti cévní trombóze. Kromě antitrombotických účinků má NO celou řadu dalších důležitých fyziologických funkcí (Carpenter AW et al., 2014). Další účinnou látkou je např. dipiridamol, který inhibuje vychytávání adenosinu v erythrocytech, krevních destičkách a endoteliálních buňkách za podmínek in vivo i in vitro. Inhibice dosahuje v maximu přibližně 80 % a její intenzita je při terapeutických koncentracích (0,5–2,0 µg/ml) závislá na podané dávce (Beran M. et al., 2017). Snížení agregace krevních destiček snižuje jejich konzumpci k normálním hodnotám. Navíc má adenosin vazodilatační účinky, což je jeden z mechanismů, kterým dipiridamol vyvolává vazodilataci.



### 3. VÝSLEDKY

#### 3.1. 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 Schema 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.



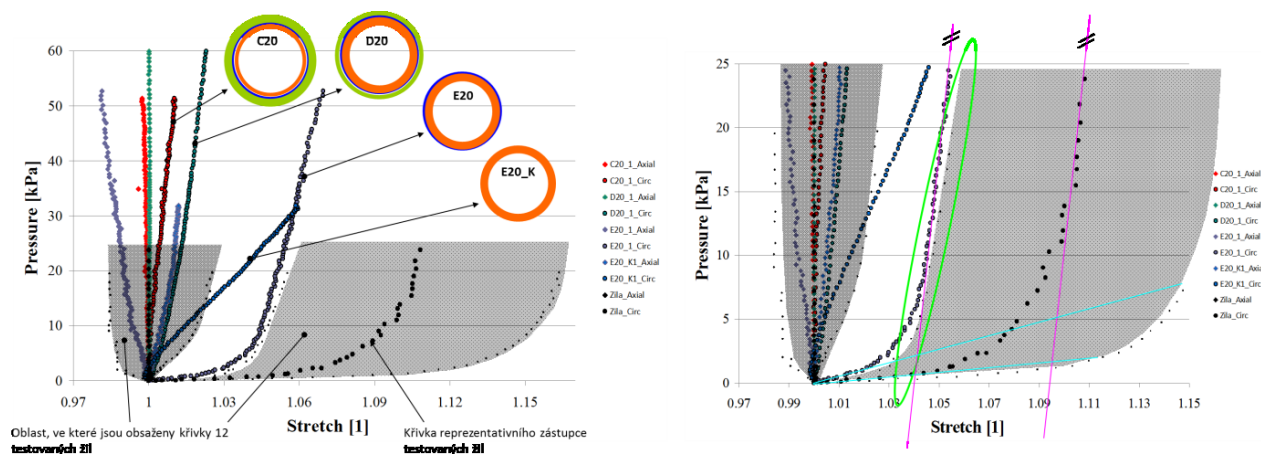
Schema 1.: schematický pohled na upnutý vzorek instalovaný do konzol.. Vpravo: schéma deformování tubulárního vzorku během inflačně-extenzního testu. Jsou zde naznačené markery (linky) na kterých se identifikovala obvodová a axiální deformace.

#### 3.2. Testování kompozitních celků

Dalším krokem ve vývoji cévní náhrady je mechanický test náhrady jako kompozitního celku v různých sendvičových uspořádáních (Schema 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, která je na Schematu 2 označená jako E20. Takto utvořená náhrada se svými fyzikálními vlastnostmi nejvíce přibližuje nativní safěně. Jde o uspořádání stěny trubice, kdy je kolagenní trubice uvnitř sítě. Na náhradě byla vytvořena i vnější kolagenní vrstva – pseudoadventicie, aby byl scaffold překryt kolagenní hmotou. Pro lepší přiblížení mechanické odezvy cévní náhrady humánní žíle (Veselý J. et al., 2015) 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, jak je patrné na Schematu 2 (Špaček M. et al., 2019).



Schema 2.: Inflačně-extendní 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.

### 3.3. Analýza rybího kolagenu – třeboňský kapr

V této části prezentujeme analýzy sekundární struktury kolagenových vzorků vyrobených z třeboňského kapra na základě našeho zadání od tří výrobců (DCM collagen s.r.o., Collado s.r.o. a ÚSMH AV ČR) s cílem určení míry zachování přirozené struktury kolagenu po jeho izolaci. Jednalo se v prvním případě o rybí kolagen extrudovaný na pleteném scaffoldu, ve druhém a třetím případě se jednalo o nativní kolagenní hmotu. Míra zachování nativní struktury kolagenu byla sledována pomocí FTIR a elektroforetické analýzy. Dále byl navržen způsob heparinizace kolagenových vzorků a způsob analýzy uvolňování heparinu ze vzorku.

#### 3.3.1. FTIR analýza sekundární struktury kolagenových vzorků

V rámci projektu byla studována sekundární struktura kolagenů pomocí infračervené spektrometrie (FTIR), která umožňuje studovat také její změny (denaturace) po různých procesech (izolace, síťování, sterilizace). Infračervené spektrum kolagenu vykazuje 5 amidických pásů (Payne KJ, Veis

A., 1988; Prystupa DA, Donald AM, 1996; Rabotyagova OS et al., 2008), které jsou odrazem jedinečné helikální struktury kolagenu: amid A, který je reprezentován valenčními vibracemi vazeb N–H při  $\sim 3303\text{ cm}^{-1}$ , amid B valenčními vibracemi C–H při  $\sim 3080\text{ cm}^{-1}$ . Pás amidu I ( $\sim 1650\text{ cm}^{-1}$ ) způsobují valenční vibrace skupin C = O kombinované s deformačními vibracemi vazeb N–H. Amide II je reprezentován pásem  $\sim 1550\text{ cm}^{-1}$  pocházející z deformačních vibrací skupin N–H kombinovaných s valenčními vibracemi vazeb C–N. Dalším důkazem existence helikální struktury je výskyt kvartetu pásů  $\sim 1205, 1240, 1280$  (amid III) a  $1340\text{ cm}^{-1}$  (Jackson M. et al., 1995; Pielesz A., 2014). Poměr integrální absorpance pásů amid III/ $1455\text{ cm}^{-1}$  (antisymetrická deformace alifatických vazeb C–H) je možné využít pro předběžné vyhodnocení stupně denaturace. Poměr  $< 1$  je typický pro želatinu, zatímco poměr  $> 1$  je typický pro kolagen.

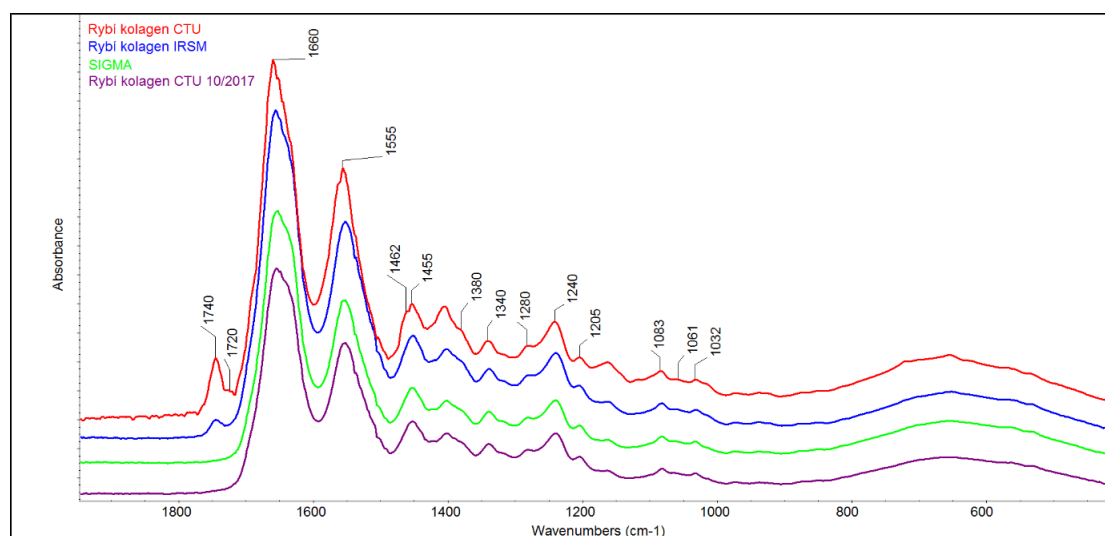
Pás amidu I ( $1650\text{ cm}^{-1}$ ) je možné rozložit do několika pásů s maximy při  $\sim 1690, 1680, 1660, 1650, 1630$  a  $1610\text{ cm}^{-1}$  (Rabotyagova OS et al., 2008). Pás  $\sim 1660\text{ cm}^{-1}$  náleží helikální struktuře kolagenu s příspěvkem konformace  $\alpha$ -helix, zatímco pás  $\sim 1630\text{ cm}^{-1}$  náleží agregované struktuře  $\beta$ -skládaného listu v denaturovaném stavu (Rabotyagova OS et al., 2008). Přítomnost komponenty  $\sim 1615\text{ cm}^{-1}$  byla prokázána v želatině (Prystupa DA, Donald AM, 1996), pás  $\sim 1650\text{ cm}^{-1}$  reprezentuje dezintegrováný stav a imidická rezidua. Pásky  $\sim 1680$  a  $1690\text{ cm}^{-1}$  je možné popsat jako to  $\beta$ -otočka a stav kdy helixy jsou agregovány do formy zvané antiparalelní  $\beta$ -skládaný list (Rabotyagova OS et al., 2008). Po denuraci kolagenu dochází ke změně relativních intenzit pásů  $1660$  a  $1630\text{ cm}^{-1}$  a jejich poměr se mění od  $> 1$  na  $< 1$ , tzn., že intenzita pásu  $1630\text{ cm}^{-1}$  roste a naopak intenzita pásu  $1660\text{ cm}^{-1}$  klesá.

Struktura kolagenních materiálů byla studována přístrojem Protégé 460 E.S.P. (Thermo Nicolet Instruments Co., Madison, USA) metodou zeslabené totální reflexe ATR (GladiATR, PIKE Technologies) s diamantovým krystalem. Výsledná spektra byla získána ze 128 skenů s rozlišením  $4\text{ cm}^{-1}$ . Plochy pásů (integrální absorpance) byly stanoveny pomocí software OMNIC 7, který byl použit rovněž pro dekonvoluční proceduru pásů amidu I. Vstupní data pro separaci pásů (počet, pozice, pološířka, relativní intenzita a tvar) byly získány pomocí Fourier self-deconvolution procedury a dále vypřesněny fitovací procedurou s použitím Gaussovy profilové funkce. Seznam a popis studovaných kolagenních materiálů je uveden v Tabulce 1.

Kolagenní materiál	Popis
SIGMA	Kolagen typu I (kryší ocas), Roche Diagnostics, No. 17182900 Standardní materiál
CTU	Kolagen typu I (rybí kůže), kolagen na PET síťce
CTU 10/2017	Kolagen typu I (rybí kůže), pouze kolagen
IRSM	Kolagen typu I (rybí kůže), izolován na ÚSMH

Tab. 3: Seznam a popis studovaných kolagenních materiálů.

Kolagenní materiály (CTU a IRSM) byly porovnány se standardním kolagenem SIGMA (Obr. 1). Jak je patrné z Obr. 1, všechny studované kolageny jsou srovnatelné. Jasně vyprofilovaný kvartet pásů  $\sim 1205$ ,  $1240$ ,  $1280$  (amid III) a  $1340 \text{ cm}^{-1}$  je jasným důkazem existence helikální struktury. Změny ve spektrech rybího kolagenu (IRSM a CTU) viditelné ve spektrální oblasti  $1700 - 1800 \text{ cm}^{-1}$  jsou důkazem přítomnosti lipidů (pás  $1740 \text{ cm}^{-1}$ ). Šarže kolagenu CTU 10/2017 lipidy téměř neobsahuje. Velmi slabé rameno tohoto pásu při  $1720 \text{ cm}^{-1}$  přítomné pouze ve spektru kolagenu CTU je projevem spektrálního vlivu polyethyltereftalátové nosné sítě. Vzhledem k jeho velmi nízké absorbanci je jeho spektrální vliv v dalších částech spektra zanedbatelný. Dalším důkazem přítomnosti lipidů je pás  $1380 \text{ cm}^{-1}$  (symetrická deformace  $\text{CH}_3$  skupin) a narůst poměru pásu  $1462 \text{ cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_2$ , deformační vibrace) k pásu  $1455 \text{ cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_3$ , antisymetrická deformační vibrace) (Jackson M. et al., 1995). Vzhledem k tomu, že kolageny izolované z ryb obsahují lipidy, není možné použít poměr amid III/ $1455 \text{ cm}^{-1}$  pro stanovení stupně denaturace. Pásky  $1031$ ,  $1061$  a  $1082 \text{ cm}^{-1}$  jsou důkazem přítomnosti sacharidů (Mieczkowska A. et al., 2015) a nekolagenních proteinů. Poměr pásu  $1032 \text{ cm}^{-1}$  ku  $1660 \text{ cm}^{-1}$  je možné využít pro stanovení stupně glykace kolagenu (Guilbert M. et al., 2013; Mieczkowska A. et al., 2015).



Obr. 6: Infračervená spektra studovaných kolagenních materiálů.

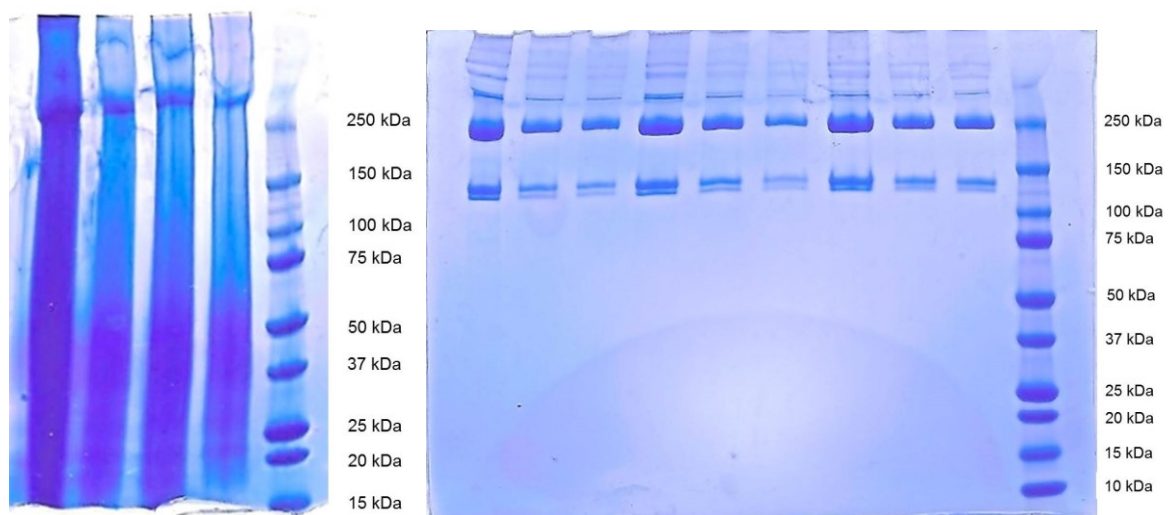
Dekonvoluce amidu I (Obr. 2-5, Tab. 2) umožnila stanovit procento helikální části kolagenu reprezentovaná pásem  $1660\text{ cm}^{-1}$  a také poměr této části k denaturovaným strukturám na základě pásů  $1630$  a  $1615\text{ cm}^{-1}$ . Statisticky významné rozdíly všech studovaných parametrů byly stanoveny mezi dvojicí (IRSM, CTU 10/2017) a dvojicí (SIGMA, CTU) – viz Obr. 6. Dvojice (IRSM, CTU 10/2017) vykazuje statisticky významně vyšší procento helikální složky a vyšší poměr helikální/denaturovaná část. Relativně velký rozptyl dat může souviset s výskytem lokálních nehomogenit (některá část kolagenu je denaturována více jiná méně) a výskytem dalších strukturních stavů. Příklad takovýchto stavů v sekundární struktuře kolagenu byl detekován ve spektru kolagenu CTU (Obr. ..). Pás  $1676\text{ cm}^{-1}$  charakterizuje úseky  $\beta$ -otoček v C- a N-telopeptidech, které souvisí s uvedením kolagenu do strukturně nerovnovážného stavu. Pás  $1648\text{ cm}^{-1}$  reprezentuje stav, při kterém dochází k transformaci helikální struktury na dezintegrováný stav (Rabotyagova OS et al., 2008).

### 3.3.2. Elektroforetická analýza kolagenových vzorků

Dodané vzorky trubiček pokrytých maticí na bázi kolagenu a s polymerní výztuží byly analyzovány pro zjištění míry čistoty, degradace a stanovení molekulových hmotností komponent vzorku pomocí separační elektroforetické techniky (ELFO) v provedení SDS-PAGE, tj. elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti detergentu SDS (Sodium dodecyl sulfate), který umožňuje separaci molekul na základě rozdílu jejich molekulové hmotnosti. Separace složek byla realizována na originálních komerčních gradientových gelech firmy BIO-RAD (TGX Miniprotean Precast Gels, 4-15 %) o tloušťce 1 mm a rozměrech 6 x 8 cm. Ty umožňují paralelní analýzu až 10 vzorků s možností aplikovat objem do 30  $\mu\text{l}$  vzorku na jamku, k separaci bylo využito systému pro vertikální elektroforézu Mini-Protean Tetra Cell firmy BIO-RAD a jako zdroj konstantního napětí PowerPac Basic 300 V Power Supply téže firmy. Při analýze bylo na dělení složek analyzovaného materiálu použito osvědčeného separačního konstantního napětí 200 V (proud klesal v intervalu cca 65-30  $\mu\text{A}$ ), při němž celá separace trvala cca 30 min. Vzorky byly před nanesením na gel ředěny komerčním neredukujícím vzorkovým Laemmliho pufrům firmy BIO-RAD (v poměru vzorek: vzorkový pufr = 1:1 obj., dle protokolu výrobce), na 1 jamku bylo aplikováno 25  $\mu\text{l}$  roztoku vzorku. Jak je patrné z přiložených snímků, při analýze bylo dle ostře oddělených zón standardů dosaženo vysoké separační schopnosti dělených zón pro analyty v širokém intervalu velikostí molekul. Molekulové hmotnosti dělených složek byly zjišťovány na základě porovnání migrační vzdálenosti zón vzorků s komerčně dostupnou sadou standardů (Precision Plus Protein Dual Color Standards firmy BIO-RAD v rozsahu molekulových hmotností 10-250 kDa, aplikovaných na jamku v množství 10  $\mu\text{l}$ ). Pro vizualizaci odseparovaných složek proteinů bylo použito barvení pomocí neředěného komerčního roztoku Coomassie Brilliant Blue R-250, pro odbarvení pozadí pak roztok složený z kyseliny octové,

methanolu a purifikované demi vody (HAc:MeOH:H<sub>2</sub>O = 100:350:550 ml). Intenzita zabarvení zóny koreluje s obsahem dané složky ve vzorku a lze ji orientačně využít při semikvantitativním hodnocení. Vymyté gely byly sušeny mezi 2 vrstvami celofánu na vzduchu v plastovém rámečku (při laboratorní teplotě) pro jejich archivaci a následné vyhodnocení.

Po oskenování gelů a vyhodnocení vzdáleností migrujících zón jednotlivých složek od čela gelu výsledky ukázaly, že v případě kolagenu IRSM z rybí kůže, čerstvě izolovaného na ÚSMH, je možné identifikovat u paralelních stanovení charakteristické, intenzivní modré pásy v oblastech molekulových hmotností kolem 250 kDa a 130 kDa odpovídající jednotlivým kolagenním alfa řetězcům, zatímco u vzorků dodaného rybího kolagenu aplikovaného na povrch trubiček (CTU), tyto typické pásy chybí a z intenzivnějších zón zde lze pozorovat jen vysokomolekulární složky v oblasti molekulové hmotnosti cca 300 kDa. To poukazuje na skutečnost, že pravděpodobně během procesu zpracování či při aplikaci kolagenní matrice na povrch trubiček, došlo působením nevhodných vnějších podmínek k poškození původní nativní struktury kolagenu, který již v konečné transformované podobě nejspíše nebude dostatečně dobře plnit svojí biologickou funkci, ve srovnání s kolagenem zpracovaným na ÚSMH, který při SDS-PAGE analýze nevykazoval zjevné známky degradace. Konkrétní pásy odpovídající děleným složkám jsou včetně popisu experimentálních podmínek znázorněny na Obr. 7.



Obr. 7. Vlevo: CTU - vzorky rybího kolagenu aplikovaného na povrch trubiček. Vpravo: IRSM - vzorky kolagenu izolovaného v ÚSMH.

Dále byl analyzován poslední dodaný kolagen - CTU 10/2017. Výsledky z ELFO naznačují, že tento kolagenový materiál má zachovanou sekundární strukturu a že při jejich zpracování nedošlo k poškození nativní struktury se známkami degradace. Na Obr. 8 je možné na vzorku kolagenu CTU 10/2017 rozpuštěného ve vodě (4 sloupce vlevo) a rozpuštěného ve slabé kyselině octové (4 sloupce

vpravo) identifikovat u paralelních stanovení charakteristické, intenzivní modré pásy v oblastech molekulových hmotností kolem 250 kDa a 130 kDa odpovídající jednotlivým kolagenním alfa řetězcům.



Obr. 8. Vzorky rybího kolagenu CTU 10/2107.

### 3.3.3. Návrh heparinizace kolagenových materiálů a způsobu analýzy uvolňování

Vzhledem k tomu, že kolagen běžně vykazuje trombogenetické vlastnosti a je velmi často využíván jako hemostatikum je nutné jej pro využití v cévní protetice modifikovat. Jeden ze způsobů je heparinizace. Heparinizaci neboli kovalentní immobilizaci heparinu je možné provést pomocí N-(3 dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimid hydrochloridu (EDC) a N-hydroxysuccinimidu (NHS). V první fázi je provedena aktivace heparinu pomocí EDC a NHS a to tak, že volné karboxylové skupiny heparinu jsou převedeny na reaktivní NHS-estery v pufru MES (2-morfolinosulfonová kyselina, pH=5,60). Poté je heparin immobilizován na kolagen reakcí těchto aktivovaných karboxylových skupin s residuálními primárními aminoskupinami kolagenu, který je rovněž síťován pomocí EDC a NHS (Jiang B., 2016).

Ke stanovení immobilizovaného heparinu je možné využít UV-Vis spektrometrii s použitím toluidinové modři, která vytváří spolu s heparinem komplex. Extinkce je měřena při 530 nm a množství immobilizovaného heparinu je stanoveno na základě kalibrační křivky (Wissink MJB et al., 2001). V současné době probíhají na pracovišti ÚSMH předběžné experimenty se stanovováním heparinu uvolňovaného z kolagenových materiálů ve formě fólií, jmenovitě kolagenu IRSM a CTU 10/2017.

### 3.3.4. Shrnutí analýz kolagenní hmoty

Byla provedena FTIR analýza sekundární struktury dodaných kolagenových vzorků s cílem určení míry zachování přirozené struktury kolagenu po jeho izolaci. Z těchto důvodů byl také izolován kolagen z rybí kůže (IRSM) ověřeným postupem, který dále posloužil jako kontrolní materiál, spolu s dalším komerčním produktem. Míra zachování nebo porušení nativní struktury kolagenu byla dále sledována elektroforetickou analýzou. Dále byl navržen postup heparinizace kolagenových materiálů a způsob analýzy uvolňování heparinu, který je ještě verifikován na modelových vzorcích.

## 3.4. Analýza účinků vybraných technologických procesů na kolagenní hmotu

### 3.4.1. Extrudovaná kolagenní hmota, vznik anizotropie, vliv dávky radiace

Zdrojová kolagenní hmota pro výrobu cévní náhrady se v průběhu výroby stále míchá a tím je k dispozici homogenizovaná izotropní hmota. Bylo třeba odpovědět na otázku, zda technologický proces extruze má vliv na vnitřní stavbu materiálu, tj. uspořádání kolagenních vláken a jejich svazku. Vliv možného vzniku anizotropie technologickým procesem extruze byl zkoumán při extruzi pásu kolagenní hmoty o příčném průřezu 2x20 mm. Jako testovací metoda baly vybrána jednoosá tahová zkouška. Vzorky pro testy byly ze získaného pásu vytnuty v longitudinálním směru (ve směru extruze) a transverzálním směru (kolmém na směr toku hmoty při extruzi). Napětí ve vzorcích bylo vypočteno jako skutečné (Cauchyho) napětí. Ze získaných materiálových charakteristik napětí-deformace, byly vypočteny tečné moduly pružnosti a hodnoty hustoty deformačních energií. Tyto parametry byly pro jednotlivé vzorky testovány pomocí ANOVA.

Provedené analýzy i porovnání celých záznamů charakteristik napětí-deformace ukazuje, že mechanické vlastnosti se v longitudinálním a transverzálním směru liší. Ve směru longitudinálním bylo dosahováno vyšší tuhosti, vyšších hodnot modulu pružnosti, než ve směru transverzálním. Znamená to, že vhodným způsobem extruze, přeuspořádáním kolagenních svazků uvnitř materiálu, lze programově řídit mechanické vlastnosti zdrojové izotropní hmoty, které se stává anizotropní.

Byl zkoumán i vliv radiace svazkem elektronů, tj.  $\beta$  záření, na mechanické vlastnosti kolagenní hmoty. Testované vzorky byly podrobeny radiaci o síla 0 Gy, 250 Gy, 850 Gy a 3300 Gy. Toto mělo simulovat např. vliv dávky radiace při sterilizaci nebo vystavení kolagenní cévní náhrady UV, obecně stárnutí biologického materiálu. Vliv dávky  $\beta$  radiace byl testován pomocí jednoosé tahové zkoušky. Testované vzorky byly získány z pásu kolagenní hmoty a byly zatěžovány prostým tahem.



Napětí ve vzorcích bylo opět vypočteno jako skutečné (Cauchyho) napětí. Ze získaných charakteristik napětí-deformace byly v relevantních bodech vypočteny tečné moduly pružnosti a hodnoty hustoty deformačních energií. Tyto hodnoty byly seřazeny do zájmových skupin a hodnoceny pomocí metody ANOVA.

Z provedených analýz, i po expertní analýze plných průběhů charakteristik napětí-deformace, bylo zřejmé, že dávka radiace má zásadní vliv na mechanickou odezvu kolagenní hmoty. Závěrem je, že se zvyšující se dávkou absorbované radiace kolagenní hmoty tuhne, zvyšuje se její modul pružnosti. Stává se křehčí, tj. lépe se láme. Tento jev si vysvětlujeme nárůstem přídavných příčných vazeb (crosslink) na molekulární úrovni, mezi jednotlivými kolagenními vlákny.

Testované vzorky - KTN + KTS + CN

- KTN - extrudované kolagenní trubice nesterilní s různou dobou síťování 10, 15 a 20 minut. Celkově bylo testováno cca 10 vzorků KTS se kterými bylo provedeno 40 sérií inflačně-extenzních testů. Průběh deformací byl vypočten z cca 160 000 obrázků z kamerového systému, které prošli analýzou obrazu. Dalších cca 6 vzorků bylo testováno na creep a dalších 3 pomocí nanoindentace povrchové vrstvy vzorku.
- KTS - extrudované kolagenní trubice sterilní s různou dobou síťování 10, 15 a 20 minut. Celkově bylo testováno cca 10 vzorků KTS se kterými bylo provedeno 40 sérií inflačně-extenzních testů a bylo získáno a pro určení průběhu deformací analyzováno cca 160 000 obrázků z kamerového systému. Dalších cca 6 vzorků bylo testováno na creep a dalších 3 pomocí nanoindentace povrchové vrstvy vzorku.
- CN - alternativní cévní náhrada = extrudovaná kolagenní trubice s integrovaným scaffoldem (polyesterová pletenina) sterilní s různou dobou síťování. Byly testovány 3 generace náhrady CN1, CN2, CN3. Náhrady CN1 byly síťovány po dobu 6, 8, a 10 minut. Náhrady CN2 a CN3 byly síťovány 10, 15 a 20 minut. Celkově bylo testováno cca 22 vzorků CN se kterými bylo provedeno 84 sérií inflačně-extenzních testů a bylo získáno a pro určení průběhu deformací analyzováno cca 340 000 obrázků z kamerového systému. Dalších cca 20 vzorků bylo testováno na creep a dalších cca 13 pomocí nanoindentace povrchové vrstvy vzorku.

Ve všech případech šlo o tubulární vzorky. Byly prováděny inflačně-extenzní testy, creepové testy a nanoindentace povrchové vrstvy. Všechny typy vzorků KTN, KTS, CN byly zatěžovány cyklicky vnitřním tlakem kapaliny a byly získány patřičné závislosti např. napětí-deformace atd. Z těchto experimentálních dat byly vypočteny různé typy modulů pružnosti (počáteční, tečný, sečný, redukovaný) a hustoty deformační energie. Získané charakteristiky byly modelovány konstitutivními vztahy, např. modelem Maxwellova typu, modelem typu Kelvin-Voigt pro lineární viskoelasticitu,

Fungovým model pro 1D, redukováným modelem HGO (Holzapfel, Gasser, Ogden). Byly získány materiálové parametry.

### 3.4.2. Analýzy vybraných technologických postupů u testovaných vzorků KTN, KTS, CN

Na základě získaných materiálových charakteristik při zatěžování vnitřním tlakem a materiálových parametrů byly u níže zmíněných typů vzorků (KTN, KTS, CN) provedeny analýzy ke zjištění vlivu na mechanické vlastnosti:

- Vliv rychlosti zatěžování
- Vliv doby síťování
- Vliv sterilizace
- Vliv integrace polyesterové pleteniny – scaffoldu

Jedná se tedy o vliv změny vnitřní stavby (struktury) stěny testované trubice. Vlivem síťování a sterilizací, která byly prováděna gama radiací, dochází k tvorbě přídavných vazeb mezi kolagenními vlákny. Tvorba těchto vazeb je však na jiných principech. Při síťování se jedná o tvorbu crosslinků cestou chemickou, ale při gama radiaci (sterilizaci) jde o cestu fyzikální. Integrovaný polyesterová scaffold (pletěnina) má zase vyztužující charakter a dává alternativní cévní náhradě jakousi limitní roztažnost, zejména v obvodovém směru.

Po integraci pleteniny do kolagenní hmoty dojde k celkovému vyztužení kompozitu (kolagen + pletěnina). Pozorovaná mechanická odezva v závislosti napětí-deformace nebo interní tlak-deformace je strmější a dosahované deformace menší. Zřejmě to je vyplněním ok pleteniny kolagenem a interakční vazbou povrchu vláken pleteniny s okolím, tj. kolagenní hmotou, tzn. vazby na rozhraní těchto dvou fází.

Cévní náhrady CN1 měla nelineární mechanickou odezvu (závislost napětí-deformace). Vzorek se zvyšující se zatížením tuhne, podobně jako nativní céva. V obvodovém směru byly dosahovány deformace do 8 % při obvodovém napětí cca 160 kPa. Ve směru axiálním se náhrady protahovala. Deformace byly takřka o řád nižší a dosahovali max. 1.5% při axiálním napětí 100 kPa. Závislost mechanických vlastností cévní náhrady při různých rychlostech zatěžování i době síťování nelze jednoznačně potvrdit ani vyvrátit. Získané charakteristiky mají poměrně značný rozptyl a nelze tak stanovit jednoznačné závěry. Tento typ náhrady CN1 je po srovnání s CN2 a CN3 z mechanického pohledu nejlepší.

Cévní náhrady CN2 měla ještě nelineární mechanickou odezvu. Byly dosahovány hodnoty obvodové deformace mezi 4 a 6 % při obvodovém napětí 300 kPa (2.8 až 4 % při 160 kPa). Ve směru axiálním se náhrady protahovala a deformace byly do 0.5 % při axiálním napětí 100 kPa (1 % při 170 kPa). U náhrady typu CN2 nebyla pozorována závislost na rychlosti zatěžování. Byla však pozorována jistá závislost na době síťování. Vzorky síťované 15 min. byly vždy tužší než vzorky síťované 10 min. a to při všech rychlostech zatěžování. Vzorky síťované 20 min byly ale u většiny provedených testů nejpoddajnější. Hypotéza pro toto může být, že síťování pro dobu 20 min. již má degradační účinky na vnitřní strukturu stavby stěny vzorku a dochází zde již k porušování na mikroskopické úrovni.

Cévní náhrady typu CN3 měla v podstatě lineární mechanickou odezvu. Hodnoty obvodové deformace se pohybovali mezi 1 a 1.7 % při obvodovém napětí 300 kPa (0.8 až 1.2 % při 160 kPa). Ve směru axiálním se náhrady protahovala a deformace byly do 0.25 % při axiálním napětí 100 kPa (0.5 % při 170 kPa). Jednalo se o nejtuzší testovaný typ náhrad. U náhrady typu CN3 také nebyla pozorována závislost na rychlosti zatěžování. Závislost mechanických vlastností na době síťování měla podobný trend jako u náhrady typu CN2. Vzorky síťované 15 min. byly vždy tužší než vzorky síťované 10 min. Vzorky síťované 20 min. byly u většiny provedených testů nejpoddajnější. Hypotéza pro tento jev je tedy stejná jako u CN2.

Drtivá většina testovaných alternativních cévních náhrad nebyla mechanicky závislá na rychlosti zatěžování. Koresponduje to s výsledky testované polyesterové pleteniny, která byly použita jako scaffold pro konstrukci náhrady. U některých náhrad se projevil vliv doby síťování na mechanickou odezvu vzorku. Tento výsledek lze uplatnit při programování mechanikách vlastností kompozitní náhrady na biologické bázi se sendvičovou konstrukcí stěny.

Extrudované kolagenní trubice bez integrovaného scaffoldu nesterilní s různou dobou síťování KTN měla v podstatě lineární mechanickou odezvu. Hodnoty obvodové deformace se pohybovali mezi 0.8 a 2 % při obvodovém napětí 300 kPa (0.5 až 1 % při 160 kPa). Ve směru axiálním se náhrady protahovala a deformace byly do 0.2 % při axiálním napětí 100 kPa (0.3 % při 160 kPa).

Extrudované kolagenní trubice bez integrovaného scaffoldu sterilní s různou dobou síťování KTS měla při době síťování 10 a 15 min. v podstatě lineární mechanickou odezvu. Při době síťování 20 min se dá mechanická odezva považovat za nelineární. Hodnoty obvodové deformace se pohybovali pro síťování 10 a 15 min. mezi 0.5 a 1.3 % při obvodovém napětí 300 kPa (0.3 až 0.8 % při 160 kPa). Při síťování 20 min byly dosahovány obvodové deformace 2.5 až 4 % při obvodovém napětí 300 kPa (1.8 až 2.8 % při 160 kPa). Ve směru axiálním se náhrady protahovala a deformace byly do 0.15 % při axiálním napětí 100 kPa (0.25 % při 170 kPa) pro všechny hodnoty síťování.

S opatrností lze konstatovat, že byl pozorován vliv sterilizace na mechanické vlastnosti extrudované kolagenní trubice. Po sterilizaci kolagenní trubice mírně ztuhla. Při sterilizaci trubice KTS byl pozorován zřejmě degenerativní proces narušení vnitřní struktury stěny vzorku, protože poměrně radikálně poklesla tuhost testované kolagenní trubice.

Doba síťování, tj. množství vzniklých přídavných vazeb v kolagenní struktuře (crosslink), má vliv na trombogenicitu kolagenní hmoty. Čím více je kolagenní hmota prosíťovaná, tím je nižší tvorba trombů. Jak se ale ukázalo, doba síťování (množství nových příčných vazeb) má i vliv na mechanické vlastnosti kolagenní hmoty, alternativní cévní náhrady. Čím je delší doba síťování, tím jsou cévní náhrady i kolagenní trubice bez integrovaného polyesterového scaffoldu tužší a ve směru obvodovém jsou deformace nižší. Zřejmě existuje jakýsi saturační vrchol pro vzniklé příčné vazby síťováním, po kterém vzorky ztrácí své mechanické vlastnosti a mění se trend mechanické odezvy. Analogie k tomuto je např. dávka radiace absorbovaná kolagenní hmotou, kde po určité dávce dochází k porušování vnitřní struktury materiálu.

Vliv integrace polyesterové pleteniny jako scaffoldu do kolagenní trubice nebyl z mechanického pohledu u testovaných vzorků jednoznačně pozorován. Technologické procesy jako bylo síťování a sterilizace toto pozorování značně ovlivnily.

U všech testovaných tubulárních vzorků byl pozorován větší rozptyl mechanických vlastností, tj. naměřených charakteristik napětí-deformace. Domníváme se, že toto má svůj původ v celém procesu výroby náhrady a je velmi důležité standardizovat jak výrobu kolagenní hmoty samotné, tvorbu pleteninového scaffoldu, tak celý následný postup výroby náhrady. Tato standardizace je ovšem proces značně zdlouhavý, který jistě svojí časovou kapacitou přesáhne délku projektu.

### **3.5. Výroba kolagenu ze sladkovodních ryb**

Izolace kolagenu z rybích kůží třeboňského kapra byla prováděna ve spolupráci s DCM Collagen s.r.o. a Collado s.r.o. v následujících krocích dle požadavků vzniklých na podkladě předchozích analýz: Mladí kapři do 2 kg váhy – lysci bez šupin. Použity byly pouze kůže bez šupin. Ploutve a ořezy z hlavy byly zpracovány zvlášť. Kůže byly ihned po zabíjení 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 %. Pomletý 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 síť 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 zachlazená a třepána na třepačce, v 2 hodinových intervalech. Následně byly přefiltrovány přes síť, propláchnuty demi vodou a opět naloženy do 10% n-butanolu. Celkem byly použity 3 cykly. Poté následovala filtrace přes síť 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 kuže vers. roztok cca 1:6 (w/w). Při přepočtu na sušinu se jedná cca o 3 % ní roztok (30 g sušiny kůži na 1 litr 0,5 M kys. octové). Plastový barel se směsí byl zachlazen 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 uhelnu (nylonová tkanina). Zfiltrovaný kolagen byl následně ještě dodatečně vymačkan 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.

### **3.6. Konstrukce cévních protéz s využitím rybího kolagenu sladkovodních ryb a technologické zvládnutí impregnace kompozitních cévních protéz rybím kolagenem**

Extruze kolagenní hmoty z rybího kolagenu je klíčovým procesem výroby cévní protézy. Principem metody je proces, při kterém dochází k protlačování kolagenní hmoty určité konzistence ze zásobníku přes speciální matici. 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. Určité specifikum pro práci s rybím kolagenem, než dojde k jeho vytvrzování, je nízká teplota při jeho zpracování, proto i zásobník extruderu musí být chlazen, aby nedošlo v průběhu extruze, kde dochází ke zvýšení teploty v důsledku zvýšení tlaku a tření, k destrukci nativního rybího kolagenu. Dále tento extruder musí být vybaven dalšími systémy, které by jinak v konečném produktu způsobovaly vznik bublin.

## **Technologický proces extruze**

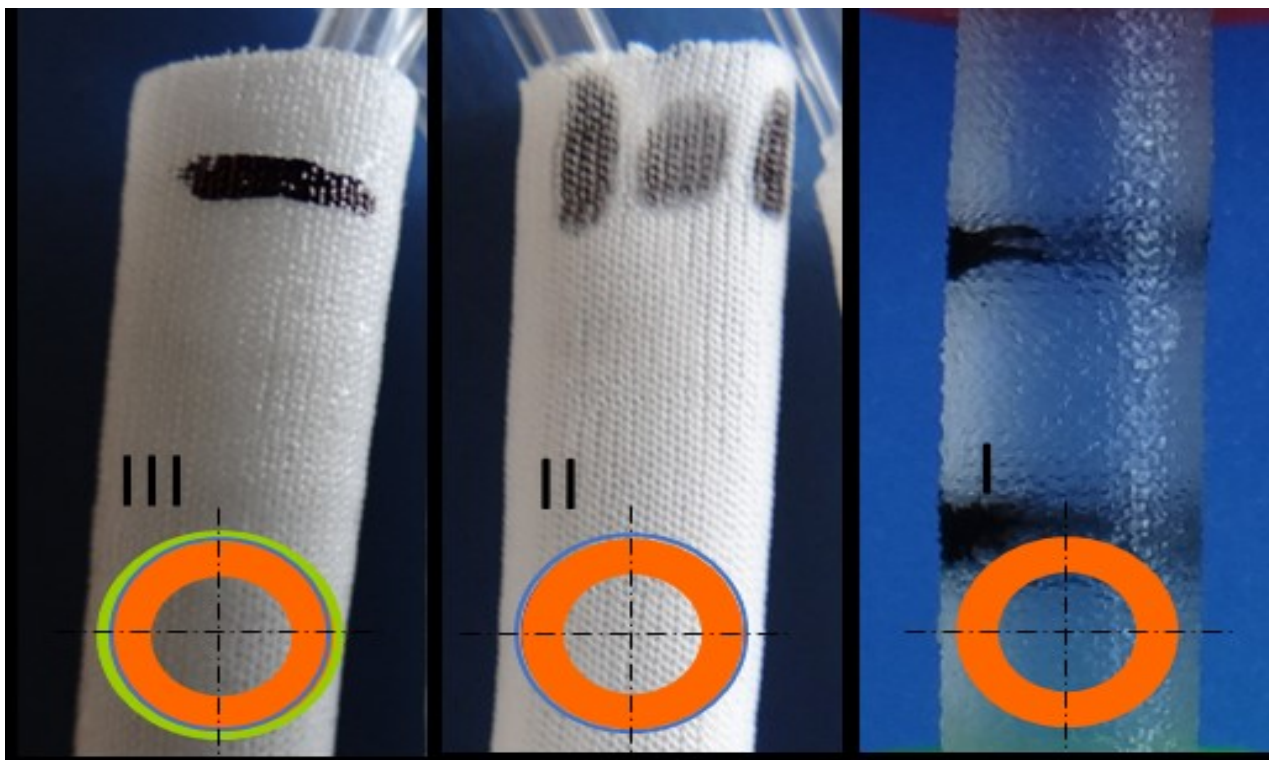
### **1. Příprava materiálu, extruze 1. vrstvy**

Kolagenní hmota byla v zchlazeném stavu umístěna do extruzního válce. Válec byl před extruzí zamrazen na -20 °C, aby udržoval kolagenní hmotu ve studeném stavu a zabránil jejímu ohřevu během extruze. Pro extruzi byly použity silikonové hadičky vnějšího průměru 4,8 mm, vnitřního průměru 1,5 mm a nerezové dráty průměru 1 mm. Pro extruzi byla použita extruzní hlava velikosti 5 mm a tvarová hlava velikosti 7 mm. Jako mazivo všech kluzných vrstev byl použit glycerol.

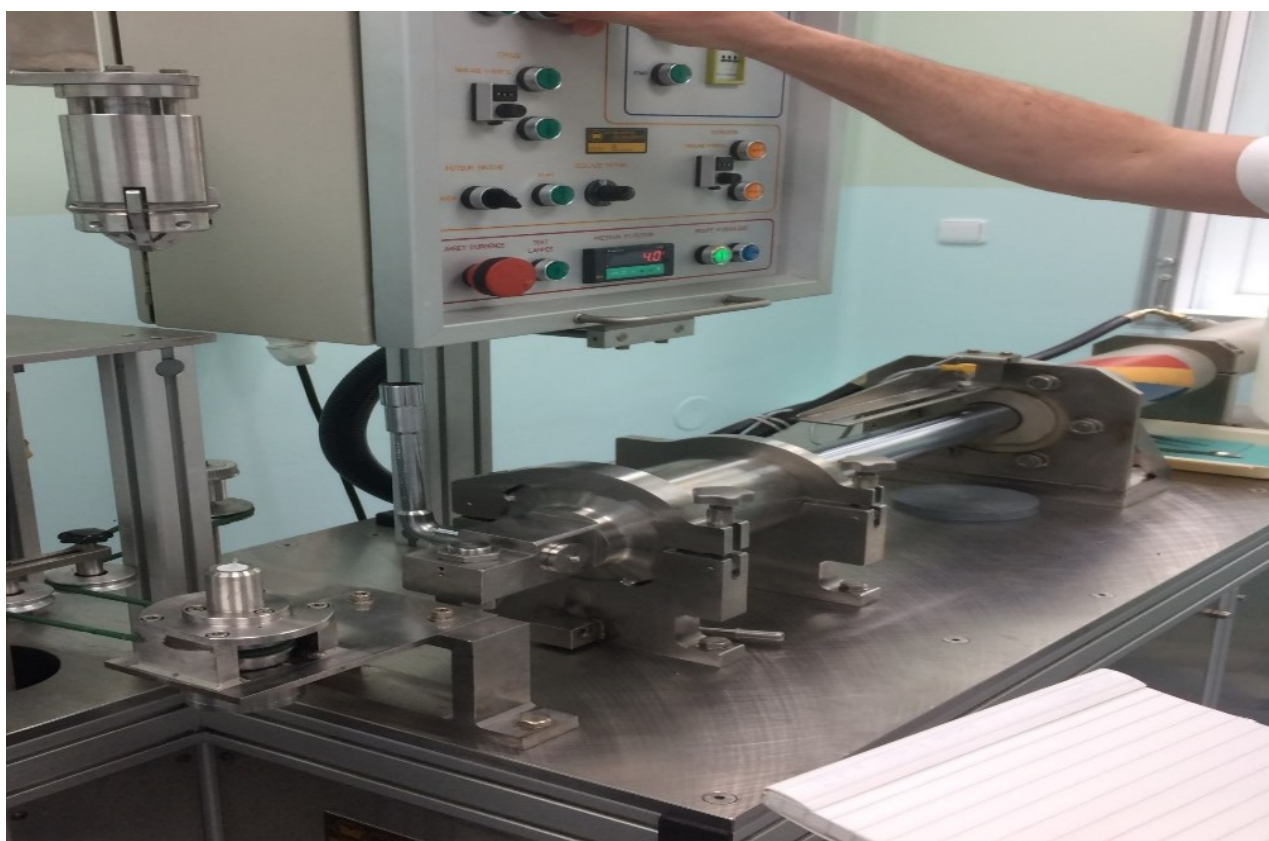
Další parametry: výtlačná rychlost 200, odtahová rychlost 680, otáčky extruzní hlavy 7/po směru

### **2. Navlečení pleteniny na 1. vrstvu a extruze 2. vrstvy**

Vyfixovaná pletenina byla natažena na hadičku s 1. kolagenovou vrstvou. Pro extruzi 2. vrstvy byla použita kolagenní hmota stejné kvality i koncentrace jako při extruzi 1. vrstvy. Pro extruzi byla použita extruzní hlava velikosti 6 mm a tvarová hlava velikosti 7 mm. Jako mazivo všech kluzných vrstev byl použit glycerol. Další parametry: výtlačná rychlost 200, odtahová rychlost 680, otáčky extruzní hlavy 7/proti směru.



Obr. 9: struktura a postup výroby kompozitní kolagenové trubice



Obr. 10: Extruzní zařízení pro extruzi rybího kolagenu



*Obr. 11: Extruze rybího kolagenu z matrice na silikonovou trubici.*

3. Doba sušení mezi extruzí 1. a 2. vrstvy byla 24 hodin.

Pro spojení obou kolagenových vrstev je možné použít ručně nanášenou lepicí mezivrstvu z kolagenu stejné kvality a koncentrace. Tato mezivrstva je ručně zpracována do pleteniny navlečené na 1. vrstvě. Toto bylo zkoušeno u několika protéz šarže 51. Nicméně nebylo prokázáno, že nanášení lepicí mezivrstvy zvyšuje soudržnost obou vrstev. Proto při výrobě šarže 61 bylo od tohoto postupu zcela upuštěno.

### **3.6.2. Technologický postup vytvrzování (síťování) protéz**

Síťování kolagenu je klíčový technologický proces, který vede ke zvyšování stability kolagenních struktur. Tímto procesem ovlivňujeme bobtnavost, stupeň denaturace, počet příčných vazeb mezi jednotlivými kolagenovými vlákny a tím přímo ovlivňujeme dobu vstřebávání takto upraveného kolagenu. K tvrzení používáme certifikovaná síťovadla, která mají certifikát pro výrobu implantátů. Zcela zásadní je také kontrola stupně vytvrzení, kterou objektivně hodnotíme pomocí speciálního zařízení a kontrolujeme takzvanou Teplotu smrštění ( $T_s$ ). Vlákna nativního kolagenu se při stoupající teplotě smršťují v případě bovinního kolagenu při teplotách mezi 30 - 40°C v případě rybího kolagenu je teplota smrštění nativního kolagenu podstatně nižší kolem 20 - 21°C. Úměrně se stupněm vytvrzení



vzrůstá i teplota smrštění kolagenu, ke kterému dochází náhle a je dána zejména kvalitou vzorku, ale také rychlostí vzestupu teploty. Na měření teploty smrštění jsme použili přístroj zkonstruovaný ing TOMISEM z předchozího projektu.

Vrátím se tedy k pokračování technologického postupu tvrzení: po extruzi 2. vrstvy byly protézy volně sušeny po dobu 24 hodin. Poté byly staženy ze silikonových hadiček a nastříhány na požadované délkové parametry. Byl připraven vytvrzovací roztok (směs fenolformaldehydové pryskyřice a DEMI vody ve stanoveném poměru). Protézy byly umístěny do vytvrzovací lázně po stanovenou dobu. Po vytvrzení byly protézy důkladně omyty v DEMI vodě a umístěny na sušicí stojan, kde byly volně sušeny po dobu 24 hodin.

### **3.6.3. Technologický postup - měkčení protéz**

Vytvrzené protézy byly následně vyměkčeny ve směsi glycerol + DEMI voda ve stanoveném poměru. Doba měkčení byla u protéz šarže 51 stanovena na 60 minut a u protéz šarže 61 na 90 minut. Doba měkčení byla stanovena operativně vizuální a mechanickou zkouškou ohebnosti během samotného procesu měkčení. Po měkčení byly protézy důkladně opláchnuty v DEMI vodě a zavěšeny na sušicí stojan, kde byly volně sušeny po dobu 30 minut.

### **3.6.4. Balení protéz**

Jednotlivé protézy byly umístěny do obalů PMS Steripack 100 × 400 mm a obaly zataveny pomocí ruční tavící žehličky. Jednotlivé obaly byly opatřeny příslušným identifikačním štítkem a umístěny společně do papírového přepravního kartonu

### **3.6.5. Radiační sterilizace a transport**

Veškerý transport zabalených protéz byl realizován v autochladničce s teplotou 4°C. Radiační sterilizace byla provedena firmou Bioster, a.s. Příslušné radiační dávky jsou uvedeny v protokolu o obdržené dávce.

## **4. VÝSLEDKY – EXPERIMENT NA VELKÝCH LABORATORNÍCH ZVÍŘATECH**

### **4.1. Implantace cévních protéz experimentálními zvířaty**

Experimenty, jejich analýzy a výsledky testů, jak kolagenu samotného, prototypu cévních protez nebo kolagenních pěn „in vitro“, jsou popsány v předešlých kapitolách. V této kapitole jsou popsány

provedené experimenty s prototypy cévní protezy z kolagenu sladkovodních ryb na velkých laboratorních zvířatech.

Všechny experimenty byly prováděny v souladu s podmínkami uvedenými v souhlasu se schválením pokusů Komise proti týrání zvířat a následným souhlasem Ministerstva zdravotnictví. Všichni přímí účastníci experimentů jsou držiteli licence pro práci s experimentálními zvířaty.

Všechny experimenty včetně předoperační a pooperační péče o pokusná zvířata byly prováděny ve speciální laboratoři/operačním sále v prostorách Fyziologického ústavu 1. lékařské fakulty UK.

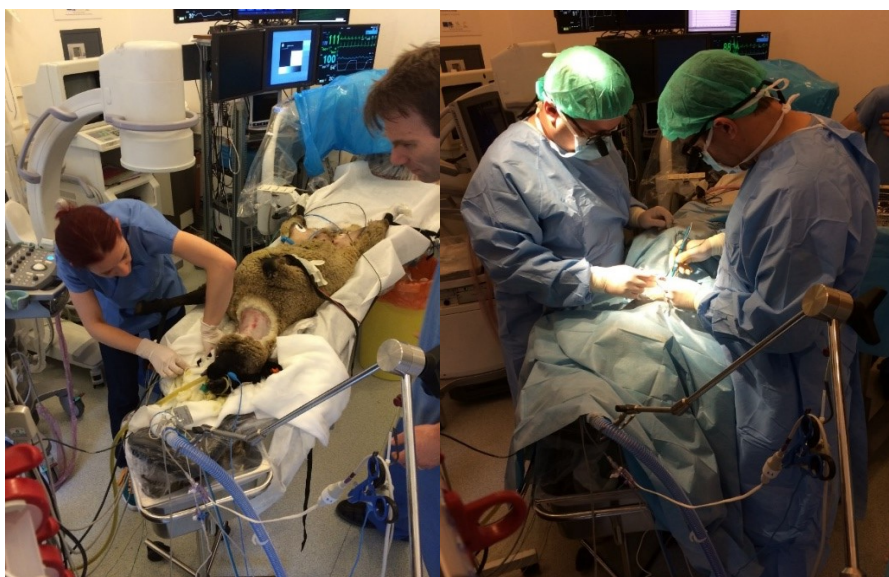


*Obr. 12: Experimentální laboratoř, ovce po úvodu do anestezie.*

Pokusným zvířetem, kterému byly implantovány prototypy cévních protez byly ovce obého pohlaví, různé váhy, dodané z kontrolovaného chovu s platným veterinárním osvědčením.

Pokusné zvíře bylo před vlastním pokusem nejméně týden aklimatizováno ve zvěřinci Fyziologického ústavu 1. LF UK a nejméně 24 hod před operačním výkonem mělo k dispozici pouze vodu. K premedikaci ovcí byl použit Ketamine a Xylazin v odpovídající dávce k váze zvířete. Během operačního výkonu byl standartně používán k anestezii Propofol a bolus Morfinu. V pooperačním období byl podáván Morfin subkuánně a nesteroidní antiflogistika dle potřeby zvířete. Z antiagregační léčby byl ovcím podáván per os tabletky Anopyrinu v dávce 100mg 1x denně.

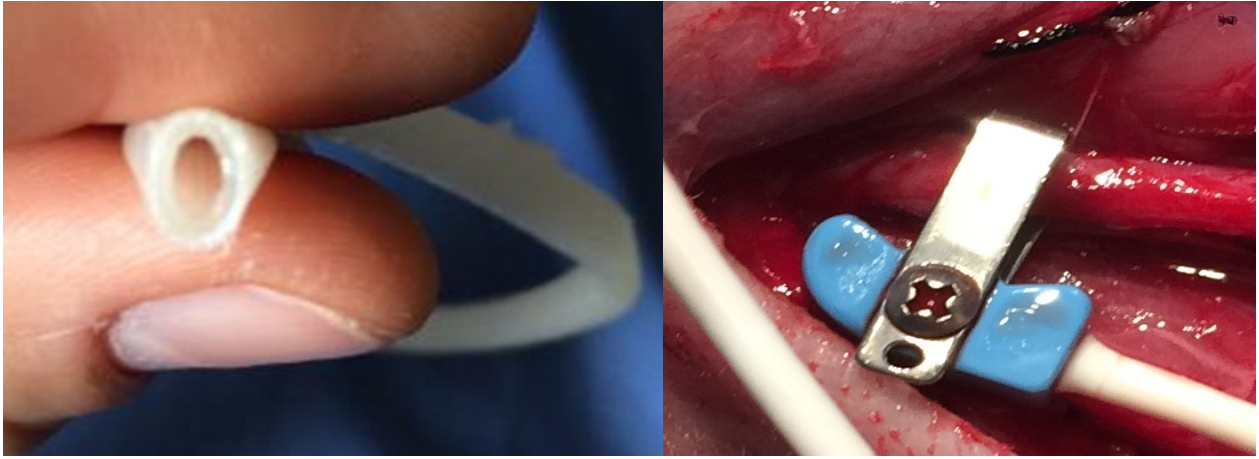
Vlastní výkon začal napolohováním ovce na záda, zavedením intratracheálního roury a zajištěním intravenozních přístupů včetně invazivního intraarteriálního měření tlaku. Byly napojena zařízení k monitoraci vitálních životních fcí a poté byla oholena přední část krku v celém rozsahu, kde byl proveden chirurgický řez.



*Obr. 13: Operační výkon prováděli současně vždy 3 chirurgové (Doc.Grus, Dr.Špaček, Dr.Mitáš). Podélným řezem na vnitřní straně m. sternocleidomastoideus byly vypreparovány obě společně a. carotis v maximální možné délce, která se pohybovala kolem 15 – 20 cm.*

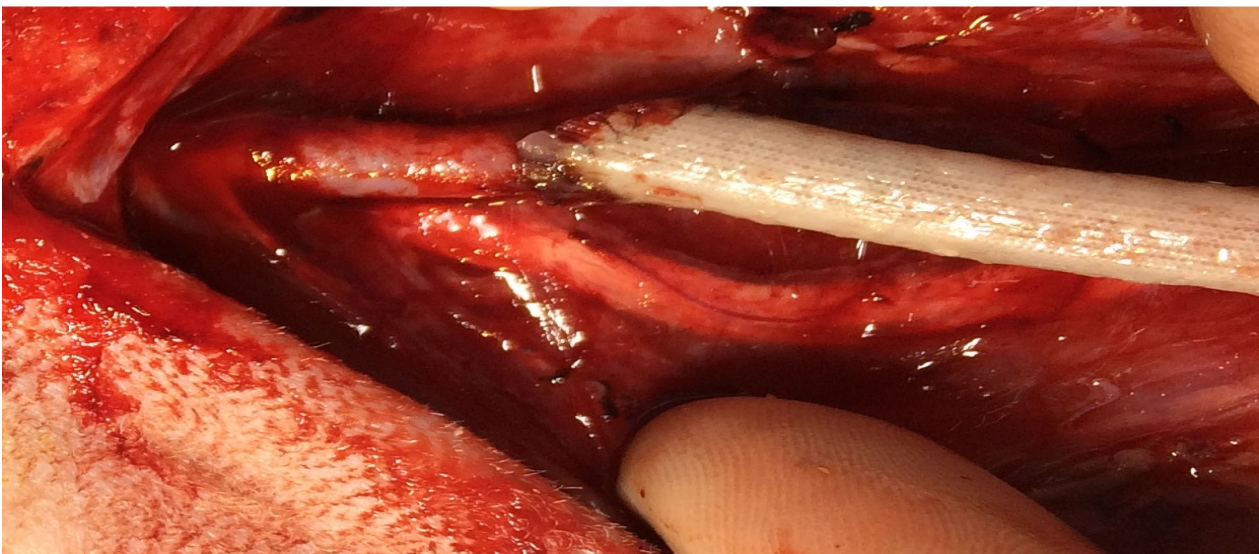


*Obr. 14: Následovalo měření a zaznamenání průtoku ultrazvukovou sondou nasazenou postupně na obě a. carotis.*



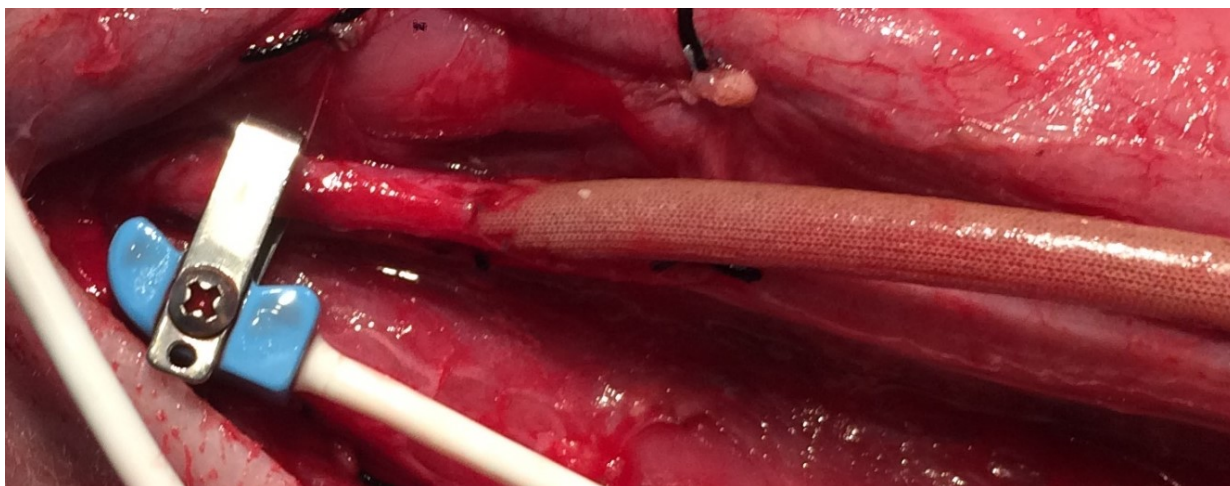
*Obr.15 A+B: Prototyp kompozitní třívrstevné cévní protezy z rybího kolagenu před implantací*

Po změření průtoku a i.v. podání Heparinu v dávce 1,5mg/kg byla karotida podvázána ponechána in situ a byly naloženy svorky na a carotis comunis. Následně byl proveden bypass prototypem protezy z rybího kolagenu sladkovodních ryb s anastomózami end to side, kerý byl dlouhý cca 8-15 cm. Vždy jsme se snažili dle délky krku ovce o našítí co nejdelšího bypassu.



*Obr. 16.: Distální anastomoza prototypu cévní protézy napojená na arteria carotis communis.*

Po obnovení průtoku bypasseem jsme opět provedli měření průtoku ultrazvukovou sondou za distální anastomózou bypassu. Vždy na levé straně byla ponechána takto našitá proteza s nativním průtokem a na pravé straně jsme průtok do bypassu za dist anastomózou zužovali pomocí naložení speciální plastické pásky na a. carotis, cca 1 cm za distální anastomózou s cílem snížení průtoku krve bypasseem. Tento průtok jsme snižovali na hodnoty kolem 100ml/min při tlaku 120/80mmHg



Obr. 17: Měření průtoku za distální anastomózou bypassu přemostujícího uzávěr arteria carotica communis ultrazvukovou sondou.



Obr. 18: 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 stenozu 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

U části zvířat byla tato sonda ponechána „in situ“ pod distální anastomózou na a carotis cca 1 cm distálně ve směru toku krve od zužující plastikové pásky a bylo prováděno kontinuální měření průtoku po dobu života ovce nebo po dobu průchodnosti rekonstrukce pro kontinuální měření toku zúženou stranou. Po zástavě krvácení byly operační rány suturovány vstřebatelným vláknem a ovce po probuzení byly předány veterináři do pooperační péče.

V průběhu jednotlivých fází experimentu byla prováděna fotodokumentace a u všech ovcí byl vyplňován operační a pooperační protokol, který jsme používali již v předchozím projektu:

**GRANT –exper.PROTOKOL**

**OVCE č.** **Datum :**

**Přivezena :**  
**Anestezie :**

---

<p><b>A.CAROTIS DX</b></p> <p><b>Operatér :</b> <b>Průtok před rek.</b> <b>Protéza :</b> <b>Typ rekonstrukce :</b> <b>Průtok :</b></p> <p><b>Průběh operace :</b></p>	<p><b>A.CAROTIS SIN.</b></p> <p><b>Operatér :</b> <b>Průtok před rek. :</b> <b>Protéza :</b> <b>Typ rekonstrukce :</b> <b>Průtok :</b></p> <p><b>Průběh operace :</b></p>
---	---

---

<b>SLEDOVÁNÍ</b>					
Datum	Způsob	Výsledek	Datum	Způsob	Výsledek

**Ukončení experimentu, datum, výsledek, histologie na druhou stranu**

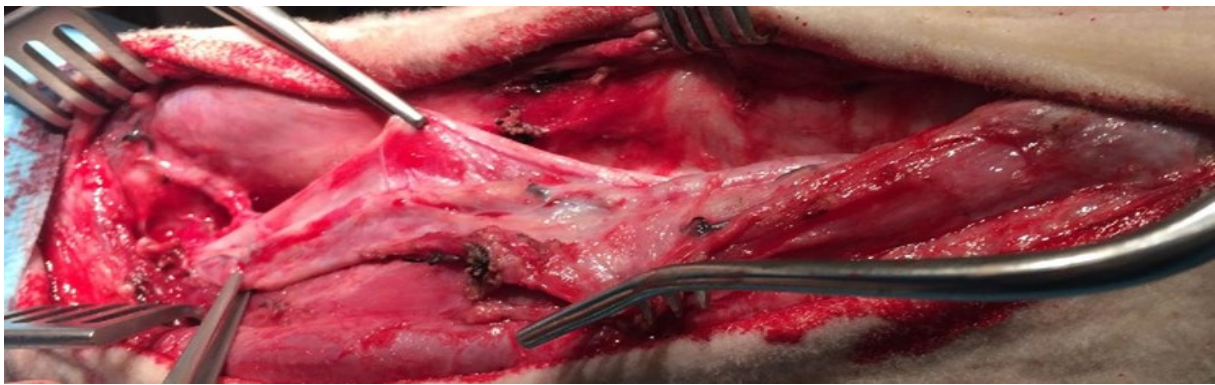
*Obr. 19: Protokol měření u experimentu na zvířatech*

V následujícím pooperačním období byly ovce kontrolovány a ošetřovány týmem asistenta MUDr Mlčka spolu s veterinářem, který zajišťoval pravidelné podávání léčiv, pravidelné kontroly průtoku krve implantovanými pototypy cévních protéz, jak pomocí ultrasonografie, tak pomocí implantovaného ultrazvukového průtokoměru. Sledování probíhalo v pravidelných intervalech: v den implantace, 3 den po implantaci a dále 1x týdně, pokud nebyla na bypassu zjevná patologie či pokles průtoku, kdy jsme ovci vyšetřovali denně.

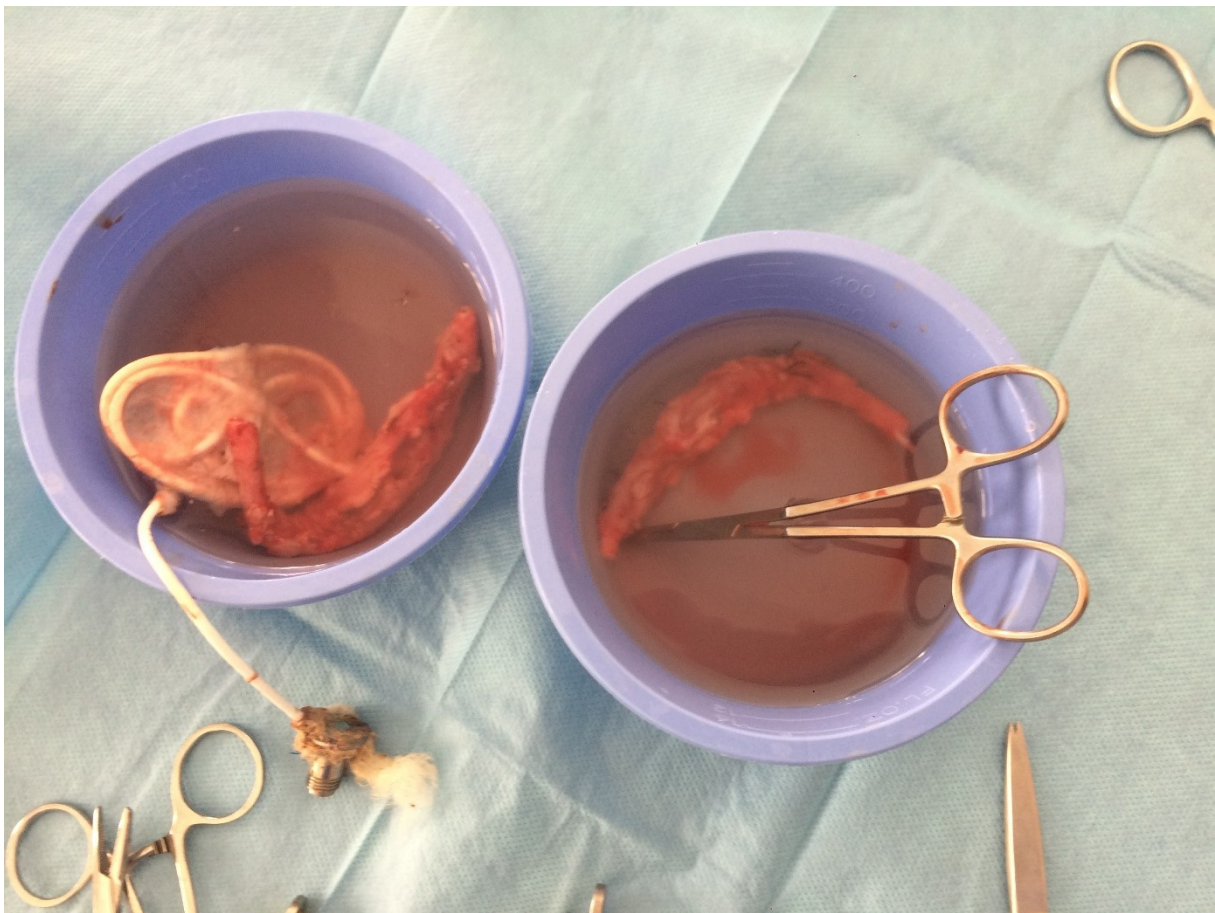


*Obr. 20: Kontrolní sonografie a měření průtoku v nativním řečišti před terminací experimentálního zvířete. Kontrola průtoku cévního prototypu před explantací.*

V případě uzávěru bypassu byla provedena terminace ovce a protéza explantována, rozetnuta a vyšita na speciální destičku, provedeno makroskopické hodnocení včetně fotodokumentace a vložena do nádoby s formolem a odeslána k histologickému vyšetření. Maximální doba přežívání ovcí byla stanovena na 1 rok poté byla ovce terminována a opět vyjmuté karotidy s bypassem odeslány na histologické vyšetření



*Obr. 21: Explantace velmi dobře vhojeného prototypu cévní protézy.*

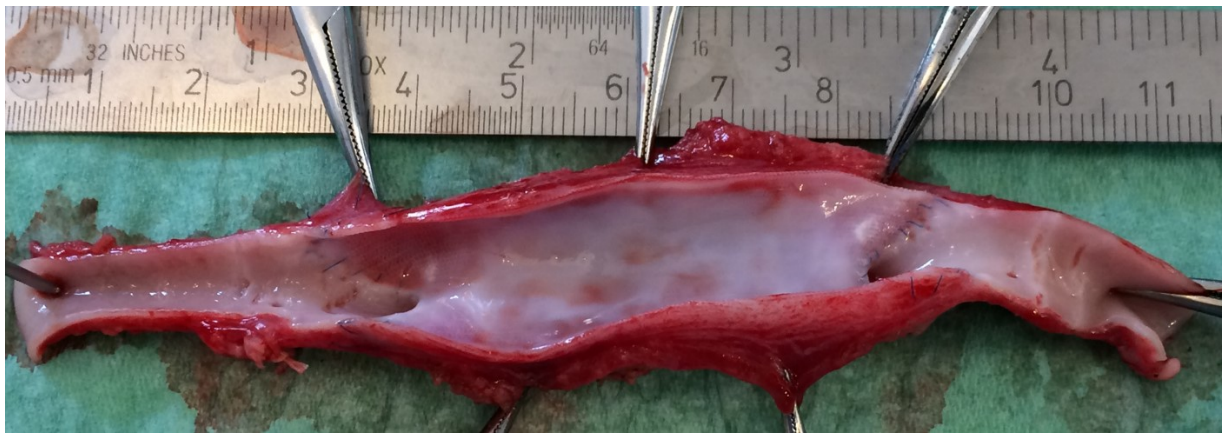


*Obr.22: Explantované prototyp cévní protézy s implantovanou permanentní ultrazvukovou sondou.*



*Obr. 23: Upevnění explantované cévní portezy na destičku před histologickým vyšetřením.*





Obr.24: Explantovaná cévní proteza s přilehlými useky a carotis comm krásně vhojená s minimální hyperplasií v obl anastomoz s překrásnou neoendotelizací intralum povrchu protezy.



Obr. 25: Histologické vyšetření explantovaných prototypů cévních protéz bylo prováděno doc. Honsovou na pracoviště klinické a transplantační patologie IKEM v Praze.



Obr. 26: Histologické vyšetření explantované cévní protezy: a) celistvá kolagenní vrstva (ornžová šipka) intralumínálně, b) vlákna pleteného scaffoldu (modrá šipka), c) zevní vrstva protezy dobře vhojena s okolím kde patrná neovaskularizace (zelená šipka)

## **4.2. Shrnutí výsledků experimentu na velkých laboratorních zvířatech:**

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 protez z 13-ti implantovaných tedy 84,6%. Tedy dlouhodobá průchodnost prototypů cévních protéz z rybího kolagenu třeboňského kapra byla srovnatelná s průchodností protezy Cybergraft z bovinního kolagenu i v tomto malém souboru implantovaných cévních protéz (80% v.s. 84,6%).

No	Anamni ID	sex	U/R	datum příjmu	datum ukončení	Podtyp úzvy	výsledky (dn)	Přechodnost	Geol. Odkaz	Baseline (ml/min)	ART Baseline (mmHg)	post implant (ml/min)	ART postimplant (mmHg)	Znění (Y/N)	Flow znění (ml/min)	ART po znění (mmHg)
1	2017-801	F	L	01-Mar-17	2-Mar-17	1	Collido	0 OK		230	90/70	170	100/82	N		
			R		rozostři se z praxe			0 OK		170	95/71	200	106/88	Y		
2	2017-802	F	L	22-Mar-17	20-Dec-17	275	Collido	275 anastomozí OK, uprostřed narazena		400	122/96	235	122/103	N		
			R					275 anastomozí OK, uprostřed narazena		450	120/96	240	114/99	Y	480	123/105
3	2017-803	M	L	06-Apr-17	15-Jun-17	75	Collido	75 anastomozí OK		550	104/89	415	94/83	N		
			R		terminec pro uzavření blizny			75 anastomozí OK		540	103/90	480	93/83	Y	100	100/89
4	2017-804	M	L	19-Apr-17	21-Apr-17	2	Collido	2 anastomozí OK		190	119/84	180	110/88	N		
			R		rozostři se z praxe			2 anastomozí OK, tromboza ve střední části blizny		192	119/99	177	105/95	Y	100	96/88
5	2017-807	F	L	03-May-17	11-May-17	192	Collido	192 anastomozí OK, pro nízkou hypotenzii, potřeba uprostřed velmi (vlnitá, bez neohlmý, plněná dlaněma, strana a okolí se zděsou)		400	96/80	230	72/56	N		
			R		úhyn, neohlmý, plněná neohlmý			192 anastomozí OK, uprostřed (vlnitá, bez neohlmý, strana a okolí zde se zděsou)		220	102/80	280	97/75	Y	80	87/70
6	2017-809	F	L	19-May-17	13-Dec-17	208	Collido	208 anastomozí OK		360	105/86	450	120/90	N		
			R					208 anastomozí OK		320	98/78	440	105/89	Y	120	101/88
7	2017-810	F	L	24-May-17	14-Jul-17	51	Collido	51 uzavřen (hyperplast anastomozí)		320	120/100	330	120/96	N		
			R		terminec pro uzavření blizny			51 uzavřen (blizna velmi křehká, potřeba úzvy > 100g protahy?)		270	120/114	250	90/85	Y	70	87/78
8	2017-811	F	L	07-Jun-17	8-Jun-17	1	DCM	0 OK		380	109/89	300	100/80	N		
			R		rozostři se z praxe			0 OK		520	109/87	400	97/82	Y	70	82/72
9	2017-812	F	L	14-Jun-17	18-Jun-17	5	DCM	5 přechodná anastomozá zblízka		700	120/95	590	102/87	N		
			R		neohlmý!			5 přechodná anastomozá dle blizny		300	120/90	520	93/82	Y	50	81/70
10	2017-813	M	L	19-Jun-17	23-Jun-17	136	DCM	136 blizna		400	104/80	420	103/86	N		
			R		terminec pro uzavření blizny			136 uzavřen		460	108/85	620	97/83	Y	90	93/80
11	2017-814	M	L	28-Jun-17	12-Jul-17	14	DCM	14 uzavřen (tromboza v anastomozě?)		410	152/113	480	137/109	N		
			R		terminec pro uzavření blizny			14 uzavřen (tromboza v anastomozě?)		500	152/112	380	125/103	Y	100	138/105
12	2017-815	F	L	12-Jul-17	2-20-17	82	DCM	427 uzavřen		180	108/85	280	120/100	N		
			R		terminec pro uzavření blizny			419 uzavřen		170	106/80	240	115/99	Y	150	115/100
13	2017-816	F	L	17-Jul-17	18-Jul-17	1	DCM	1 vs. vyztáhná trombóza (uzavřen?) (dla anastomozí) (viz foto)		220	108/80	210	112/84	N		
			R		úhyn 1.2. příčiny dechu			1 po 1. dni průchodu		210	109/80	200	117/88	Y	120	117/86
14	2017-817	F	L	20-Sep-17	12-Oct-17	22	DCM	22 uzavřen 2. den, anastomozá OK, sekce hyperplázie		290	120/98	180	125/90	N		
			R		terminec pro uzavření blizny			22 uzavřen 2. den, anastomozá OK, sekce hyperplázie		290	120/98	300	145/100	Y	80	137/95
15	2018-803	F	L	31-May-18	8-Jun-2018	7	DCM	5 dní uzavřen		300	110/90	200	80/65	N		
			R		terminec pro uzavření blizny			6 dní uzavřen		240	80/60	150	99/85	Y	100-110	110/80
16	2018-804	F	L	31-May-18	8-Jun-2018	7	DCM	5 dní uzavřen		190	160/130	205	155/130	N		
			R		terminec pro uzavření blizny			4 dní uzavřen		210	160/130	160	145/125	Y	110	150/130

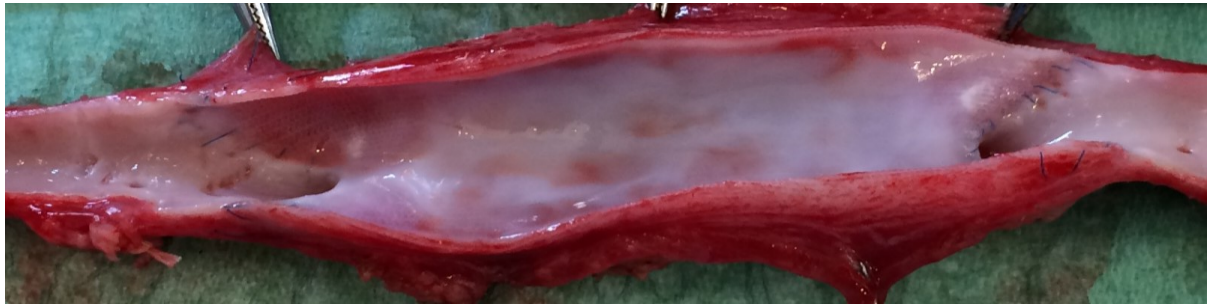
Tabulka 3: Přehledná prezentace výsledků experimentu.

V průběhu experimentu jsme se setkali s několika problémy, které se týkali omezení průtoku, poměrně vysokého počtu zvířat, které se nezotavili z anestezie, neprospíváním zvířat v časném pooperačním období, proto byla časně terminována, a také některými úskalími, týkající se konstrukce vlastní cévní protezy, které vedly k předčasnému odbourání kolagenu, kdy ještě nedošlo k prorůstání fibroblastů do pleteného scaffoldu. Tím, že protéza nebyla z intraluminálního povrchu ještě přeendotelizována a ze zevnějška nedošlo ještě k vhojení, došlo u prvních prototypů cévní protezy k nahrnutí pleteniny ve střední části protezy krevními pulzacemi.



*Obr. 27: Explantované cévní protéza s endotelizace z okrajů a ve střední části s nařasením pleteniny při časném odbourání kolagenu, kdy ještě v této části nedošlo k prorůstání fibroblastů do pleteného scaffoldu.*

Po určitých technologických úpravách kolagenu typu 1 jsme se již s tímto problémem nesetkali.



*Obr.28: Cévní proteza po úpravě kolagenu s přeendotelizováním v celé délce protezy, kde došlo k dobrému prorůstání fibroblastů z okolí do pleteného scaffoldu, aniž by došlo k odbourání vnitřní vrstvy kolagenu*

Cévní protézy z rybího kolagenu s kolagenem typu 2, který byl po stránce mechanických vlastností velmi dobrý (dobrý v ohybu bez zalamování, vlastnostmi podobné silikonové hadici, nerozlepování vrstev od sebe, kolagen se nepoškodil při uchopení do pinzety,...) avšak docházelo k časnému uzavěru cévních protez v důsledku vzniku nástěnné intraluminální trombozy poměrně časně po implantaci. Tyto protezy se stejně dobře vhojovali jako protezy s kolagenem typu 1.

Další určitým problémem byla hodnota sníženého průtoku protézou nastavenou při implantaci protézy u pokusného zvířete, které v danou chvíli bylo v celkové anestezii. Průtok je dán rozdílem tlaků mezi oblastmi proximálně a distálně od zúžení a je významně ovlivňován periferní rezistencí.

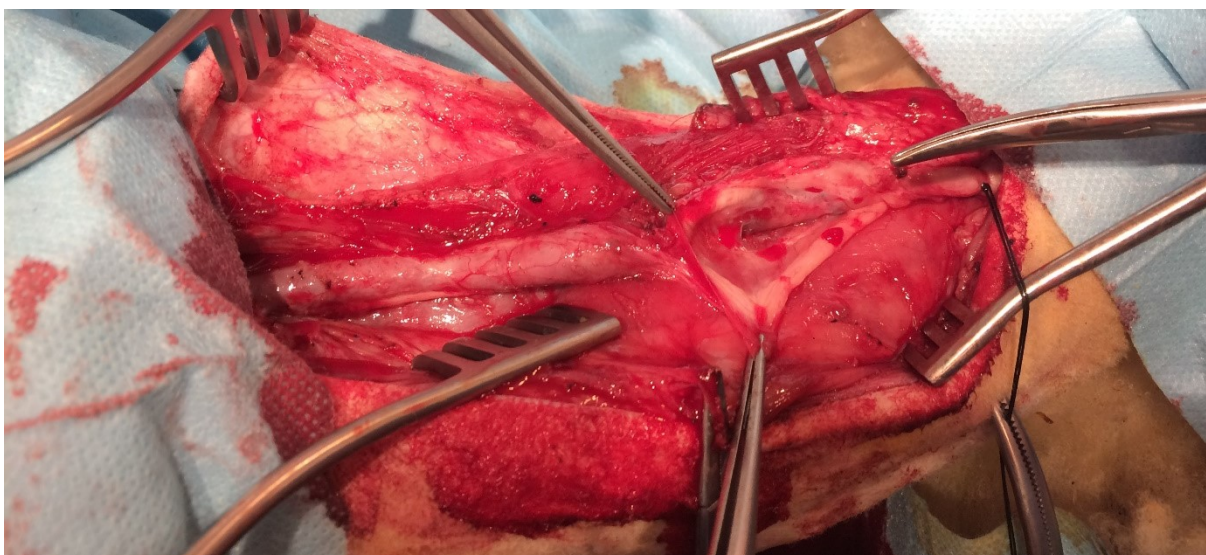
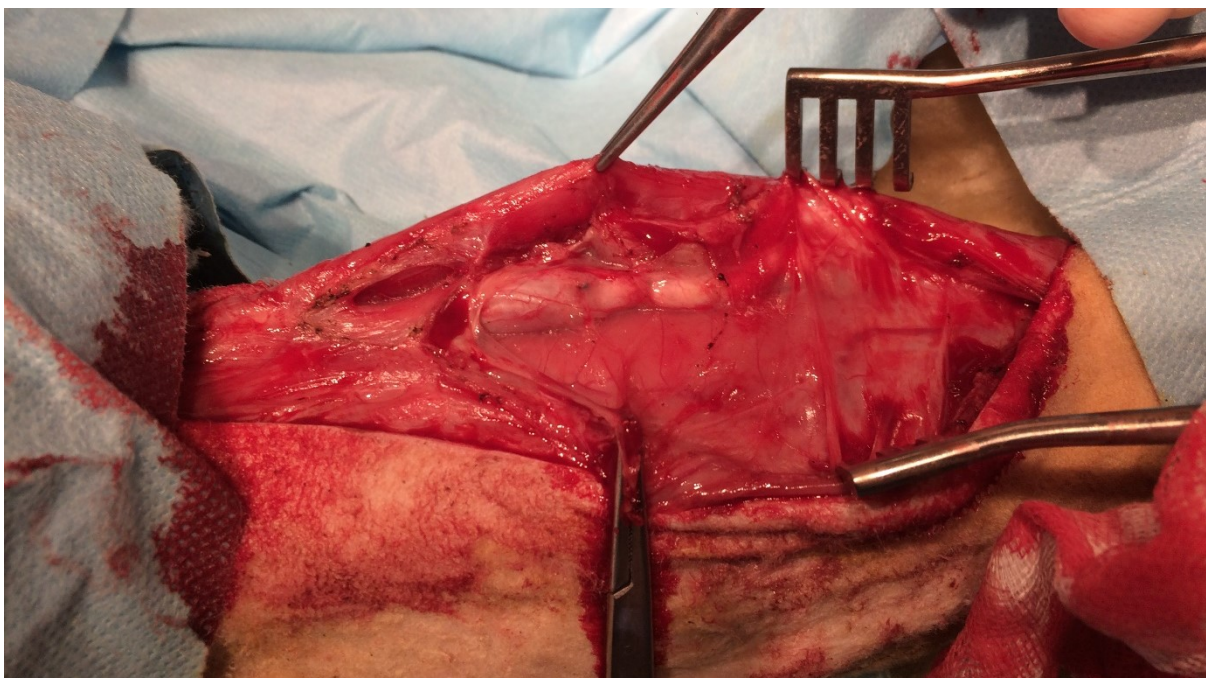
Ovce, která neměla ateroskleroticky postižené karotické tepenné řečiště reagovala na snížení průtoku jinak, než bychom očekávali u člověka s tepnami postiženými aterosklerózou. Docházelo tak po probuzení z anestezie do několika hodin ke zvýšení průtoku bypassem, z hodnot kolem 100ml/min nastavené peroperačně, na hodnoty kolem 200ml/min. Nicméně i průtok bypassem kolem 200ml/min je považován za kritickou hranici pro vznik intraluminální nástěnné rombozy s rizikem postupného uzávěru rekonstrukce.

U implantovaných prototypů cévních protez z rybího kolagenu jsme hodnotili několik parametrů, které jsme mezi sebou vzájemně porovnávali:

- vhojování
- průchodnost
- prospívání zvířete
- stavu protézy po explantaci - makroskopické a mikroskopické hodnocení (histologie)

### **Vhojování:**

Řadou pokusů, jak bude zmíněno níže, bylo v pokusech na myších prokázáno že se i prosítvaný kolagen z pleteného scaffoldu odbourává a s přítomností infekce dochází až k úplné a poměrně časně destrukci kolagenních vláken. Pokud budeme hovořit pouze o vstřebávání kolagenní hmoty, má na tento proces nezanedbatelný vliv především její hydratace. Nesítvaná kolagenní hmota pak poměrně rychle začne ztrácet svoji mechanickou pevnost a čím více vody začne obsahovat, tím rychlejší je její odbourávání, kdy k úplnému odbourání dojde v řádu několika hodin. Právě procesy tvrzení se tato skutečnost dá do určité míry eliminovat. Různý stupeň síťování vede ke zpomalení hydratace a tím i zpomalení odbourávání kolagenní hmoty. Implantace cévní protezy do podkoží myší bez přítomnosti infekce nás informovala o mezenchymální reakci a způsobu rychlosti resorbce kolagenu z pleteného scaffoldu. Pletený scaffold cévní protezy svojí hustotou umožňoval dostatečné prostoupení vazivovou tkání, která má významný vliv pro následné formování pseudointimy. Námi síťovaná kolagenní hmota se v největší míře odbourává mezi 3-4 týdnem po implantaci, kde hlavní podíl na resorbci mají proteolytické enzymy a výraznou buněčnou reakci o níž bude zmíněno v mikroskopickém hodnocení, nejspíše způsobuje použité síťovadlo. Jak již bylo zmíněno výše, vhojování obou prototypů cévní protezy s rybím kolagenem typu 1 a 2 bylo velmi dobré i při uzávěru cévní protézy.



*Obr. 29 A+B: Preparace vhojené cévní náhrady – reoperace.*

**Průchodnost:** v případě typu 1 byla podstatně lepší, i když mechanické vlastnosti byly horší než u typu 2. Docházelo relativně brzy v průběhu několika dní po implantaci k odbourávání kolagenu typu 1 a došlo tak jak již bylo zmíněno výše k nahrnutí pleteného scaffoldu pseudomedie zejm. v oblasti střední části protezy, i přesto však u typu 1 nedošlo k uzávěru cévní protezy. Klíčovým momentem v tomto případě u prvních prototypů s kolagenem typu 1 byla úprava kolagenu, který se pomaleji odbourával a bylo tak umožněno postupné vrůstání fibroblastů z okolní tkáně protézy do pleteniny spolu s postupným, pomalejším odbouráváním kolagenu pseudoadventicie.

**Prospívání pokusných zvířat:**

Pooperační péče odpovídala schválenému projektu pokusů a zahrnovala zejména podávání látek na tlášení bolesti a probiotik na co nejrychlejší obnovení normálního trávicího procesu. Doba podávání

byla 3-5 dní. Hojení ran bylo denně sledováno. Průchodnost protéz byla pravidelně sledována sonograficky. Naprostá většina zvířat se rychle zotavila. V případě časných uzávěrů implantovaných protéz jsme pozorovali potíže s rovnováhou, které měly tendenci se zlepšovat. U přibližně třetiny zvířat nastaly komplikace v pooperačním období, především neobnovení zažívání a v jednom případě plicní edém, které vzdor poskytnuté intenzivní péči vedly k předčasnému úmrtí a/nebo rozhodnutí k terminaci. Terminována byla také zvířata, kde nastal oboustranný uzávěr implantátů

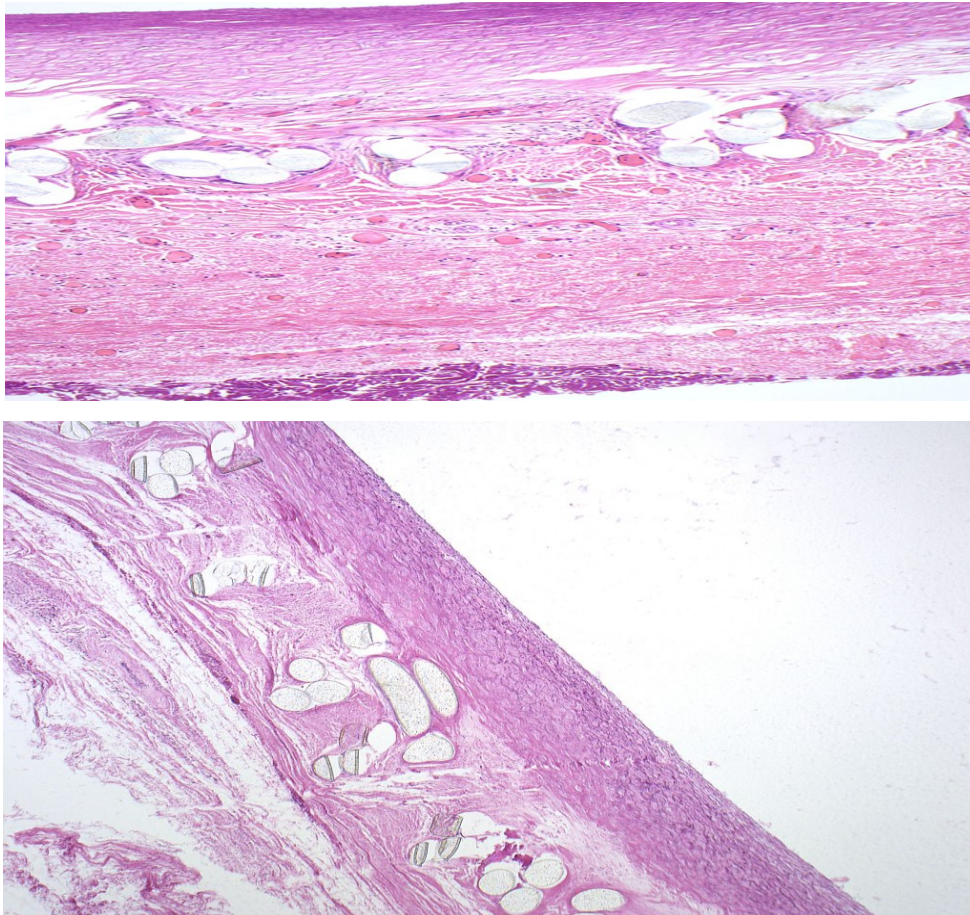
## **Stav protézy po explantaci**

### **Makroskopické nálezy:**

Z makroskopického hlediska pseudointima u cévní protezy typu 1 byla dobré kvality po technologické úpravě, kde jsme neshledali výrazné defekty či jiné nepravidelnosti vhojení s minimem případných nepravidelných trombů, které však nepůsobily omezení průtoku. Oblast pseudoadventicie byla velmi dobře vhojena, bez jakéhokoli infiltrátu či známek infekce s patrným prorůstáním do pleteného scaffoldu. Velmi cenným nálezem byla téměř nulová neointimální hyperplasie v oblasti cévních anastomóz, která bývá Achillovou patou rekonstrukcí a kterou můžeme jen velmi těžko ovlivnit. Tato neointimální hyperplasie vede k pozvolnému zúžení v oblasti anastomozy nebo těsně za ní a tím postupně k uzávěru a selhání cévní rekonstrukce. U našich protéz z rybího kolagenu se tento jev vyskytoval velmi ojediněle a oblast anastomozy a jejího blízkého okolí byla obvykle přeendotelizována, bez průkazu intimální hyperplasie. Výše uvedené je zcela jistě příznivým nálezem, ale z hlediska hemodynamiky a pokračování vývoje tohoto prototypu cévní protezy z rybího kolagenu treboňského kapra jsou nejcennější právě protezy, u nichž vznikly komplikace, které jsme byly nuceni v průběhu projektu řešit. Týkaly se jak vlastního kolagenu, tak i způsobu pletení polyesterové sítky tvořící oblast pseudomedie. Tyto problémy vedly k vylepšení a dalšímu poznání možností technologických úprav jak kolagenu samotného, tak i pleteného scaffoldu.

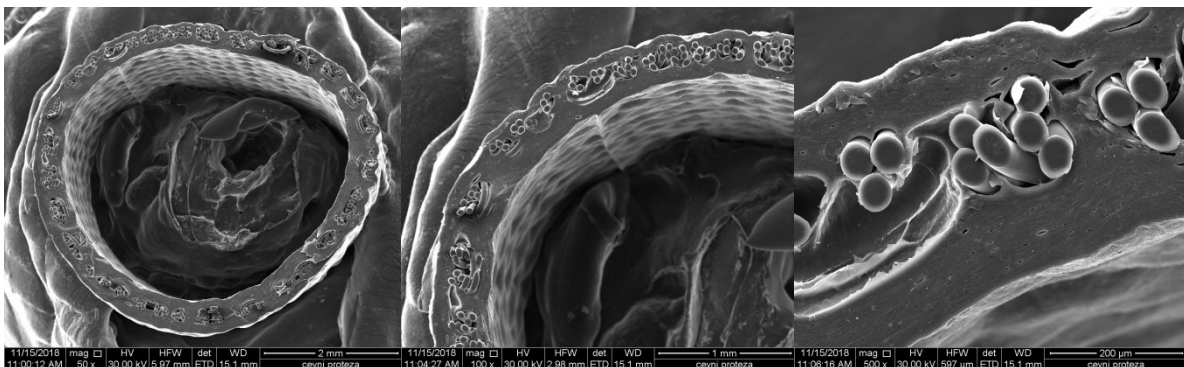
### **Mikroskopické nálezy:**

Prototypy cévních protéz z rybího kolagenu treboňského kapra byly tvořeny 3 vrstvami: vnitřní – pseudointima, střední – pseudomedie a zevní pseudoadventicie. V histologickém vyšetření je pseudomedie dobře viditelná a dobře morfologicky odlišná vzhledem k světlolomnému materiálu kterým je vlákno ze kterého byl upleten scaffold protezy



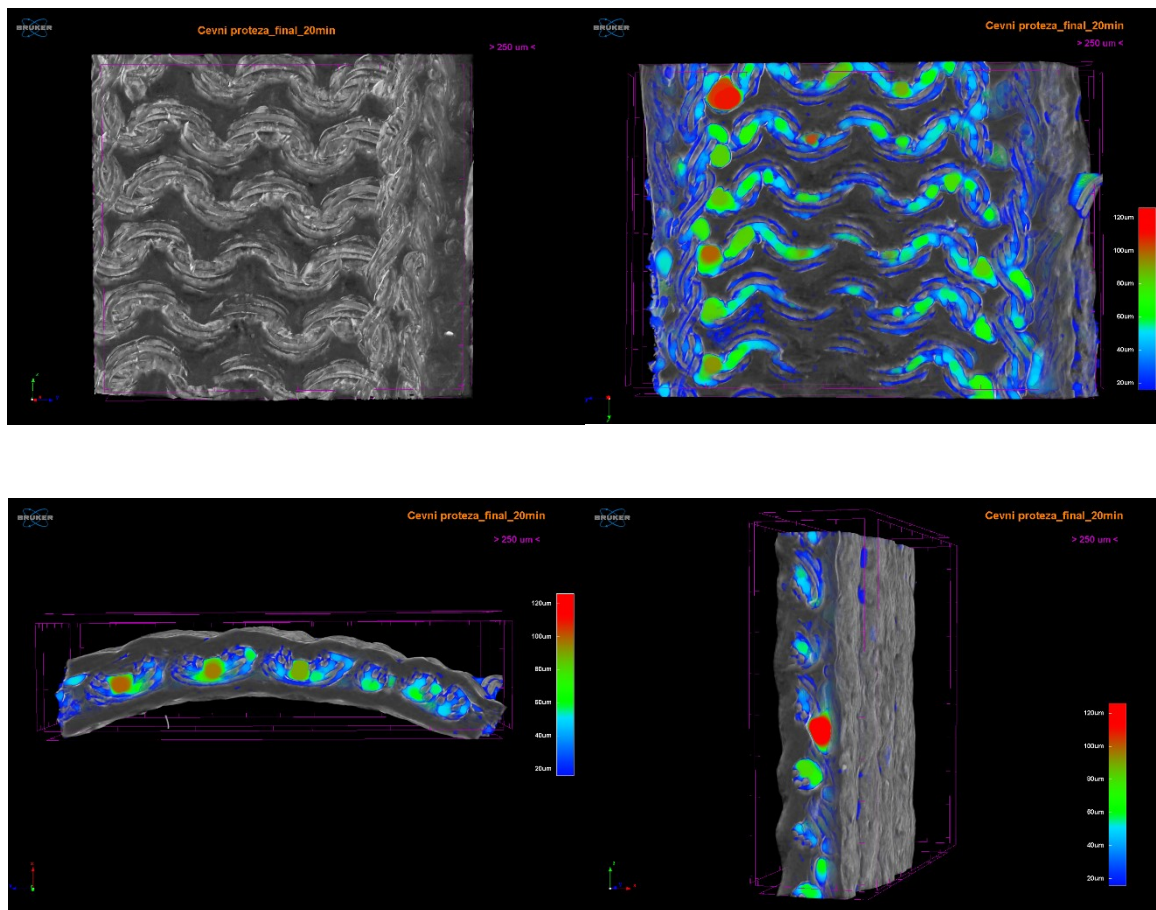
*Obr.30 A+B: Prázdné prostory na snímku jsou vlákna pletené sítě – pseudomedie – protézy a okolní tkán je pseudointima a pseudomedie tvořená rybím kolagenem.*

Vyrobené prototypy cévních protez z rybího kolagenu podstoupily i mikro CT vyšetření, kde je patrná struktura třívrstvé kompozitní kolagení trubice se střední vrstvou pleteniny.



*Obr. 31: Mikro CT - snímky cévních protez.*





Obr. 32: Ukázka mikro-CT 3D vizualizace cévních protězy

### 4.3. Explantované cévní protezy – mikroskopické nálezy

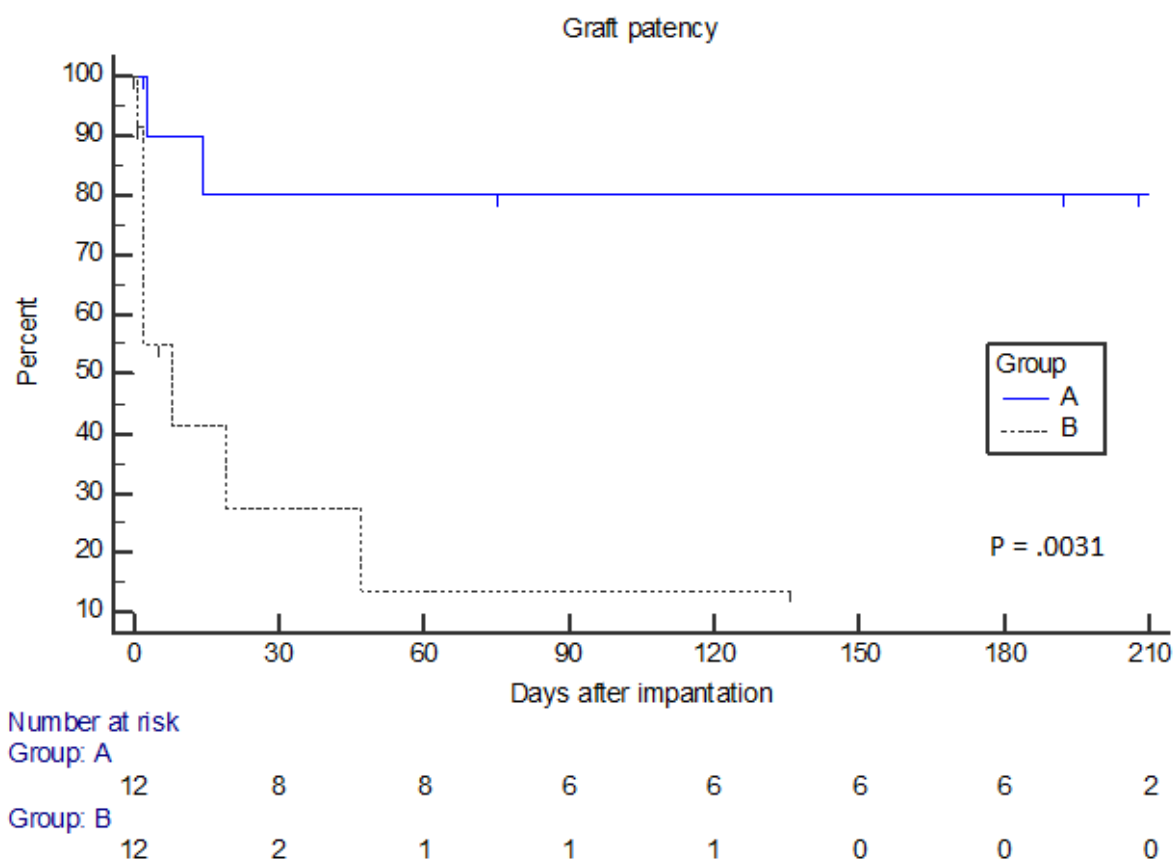
Mikroskopické nálezy explantovaných protéz z rybího kolagenu jsme rozdělili do dvou skupin. Do skupiny A byly zahrnuty explantované cévní protezy z rybího kolagenu, kde byl použit kolagen typu 1 extrudovaný na pletený scaffold. Kolagen typu 1 jak uvedeno výše je charakterizován nízkým obsahem tuků (5,8% tuků v sušině) a poměrně vysokým obsahem rybího kolagenu v sušině (80,8%). Skupina B zahrnovala explantované prototypy cévních protez, které byly vytvořeny z kolagenu typu 2. Kolagen typu 2 je charakterizován vyšším obsahem tuku v sušině (34,4%) oproti množství rybího kolagenu v sušině (57,2%) kolagenní hmoty použité k výrobě protězy (tab.:1). Teplota smrštnění byla u obou skupin srovnatelná s 43,1° C a 43,7° C.

	Product A	Product B
Dry matter	7%	8%
Collagen in dry matter	81%	57%
Fat in dry matter	6%	34%

Tabulka 4: Složení kolagenu A a B

Pro cévní protezy skupiny B byla charakteristická lepší soudržností vrstev kompozitní kolagení trubice, zatímco protezy skupiny A byly tvrdší, křehčí, s neoptimální soudržností vrstev, kdy při styku s krví a úchopu protezy do pinzety docházelo poměrně časně k oddělování se vrstev od pleteného scaffoldu v místě zatěžování (úchopu pinzetou, šití, naložení svorky).

V každé skupině se dvě zvířata nezotavila z anestezie z nejasného důvodu a jedno pokusné zvíře ve skupině A i B bylo terminováno 51. a 5. den z důvodu neprospívání. Ve skupině A došlo v prvních dvou týdnech k uzavěru obou implantovaných cévních protéz u jednoho zvířete. Ve skupině B však bylo pozorováno předčasné uzavření obou implantovaných cévních protéz až u pěti zvířat (obr. 3).



Obr. 32: Kaplan-Meierova křivka průchodnosti štěpů ukazuje jasný rozdíl mezi skupinou A a skupinou B ( $p = .0031$  log-rank test).

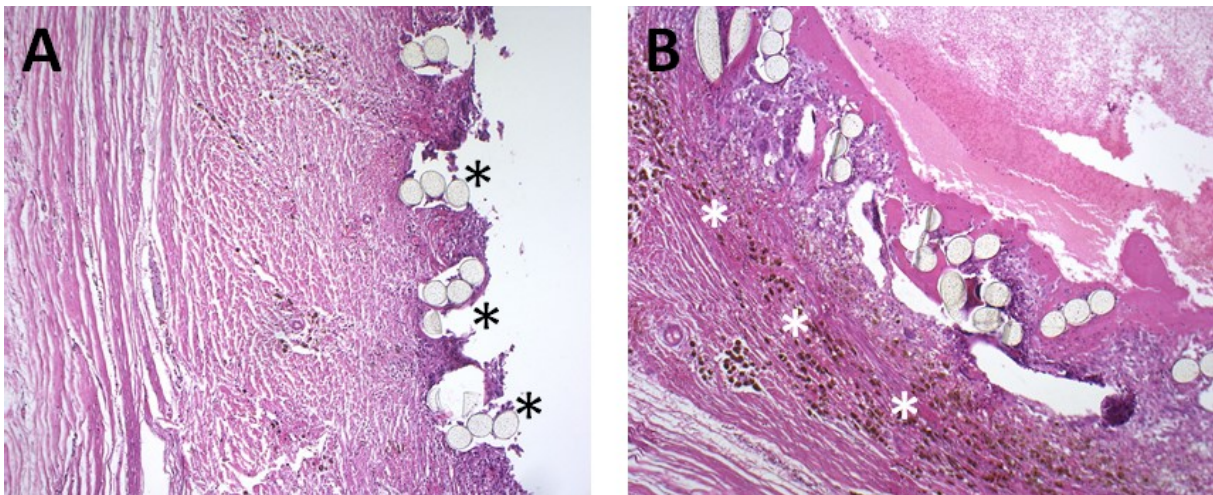
Průtok implantovanými cévními protézami z rybího kolagenu byly srovnatelné u obou skupin i mezi pravou a levou stranou (tabulka 2). Po zúžení a. carotis na jedné straně PVC páskou se tok v implantovaných cévních protezách snížil o 47% u skupiny A a o 71% u skupiny B, ale statistický rozdíl mezi skupinami nebyl významný ( $p = 0.28$ ).

Group	Side	Flow	Flow after	Flow		Flow at		
		Initial	graft	after		the end		
		[ml/min]	[ml/min]	P <sup>1</sup>	[ml/min]	P <sup>1</sup>	[ml/min]	P <sup>1</sup>
A	Left	350±120	287±113	0.1434			355±102	0.42
A	Right	309±134	297±118	0.7645	158±159	0.0411	147±10	0.64
B	Left	330±170	311±123	0.5674			175	x
B	Right	318±137	330±164	0.7719	97±29	0.0052	110	x

<sup>1</sup>paired t-test

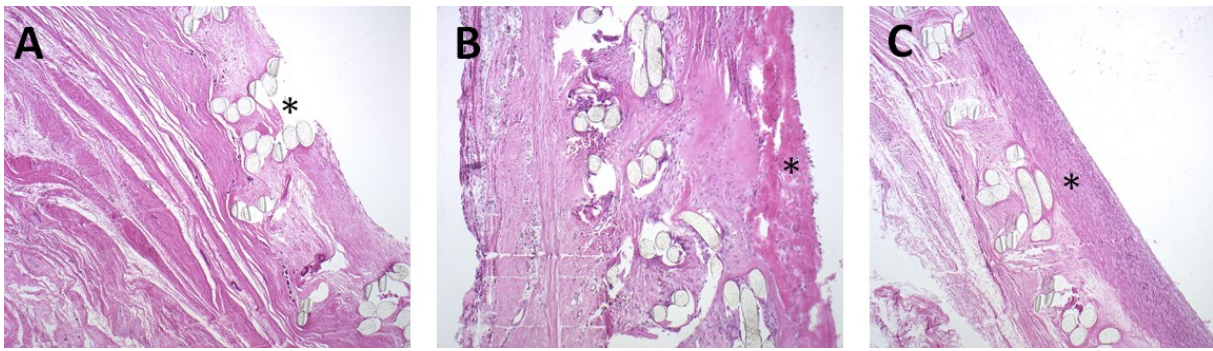
Tab. 5: Průtoky před a po implantaci štěpu po umístění PVC pásky na pravou a. carotis pro omezení průtoku naimplantovanou cévní protézou na konci pokusu.

Histologická analýza ukázala, že prototypy cévních protez z rybího kolagenu, které byly implantované nejméně po dobu tří týdnů, indukovaly výraznou buněčnou reakci ve vnější vrstvě (obr. 33).



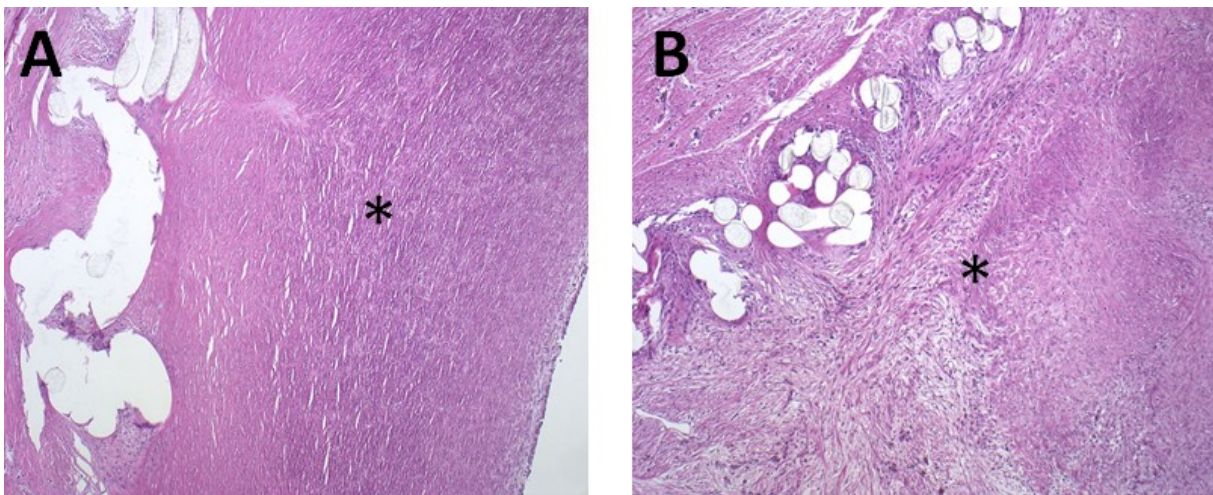
Obr. 33 A+B: Mikroskopický obraz (H & E) explantovaného štěpu ukazuje: a) plochy s obnaženou polyesterovou sítí ve středu protézy a b) reakce velkých buněk s krvácením ve vnější vrstvě cévní protézy u zvířat ve skupině A, všechny označené hvězdičkou.

Explantované cévní protézy skupiny A s vyšším procentem rybího kolagenu a nízkým procentem tuků vykazovali relativně rychlé odbourání rybího kolagenu z intraluminální strany, kde byly patrné plochy s obnaženou polyesterovou sítí (pletený scaffold) a to v centrální části protézy. Naopak z oblasti anatomoz jak periferní, tak centrální byla patrná krásná endotelizace směrem ke středu protézy po celém obvodu cévní protézy (obr. 5).



Obr. 34 A+B+C: Mikroskopický obraz (H & E) explantovaného štěpu ukazuje: a) plochy s otevřenou polyesterovou síťovinou ve středu, b) intimální hyperplazii a c) fibrózní zahušťování intimální vrstvy směrem k obvodu štěpu indukující neoendothelizaci u zvířat ve skupině A, všechny označené hvězdičkou.

U explantovaných cévních protéz skupiny B bylo patrné vyvynutí silného vláknitého ztlustění neointimální vrstvy (obr 6.). Všechny protézy jak ve skupině A tak i ve skupině B vykazovali dobré známky vhojení do okolní tkáně



Obr. 35 A+B: Mikroskopický obraz (H & E) explantovaného štěpu vykazuje značné vláknité ztlustění intimální vrstvy ve skupině B označené hvězdičkou.

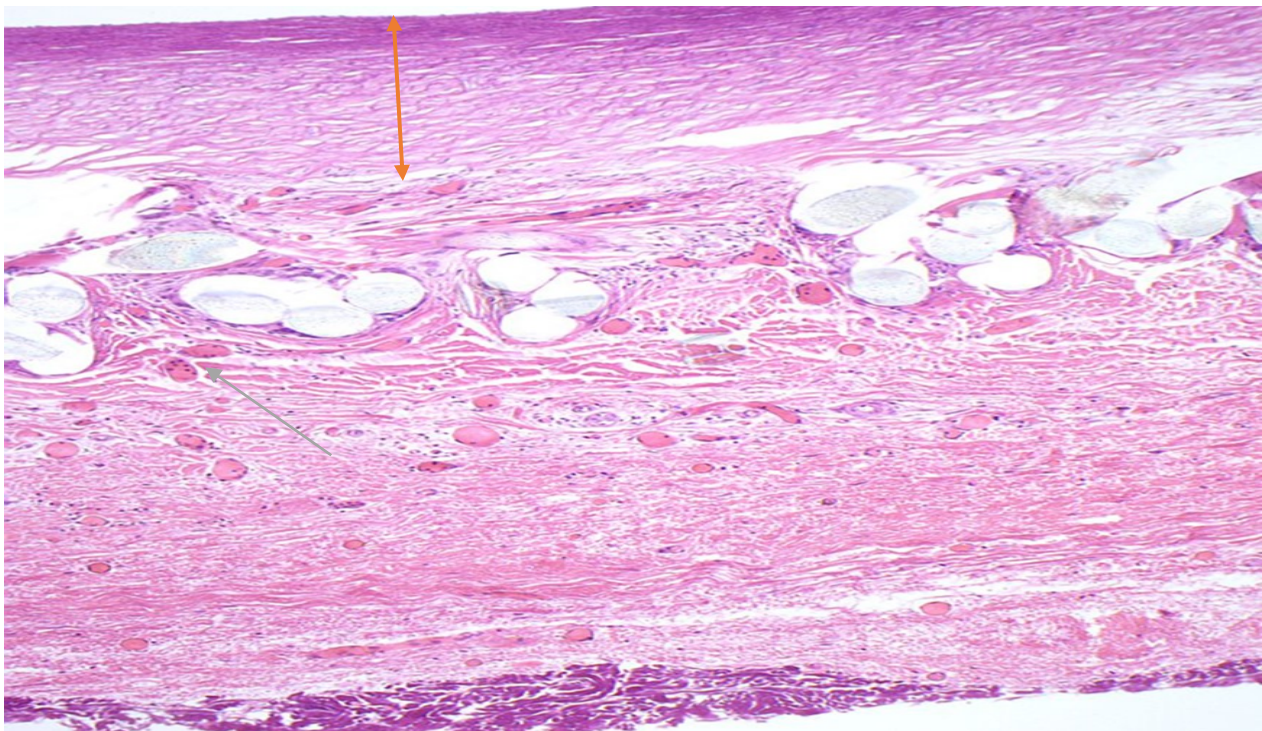
Z histologických vyšetření byla patrná reakce na vnitřní vrstvu protezy ve skupině B, kdy není jasné, zdali jde o nějaký technický problém při technologické úpravě kolagenu před extruzí, nebo zdali tato reakce souvisí s vaskularizací pseudointimy a s obecnou zánětlivou reakcí. Zevní vrstva pseudoadventicie byla u obou skupin snášena ve všech případech dobře.

.Pseudoadventicie má taktéž nezastupitelnou roli, jak již bylo uvedeno výše stran vhojování protézy, kdy musí umožnit vrůstání kapilárních pupenů, které jsou velmi citlivé na mechanické překážky a

pokud dojde k zastavení jejich růstu, proteza je zavzata do minimálně vaskularizované tkáně, která není schopna dostatečně odvádět produkty metabolismu.

Ty se poté hromadí v okolí neomedie na což se dá usuzovat při histologickém vyšetření z přítomnosti lipidů v novotvořené cévní stěně. Čím více lipidů se ve stěně vyskytuje, tím je výživa zásadněji postižena, a proto byla zevní vrstva upravena tak, aby nepředstavovala pro vrůstající kapilární pupeny žádnou překážku.

Na vyšetřovaných histologických preparátech explantovaných cévních protéz, které byly v pokusných zvířatech více jak 6 měsíců, jsme nikde nezachytili ve stěny protézy lipidy což svědčí o dobrém metabolismu novotvořené cévní stěny. Byla zde patrná dobrá vaskularizace všech tří vrstev což je předpokladem dobré úrovně její výživy.



*Obr. 36: Implantovaná protéza s vnitřní vrstvou – červená šipka bez zánětu, bez tkáňové reakce s hladkým povrchem bez nástěnné trombozy. Další, střední vrstva je tvořena vlákny pleteného scaffoldu na které je zřetelná obrovskobuněčná reakce. Tato vrstva je vaskularizovaná, kde mezi vlákny je patrné vazivo s drobnými tenkostěnnými cévami s erytrocyty (zelená šipka). Zevní vrstva je nerozpoznatelná od běžné vazivové tkáně.*

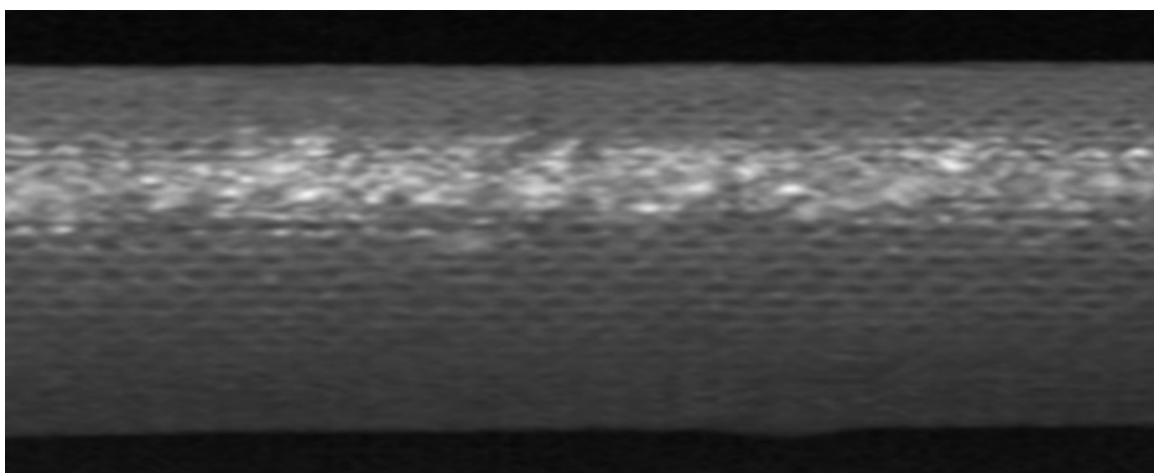
#### 4.4. Vytvoření finálních technologií

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

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. Krajíčkem, 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 třeboňského 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 měkčeny 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*.



*Obr. 37: Balené sterilní cévní protezy z rybího kolagenu*



*Obr. 38: Prototyp cévní protezy z rybího kolagenu*

## **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 protezy 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 vlákn), 2) vhodně zvoleným sendvičovým uspořádáním kompozitní trubice (pozice scaffoldu vůči matici), 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 rybího 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

- Beran M, Drahorad J, Molik P, et al. Site-specific thrombolytic and anticoagulant biomaterials. Proceedings of AMN7. Int J Nanotechnology 2017;14:31–7. doi.10.1504/IJNT.2017.082443.
- Berglund JD, Mohseni MM, Nerem RM, et al. A biological hybrid model for collagen-based tissue engineered vascular constructs. Biomaterials 2003;24:1241–54.
- 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.
- Carrel A. Ultimate results of aortic transplantation J Exp Med. 1912;15: 389–92.
- Cozza ES, Monticelli O, Cavalleri O, Marosano E. Preparation, characterization, and properties of nanofibers based on poly(vinylidene fluoride) and polyhedral oligomeric silsesquioxane. Polymer for Advances Technologies 23 (9): 1252 - 1257 (2012).
- Domurado D, Guidoin R, Marois M, Martin L, Gosselin C, Award J. Albuminated dacron prostheses as improved blood vessel substitutes. J Bioeng. 2(1-2):79-91 (1978).
- Elshazly T. CHARACTERIZATION OF PVA HYDROGELS WITH REGARDS TO VASCULAR GRAFT DEVELOPMENT. Thesis. Georgia Institute of Technology 2004.
- Fernandes EG, de Queiroz AA, Abraham GA, et al. Antithrombogenic properties of bioconjugate streptokinase-polyglycerol dendrimers. J Mater Sci Mater Med. 2006;17:105–11. doi: 10.1007/s10856-006-6813-5
- Fiorica C, Rigogliuso S, Palumbo FS, Pitarresi G, Giammona G, Ghersi G. A Fibrillar Biodegradable Scaffold for Blood Vessels Tissue Engineering. CHEMICAL ENGINEERING TRANSACTIONS 27 (2012).
- Greisler HP, Gosselin C, Rent D, Kangt SS, Kim DU. Biointeractive polymers and tissue engineered blood vessels. Biomaterials 17: 329-336 (1996).
- Heyligers JMM, Arts CHP, Verhagen HJM, de Groot PG, Moll FL. Improving Small-Diameter Vascular Grafts: From the Application of an Endothelial Cell Lining to the Construction of a Tissue-Engineered Blood Vessel. Ann Vasc Surg. 19 (3): 448-56 (2005).
- 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
- Guilbert M, Said G, Happillon T, Untereiner V, Garnotel R, Jeannesson P, Sockalingum GD. Probing non-enzymatic glycation of type I collagen: a novel approach using Raman and infrared biophotonic methods. Biochim Biophys Acta, 2013, vol. 1830, pp. 3525–3531.
- Hanai K, Takeshita F, Honma K et al. “Atelocollagen-mediated systemic DDS for nucleic acid medicines,” Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 1082, pp. 9–17, 2006.

- Harrison JH. Synthetic materials as vascular prostheses: II. A comparative study of nylon, dacron, orlon, ivalon sponge and teflon in large blood vessels with tensile strength studies. *The American Journal of Surgery* 95 (1): 16-24 (1958).
- Heyligers JMM, Arts CHP, Verhagen HJM, et al. Improving small-diameter vascular grafts: From the application of an endothelial 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.
- Huanga Ch, Chena R, Kea Q, Morsic Y, Zhanga K, Mo X. Electrospun collagen–chitosan–TPU nanofibrous scaffolds for tissue engineered tubular grafts. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 82: 307–315 (2011).
- Chan-Park MB, Shen JY, Cao Y, Xiong Y, Liu Y, Rayatpisheh S, Kang GC, Greisler HP. Biomimetic control of vascular smooth muscle cell morphology and phenotype for functional tissue-engineered small-diameter blood vessels. *J Biomed Mater Res A.* 91 (2): 629-34 (2009).
- Chaouat M., Le Visage C., Baille W.E., Escoubet B., Chaubet F., Mateescu M.A., Letourneur D. A Novel Cross-linked Poly(vinyl alcohol) (PVA) for Vascular Grafts. *Adv. Funct. Mater.*, 18: 2855–2861 (2008).
- 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).
- Choi Y-J, Noh I. Media tissue regeneration of the hybrid expanded polytetrafluoroethylene vascular graft via gelatin coating. *Current Applied Physics* 5: 463–467 (2005).
- Chung S, Ingle NP, Montero GA, Kim SH, King MW. Bioresorbable elastomeric vascular tissue engineering scaffolds via melt spinning and electrospinning. *Acta Biomaterialia* 6: 1958 - 1967 (2010).
- Izhar U, Schwalb H, Borman JB, Hellener GR, Hotoveli-Salomon A, Marom G, Stern T, Cohn D. Novel synthetic selectively degradable vascular prostheses: a preliminary implantation study. *J Surg Res.* 95 (2): 152-60 (2001).
- Jackson M, Choo LP, Watson PH, Halliday WC. Beware of connective tissue proteins: assignment and implications of collagen absorptions in infrared spectra of human tissues, *Biochim Biophys Acta*, 1995, vol. 1270, pp. 1-6.
- Jiang B, Suen R, Wertheim JA, Ameer GA. Targeting heparin to collagen within extracellular matrix significantly reduces thrombogenicity and improves endothelialization of decellularized tissue. *Biomacromolecules*, 2016, vol. 17, pp 3940-3948.
- Jiang T, Kumbar SG, Nair LS, Laurencin CT. Biologically active chitosan systems for tissue engineering and regenerative medicine. *Curr Top Med Chem.* 8(4):354-64 (2008).
- Kaibara M, Kawamoto Y, Yanagida S, Kawakami S. In vitro evaluation of antithrombogenicity of

- hybrid-type vascular vessel models based on analysis of the mechanism of blood coagulation. *Biomaterials* 16: 1229-1234 (1995).
- Kakisis JD, Liapis ChD, Breuer Ch, et al. Artificial blood vessel: The Holy Grail of peripheral vascular surgery. *J Vasc Surg.* 2005;41:349–54. doi: 10.1016/j. jvs.2004.12.026.
- 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).
- Kannan RY, Salacinski HJ, Butler PE, Hamilton G, Seifalian AM. Current status of prosthetic bypass grafts: a review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 74(1):570-81 (2005).
- Khan R, Khan MH, Bey A. Use of collagen as an implantable material in the reconstructive procedures - an overview. *Biology and Medicine,* 3 (4): 25-32 (2011).
- Kizildag N, Yalcin P. AN ALTERNATIVE STRUCTURE FOR USE IN CONSTRUCTION OF ARTIFICIAL BLOOD VESSELS: ELECTROSPUN NANOWEB. *Smartex Research Journal* 1 (1) (2012).
- Klemm D, Schumann D, Uthard U, Marsch S. Bacterial synthesized cellulose – artificial blood vessels for microsurgery. *Prog. Polym. Sci.* 26: 1561-1603 (2001).
- Koens MJW, Faraj KA, Wismans RG, van der Vliet JA, Krasznai AG, Cuijpers VMJI, Jansen JA, Daamen WF, van Kuppevelt TH. Controlled fabrication of triple layered and molecularly defined collagen/elastin vascular grafts resembling the native blood vessel. *Acta Biomaterialia* 6: 4666–4674 (2010).
- Kong X, Han B, Li H, Liang Y, Shao K, Liu W. New biodegradable small-diameter artificial vascular prosthesis: a feasibility study. *J Biomed Mater Res A.* 100 (6): 1494-504 (2012)
- Kunlin J. Venous grafts. *J Int Chir.* 1953;13:313–9.
- Lee CH, Singla A, Lee Y, “Biomedical applications of collagen,” *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 221, no. 1-2, pp. 1–22, 2001.
- Lee LY, Wu SC, Fu SS, Zeng SY, Leong WS, Tan LP. Biodegradable elastomer for soft tissue engineering. *European Polymer Journal* 45: 3249–3256 (2009).
- Lovett M, Cannizzaro Ch, Daheronc L, Messmera B, Vunjak-Novakovice G, Kaplan DL. Silk fibroin microtubes for blood vessel engineering. *Biomaterials* 28 5271–5279 (2007).
- Lovett M, Cannizzaro Ch, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL. Gel spinning of silk tubes for tissue engineering. *Biomaterials* 29 (35): 4650-7 (2008).
- Lovett M, Eng G, Kluge JA, Cannizzaro Ch, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL. Tubular silk scaffolds for small diameter vascular grafts. *Organogenesis* 6 (4):217-224 (2010).
- Martinez AW, Caves JM, Ravi S, Li W, Chaikof EL. Effects of crosslinking on the mechanical properties, drug release and cytocompatibility of protein polymers. *Acta Biomater.* 2014 Jan;10(1):26-33.

- Mieczkowska A, Aishah Mansur S, Irwin N, Flatt PR, Chappard D, Mabilieu G. Alteration of the bone tissue material properties in type 1 diabetes mellitus: A Fourier transform infrared microspectroscopy study. *Bone*, 2015, vol. 76, pp. 31–39.
- Millon IE, Padavan DT, Hamilton AM, Boughner DR, Wan W. Exploring cell compatibility of a fibronectin-functionalized physically crosslinked poly(vinyl alcohol) hydrogel. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 100 (1):1-10 (2012).
- Miyata T, Taira T, Noishiki Y, “Collagen engineering for biomaterial use,” *Clinical Materials*, vol. 9, no. 3-4, pp. 139–148, 1992.
- Nagai N, Nakayama Y, Zhou Y-M, Takamizawa K, Mori K, Munekata M. “Development of salmon collagen vascular graft: mechanical and biological properties and preliminary implantation study,” *Journal of Biomedical Materials Research Part B*, vol. 87, no. 2, pp. 432–439, 2008.
- Nemeno-Guanzon JG, Lee S, Berg JR, Jo YH, Yeo JE, Nam BM, Koh Y-G, Lee JI. Trends in Tissue Engineering for Blood Vessels. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012. Article ID 956345.
- Nerem RM. Critical issues in vascular tissue engineering. *International Congress Series* 1262: 122–125 (2004).
- Nerem RM. Role of mechanics in vascular tissue engineering. *Biorheology* 40 (1-3): 281-7 (2003).
- Nerem RM. Tissue engineering a blood vessel substitute: the role of biomechanics. *Yonsei Med J.* 41 (6): 735-9 (2000).
- Nerem RM., Seliktar D. Vascular tissue engineering. *Annu Rev Biomed Eng.* 3:225-43 (2001).
- Niekraszewicz A, Kucharska M, Kardas I, Szadkowski M. Resorbable Tightening of Blood Vessel Protheses Prepared from Synthetic Polymers. *FIBRES & TEXTILES in Eastern Europe* 17 (6): 93-98 (2009).
- Patel A, Fine B, Sanding M, Mequanint K. Elastin biosynthesis: The missing link in tissue engineered blood vessels. *Cardiovasc Res* 71 (1): 40-49 (2006).
- Pati F, Datta P, Adhikari D, Dhara S, Ghosh K, Mohapatra PKD, “Collagen scaffolds derived from fresh water fish origin and their biocompatibility,” *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 100, no. 4, pp. 1068–1079, 2012
- Payne KJ, Veis A. Fourier transform IR spectroscopy of collagen and gelatin solutions: Deconvolution of the Amide I band for conformational studies. *Biopolymers*, 1988, vol. 27, pp. 1749–1760.
- Peltola SM, Melchels FP, Grijpma DW, Kellomäki M. A review of rapid prototyping techniques for tissue engineering purposes. *Ann Med.* 40(4):268-80 (2008).
- Pielesz A. Temperature-dependent FTIR spectra of collagen and protective effect of partially hydrolysed fucoidan. *Spectrochim. Acta A*, 2014, vol. 118, pp.287-293.
- Prystupa DA, Donald AM. Infrared study of gelatin conformations in gel and sol states. *Polymer Gels*

- and Networks, 1996, vol. 4, pp. 87–110.
- Rabotyagova OS, Cebe P, Kaplan DL. Collagen Structural Hierarchy and Susceptibility to Degradation by Ultraviolet Radiation, *Mater Sci Eng C*, 2008, vol. 28, pp. 1420-1429.
- Ravi S, Chaikof EL. Biomaterials for vascular tissue engineering. *Regen Med*. 5 (1): 107 (2010).
- Roll S, Müller-Nordhorn J, Keil T, Scholz H, Eidt D, Greiner W, Willich SN. Dacron vs. PTFE as bypass materials in peripheral vascular surgery--systematic review and meta-analysis. *BMC Surg*. 8: 22 (2008).
- Sano A, Maeda M, Nagahara S et al. "Atelocollagen for protein and gene delivery," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 55, no. 12, pp. 1651–1677, 2003.
- Sarkar S, Burriesci G, Wojcik A, Aresti N, Hamilton G, Seifalian AM. Manufacture of small calibre quadruple lamina vascular bypass grafts using a novel automated extrusion-phase-inversion method and nanocomposite polymer. *Journal of Biomechanics* 42 (6): 722-730 (2009).
- Sarkar S, Salacinskij HJ, Hamilton G, Seifalian AM. The mechanical properties of infrainguinal vascular bypass grafts: their role in influencing patency. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 31(6):627-36 (2006).
- Sarkar S, Schmitz-Rixen T, Hamilton G, Seifalian AM. Achieving the ideal properties for vascular bypass grafts using a tissue engineered approach: a review. *Med Biol Eng Comput*. 45 (4): 327-36 (2007).
- Shaikh FM, Callanan A, Kavanagh EG, Burke PE, Grace PA, McGloughlin TM. Fibrin: a natural biodegradable scaffold in vascular tissue engineering. *Cells Tissues Organs* 188(4):333-46 (2008).
- Schmedlen RH, Elbjairami WM, Gobin AS, West JL. Tissue engineered small-diameter vascular grafts. *Clin Plast Surg*. 30(4):507-17 (2003).
- Schneider A, Schwalb H, Vlodayky TI, Uretzkyn G. An Improved Method of Endothelial Seeding on Small Caliber Prosthetic Vascular Grafts Coated with Natural Extracellular Matrix. *Clinical Materials* 13: 51 – 55 (1993).
- Schutte SC, Nerem RM. CHAPTER II.6.9 BLOOD VESSEL TISSUE ENGINEERING. From: B.D. Rarner, A.S. Hofman, F.J. Schoen, J.E. Lemons (editors). *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. Academic Press; 3 edition, January 2013.
- Singha K, Trippel MOH, Shields TW, Bernhard VM, Benventune R, Lewis FJ. Reinforced Ivalon Sponge as an Aortic Prosthesis. *Ann Surg*. 151 (2): 216-224 (1960).
- Skardal A, Zhang J, Prestwich GD. Bioprinting vessel-like constructs using hyaluronan hydrogels crosslinked with tetrahedral polyethyleneglycol tetracrylates. *Biomaterials* 31: 6173-6181 (2010).
- Son J, Kim G. Three-dimensional plotter technology for fabricating polymeric scaffolds with micro

- grooved surfaces. *J Biomater Sci* 20(14):2089-101 (2009).
- Solouk A, Cousins BG, Mirzadeh H, Seifalian AM. Application of plasma surface modification techniques to improve hemocompatibility of vascular grafts: A review. *Biotechnol Appl Biochem.* 58(5):311-27 (2011).
- 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.
- Stankusa JJ, Solettib L, Fujimoto K, Hongc Y, Vorp DA, Wagner WR. Fabrication of cell microintegrated blood vessel constructs through electrohydrodynamic atomization. *Biomaterials* 28: 2738–2746 (2007).
- Sugiura H, Yunoki S, Kondo E, Ikoma T, Tanaka J, Yasuda K. "In vivo biological responses and bioresorption of tilapia scale collagen as a potential biomaterial," *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, vol. 20, no. 10, pp. 1353–1368, 2009.
- Špaček M, Chlup H, Mitáš P, et al. Three-layer collagen-based vascular graft designed for low-flow peripheral vascular reconstructions. *J Appl Biomed.* 2019, in press
- Tiwari A, Salacinski H, Seifalian AM, Hamilton G. New prostheses for use in bypass grafts with special emphasis on polyurethanes. *Cardiovasc Surg* 10(3):191-7 (2002).
- Van Aalst M, Eenink MJ, Krufft MA, Van Tuil R.. ABC's of bioabsorption: application of lactide based polymers in fully resorbable cardiovascular stents. 5 Suppl F:F23-7 *EuroIntervention* (2009).
- Vaz CM, van Tuijl S, Bouten CVC, Baaijens FPT. Design of scaffolds for blood vessel tissue engineering using a multi-layering electrospinning technique. *Acta Biomaterialia* 1: 575–582 (2005).
- 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. doi:10.1016/j.jmbbm.2015.01.023
- Veselý J, Chlup H, Žitný R, et al. Effect of sterilization on mechanical properties of biological composite. *ECCOMAS Congress 2016 VII European Congress on Computational Methods in Applied Sciences and Engineering.* June 2016
- Vrana NE, Cahill PA, McGuinness GB. Endothelialization of PVA/gelatin cryogels for vascular tissue engineering: effect of disturbed shear stress conditions. *J Biomed Mater Res A.* 94 (4):1080-90 (2010).
- 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).
- Xiang P, Li M, Zhang Ch-Y, Chenb DL, Zhou Z-H. Cytocompatibility of electrospun nanofiber tubular scaffolds for small diameter tissue engineering blood vessels. *International Journal of Biological Macromolecules* 49 281– 288 (2011).

Wissink MJB, Beernink R, Pieper JS, et al. Immobilization of heparin to EDC/NHS-crosslinked collagen. Characterization and in vitro evaluation. *Biomaterials*, 2001, vol. 22, pp. 151-163.

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 pages

Závěrečná zpráva projektu výzkumu a vývoje č. NT13302 – 4/2012 „Optimalizace fyzikálních charakteristik cévních náhrad pro nízké průtoky“ 2015, M.Krajíček a kol.

Závěrečná zpráva Projektu výzkumu a vývoje č. 15 – 27941A – 4/2015 „Využití neantigenního rybího kolagenu při konstrukci implantátů a jako nosiče léků“ 2018, T. Grus a kol.



## 8. VLASTNÍ PUBLIKAČNÍ AKTIVITA

### 4.1. 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

### 4.2. Ostatní publikace v časopisech s IF

1. Špaček M, Jindrák V, Špunda R, Štádl 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**, Brlicová 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 Infragenicular 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, Hlubočký J, Krs O, Špatenka J, Burkert J, Fiala R, **Mitáš P**, Měříčka P, Špaček M, Hlubočká 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, Hlubočký J, **Mitáš P**, Lindner J. Fibrin sealants in cardiac surgery: The last five years of their development 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 cryopreserved 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)

### 4.3. 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 protézy. *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, Brlicová L, Slavíková M, Valešová J, **Mitáš P**, Hlubocký 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, Hlubocký 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, Hlubocký 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**, Hlubocký 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- $\alpha$  - 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 femoro-pedal 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.

#### 4.4. 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, Bělohlávek 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, Piťha J, Piťhová 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.

## 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

P. MITAS<sup>1\*</sup>, T. GRUS<sup>1\*</sup>, L. LAMBERT<sup>2</sup>, M. MLCEK<sup>3</sup>, H. CHLUP<sup>4</sup>, E. HONSOVA<sup>5</sup>, M. DOHNALOVA<sup>1</sup>, T. SUCHY<sup>6</sup>, A. BURGETOVA<sup>2</sup>, J. LINDNER<sup>1</sup>, M. SPACEK<sup>1</sup>

\*These authors contributed equally to this paper

<sup>1</sup>Second Department of Surgery - Department of Cardiovascular Surgery, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital, Prague, Czech Republic, <sup>2</sup>Department of Radiology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic, <sup>3</sup>Institute of Physiology, First Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic, <sup>4</sup>Department of Mechanics, Biomechanics and Mechatronics, Faculty of Mechanical Engineering, Czech Technical University in Prague, Prague, Czech Republic, <sup>5</sup>Department Pathology, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic, <sup>6</sup>Institute of Rock Structure and Mechanics of the Czech Academy of Sciences, Prague, Czech Republic.

Received January 12, 2019

Accepted May 2, 2019

Epub Ahead of Print June 6, 2019

### Summary

We compared graft outcome between two types of a novel composite three-layer carp-collagen-coated vascular graft in low-flow conditions in a sheep model. Collagen in group A underwent more cycles of purification than in group B in order to increase the ratio between collagen and residual fat. The grafts were implanted end-to-side in both carotid arteries in sheep (14 grafts in 7 sheep in group A, 18 grafts in 9 sheep in group B) and artificially stenosed on the right side. The flow in the grafts in group A decreased from 297±118 ml/min to 158±159 ml/min ( $p=0.041$ ) after placement of the artificial stenosis in group A, and from 330±164ml/min to 97±29 ml/min ( $p=0.0052$ ) in group B ( $p=0.27$  between the groups). From the five surviving animals in group A, both grafts occluded in one animal 3 and 14 days after implantation. In group B, from the six surviving animals, only one graft on the left side remained patent ( $p=0.0017$ ). Histology showed degradation of the intimal layer in the center with endothelialization from the periphery in group A and formation of thick fibrous intimal layer in group B. We conclude that the ratio between collagen and lipid content in the novel three-layer graft plays a critical role in its patency and structural changes *in vivo*.

### Key words

Vascular graft • Collagen • Crosslinking • Extrusion • Composite tube • Patency • Sheep

### Corresponding author

L. Lambert, Department of Radiology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, U Nemocnice 2, 128 08 Prague 2, Czech Republic. Fax: +420 224963048. E-mail: [lambert.lukas@gmail.com](mailto:lambert.lukas@gmail.com)

### Introduction

The long-term patency of prosthetic vascular grafts in the treatment of peripheral arterial disease depends on numerous factors including morphology of the anastomosis, graft diameter, and the outflow bed. In distal reconstructions and reconstructions with limited outflow, prosthetic grafts show worse patency rates than in proximal reconstructions (Chlupáč *et al.* 2009, Grus *et al.* 2017).

Our group has designed and manufactured a novel composite three-layer vascular graft. It is a composite tube on a biological basis with sandwich

construction of the wall where a polyester mesh is covered on both sides by collagen prepared from freshwater fish (Browning *et al.* 2012, McClure *et al.* 2012, Yamada *et al.* 2014). Previously, the immunological properties of carp collagen were tested and found comparable to or even better than the commonly used bovine collagen (Duan *et al.* 2009, Lambert *et al.* 2019, Yamamoto *et al.* 2014). We and other research groups tested different designs of vascular grafts with regard to similarity with a native vessel (Singh *et al.* 2015, Spacek *et al.* 2019, Veselý *et al.* 2015, Wise *et al.* 2011).

Preparation of collagen from a biological material follows numerous steps that include harvesting, cleaning, grinding, homogenization, crosslinking, and sterilization. Each of these steps influences properties of the final product. Specifically, crosslinking decreases compliance and thrombogenicity of the material (Terzi *et al.* 2018). The effect of the proportion of collagen and residual fat content which is influenced by its repeated dissolution and washing has not been explored yet.

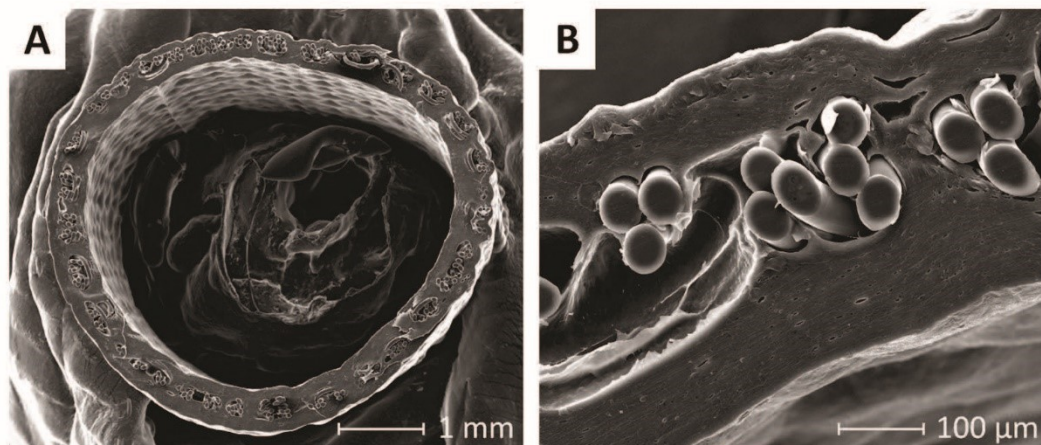
In the present study, we manipulated the residual fat content in collagen used in this graft to influence its patency and biological properties that we further tested in an animal model.

## Materials and Methods

This prospective study was approved by the institutional Animal Care and Use Committee and conducted in accordance with national Act No 246/1992 Coll. as amended on the protection of animals against cruelty, that is harmonized with the legislation of EU.

Two types of a composite three-layer vascular graft for low flow conditions with two carp collagen layers covering polyester mesh from both sides with an internal diameter of 5mm were prepared (Grus *et al.* 2018, Spacek *et al.* 2019). The middle layer (Fig. 1) was knitted from a polyester monofilament (TDA Inc., Connecticut, USA) with a diameter of 34  $\mu\text{m}$  prepared by electrospinning on a flat double knitting machine (Faculty of Textile Engineering, Technical University in Liberec, Czech Republic) with 16 needles, 32 loops and then soaked in a solution with 4 g/l AEL (nonionic tenside), 0.5 g/l  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  at 80 °C for one hour, washed in chloroform for one hour, and finally thermally fixed at 160 °C for 10 min (Grus *et al.* 2018, Spacek *et al.* 2019). Mechanical and immunological properties of this graft have been tested previously (Lambert *et al.* 2019, Spacek *et al.* 2019).

Collagen was extracted from the skin of young ( $\leq 2$  kg) scaleless carps. The skin was cleaned, frozen, and minced. This material was repeatedly dissolved in 0.1 M NaOH to remove excessive fat, washed, and again repeatedly dissolved in 10 % n-butanol, filtered and washed. The number of dissolution cycles in NaOH was 5 in product A and 3 in product B. Ultimately, collagen sheets were prepared by crosslinking in formaldehyde for 8 minutes (2.2 % Lyofix CHN) and curing in 20 % glycerine for 30 min. In the final product, we estimated the content of dry matter, collagen, and fat, and measured the heat-shrink temperature. The middle layer was coated by collagen from both sides by extrusion creating a three-layer graft. The final product with an internal diameter of 5 mm was sterilized by gamma irradiation.



**Fig. 1.** MicroCT image of the novel three-layer graft.



Fig. 2. Photograph of the graft ( $\varnothing=5$  mm) before (above) and after (below) implantation. Proximal and distal end of the anastomosis are marked with arrowheads. Arrow shows the direction of blood flow. Asterisk marks the plastic band used for artificial narrowing. The perivascular transient-time ultrasonic probe is marked by a chevron.

Table 1. Composition of collagen product A and B used in the inner and outer layer of the graft.

	Product A (lower fat content)	Product B (higher fat content)
Dry matter	7 %	8 %
Collagen in dry matter	81 %	57 %
Fat in dry matter	6 %	34 %

The grafts were trimmed to a length of approx. 15 cm and implanted end-to-side in both carotid arteries in a sheep by two experienced vascular surgeons during general inhalation anesthesia (Fig. 2). There were 14 grafts coated with product A implanted in 7 sheep (group A) and 18 grafts coated with product B implanted in 9 sheep (group B). The sheep were  $6.3 \pm 1.0$  years old, weighted  $53 \pm 14$  kg, and 12 (75 %) were ewes. Flow in the carotid artery and graft were measured using a perivascular transient-time ultrasonic probe (Transonic Inc., Ithaca, NY) before and after implantation. In all animals, the outflow artery was artificially narrowed by placing a plastic band on one side (Fig. 2) to limit the flow to 100-150 ml/min, and the flow was re-measured. Postoperatively, all animals were receiving acetylsalicylic acid (Anopyrin 100 mg, Zentiva, Czech Republic). The patency of the grafts was assessed by ultrasound (Acuson

X150™, Siemens Healthcare, Munich, Germany) and the general status of the animals was checked on a regular basis. The animals were terminated when 1) they were not thriving or could not recover from anesthesia, 2) the graft occluded, or 3) after a period of 26 weeks. The grafts were explanted for histological analysis. The specimens were processed with the paraffin technique and stained with hematoxylin and eosin (H&E) with Weigert's resorcin-fuchsin (elastin).

## Results

Product A had higher content of collagen and lower content of fat compared to product B (Table 1). The heat-shrink temperature in product A and B was comparable with  $43.1$  °C and  $43.7$  °C, respectively. When handling, product B with higher fat content was more



compliant with better cohesion of the layers while product A was tougher, more brittle, with suboptimal cohesion of the layers.

In each group, two animals did not fully recover from the anesthesia. One animal in group A and one animal in group B were terminated at 51 and 5 days for failure to thrive. In group A, two grafts in one animal occluded in the first two weeks, but in group B, early closure was observed in five animals (Fig. 3). The flow through the graft was comparable between the study groups and the left and right side (Table 2). After artificial narrowing, the flow in the graft diminished by 47% in group A and by 71% in group B, but the difference between the groups was not significant ( $p=0.28$ ). Histological analysis showed that grafts that were *in situ* for at least three weeks induced cellular reaction in the outer layer. Grafts from group A showed

areas of exposed polyester mesh in the central portion with signs of patchy to sub-confluent endothelialization towards the periphery (Fig. 4). Graft from group B developed a thick fibrous intimal layer (Fig. 5).

**Discussion**

This study showed that the use of carp collagen with lower fat content (product A) in a novel composite three-layer graft with sandwich construction of the wall results in better patency rates. Both collagens showed tendency to incorporate in the surrounding tissue. Grafts coated with higher carp collagen content (product A) show degradation of the intimal layer and reendothelialization from the periphery while grafts with higher lipid content (product B) tend to develop a thick fibrous intimal layer.

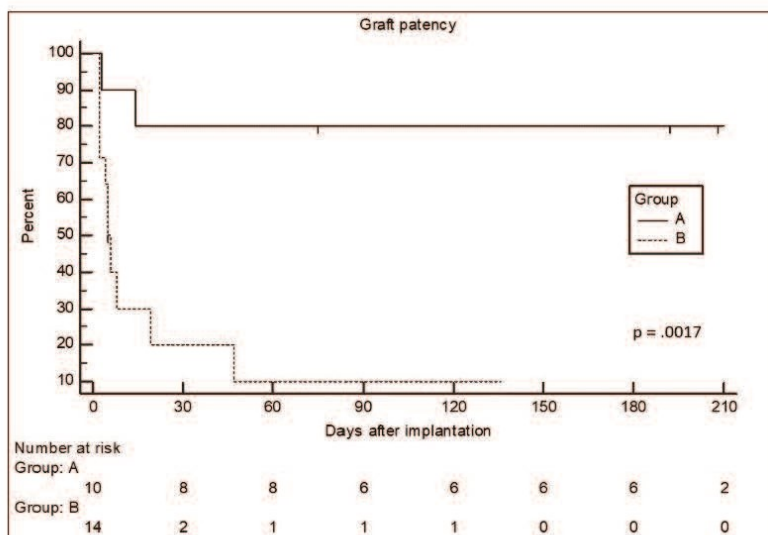


Fig. 3. Kaplan-Meier plot of graft patency rates shows clear difference between group A (lower fat content collagen) and group B (higher fat content collagen) with  $p=0.0031$  according to the log-rank test.

Table 2. Flow rates before and after implantation of the graft, after artificial narrowing of the right side to limit flow through the graft, and at the end of the experiment in animals with patent grafts. The graft implanted in group A was coated with collagen with lower fat content (product A) compared to the graft used in group B (see Table 1).

Group	Side	Flow Initial [ml/min]	Flow after graft placement		Flow after narrowing		Flow at the end	
			[ml/min]	$p^1$	[ml/min]	$p^1$	[ml/min]	$p^1$
A	Left	350±120	287±113	0.1434			355±102	0.42
A	Right	309±134	297±118	0.7645	158±159	0.0411	147±10	0.64
B	Left	330±170	311±123	0.5674			175	x
B	Right	318±137	330±164	0.7719	97±29	0.0052	110	x

<sup>1</sup>paired t-test

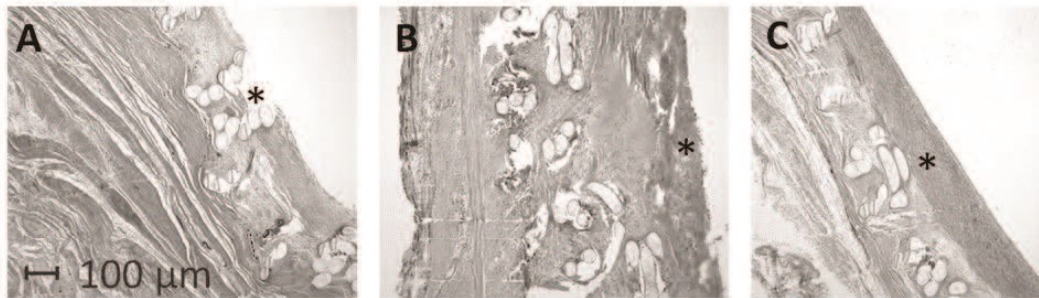


Fig. 4: Microscopic image (H&E) of an explanted graft shows: a) areas of exposed polyester mesh in the center, b) intimal hyperplasia, and c) mild fibrous thickening of the intimal layer towards the periphery of the graft indicating neoendothelisation in an animal from group A (lower fat content collagen), all marked by an asterisk.

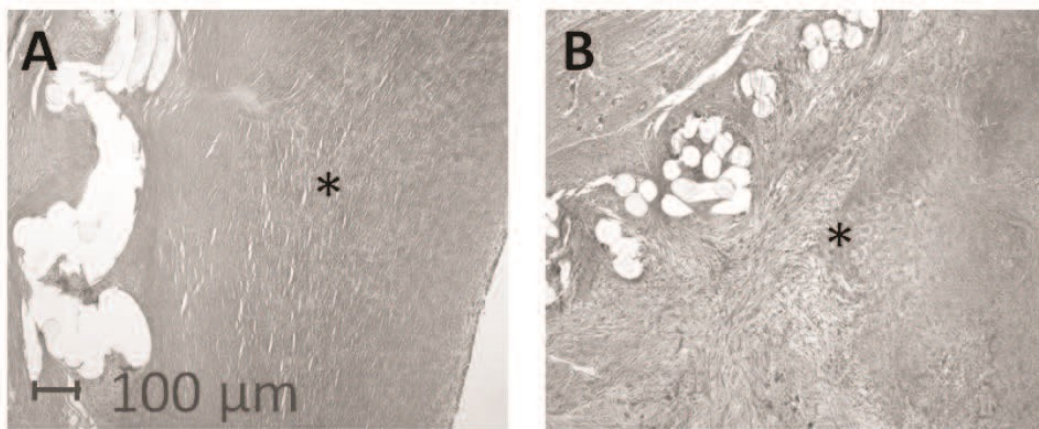


Fig. 5. Microscopic image (H&E) of an explanted graft shows marked fibrous thickening of the intimal layer in two animals from group B (higher fat content collagen), marked by an asterisk.

Prosthetic vascular grafts are an alternative to autologous grafts if they are not available in sufficient length or quality. Generally, their long-term performance is inferior to autologous grafts, but some studies have shown, that it may be even comparable in proximal reconstructions (Rychlik *et al.* 2014). In our design of a three-layer vascular graft, we aimed to mimic the structure of an autologous vessel and approximate its mechanical and physical properties as much as possible (Spacek *et al.* 2019, Vesely *et al.* 2015). For this, we tested various constructions of the vessel wall and structures of the scaffold in previous studies (Grus *et al.* 2018, Spacek *et al.* 2019).

The fabric and construction of a prosthetic vascular graft has an effect on its long-term patency as well (Sarkar *et al.* 2007). Currently, two types of grafts are in clinical use: the expanded polytetrafluorethylene (ePTFE) graft, and knitted grafts made from polyester

with several modifications of the graft structure and inner wall coating. Several graft construction types including bi- or multi-layered design have been proposed and investigated even by our research group (Chlupáč *et al.* 2009, Spacek *et al.* 2019). Coating of the inner layer by a modified mesh to improve wettability and neoendothelization of the graft have been proposed and tested in animal models but were not used in patients (Grus *et al.* 2018). In this study, we showed, that modification of a single step in purification of the collagen impacts the balance between degradation of the artificial intima, neoendothelization, and proliferation and hypertrophy of this layer. The primary idea of modifying the ratio between the collagen content and residual fat was to decrease wettability of the inner layer because pure collagen is a hemostatic agent.

As Zilla *et al.* (Zilla *et al.* 2007) indicated, the ingrowth of the intima from the native vessel to the

periphery of the graft is not as desirable as transmural reendothelization along the whole length of the graft. In group A (lower fat content in collagen), we observed the first pattern. In group B, we believe that the latter phenomenon prevailed, but it was too intense that it resulted in stenosis and ultimately occlusion of the vessel. The residual fat content in the collagen layer, which was higher in group B, may dissolve from the mesh, which results in rarefaction of the inner layer, increased porosity, and throughput. We assume that accelerated release of the fat from the inner layer in group B resulted in increased porosity and exposure of collagen fibers and thus increased adhesion of fibrin and platelets forming a thick neointimal fibrinous layer.

Mechanical properties of a vascular graft in terms of handling and constructing an anastomosis are important. We noted that product B with higher fat content was easier to handle due to its better compliance and cohesion of the layers, but this also resulted in greater tortuosity and propensity to kinking. Product A with lower fat content was more difficult to suture, and attention had to be paid not to dissociate its layers, but its shape was more stable.

Extracted carp collagen has a heat-shrink temperature about 20 °C which increases with cross-linking, in our study to 43 °C. Normal body temperature of a sheep is 39 °C which is close to this temperature and this also may have had impact on the stability of the collagen layer, its wettability, thrombogenicity, porosity, and throughput, which should not exceed 3.000 ml/min/cm<sup>2</sup>/120 mmHg. Further design of the graft therefore would need to address this issue by longer time for cross-linking (Vesely *et al.* 2015). It should be noted that sterilization by gamma rays increases the crosslinking rate (Matuska and McFetridge 2015). Crosslinking increases stiffness of the material and has another side effect of changing the epitopes of the collagen macromolecule that are responsible for its hemostatic properties and therefore may contribute to decreased thrombogenicity (Chan and Leong 2008, Terzi *et al.* 2018, Wise *et al.* 2011). Also, formaldehyde should be replaced by a different non-carcinogenic crosslinking agent, when used in humans.

The outer layer plays a role in incorporation of the graft into the surrounding structures. In our study, the

manipulated properties of the collagen showed little influence on cellular migration into the outer artificial collagen layer.

Apart from graft type, there are several factors known to influence long term patency of the reconstruction. Previously, our group and others have demonstrated the favorable effect of constructing an anastomosis with an acute angle, or the choice of the graft diameter similar or slightly greater than the target artery (Grus *et al.* 2009, Grus *et al.* 2016a, Grus *et al.* 2016b). In our experiment, we constructed a graft with a diameter of 5mm, which is similar to that of the carotid artery in a sheep. However, experimental manipulation of the flow could have tipped the balance towards lower wall shear stress and increased thrombogenicity (Zhou *et al.* 2014). On the other hand, increased wall shear stress may accelerate degradation of the inner layer and impede formation of the neointima. The anastomosis undergoes remodeling that promotes laminar flow in the first postoperative months as well (Grusova *et al.* 2018).

This study has several limitations. Firstly, the number of surviving animals especially in group B (higher fat content) was small. Secondly, the flow on the artificially stenosed side in group B was slightly, albeit not significantly, smaller. Thirdly, the experiment was carried out on an animal model and its results cannot be fully translated to human patients. Further study with longer follow-up is warranted to assess graft patency in long-term.

## Conclusions

This study showed that modification of the fat content of collagen used in the outer and inner layer of a novel composite three-layer vascular graft plays a critical role in its patency and structural changes in the intimal layer.

## Conflict of Interest

There is no conflict of interest.

## Acknowledgements

This work was supported by Ministry of Health of the Czech Republic (grant 15-27941A) and by the grant SVV-2019 - 260 372.

## References

- BROWNING MB, DEMPSEY D, GUIZA V, BECERRA S, RIVERA J, RUSSELL B, HÖÖK M, CLUBB F, MILLER M, FOSSUM T, DONG JF, BERGERON AL, HAHN M, COSGRIFF-HERNANDEZ E: Multilayer vascular grafts based on collagen-mimetic proteins. *Acta Biomater* **8**: 1010-1021, 2012.
- CHAN BP, LEONG KW: Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *Eur Spine J* **17**: 467-479, 2008.
- CHLUPÁČ J, FILOVÁ E, BACÁKOVÁ L: Blood vessel replacement: 50 years of development and tissue engineering paradigms in vascular surgery. *Physiol Res* **58** Suppl 2: S119-139, 2009.
- DUAN R, ZHANG J, DU X, YAO X, KONNO K: Properties of collagen from skin, scale and bone of carp (*Cyprinus carpio*). *Food Chem* **112**: 702-706, 2009.
- GRUS T, GRUSOVA G, LAMBERT L, BANERJEE R, MATECHA J, MLČEK M: The influence of the anastomosis angle on the hemodynamics in the distal anastomosis in the infrainguinal bypass: an *in vitro* study. *Physiol Res* **65**: 591-595, 2016a.
- GRUS T, LAMBERT L, GRUSOVA G, LUKAC P, HRUBY J, LINDNER J: Branched crural bypass has no advantage over simple crural bypass in the treatment of peripheral arterial disease. *Int J Clin Exp Med* **10**: 7859-7866, 2017.
- GRUS T, LAMBERT L, MATĚCHA J, GRUSOVÁ G, ŠPAČEK M, MLČEK M: The ratio of diameters between the target artery and the bypass modifies hemodynamic parameters related to intimal hyperplasia in the distal end-to-side anastomosis. *Physiol Res* **65**: 901-908, 2016b.
- GRUS T, LAMBERT L, MLČEK M, CHLUP H, HONSOVA E, SPACEK M, BURGETOVA A, LINDNER J: *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**: 3519596, 2018.
- GRUS T, LINDNER J, VIDIM T, TOSOVSKY J, MATECHA J, ROHN V, LAMBERT L, GRUSOVA G: The anastomosis angle is a key to improved long-term patency of proximal femoropopliteal bypass. *Ann Vasc Surg* **23**: 598-605, 2009.
- GRUSOVA G, LAMBERT L, KAVAN J, LAMBERTOVA A, BURGETOVA A, MLČEK M, GRUS T: Natural remodeling of the distal anastomosis of an above-knee femoropopliteal bypass depicted by CT angiography of lower limbs improves geometry of the reconstruction. *Physiol Res* **67**: 857-862, 2018.
- LAMBERT L, NOVAKOVA M, LUKAC P, CECHOVA D, SUKENIKOVA L, HRDY J, MLČEK M, CHLUP H, SUCHY T, GRUS T: Evaluation of the immunogenicity of a vascular graft covered with collagen derived from the european carp (*cyprinus carpio*) and bovine collagen. *Biomed Res Int* **2019**: 5301405, 2019.
- MATUSKA AM, McFETRIDGE PS: The effect of terminal sterilization on structural and biophysical properties of a decellularized collagen-based scaffold; implications for stem cell adhesion. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **103**: 397-406, 2015.
- McCLURE MJ, SIMPSON DG, BOWLIN GL: Tri-layered vascular grafts composed of polycaprolactone, elastin, collagen, and silk: Optimization of graft properties. *J Mech Behav Biomed Mater* **10**: 48-61, 2012.
- RYCHLIK IJ, DAVEY P, MURPHY J, O'DONNELL ME: A meta-analysis to compare Dacron versus polytetrafluoroethylene grafts for above-knee femoropopliteal artery bypass. *J Vasc Surg* **60**: 506-515, 2014.
- SARKAR S, SCHMITZ-RIXEN T, HAMILTON G, SEIFALLIAN AM: Achieving the ideal properties for vascular bypass grafts using a tissue engineered approach: a review. *Med Biol Eng Comput* **45**: 327-336, 2007.
- SINGH C, WONG CS, WANG X: Medical textiles as vascular implants and their success to mimic natural arteries. *J Funct Biomater* **6**: 500-525, 2015.
- SPACEK M, CHLUP H, MITAS P, VESELY J, LAMBERT L, MLČEK M, KRAJICEK M, LINDNER J, GRUS T: Three-layer collagen-based vascular graft designed for low-flow peripheral vascular reconstructions. *J Appl Biomed* **17**: 47-52, 2019.
- TERZI A, STORELLI E, BETTINI S, SIBILLANO T, ALTAMURA D, SALVATORE L, MADAGHIELE M, ROMANO A, SILIQU D, LADISA M, DE CARO L, QUATTRINI A, VALLI L, SANNINO A, GIANNINI C: Effects of processing on structural, mechanical and biological properties of collagen-based substrates for regenerative medicine. *Sci Rep* **8**: 1429, 2018.

- 
- VESELÝ J, HORNÝ L, CHLUP H, ADAMEK T, KRAJÍČEK M, ŽITNÝ R: Constitutive modeling of human saphenous veins at overloading pressures. *J Mech Behav Biomed Mater* **45**: 101-108, 2015.
- VESELY J, HORNÝ L, CHLUP H, BERAN M, KRAJICEK M, ŽITNÝ R: Effect of polyvinyl alcohol concentration on the mechanical properties of collagen/polyvinyl alcohol blends. *Appl Mech Mater* **732**: 161-164, 2015.
- WISE SG, BYROM MJ, WATERHOUSE A, BANNON PG, NG MKC, WEISS AS: A multilayered synthetic human elastin/polycaprolactone hybrid vascular graft with tailored mechanical properties. *Acta Biomater* **7**: 295-303, 2011.
- YAMADA S, YAMAMOTO K, IKEDA T, YANAGIGUCHI K, HAYASHI Y: Potency of fish collagen as a scaffold for regenerative medicine. *Biomed Res Int* **2014**: 302932, 2014, doi: 10.1155/2014/302932
- YAMAMOTO K, IGAWA K, SUGIMOTO K, YOSHIZAWA Y, YANAGIGUCHI K, IKEDA T, YAMADA S, HAYASHI Y: Biological safety of fish (tilapia) collagen. *Biomed Res Int* **2014**: 630757, 2014. doi: 10.1155/2014/630757
- ZHOU J, LI Y-S, CHIEN S: Shear stress-initiated signaling and its regulation of endothelial function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **34**: 2191-2198, 2014.
- ZILLA P, BEZUIDENHOUT D, HUMAN P: Prosthetic vascular grafts: Wrong models, wrong questions and no healing. *Biomaterials* **28**: 5009-5027, 2007.
-



Original research article

## Three-layer collagen-based vascular graft designed for low-flow peripheral vascular reconstructions

Miroslav Špaček<sup>1\*</sup>, Hynek Chlup<sup>2</sup>, Petr Mitáš<sup>1</sup>, Jan Veselý<sup>2</sup>, Lukas Lambert<sup>3</sup>, Mikuláš Mlček<sup>4</sup>, Milan Krajčec<sup>1</sup>, Jaroslav Lindner<sup>1</sup>, Tomáš Grus<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Charles University and General University Hospital in Prague, First Faculty of Medicine, 2nd Department of Surgery – Department of Cardiovascular Surgery, Prague, Czech Republic

<sup>2</sup> Czech Technical University in Prague, Faculty of Mechanical Engineering, Department of Mechanics, Biomechanics and Mechatronics, Prague, Czech Republic

<sup>3</sup> Charles University and General University Hospital in Prague, First Faculty of Medicine, Department of Radiology, Prague, Czech Republic

<sup>4</sup> Charles University, First Faculty of Medicine, Institute of Physiology, Prague, Czech Republic

### Abstract

**Introduction:** The aim of this study was to develop a prototype of an artificial blood vessel which has similar mechanical properties to a human saphenous vein graft and to experimentally verify the function of the prosthesis via ovine carotid bypass implantation.

**Material and methods:** The prototype of an artificial graft prosthesis for low flow was developed and manufactured from a collagenous matrix and reinforcing polyester mesh. We compared the results of both the pressurisation and the mechanical stress evaluation tests of VSM with four types of hybrid vascular graft. The most similar graft (type II) was chosen for the first ovine model implantation.

**Results:** Dominant behavior e.g. mechanical response of VSM graft in plots of circumferential and axial stress during loading is observed in circumferential direction. Average results of used VSM showed area of ideal mechanical response and the properties of artificial blood vessels were fitted into this area. Developed graft remained patent after 161 days of follow up in ovine model.

**Conclusions:** The mechanical properties of the graft were designed and adjusted to be similar to the behaviour of human saphenous veins. This approach showed promising results and enhanced the final performance of the prosthesis.

**Keywords:** Collagen-based vascular graft; Low-flow peripheral vascular reconstruction; Artificial blood vessel; Human saphenous vein; Inflation-extension test

### Introduction

One of the foundations of vascular reconstructive surgery is the blood vessel graft. Arterial allotransplants were first used for aneurysm surgery on the abdominal aorta. After a short period it was observed that, because of immunologically driven degenerative changes, the grafts became closed or a rupture occurred. In the early fifties (Kunlin, 1953) the use of auto-transplant from saphenous vein (VSM) was favoured. Since then, the saphenous vein is most often used as an arterial bypass graft in coronary artery bypass surgery and, of course, in cases of below-knee arterial reconstruction. However, the use of VSM is for some patients limited by its dimensions, availability or pathology. An artificial graft may be a solution for these patients. The first prosthesis was manufactured in 1954 from synthetic fibres using textile procedures (Blakemore and Voorhees, 1954). Since that time, dynamic development has been observed in this area. Currently, artificial grafts manu-

factured from different materials such as PTFE (expanded polytetrafluoroethylene), Dacron etc., are available to be used in different anatomical areas of the human body (Ambler and Twine, 2018; Wang et al., 2007).

One of the biggest disadvantages of a prosthesis is its low patency when it is used for low flow reconstructions (Kannan et al., 2005). These limitations could be found in cases of flow lower than 100–200 ml per minute. The second drawback is the sensitivity of polyester fibre towards infection.

Experience shows that their mechanical properties are crucial characteristics (Horný et al., 2014) of vein autotransplants used for low flow bypass. They are capable of creating a perfect anastomosis and also allow the graft to become adapted to the pressure and flow conditions in the arterial system. Therefore, the aim of artificial blood vessel development was to mimic the mechanical behaviour of saphenous vein grafts (Veselý et al., 2015a). The human saphenous veins were tested in order to determine the ideal range of mechanical properties which the prosthesis characteristics should fit. The properties of artificial

**\* Author for correspondence:** Miroslav Špaček, Charles University and General University Hospital in Prague, First Faculty of Medicine, 2nd Department of Surgery – Department of Cardiovascular Surgery, U Nemocnice 2, 128 08 Prague 2, Czech Republic; e-mail: mirekspacek@seznam.cz; <http://doi.org/10.32725/jab.2019.002>

Submitted: 2018-04-13 • Accepted: 2019-01-16 • Prepublished online: 2019-01-23

J Appl Biomed 17/1: 47–52 • EISSN 1214-0287 • ISSN 1214-021X

© 2019 The Authors. Published by University of South Bohemia in České Budějovice, Faculty of Health and Social Sciences.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license.

graft were then tested and tuned, including the influence of sterilisation process.

The aim of this study was to develop a prototype of an artificial blood vessel which has mechanical properties similar to saphenous veins grafts (Singh et al., 2015) and experimentally verify the function of the prosthesis using implantation into a sheep model. The authors aimed to create an ideal bypass graft for arterial bypass surgery, best resembling the mechanical properties to a human venous graft, which to date is the best graft available in human reconstructive vascular surgery. Arterial grafts used in cardiac surgery with excellent results are limited by their length (up to 15–20 cm), and they are not sufficient for use in infrainguinal bypass surgery in patients presenting with critical limb ischaemia.

## Material and methods

### Human saphenous veins

Samples of human great saphenous vein (SV) were collected either during coronary-artery bypass surgery conducted at the General University Hospital in Prague (obtained with informed consent) or during autopsies conducted at the Department of Forensic Medicine of the Third Faculty of Medicine of Charles University in Prague. The experimental protocol was approved by the institutional Ethical Committees. Eleven samples were tested within 72 hours after excision (mean  $\pm$  SD; age  $62 \pm 8.2$ ; 9 male and 2 female; 8 samples from surgery and 3 from cadavers). The obtained mechanical response of the veins was used to determine a reference range within which the response of artificial prosthesis should fall (Vesely et al., 2015a).

### Matrix for artificial blood vessel

Eleven different polyvinyl alcohol (PVA) preparations in total were tested. The preparations differed in molecular weight, level of hydrolysis, branching, etc. The PVA was then mixed in different ratios with denatured and native collagen type I (VUP Brno) and gelatin (G9382, gelatin from bovine skin, 225 g Bloom, Type B, Sigma-Aldrich). The first selection process was performed using tests of the mechanical properties, grade of homogeneity, and solubility. Finally, the blend of denatured collagen and PVA (average Mw 130,000, 99 + % hydrolysed, Sigma-Aldrich) showed the best properties and was chosen for the next steps of development. Glycerol was used

as a plasticiser of the blends. Hydrogels of these blends can mimic the structure of native blood vessels and have a better mechanical strength than laboratory derived collagen. These samples are insoluble in water (because of their relatively high molecular weight) without additional cross-linking process. The mechanical properties of these specimens were evaluated using uniaxial tensile tests (Horný et al., 2014).

### Artificial blood vessel

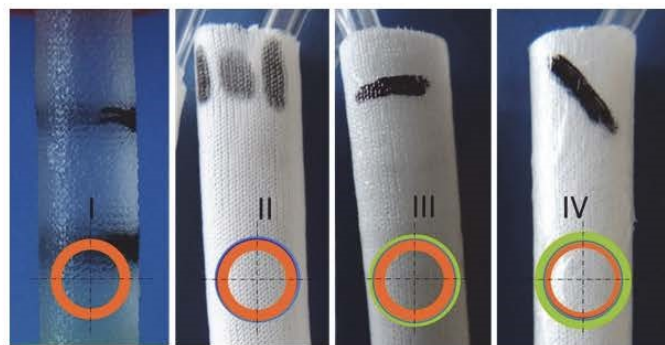
The developed artificial blood vessel is a hybrid composite, as this arrangement has already been proven as advantageous over others (de Valence et al., 2012). A mesh from monophilic polyester fibres was used as a scaffold (made in-house). The blend of denatured collagen and PVA was used as a matrix. The scaffold mesh was integrated into the matrix using extrusion process. The procedure allows for the creation of a prosthesis with different sandwich arrangement (different position of the scaffold in the matrix, different thickness of matrix). The created tubular samples were dried and sterilised by gamma irradiation using standard medical procedures. All of the manufactured prostheses were sterilised by 28 kGy of gamma radiation.

The mechanical properties of the prosthesis were given by its internal composition. Four different arrangements of artificial blood vessel were tested (Fig. 1). Type I was manufactured from the collagenous matrix only (without the reinforcement of polyester mesh). The polyester mesh was placed on the outer diameter of the specimen for the type II. Type III and IV had the mesh integrated inside the collagenous matrix. For the type III the outer layer was thinner than the inner one (ratio of 40 : 60 percent). Type IV was arranged in the opposite way, with the inner layer being thinner than the outer one.

### Pressurisation tests

Both the human saphenous vein and the artificial blood vessel samples were tested using the inflation-extension test. The mechanical response of the prosthesis was adjusted to mimic the behaviour of native veins. This test was chosen because the filling of the specimen is similar to physiological filling of blood vessels.

Each specimen was marked with a black liquid eye-liner, cannulated at one end, hung vertically in the experimental setup (Fig. 2) and pressurised by a motorised syringe up to approx. 20 kPa (150 mmHg). The prostheses were expanded to a

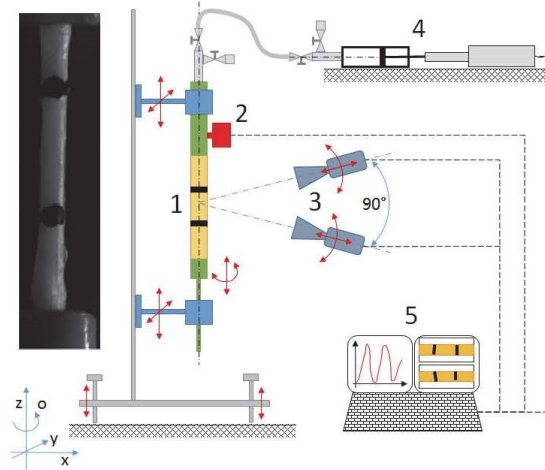


**Fig. 1.** Different types of manufactured and tested artificial blood vessel samples.

Blue – reinforcing polyester mesh; green – outer layer of collagenous matrix; orange – inner layer of collagenous matrix (for colour resolution see the on-line edition).

pressure which was approx. 5 times higher than the veins in order to confirm and verify the safety of their construction. The speed of the syringe piston was 0.1 mm/s. The intraluminal pressure was monitored by a pressure transducer (Cressto s.r.o, Czech Republic). The deformed geometry was recorded by a CCD camera (Dantec Dynamics, Skovlunde, Denmark). In the data post-processing, changes in the length between the black marks (Fig. 1) and average changes in the silhouette between markers were determined by an edge detection algo-

rithm in Matlab (MathWorks, MA, USA). The obtained data were used to compute deformations in the axial and circumferential direction. The experiments were performed at room temperature (22 °C). Prior to mechanical testing, two rings were cut out of the sample at both ends, and the mean reference dimensions of the samples (external radius, thickness) were determined by means of image analysis of digital photographs (Nis-Elements, Nikon Instruments Inc., NY, USA).



**Fig. 2.** Inflation test set-up: **1**, sample; **2**, pressure transducer; **3**, CCD camera system; **4**, pulsator; **5**, measuring and controlling PC. Left: Photograph of the sample in front of contrasting background from CCD camera. Black marks were used to evaluate the longitudinal deformation of the sample.

**Mechanical stress evaluation**

The samples were considered to be incompressible cylindrical thin-walled tubes. The kinematics of the experiment was modelled as simultaneous inflation and extension. The longitudinal ( $\lambda_z$ ) and circumferential ( $\lambda_\theta$ ) stretch ratios were computed using the same equations as in previous papers (Vesely et al., 2014; 2015a, b). Using the incompressibility condition, relationship for stretch and conditions of equilibrium forces in the axial direction, the Laplace equation can be rewritten in form (1) and (2).

$$\sigma_o = \frac{rp}{h} = \frac{R\lambda_\theta^2\lambda_z p}{H} = \frac{R(\epsilon_\theta+1)^2(\epsilon_z+1)p}{H} \quad (1)$$

$$p\pi R^2 - \sigma_z 2\pi R h = 0 \Rightarrow \sigma_z = \frac{\sigma_o}{2} \quad (2)$$

In (1),  $H$  is the reference thickness of the sample.

**Evaluation of prosthesis in the animal model**

The best mechanical performance was achieved by prosthesis type II. The prosthesis was implanted as an end-to-side graft (bypass) to ovine right carotid artery, which was ligated before bypassing. We administered standard perioperative drugs including Acetylsalitic acid, which was given for the first seven days following the operation (Anopyrin 100 mg, Zentiva, Czech Republic). The sample was explanted after 161 days and a macroscopic evaluation was performed.

**Results**

**Diameters of VSM and SCT**

The inner diameter of the tubes (SCT) was between 5.5–6.0 mm. The approximate wall thickness of the tubes was 0.56 mm in VSM and 0.41 mm in SCT (Table 1 and Table 2).

**Table 1.** Diameters of the sandwich collagen tubes

Sample	$Re_{SCT}$ (mm)	$R_{SCT}$ (mm)	$H_{SCT}$ (mm)
type I	3.21	3.01	0.40
type II-1	3.24	3.03	0.43
type II-2	3.27	3.10	0.34
type III-1	3.49	3.30	0.39
type III-2	3.50	3.34	0.31
type IV-1	3.45	3.18	0.54
type IV-2	3.46	3.23	0.45
<b>mean</b>	<b>3.37</b>	<b>3.17</b>	<b>0.41</b>
<b>SD</b>	<b>0.13</b>	<b>0.13</b>	<b>0.08</b>

SCT – sandwich collagen tube,  $Re_{SCT}$  – external radius of SCT,  $R_{SCT}$  – mean radius of SCT,  $H_{SCT}$  – thickness of SCT.



**Table 2.** Diameters of the saphenous vein grafts samples

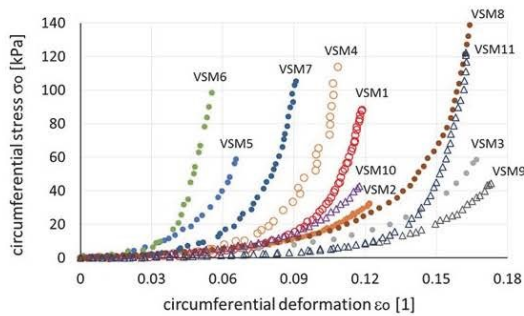
Sample	Age (years)	Sex	$R_{eVSM}$ (mm)	$R_{VSM}$ (mm)	$H_{VSM}$ (mm)	Sample of
VSM1	63	M	2.89	3.31	0.83	operation
VSM2	69	M	1.14	1.44	0.59	operation
VSM3	63	M	2.05	2.43	0.76	operation
VSM4	60	M	1.80	2.07	0.63	operation
VSM5	76	M	1.98	2.27	0.57	operation
VSM6	50	M	2.33	2.62	0.57	operation
VSM7	60	M	1.92	2.16	0.47	operation
VSM8	49	F	1.86	2.06	0.39	operation
VSM9	72	F	1.78	2.14	0.71	cadaver
VSM10	60	M	0.92	1.06	0.28	cadaver
VSM11	60	M	2.14	2.35	0.42	cadaver
<b>Mean</b>	<b>62</b>		<b>1.89</b>	<b>2.17</b>	<b>0.56</b>	
<b>SD</b>	<b>8</b>		<b>0.53</b>	<b>0.58</b>	<b>0.17</b>	

VSM – vena saphena magna,  $R_{eVSM}$  – external radius of VSM,  $R_{VSM}$  – mean radius of VSM,  $H_{VSM}$  – thickness of VSM.

**Pressurisation tests of saphenous veins**

The mechanical properties of human saphenous vein samples, curves stress-deformation, in the circumferential and axial directions are shown in Fig. 3 and Fig. 4, respectively.

It was observed that the deformation in circumferential direction is approx. 10 times higher than in the longitudinal direction. These findings lead to the assumptions that the dominant behaviour is observed in the circumferential direction. Therefore, in Fig. 3, the range of ideal mechanical response was created and the properties of artificial blood vessels were adjusted to fall within this range. In order to compare the mechanical response with the response of alternative vascular substitutes, the samples of VSM 1 and VSM 4 (healthy typical saphenous vein grafts) were used as representatives – Fig. 3. They were placed in the middle of all the tested examples and the age of donors was very close to the median of age of all tested donors, as well.

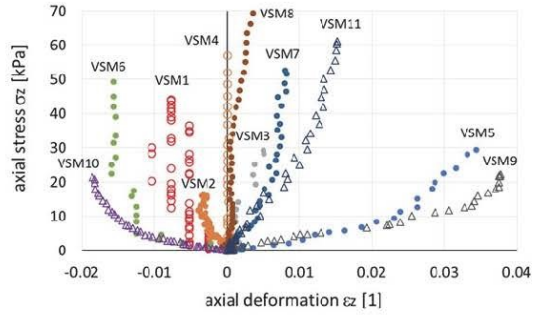


**Fig. 3a.** Stress-strain curve for human saphenous veins in the circumferential direction. The area of mechanical behavior into which the response of prosthesis was fitted is shown.

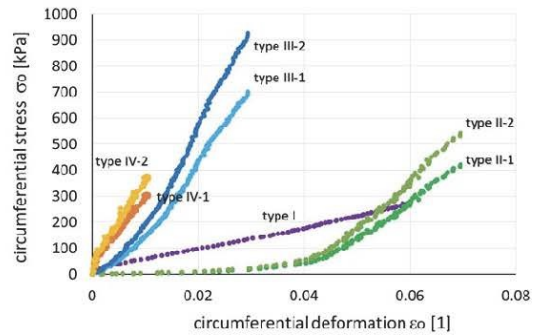
**Pressurisation tests of artificial blood vessels**

The mechanical response of the prosthesis samples is shown in Fig. 4 and Fig. 5. Type I is a simple collagenous tube with

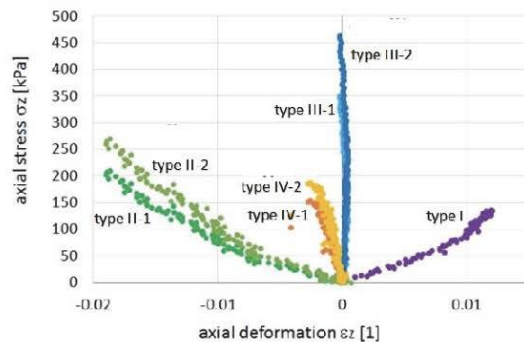
unacceptable deformation under low pressure. Type II shows a non-linear stress-deformation dependence which corresponds best to the reaction demonstrated by a vein. Type III and IV were more rigid, and this characteristic does not allow physiological pulse wave propagation.



**Fig. 3b.** Stress-strain curve for human saphenous veins in the axial direction. VSM 1 and VSM 4 are representative characteristics of healthy v. saphena magna (they did not show any type of degeneration and were retrieved from healthy donors of mean age  $62 \pm 8$  years). The area of mechanical behaviour is between characteristics of examples VSM 6 and VSM 3 (VSM 9). The nearest behaviour was seen in type II prosthesis.



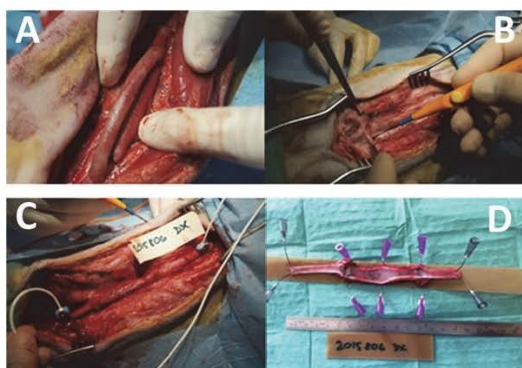
**Fig. 4.** Stress-strain curves in the circumferential direction for prosthesis with different internal arrangement



**Fig. 5.** Stress-strain curves in the axial direction for prosthesis with different internal arrangement

### Model

The first experimental implantation of the newly designed vascular prosthetic graft was carried out on an ovine model in the form of a carotid bypass (Fig. 6). The operation time was 3.4 hours, and the animal did not experience any perioperative complications or wound healing issues. The blood flow after sling placement was 145 ml/min. Explantation of the patent graft was made on post-operative day 161. The graft after removal was free of thrombi, with no signs of stenosis or any type of degeneration, including aneurysm formation.



**Fig. 6.** The implantation of prosthesis into the ovine carotid artery and the condition after 161 days is shown. **A**, proximal and distal anastomosis End-to-Side, ligation of carotid artery; **B**, explantation of patent graft; **C**, flow measurement; **D**, no macroscopic signs of intimal hyperplasia after 161 days.

### Discussion

Collagen is the most abundant biological material used for tissue engineering. It is the basic constituent of skin, bones, ligaments and connective tissues. Collagen-based biomaterials have been studied extensively for a variety of biomedical applications including dialysis membranes, wound dressings and artificial skin (Khan et al., 2011; Ravi and Chaikof, 2010; Sarkar et al., 2007). Although native collagen possesses a high tensile strength, the chemical treatment necessary for isolation makes the mechanical properties of reconstituted collagen very poor. A possible means to circumvent the problem is to reinforce the natural polymer matrix with a synthetic PVA polymer. The biggest advantages of PVAs are their mechanical performance, low price, and easy method of creating fibres. The non-antigenicity, non-toxicity, non-carcinogenicity, and non-allergy of this material has been repeatedly proven and therefore it is one of the main constituents used in the prosthesis manufacture process (Vesely et al., 2015b).

The high porosity of the inner layer reduces graft compliance due to fibrovascular infiltration of the wall, and the low porosity impedes the formation of the neointimal lining (Williams et al., 2011). The coating of the inner layer with an endothelial cell lining (endothelialisation) generally improves the durability of prosthetic vascular grafts and can be further facilitated by modifying the epitopes of the surface and tissue engineering (Heyligers et al., 2005). During graft development, the thickness of the fibres and polyester mesh manufacturing were chosen in order to not influence the perfusion of the nutrients

from the lumen to the outer layer of the graft (to avoid perfusion shadows). The unique extrusion process, performed on a special extrusion machine, allowed for the mesh integration into a homogenous matrix. The advantage of this process is, in terms of resistance to longitudinal dissection, a probably higher resistance to infection due to protection of the prosthetic scaffold from first time-contact with bacteria during implantation. The pressure wave distribution also seems to be more physiological in developer type II of the prosthesis. The theoretical advantages of our prosthesis over those already clinically used are mainly its compliance and the possibility for a more physiological distribution of the pressure wave. In our opinion, the graft exhibits a type of biointegration into the surrounding tissue, which is a major clinical sign of the absence of infection. This biointegration was clearly visible during the explantation surgery.

The prosthesis created from different layers could be programmed in its mechanical properties (Greenwald and Berry, 2000). Three processes are controlled in order to obtain the desired mechanical response. The first is the quality and mechanical performance of the collagenous matrix (the amount of collagen and PVA in the blend) (Vesely et al., 2015c). The second is the geometry of the polyester mesh (mesh size, fibre diameter, amount of fibres), and the third is the sandwich arrangement of the prosthesis layers. This study proved that the integration of the polyester mesh showed a significant influence on the final mechanical properties. Tests showed that the thicker the outer layer of prosthesis, the more compliant the whole structure is (Fig. 4). The arrangement of type II was, for the physiological filling, closest to the desired range of values set by the behaviour of veins (Fig. 4). Contrary to that, type IV showed very rigid behaviour. It should also be mentioned that the response of saphenous veins is highly nonlinear (Fig. 3). The same trend was again achieved by graft type II (Fig. 4).

To date there are three main drawbacks of currently used vascular prostheses – poor mechanical properties (compliance mismatch leading to intimal hyperplasia), susceptibility to infection, and poor hemocompatibility (thrombogenicity) resulting from the absence of an endothelial layer – the aim of this study is to address these mechanical properties.

The limitation of this study, however, is that it addresses only one of the parameters of vascular prostheses development and not the others. Other potential limitations include the fact that so far only the first, animal implantation was carried out and also the fact that the number of the performed measurements is relatively limited, although the dataset is rather unique. In our study we did not seed endothelial cells prior to implantation. Potential post-implant endothelialisation of our grafts is a topic for future research.

The effort to mimic the physiological behaviour of saphenous veins has shown to be a good strategy in the artificial blood vessel development process. Further testing in animal models and future clinical study, as well as necessary detailed histologic studies, will fully test the artificial graft proper function.

### Conclusions

We designed an artificial blood vessel as a hybrid composite, where a mesh from monophilic polyester fibres was used as a scaffold and a blend of denaturated collagen and PVA was used as a matrix. The scaffold mesh was integrated into the matrix using an extrusion process. The mechanical properties of the prosthesis were tested in four different arrangements. The

dominant behaviour of the human saphenous vein graft was in the circumferential direction.

We compared the results of the pressurisation and mechanical stress evaluation tests of the human saphenous vein graft with four types of hybrid vascular graft. The graft which best resembled the mechanical properties of human saphenous vein graft was chosen for the first *in-vivo* implantation, which was successful. The graft remained fully patent as a carotid bypass after 161 days of follow up in the ovine model and showed no signs of degeneration after removal.

#### Conflict of interests

The authors have no conflict of interests to declare.

#### Acknowledgements

This work was supported by the Ministry of Health of the Czech Republic under AZV ČR 15-27941A.

These authors (Miroslav Špaček and Hynek Chlup) contributed equally to this work.

*Dedicated to the memory of doc. MUDr. Milan Krajčiček, DrSc.*

## References

- Ambler GK, Twine CP (2018). Graft type for femoro-popliteal bypass surgery. *Cochrane Database Syst Rev* 11 (2): CD001487. DOI: 10.1002/14651858.CD001487.pub3
- Blakemore AH, Voorhees AB Jr. (1954). The use of tubes constructed from vinyon N cloth in bridging arterial defects; experimental and clinical. *Ann Surg* 140(3): 324–334.
- de Valence S, Tille JC, Giliberto JP, Mrowczynski W, Gurny R, Walpoth BH, Möller M (2012). Advantages of bilayered vascular grafts for surgical applicability and tissue regeneration. *Acta Biomater* 8(11): 3914–3920. DOI: 10.1016/j.actbio.2012.06.035.
- Greenwald SE, Berry CL (2000). Improving vascular grafts: the importance of mechanical and haemodynamic properties. *J Pathol* 190(3): 292–299. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9896(200002)190:3<292:AID-PATH528>3.0.CO;2-S.
- Heyligers JM, Arts CH, Verhagen HJ, de Groot PG, Moll FL (2005). Improving small-diameter vascular grafts: From the application of an endothelial cell lining to the construction of a tissue-engineered blood vessel. *Ann Vasc Surg* 19(3): 448–456. DOI: 10.1007/s10016-005-0026-0.
- Horný L, Netušil M, Voňavková T (2014). Axial prestretch and circumferential distensibility in biomechanics of abdominal aorta. *Biomech Model Mechanobiol* 13(4): 783–799. DOI: 10.1007/s10237-013-0534-8.
- Kannan RY, Salacinski HJ, Butler PE, Hamilton G, Seifalian AM (2005). Current status of prosthetic bypass grafts: A review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 74(1): 570–581. DOI: 10.1002/jbm.b.30247.
- Khan R, Khan MH, Bey A (2011). Use of collagen as an implantable material in the reconstructive procedures – an overview. *Biol Med* 3(4): 25–32.
- Kunlin J (1953). Venous grafts. *J Int Chir* 13(3): 313–319.
- Ravi S, Chaikof EL (2010). Biomaterials for vascular tissue engineering. *Regen Med* 5(1): 107–120. DOI: 10.2217/rme.09.77.
- Sarkar S, Schmitz-Rixen T, Hamilton G, Seifalian AM (2007). Achieving the ideal properties for vascular bypass grafts using a tissue engineered approach: a review. *Med Biol Eng Comput* 45(4): 327–336. DOI: 10.1007/s11517-007-0176-z.
- Singh C, Wong CS, Wang X (2015). Medical textiles as vascular implants and their success to mimic natural arteries. *J Funct Biomater* 6(3): 500–525. DOI: 10.3390/jfb6030500.
- Veselý J, Hadraba, D, Chlup H, Horný L, Adámek T, Žitný R (2014). Constitutive modelling and histology of vena saphena. *Appl Mech Mater* 486: 249–254.
- Veselý J, Chlup H, Krajčiček M, Žitný R (2015a). Mechanical properties of biological composite reinforced by polyester mesh. In: 53rd Experimental stress analysis. Praha: Czech Technical University in Prague, pp. 466–468.
- Veselý J, Horný L, Chlup H, Adámek T, Krajčiček M, Žitný R (2015b). Constitutive modeling of human saphenous veins at overloading pressures. *J Mech Behav Biomed Mater* 45: 101–108. DOI: 10.1016/j.jmbm.2015.01.023.
- Veselý J, Horný L, Chlup H, Beran M, Krajčiček M, Žitný R (2015c). Effect of polyvinyl alcohol concentration on the mechanical properties of collagen/polyvinyl alcohol blends. *Appl Mech Mater* 732: 161–164. DOI: 10.4028/www.scientific.net/AMM.732.161.
- Wang X, Lin P, Yao Q, Chen C (2007). Development of small-diameter vascular grafts. *World J. Surg* 31(4): 682–689. DOI: 10.1007/s00268-006-0731-z.
- Williams SK, Kleinert LB, Patula-Steinbrenner V (2011). Accelerated neovascularization and endothelialization of vascular grafts promoted by covalently bound laminin type 1. *J Biomed Mater Res A* 99(1): 67–73. DOI: 10.1002/jbm.a.33138.

## Vývoj cévní náhrady pro nízké průtoky – přehled

P. Mitáš<sup>1</sup>, M. Špaček<sup>1</sup>, T. Grus<sup>1</sup>, H. Chlup<sup>2</sup>, M. Mlček<sup>3</sup>, L. Lambert<sup>4</sup>, M. Krajčec<sup>1</sup>, J. Lindner<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Il. chirurgická klinika kardiovaskulární chirurgie, Všeobecná fakultní nemocnice a 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Praha

<sup>2</sup>Odbor biomechaniky, Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky, Fakulta strojní, ČVUT, Praha

<sup>3</sup>Fyziologický ústav, 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Praha

<sup>4</sup>Radiodiagnostická klinika, Všeobecná fakultní nemocnice a 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Praha

### Souhrn

Vývoj cévní náhrady pro nízké průtoky je aktuální otázkou. Autoři představují vlastní model hledání vývoje náhrady optimálních vlastností, které vycházejí z myšlenky převzetí charakteristiky biologického modelu – veny sapheny, a naprogramování těchto vlastností do modelu konstruované náhrady. Představovaná cévní náhrada se skládá ze tří částí – nevstřebatelného scaffoldu představujícího medii a dvou vstřebatelných kolagenních vrstev – pseudointimy a pseudoadventicie. Autoři představují základní metody fyzikálního testování (inflačně-extenzní test), stejně jako další postupy, které ovlivňují konečné vlastnosti vyvíjené protézy. Mezi takové patří tvzení kolagenu, antitrombogenní ošetření vnitřního povrchu cévní náhrady a použití metody sterilizace. Testovaný prototyp byl úspěšně ověřen implantací na ovčím modelu.

**Klíčová slova:** cévní náhrada pro nízké průtoky – fyzikální testování

### Summary

#### Development of vascular substitutes for low-flow peripheral bypass grafting – a review

P. Mitas, M. Spacek, T. Grus, H. Chlup, M. Mlcek, L. Lambert, M. Krajicek, J. Lindner

The development of a low-flow vascular prosthesis is a very topical issue. The authors present a pathway for the development of a prosthesis with optimal properties based on the idea of mimicking the characteristics of a biological model (saphenous vein graft) and programming these properties in the model of the prosthetic substitute. The vascular prosthesis presented consists of three layers – a non-absorbable scaffold representing vascular “media”, and two absorbable collagen layers – pseudointima and pseudoadventitia. The basic methods of physical testing are presented – the single axis stretch test and inflation-extension test, as well as other procedures that affect the final properties. These include collagen curing, antithrombotic treatment of the inner layer and the use of sterilization methods. The designed new graft was successfully implanted in an ovine model.

**Key words:** vascular substitutes for low-flow peripheral bypass grafting – testing

*Rozhl Chir* 2019;98:233–238

doi:10.33699/PIS.2019.98.6.233–238

### 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 [1]. 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 aotransplantáty 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 [2] 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 vyrobenou textilním způsobem ze syntetických vláken [3]. Tento základní průlom byl následován dynamickým vývojem a konstrukcí škály cévních protéz z různých materiálů, různých charakteristik a rozměrů, takže je bylo možno použít téměř ve všech anatomických oblastech tepenného systému.

Obecnou nevýhodou cévních protéz je nízká průchodnost v případě nízkého průtoku rekonstrukce, limitem jsou průtoky nižší než 100–200 ml/min. Druhou zásadní nevýhodou je citlivost polyesterového vlákna vůči infekci. Na základě dlouhodobých zkušeností s cévními náhradami vycházejí autoři z představy, že klíčovou charakteristikou pro úspěch žilního autotransplantátu v tepenných oblastech s nízkým průtokem jsou její fyzikální vlastnosti, které umožňují dokonalé technické provedení anastomózy a též umožňují náhradě přizpůsobit se průtokovým a tlakovým poměrům

v rekonstruovaném tepenném úseku [4–8]. Přibližování vlastností syntetických cévních náhrad biologickým autologním materiálům je tedy jednou z možných cest vývoje.

### Vlastní koncepce cévní náhrady

Cévní náhrada je konstruována jako kompozitní poddajná trubice s třívrstvou sendvičově uspořádanou stěnou – sestávající z prostřední nevstřebatelné porézní vrstvy – tzv. scaffold – a dvou vstřebatelných vrstev z biologického materiálu – zevní a vnitřní, tzv. pseudointima a pseudoadventicie [9]. Jako mechanicky základní vrstva scaffoldu je použita monofilová polyesterová nevrapovaná pletenina s porozitou vyšší než 10 000 ml/min<sup>2</sup>/120 mmHg [10]. Tato vrstva by měla zaručit limitní roztažnost (dilataci) alternativní protězy. Síla vláken i charakter pletení jsou voleny tak, aby nevstřebatelná složka nebránila klasické perfuzi živin z lumina až do zevní vrstvy, která při dostatečné vaskularizaci odvádí produkty metabolismu. Jinak řečeno, vlákna nevytvářejí tzv. perfuzní stěny. Pro vstřebatelné vrstvy, pseudointimu a pseudoadventicii, přicházejí z biopolymerů v úvahu kolagen, želatina, elastin, rekombinantní tropoelastin, polylysin, chitosan, celulóza a její deriváty, hyaluran a jeho deriváty [11–13].

## METODY

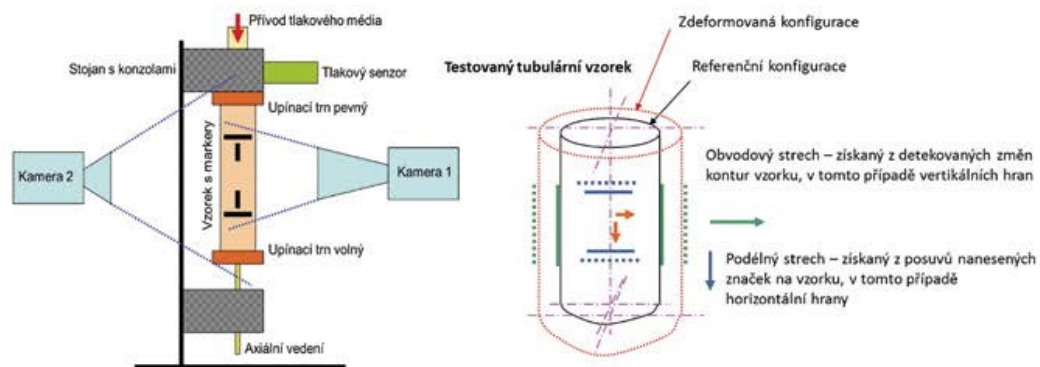
### Výroba nosného scaffoldu protězy

Pro výrobu scaffoldu bylo použito monofilní polyesterové vlákno o průměru 0,034 mm. Toto vlákno bylo v pletacím stroji sdružováno do svazků po 2 a byla z něj vytvořena pleteninová trubice. Než se dospělo k finální konstrukci pleteniny, bylo testováno několik variant. Ty se lišily počtem sdružovaných monofilních polyesterových vláken a hustotou, tím i velikostí ok pleteniny. Před integrací pleteninového scaffoldu do kolagenní hmoty,

byla pletenina ještě chemicky ošetřena praním a předsrážením. Pletenina jako scaffold byla zvolena pro své mechanické vlastnosti. Pleteninová trubice se dokáže vhodně deformovat v obvodovém i podélném směru. Tím by měla být umožněna dobrá poddajnost alternativní cévní protězy zejména v obvodovém směru. To je mimo jiné důležité pro přenos pulzaci v krevním systému a propagaci pulzní vlny. Vzhledem k dobrým mechanickým vlastnostem a biokompatibilitě je polyester využíván jak v chirurgii, tak v tkáňovém inženýrství.

### Pseudointima a pseudoadventicie – kolagenní vrstvy

Na základě podrobné analýzy vlastností byl vybrán bovinní a rybí kolagen vyrobený za kontrolovaných podmínek. Kolagen je typická vláknitá bílkovina, která je spolu s retikulinem hlavní součástí fibrilárních struktur vaziva, kůže, kostí a podpůrného skeletu všech orgánů a tkání. Antigenní vlastnosti nativního kolagenu jako heterologní bílkoviny vyvolávají vazbu komplementu, aglutinaci, anafylaxi a další reakce. Kolagenní hmota byla při výrobě protěz vystavena tvrzení, v tomto případě pomocí chemických činidel vytvářejících přídavné příčné vazby na molekulární úrovni struktury kolagenu typu I. Tato materiálová úprava je klíčová pro ovlivnění vlastní kolagenu, zejména bobtnavosti, stupně denaturace a doby vstřebávání. V této oblasti je zcela zásadní spolehlivá kontrola stupně vytvrzení [14,15]. Stupeň vytvrzení se hodnotí podle takzvané teploty smrštění ( $T_s$ ) nebo též denaturační teploty. Vlákna netvrzeného kolagenu se při stoupající teplotě, mezi 30 až 40 °C, smrští. Dochází také k denuraci a změně fyzikálních vlastností hmoty, např. poklesu mechanických vlastností. Úměrně se stupněm vytvrzení stoupá i teplota, při které ke smrštění dochází. Bylo jednoznačně prokázáno, že antigenicita nativního kolagenu klesá úměrně se stupněm vytvrzení (hodnoceno podle  $T_s$ ) až k bezvýznamným hodnotám. Podobný trend byl pozorován u trombogenicity. Je však nezbyt-

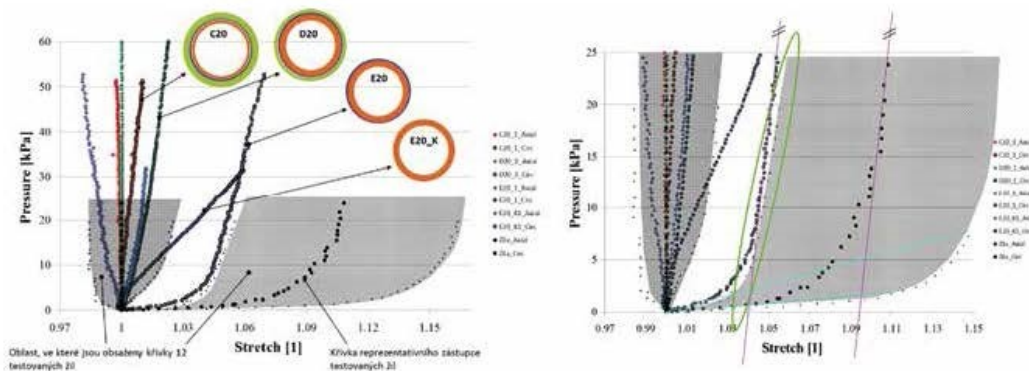


**Schéma 1: Vlevo: schematický pohled na upnutý vzorek instalovaný do konzol**

Schéma odpovídající reálným fotografiím na Obr. 1. Vpravo: schéma deformování tubulárního vzorku během inflačně-extenzního testu. Jsou zde naznačeny markery (linky) na kterých se identifikovala obvodová a axiální deformace.

**Schéma 1: Left: A schematic view of the sample secured in the console**

Scheme corresponding to the real photographs in Fig. 1. Right: Diagram of the deformation of a tubular sample during an inflation-extension test. Blue and green lines indicate levels at which the circumferential and axial deformations have been measured.



**Schema 2: Inflačně-extenzní testy cévních náhrad jako kompozitních trubíc s různým sendvičovým uspořádáním stěny**  
 Vlevo: testované varianty sendvičového uspořádání stěny náhrady, kde modrá barva reprezentuje scaffold z polyesterové pleteniny a zelená s oranžovou vnější a vnitřní stěnu náhrady tvořenou kolagenní hmotou. Vpravo: detail obrázku vlevo v rozsahu fyziologických hodnot s vyznačením trendu mechanické odezvy reprezentativní nativní žilny sapheny magna a prototypu cévní náhrady.  
**Schema 2: Inflation-extension tests of vascular grafts with different sandwich wall configurations**  
 Left: tested variants of the sandwich arrangement of the graft wall, where blue color represents the scaffold, green and orange colors the outer and inner walls of the collagen-based layer. Right: Detail of the left figure within physiological values.

né uváděné výhodné faktory korelovat s mechanickými vlastnostmi a hledat optimální konfiguraci úpravy kolagenní hmoty.

#### 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 Schema 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.

#### Testování kompozitních celků

Dalším krokem ve vývoji cévní náhrady je mechanický test náhrady jako kompozitního celku v různých sendvičových uspořádáních (Schema 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, která je na Schematu 2 označena jako E20. Takto utvořená náhrada se svými fyzikálními vlastnostmi nejvíce přibližuje nativní saféně. Jde o uspořádání stěny trubice, kdy je kolagenní trubice uvnitř sítě. Na náhradě byla vytvořena i vnější kolagenní vrstva – pseudoadventicie, aby byl scaffold překryt kolagenní hmotou. Pro lepší přiblížení mechanické

odezvy cévní náhrady humánní žile [16] 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, jak je patrné na Schematu 2 [17].

#### Antitrombogenní ošetření vnitřního povrchu cévní náhrady

Lokální aplikace antitrombotických látek může zpomalovat počáteční nekontrolované ukládání fibrinu na vnitřní stěnu cévních náhrad, které u cév s malým průtokem může vést až k jejich uzavěru. Také postupné uvolňování heparinu do krevního řečiště může významně prodloužit životnost cévních náhrad. V průběhu roku 2014 byly autory vyvinuty antitrombotické biomateriály s postupným uvolňováním heparinu a/nebo streptokinázy [18]. Obě tyto látky jsou již široce využívány v klinické praxi [19]. V posledních letech je věnována zvýšená pozornost možnosti využití jiného antitrombotického činidla, oxidu dusnatého (NO). Přirozená endoteliální výstelka cév uvolňuje NO, který inhibuje aktivaci krevních destiček a polymorfonukleárních leukocytů, brání tak jejich agregaci a působí preventivně proti cévní trombóze. Kromě antitrombotických účinků má NO celou řadu dalších důležitých fyziologických funkcí [22]. Další účinnou látkou je např. dipiridamol, který inhibuje vychytávání adenosinu v erythrocytech, krevních destičkách a endoteliálních buňkách za podmínek in vivo i in vitro. Inhibice dosahuje v maximu přibližně 80 % a její intenzita je při terapeutických koncentracích (0,5–2,0 µg/ml) závislá

na podané dávce [18]. Snížení agregace krevních destiček snižuje jejich konzumpci k normálním hodnotám. Navíc má adenosin vazodilatační účinky, což je jeden z mechanismů, kterým dipyridamol vyvolává vazodilataci.

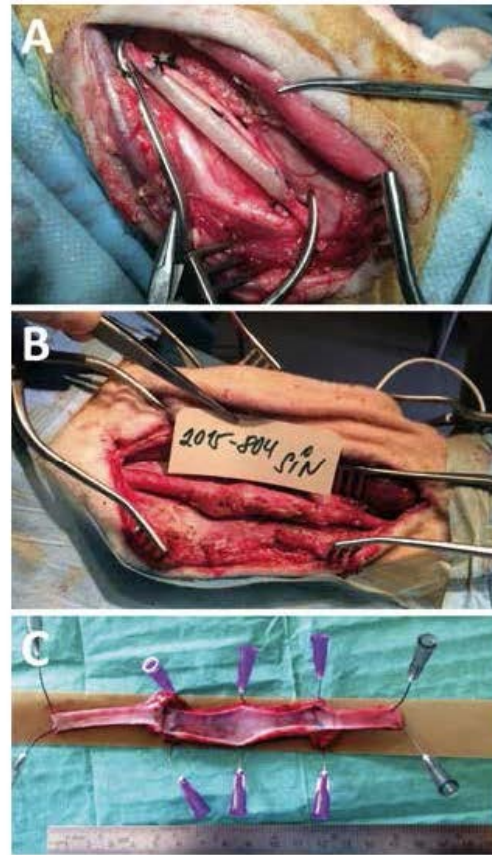
## VÝSLEDKY

### Experimentální ověření

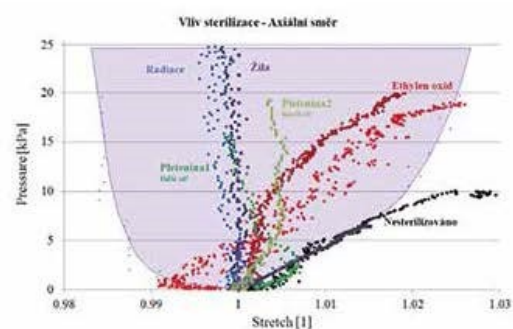
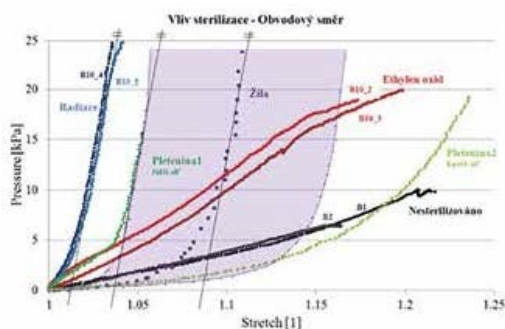
Uvedené poznatky získané během experimentální práce vedly k vytvoření kompozitní třívrstvé cévní náhrady. Prostřednictvím technologie výroby extruze homogenizované kolagenní hmoty, se podařilo změnou uspořádání orientace kolagenních vláken a jejich svazku, vytvořit anizotropní materiál s nelineární mechanickou odezvou při zatěžování. To je další krok přibližující alternativní cévní náhradu nativním cévám. Dalším krokem bylo její experimentální ověření na ovčím modelu [9]. Při implantaci graftu jako náhrady ovčí karotidy (bypass s anastomózami end-to-side nebo náhrada s anastomózami end-to-end) u 7 ovcí a peroperačním omezením průtoku zaškrcením výtokového traktu (s průtoky cca 150 ml/min.) bylo při půlročním přežití ovcí dosaženo velmi dobré průchodnosti (6 průchodných, 1 uzavřená) [9].

### Vliv sterilizace na mechanickou odezvu cévní náhrady

Ukázalo se, že typ sterilizace má na mechanické chování náhrady značný vliv [26–28]. Při sterilizaci vznikají ve vnitřní struktuře kolagenní hmoty přídavné vazby, tzv. crosslinky, jak názorně dokumentuje Schema 3. Ukázalo se, že tyto přídavné vazby ve struktuře kolagenu mají na jeho výsledné fyzikální vlastnosti významný vliv. Je tedy podstatné, jakým způsobem sterilizujeme cévní náhradu, v jejíž struktuře je obsažen kolagen. Tato skutečnost může vést nejen ke změně vlastností ve smyslu obvodové a axiální deformace (Schema 3), ale i k vyšší náchylnosti cévní náhrady k trombóze.



**Obr. 1: Fotografie cévní náhrady**  
Cévní náhrada po implantaci (A), s 6 měsíčním odstupem při reoperaci (B) a explantovaná průchodná náhrada s patrným omezením průtoku za distální anastomózou (C)  
**Fig. 1: Perioperative photo of implanted graft**  
Perioperative photo of implanted graft (A), 6 months later (B) and explanted graft with no thrombi (C).



**Schema 3: Vliv typu sterilizace na mechanickou odezvu cévní náhrady při inflačně - extenzním testu**

Vlevo: charakteristiky vnitřní tlak v náhradě - obvodová deformace náhrady. Vpravo: charakteristiky vnitřní tlak v náhradě - axiální (podélná) deformace náhrady.

**Schema 3: The effect of the type of sterilization on the mechanical response of the vascular graft in the inflation-extension test**  
Left: characteristics of the internal pressure in the replacement - circumferential deformation of the graft. Right: characteristics of internal pressure in the graft - axial deformation of the graft.

## DISKUZE

Mezi základní požadavky na cévní náhrady patří biokompatibilita, vhodné mechanické vlastnosti – dostatečná pevnost a viskoelastické nebo hyperelastické vlastnosti podobné jako u nativní cévy a schopnost adaptace na měnící se podmínky krevního průtoku. Dalším nezbytným požadavkem je nízká trombogenicita vnitřního povrchu cévních náhrad [29]. Nejnáročnější požadavky jsou na cévní náhrady s malým průtokem a malým průměrem, které jsou velmi náchylné k trombóze. V současné době nejsou na trhu skutečně spolehlivé syntetické cévní náhrady určené pro nízké průtoky.

Chan-Park et al. popisují postupy tkáňového inženýrství vedoucí k požadovaným vlastnostem cévních náhrad [30]. Diskutují zde i požadavky na biodegradovatelné materiály. Cévní náhrady s malým průtokem jsou vyžadovány zejména pro pacienty s potřebou náhrady koronárních a podkolenních cév – tzv. distálních bypassů. Současně možnosti zahrnují použití autologních cév a syntetických náhrad [31,32]. Požadovanými mechanickými vlastnostmi infrainguinálních bypassů se zabývali Sarkara et al. [33]. Ideální biomateriál pro tuto oblast tkáňového inženýrství by se měl mechanickými vlastnostmi blížit nativním cévám, ale také podporovat buněčný růst, podporovat produkci extracelulární matrix a inhibovat trombogenicitu [12,23]. Kaibara et al. popsali metodu *in vitro* hodnocení trombogenicity biomateriálů [23]. Rovněž z těchto požadavků vycházejí autoři při hledání adekvátních vlastností cévní náhrady.

V případě použití biologického materiálu pro konstrukci cévní protézy pro nízké průtoky – tedy například kolagenu – je třeba zohlednit, že výrobou proces vytváření fyzikálních vlastností náhrady nekončí a vliv sterilizace na tuhost náhrady může být zásadní [34]. Typ použitého kolagenu je otázkou dalších experimen-

tů s výhledem využití rybího kolagenu s předpokladem nižší antigenicity, ve srovnání s nejčastěji používaným kolagenem bovinním.

## 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 vlákn), 2) vhodně zvoleným sendvičovým uspořádáním kompozitní trubice (poloze scaffoldu vůči matici), 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 [9,17].

*Práce je věnována památce doc. MUDr. Milana Krajčeka, DrSc.*

*Poděkování: Práce vznikla s podporou grantu MZ ČR AZV 15-27941A, projektu Specifického vysokoškolského výzkumu 2019 – 260 372 a projektu PROGRES Q38/LF1.*

### Konflikt zájmů

*Autoři článku prohlašují, že nejsou v souvislosti se vznikem tohoto článku ve střetu zájmů a že tento článek nebyl publikován v žádném jiném časopise.*

## LITERATURA

1. Carrel A. Ultimate results of aortic transplantation. *J Exp Med.* 1912;15:389–92.
2. Kunlin J. Venous grafts. *J Int Chir.* 1953;13:313–9.
3. 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.
4. Kakisis JD, Liapis ChD, Breuer Ch, et al. Artificial blood vessel: The Holy Grail of peripheral vascular surgery. *J Vasc Surg.* 2005;41:349–54. doi: 10.1016/j.jvs.2004.12.026.
5. Kannan RY, Salacinski HJ, Butler PE, et al. Current status of prosthetic bypass grafts: a review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2005;74:570–81. doi: 10.1002/jbm.b.30247
6. Chlupáč J, Filová E, Bačáková L. Blood vessel replacement: 50 years of development and tissue engineering paradigms in vascular surgery. *Physiol Res.* 2009;58 (Suppl.2) S119–S139.
7. Heyligers JMM, Arts CHP, Verhagen HJM, et al. Improving small-diameter vascular grafts: From the application of an endothelial 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.
8. Berglund JD, Mohseni MM, Nerem RM, et al. A biological hybrid model for collagen-based tissue engineered vascular constructs. *Biomaterials* 2003;24:1241–54.
9. 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
10. Veselý J, Chlup H, Krajčec M, et al. Mechanical properties of biological composite reinforced by polyester mesh. In *Experimental Stress Analysis 2015*. Czech Technical University in Prague 2015:466–8.
11. Veselý J, Horný L, Chlup H, et al. Effect of polyvinyl alcohol concentration on the mechanical properties of collagen/polyvinyl alcohol blends. *Applied Mechanics and Materials* 2015;732:161–4. doi: 10.4028/www.scientific.net/AMM.732.161.
12. Ravi S, Chaikof EL. Biomaterials for vascular tissue engineering. *Regen Med.* 2010;5:107. doi: 10.2217/rme.09.77
13. Nerem RM. Tissue engineering a blood vessel substitute: The role of biomechanics. *Yonsei Medical Journal* 2000;41:735–9. doi:10.3349/ymj.2000.41.6.735.
14. Martinez AW, Caves JM, Ravi S, et al. Effects of crosslinking on the mechanical properties, drug release and cytocompatibility of protein polymers. *Acta Biomater.* 2014;10:26–33. doi: 10.1016/j.actbio.2013.08.029.
15. Chaouat M, Le Visage C, Baille WE, et al. A novel cross-linked poly(vinyl alcohol) (PVA) for vascular grafts. *Adv Funct Mater.* 2006;18:2855–61. doi:10.1002/adfm.200701261.
16. 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. doi:10.1016/j.jmbm.2015.01.023
17. Špaček M, Chlup H, Mítáš P, et al. Three-layer collagen-based vascular graft de-



- signed for low-flow peripheral vascular reconstructions. *J Appl Biomed*. 2019; in press.
18. Beran M, Drahorad J, Molik P, et al. Site-specific thrombolytic and anticoagulant biomaterials. *Proceedings of AMN-7. Int J Nanotechnology* 2017;14:31–7. doi:10.1504/IJNT.2017.082443.
  19. Fernandes EG1, de Queiroz AA, Abraham GA, et al. Antithrombogenic properties of bioconjugate streptokinase-polyglycerol dendrimers. *J Mater Sci Mater Med*. 2006;17:105–11. doi: 10.1007/s10856-006-6813-5
  20. Sask KN. Antithrombogenic biomaterials: Surface modification with an snitthrombin-heparin covalent complex. Open access dissertations and theses 4-1-2012. McMaster University. DigitalCommons@McMaster
  21. Zhou Z, Meyerhoff ME. Preparation and characterization of polymeric coatings with combined nitric oxide release and immobilized active heparin. *Biomaterials* 2005;26:6506–17. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.04.046.
  22. Carpenter AW, Johnson JA, Schoenfisch MH. Nitric oxide-releasing silica nanoparticles with varied surface hydrophobicity. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2014;454: 144–51. doi: 10.1016/j.colsurfa.2014.04.046.
  23. Kaibara M, Kawamoto Y, Yanagida S, et al. In vitro evaluation of antithrombogenicity of hybrid-type vascular vessel models based on analysis of the mechanism of blood coagulation. *Biomaterials* 1995;16:1229–34.
  24. Popowich Q, Jiang JA, Hrabie JE, et al. Nitric oxide and nanotechnology: A novel approach to inhibit neointimal hyperplasia. *Journal of Vascular Surgery* 2008;47:173–82. doi: 10.1016/j.jvs.2007.09.005.
  25. Innocente F, Mandracchia D, Pektok E, et al. Paclitaxel-eluting biodegradable synthetic vascular prostheses: a step towards reduction of neointima formation? *Circulation* 2009;120(11 Suppl):S37–45. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.848242.
  26. Noah EM, Chen J, Jiao X, et al. Impact of sterilization on the porous design and cell behavior in collagen sponges prepared for tissue engineering. *Biomaterials* 2002;23:2855–61.
  27. Olde Damink LH, Dijkstra PJ, Van Luyn MJ, et al. Influence of ethylene oxide gas treatment on the in vitro degradation behavior of dermal sheep collagen. *Journal of Biomedical Materials Research* 1995;29:149–55. doi: 10.1002/jbm.B.20290203.
  28. Cheung DT, Perelman N, Tong D, et al. The effect of gamma-irradiation on collagen molecules, isolated alpha-chains, and crosslinked native fibers. *Journal of Biomedical Materials Research* 1990;24:581–9. doi: 10.1002/jbm.B.20240505.
  29. Sarkar S, Schmitz-Rixen T, Hamilton G, et al. Achieving the ideal properties for vascular bypass grafts using a tissue engineered approach: a review. *Med Biol Eng Comput*. 2007;45:327–36. doi:10.1007/s11517-007-0176-z
  30. Chan-Park MB, Shen JY, Cao Y, Xiong Y, et al. Biomimetic control of vascular smooth muscle cell morphology and phenotype for functional tissue-engineered small-diameter blood vessels. *J Biomed Mater Res A*. 2009;88:1104–21. doi:10.1002/jbm.a.32318.
  31. Nerem RM, Seliktar D. Vascular tissue engineering. *Annu Rev Biomed Eng*. 2001;3:225–43. doi:10.1146/annurev-bioeng.3.1.225.
  32. Sarkar S, Salacinskij HJ, Hamilton G, et al. The mechanical properties of infrainguinal vascular bypass grafts: their role in influencing patency. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2006;31:627–36. doi: 10.1016/j.ejvs.2006.01.006.
  33. Sarkar S, Burriesci G, Wojcik A, et al. Manufacture of small calibre quadruple lamina vascular bypass grafts using a novel automated extrusion-phase-inversion method and nanocomposite polymer. *Journal of Biomechanics* 2009;42:722–30. doi: 10.1016/j.jbiomech.2009.01.003.
  34. Veselý J, Chlup H, Žitný R, et al. Effect of sterilization on mechanical properties of biological composite. *ECCOMAS Congress 2016 VII European Congress on Computational Methods in Applied Sciences and Engineering*. June 2016.

MUDr. Miroslav Špaček, Ph.D.  
 II. chirurgická klinika kardiiovaskulární chirurgie,  
 VFN a 1. LF UK Praha  
 U Nemocnice 2  
 128 08 Praha 2  
 e-mail: miroslav.spacek@vfn.cz