

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Autoreferát dizertační práce



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

**Optimalizace vlastností kolagenních
pěn z rybího kolagenu pro medicínské
a veterinární použití.**

MUDr. Peter Lukáč

Praha 2021

Doktorské studijní programy v biomedicině
Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor: Experimentální chirurgie

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

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

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

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

OBSAH

SOUHRN	str. 4
SUMMARY	str. 6
1. ÚVOD	str. 7
2. HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE	str. 8
3. METODIKA A VÝSLEDKY	str. 9
4. ZÁVĚR	str. 15
5. LITERATURA	str. 18
6. VLASTNÍ PUBLIKAČNÍ AKTIVITA	str. 19

SOUHRN

V průběhu projektu byly vyvinuty unikátní kolagenní pěny z kolagenu získaného z kůže sladkovodní ryby (kapr obecný, *Cyprinus carpio*). Pomocí síťování karbodiimidem byl překonán problém s nestabilitou kolagenní matrix z kolagenu získávaného z chladnokrevných živočichů při tělesné teplotě savců. Následně byly pěny impregnovány antibiotiky (gentamicin a vankomycin) a opětovně lyofilizovány, což je postup, který zajišťuje požadovanou koncentraci antibiotika bez rizika následného vymytí při dalších technologických krocích. Uvedený produkt je, na rozdíl od přípravků z nesíťovaného kolagenu, stabilní i při sterilizaci gamma zářením. Finální sterilizovaný produkt byl testován *in vivo* na potkaním modelu infikované rány.

Byla prokázána efektivita v léčbě potenciálně letální infekce *Pseudomonas aeruginosa* a kmene *Stafylococcus aureus* rezistentní k meticilinu (MRSA). Vzhledem k vysoké potřebě profylaxe a terapie infekcí pooperačních a jiných ran právě výše uvedenými polyrezistentními původci se jedná o slibný prostředek k budoucímu klinickému využití.

Zkušenosti, které jsme získali v průběhu uvolňování ATB z kolagenních pěn budou v dalším vývoji použity pro impregnaci zevní kolagenní vrstvy cévní protézy, čímž bychom mohli eliminovat jednu z největších nevýhod a rizik spojených s použitím umělých materiálů a tím je infekce.

Dále v průběhu výzkumu jsme vytvořili pilotní technologie k programování porozity a programování degradace těchto kolagenních pěn z rybiho kolagenu. Byla provedena celá řada testů včetně analýz sekundárních struktur kolagenových vzorků zdrojového kolagenu a kolagenu získaného z vyrobené cévní náhrady včetně *in vivo* testů. Míra zachování nativní struktury kolagenu byla sledována pomocí FTIR a elektroforetické analýzy. Dále byl navržen

způsob heparinizace kolagenových vzorků a způsob jejich analýzy.

Byly zkoumány fyzikální vlastnosti kolagenových lyofilizátů s antibiotiky. Práce byly zaměřeny na návrh složení a přípravy kolagenových lyofilizátů s antibiotiky. Dále byly provedeny analýzy degradačních vlastností připravovaných materiálů a na jejich základě byl postup přípravy doplněn o dodatečné síťování kolagenu.

Byly ověřovány různé způsoby síťování a na základě výsledků byl doporučen finální postup přípravy. Na základě výsledků byly ve spolupráci s výrobcí kolagenu modifikovány výrobní postupy za účelem optimalizace vlastností implantátů.

Do hrudní stěny potkanů byly implantovány části nových prototypů za účelem ověření doby vstřebávání prosíťované a sterilizované kolagenní hmoty. Dále probíhalo testování farmakokinetických možností kolagenních pěn, ovlivnění degradace, denaturace, vhojování. Byly formulovány finální postupy pro výrobu kolagenních protéz a pěn.

SUMMARY

During the project, unique collagen foams were developed from collagen obtained from the skin of freshwater fish (common carp, *Cyprinus carpio*). The problem of instability of the collagen matrix from collagen obtained from cold-blooded animals at mammalian body temperature was overcome by carbodiimide crosslinking. Subsequently, the foams were impregnated with antibiotics (gentamicin and vancomycin) and re-lyophilized, a process that ensures the required concentration of antibiotic without the risk of subsequent leaching in further technological steps. This product, in contrast to non-crosslinked collagen preparations, is stable even when sterilized by gamma radiation. The final sterilized product was tested *in vivo* in a rat model of an infected wound.

Efficacy in the treatment of potentially lethal *Pseudomonas aeruginosa* infection has been demonstrated and testing of the dreaded and increasingly common methicillin-resistant strain of *Staphylococcus aureus* (MRSA) is currently underway. Due to the high need for prophylaxis and therapy of postoperative and other wound infections by the above-mentioned polyresistant agents, this is a promising tool for future clinical use.

The experience we have gained during the release of ATB from collagen foams will be used in further development to impregnate the outer collagen layer of the vascular prosthesis, which could eliminate one of the biggest disadvantages and risks associated with the use of artificial materials and infection.

Furthermore, during the research, we developed pilot technologies to program the porosity and degradation programming of these collagen foams from fish collagen. A number of tests were performed, including analyzes of secondary structures of collagen samples of source collagen and collagen obtained from the produced vascular prosthesis, including *in vivo* tests. The degree of preservation of the native collagen structure was monitored by

FTIR and electrophoretic analysis. Furthermore, a method for heparinization of collagen samples and a method for their analysis was proposed.

The physical properties of collagen lyophilisates with antibiotics were investigated. The work was focused on the design of the composition and preparation of collagen lyophilizates with antibiotics. Furthermore, analyzes of the degradation properties of the prepared materials were performed and on the basis of them the preparation process was supplemented by additional crosslinking of collagen.

Various cross-linking methods were tested and the final preparation procedure was recommended based on the results. Based on the results, production processes were modified in cooperation with collagen manufacturers in order to optimize the properties of implants.

Parts of the new prototypes were implanted in the chest wall of the rats in order to verify the absorption time of the sieved and sterilized collagen mass. Furthermore, testing of pharmacokinetic possibilities of collagen foams, influencing of degradation, denaturation, healing was performed. Final procedures for the production of collagen prostheses and foams were formulated.

1. ÚVOD

Infekce v operační ráně můžeme považovat za Achilovu patu chirurgických oborů a jsou nejčastější příčinou nehojící se rány. Často komplikují a zhoršují pooperační průběh a mohou být příčinou úmrtí v časném i pozdějším pooperačním průběhu (Kirkland KB et al., 1999).

Terapeutickou možností v prevenci, nebo řešení již infikované

operační rány, je použití **antibiotik** (ATB), a to jak v podobě systémového, tak i lokálního podání. V případě lokální aplikace ATB jsou již několik let používány speciální kolagenní houby nebo kolagenní gely s obsahem antibiotika. Tyto kolagenní houby obvykle používáme i pro jejich hemostatický efekt k zástavě drobného krvácení přímo do operační rány nebo je přikládáme zevně na ránu. Určitou nevýhodou, jak konec konců ukážeme i v této práci, je nekontrolované uvolnění antibiotika z této **kolagenní houby** během několika desítek minut. Například v cévní chirurgii přikládáme tyto houbičky na suturovanou cévu přímo do operační rány k zástavě drobného krvácení, a následně přešíváme měkké tkáně nad cévou s houbičkou. Pokud je houbička napuštěna ATB dochází k vyplavení tohoto antibiotika během několika desítek minut a následně již v ráně zůstává jen kolagenní houba, kterou musí organismus odbourat. Tento proces může trvat i několik týdnů v závislosti na úpravě kolagenu což může mít vliv na hojení operační rány.

Hypotézy práce:

1. Rybí kolagen ze sladkovodních ryb vykazuje menší antigenní potenciál, než kolagen bovinního původu, Při jeho implantaci in vivo je eliminována lokální imunitní reakce.
2. Rychlost rozpadu kolagenních pěn lze programovat různým způsobem jejich přípravy.
3. Rychlost uvolňování léčiva z kolagenních pěn lze programovat různým způsobem jejich přípravy.
- 4.

Cíle práce:

1. Vývoj metodiky a testování imunogenicity základní kolagenní hmoty na buněčných a myších modelech
2. Vývoj a příprava různých typů kolagenních pěn z kolagenu sladkovodních ryb

3. Vývoj kolagenních pěn s obsahem antibiotik určených pro krytí infikovaných ran
4. Vývoj sendvičových pěn z vrstev různě porézního kolagenu za účelem řízení doby rozpadu a uvolnění antibiotik
5. In vitro testování mechanických vlastností připravených typů kolagenních pěn.
6. Experimentální ověření doby vstřebávání kolagenní pěny z rybiho kolagenu in vitro a in vivo na krysích modelech.

Výsledky práce jsou publikovány ve 4 stěžejních impaktovaných publikacích. V rámci autoreferátu jsou zde stručně uvedeny dvě hlavní, není tedy dodrženo standardní členění autoreferátu.

2. METODIKA A VÝSLEDKY

Testování imunogenních vlastností implantátů kapřího kolagenu

Ke sledování **systemové odpovědi** jsme zvolili monitorování hladiny vybraných cytokinů v sérech implantovaných myší. Dále jsme sledovali aktivitu splenocytů z implantovaných zvířat, které jsme stimulovali konvenčními pozitivními stimulatory (PWM, LPS) a gely připravenými z bovinního i kapřího kolagenního implantátu. Po stimulaci (24 a 72 hodin) *in vitro* byla stanovena hladina cytokinů v supernatantech kultur metodou ELISA.

Ke sledování odezvy imunitního systému byly vybrány následující cytokiny (dle *Qingsong Ye, 2013*):

IL-1 β , TNF- α , IFN- γ . Prozánětlivé cytokiny, produkovány M1 makrofágy, *pozn.*: především hladiny IFN- γ mohou být ovlivněny

modifikací/zesítněním kolagenu. IFN- γ je klíčovým regulátorem fagocytózy kolagenu makrofágy, jeho přítomnost v mikroprostředí kolagenních implantátů koreluje s přílivem neutrofilů, exprese neutrofilů je známá během reakce na cizí kolagenní materiál.

IL-10. Protizánětlivý cytokin, klíčový pro regulaci exprese degračních enzymů (MMPs) a jejich inhibitorů TIMPs. (*Lacruz et al., 1995; Sternlicht and Werb, 2001*). IL-10 je v reakci na cizorodý materiál produkován syncytií makrofágů a M2 makrofágy.

IL-13. Cytokin klíčový v alergickém zánětu, úloha v reakci na cizí materiál spočívá v aktivaci makrofágů k formování gigantických buněk, tyto následně exprimují IL-10 a tím je potlačena enzymatická degradace kolagenu.

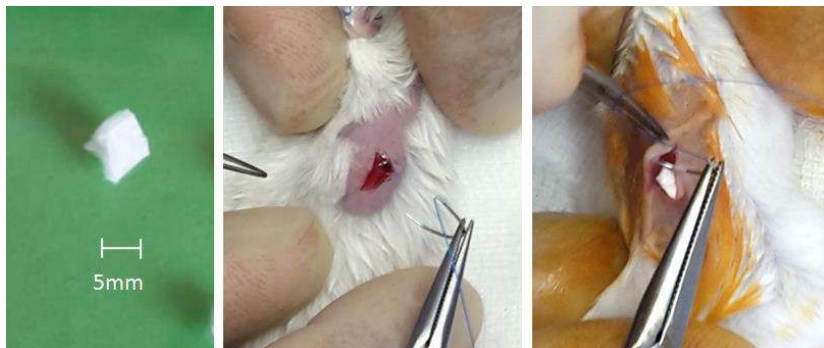
Protokol pilotních imunizačních pokusů:

Studie byly prováděny na myším modelu. Myším (BALB/c, samice, 8 týdnů) byl implantován podkožně lyofilizovaný bovinní (Bov)/kapří (Cyp) kolagen, cca 0,5 cm³, 1–1,1 mg.

- Implantace I (sledování reaktivity bovinního kolagenu): 2 skupiny (K, BOV) – 7 myší ve skupině (K-kontrolní skupina)
- Implantace II (porovnání bovinního a kapřího kolagenu): 3 skupiny (K, BOV, CYP) – 7 myší ve skupině

Subkutánní implantace na dorzální straně trupu, příprava operačního pole 2 dny před implantací pomocí krému (Weet), anestezie - 1,5% isofluran. Místo implantace označeno ligačním klipem (Small Titanium) při implantaci I, vnitřním stehem (Prolen 5-0, Ethicon) při implantaci II. (Obr. 5.)

Obr. 1.: Gelita-Spon Standard, kolagenní hemostatická houbička z bovinního kolagenu



Odběry byly provedeny u Implantace I a II: 3., 8., 10., 15., 22. a 29. den po implantaci. V den odběru usmrcena 1 myš z každé skupiny a odebrána tkáň z okolí implantátu k histologickému posouzení, slezinné buňky, ke stimulačním experimentům *in vitro* a sérum.

Slezinné buňky inkubovány s různými stimulatory (PWM, LPS, gel Bov a gel Cyp – gely připraveny z kolagenu určenému k implantaci, 100ug/ml H₂O). V supernatantech (po 72 hodinové stimulaci buněk) a v séru byla následně sledována přítomnost vybraných cytokinů.

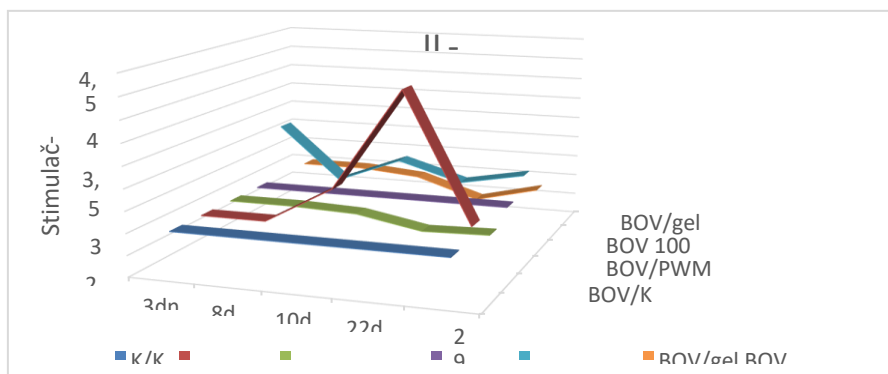
Imunogenní vlastnosti kolagenu - výsledky implantace

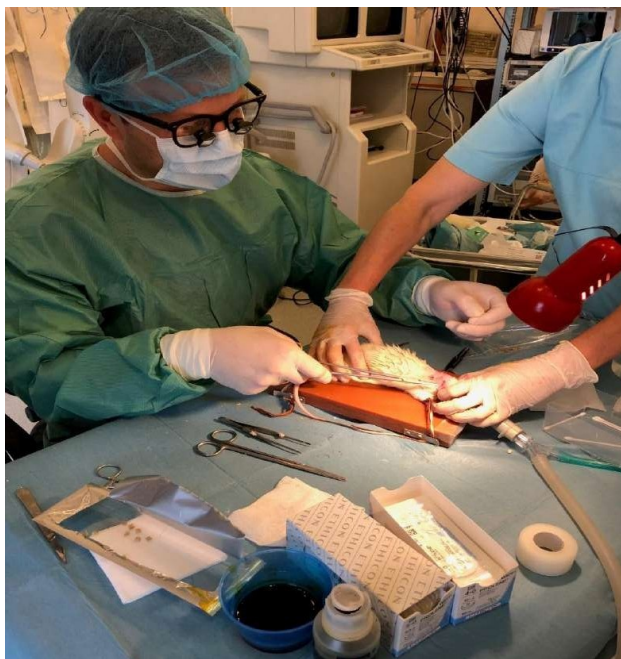
Observe pokusných zvířat: Myši po zákroku pravidelně kontrolovány, první čtyři dny denně. Od 2. dne bez viditelných změn v chování, běžná aktivita. 3. den žádná reakce na tlak v místě implantace. 4. den 4 myši ze skupiny CYP, 2 ze skupiny BOV a 1 z kontrolní skupiny mírné známky zánětu v okolí rány (začervenalé okraje řezu, bez viditelného otoku). 8. den reakce v okolí rány u

myši odeznívá, téměř není patrná. 10. den všechna zvířata bez známek reakce, rána zhojena, některá zvířata bez vnějších stehů.

Obrázek 2 (Implantace I): Průměrná hladina cytokinů (pg/ml) v supernatantech *in vitro* stimulovaných splenocytů implantovaných (BOV) a kontrolních (K) skupin stanovená metodou ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Odběry 3., 8., 10., 22. A 29. den po implantaci. Kultury myších splenocytů byly inkubovány v obohaceném RPMI 1640 mediu bez stimulantu (K, negativní kontrola), s pokeweed mitogenem (PWM, pozitivní kontrola), s boviním a kapřím gelem (gBOV, gCYP). Po hodinové inkubaci byly kultury odstředěny a supernatanty kultur byly použity ke stanovení koncentrace cytokinů. Nebyly zjištěny signifikantní rozdíly.

Obr. 2 Průměrná hladina cytokinů (pg/ml) v supernatantech *in vitro* stimulovaných splenocytů implantovaných (BOV) a kontrolních (K) skupin stanovená metodou ELISA





Obr.3 Anestezie laboratorního potkana před implantací.

V průběhu projektu byly vyvinuty unikátní kolagenní pěny z kolagenu získaného z kůže sladkovodní ryby (kapr obecný, *Cyprinus carpio*). Pomocí síťování karbodiimidem byl překonán problém s nestabilitou kolagenní matric z kolagenu získávaného z chladnokrevných živočichů při tělesné teplotě savců. Následně byly pěny impregnovány antibiotiky (gentamicin a vankomycin) a opětovně lyofilizovány, což je postup, který zajišťuje požadovanou koncentraci antibiotika bez rizika následného vymytí při dalších technologických krocích. Uvedený produkt je, na rozdíl od přípravků z nesíťovaného kolagenu, stabilní i při sterilizaci gamma zářením. Finální sterilizovaný produkt byl testován *in vivo* na potkaních modelu infikované rány.

Byla prokázána efektivita v léčbě potenciálně letální infekce *Pseudomonas aeruginosa* a kmene *Stafylococcus aureus* rezistentní k meticilinu (MRSA). Vzhledem k vysoké potřebě profylaxe a terapie infekcí pooperačních a jiných ran právě výše uvedenými polyrezistentními původci se jedná o slibný prostředek k budoucímu klinickému využití.

Zkušenosti, které jsme získali v průběhu uvolňování ATB z kolagenních pěn budou v dalším vyvoji použity pro impregnaci zevní kolagenní vrstvy cévní protězy, čímž bychom mohli eliminovat jednu z největších nevýhod a rizik spojených s použitím umělých materiálů a tím je infekce.

Dále v průběhu výzkumu jsme vytvořili pilotní technologie k programování porozity a programování degradace těchto kolagenních pěn z rybího kolagenu. Byla provedena celá řada testů včetně analýz sekundárních struktur kolagenových vzorků zdrojového kolagenu a kolagenu získaného z vyrobené cévní náhrady včetně in vivo testů. Míra zachování nativní struktury kolagenu byla sledována pomocí FTIR a elektroforetické analýzy. Dále byl navržen způsob heparinizace kolagenových vzorků a způsob jejich analýzy.

Byly zkoumány fyzikální vlastnosti kolagenových lyofilizátů s antibiotiky. Práce byly zaměřeny na návrh složení a přípravy kolagenových lyofilizátů s antibiotiky. Dále byly provedeny analýzy degračních vlastností připravovaných materiálů a na jejich základě byl postup přípravy doplněn o dodatečné síťování kolagenu.

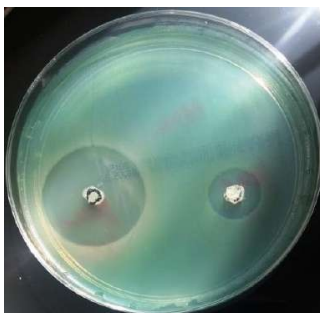
Byly ověřovány různé způsoby síťování a na základě výsledků byl doporučen finální postup přípravy. Na základě výsledků byly ve spolupráci s výrobcí kolagenu modifikovány výrobní postupy za účelem optimalizace vlastností implantátů.

Do hrudní stěny potkanů byly implantovány části nových prototypů, za účelem ověření doby vstřebávání prosíťované a sterilizované kolagenní hmoty. Dále probíhalo testování farmakokinetických možností kolagenních pěn, ovlivnění degradace, denaturace, vho-

jování. Byly formulovány finální postupy pro výrobu kolagenních protéz a pěn.

Ověřování depotizačních vlastností a uvolňování antibiotik ze zesíťovaného kolagenu

Pomocí výše uvedené metody byly připraveny houbičky s antibiotiky síťované pomocí karbodiimidu. V houbičkách byla přidána 3 antibiotika: nitrofurantoin, vankomycin, gentamicin.



Obr. 4 Petriho miska s nakultivovanou Pseudomonas aeruginosa s přiloženými houbičkami s gentamicinem – vlevo nesíťovaná, vpravo síťovaná.

pokus byly použity houbičky s antibiotiky bez síťování a referenční přípravek Garamycin SCHWAMM®, který je charakterizován jako Léčivá hubka složená pouze z equinního kolagenu a gentamicinu, která obsahuje plochu 10x10 cm 130 mg gentamicinu.

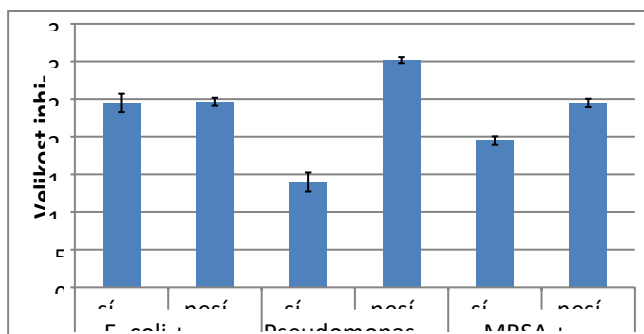
Diskové difusní testy s kolagenními houbičkami výrobnými kolyofilizací s antibiotiky

Metodika: Pro zjištění efektivity houbiček jako nosiče antibiotik byly použity standardní mikrobiologické metody (diskové difuzní testy) s použitím vzorků houbiček kruhového tvaru o průměru 5

mm. Pro jednotlivé testy byly použity bakterie *Pseudomonas aeruginosa* (gentamicin), *Staphylococcus aureus* rezistentní na meticilin (MRSA – vancomycin), *Escherichia coli* (nitrofurantoin). Na Petriho misky byla standardním způsobem rozočkovávána souvislá vrstva bakterií, po 24 hodinách byly přiloženy disky o průměru 6 mm vystřižené z houbiček a po dalších 24 hodinách byla odečtena velikost inhibiční zóny (obr. 4).

Pokusy byly provedeny s pěti disky od každého vzorku, všech 5 disků vždy z jedné houbičky.

Výsledky



Obr. 5 Velikost inhibičních zón jednotlivých testovaných houbiček.

Nitrofurantoin: velikost inhibičních zón je totožná, neohledě na síťování ($P = 0,765$), což je s největší pravděpodobností způsobeno velice nízkou rozpustností nitrofurantoinu ve vodném prostředí. Z obou houbiček se tedy uvolnilo pouze malé množství z celkového množství antibiotika, aniž by se projevila retenční schopnost houbiček. Nitrofurantoin je z tohoto pohledu ideální lék, neboť k „depotizaci“ dochází vlivem jeho fyzikálních vlastností.

Gentamicin: významný rozdíl ($p < 0,0001$) – síťované houbičky mají o cca 54 % menší inhibiční zóny.

Vancomycin: významný rozdíl ($p < 0,0001$) – síťované houbičky mají o cca 20 % menší inhibiční zóny.

Závěr (diskové difuzní testy):

Inhibiční zóny síťovaného kolagenu byly znatelně menší (obr.44), což je dáno technologickým procesem výroby, kdy síťovadlo je přidáno do houbičky vytvořené kolyofilizací s antibiotikem a následně je velká část antibiotika vymyta při procesu síťování, který zahrnuje vymytí nadbytku síťovacího činidla hydrofilním rozpouštědlem. U nitrofurantoinu, který je velice málo rozpustný v hydrofilních rozpouštědlech k vymytí nedošlo. Velice malý variační koeficient (malé SD úsečky) naznačuje, že ATB. jsou v houbičkách rovnoměrně rozptýlena. Jednalo se o první testy depotizace s dodanými houbičkami AV ČR. Na základě těchto výsledků byl upraven finální technologický postup „dvojitý lyofilizace“.

4. ZÁVĚR

Cíle práce byly splněny – na počátku jsme vyvinuli metodiku pro testování imunogenicity základní kolagenní hmoty – rybího kolagenu z třeboňského kapra, podařilo se naprogramovat v čase optimální uvolňování antibiotika v ranně a současně obdobně probíhající degradaci nosiče – kolagenu. Testovali jsme tři standardně užívané typy antibiotik. Výsledky práce byly publikovány ve 4 impaktovaných publikacích.

5. LITERATURA (klíčové literární odkazy)

Chiang HY, Herwaldt LA, Blevins AE, Cho E, Schweizer ML. Effectiveness of local vancomycin powder to decrease surgical site infections: A meta-analysis. *Spine J* 2014;14(3):397-407.

Liu, Chao & Liu, Xin & Xue, Yang & Ding, Tingting & Sun, Jiao. (2015). Hydrolyzed tilapia fish collagen modulates the biological behavior of macrophages under inflammatory conditions. *RSC Adv.* 5. 30727-30736. 10.1039/C5RA02355F.

Pielesz A. Temperature-dependent FTIR spectra of collagen and protective effect of partially hydrolysed fucoidan. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2014;118:287-93.

Subhan, F., Kang, H. Y., Lim, Y., Ikram, M., Baek, S. Y., Jin, S., Jeong, Y. H., Kwak, J. Y., & Yoon, S. (2017). Fish Scale Collagen Peptides Protect against $\text{CoCl}_2/\text{TNF-}\alpha$ -Induced Cytotoxicity and Inflammation via Inhibition of ROS, MAPK, and NF- κ B Pathways in HaCaT Cells. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017, 9703609

Chattopadhyay S and Raines RT. Review collagen-based biomaterials for wound healing. *Biopolymers*, vol. 101, no. 8, pp. 821–833, 2014.

Brinkman CL, Tyner HL, Schmidt-Malan SM, Mandrekar JN, Patel R. Causes and Implications of the Disappearance of Rifampin Resistance in a Rat Model of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Foreign Body Osteomyelitis. *Antimicrob Agents Chemother*, 59(8), 4481-4488 (2015).

Shiels SM, Tennent DJ, and Wenke CJ. Topical rifampin powder for orthopedic trauma part I: rifampin powder reduces recalcitrant infection in a delayed treatment musculoskeletal trauma model. *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 36, no. 12, pp. 3136–3141, 2018

6. VLASTNÍ PUBLIKAČNÍ AKTIVITA

Publikace se vztahem k tématu dizertační práce

a) Impaktované

1. Hartinger JM, **Lukáč P**, Mitáš P, Mlček M, Popková M, Suchý T, Šupová M, Závora J, Adámková V, Benáková H, Slanař O, Šíma M, Bartoš M, Chlup H, Grus T. Vancomycin-releasing cross-linked collagen sponges as wound dressings. *Bosn J Basic Med Sci.* 2021 Feb 1;21(1):61-70. doi: 10.17305/bjbms.2019.4496.
IF (2019) = 2,05 pozn.:
Sdílené první autorství
2. Hartinger JM, **Lukáč P**, Mlček M, Popková M, Suchý T, Šupová M, Chlup H, Horný L, Závora J, Adámková V, Slanař O, Kozlík P, Molnarova K, Honsová E, Lambert L, Grus T. Rifampin-Releasing Triple-Layer Cross-Linked Fresh Water Fish Collagen Sponges as Wound Dressings. *Biomed Res Int.* 2020 Oct16;2020:3841861. doi: 10.1155/2020/3841861. eCollection 2020.
IF (2018) = 2,14
3. **Lukáč P**, Hartinger JM, Mlček M, ..., Lambert L, Grus T. A novel gentamicin-releasing wound dressing prepared from freshwater fish *Cyprinus carpio* collagen cross-linked with carbodiimide. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 2019, 34(3), pp. 246–262
IF (2019) = 1,624

4. Lambert L, Novakova M, **Lukac P**, Cechova D, Sukenikova L, Hrdy J, Mlcek 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 Feb 28;2019:5301405. doi: 10.1155/2019/5301405. eCollection 2019.
IF (2019) = 2,14

Ostatní publikace v časopisech bez vztahu k dizertační práci

a) Impaktované

1. Grus T, Lambert L, Grusova G, **Lukáč P**, Hruby J, Lindner J. Branched crural bypass has no advantage over simple crural bypass in the treatment of peripheral arterial disease. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 2017, 10(5), pp. 7859–7866, IJCEM0046290
IF (2019) = 0,166

b) Neimpaktované, v časopisech s recenzním řízením

1. Grus T, Mitáš P, **Lukáč P**, Grusová G, Lambert L. Větvený pedální bypass v léčbě kritické končetinové ischemie - zkušenosti našeho centra | Branched pedal bypass in the treatment of critical limb ischemia - a single center experience. *Rozhledy v chirurgii : měsíčník Československé chirurgické společnosti*, 2018, 97(11), pp. 509–513

Celkový IF = 8.12, citace WoS 15, bez autocitací 10, citace Scopus 16, H index 2

