

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Postgraduální doktorské studium v biomedicině

Oborová rada: Experimentální chirurgie

předseda: prof. MUDr. Zdeněk Krška, DrSc.



MUDr. Peter Lukáč

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

Fish collagen foam properties optimization for medical and veterinary use.

Dizertační práce

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

Praha, 2021

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 mezi univerzitního projektu Theses.cz, za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze dne 4.5.2021

MUDr. Peter Lukáč

Identifikační záznam:

Lukáč, Peter. *Optimalizace vlastností kolagenních pěn z rybího kolagenu pro medicínské a veterinární použití. [Fish collagen foam properties optimization for medical and veterinary use.]*

Praha, 2021. Počet stran 175, počet příloh 4. Dizertační práce. Univerzita Karlova, 1. Lékařská fakulta, II.chirurgická klinika kardiiovaskulární chirurgie. Vedoucí práce Grus, Tomáš

PODĚKOVÁNÍ

Poděkovat bych chtěl především mému školiteli doc. MUDr. Tomáši Grusovi, Ph.D., který mi umožnil podílet se na řešení grantového úkolu a vedl grantový 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 Mlčkoví, PhD. bych rád poděkoval za pomoc při realizaci experimentů/operací a další péči o experimentální zvířata v prostorách Fyziologického ústavu 1. LF UK, rád bych poděkoval za spolupráci na testování mechanických vlastností Ing. Hynku Chlupovi, Ph.D., a především PhDr. Janu M. Hartingerovi, Ph.D. 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 Ing. Jaromíru Fichtlovi.

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* napotkaním 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 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 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 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 prosířované 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.

Klíčová slova: kolagen, antibiotické krytí ran, gentamicin, vankomycin, rifampicin

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 lyophilisates 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.

Key words: collagen, antibiotic wound dressing, gentamicin, vancomycin, rifampin

Obsah

PODĚKOVÁNÍ	1
SOUHRN	2
SUMMARY	4
Obsah	6
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK (seřazeno abecedně)	9
1. Úvod	12
1.1 Kolagen	16
1.2 Kolagen jako matrice pro uvolňování léčiv	18
1.2.1 Antibiotika	21
1.2.2 Lokální anestetika	23
1.2.3 Imunosupresiva	24
2 Hypotézy a cíle práce	25
2.1 Hypotézy práce:	25
2.2 Cíle práce:	25
3 Testování imunogenity kolagenu	26
3.1 Testování bovinního kolagenu	26
3.1.1 Protokol pokusu	27
3.1.2 Výsledky	27
3.2 Testování imunogenních vlastností implantátů kapřího kolagenu	28
3.2.1 Protokol pilotních imunizačních pokusů:	28
3.2.2 Imunogenní vlastnosti kolagenu - výsledky implantace	29
3.2.3 Protokol následných imunizačních pokusů:	36
3.2.4 Výsledky provedených testů	38
3.2.5 Závěr	41
4 Testování doby vstřebávání kolagenu	42
4.1 Protokol pokusu	42
4.2 Mikroskopické nálezy – kolagenní matrice:	44
4.3 Mikroskopické nálezy implantovaných kolagenů:	45
4.3.1 Skupina 1. Implantovaný bovinní a rybí kolagen, 3. den.	45
4.4 Shrnutí testu resorbce kolagenu:	50
5 Ověření technologických možností výroby hemostatické pěny z rybího kolagenu sladkovodních ryb – kolagenové lyofilizáty s antibiotiky	50

5.1	Návrh složení a přípravy kolagenových lyofilizátů s ATB.....	50
5.2	Podrobná analýza fyzikálních vlastností kolagenových lyofilizátů s antibiotiky	55
6	OPTIMALIZACE DOBY DEGRADACE KOLAGENOVÝCH LYOFILIZÁTŮ DODATEČNÝM ZESÍTĚNÍM.....	57
7	OVĚŘOVÁNÍ DEPOTIZAČNÍCH VLASTNOSTÍ A UVOLŇOVÁNÍ ANTIBIOTIK ZE ZESÍŤOVAÉHO KOLAGENU	59
7.1	Diskové difusní testy s kolagenními houbičkami vyrobenými kolyofilizací s antibiotiky	60
7.1.1	Metodika	60
7.1.2	Výsledky	61
7.1.3	Závěr (diskové difuzní testy):	61
8	PŘÍPRAVA FINÁLNÍCH KOLAGENOVÝCH LYOFILIZÁTŮ S ANTIBIOTIKY, METODA DVOJÍ LYOFILIZACE.....	63
8.1	Gentamicin a vankomycin.....	63
8.2	Rifampicin.....	66
8.2.1	Optimalizace doby degradace	68
8.2.2	Příprava sednvičových pěn	69
8.2.3	Příprava kolagenových vláken.....	71
8.3	VLIV STAVBY PĚN NA UVOLŇOVÁNÍ ANTIBIOTIK A DEGRADACI	75
9	OVĚŘOVÁNÍ DEPOTIZAČNÍCH VLASTNOSTÍ A UVOLŇOVÁNÍ ANTIBIOTIK ZE ZESÍŤOVAÉHO KOLAGENU PŘIPRAVENÉHO METODOU DVOJÍ LYOFILIZACE – IN VITRO EXPERIMENTY	78
9.1	Testy s finálními produkty hemostatických kolagenních pěn z rybího kolagenu s depotizovaným gentamicinem.....	78
9.1.1	Diskové difusní testy s kolagenními houbičkami vyrobenými kolyofilisací s gentamicinem:	78
9.1.2	Uvolňování gentamicinu v čase	80
9.2	Testy s finálními produkty hemostatických kolagenních pěn z rybího kolagenu s depotizovaným vankomycinem	81
9.3	Diskové difusní testy s kolagenními houbičkami vyrobenými kolyofilizací s vankomycinem	81
9.3.1	Uvolňování vankomycinu v čase	83
9.4	Testy s finálními produkty hemostatických kolagenních pěn z rybího kolagenu s depotizovaným rifampicinem.....	85
9.4.1	Diskové difusní testy s kolagenními houbičkami vyrobenými kolyofilizací s rifampicinem:	85

9.4.2	STABILITNÍ TESTY RIFAMPICINU	86
9.4.3	IN VITRO UVOLŇOVÁNÍ RIFAMPICINU Z HOUBIČEK.....	88
9.5	SHRnutí IN VITRO EXPERIMENTŮ.....	90
10	Testování biologických vlastností kolagenních pěn z rybího kolagenu - In vivo experimenty	91
10.1	Gentamicin	91
10.1.1	Metodika:	92
10.1.2	Výsledky	93
10.1.3	Závěr (<i>in vivo</i> pokusy s gentamicinem):	96
10.2	Vankomycin	97
10.2.1	Metodika:	97
10.2.2	Výsledky	99
10.2.3	Závěr (<i>in vivo</i> pokusy s vankomycinem):	101
10.3	Rifampicin.....	101
10.3.1	Metodika:	102
10.3.2	Výsledky	105
10.4	LOKÁLNÍ REAKCE NA HOUBIČKY S RIFAMPICINEM PODANÉ POTKANŮM DO PODKOŽÍ.....	108
10.4.1	Závěr (<i>in vivo</i> pokusy s rifampicinem).....	115
11	Závěr.....	116
12	LITERATURA:	119
13	Publikační výstupy.....	125
13.1	Publikace se vztahem k tématu dizertační práce.....	125
13.2	Ostatní publikace v časopisech bez vztahu k dizertační práci	126
14	Přílohy.....	127

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK (seřazeno abecedně)

AMK	aminokyseliny
ATB	antibiotika
AUC	plocha pod křivkou
AV	Akademie věd
BALB/c	albínský, laboratorně vyšlechtěný kmen myši domácí
BOV	bovinní
bFGF	růstový faktor fibroblastů
°C	stupeň Celsia
CFU	Colony Forming Units, jednotky tvořící kolonie
CLCS	zesíťovaný kolagen
nCLCS	nezesíťovaný kolagen
CYP, Cyp	třeboňský kapr
ČVUT	české vysoké učení technické
<i>D</i>	míra degradace
DEMI	demineralizovaná voda (purifikovaná)
EU	veličina ke kvantifikaci aktivity endotoxinu
EDC	N-(3 dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimid hydrochlorid
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay analytická metoda využívaná ke kvantitativnímu stanovení různých antigenů.
E_{sw}	míra bobtnání
FTIR	infračervená spektrometrie
g	gram
gBOV	hovězí gel
gCYP	kapří gel
GEN	gentamicin

H & E, HE	barvení preparátu (hematoxilin-eozin)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
iBOV	hovězí implantát
iCYP	kapří implantát
IF	impakt factor
IFN	interferon
IL	interleukin
IM	intramuskulární
K	kontrolní
Kolagenní materiál:	
SIGMA	kolagen typu I., krysí ocas
CTU	kolagen typu I., rybí kůže
IRSM	kolagen typu I., rybí kůže izolován ÚSHM
LPS	lipopolysacharidový komplex
M mol ml, l	mililitr, litr
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MCP1(CCL2)	monocytový chemoatraktantový protein 1
MIP1 α (CCL3)	makrofágový zánětlivý protein 1-alfa
MRSA	Meticilin-rezistentní zlatý stafylokok
min	minuta
mikroCT	vyšetření výpočetní tomografií mikro rozlišení (experimentální)
mmHg	milimetr rtuťového sloupce
mm, cm, m	milimetr, centimetr, metr
NF	nitrofurantoin
ng	nanogram
NHS	N-hydroxysuccinimid
PBS	fosfátový pufr
PCL	polykaprolakton
PCR	Polymerázová řetězová reakce

PE	polyethylen
PES vlákno	polyesterové vlákno
PEG	Polyethylen glycol
PEO	polyethylen oxidu
PHA	Fytohemaglutinin
PLA	polylactic acid
PLGA	polylactic-co-glycolic acid
PMS Steripack	obal pro zatavení protézy
PVA	polyvinyl alkohol
PVC	polyvinylchloride
RPMI 1640	růstové médium používané v buněčné kultuře
SC	subkutánní
SEM	rastrovací elektronový mikroskop
SRel	Sirius red elastika, metoda barvení kolagenních vláken a elastiky
VAN	vankomycin
VFN	Všeobecná fakultní nemocnice
VUP	Výzkumný ústav pletářský
W_t	hmotnost suchého vzorku
TGF- β	ransforming growth factor beta, označení pro několik mimobuněčných homodimerních proteinů, které pracují jako cytokiny a látky regulující dělení
TNF	Tumor necrosis factor
TT	tělesná teplota
W	hmotnost

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 preventivního použití antibiotik je roky známé podání antibiotika těsně před operací s cílem vytvoření chráněného koagula v oblasti operačního pole jako prevence nosokomiální nákazy. Pro každý chirurgický obor je specifické určité mikrobiální spektrum. Vhodné je sledování mikrobiálního spektra na pracovišti a v souvislosti s výskytem nosokomiálních nákaz a příslušného bakteriálního kmene je vhodný cílený výběr antibiotika, který je pacientům před výkonem podáváno. Toto antibiotikum je obvykle každý rok měněno v reakci na mikrobiální spektrum pracoviště. Samozřejmostí je cílené podávání antibiotika u pacientů s infikovaným defektem, kde známe infekční agens, obvykle dle posledního stěru z infikované oblasti před operačním výkonem nebo z hemokultury. V případě kardiovaskulární chirurgie jsou nejčastějšími bakteriálními kmeny především stafylokoky a streptokoky a v případě G- bakterií se jedná o *Escherichia Coli* a o *Pseudomonas Aeruginosa*. V případě těchto bakteriálních kmenů se jeví ideální použití vankomycinu pro G+ bakterie a aminoglykosidová antibiotika pro G- bakterie. Tato ATB však mohou mít při perorálním a v některých případech i při parenterálním podání omezený průnik do tkání (Stein GE, Wells EM, 2010).

V případě krátkého intervalu mezi podáváním jednotlivých dávek ATB nebo u pacientů s renální insuficiencí či jaterním selháním může dojít k systémové toxicitě, která je způsobená vysokou koncentrací ATB v těle. V některých případech, je proto možné nebo dokonce vhodnější použití lokální aplikace ATB. To potom obvykle nevede i v poměrně vysokých koncentracích k projevům systémové toxicity. Tento fakt dokumentuje celá řada prací v oboru ortopedie, traumatologie a dalších chirurgických oborech (Buttaro MA et al., 2005; Gruessner U et al., 2001; Xiong L et al., 2014; Hamman BL et al., 2014; Kahramanca Ş et al., 2013, Morávek J, et al., 1986).

V práci Buttara a Gimeneze bylo dosaženo vysokých lokálních hladin vankomycinu bez známek nefrotoxicity při operaci náhrady kyčelního kloubu při použití kostních štěpů impregnovaných vankomycinem v kombinaci s cementem obsahujícím aminoglykosidy (Buttaro MA et al., 2005).

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. Typickým příkladem jsou komerčně dostupné kolagenní houbičky 10x10 cm obsahující 130 mg gentamicinu (Garamycin Schwamm, Eurocept B.V., Ankeveen, obr. 1)



Obrázek 1. Komerčně dostupný kolagenní produkt s gentamicinem na krytí operačních ran.

Kolagenní houby, které jsou v současnosti dostupné na trhu, mají několik nevýhod:

1. **Antibiotikum se vyplaví v řádu několika desítek minut** a po jeho vyplavení zůstává v organismu jen kolagen, i několik týdnů, než je organismem odbourán (viz další výsledky této práce).
2. Kolagen používaný k výrobě těchto houbiček (pěn) bývá většinou získáván ze savců. (bovinního, koňského a prasečího). Tento kolagen ovšem **vykazuje vysokou antigenicitu**, což se přisuzuje tyrosinu v telopeptidech, která může způsobovat alergické reakce a to i po extrakci telopeptid, které jsou nejvíce antigenními molekuly kolagenu, získaného ze savců. Alergické reakce u takto upravovaných pěn se vyskytují u zhruba 3%-4% populace (Charriere G et al., 1989).
3. Použití bovinního kolagenu také znamená **riziko přenosu bovinní spongiformní encefalopatie, případně jiných zoonoz** (Jongjareonrak A et al., 2005).
4. V současné době vystupuje do popředí i **náboženské vyznání pacienta**, kde musíme být velmi obezřetní zejména při použití kolagenních pěn z bovinního nebo prasečího kolagenu.

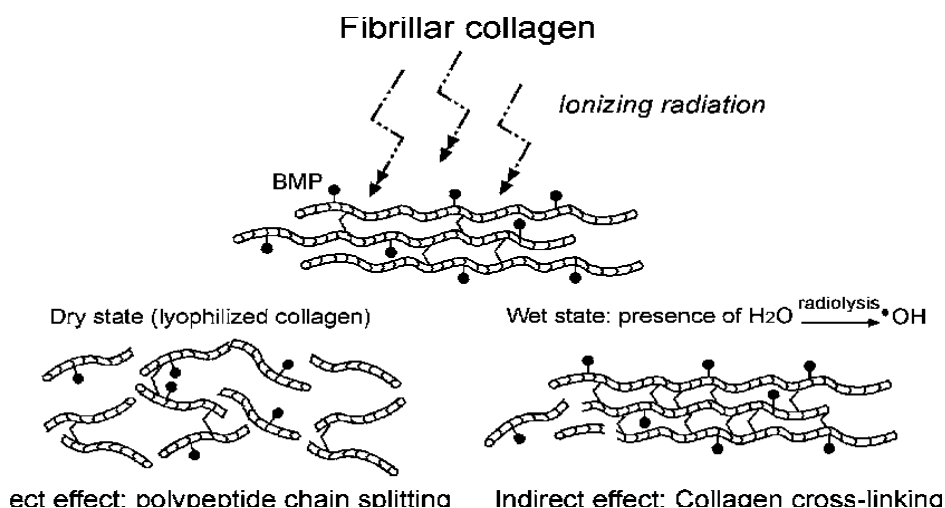
Z výše uvedených nevýhod současně používaných kolagenů k výrobě koalegenních pěn roste poptávka po alternativním typu kolagenu. Určitou alternativou, která výše uvedená negativa eliminuje je právě rybí kolagen. Rybí kolagen vykazuje menší antigenicitu v porovnání s kolagenem získaným ze savců, vykazuje výbornou biokompatibilitu, podporuje adhezi a diferenciaci buněk (Pati F et al. 2012; Oh HH et al., 2015). Jeho jednoznačnou výhodou je že eliminuje přenos zoonoz z ryb na člověka, protože při jeho zpracování a používání při teplotě lidského těla žádný rybí patogen nepřežívá. Použití rybího kolagenu se tedy jeví jako mnohem bezpečnější, než použití kolagenu získaného ze savců.

V posledních letech se objevují především na trhu s kosmetickými a potravinářskými produkty výrobky z kolagenu mořských ryb. Uplatnění kolagenu mořských ryb v medicínských aplikacích zmiňují již některé studie vycházející z oboru tkáňového inženýrství (N. Nagai, Y. Nakayama, 2008) a stomatologie (Yanagiguchi 2001, Yang 2001). Nicméně systematické publikace o použití rybích kolagenů v medicíně jsou

literatuře zatím poměrně ojedinelé. Objevují se převážně práce na poli popáleninové medicíny, konstrukci cévních protéz nebo speciálních krytí na hojení ran.

Rybího kolagen je ve srovnání s běžně používanými kolageny odolnější vůči fyzikálnímu nebo chemickému poškození, zřejmě i díky prostředí ve kterém dochází ke střídání tlaků a teplot, což je typické pro místa, kde ryby žijí. Protože si tento rybí kolagen zachovává svou trojšroubovicovou strukturu, zůstávají polypeptidy a aminokyseliny nedotčené, čímž se zvyšuje efektivita tohoto kolagenu. Bohužel však na trhu chybí jednoznačně definovaný kolagen z mořských ryb, u kterého by producent definoval podrobnou analýzu jeho čistoty. Příčinou toho je, že běžně dostupný rybí kolagen je získáván asi z dvaceti druhů mořských živočichů, tedy jednotný kalibrační vzorek je nutné teprve hledat. Technologické procesy získávání kolagenu ze sladkovodních ryb nejsou ještě ani universálně vypracovány a zcela nepochybně budou druhově specifické, proto i systematický popis včetně různých charakteristik rybího kolagenu jsou poměrně komplikované vzhledem k malému množství publikovaných informací v této oblasti (Bae I et al. 2008).

Kromě toho je rybí kolagen náročnější na zpracování pro lékařské účely ve srovnání s kolagenem z teplokrevných živočichů, neboť denaturuje při teplotě lidského těla (Bae I et al., 2008). Abychom zabránili denaturaci, je nutná jeho technologická úprava zesíťováním. Vzniku vazeb mezi kolagenními vlákny dosahujeme pomocí chemického procesu síťování vhodným činidlem nebo gama zářením (obr. 2.), které používáme při sterilizaci těchto kolagenních pěn. Je nutné brát v úvahu, že síťování kolagenu mění i jeho fyzikální (zejména mechanické) a chemické vlastnosti. S tím je důležité počítat, protože přílišné zesíťování vede ke zvýšení tuhosti pěny a zvýšení její křehkosti což není v případě tohoto produktu žádoucí. S tím také souvisí i jeho odbourávání. Čím je kolagen více síťován tím se hůře v organismu odbourává. Dalším důležitým faktem je i vazba případných léčiv v kolagenní houbičce a jejich uvolňování do zevního prostředí.

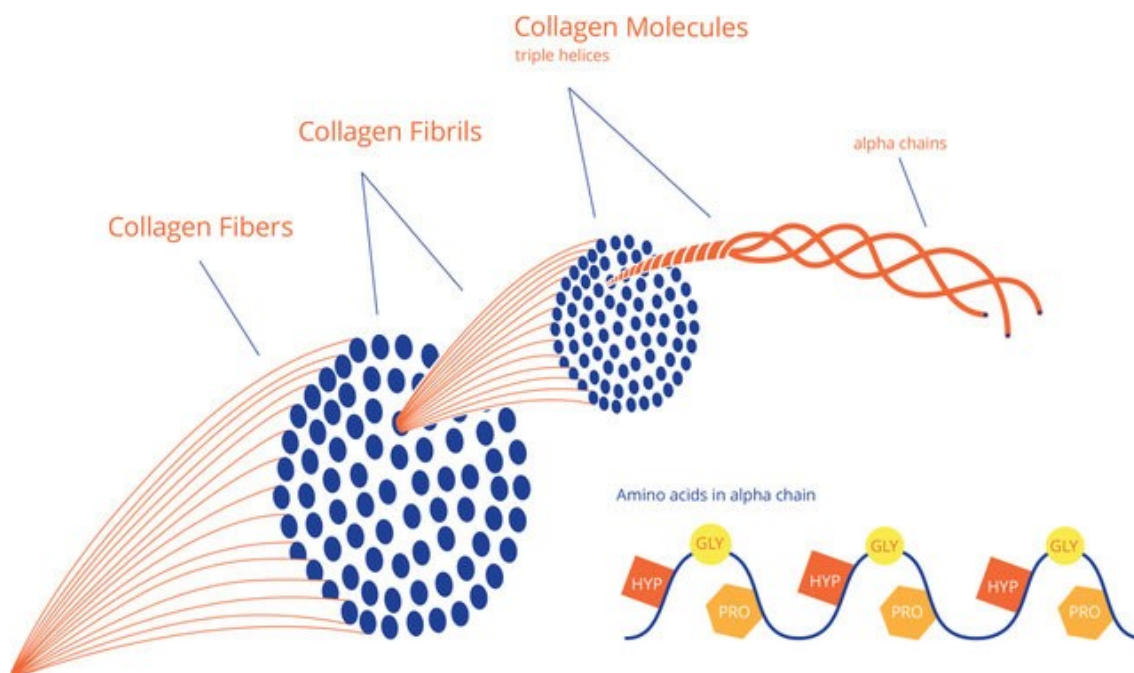


Obr. 2.: Efekt gamazáření při sterilizaci kolagenu (obr. Zapůjčen z práce: Nguyen H, 2007)

Na výrobě rybího kolagenu ze sladkovodních ryb spolupracujeme s týmem odborníků z LF1 KU a VFN, AV a ČVUT i dalších bývalých spolupracovníků doc MUDr. Milana Krajíčka již několik let. Kolagen je získáván především z kůže ryb. Náš tým zvolil jako výchozí surovinu kůži třebonského kapra. Ta je snadno dostupná jako odpadní produkt při zpracování ryb. Je tedy výhodou, že zpracováváme odpadní produkt zpracování ryb. Surovina je levná a je jí dostupná v dostatečném množství.

1.1 Kolagen

Jako kolageny jsou označovány vláknité bílkoviny s typickým obsahem aminokyselin (13-14% hydroxyprolinu, 2% hydroxylysinu) s charakteristickým žíháním. Tyto struktury můžeme obvykle detekovat prostřednictvím elektronového mikroskopu. Základním stavebním kamenem kolagenu jsou zejména aminokyseliny glycin, prolin, hydroxyprolin a hydroxylysin, které se skládají do řetězců, které tvoří trojitou spirálu, která se označuje jako tropokolagen (Ledvina M et al., 2020). Tyto trojitě spirály se sdružují do drobných fibril, které se slučují do větších fibril a vytváří typické kolagenní vlákno (obr. 3).



Obr. 3.: Stavba kolagenního vlákna

(Obr. zapůjčen z Nijhuis W.H. et al. *Current concepts in osteogenesis imperfecta: Bone structure, biomechanics and medical management. Journal of Children s Orthopaedics* 2019,13(1):1-11)

Zcela zásadní roli zde hraje hmota vysoce hydratovaných mukopolysacharidů nacházející se mezi jednotlivými vlákny. Přestože chemicky známe řadu různých typů kolagenu, pro medicínské použití je nejdůležitější kolagen typu I.

Pro použití kolagenu v medicíně jsou zásadní 3 základní charakteristiky:

- 1) *biologická* – antigenicita vlastního kolagenu
- 2) *fyzikálně-chemická* – ovlivnitelné vytváření příčných vazeb a s tím bezprostředně související rozpustnost, nasákavost a odbourávání kolagenní hmoty
- 3) *fyzikálně-mechanická* – což je odolnost materiálu při mechanickém zatěžování (pružnost, odolnost v tahu) aniž by došlo k porušení jeho vlastní vnitřní struktury (daná orientací vláken)

V medicíně se datuje použití kolagenu od šedesátých let minulého století. V naprosté většině jde o kolagen bovinního původu, který je vyráběn ze šlach (například Achilova šlacha je skoro čistý kolagen typu I) nebo škáry kůže hovězího dobytka. Cca 3-4 % populace vykazuje alergii na hovězí bílkoviny, které nelze jakýmkoli procesem odstranit (Charriere et. al. 1989). Pro tyto pacienty představuje použití zdravotnických prostředků s přítomností bovinního kolagenu riziko. Z výše uvedených důvodů je tedy nativní kolagen pro medicínské použití prakticky nepoužitelný.

Pro využití v medicíně je nutné umět vlastnosti kolagenu cíleně upravovat (kolagenní pěny, kolagenní cévní protézy). Základním technologickým procesem, především u rybího kolagenu, je výše uvedené síťování, neboli tvrzení kolagenní hmoty, které spočívá v působení síťovacích činidel (např. glutaraldehyd, tanin, genipin, ...) na vlastní kolagenní hmotu, kdy dochází k nárůstu počtu příčných vazeb mezi jednotlivými kolagenními vlákny. V medicínských aplikacích se používají zejména síťovadla na bázi speciálních pryskyřic, kterými je glutaraldehyd vzhledem ke své potenciální biologické toxicitě postupně vytlačován. Tímto způsobem můžeme do jisté míry kolagen programovat po stránce mechanické, chemické i biologické. Ovlivňujeme tak elasticitu, bobtnavost rozpustnost, tuhost, pevnost, vstřebávání v organismu, antigenicitu a další vlastnosti (Suchý T et al., 2015, Suchý T et al., 2016, Suchý T et al., 2017).

1.2 Kolagen jako matrice pro uvolňování léčiv

Kolagenové matrice je možné použít jako základ lékových forem, které prodlužují nebo zpomalují uvolňování účinné látky v místě aplikace. Tímto způsobem můžeme docílit přítomnost například antibiotika po různě dlouhou dobu v účinné koncentraci v operační ráně (Ruszcak Z, Friess W, 2003, Nandi SK et al., 2009), popřípadě můžeme tímto způsobem tlumit bolest, pokud kolagenní matici máme navázáno lokální anestetikum, které se kontrolovaně uvolňuje (Cusack Z. et al., 2012). Kolagen sám o sobě má i hemostatické vlastnosti a pozitivně působí jako krytí při hojení rány (Chattopadhyay S, Raines RT, 2014).

Kolagenové matrice mohou být buď pevné (např. houbička, kterou vkládáme do operační rány nebo na ní) (Ruszcak Z, Friess W., 2003), nebo polotuhé. Polotuhé matrice mají obvykle charakter gelů a mohou být injekčně aplikovány např. do píštělí (Versteegden

LRM et al., 2018). Za fyziologických podmínek mohou tvrdnout nebo vytvořit depo gelu s navázanou účinnou látkou (Wallace DG, et al., 2003).

Vlastnosti lékových forem na kolagenové bázi jsou ovlivněny třemi základními veličinami:

1. Vlastnostmi kolagenu jako základní stavební jednotky matrice, které určují následující vlivy:

- druh živočicha, ze kterého je kolagen získán. Kolagen z různých druhů mořských ryb má různou teplotu tání a různé aminokyselinové složení – souvisí s místem výskytu a v jaké hloubce živočich žije (Bae I, et al., 2008).
- orgán, ze kterého je kolagen získán. Například bovinní kolagen z Achillových šlach je složen převážně z kolagenu typu I, oproti kolagenu z podkoží, ve kterém se nachází další typy kolagenu (Ruszczak Z, Friess W., 2003). Rovněž kolagen z různých orgánů ryb má různou denaturační teplotu (Zhang X, et al., 2014).
- u rybího kolagenu byl popsán přímý vztah mezi teplotou vody, ve které daný jedinec žije na kvalitu kolagenu (Bae I, et al., 2008).
- způsob zpracování. Pokud v průběhu zpracování zachováme terciální strukturu, vzniká nerozpustný kolagen. Naopak rozpustný kolagen vznikne z denaturovaných vláken po extrakci kyselinami, případně enzymy (Ruszczak Z, Friess W., 2003).
- způsob sterilizace (Ruszczak Z, Friess W., 2003).
- vlastnosti kolagenních gelů, které můžeme aplikovat injekčně lze ovlivňovat modifikací kolagenních molekul, např. succinylací (Wallace DG, et al., 2003, Sripriya R, et al., 2004), při které dojde k vytvoření negativně nabitě sítě schopná vázat některá léčiva (ciprofloxacin) (Wallace DG, et al., 2003).

2. Vlastnostmi matrice, které jsou určeny především

- koncentraci kolagenu což souvisí s hustotou kolagenních vláken (Ruszczak Z, Friess W., 2003).

- skládáním kolagenních vrstev s různými vlastnostmi (např. v důsledku rozdílné propustnosti pro dané léčivo), příkladem jsou „jádra“ s navázanou zásobou léčiva, které je obaleno méně propustnou vrstvou, která řídí jeho uvolňování (Ruszczak Z, Friess W., 2003, Chen MC, et al., 2005). Dalším příkladem může být houbička uvolňující například ciprofloxacin v závislosti na hydrataci (ta může být dána mírou exsudace rány), na jejíž horní straně je kolagenní film, který uvolňuje do houbičky léčivo, které z ní ubývá (Sripriya R, et al., 2004).
- zesíťováním molekul kolagenu, které jednoznačně vede ke snížení propustnosti a zvýšení stability matrice (Ruszczak Z, Friess W., 2003, Chen MC, et al., 2005). Molekuly kolagenu nesmíme zesítovat v případě gelů (Wallace DG, et al., 2003).
- kombinací kolagenu s jinými makromolekulami, např. hyaluronovou kyselinou (Wallace DG, et al., 2003).
- uzavřením léčiva do liposomů s jejich následnou inkorporací do kolagenní matrice (Ruszczak Z, Friess W., 2003).

3. Vlastnostmi léčiva, které matrice obsahuje, především

- rozpustností léčiva ve vodě - ta může být snížena např. přítomností málo rozpustné soli a tím pádem dochází k pomalejšímu vymývání z místa aplikace (Ruszczak Z, Friess W., 2003, Gruessner U, et al., 2001).
- velikostí molekuly léčiva – podle velikosti molekuly můžeme rozdělit léčiva na molekuly větší, než jsou póry kolagenní matrice (u nezesíťovaného kolagenu 58 nm pro fibrilární kolagen, 4-6 nm pro sukcinoylovaný kolagen), jejichž difuze je zbrzděována („hindered diffusion“) a léčiva s molekulami menšími, která nejsou v difuzi zbrzděována (Wallace DG, et al., 2003).
- elektrostatickými vazbami mezi léčivem a kolagenními vlákny (vazebnou kapacitou matrice pro dané léčivo) (Wallace DG, et al., 2003).

Zpomalená difuze v nezesíťovaném kolagenu se vyskytuje především u makromolekul, jako např. TGF- β . Většina léčiv však velikostí molekuly nedosahuje velikosti pórů

kolagenních gelů a jejich uvolňování tedy závisí především na prosté difuzi (Hildebrand T, et al., 1997).

Pokud tedy nedochází k vazbě mezi kolagenními vlákny a molekulami léčiv, opustí většina léčiva matrici během několik minut po implantaci. Ve skutečnosti se však kromě difuze uplatňují, jak u makromolekul, tak u malých molekul i vazebné interakce mezi léčivem a kolagenem (např. mezi karboxylovými skupinami aminokyselin kolagenu, případně kyseliny jantarové při sukcylnylaci a aminoskupinami gentamicinu (Wallace DG, et al., 2003), nebo ciprofloxacinu (Sripriya R, et al., 2004). Vazebná kapacita matrice pro určité léčivo je saturabilní a závisí na množství vazebných míst na molekulách kolagenu. Pokud dojde při výrobě lékové formy k přesycení matrice, uvolní se volná frakce léčiva okamžitě po aplikaci. Toho je možné využít k rychlému vytvoření vysokých koncentrací léčiva v místě aplikace. Naopak pokud je léčivo vázáno na kolagen kovalentně hydrolyzovatelnou vazbou, dochází k pomalému uvolňování při postupném odbourávání matrice (Wallace DG, et al., 2003).

Kolagenní léková forma tak může být uzpůsobena (různým způsobem vyplývajícím z výše zmíněných interakcí léčiva a kolagenu) např. k rychlému uvolnění „nasyčovací dávky“ antibiotika ihned po aplikaci s vytvořením lokální koncentrace mnohonásobně převyšující minimální inhibiční koncentraci (MIC) citlivých mikrobů, po kterém následuje pomalé uvolňování „udržovací dávky“ antibiotika prodlužující účinnost na několik dní (Ruszczak Z, Friess W., 2003, Sripriya R, et al., 2004, Gruessner U, et al., 2001). Podobný profil plazmatických koncentrací byl popsán např. při uvolňování bupivakainu (Cusack SL, et al., 2013).

1.2.1 Antibiotika

Nejčastěji používaným antibiotikem v kolagenních lékových formách je gentamicin. V klinické praxi našly tyto přípravky využití především ve stomatologii, břišní chirurgii a traumatologii (Ruszczak Z, Friess W., 2003). V poslední době se objevují také klinické studie z oblasti kardiochirurgie, které potvrzují efektivitu tohoto přístupu v prevenci pooperačních infekcí (Schimmer C, et al., 2012, Mishra PK, et al., 2014), dále se tento postup používá v terapii diabetické nohy (Uckay I et al., 2018). *In vitro* se sice uvolní většina gentamicinu z komerčně vyráběných přípravků již po 30 minutách, *in vivo* však dochází k postupnému uvolňování, které zajišťuje vysoké lokální koncentrace ještě 1-4

dny po aplikaci. Délka lokálního působení je mj. ovlivněna také vaskularizací místa aplikace a závisí tedy na rychlosti vymývání lokálně nahromaděného gentamicinu do systémového oběhu. Při použití dostupných přípravků nedochází k dlouhodobé expozici toxickým hladinám gentamicinu (koncentrace klesá do 24 hodin pod 2 mg/L) a nebyly zaznamenány projevy systémové toxicity (Ruszczak Z, Friess W., 2003). Existují studie zabývající se využitím kolagenní matrice s tetracyklinem a metronidazolem v dentální chirurgii (Ruszczak Z, Friess W., 2003). Za účelem terapie periodontitidy jsou používány kolagenní matrice uvolňující chlorhexidin v dutině ústní. Kromě bovinního kolagenu je za tímto účelem využíván i kolagen ze sladkovodních ryb (John P, et al. 20015). Dále jsou dostupná in vitro data a data ze zvířecích experimentů pro ciprofloxacin (Sripriya R, et al., 2004).

Další zajímavou možností je použití vankomycinu (Chiang HY, et al., 2014, Šíma M, et al., 2017, Vander S, et al., 1989). V klinické praxi byly použity vankomycinem impregnované kostní alografty v kombinaci s cementem obsahujícím aminoglykosidy při náhradě kyčelního kloubu. Vankomycin může být rovněž součástí hydroxyapatitových kuliček při léčbě poranění pohybového aparátu (Suchý T, et al., 2017). Lokální aplikací bylo dosaženo vysokých koncentrací vankomycinu v místě infekce bez projevů nefrotoxicity, které jsou spojeny se systémovým podáváním antibiotik (Buttaro MA, et al., 2005) a které často brání eskalaci dávek při systémovém podání (Šíma M, et al., 2018). Vzhledem k tomu, že vankomycin, stejně jako aminoglykosidy nedostatečně penetruje do tkání (Stein GE, Wells EM, 2010) je systémová aplikace k terapii infekcí pooperačních ran problematická. Lokální aplikace s postupným uvolňováním by v případě tohoto antibiotika byla obzvláště vhodná, neboť na rozdíl od aminoglykosidů je jeho účinnost závislá nejenom na výši dosažených koncentrací, ale také na délce, kdy koncentrace přesahuje MIC. Hodnota nejlépe korelující s klinickou odezvou při systémové terapii infekcí *Staphylococcus aureus* je AUC/MIC (Rybak M, et al., 2009). Pokud by kolagenní lékové formy zajistily dlouhodobě adekvátní lokální koncentrace vankomycinu v ráně, bylo by možné tímto způsobem upustit od systémového použití dalších záložních antibiotik (ceftarolinu, linezolidu) a jejich šetření pro jiné závažné infekce. Větší počáteční množství vankomycinu, které se vyplaví bezprostředně po aplikaci kolagenní matrice je navíc vhodné k dosažení účinné koncentrace vankomycinu v místě účinku a může posloužit jako nasycovací dávka (Šíma M, et al., 2018). Lokální podání se tak jeví

jako efektivní a bezpečná alternativa, což bylo prokázáno při lokální aplikaci prášku vankomycinu při pediatrické operaci páteře, kde nebyly zjištěny žádné komplikace související s antibiotiky (Armaghani SJ, et al., 2014).

Rovněž rifampicin může být zajímavou molekulou pro lokální aplikaci při hojení chirurgických ran v infikovaném terénu. Bylo prokázáno, že systémově podávané antibiotické kombinace obsahující rifampicin snižují výskyt hlubokých poststernotomických infekcí (Khanlari B et al., 2010) a efektivitu prokázal i v randomizované studii, ve které snižoval výskyt infekcí spojených s implantací ortopedických endoprotéz (Zimmerli W et al., 1998). Byla rovněž studována i topická aplikace rifampicinu ve formě prášku na modelu muskuloskeletálního traumatu (Shiels SM et al., 2018) a efekt kolagenní pěny napuštěné mj. rifampicinem v terapii prasečího modelu traumatu sleziny (Parker SJ et al., 1999).

1.2.2 Lokální anestetika

Lokální anestetika v kolagenních maticích mohou být implantována do pooperační rány za účelem snížit intenzitu pooperační bolesti. V kontrolovaných klinických studiích bylo prokázáno subjektivní snížení bolestivosti a menší spotřeba opioidů 72 hodin po inguinální hernioplastice, pokud byla do rány implantována kolagenní matrice (fibrilární zesíťovaný kolagen, patent US 20110301131 A1) s bupivakainem (100 mg a 200 mg). Bupivakain je uvolňován okamžitě po aplikaci, takže účinek nastupuje již při odeznívání celkové anestézie (Cusack Z, et al., 2012). Při gynekologických operacích byla stejná léková forma při menší spotřebě bupivakainu (150 mg) srovnatelně účinná s kontinuální aplikací bupivakainu do pooperační rány infusorem (Cusack M, et al., 2012). Systémové koncentrace bupivakainu se pohybují pod hranicí pro vyvolání kardiotoxických a neurotoxických účinků (Cusack Z, et al., 2012, Cusack SL, et al., 2013). Průběh systémových hladin vykazuje dva koncentrační vrcholy, první po cca 2 hodinách, kdy dochází k uvolnění většího množství léčiva po implantaci, což je výhodné pro tlumení nejsilnější pooperační bolesti a následně mezi 12-24 hodinami, který je způsoben postupným uvolňováním léčiva. Je zajištěna dostatečná koncentrace v místě aplikace po nejméně 48 hodin (Cusack SL, et al., 2013). Dalším možným využitím kolagenní matrice s lokálním anestetikem je povrchová anestesia benzokainem uvolňovaným z kolagenního bioadhezivního filmu (de Araujo DR, et al., 2010).

1.2.3 Imunosupresiva

In vitro bylo popsáno prodloužené uvolňování sirolimu ze stentu potahovaného bovinním kolagenem typu I, který byl zesíťován genipinem (patent US 7351421 B2). Tímto způsobem bylo dosaženo konstantní rychlosti uvolňování sirolimu bez počátečního nárazového uvolnění větší dávky. Podle množství účinné látky trvalo uvolňování sirolimu 7-28 dní (Chen MC, et al., 2005). V současné době je většina kolagenních lékových forem na bázi bovinního kolagenu (Ruszczak Z, Friess W., 2003, Wallace DG, et al., 2003). Rybí kolagen je za tímto účelem využíván zatím pouze ojediněle (John P, et al. 20015). V případě vývoje lékových forem využívajících rybí kolagen za účelem řízeného uvolňování léčiv je zapotřebí důsledná standardizace finálního produktu a ověření konstantních vlastností kolagenu, které mohou být ovlivněny i takovými okolnostmi, jako je průměrná teplota vody, ve které ryby žijí (Bae I, et al., 2008).

2 Hypotézy a cíle práce

2.1 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.

2.2 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 rybího kolagenu in vitro a in vivo na krysích modelech.

3 Testování imunogenity kolagenu

Kolagenní materiály obecně jsou řazeny k slabým imunogenům, přesto mohou vyvolávat imunitní odezvu, a proto je před jejich zavedením do klinického testování v humánní medicíně vhodné otestovat jejich imunogenní vlastnosti. V současnosti ale neexistují jednoznačná doporučení jaké imunologické testy použít.

3.1 Testování bovinního kolagenu

V pilotní studii jsme použili bovinní kolagen, ze kterého jsou vyrobeny standartně používané kolagenní pěny (Gelita-Spon Standard, Gelita Medical, obr. 4.). Na tomto základě jsme provedli výběr a optimalizaci vhodných *in vitro* a *in vivo* metod, kterými jsme zjišťovali imunologické vlastnosti kolagenu třeboňského kapra. Následně byl v imunizačních pokusech použit tento bovinní kolagen jako kontrolní skupina při studiu imunoreaktivity kolagenu třeboňského kapra.



Obr. 4.: Gelita-Spon Standard, kolagenní heostatická houbička z bovinního kolagenu
(obrázek zapůjčen z:

<https://www.henryschein.nl/nl-nl/medisch/p/verbandmiddelen/wondverband/gelitaspon-per-5x10-stuks/263649>)

V první fázi studie jsme *in vitro* otestovali imunostimulační schopnosti bovinního kolagenu kolagenní pěny na mononukleárních leukocytech ze slezin kolagen senzitivních BALB/c myši. Zaměřili jsme se na schopnost indukovat tvorbu časných prozánětlivých cytokinů (IL-1 β , TNF- α) a na schopnost stimulovat buněčnou proliferaci, tj. testování blastické transformace splenocytů se značeným ³H thymidinem.

3.1.1 Protokol pokusu

Zdroj splenocytů: myši Balb/c, samice, stáří 8 týdnů, 6 kusů

Pozitivní kontroly: PHA 10ug/ml, PWM 1ug/ml

Stimulace: cévou (T10-S, N-S) a 3% roztokem kolagenu v apyrogenní vodě 10 \times , 100 \times a 1000 \times ředěným v PBS.

Koncentrace cytokinů byla stanovena metodou ELISA (RD Systems, DuoSet) po 24 a 72 hodinové stimulaci buněčných kultur nativním bovinním kolagenem (ve třech ředěních) a definovanými částmi cévních protéz potažených bovinním kolagenem.

Blastická transformace byla vyhodnocena po sběru proliferujících buněk po 18 hodinovém pulsu ³H thymidinem.

3.1.2 Výsledky

Stimulace splenocytů roztoky ředěného bovinního kolagenu nevedla k žádné výrazné tvorbě sledovaných cytokinů (IL-1 β , TNF α), na rozdíl od stimulace splenocytů vzorky cév, kde jsme zaznamenali mírné zvýšení tvorby obou prozánětlivých cytokinů, jak IL-1 β , tak TNF- α . Proliferační aktivita mononukleárních leukocytů nebyla výrazně ovlivněna.

3.2 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 přílivem neutrofilů, exprese neutrofilů je známá během reakce na cizí kolagenní materiál.

IL-10. Protizánětlivý cytokin, klíčový pro regulaci exprese degradačních enzymů (MMPs) a jejich inhibitorů TIMPs. (*Lacraz 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.

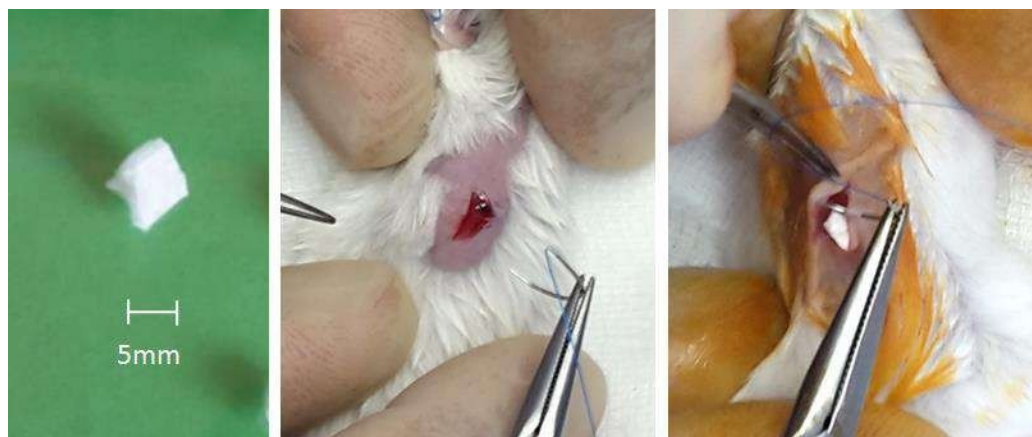
3.2.1 Protokol pilotních imunizačních pokusů:

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

- 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. 5.: 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.

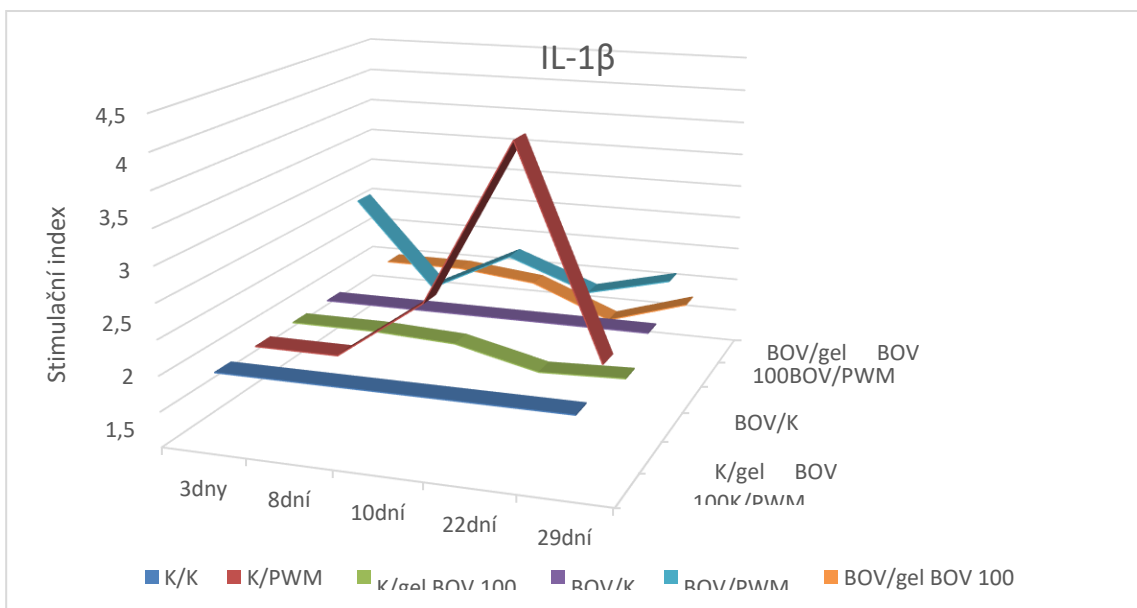
Slezinné buňky inkubovány s různými stimulatory (PWM, LPS, gel Bov a gel Cyp – gely připraveny z kolagenu určenému k implantaci, 100ug/ml H₂O). V supernatantech (po 72 hodinové stimulaci buněk) a v séru byla následně sledována přítomnost vybraných cytokinů.

3.2.2 Imunogenní vlastnosti kolagenu - výsledky implantace

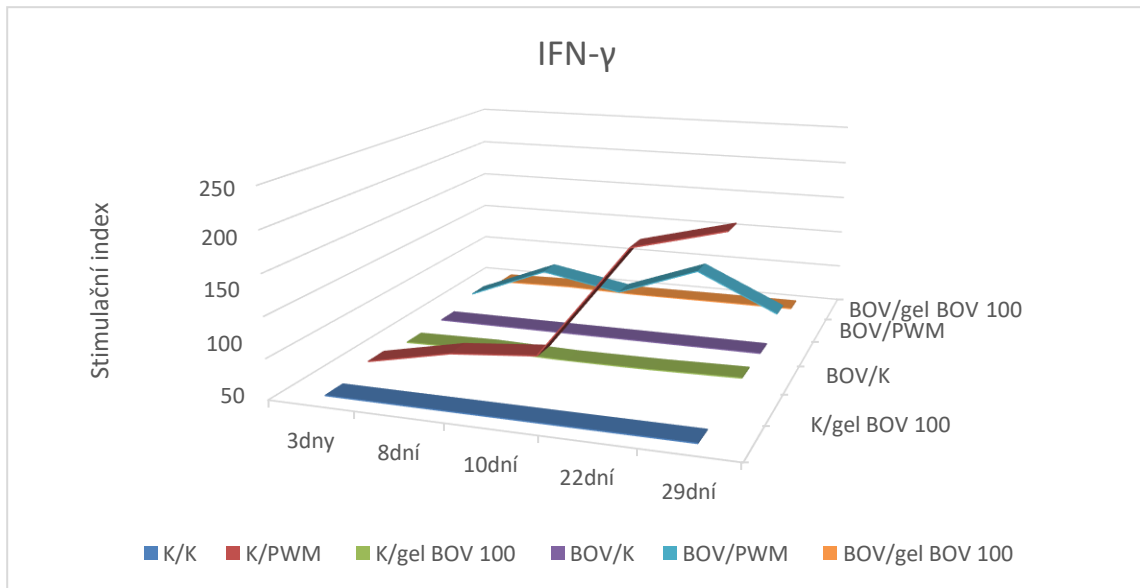
Observace pokusných zvířat: Myši po zákroku pravidelně kontrolovány, první čtyři dny denně. Od 2. dne bez viditelných změn v chování, běžná aktivita. 3. den žádná reakce na

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.

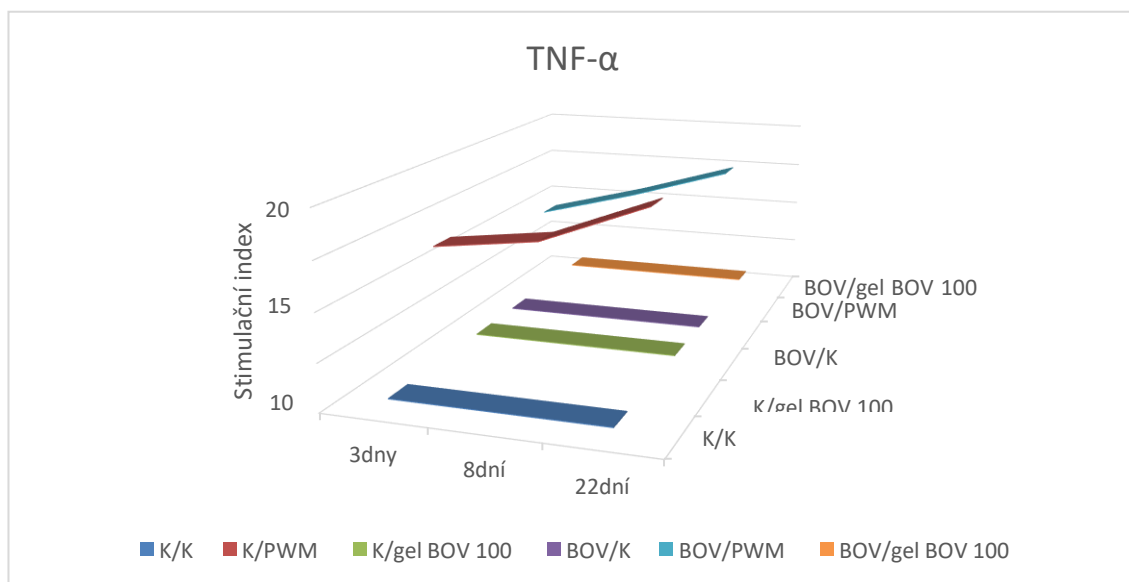
Obrázek 6-9 (Implantace I): Průměrná hladina cytokinů (pg/ml) v supernatantech *in vitro* stimulovaných splenocytů implantovaných (BOV) a kontrolních (K) skupin stanovená metodou ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Odběry 3., 8., 10., 22. a 29. den po implantaci. Kultury myších splenocytů byly inkubovány v obohaceném RPMI 1640 mediu bez stimulátoru (K, negativní kontrola), s pokeweed mitogenem (PWM, pozitivní kontrola), s bovinním a kapřím gelem (gBOV, gCYP). Po hodinové inkubaci byly kultury odstředěny a supernatanty kultur byly použity ke stanovení koncentrace cytokinů. Nebyly zjištěny signifikantní rozdíly.



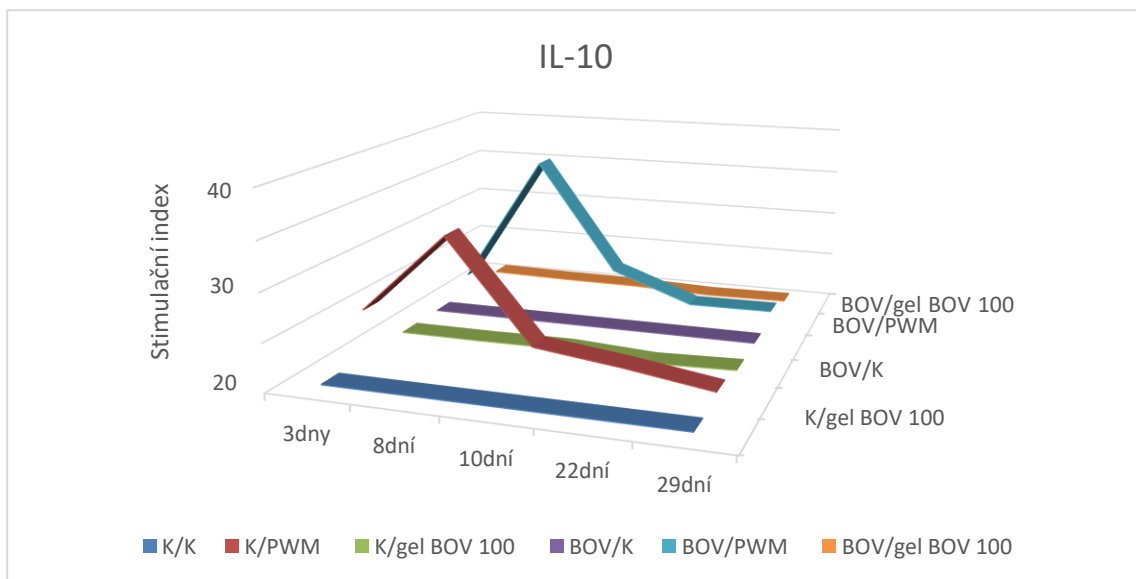
Obr. 6 Průměrná hladina cytokinů (pg/ml) v supernatantech *in vitro* stimulovaných splenocytů implantovaných (BOV) a kontrolních (K) skupin stanovená metodou ELISA



Obr. 7 Průměrná hladina cytokinů (pg/ml) v supernatantech in vitro stimulovaných splenocytů implantovaných(BOV) a kontrolních (K) skupin stanovená metodou ELISA

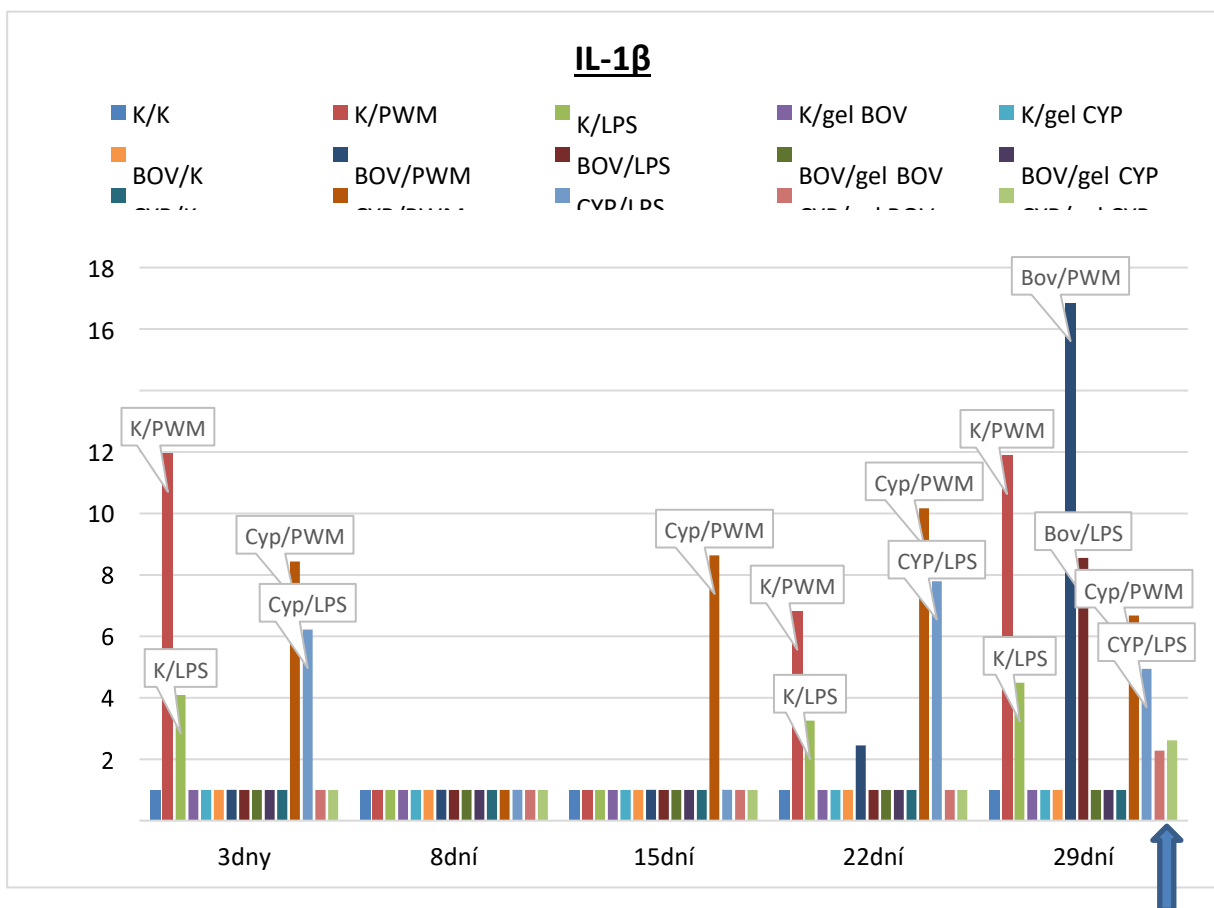


Obr. 8 Průměrná hladina cytokinů (pg/ml) v supernatantech in vitro stimulovaných splenocytů implantovaných(BOV) a kontrolních (K) skupin stanovená metodou ELISA

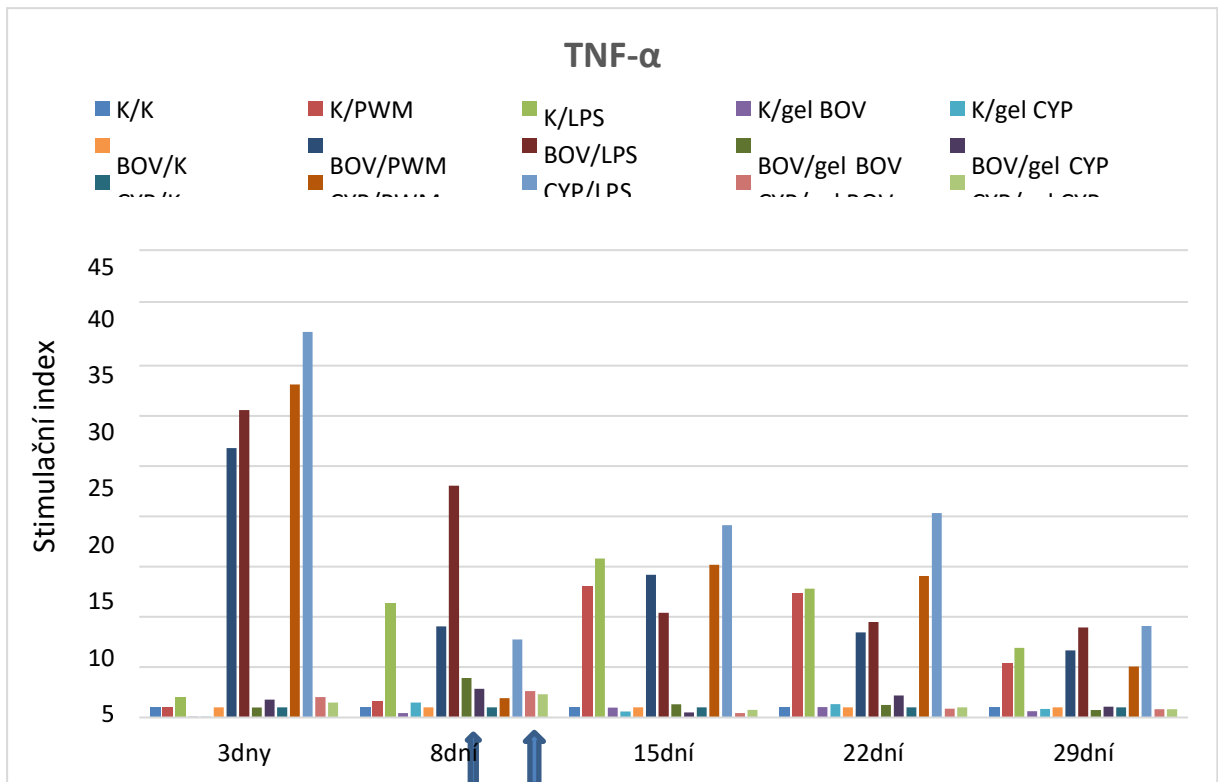


Obr. 9 Průměrná hladina cytokinů (pg/ml) v supernatantech in vitro stimulovaných splenocytů implantovaných (BOV) a kontrolních (K) skupin stanovená metodou ELISA

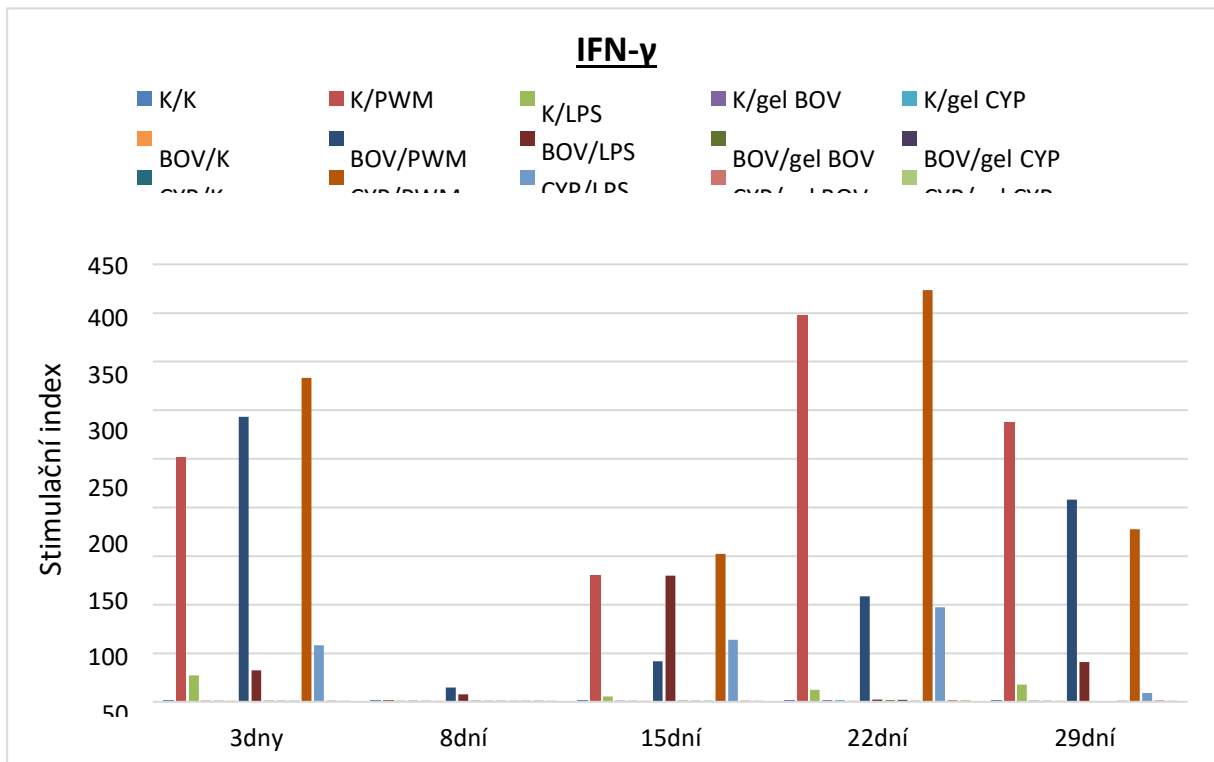
Obrázek 10 – 14 (Implantace II): Průměrná hladina cytokinů (pg/ml) v supernatantech *in vitro* stimulovaných splenocytů implantovaných (BOV a CYP) a kontrolních (K) skupin stanovená metodou ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Odběry 3., 8., 10., 22. A 29. den po implantaci. Kultury myších splenocytů byly inkubovány v obohaceném RPMI 1640 mediu bez stimulátoru (K, negativní kontrola), s pokeweed mitogenem a lipolysacharidem (PWM, LPS - pozitivní kontroly) a s bovinním a kapřím gelem (gel BOV, gel CYP). Po hodinové inkubaci byly kultury odstředěny a supernatanty kultur byly použity ke stanovení hladiny cytokinů. Nebyly zjištěny signifikantní rozdíly.



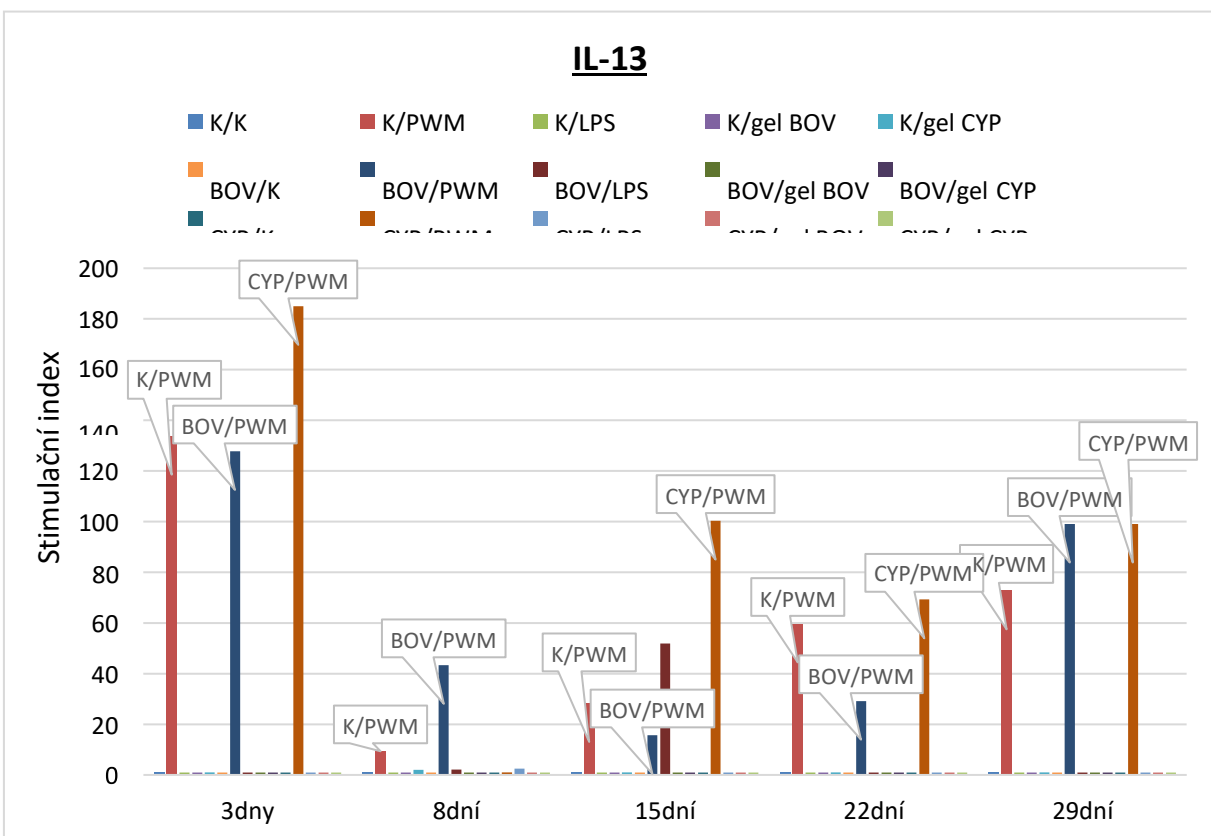
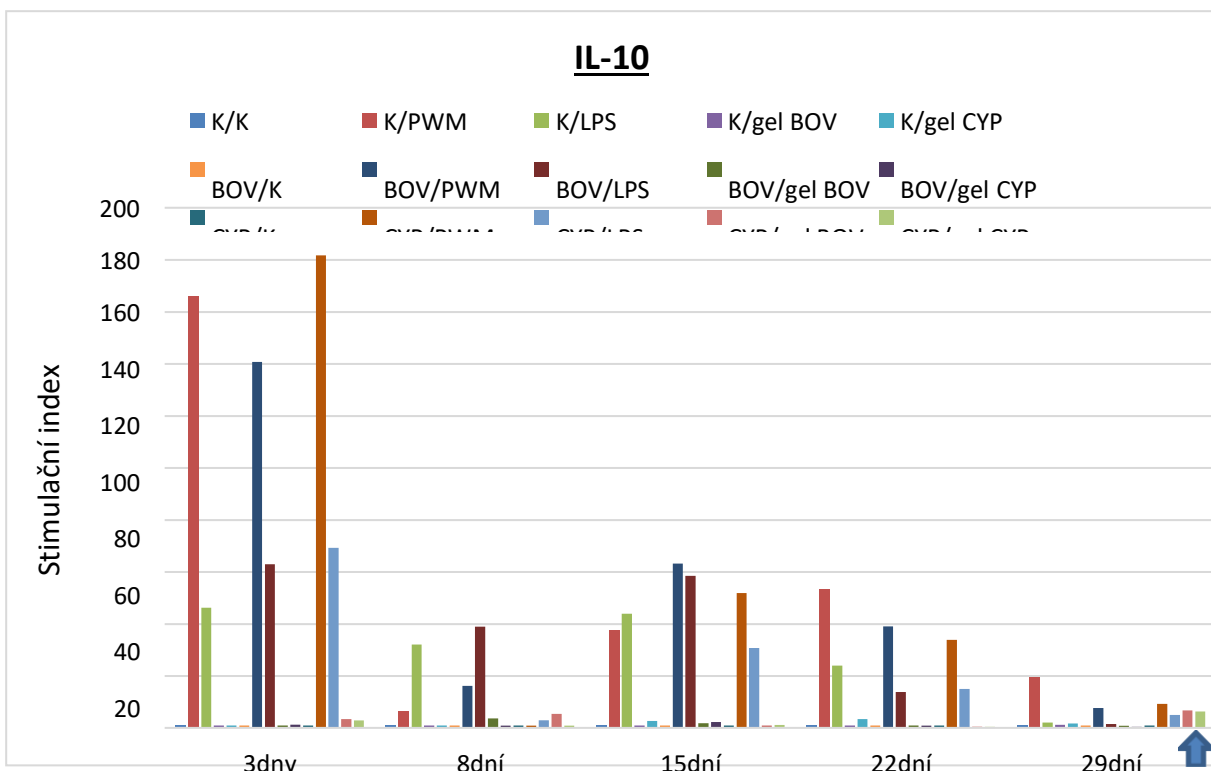
Obr. 10 Průměrná hladina cytokinů (pg/ml) v supernatantech *in vitro* stimulovaných splenocytů implantovaných (BOV a CYP) a kontrolních (K) skupin stanovená metodou ELISA



Obr. 11 Průměrná hladina cytokinů v supernatantech in vitro stimulovaných splenocytů



Obr. 12 Průměrná hladina cytokinů v supernatantech in vitro stimulovaných splenocytů



Obr. 13: Mírná stimulace kapřím a bovinním gelem ve skupině Cyp 29. den

Obr. 14 Průměrná hladina cytokinů v supernatantech in vitro stimulovaných splenocytů

Hladiny cytokinů v sérech a v supernatantech stimulovaných kultur splenocytů:

Pro všechny sledované cytokiny platí, že nebyly prokázány významné rozdíly ve stimulaci myších splenocytů mezi skupinou s bovinním implantátem a kontrolní skupinou. Stimulace buněk gelyz bovinních implantátů vedla ke zvýšení koncentrace IL-1 β v supernatantech splenocytů v kontrolní i implantované skupině, ve skupině implantované byla stimulace významnější v důsledku mírné zánětlivé reakce.

Zvýšená hladina proalergického IL-13 nebyla naměřena u žádné skupiny.

3.2.3 Protokol následných imunizačních pokusů:

Studie navazující na pilotní *in vitro* pokusy s bovinním kolagenem a na *in vivo* experimenty s bovinními kapřím kolagenem. Cílem bylo sledovat lokální a systémovou imunitní reakci na implantaci bovinního a kapřího kolagenu na myším modelu.

Zvířecí model

Pro studii byly vybrány Balb/cOla inbrední myši, samice (*AnLab*, Česká republika). Osmítýdenní myši byly rozděleny do tří skupin po 14 (kontrola - C, cévní implantát impregnovaný bovinním kolagenem – BOV, cévní implantát impregnovaný kapřím kolagenem – CYP).

Implantát

Čtvereček (0.5 x 0.5 cm, cca 17 mg) z cévní protézy impregnované bovinním nebo kapřím kolagenem.

Implantace, časový průběh pokusu

Den před implantací: odstranění srsti na hřbetě zvířat (depilační krém Weet)

Anestezie (1.5 % isofluran, inhalace), dezinfekce (Betadine)

Bovinní a kapří implantáty umístěny do podkožní kapsy (skupiny BOV, CYP). Skupina C (kontrolní myši) absolvovala stejnou operační proceduru bez vložení implantátu. Prolen 5-0 (Ethicon) byl použit jako šicí materiál.

Po implantaci byly myši denně sledovány (změna chování, nechutenství, makroskopické známky zánětu v místě implantace). Sedmý a čtrnáctý den po implantaci byla polovina zvířat z každé skupiny usmrcena. K další analýze byly následně odebrány vzorky ze sleziny, tkáň z místa implantace a sérum.

Imunologická analýza

1. Koncentrace cytokinů v supernatantech 3 denních buněčných kultur (z myších mononukleárních leukocytů izolovaných ze slezin jednotlivých myší v pokusu) po stimulaci. *ELISA (Duoset, RD Systems, USA)*
2. Blastická transformace myších splenocytů po stimulaci.
3. Koncentrace cytokinů v sérech pokusných myší. *ELISA (Duoset, RD Systems, USA)*
4. Kvantitativní analýza mRNA (pro vybrané cytokiny) izolované z tkáně z místa implantace.

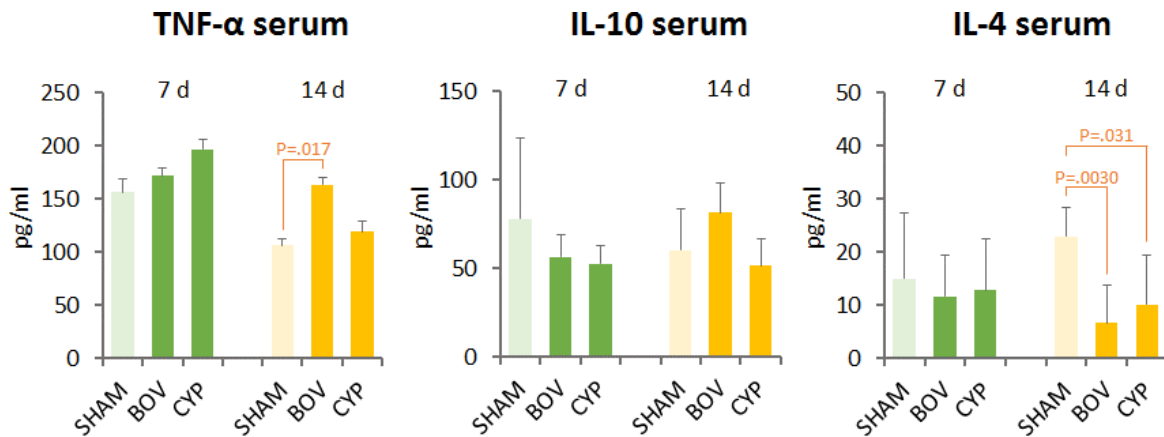
(qPCR)

Vzhledem k tomu, že implantace biomateriálů často provokuje zánětlivou reakci, zaměřili jsme se na stanovení imunologických parametrů zánětu na zvířecím modelu. Zajímalo nás především srovnání imunologické reakce ve skupině myší s kapřím implantátem versus skupiny zvířat bez implantátu a s bovinním implantátem. V první řadě jsme sledovali systémovou odpověď (stanovení cytokinů: IL-1 β , IL-4, IL-10, IL-13, TNF- α a IFN- γ , spojených s akutní zánětlivou odpovědí) a to v sérech a v supernatantech splenocytů (stanovení vybraných cytokinů poskytuje základní orientaci při posuzování reaktivity organismu na implantovaný materiál (*Qingsong Ye. 2013, Song E. 2006, Pati F. 2012*). Dále jsme testovali blastickou transformaci splenocytů z pokusných zvířat v jednotlivých skupinách, a to spontánní i po stimulaci vybranými stimulatory.

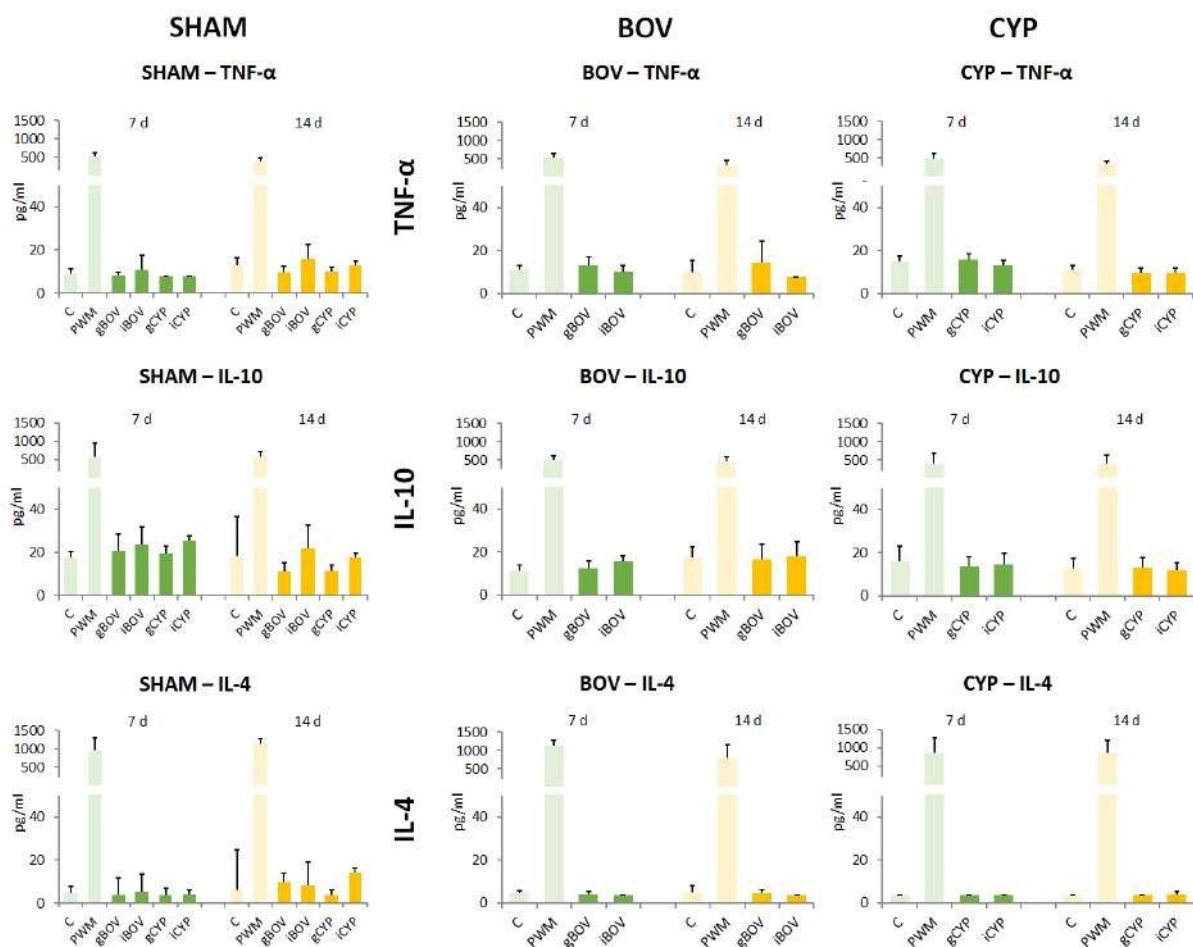
V další analýze jsme se zaměřili na lokální odpověď ve tkáni z okolí implantátu (qPCR). Pro tento účel jsme ke sledování reaktivity tkáně vybrali kromě pro- a protizánětlivých

markerů (TNF- α , IL-6, IL-10 a TGF- β) i některé chemokiny - MCP1(CCL2) a MIP1 α (CCL3).

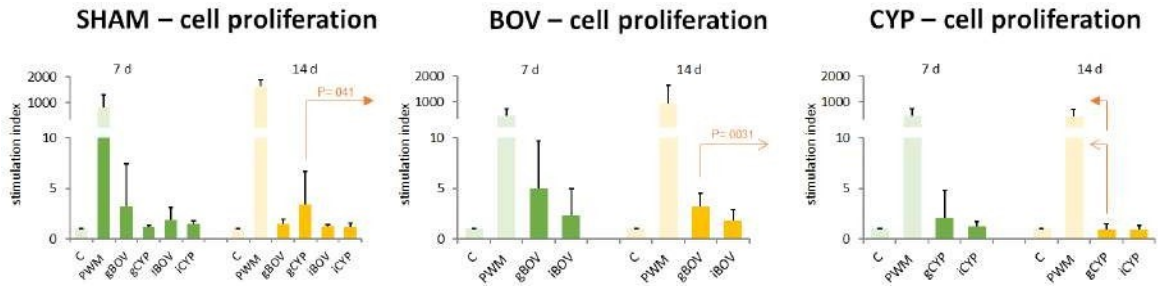
3.2.4 Výsledky provedených testů



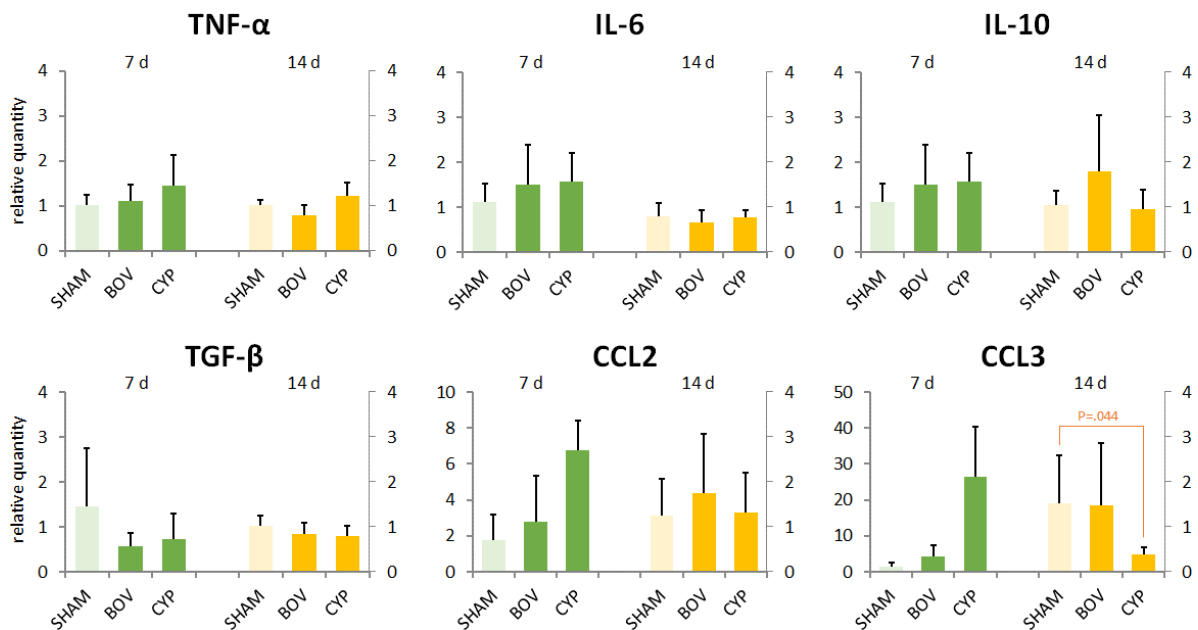
Obr. 15: Průměrná hladina cytokinů (pg/ml) v séru experimentálních skupin (BOV, CYP) a kontrolní skupiny (SHAM) stanovená metodou ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 7 dnů (zelené sloupce) a 14 dnů (žluté sloupce) po implantaci.



Obr.16: Průměrná hladina cytokinů (pg/ml) v supernatantech *in vitro* stimulovaných splenocytů implantovaných (BOV, CYP) a kontrolních (SHAM) skupin stanovená metodou ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 7 dnů (zelené sloupce) a 14 dnů (žluté sloupce) po implantaci. Kultury myších splenocytů byly inkubovány v obohaceném RPMI 1640 mediu bez stimulantu (C, negativní kontrola), s pokeweed mitogenem (PWM, pozitivní kontrola), s bovinním a kapřím gelem (gBOV, gCYP) a s bovinním a kapřím implantátem (iBOV, iCYP). Po hodinové inkubaci byly kultury odstředěny a supernatanty kultur byly použity ke stanovení cytokinové exprese. Nebyly zjištěny signifikantní rozdíly.



Obr. 17. Buněčná proliferace *in vitro* stimulovaných splenocytů implantovaných (BOV, CYP) a kontrolních (SHAM) skupin stanovená jako stimulační index 7 dnů (zelené sloupce) a 14 dnů (žluté sloupce) po implantaci. Kultury myších splenocytů byly inkubovány 48 hodin v obohaceném RPMI 1640 mediu bez stimulatoru (C, negativní kontrola), s pokeweed mitogenem (PWM, pozitivní kontrola), s bovinním a kapřím gelem (gBOV, gCYP) a s bovinním a kapřím implantátem (iBOV, iCYP). Poté přidán na 18 hodin ³H-thymidine (37 kBq); inkorporace značeného thymidinu myšimi lymfocyty byla měřena beta-counterem. Výsledek je vyjádřen jako stimulační index – poměr cpm (count per minute) stimulovaných buněk k negativní kontrole (C). Buněčná proliferace u skupiny CYPa stimulaci CYP gelem byla 14. den významně nižší ve srovnání se skupinou BOV stimulovanou BOVgelem ($P=0,0031$) nebo kontrolní skupinou stimulovanou CYP gelem ($P=0,041$).



Obr. 18: RNA (relativní množství, RQ) ve tkáni z mikroprostředí implantátu. Výsledek získán z normalizovaných dat genové exprese. RQ hodnoty vyjadřují rozdíl mezi implantovanými skupinami (BOV, CYP) a kontrolní skupinou (SHAM). Pro každou skupinu je RQ hodnota vyjádřena jako průměr \pm SD. Statistická analýza ukázala významný pokles CCL3 u CYP skupiny 14. den.

Všechna zvířata po zákroku dobře prospívala a nejevila žádné známky dyskomfortu. Analýza vybraného cytokinového spektra v sérech a v supernatantech kultur metodou ELISA neukázala žádné statisticky významné odchylky mezi skupinami myší. Hladiny cytokinů IL-1 β , IL-13 a IFN- γ byly velmi nízké, mnoho vzorků se nacházelo pod detekčním limitem zvolené metody. Ve všech skupinách byla na základě této analýzy míra zánětlivé odpovědi velmi nízká, což svědčí o dobré toleranci obou implantátů u testovaných zvířat.

Nicméně porovnáním výsledků v obou implantovaných skupinách byly zjištěny následující odchylky: hladiny IL-4, IL-10 and TNF- α v sérech myší s kapřími implantáty měly v čase klesající tendenci (14.den byly nižší než 7. den). U skupiny s bovinními implantáty tento pokles ve zvoleném časovém intervalu zaznamenán nebyl.

Test blastické transformace splenocytů umožnil porovnat proliferační aktivitu buněk izolovaných ze slezin všech tří skupin myší. Kultury splenocytů byly *in vitro* stimulovány PWM (pozitivní kontrola), bovinním a kapřím kolagenem. Byly zaznamenány pouze statisticky málo významné rozdíly v aktivitě splenocytů všech tří skupin myší; mírně vyšší proliferační aktivitu vykazují stimulované i nestimulované splenocyty ze skupiny myší s bovinním implantátem.

Kvantitativní analýza mRNA vzorků tkáně (qPCR) odráží reálnou lokální expresi vybraných cytokinů (TNF- α , IL-6, IL-10 a TGF- β , MCP1 a MIP1 α). Nicméně ani na lokální úrovni nebyly zachyceny žádné významné rozdíly mezi skupinami. Statistická analýza ukázala významný pokles CCL3 u CYP skupiny den.

3.2.5 Závěr

Podkožní implantáty cévních protéz impregnované kapřím kolagenem jsou u myší dobře tolerovány, implantovaná zvířata vykazují pouze mírné známky zánětu, který do 14 dnů odeznívá. Naše výsledky korespondují s výsledky studií, které jsou zaměřeny na výzkum

protizánětlivých vlastností kolagenních peptidů ryb (Subhan F et al, 2017), nicméně k průkazu protizánětlivého efektu kapřího kolagenu jsou třeba další detailnější studie. V rámci vývoje kolagenní hemostiptické pěny bylo rovněž formou vyšetření v externí akreditované laboratoři potvrzeno, že získaný rybí kolagen neobsahuje nepřijatelné množství endotoxinu.

4 Testování doby vstřebávání kolagenu

4.1 Protokol pokusu

Součástí práce bylo zjištění vstřebávání kolagenu a pro zjednodušení detekce implantovaného kolagenu jsme zvolili části kolagenní cévní protézy. Test spočíval v zažití části kolagenní protezy o velikosti 5x8 mm do podkoží hrudní stěny u 24 myši a po určitých časových intervalech 3., 10., 15. den, 3. a 6. měsíc byly myši usmrceny a oblast hrudní stěny myši s implantovanou částí kolagenní cévní protézy byla odeslána na histologické vyšetření. Byly použity části cévních protéz s kolagenem bovinním a porovnávali jsme dobu resorbce kolagenu s prototypy cévních protéz s rybím kolagenem třeboňského kapra typu 1 síťovaným 8 minut. Vždy na jednu stranu hrudní stěny (vpravo) byl implantován malý vzorek cévní protézy z rybího kolagenu typu 1 a na druhou stranu hrudní stěny (vlevo) byl implantován kontrolní vzorek protézy s bovinním kolagenem (Obr.: 19-20).



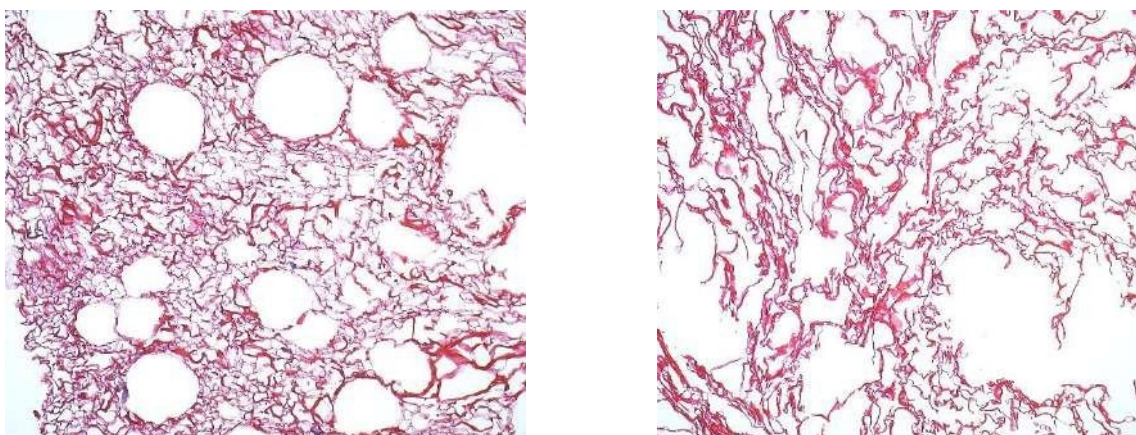
Obr. 19.: Implantace částí kolagenních cévních protéz do podkoží v oblasti hrudní stěny myši.



Obr. 20.: Implantace částí kolagenních cévních protéz na hřbet laboratorního potkana

4.2 Mikroskopické nálezy – kolagenní matrice:

Použitý materiál byl bovinní a rybí kolagen, který je na mikroskopické úrovni neodlišitelný (obr. 21). Nicméně kolagen je dobře detekovatelný standardními histopatologickými technikami (při použití barvení Srel (sirius red s elastikou), je pozitivní průkaz kolagenu jasně červený.

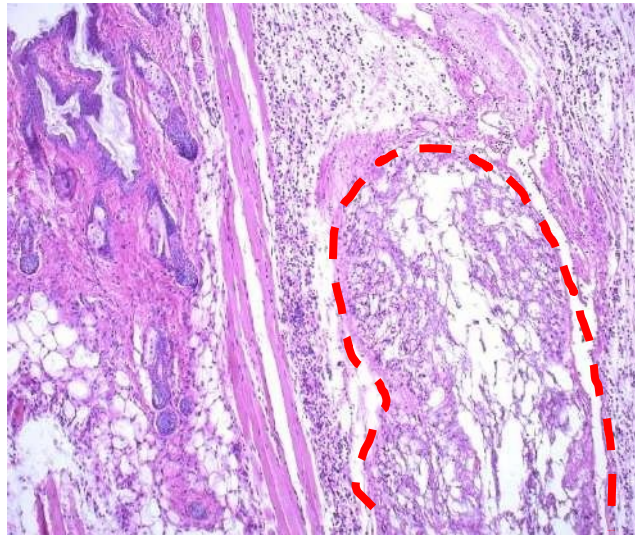


Obr. 21.: Samostatně zpracované vzorky v experimentu použitých kolagenů; vlevo bovinní a vpravo rybí. Barvení Srel (sirius red s elastikou); zvětšení: objektiv 10x.

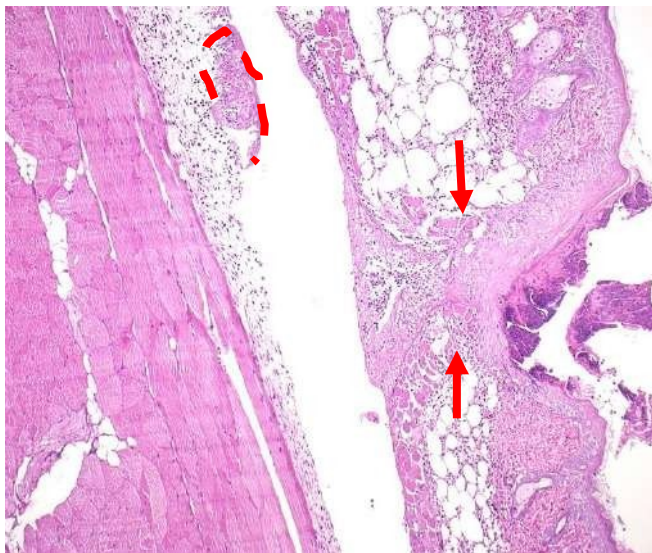
4.3 Mikroskopické nálezy implantovaných kolagenů:

4.3.1 Skupina 1. Implantovaný bovinní a rybí kolagen, 3. den.

Ložiska jsou v připravených „kapsách“, v jejich okolí je mírná zánětlivá a reparativní reakce, která jetěž u kontrol (obr. 22a, 22b).



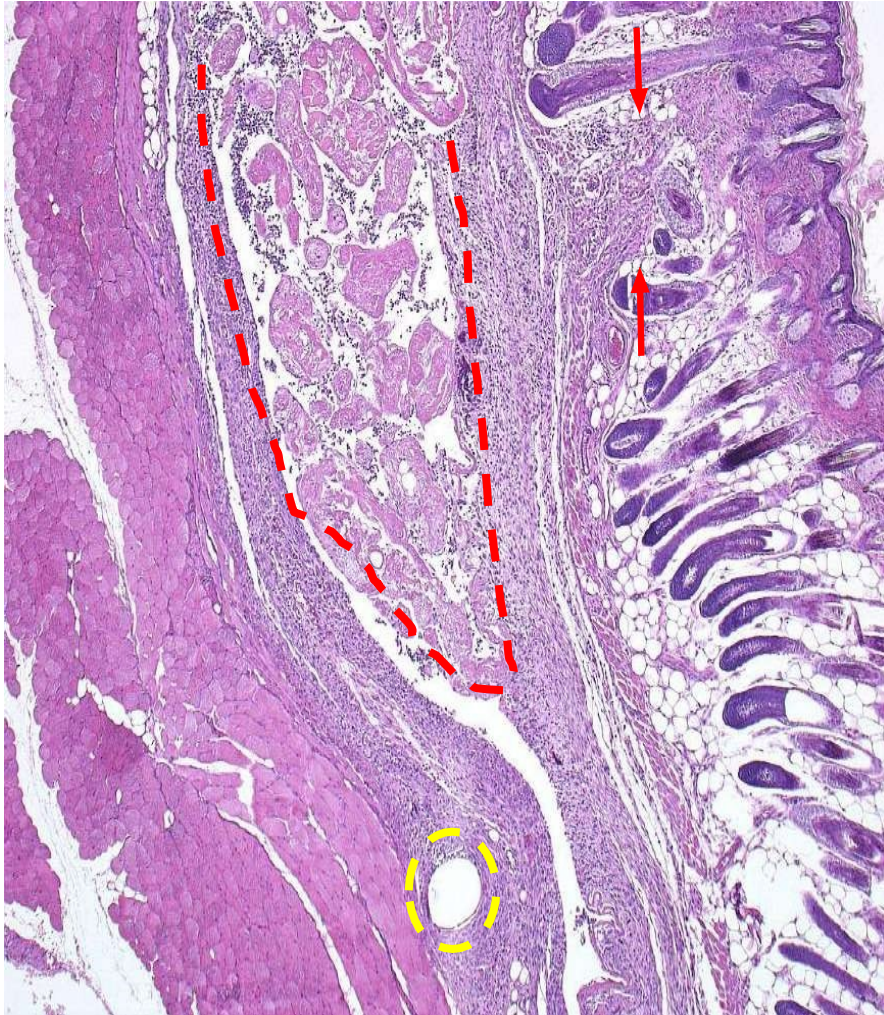
22a. Implantace rybího kolagenu; 3. den. Červeně ohraničené je ložisko s kolagenem, v okolí je mírná zánětlivá reakce. V levé části je kožní kryt s chlupy. Barvení HE s elastikou; zvětšení: objektiv 10x.



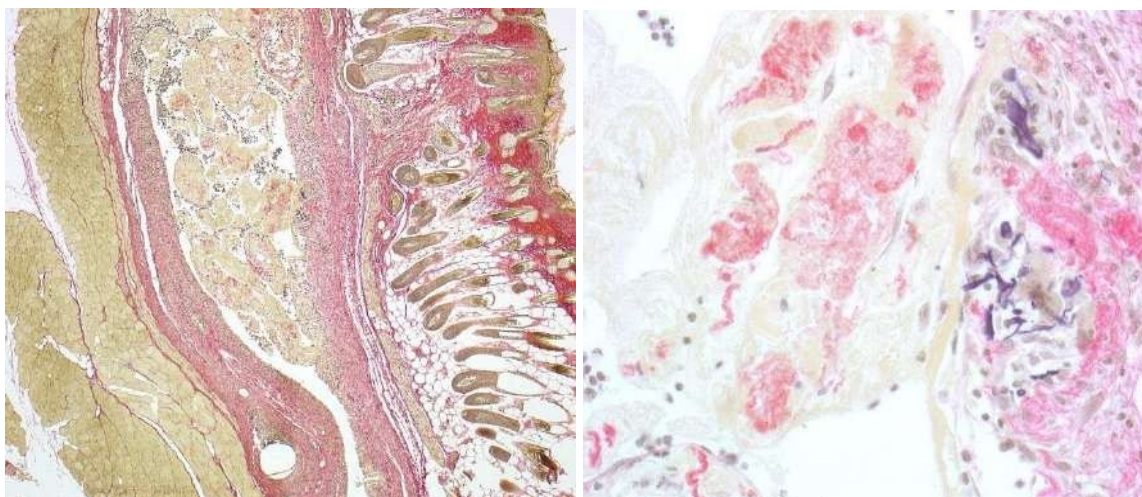
22b. Implantace bovinního kolagenu; 3. den. Ve vzorku je tvořící se jizva (mezi šipkami) a nepatrné reziduum kolagenu s řídkým pojivem se zánětem v okolí (červeně nahoře vlevo). Barvení HE s elastikou; zvětšení: objektiv 10x.

Skupina 2. Implantovaný bovinní a rybí kolagen, 10. den.

Ložiska jsou v připravených „kapsách“, v jejich okolí je mírná zánětlivá a reparativní reakce, je téměř plně vyvinutá kožní jizva. Zánětlivá reakce je mírná až střední, na materiál není obrovskobuněčná reakce (obr. 3). Část implantátů je v blízkosti jizvy a stehů, část se nedaří najít a velmi pravděpodobně řídkým pojivem cestují.



23a. Implantace bovinního kolagenu; 10. den. Ve vzorku je tvořící se jizva (mezi šipkami) a ložiskokolagenu s řídkým pojivem se zánětem v okolí (červeně čárkovanou čarou). Žlutě je označený stehs tkáňovou reakcí. Barvení HE s elastikou; zvětšení: objektiv 10x.

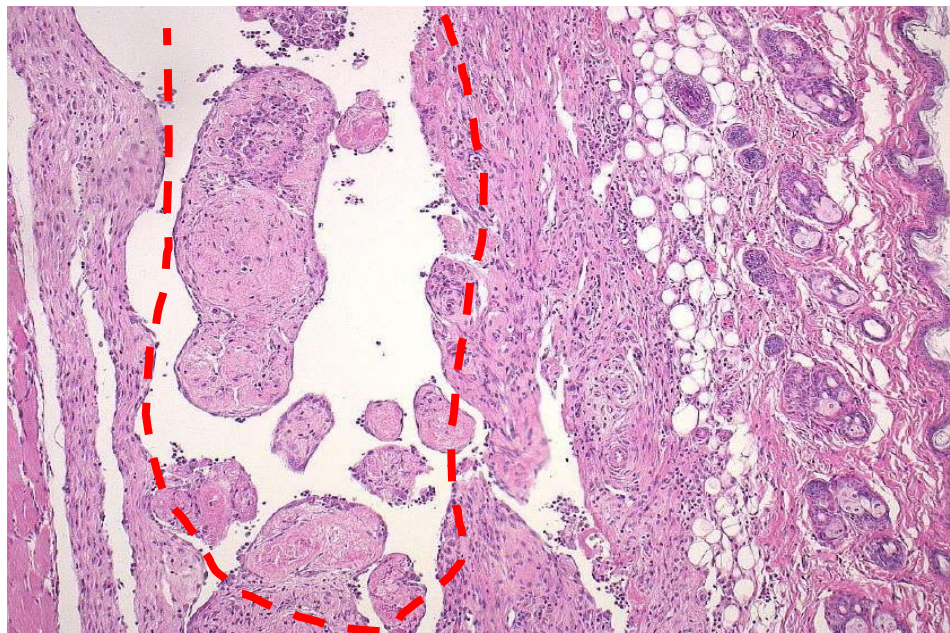


23b. Implantace bovinního kolagenu; 10. den. Vlevo stejné místo jako v předchozím, zde barveno Srel, kdy lépe vynikne jizva. Barvení Srel, zvětšení: objektiv 10x).

23c. Vpravo v detailu kolagen z ložiska (Barvení Srel, zvětšení: objektiv 40x).

Skupina 3. Implantovaný bovinní a rybí kolagen, 15. den.

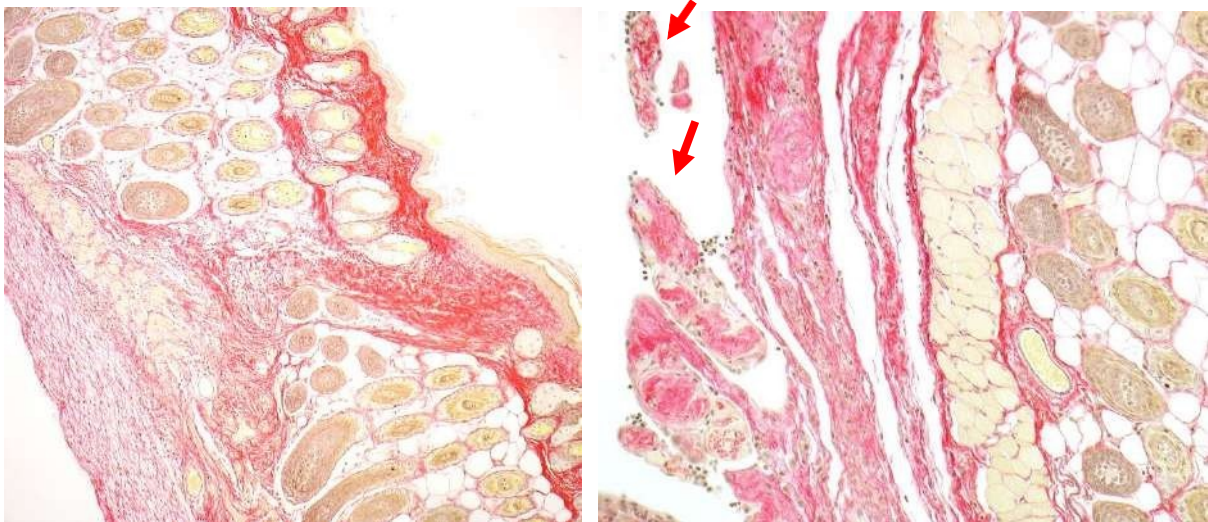
Ložiska a reakce na ně jsou prakticky stejná jako v předchozích vzorcích z 10. dne (obr. 24, obr 25). Identifikace implantátů je i zde obtížná.



24a. Implantace rybího kolagenu; 15. den. Červeně ohraničené je ložisko s kolagenem, v okolí je mírná zánětlivá reakce. V pravé části je kožní kryt s chlupy. Barvení HE s elastikou; zvětšení: objektiv 10x.



24b. Implantace rybího kolagenu; 15. den. Detail ložiska kolagenu. Barvení Srel; zvětšení objektiv 40x.



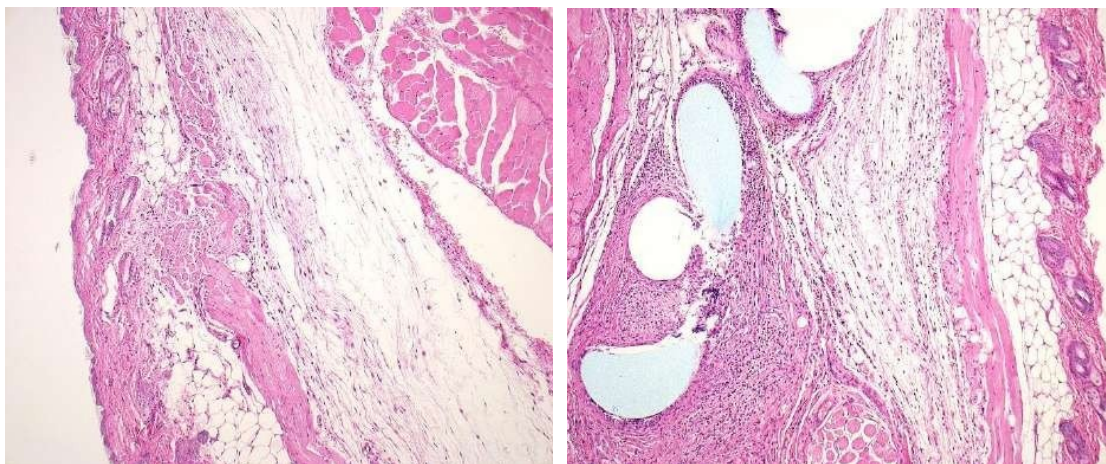
25. Implantace bovinního kolagenu; 15. den.

25a. Vlevo v centru je jizva a ve spodně řídké pojivo.

25b. Vpravo jsou rezidua kolagenu (šipky). Barvení Srel; zvětšení: objektiv 10x.

Skupina 4. Implantovaný bovinní a rybí kolagen, 3. měsíc.

Ložiska kolagenu se nedaří nalézt, a to i přes to že prokrájené byly celé dodané vzorky. Identifikované jsou kožní jizvy a stehy, které měly ložiska značit (obr. 26). Patrná zůstává pouze rozšířená vrstva řídkého pojiva. Nelze rozhodnout s jistotou, zda se kolagen vstřebal nebo zda se posunul na tolik, že nebyl při odebrání vzorku nalezen.

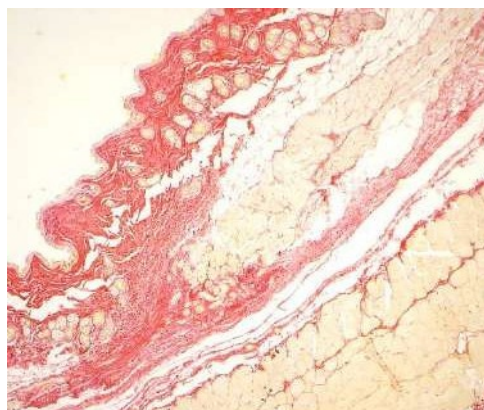
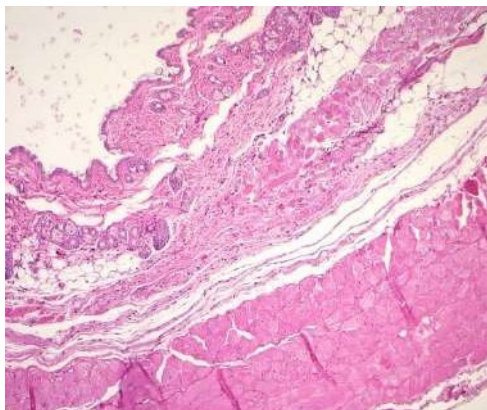


26a. Vlevo: Implantace bovinního kolagenu; 3. měsíc. V centru je jizva a ve spodině řídké pojivo, kolagen neidentifikován. Barvení HE s elastikou; zvětšení: objektiv 10x.

26b. Vpravo: Implantace rybího kolagenu; 3. měsíc. Ve vzorku jsou stehy v místě předpokládaného kolagenu. Navazuje řídké pojivo a vpravo kožní kryt. Kolagen neidentifikován. Barvení HE s elastikou; zvětšení: objektiv 10x.

Skupina 5. Implantovaný bovinní a rybí kolagen, 6. měsíc.

Ložiska kolagenu se nedaří nalézt, a to i přes to že prokrájené byly celé dodané vzorky (obr. 27). Rozvahou důvodu je stejná jako v předchozí skupině 4, 3 měsíce po implantaci. U vzorků 3 a 6 měsíců po implantaci nemůžeme vyloučit, že došlo ke kompletní resorpci kolagenu a jako reziduum zůstává patrná pouze řídká rozšířená pojivová tkáň.



27. Implantace bovinního kolagenu; 6. měsíc. 27a. Vlevo je jizva, kolagen neidentifikován. Barvení HE s elastikou, zvětšení: objektiv: 10x. 27b. Vpravo stejné místo v barvení Srel, kde lépe vynikne vazivová jizva.

4.4 Shrnutí testu resorbce kolagenu:

Tento test vstřebávání prokázal, že ještě 15 dní po implantaci je patrný kolagen na implantované části cévní protézy, ale už ve fázi odbourávání a ve 3 měsíci je kolagen již odbourán a zůstává v tkáni jen pletený scaffold což koreluje s výše uvedeným, že k odbourání většiny kolagenu dochází mezi 3-5 týdnem. Je velká škoda, že jsme do pokusu nezařadili histologické vyšetření v rozmezí 4-6 týdnem po implantaci. K tomuto chybnému kroku došlo v důsledku úvahy vyššího stupně prosítování protézy s rybím kolagenem, kde jsme předpokládali delší dobu odbourávání, na což ukazovala i histologická vyšetření z 10. a 15. dne po implantaci kde, v okolí implantovaného vzorku byla jen mírná reparativní reakce a kolagen je odbourán minimálně.

5 Ověření technologických možností výroby hemostatické pěny z rybího kolagenu sladkovodních ryb – kolagenové lyofilizáty s antibiotiky

5.1 Návrh složení a přípravy kolagenových lyofilizátů s ATB

V rámci předběžných testů kolagenových lyofilizátů sycených antibiotiky bylo připraveno a hodnoceno 17 typů materiálů, lišících se koncentrací kolagenové disperze (C1, C2), použitým antibiotikem, jmenovitě gentamicin (infuzní roztok 80mg/80ml, B Braun, Gentamicin sulfát, Sigma, GEN), vankomycin (Mylan, VAN) a dodaný nitrofurantoin (NF), a prvotní teplotou zamražení (-30 a -80 °C), popis vzorků je uveden v Tab. 1. Jako

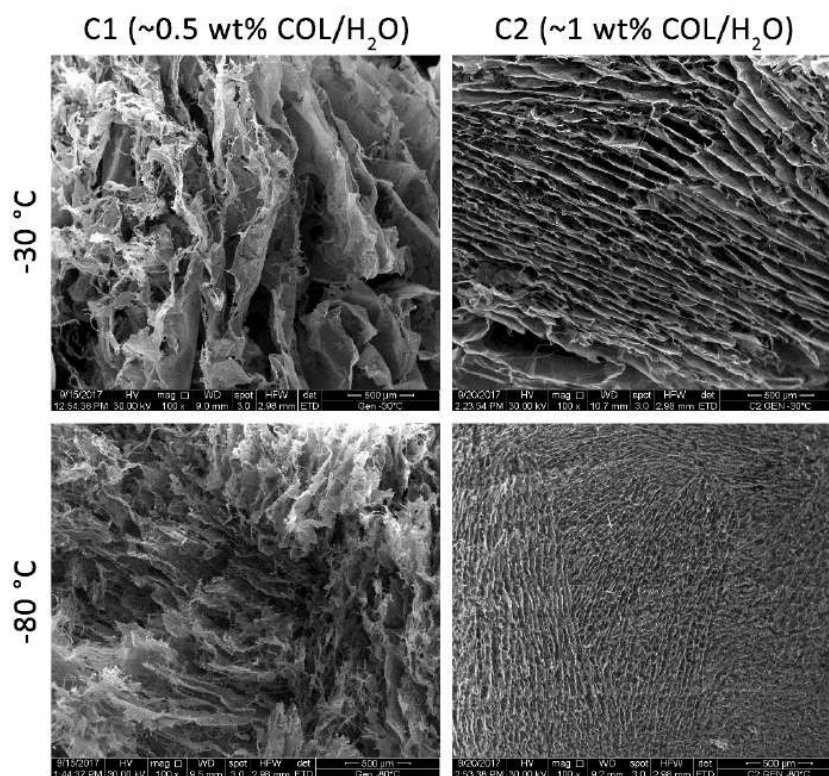
kontrolní vzorky posloužily kolagenové lyofilizáty (C1 a C2) bez ATB a komerční produkt Garamycin Schwamm® (EUSA Pharma (UK) Limited). Vnitřní struktura vzorků byla hodnocena pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM). Dále byla stanovena míra botnění a míra degradace během 24 a 48 hodinové expozice v deionizované vodě při 37 °C a v 5% CO₂ atmosféře simulující tělní prostředí. Médium bylo vybráno z důvodu zamezení nepřesností vlivem usazování nebo precipitace látek z médií jako PBS, DMEM apod. Míra degradace (D) byla stanovena, jako $D=(W_0-W_t)/W_0*100$ [%], kde W_0 je původní hmotnost vzorku, W_t je hmotnost suchého (lyofilizovaného) vzorku po loužení a míra botnění (E_{SW}) jako $E_{SW}=(W_{SW}-W_0)/W_0*100$ [%], kde W_0 je původní hmotnost suchého vzorku, W_{SW} je hmotnost mokrého vzorku po loužení.

C1 – GENTAMICIN (za použití dodaného fyz. roztoku s genta)				KOL+FYZ.	KOL/GEN
Disperze kolagenu přímo s NaCl roztokem gentamicinu 1mg/1ml B.BRAUN	B.BRAUN	KOLAGEN	GENTA	DISPERZE	KOMPOZIT
	[ml]	[mg]	[mg]	[%hm]	[%hm]
	32,5	125	32,5	0,383	68/32
C1 - VANKO+NITRO				KOL+H₂O	KOL/GEN
Disperze kolagenu s demi vodou a přidaným ATB	VODA	KOLAGEN	ATB	DISPERZE	KOMPOZIT
	[ml]	[mg]	[mg]	[%hm]	[%hm]
	32,5	125	100	0,383	55,6/44,4
C2 – GENTAMICIN (za použití GENTA Sigma-Aldrich*)				KOL+FYZ.	KOL/GEN
Disperze kolagenu s demi vodou a GENTA SIGMA	VODA	KOLAGEN	GENTA	DISPERZE	KOMPOZIT
	[ml]	[mg]	[mg]	[%hm]	[%hm]
	16,25	125	32,5	0,763	68/32
C2 - VANKO+NITRO				KOL+H₂O	KOL/GEN
Disperze kolagenu s demi vodou a přidaným ATB	VODA	KOLAGEN	ATB	DISPERZE	KOMPOZIT
	[ml]	[mg]	[mg]	[%hm]	[%hm]
	16,25	125	100	0,763	55,6/44,4

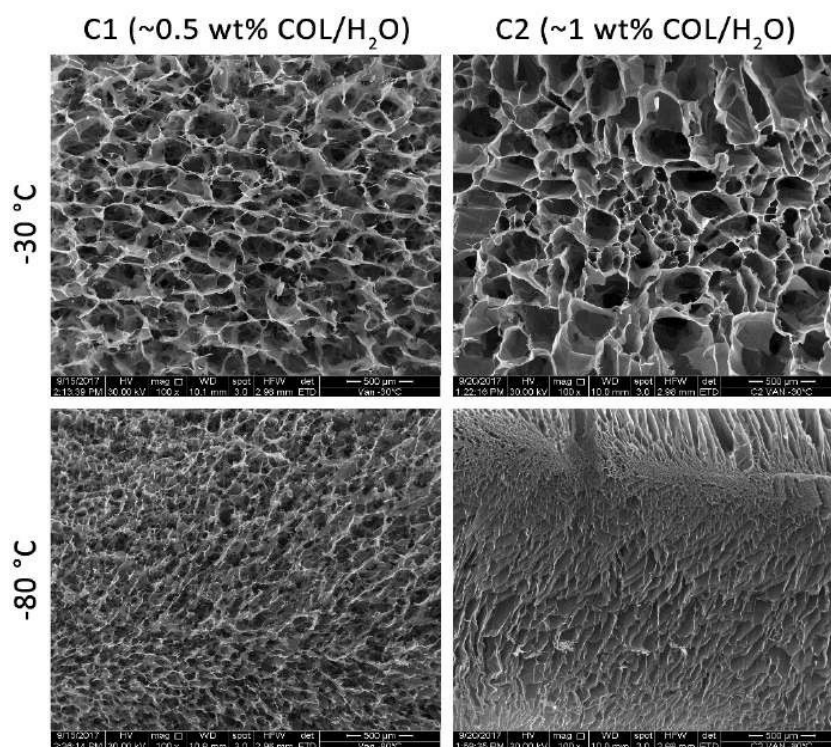
Tab. 1. Materiálové složení lyofilizátů.



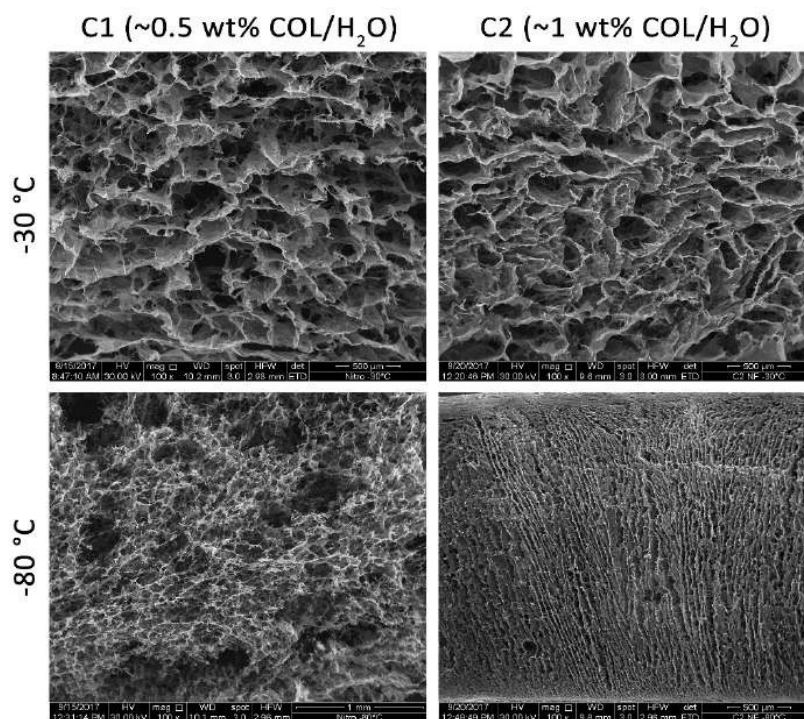
Obr. 28 Ukázka lyofilizátů s gentamicinem (GEN), vankomycinem (VAN) a nitrofurantoinem (NF) s koncentrací kolagenové disperze C1, zamražených na -30 a -80°C .



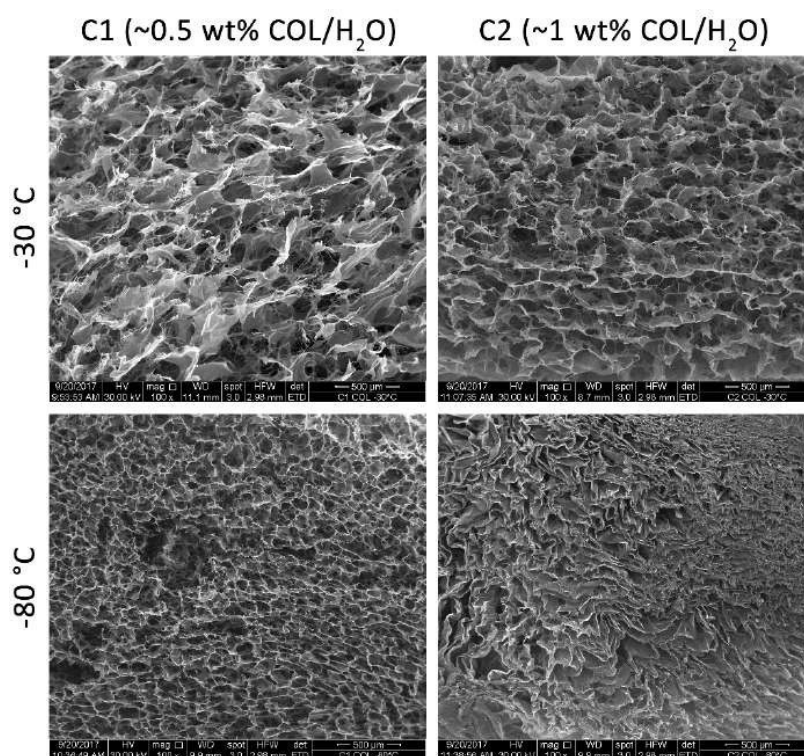
Obr. 29 SEM snímky čtyř typů lyofilizátů s gentamicinem (použité koncentrace kolagenové disperze jsou pro přehlednost zaokrouhleny na C1: 0,5% a C2: 1%), mag. 100x.



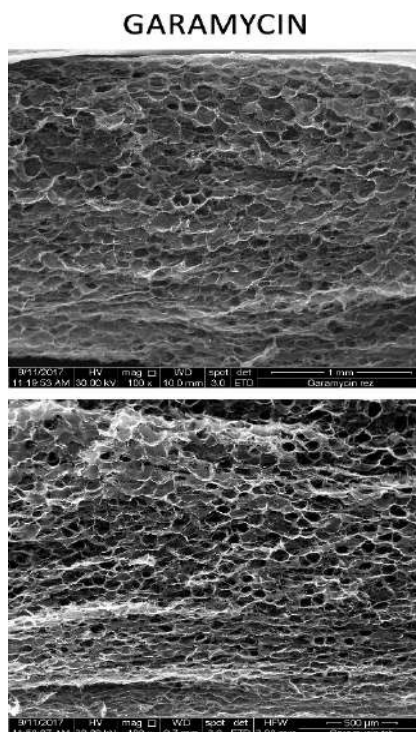
Obr. 30 SEM snímky čtyř typů lyofilizátů s vankomycinem (použité koncentrace kolagenové disperze jsou pro přehlednost zaokrouhleny na C1: 0,5% a C2: 1%), mag. 100x.



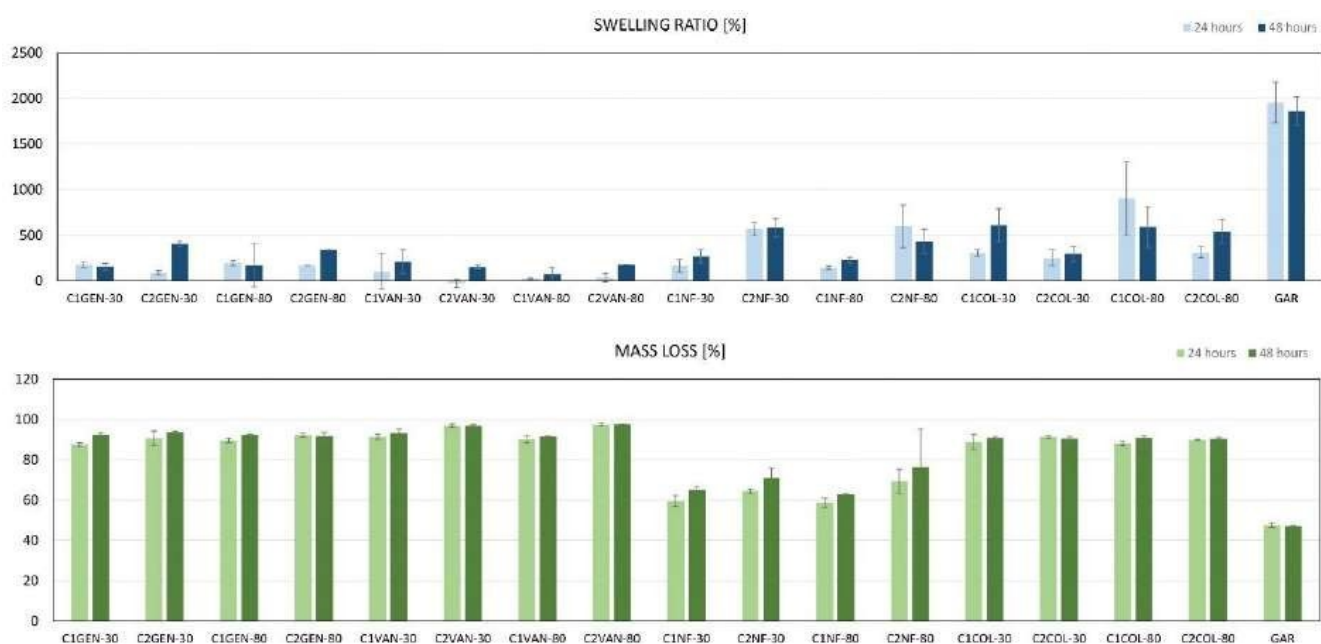
Obr. 31 SEM snímky čtyř typů lyofilizátů s nitrofurantoinem (použité koncentrace kolagenové disperze jsou pro přehlednost zaokrouhleny na C1: 0,5% a C2: 1%), mag. 100x.



Obr. 32 SEM snímky čtyř typů lyofilizátů bez ATB (použité koncentrace kolagenové disperze jsou propřehlednost zaokrouhleny na C1: 0,5% a C2: 1%), mag. 100x.



Obr. 33 SEM snímky Garamycinu, mag. 100x.



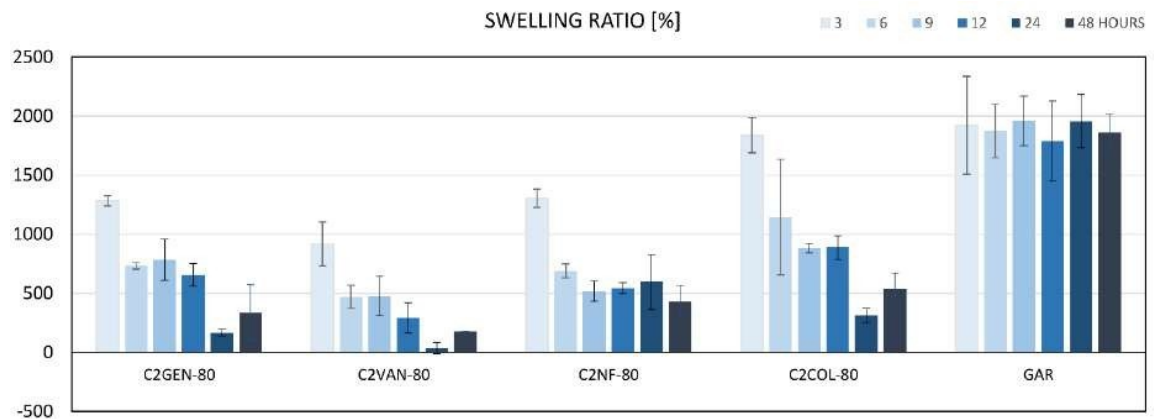
Obr. 34 Míra bobtnání a hmotnostní úbytky analyzovaných materiálů (aritmetický průměr, SD, n=3).

5.2 Podrobná analýza fyzikálních vlastností kolagenových lyofilizátů s antibiotiky

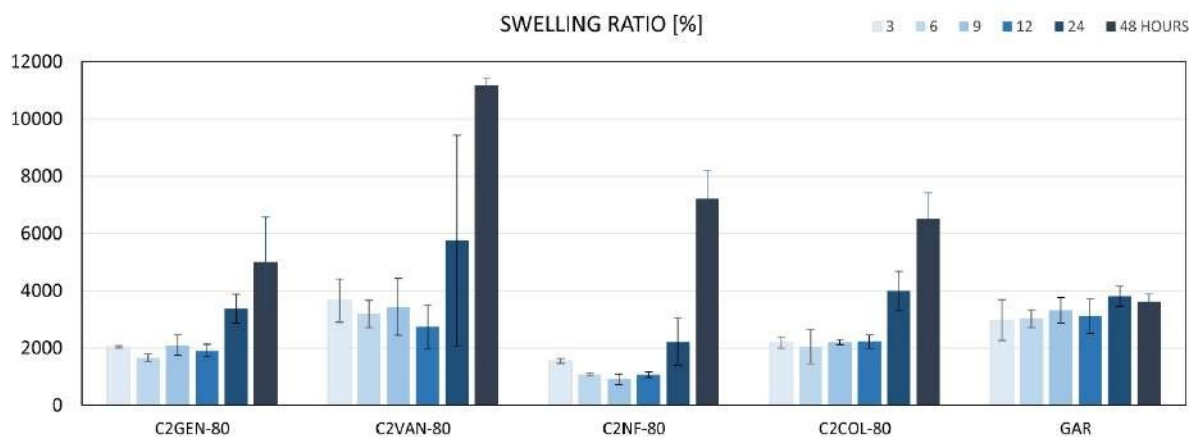
V dalším kroku byla provedena podrobnější analýza míry bobtnání a degradace během prvních 12hod. expozice u vybraných materiálů – lyofilizátů s koncentrací C2, zamražených na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, se všemi typy ATB, jako kontrola posloužil vzorek kolagenu připravený z koncentrace C2 bez ATB a opět Garamycin. Oba parametry byly sledovány po 3, 6, 9 a 12 hodinách. Expozice byla provedena za stejných podmínek, tedy v deionizované vodě při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a v 5% CO_2 atmosféře simulující tělní prostředí. Oproti minulému stanovení jsme v případě míry bobtnání provedli ještě přepočítání, který zohledňuje míru degradace vzorků. Míra nasáknutí nebyla tedy stanovena k původní hmotnosti vzorku na začátku experimentu, ale byla vztažena ke hmotnosti suchého vzorku v dané periodě odběru, viz dále.

Míra bobtnání nezohledňující degradaci (E_{sw}) jako $E_{sw} = (W_{sw} - W_0) / W_0 * 100$ [%], kde W_0 je původní hmotnost suchého vzorku, W_{sw} je hmotnost mokrého vzorku po loužení. Míra bobtnání zohledňující degradaci (E_{swD}) jako $E_{swD} = (W_{sw} - W_D) / W_D * 100$ [%], kde W_D je hmotnost suchého (lyofilizovaného) vzorku po loužení, W_{sw} je hmotnost mokrého vzorku po loužení. Míra degradace (D) byla stanovena jako

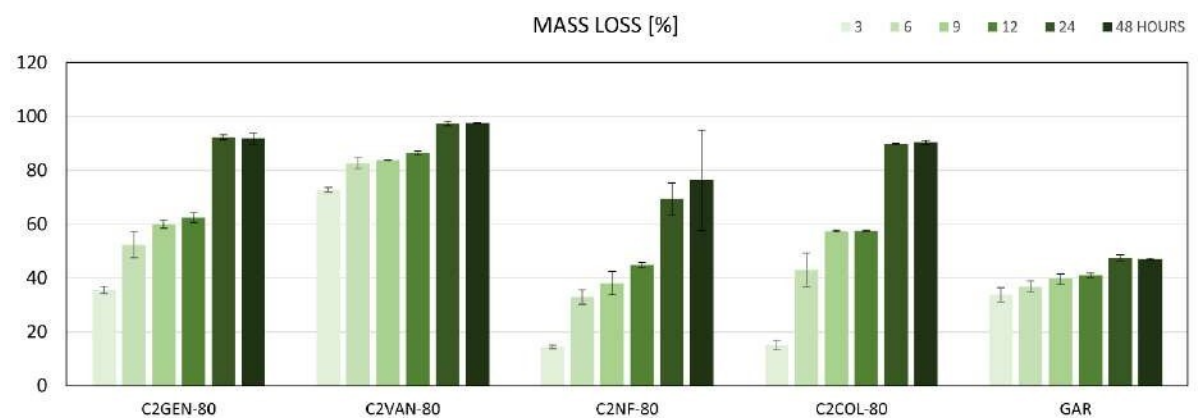
$D=(W_0-W_t)/W_0*100$ [%], kde W_0 je původní hmotnost vzorku, W_t je hmotnost suchého (lyofilizovaného) vzorku po loužení.



Obr. 35 Míra botnání nezohledňující degradaci analyzovaných materiálů v intervalu 3-48 hodin. (aritmetický průměr, SD, n=3).



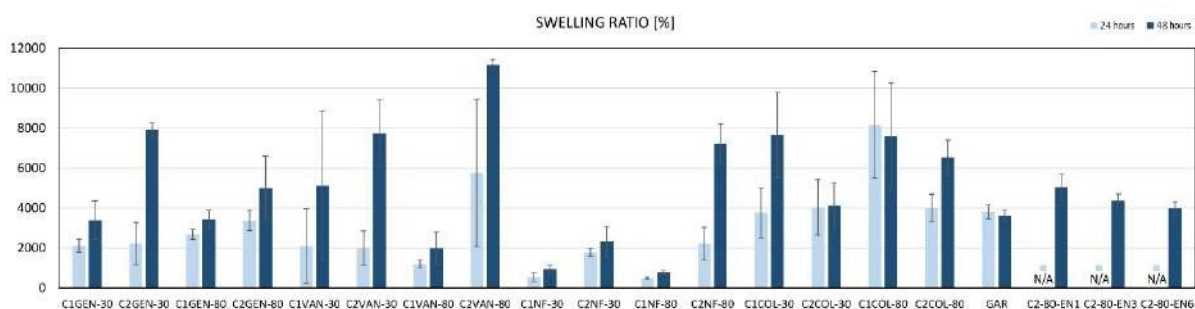
Obr. 36 Míra botnání zohledňující degradaci analyzovaných materiálů v intervalu 3-48 hodin. (aritmetický průměr, SD, n=3).



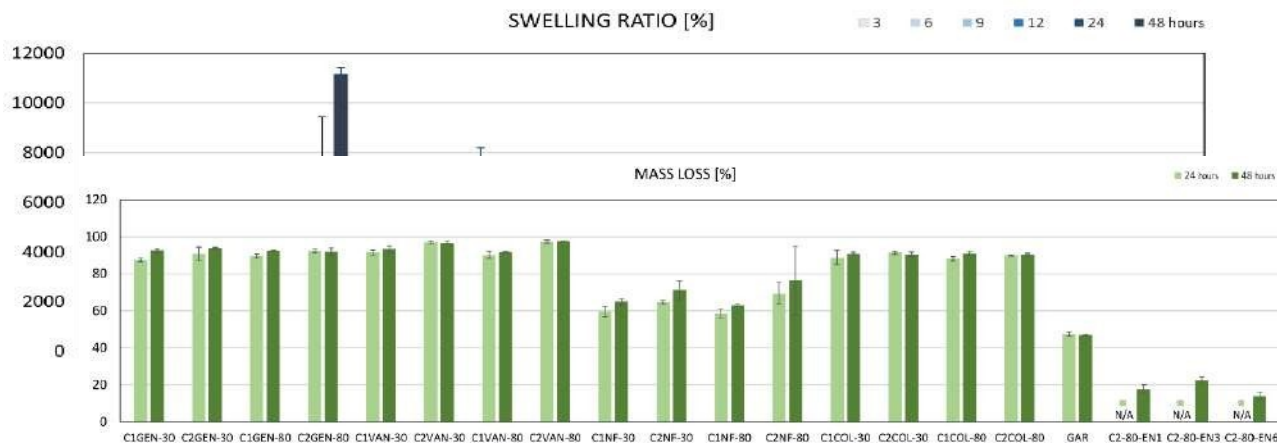
Obr. 37 Hmotnostní úbytky analyzovaných materiálů v intervalu 3-48 hodin. (aritmetický průměr, SD, n=3).

6 OPTIMALIZACE DOBY DEGRADACE KOLAGENOVÝCH LYOFILIZÁTŮ DODATEČNÝM ZESÍTĚNÍM

Vzhledem k relativně rychlé degradaci připravených kolagenových lyofilizátů (koncentrace C2) byl postup přípravy dále modifikován zařazením dodatečného zesíťování kolagenové složky. K zesíťování bylo použito chemických činidel N-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethylkarbodiimidu hydrochloridu (Sigma, EDC) a N-hydroxysukcinimidu (Sigma, NHS). Po homogenizaci a zamrazení směsi na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (3 hodiny) a lyofilizaci je stabilita tedy zvýšena máčením v roztoku 95 % hmotn. ethanolu a vodys EDC/NHS (4/1 hmotnostně) při teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 1 (C2-80-EN1), 3 (C2-80-EN3) nebo 6 hodin (C2-80-EN6). Na 1 g kolagenu připadá 1 g EDC. Po zesíťování kolagenové složky je kolagenová pěna promývána 0,1 M Na_2HPO_4 po dobu alespoň 2x45 minut a dále promyta alespoň 30 minut v destilované vodě, zamrazena na $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (5 hodin) a lyofilizována. Míra zesíťování byla analyzována stanovením míry bobtnání a degradace během 48 hodin expozice v deionizované vodě při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a v 5% CO_2 atmosféře simulující tělní prostředí ($n=6$). Opět byl proveden přepočít, který zohledňuje míru degradace vzorků. Míra nasáknutí nebyla tedy stanovena k původní hmotnosti vzorku na začátku experimentu, ale byla vztažena ke hmotnosti suchého vzorku v dané periodě odběru. Dosažené hodnoty jsou níže srovnány se všemi doposud analyzovanými materiály – nezesíťovanými kolagenovými lyofilizáty a Garamycinem.

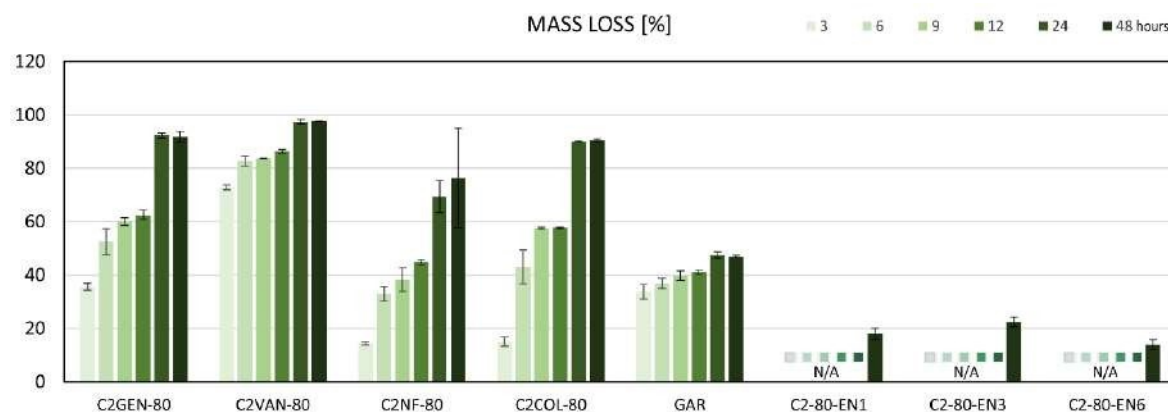


Obr. 38 Míra bobtnání zohledňující degradaci analyzovaných materiálů (ar. průměr, SD, $n=3$, $n=6$).

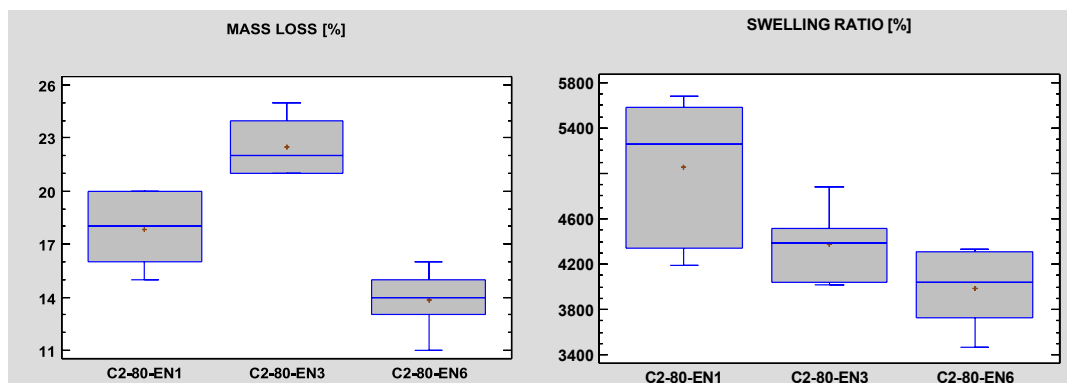


Obr. 39 Míra bobtnání zohledňující degradaci analyzovaných materiálů v intervalu 3-48 hodin (aritmetický průměr, SD, $n=3$, $n=6$).

Obr. 40 Hmotnostní úbytky analyzovaných materiálů (aritmetický průměr, SD, $n=3$, $n=6$).



Obr. 41 Hmotnostní úbytky analyzovaných materiálů v intervalu 3-48 hodin (aritmetický průměr, SD, $n=3$, $n=6$).



Obr. 42 Krabicové grafy hmotnostních úbytků a míry botnání zesítěných vzorků ($n=6$).

Z výsledků vyplývá, že k zesítní dochází již po aplikaci síťovacího roztoku po dobu jedné hodiny. Z Obr. 40 a 41 je patrné snížení hmotnostních úbytků oproti nezesíťovaným materiálům po 48 hodinách v médiu (zejména srovnání se samotným kolagenem), z krabicového grafu hmotnostních úbytků (Obr. 42 vlevo) je pak patrný další rozdíl v hmotnostních úbytcích až po aplikaci šestihodinového procesu. Mezi 1 a 3 hodinami není statisticky významný rozdíl ($p < 0.05$, Kruskal-Wallisův test vícenásobného porovnání s Bonferroniho korekcí). Za předpokladu, že vyšší míra zesítní snižuje botnání kolagenu, můžeme obdobně usuzovat, že k zesítní dochází už po aplikaci roztoku po dobu jedné hodiny (Obr. 38 a 39). Z krabicového grafu míry botnání (Obr. 42) je pak patrný rozdíl až po aplikaci šestihodinové expozice ($p < 0.05$, Kruskal-Wallisův test vícenásobného porovnání s Bonferroniho korekcí). Hodnoty míry botnání i hmotnostních úbytků stanovených po hodinové expozici vykazují relativně vyšší míru rozptylu, z čehož lze usuzovat na nižší homogenitu analyzovaných vzorků a pravděpodobně také na nedostatečně homogenní proces zesítní. Z dosažených výsledků lze tedy usuzovat, že optimální pro další přípravu bude aplikace tříhodinového procesu síťování. Ten bude nutné dále ještě verifikovat v delších časových intervalech a také v kombinaci s antibiotiky, aby byla rychlost degradace nastavena dle požadavků na finální aplikaci.

7 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. Pro kontrolní 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.

7.1 Diskové difusní testy s kolagenními houbičkami vyrobenými kolyofilizací s antibiotiky

7.1.1 Metodika

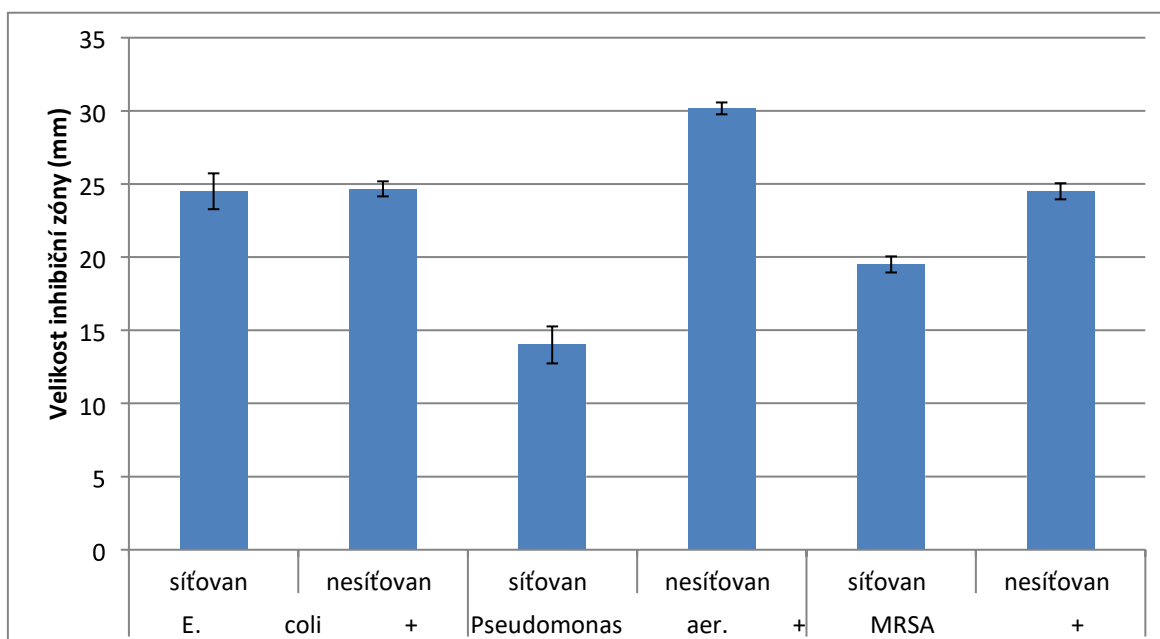
Pro zjištění efektivity houbiček jako nosiče antibiotik byly použity standardní mikrobiologické metody (diskové difuzní testy) s použitím vzorků houbiček kruhového tvaru o průměru 5 mm. Pro jednotlivé testy byly použity bakterie *Pseudomonas aeruginosa* (gentamicin), *Staphylococcus aureus* rezistentní na meticilin (MRSA – vancomycin), *Escherichia coli* (nitrofurantoin). Na Petriho misky byla standardním způsobem rozočkována 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. 43.).



Obr. 43 Petriho miska s nakultivovanou *Pseudomonas aeruginosa* s přiloženými houbičkami s gentamicinem – vlevo nesíťovaná, vpravo síťovaná.

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

7.1.2 Výsledky



Obr. 44 Velikost inhibičních zón jednotlivých testovaných houbiček.

Nitrofurantoin: velikost inhibičních zón je totožná, nehledě 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 „depozici“ 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.

7.1.3 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 vmytí nadbytku síťovacího činidla hydrofilním rozpouštědlem.

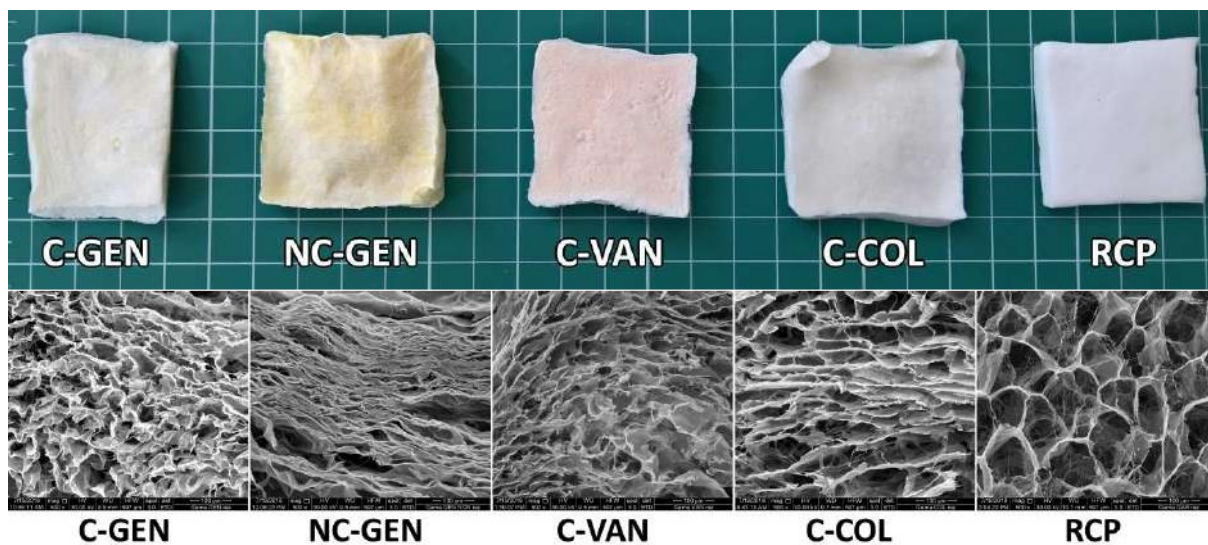
U nitrofurantoinu, který je velice málo rozpustný v hydrofilních rozpouštědlech vymytí nedošlo. Velice malý variační koeficient (malé SD úsečky) naznačuje, že atb. jsou v houbičkách rovnoměrně rozptýlena. Jednalo se o první testy depotizace s dodanými houbičkami AV ČR. Na základě těchto výsledků byl upraven finální technologický postup „dvojí lyofilizace“.

Pro následující pokusy byly vytvořeny síťované houbičky nejprve zesíťováním a lyofilizací, následnou impregnací gentamicinem/vankomycinem a poté opět lyofilizací (zcela nově vyvinutá metoda „dvojí lyofilizace“).

8 PŘÍPRAVA FINÁLNÍCH KOLAGENOVÝCH LYOFILIZÁTŮ S ANTIBIOTIKY, METODA DVOJÍ LYOFILIZACE

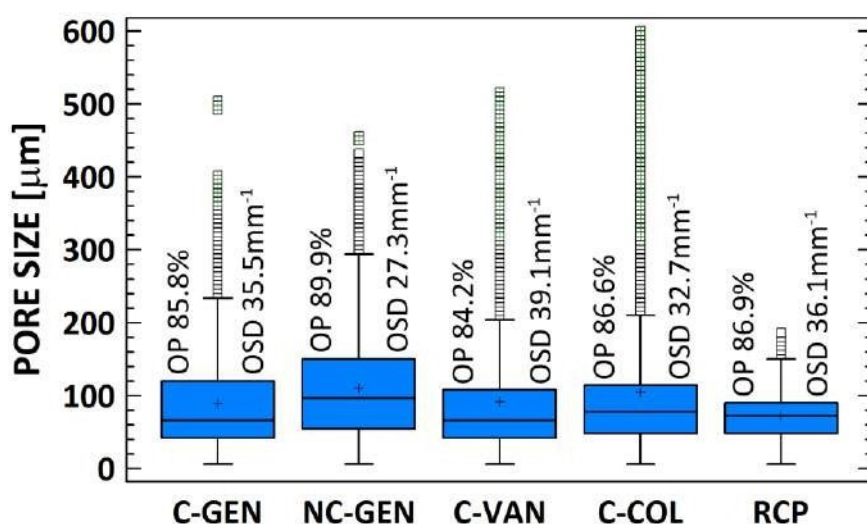
8.1 Gentamicin a vankomycin

Na základě provedené optimalizace přípravy a degradace kolagenových lyofilizátů byly připravovány vzorky s antibiotiky pro biologické testování v podmínkách *in vivo*. Jmenovitě šlo o vzorky (Obr. 45) zesíťovaného kolagenu impregnovaného gentamicinem (C-GEN) a vankomycinem (C-VAN), dále nezesíťovaného kolagenu s gentamicinem (NC-GEN) a referenční vzorky zesíťovaného kolagenu bez antibiotik a komerčního produktu Garamycin Schwamm[®]. Vzorky byly sterilizovány pomocí gama záření (25kGy). Vzorky byly standardně podrobeny analýze vnitřní struktury pomocí elektronové mikroskopie, mikro-CT, dále byly analyzovány pomocí FTIR a jejich strukturální stabilita byla testována pomocí degradačních testů ve fyziologické prostředí při 37 °C a řízené 5% CO₂ atmosféře. (Pielesz A, 2014)



Obr. 45 Makrosnímky připravovaných lyofilizátů a SEM snímky jejich vnitřní struktury v řezu (500x).

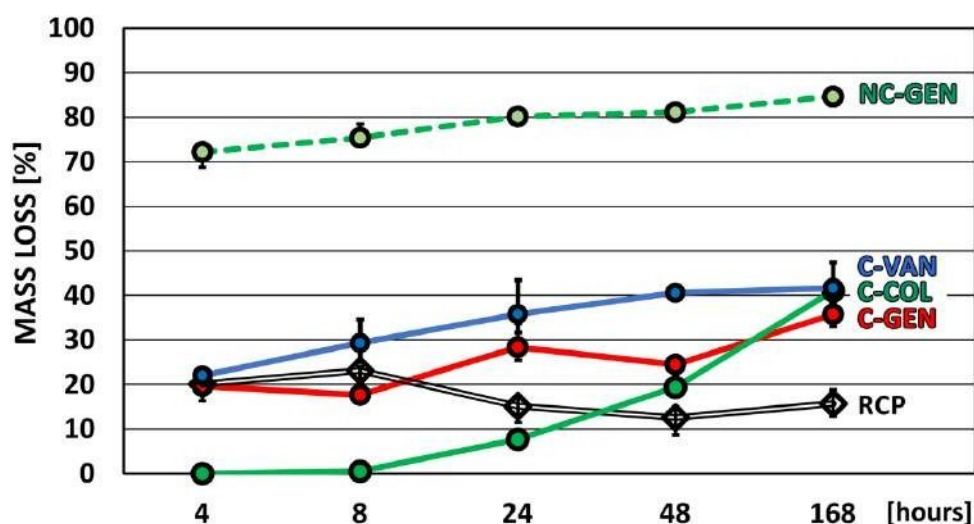
Na Obr. 46 jsou uvedeny strukturální parametry všech analyzovaných materiálů. Mimo velikosti a distribuce pórů jsou zde uvedeny hodnoty otevřené porozity (OP) a plošné hustoty (OSD) stanovené jako poměr celkové plochy kolagenu k celkovému analyzovanému objemu. Z výsledků je patrné, že u všech typů připravovaných materiálů bylo dosaženo obdobné otevřené porozity. Velikost pórů se u jednotlivých materiálů statisticky významně lišila, přičemž nejnižší velikost vykazovaly vzorky s vankomycinem (42-108 μm , dolní - horní kvartil) a gentamicinem (42-120 μm), nejvyšší pak nesíťované vzorky s gentamicinem (54-150 μm). Vzhledem k překryvu rozptylů nejde v rozměrech pórů jednotlivých lyofilizátů o výrazný rozdíl.



Obr. 46 Velikost pórů, otevřená porozita (OP) a plošná hustota (OSD) analyzovaných materiálů. Všechny hodnoty vykazují statisticky významné rozdíly (Kruskal-Wallis, Bonferroniho korekce, 0,05).

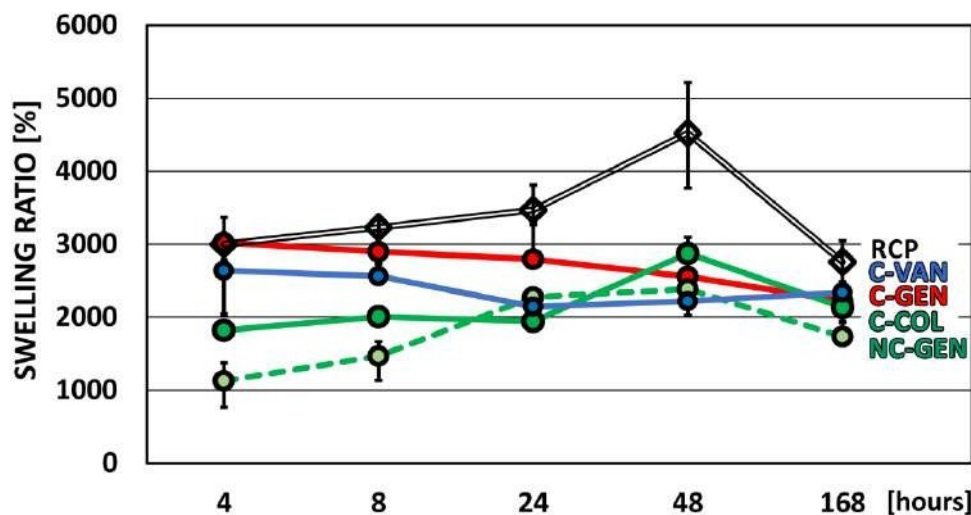
Výsledky degradačních testů jsou shrnuty na Obr. 47. Nejvyšší míru degradace vykazovaly vzorky nezesíťovaného kolagenu s gentamicinem. Po čtyřech hodinách expozice v simulovaném tělním prostředí byl zjištěn úbytek hmotnosti přes 70%, přičemž po týdenní expozici zdegradovalo přibližně 85% původní hmotnosti vzorku. Průběh degradace vykazovaly obdobně oba zesíťované vzorky impregnované vankomycinem a gentamicinem. Ihned po čtyřech hodinách expozice dosahoval hmotnostní úbytek 20%. Tato zrychlená degradace může být způsobena také rychlým uvolněním antibiotik

integrovaným ve vnitřní porézni struktuře lyofilizátu. Další průběh úbytku hmotnosti měl pomalejší trend a po týdenní expozici se zastavil shodně na hodnotě kolem 40%. Vliv vyplavování antibiotik na ztrátu hmotnosti impregnovaných vzorků lze doložit také na příkladu úbytků hmotnosti samotného zesíťovaného kolagenu, kde byla ztráta hmotnosti měřitelná teprve až po 24 hodinách testu, zatímco po týdnu vykazovaly vzorky shodně úbytek okolo zmíněných 40%. U druhého referenčního materiálu – komerčního produktu Garamycin[®], měl průběh degradace jiný trend. Po čtyřech hodinách expozice byla ztráta hmotnosti také 20%, ale dále až do konce testu zůstala prakticky beze změny. Tentodě pravděpodobně souvisí také s rychlejším uvolněním antibiotika ihned v první fázi expozice v simulovaném tělním prostředí.



Obr. 47 Hmotnostní úbytky vyjádřené jako procentní ztráta původní hmotnosti (medián, mezikvartilové rozpětí).

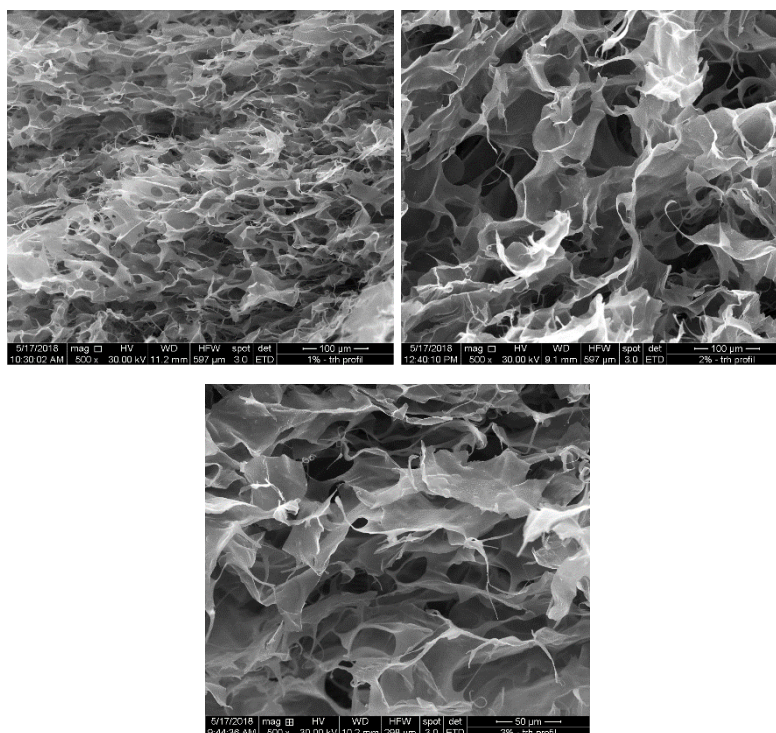
Míra nasákavosti (botnání), vyjádřená jako nárůst původní hmotnosti vzorku, během sedmi denní expozice v tělním prostředí je uvedena na Obr. 48.



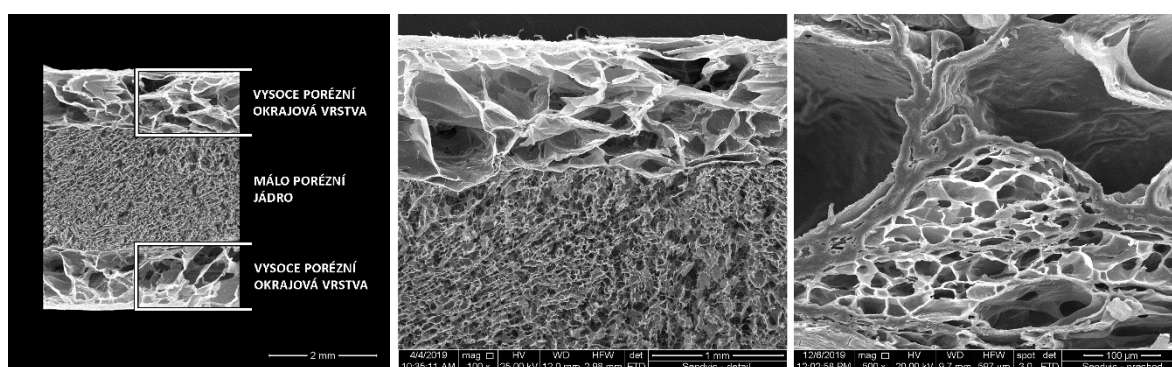
Obr. 48 Míra botnání vyjádřená jako procentní nárůst původní hmotnosti vzorku (medián, mezikvartilové rozpětí).

8.2 Rifampicin

Připravené kolagenové pěny s rifampicinem lze rozdělit do tří základních skupin, které se principiálně liší rozsahem porozity, specifickou velikostí povrchu a mechanickými vlastnostmi. Cílem různé přípravy a také inkorporace kolagenu v nanovláknenné formě je optimalizace doby degradace a řízené uvolňování antibiotik. **První skupinou** jsou pěny připravované z kolagenové disperze s různou koncentrací, jmenovitě 1%, 2% a 3% (Obr. 49). **Druhou skupinou** jsou sendvičové konstrukty, které kombinují tuhé, málo porézní jádro a okrajové vrstvy s vyšší porozitou (viz Obr. 50). Sendvičové materiály jsou vytvářeny několikasupňovou přípravou, která obnáší přípravu tuhého zesíťovaného nebo nezesíťovaného jádra s nižší porozitou, které je ve druhém kroku prosycováno méně koncentrovanou disperzí kolagenu, opětovně zamrazováno a pouze lyofilizováno. Tento způsob přípravy umožní řízení postupné degradace pěn, která by měla zajistit variabilní míru uvolňování antibiotik z různě porézních vrstev při zachování dostatečné tuhosti a aplikovatelnosti formou hemostatického krytí.



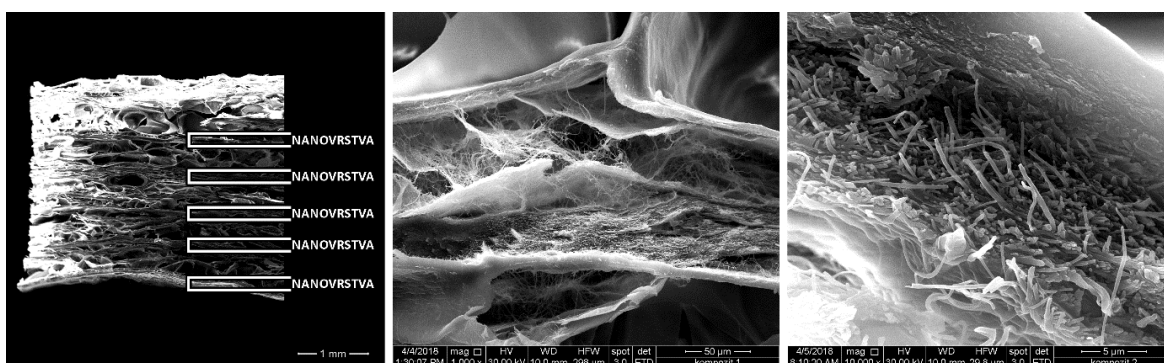
Obr. 49 SEM snímky kolagenových pěn připravovaných z různě koncentrovaných prekurzorů (zleva 1%, 2% a 3%), kterými lze dosáhnout různé porozity jednotlivých materiálů.



Obr. 50 Sendvičová kolagenová pěna s málo porézním jádrem, připraveným z 5 % hmotn. disperze kolagenu, a s vysoce porézními okrajovými částmi, připravenými z 1 % hmotn. disperze kolagenu. Zcela vpravo je snímek rozhraní přechodu mezi jádrem a okrajem.

Třetí skupinou jsou kolagenové pěny kombinující mikro strukturovaný lyofilizát s několika vrstvami kolagenových nanovláken (Obr. 51). Obdobně jako v případě vytváření sendvičů je cílem návrh pěn s různou porozitou a tuhostí. Kombinované mikro a nano

strukturované pěny jsou připravovány několikastupňovým procesem, kdy je v prvním kroku elektrostatickým zvlákňováním připravena nanostrukturovaná vrstva, která je v dalších krocích po zesítnění prosycována kolagenovou disperzí, skládána do kompozitní formy, a po zamražení lyofilizována. Kombinace složek s různou specifickou velikostí povrchu umožní další způsob řízení degradace pěn a měla by zajistit variabilní míru uvolňování antibiotik při zachování dostatečné tuhosti a aplikovatelnosti formou hemostatického krytí.

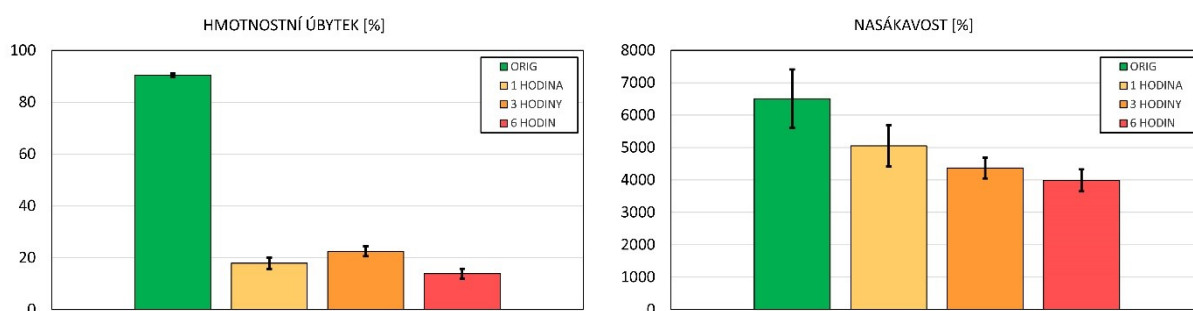


Obr. 51 Nanostrukturovaná vysoce porézní kompozitní pěna připravená prosycením pěti nanovlákněných vrstev 1 % hmotn. disperzí kolagenu. Snímek uprostřed ilustruje přechod mezi vlákny a porézní strukturou pěny. Snímek zcela vpravo ukazuje detail prosycení nanovlákněné vrstvy disperzí.

8.2.1 Optimalizace doby degradace

Vzhledem k relativně rychlé degradaci kolagených lyofilizátů byl postup přípravy všech typů pěn modifikován zařazením dodatečného zesíťování kolagenové složky. K zesítnění bylo použito chemických činidel N-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethylkarbodiimidu hydrochloridu (EDC) a N-hydroxysukcinimidu (NHS). Po homogenizaci a zamrazení směsi na -80 °C (3 hodiny) a lyofilizaci je stabilita tedy zvýšena máčením v roztoku 95 % hmotn. ethanolu a vody s EDC/NHS (4/1 hmotnostně) při teplotě 37 °C. Na 1 g kolagenu připadá 1 g EDC. Po zesíťování kolagenové složky je pěna promývána 0,1 M Na₂HPO₄ po dobu alespoň 2x45 minut a dále promyta alespoň 30 minut v destilované vodě, zamražena na -30 °C (5 hodin) a lyofilizována. Míra zesítnění byla analyzována

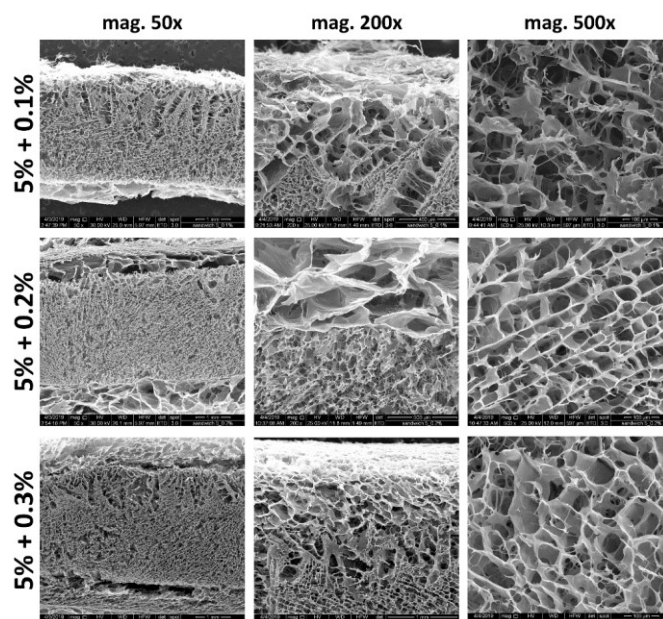
stanovením míry botnění (nasákavosti) a degradace během expozice v simulovaných tělních prostředích. Takto byl ověřován stupeň zesílení pěn, které byly exponovány v síťovacím roztoku po dobu 1 až několika hodin. Dalším parametrem, který byl v rámci doby degradace analyzován, byla různá porozita kolagenových pěn. Jmenovitě se jednalo o koncentrační řadu kolagenové disperze 0,1 - 8 % hmotn. Obr. 52 ilustruje vliv kratších intervalů zesíťování na hmotnostní úbytek a nasákavost v simulovaných tělních podmínkách.



Obr. 52 Hmotnostní úbytky a nasákavost kolagenních pěn připravených z 1 % hmotn. disperze síťované po dobu 1, 3 a 6 hodin. Výsledky jsou porovnány s totožnou nezesíťovanou pěnou. Vybrané výsledky ilustrují razantní snížení degradace už při jedné hodině síťování, při zachování vysoké míry nasákavosti.

8.2.2 Příprava sendvičových pěn

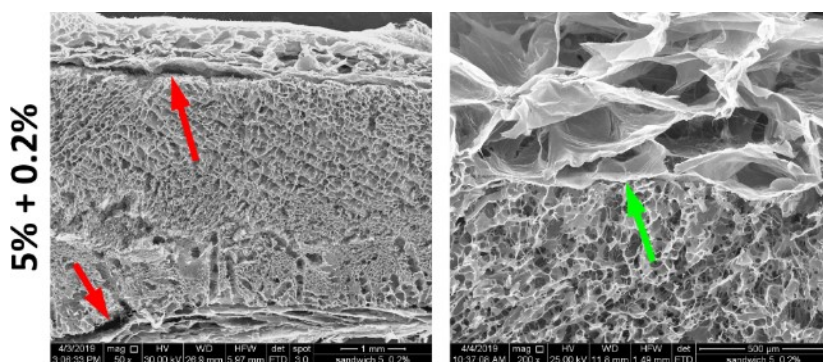
Pro přípravu sendvičových pěn byly na základě předchozích analýz vybrány jádro připravované z 5 % hmotn. kolagenové disperze a vysoce porézní okrajové části připravované z disperze o koncentracích 0,1 - 1 % hmotn. s krokem 0,1 % hmotn. Připravované sendvičové pěny jsou ilustrovány na Obr. 53.



Obr. 53 Reprezentativní snímky sendvičových pěn s tuhým jádrem (5%hm. disperze) a vysoceporézními okrajovými částmi (shora 0,1%hm., 0,2%hm. a 0,3%hm. disperze).

Postup jejich přípravy spočívá v několika fázích. Prvním krokem je příprava tuhého jádra (5 % hmotn., -80 °C), které je po lyofilizaci zesíťováno pomocí EDC/NHS 3 hodiny při 37 °C a opětovně vymraženo mezi lisovacími deskami. Tvarově konzistentní jádro je ve druhé fázi prosycováno disperzí kolagenu o konkrétní koncentraci. Po dostatečném prosycení ve vakuu a fixaci jádra jsou vzorky zamraženy (-80 °C) a lyofilizovány. Následuje zesíťování (EDC/NHS, 3 hodiny, 37 °C) a lyofilizace.

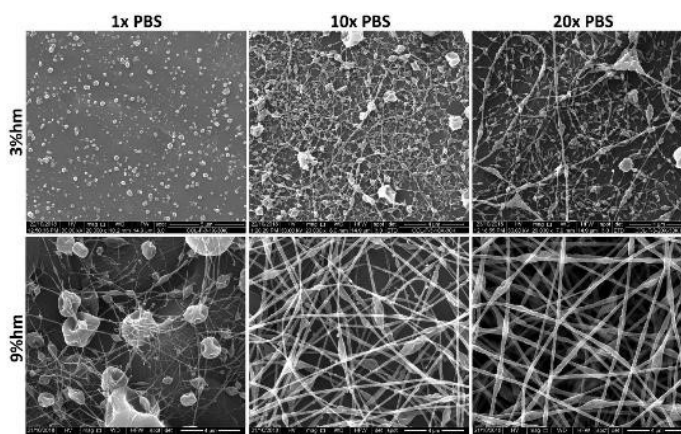
Právě doba a způsob prosycení je pro kvalitu těchto konstrukcí zásadní. Při nedostatečném prosycení může docházet k delaminaci jednotlivých vrstev (Obr. 54). Obdobně při prosycení disperzemi s vyššími koncentracemi dochází ke ztrátě porozity tuhého jádra, což může negativně ovlivňovat kinetiku uvolňování antibiotik stejně tak, jako požadované mechanické vlastnosti. Nevhodný způsob prosycení tuhého jádra ilustruje SEM snímek na Obr. 54 vlevo, kde šipky označují části, ve kterých došlo k delaminaci jednotlivých vrstev, v tomto případě šlo o okrajové vrstvy o koncentraci disperze 0,2 % hmotn. Pokud aplikujeme stejně koncentrovanou disperzi temperovanou na 37°C pod vakuem, dojde k vhodnému prosycení okrajových vrstev tuhého jádra a k delaminaci nedochází.



Obr. 54 Ukázka nevhodné impregnace tuhého jádra kolagenovou disperzí o koncentraci 0,2%hm. (vlevo, zvětšeno 50x) a ukázka optimalizované impregnace (vpravo, zvětšeno 200x), kde zelená šipka označuje homogenní rozhraní obou různě porézních vrstev.

8.2.3 Příprava kolagenových vláken

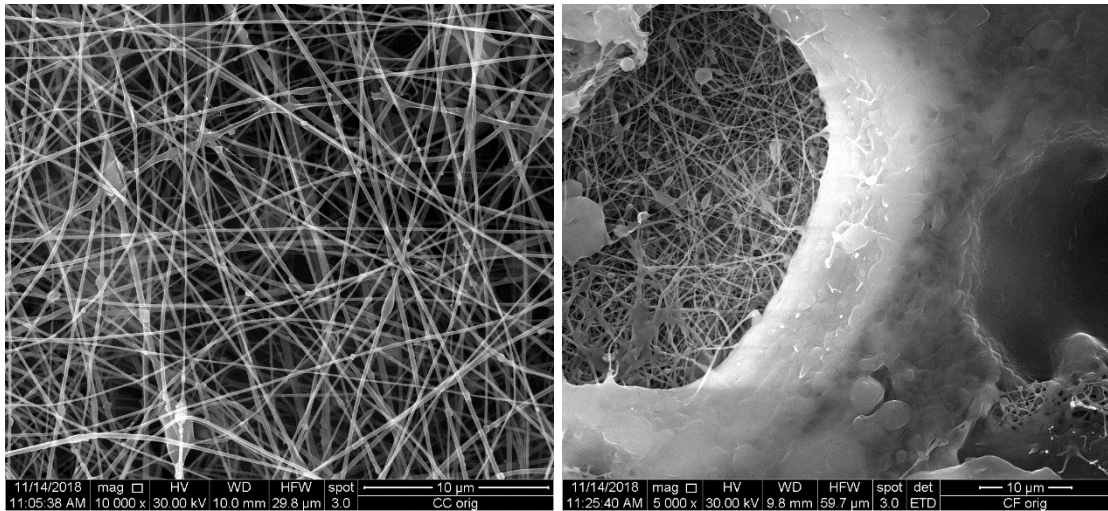
Pro přípravu kolagenových nanovláken bylo potřeba optimalizovat proces elektrostatičkého zvlákňování (obr 55), zejména pak zvlákňovací roztok. Postup přípravy kolagenového roztoku pro elektrostatičké zvlákňování vychází z našich zkušeností s přirozenými rozpouštědlovými systémy na bázi solí, vody a alkoholů, které minimálně poškozují nativní strukturu kolagenu. Základem pro roztok je lyofilizovaný kolagen typu I izolovaný opět z kůže treboňského kapra, získaný pomocí předextrakce ve fosfátovém a citrátovém pufru a izolace v 0,5M CH₃COOH. [Bell E, et al., 1979]



Obr. 55 Ukázka optimalizace procesu zvlákňování kolagenu. SEM snímky (zvětšení 20 000x) vláken připravených z roztoků o koncentraci 3%hm. (horní řádek) a 9%hm. (dolní řádek) za použití různě koncentrovaných fosfátových pufrů (PBS).

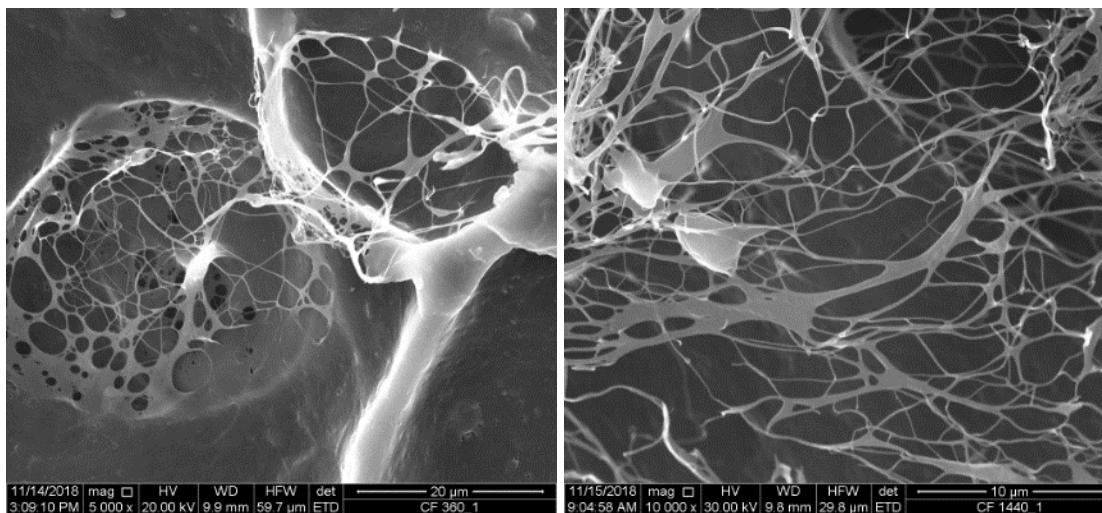
Základním roztokem pro zvlákňování je 3-16 % hmotn. roztok takto izolovaného kolagenu, který je smísen s fosfátovým pufrům a ethanolem, které jsou v objemovém poměru 1:1. Roztok byl dále optimalizován pro dosažení homogenních nanovlákných vrstev, a to zejména změnou jeho koncentrace v rozmezí 3-16 % hmotn. Dalším testovaným postupem byla aplikace pomocného polymeru, konkrétně polyethylen oxidu (PEO) s různými molekulovými hmotnostmi. PEO byl do roztoku přidáván v poměru 5-10 % hmotn. na hmotnost kolagenu.

Důležitou etapou přípravy zvlákňovaných vrstev byl návrh způsobu jejich síťování pro zvýšení stability v tělním prostředí. Cílem těchto prací bylo sledovat síťování vzorků z kolagenové nanovrstvy systémem EDC/NHS, při dávkování EDC 5/8 g na 1 g kolagenové nanovrstvy, s poměrem EDC:NHS (4:1 molárně) ve srovnání se síťováním referenční nanovrstvy z komerčního kolagenu (telecí kůže, VUP Medical, Brno) za laboratorní teploty. Síťování probíhalo na vzorcích v 60 plastových uzavíratelných miskách o objemu 20ml. Vzorky byly odebírány v časech 60, 120, 180, 240, 360 a 1440 minut. Po každém odběru byly vzorky stabilizovány v roztoku hydrofosforečnanu a dány k lyofilizaci. Lyofilizované zesíťované vzorky byly převáženy a stanoveny hmotnostní změny a provedena kontrola pomocí elektronové mikroskopie (SEM) se zaměřením na zachování nanovlákné struktury. Dalším krokem experimentu bylo zjištění stability síťovaných vzorků nanovrstev, resp. stupně zesíťování, expozicí v demi vodě při teplotě 37°C po dobu 70 hodin s následnou lyofilizací a stanovením hmotnostních změn, vyjadřujícími stupeň zesíťování a kontrolou SEM. Reprezentativní snímky vrstev připravovaných z obou typů kolagenu jsou uvedeny na Obr. 56.



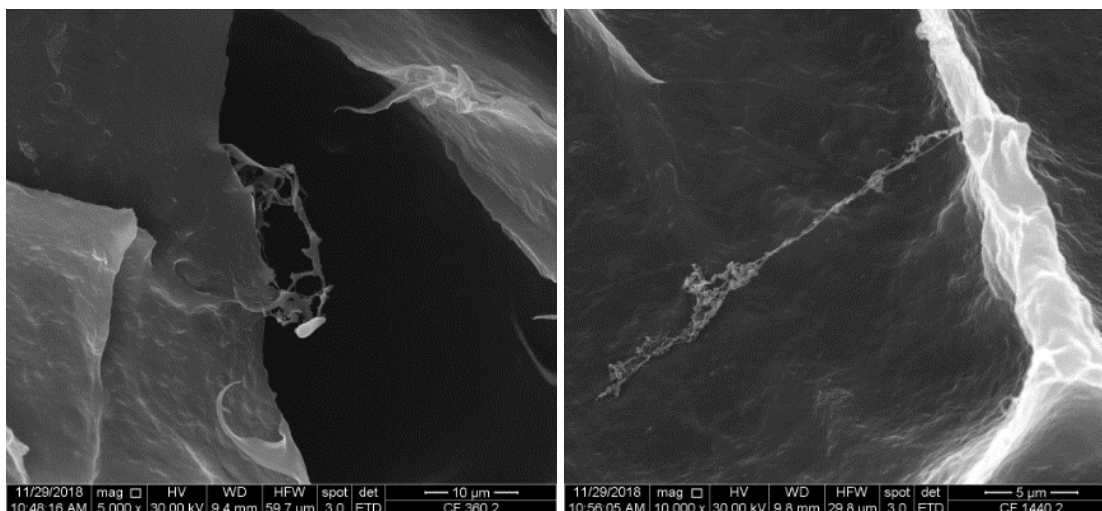
Obr. 56 Ukázka nanovláknenných vrstev elektrostaticky zvlákňovaných z roztoku kolagenu VUP Medical (vlevo, zvětšení 10 000x) a kolagenu izolovaného z rybí kůže (vpravo, zvětšení 5 000x).

Vrstvy zvlákňované z roztoku kolagenu izolovaného z rybí kůže často obsahovaly vláknennou strukturu, která byla z velké části zřejmě překrytá další vrstvou, ve které jsou vlákna propojena do strukturované nanovrstvy kompaktního materiálu. Ten může být tvořený rozpustnými nízkomolekulárními frakcemi kolagenu, které se nepodařilo zvláknit, nebo tukovými částicemi, anebo naopak vrstvou vláken, která se vlivem zpomalené síťovací reakce mohla vrátit do výchozího stavu. Viz viditelně vystupující vláknenná struktura na povrch (Obr. 56). Z prováděných experimentů vyplývá, že síťování vzorků z rybího kolagenu za podmínek 21°C proběhlo při kratších časových expozicích pouze do nízkého stupně. Teprve vzorky, které byly síťovány 360 a 1440 min. byly manipulovatelné a schopné dalšího hodnocení (Obr. 57).



Obr. 57 Ukázka nanovláknenných vrstev elektrostaticky zvláknňovaných z roztoků rybího kolagenu po dobu 360 minut (vlevo, zvětšení 5 000x) a 1440 minut (vpravo, zvětšení 10 000x).

Při následné expozici zesíťovaných kolagenových nanovrstev v demi vodě však dochází ke ztrátě nanovláknenné struktury. Výsledky těchto experimentů prokázaly, že síťovací reakce probíhá podstatně pomaleji a jelikož síťovací medium obsahuje vodu, byť ne ve velkém množství, je umožněno difuzním procesem media do kolagenové vrstvy destruovat vláknennou strukturu ještě nestabilizovaného kolagenu (Obr. 58).

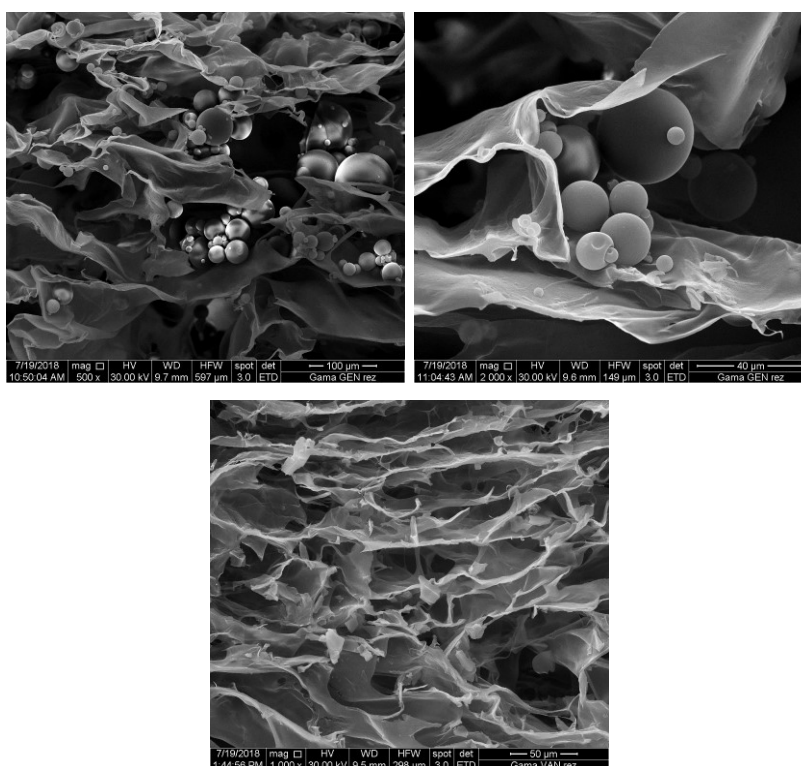


Obr. 58 Ukázka nanovláknenných vrstev z roztoků rybího kolagenu zesíťovaných po dobu 360 minut (vlevo, zvětšení 5 000x) a 1440 minut (vpravo, zvětšení 10 000x) po expozici v demi vodě (37 °C, 70 minut).

Nižší teplota síťování (21 °C) byla pro rybí kolagen zvolena z důvodů zamezení možné denaturace kolagenu vlivem vyšší teploty. Provedené experimenty však prokázaly, že nižší teplota není pro síťovací reakci dostatečná a také, že k destrukci vlákně struktury je náchylnější vlákně struktura rybího kolagenu než kolagenu telecího (VUP Medical). Vzhledem k tomu, že obsah pro reakci funkčních skupin COOH a NH₂ je dle analýzy rybího a telecího kolagenu z pohledu mol.% (AMK) obdobný (kyselina asparagová: ryba 5,34 - tele 5,3; kyselina glutamová: ryba 7,76 - tele 8,38; lysin: ryba 3,01 - tele 3,07), hlavní rozdíl mezi oběma sledovanými nanovrstvami bude z hlediska jejich složení pravděpodobně v podstatně vyšším obsahu tuků, zbytků proteoglykanů, glykosaminů a glukosaminů v konkrétním rybím kolagenu než v telecím. Tyto látky vzhledem ke svým fyzikálním vlastnostem určitě ovlivňují průběh síťování. Jejich selektivní separace je komplikovaná. Tuky lze odstranit poměrně jednoduše extrakcí v rozpouštědlech, ale již při této operaci není jisté, zda rozpouštědlo nedenaturuje kolagenový podíl. V rámci experimentu byla tedy dále provedena extrakce vzorků obou vrstev v dichlormetanu (extrakce tuků) a stanoveno, že rybí nanovrstva obsahuje téměř 16 % hmotn. tuků, zatímco v telecí nanovrstvě nebyl nalezen žádný tuk, resp. látka rozpouštějící se v tomto rozpouštědle. Právě tuky mohou, zvláště z počátku reakce blokovat reaktivní skupiny COO⁻ v karboxylových skupinách a nakonec i v následné fázi -NH₂ skupinu v lysinu. Na závěr lze shrnout, že příčinou dosažení nízkého stupně zesíťování u rybí nanovrstvy je nižší teplota expozice, jejímž důsledkem je zpomalení síťovací reakce, a dále zřejmě i nižší koncentrace AMK v nanovrstvě v důsledku vyššího obsahu nekolagenních zbytků. Zpomalením fixace polypeptidických řetězců příčnými vazbami dochází k devastaci nanovláken síťovacím médiem obsahujícím vodu. Přítomnost vody je však důležitá, aby síťovací reakce systému EDC/NHS kvantitativně probíhala.

8.3 VLIV STAVBY PĚN NA UVOLŇOVÁNÍ ANTIBIOTIK A DEGRADACI

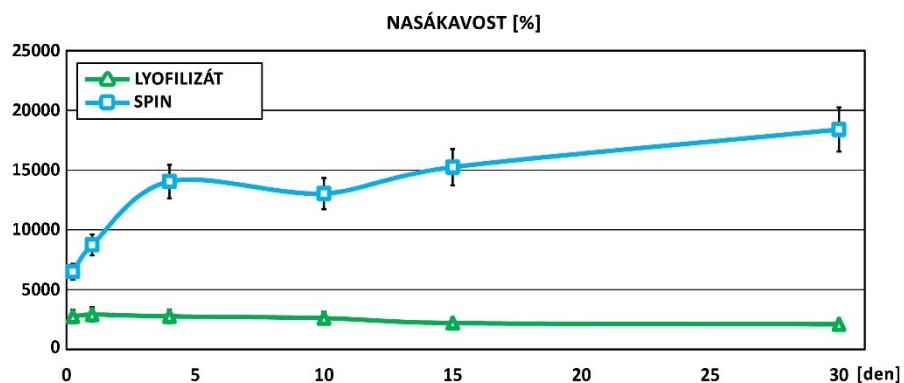
Pro ověření antibiotické účinnosti byly dále prováděny experimenty s navázáním různých druhů antibiotik na kolagenové pěny, jmenovitě za použití gentamicinu, vankomycinu a rifampicinu aplikovaných impregnací z roztoků na bázi alkoholů. Po impregnaci a opětovné lyofilizaci byly pěny charakterizovány pomocí infračervené spektroskopie, obrazové analýzy a jejich vnitřní struktura byla také analyzována pomocí mikro-CT (hodnocenými parametry byly otevřená a uzavřená porozita, velikost pórů). (Jířík M, et al., 2018) Ukázka připravených kolagenových pěn s antibiotiky je na Obr. 59.



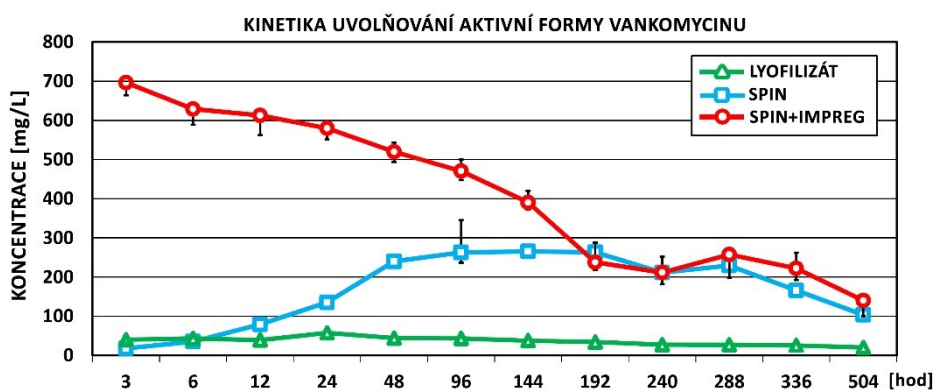
Obr. 59 Ukázka kolagenových pěn po impregnaci gentamicinem (vlevo a uprostřed) a vankomycinem.

Kinetiku uvolňování antibiotik navržených pěn, podobně jako rychlost jejich degradace, lze programovat dobou zesílení kolagenové složky ale také velmi efektivně volbou konstrukce (pěna, sendvič, kompozit) a objemovým zastoupením jejich jednotlivých složek (tuhé jádro a porézní okraj, množství nanovláknenných vrstev). Kombinace jednotlivých složek, které jsou mikro nebo nano strukturované, zásadně ovlivňuje míru nasákavosti pěn. Množství tekutiny, kterou pěna dokáže pojmout, stejně jako její různá permeabilita pak ovlivňuje kinetiku uvolňování antibiotik. Jednoduché srovnání nasákavosti dvou kolagenových forem, je znázorněno na Obr. 60. Různá výsledná kinetika uvolňování antibiotik, jmenovitě aktivní formy vankomycinu, je pak ilustrována na Obr. 61. Impregnovaná pěna (lyofilizát) vykazuje pozvolné uvolňování antibiotik. Pokud se stejný materiál, tedy kolagen v roztoku s antibiotiky přímo zvlákni, potom takto připravený materiál díky svému velkému specifickému povrchu, vykazuje násobně vyšší uvolňování antibiotik s pomalejším nástupem. Pokud je nanovláknenný materiál po zesílení antibiotiky impregnovaný, je možné dosáhnout okamžitých vysokých lokálních

koncentrací antibiotik s dlouhodobým účinkem nad minimální inhibiční koncentrací. Díky kombinaci těchto jednotlivých složek je možné nastavit, neboli naprogramovat způsob a míru působení antibiotik.



Obr. 60 Ukázka různé míry nasákavosti kolagenové pěny připravené z 8 % hmotn. disperze (lyofilizát) a elektrostaticky zvlákněné kolagenové vrstvy tvořené nanovláknky.



Obr. 61 Ukázka kinetiky uvolňování aktivní formy vankomycinu z kolagenového materiálu připraveného jako pěna (LYOFILIZÁT) nebo jako nanovláknka (SPIN) a nanovláknka dodatečně impregnovaná antibiotiky (SPIN+IMPREG).

9 OVĚŘOVÁNÍ DEPOTIZAČNÍCH VLASTNOSTÍ A UVOLŇOVÁNÍ ANTIBIOTIK ZE ZESÍŤOVAÉHO KOLAGENU PŘIPRAVENÉHO METODOU DVOJÍ LYOFILIZACE – IN VITRO EXPERIMENTY

Pro finální testování depotizace a *in vivo* pokusy byly zvoleny houbičky s gentamicinem a vankomycinem, vzhledem k omezenému spektru účinku nitrofurantoinu na běžné patogeny pooperačních ran.

9.1 Testy s finálními produkty hemostatických kolagenních pěn z rybího kolagenu s depotizovaným gentamicinem

Byly použity zesíťované (CLCS) a nezesíťované (nCLCS) kolagenní houbičky sycené gentamicinem. Síťované houbičky byly vyrobeny metodou „dvojí lyofilizace“, která spočívá v zesíťení kolagenu karbodiimidem a lyofilizaci a následné impregnaci vzniklého produktu roztokem antibiotika a opětovné lyofilizaci. Na plochu 4x4 cm bylo použito 21 mg gentamicinu, výsledná koncentrace na plochu však byla vyšší vlivem mírného sražení kolagenních houbiček vlivem lyofilizace. Pro kontrolní pokus byl použit referenční produkt Garamycin SCHWAMM®, který byl popsán výše.

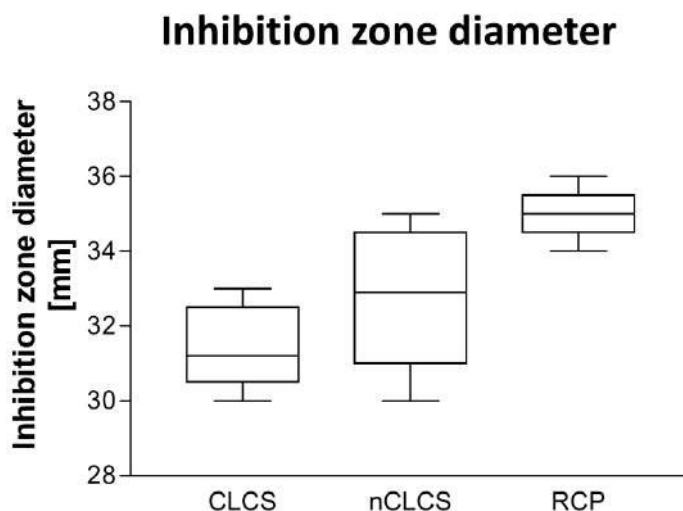
9.1.1 Diskové difusní testy s kolagenními houbičkami vyrobenými kolyofilisací s gentamicinem:

Metodika:

Pro zjištění efektivity houbiček jako nosiče antibiotik byly použity standardní mikrobiologické metody (diskové difuzní testy) s bakterií *Pseudomonas aeruginosa* (kmen CNCTC 5482).

Na Petriho misky byla standardním způsobem rozočkováána souvislá vrstva bakterií, po 24 hodinách byly přiloženy disky o průměru 6 mm vystřížené z houbiček a po dalších 24 hodinách byla odečtena velikost inhibiční zóny. Bylo odebráno 5 vzorků z různých míst na ploše Garamycinu, 5 vzorků z pěti zesíťovaných houbiček a 5 vzorků z pěti nezesíťovaných houbiček.

Výsledky:



Obr. 62 Srovnání inhibičních zón u houbiček ze zesíťovaného kolagenu (CLSC), nezesíťovaného kolagenu (nCLCS) a u Garamycinu® (RCP).

Na obrázku 62 je vidět velice podobné rozměry inhibičních zón pro referenční produkt (RCP), síťované (CLCS) a nesíťované (nCLCS) houbičky AV ČR.

Závěr (diskové difuzní testy):

Výsledky diskových difuzních testů (obr. 43 a 44) ukazují ve všech případech velké inhibiční zóny. Rozdíly mezi jednotlivými testovanými vzorky byly sice statisticky signifikantní, nicméně malé a vs. klinicky nevýznamné. Použité testy pouze potvrzují, že gentamicin se z houbiček uvolňuje v efektivním baktericidním množství, nejsou však určeny k porovnávání produktů mezi sebou.

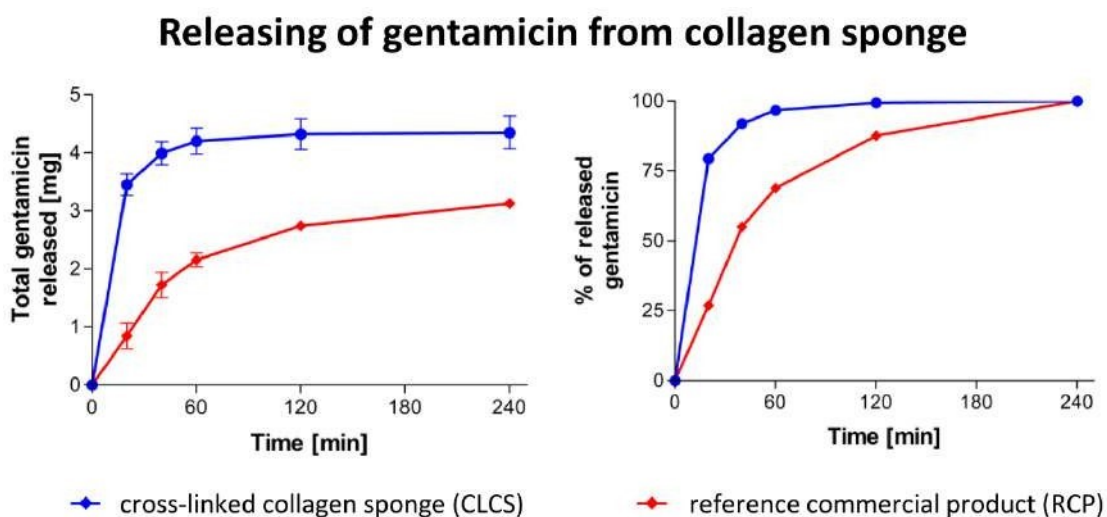
9.1.2 Uvolňování gentamicinu v čase

Nezesíťovaný kolagen nebyl dále testován pro své horší mechanické vlastnosti, které by bránily klinickému využití (vysoká rozpustnost a nízká stabilita houbiček ve vodném prostředí – vzorek NC-GEN, při laboratorní práci se výsledky potvrdily, kolagenní pěna se v průběhu pokusů rozpouštěla). Bylo odebráno celkem 5 vzorků 1x2 cm ze tří různých síťovaných houbiček (3 kousky z jedné zesíťované houbičky a dva z dalších dvou houbiček) a 4 kousky z referenčního produktu Garamycin Schwamm (viz obrázek č. 1). Uvedený výběr vzorků umožnil testovat stejnoměrnost jak mezi houbičkami, tak rovnoměrnost obsahu gentamicinu v jedné houbičce.

Metodika:

1. Vzorky byly ponořeny ve zkumavkách do 10 mL PBS a inkubovány na třepačce při 37°C.
2. Po 20, 40, 60, 120 a 240 min. byly vzorky opakovaně přeneseny do nového PBS a inkubovány.
3. Obsah gentamicinu v roztocích, do kterých se louhoval z houbiček, byl stanoven nefelometricky imunochemickou metodou (Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA) v biochemické laboratoři ULBLD VFN.

Výsledky:



Obr. 63 Srovnání uvolňování gentamicinu ze síťovaného kolagenu (CLCS) a z Garamycinu® (RCP).

Ze zesíťovaných houbiček AV ČR (CLCS) bylo 90 % gentamicinu vyplaveno v prvních 40 minutách, zatímco z komerčního produktu (Garamycin®) bylo uvolněno v prvních 40 minutách cca 50 % gentamicinu a následně dalších 50 % za cca 200 minut (obr. 63).

Závěr (testy depotizace a uvolňování gentamicinu):

Z kolagenu (CLCS) došlo k uvolnění gentamicinu o něco rychleji, než z přípravku Garamycin®. Tento rozdíl v depotizaci gentamicinu je s největší pravděpodobností klinicky nevýznamný. Depotizační schopnosti síťovaného i nesíťovaného kolagenu pro malé molekuly léčiv jsou zanedbatelné a pro klinické využití kolagenních houbiček jako krytí ran jsou klinicky nepodstatné. V současnosti jediný komerční produkt využívající kombinaci kolagenu a gentamicinu (Garamycin SCHWAMM®) vykazuje minimální depotizaci.

Kolagenní houbička má sloužit pro rychlé dosažení lokální koncentrace gentamicinu v ráně, která budemnohokrát přesahovat MIC patogenu a následně po vymytí gentamicinu z rány (v závislosti na prokrvení) se uplatní postantibiotický efekt aminoglykosidu.

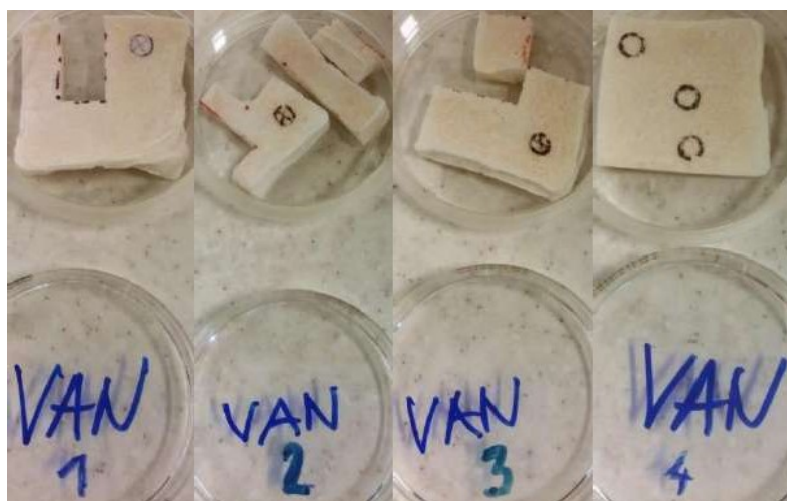
9.2 Testy s finálními produkty hemostatických kolagenních pěn z rybího kolagenu s depotizovaným vankomycinem

Houbičky byly připraveny výše popsanou metodou „dvojitá lyofilizace“. Na 125 mg kolagenu lyofilizované houbičky bylo použito 100 mg vankomycinu s tím, že průměrná hmotnost impregnovaných houbiček byla přibližně 150 mg a průměrná plocha 16 cm². V každé houbičce s touto plochou a hmotností je tedy 120 mg vankomycinu.

9.3 Diskové difusní testy s kolagenními houbičkami vyrobenými kolyofilizací s vankomycinem

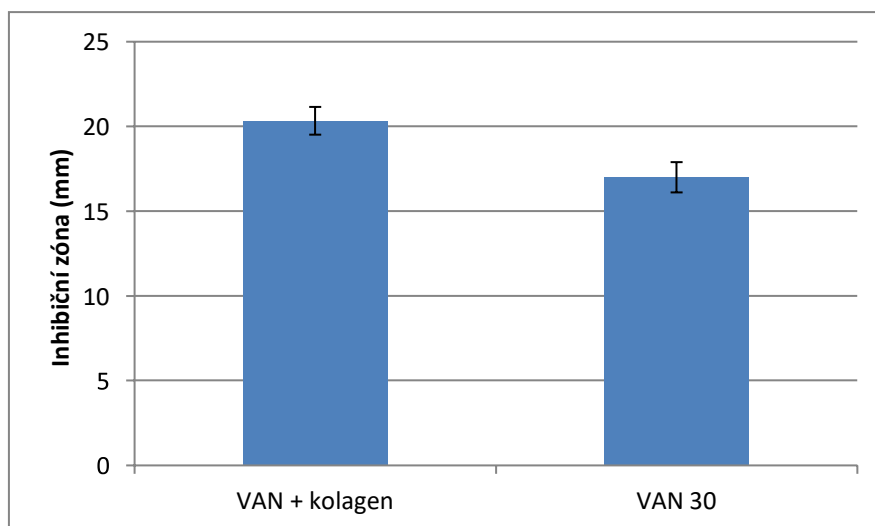
Pro zjištění efektivity houbiček jako nosiče antibiotik byly použity standardní mikrobiologické metody (diskové difuzní testy). Byly použity bakterie *Staphylococcus aureus* rezistentní k meticilinu (MRSA). Na Petriho misky byla standardním způsobem rozočkována souvislá vrstva bakterií, po 24 hodinách byly přiloženy disky o průměru 6

mm vystřížené z houbiček a po dalších 24 hodinách byla odečtena velikost inhibiční zóny. Bylo odebráno 6 disků s průměrem 6 mm. 3x ze tří různých houbiček a 3x jedné houbičky (střed, okraj prostředek a okraj u rohu) – viz obr. 64. Jako kontrola byly použity standardní disky pro testování citlivosti na vankomycin.



Obr. 64 Naznačení odběrů disků, které byly použity pro diskové difuzní testy. Houbičky VAN1-3 byly rovněž použity pro testy uvolňování vankomycinu v čase.

Výsledek:



Obr. 65 Srovnání inhibičních zón u houbiček ze zesíťovaného kolagenu + vankomycin (VAN + kolagen), a u standardních disků používaných pro diskové difuzní testy.

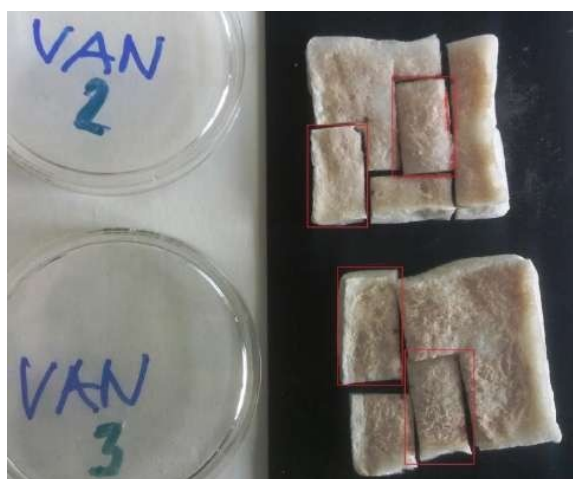
Inhibiční zóny byly o něco větší, než u standardních disků s vankomycinem (obr. 65), což potvrzuje, že se vankomycin z houbiček uvolňuje v dostatečném baktericidním množství. Malý rozptyl velikostí inhibičních zón (malé SD křivky) potvrzuje, že jak mezi houbičkami, tak mezi jednotlivými místy u jedné houbičky je obsah vankomycinu podobný.

Závěr (diskové difuzní testy):

Vankomycin se z houbiček uvolňuje a působí baktericidně. Obsah vankomycinu v houpičkách je rovnoměrný.

9.3.1 Uvolňování vankomycinu v čase

Byly odebrány vzorky ze dvou houpiček (viz obr. 66):

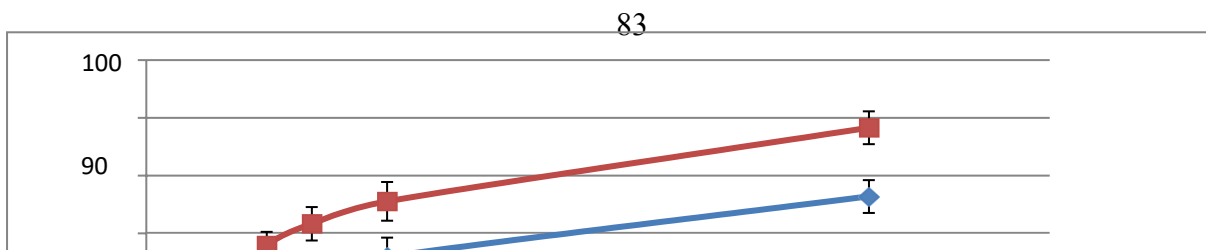


Obr 66 Odběry vzorků z houpiček s vankomycinem (z každé houpičky byl odebrán vzorek z okraje a ze středu). Místa odběrů jsou vyznačena červeným obdélníkem.

Metodika:

10 mL PBS bylo inkubováno na třepačce při 37°C. Vzorky byly opakovaně přeneseny do nového PBS a opětovně inkubovány. Přenesení do nového média proběhlo v čase 30, 60, 120, 180, 240, 330, 480 min a 24 hodin, poslední výměna byla za 7 dní (6 dní od poslední výměny za 24 hodin). Ve vyluzích byla nefelometricky imunochemickou metodou (Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA) stanovena koncentrace vankomycinu.

Výsledky:



Obr. 67 Uvolňování vankomycinu – rozdíl mezi houbičkami.

Byl zaznamenán mírný rozdíl v obsahu vankomycinu mezi houbičkami (obr. 67). V případě převedení do klinické praxe je třeba pečlivě standardizovat výrobní postup a charakterizovat obsah vankomycinu v houbičkách. Po sedmi dnech (nejdelší provedený pokus) byly vzorky kompaktní, podobně jako vzorky výše testovaného Garamycinu[®], což je dobrý předpoklad pro použití v klinické praxi (obr. 68):



Obr. 68 Vzorek houbičky s vankomycinem 1 x 2 cm, který se louhoval 7 dní v PBS při 37° C.

Závěr (testy depotizace a uvolňování vankomycinu):

Byl vytvořen produkt, který efektivně uvolňuje baktericidní koncentrace vankomycinu v místě aplikace. Depotizace vankomycinu je minimální, což ovšem není jednoznačnou

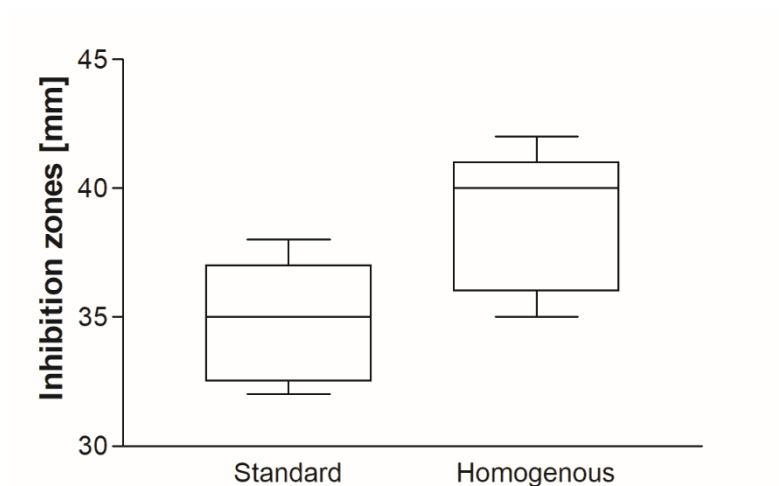
nevýhodou pro klinické použití, neboť dostupné již používané kolagenní produkty s antibiotiky (Garamycin®) rovněž antibiotika nedeponují. Produkt má výbornou stabilitu v *in vitro* testech, nedochází k rozpouštění zesíťovaného kolagenu, což propůjčuje produktu dobré vlastnosti pro využití v klinické praxi. Ve srovnání s houbičkami s gentamicinem, kde se uvolnilo za 20 min 80 % antibiotika je vankomycin lépe vázán. Za 30 min se uvolní cca 40 %, do osmi hodin cca 65-75%. Tomu by měly být přizpůsobeny i odběry krve potkanů při *in vivo* zkouškách.

9.4 Testy s finálními produkty hemostatických kolagenních pěn z rybího kolagenu s depotizovaným rifampicinem

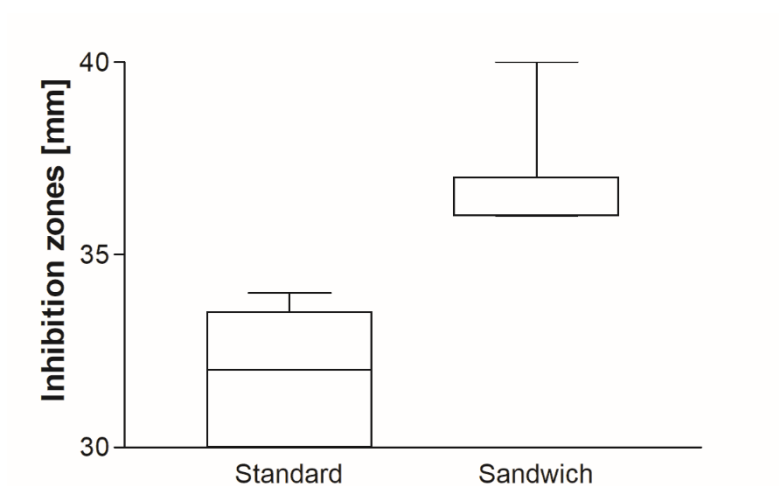
Pro ověření mikrobiologické účinnosti rifampicinu vázaného v houbičkách byly provedeny diskové difuzní testy podle výše popsané metodiky. Mikrobiologická odpověď byla testována standardní metodou diskového difuzního testu proti komerčně dodávanému disku s rifampicinem. Testovaný kmen byl *Staphylococcus aureus* CNCTC 6271 (MRSA), suspenze 0,5 McF. Byly testovány homogenní kolagenní pěny a sendvičová struktura s porézními vrstvami na povrchu a denzní vrstvou uvnitř.

9.4.1 Diskové difuzní testy s kolagenními houbičkami vyrobenými kolyofilizací s rifampicinem:

Průměrná hodnota velikosti inhibičních zón standardních disků byla 34.89 ± 0.7349 mm. U testovaných disků houbiček z *homogenní* kolagenní pěny byla průměrná hodnota velikosti inhibičních zón 38.89 ± 0.8889 mm (viz obr. 69). Výsledek byl statisticky signifikantní ($p = 0,0032$). Porovnání inhibičních zón standardu a testovaných disků jednotlivých houbiček sendvičové struktury je uvedeno na obr. 65. Průměrná hodnota velikosti inhibičních zón standardu je 32.00 ± 0.5528 mm. U testovaných disků z houbiček sendvičové struktury byla průměrná hodnota velikosti inhibičních zón 37.00 ± 0.4082 mm (obr 70). Výsledek byl statisticky signifikantní ($p < 0,0001$). Těmito testy bylo mj. ověřeno, že po zpracování kolagenních houbiček zesíťováním, impregnací rifampicinem a lyofilizací s následnou sterilizací gama zářením byl v houbičkách zachován mikrobiologicky aktivní rifampicin.



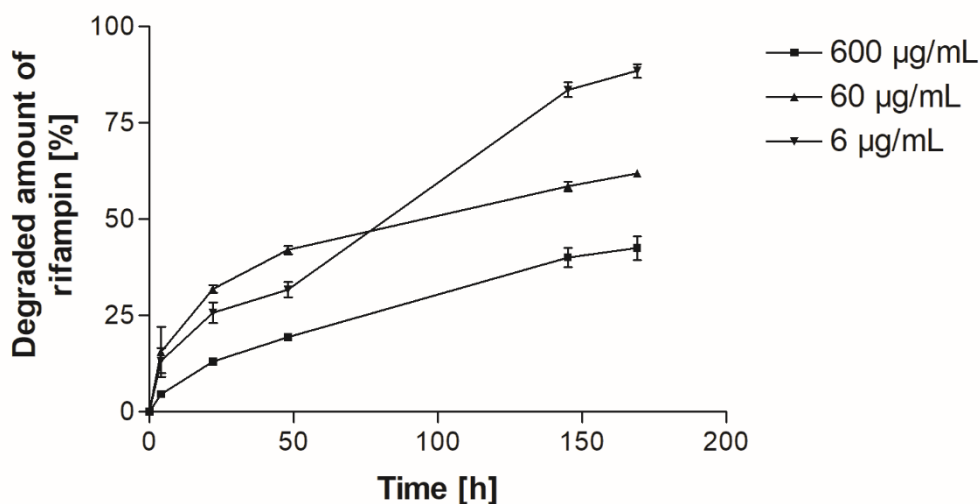
Obr. 69 Porovnání inhibičních zón disků z houbiček z homogenní kolagenní pěny a standardu ($p = 0,0032$).



Obr. 70 Porovnání inhibičních zón disků z houbiček ze sendvičové kolagenní pěny a standardu ($p < 0,0001$).

9.4.2 STABILITNÍ TESTY RIFAMPICINU

V literatuře byla popsána omezená stabilita rifampicinu při 37°C (Pearson SD, Trissel LA, 1993). Na druhé straně bylo prokázáno, že rifampicin aplikován lokálně do rány při operaci hernie efektivně snižoval výskyt pooperačních infekčních komplikací (Kahramanca S, et al., 2013). Pro ověření stability rifampicinu při fyziologických podmínkách byl proveden experiment, kdy byl vytvořen roztok rifampicinu v PBS (phosphate buffered saline) a následně sledován pokles koncentrace v tomto roztoku, který byl inkubován při 37 °C. Pro testy stability byly vytvořeny roztoky rifampicinu v PBS o koncentracích 600 µg/mL, 60 µg/mL a 6 µg/mL. Tyto roztoky byly inkubovány v temnotě při 37 °C. V časech **0, 4 a 24 hodin a 2, 6 a 7 dní** byly odebírány vzorky na stanovení koncentrace rifampicinu. Postup degradace rifampicinu (procentuální úbytek z původní koncentrace) je znázorněn na obr. 71.



Obr. 71 degradace rifampicinu (procentuální úbytek z původní koncentrace). Byly testovány 3 výchozí koncentrace (600 µg/mL, 60 µg/mL a 6 µg/mL). Procentuální vyjádření poklesu koncentrace rifampicinu v jednotlivých odběrech je uvedeno v tabulce 2.

Koncentrace/čas	0	4 h	24 h	2 dny	6 dní	7 dní
600 µg/mL	0.0	4.7	13.1	19.4	40.1	42.5

60 µg/mL	0.0	15.6	31.9	42.0	58.5	61.9
6 µg/mL	0.0	13.3	25.7	31.7	83.6	88.5

Tabulka 2 Procentuální úbytek koncentrace rifampicinu v roztoku PBS při inkubaci v 37 °C v čase.

Přestože je rifampicin zkoumán jako antibiotikum potenciálně snižující výskyt infekcí v operačních rázech (Kahramanca S, et al., 2013), jeho stabilita ve fyziologických podmínkách (roztok v PBS, 37°C, temnota) je poměrně nízká (Tabulka 2). Za 4 hodiny se rozpadá až 15 % rifampicinu, za dva dny 20-40 % a za 7 dní 40-90 %. To odpovídá i dříve prováděným stabilitním studiím (Pearson SD, Trissel LA, 1993). Je třeba počítat s touto omezenou stabilitou při vytváření kolagenního krytí pro pooperační rány – nemá smysl zpomalovat uvolňování na více, než cca 2 dny.

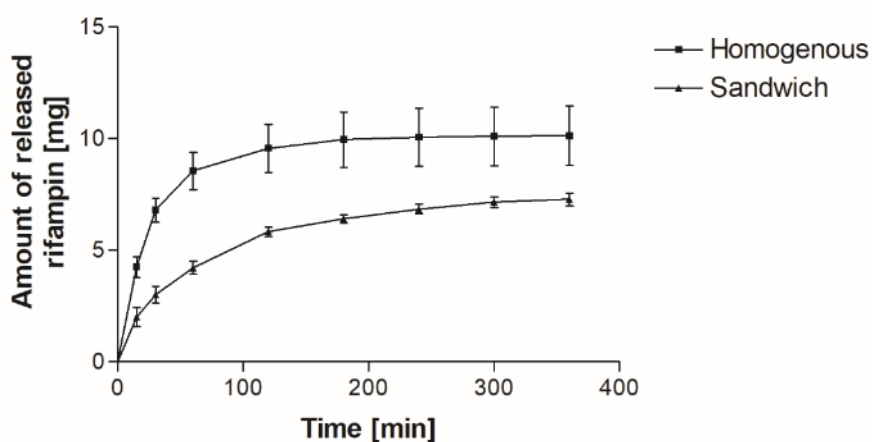
9.4.3 IN VITRO UVOLŇOVÁNÍ RIFAMPICINU Z HOUBIČEK

Za účelem zjištění kinetiky uvolňování rifampicinu byly ze tří houbiček homogenní kolagenní pěny a ze tří houbiček sandwichové struktury získány vzorky o velikosti 2x1 cm. Z každé houbičky byly získány 2 vzorky a to z okraje a ze středu. Tyto vzorky byly opakovaně přenášeny do 20 mL PBS a inkubovány na třepačce při 37 °C. Přenesení do nového média bylo uskutečněno v časových intervalech **15, 30, 60, 120, 180, 240, 360 min a 24 hodin, poslední vzorek byl odebrán za 8 dní (7 dní od výměny za 24 hodin)**. Vzorky byly uchovány při -80 °C a následně analyzovány pomocí HPLC zavedené na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty UK speciálně za účelem tohoto projektu.

Homogenní kolagenní houbičky s rifampicinem. Množství uvolněného rifampicinu bylo značně variabilní a obsah rifampicinu je závislý na váze vzorku, která neodpovídá jeho ploše (váha, nikoliv plocha vzorku koreluje s obsahem rifampicinu). V plánovaných *in vivo* pokusech s implantací houbičky potkanům do podkoží tedy nelze aplikovat dávku odměřenou podle plochy houbičky, je třeba postupovat gravimetricky. Pro p. o. podání rifampicinu potkanům byla v literatuře nejčastěji použita dávka 25 mg/kg 2x denně (Brinkman CL, et al., 2015, Vergidis P, et al 2015). Bylo zjištěno, že 100 mg houbičky z homogenní kolagenní pěny obsahuje 30,5 mg rifampicinu. Pro dávkování 25 mg/kg byl odvozen vzorec: $\text{váha potkana (kg)} * 0,082 = \text{váha houbičky v mg}$

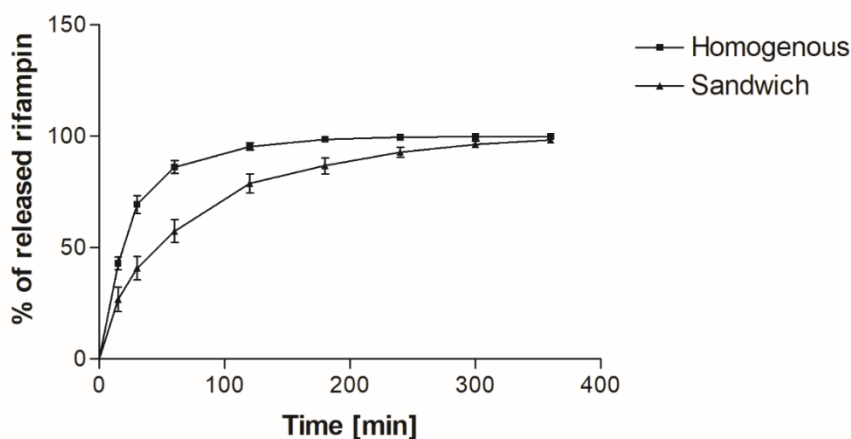
Sendvičové kolagenní houbičky s rifampicinem. Obsah rifampicinu v jednotlivých vzorcích byl relativně homogenní. Bylo zjištěno, že 100 mg houbičky sandwichové struktury obsahuje 17,3 mg rifampicinu. Pro dávkování 25 mg/kg byl odvozen vzorec: $\text{váha potkana (kg)} * 0,145 = \text{váha houbičky v mg}$

Množství rifampicinu v sendvičových houbičkách bylo výrazně menší, než v houbičkách z homogenní kolagenní pěny (17,3 % w/w oproti 30,5 % w/w). Obr. 72 a 73 znázorňuje kinetiku uvolňování rifampicinu z obou typů houbiček.



Obrázek 72 Porovnání množství uvolněného rifampicinu z homogenní kolagenní pěny (Homogenous) a z houbiček sendvičové struktury (Sandwich).

Množství uvolněného rifampicinu po šesti hodinách již bylo pod detekčním limitem u všech vzorků homogenní pěny a dosahovalo hodnot 0-0,3 mg pro sandwichové struktury. Obrázek 73 znázorňuje procenta uvolněného rifampicinu za prvních 6 hodin. Celkové množství rifampicinu uvolněné za 24 hodin považováno za 100 %.



Obrázek 73 Procentuálně znázorněné uvolňování rifampicinu z homogenní kolagenní pěny (Homogenous) a z houbiček sendvičové struktury (Sandwich). Celkové množství uvolněné za 24 hodin (9 výměn) je považováno za 100 %.

Na základě porovnání kinetiky eluce rifampicinu na obr. 73 je vidět, že v případě sandwichové struktury došlo k mírnému zpomalení uvolňování rifampicinu. Tento rozdíl však je pravděpodobně klinicky nevýznamný.

Závěrem lze shrnout, že bylo zjištěno, že kolagenní houbičky sandwichové struktury mírně zpomalují uvolňování rifampicinu. Byly odvozeny vzorce, na základě kterých byla určována velikost houbiček implantovaných potkanům v *in vivo* pokusech.

9.5 SHRNUTÍ IN VITRO EXPERIMENTŮ

Byl navržen způsob přípravy kolagenových lyofilizátů pro aplikace formou hemostatického krytí antibiotiky. Volbou parametrů přípravy byla optimalizována jejich vnitřní struktura, a to zejména pohledu otevřené porozity s vhodně velikými póry a byla optimalizována míra jejich degradace. Optimalizovaný způsob přípravy byl aplikován při přípravě lyofilizátů s několika druhy antibiotik, jmenovitě vankomycinem a gentamicinem. Všechny materiály byly podrobeny degradačním testům, současně byl průběžně vyšetřován vliv jednotlivých kroků přípravy na zachování sekundární struktury kolagenu. Byla ověřena jejich depotizační schopnost, která je srovnatelná s komerčně vyráběnými a klinicky využívanými produkty z equinního kolagenu a bylo potvrzeno efektivní uvolňování antibiotik v baktericidních koncentracích pomocí diskových difuzních testů.

10 Testování biologických vlastností kolagenních pěn z rybího kolagenu - In vivo experimenty

10.1 Gentamicin

Byl proveden pokus na potkanech, kterým byla vyvolána infekce *Pseudomonas aeruginosa* (kmen CNCTC 5482) aplikací inokula do kožní kapsy. Tato infikovaná podkožní kapsa byla následně léčena aplikací zesíťované kolagenní houbičky (CLCS) s gentamicinem, připravené AV ČR (přesná charakteristika viz výše). Celkem byly vytvořeny 3. skupiny zvířat – viz tabulka 3. V rámci experimentu byl sledován klinický stav, hladiny gentamicinu, markery zánětu (haptoglobin – u krys nelze použít CRP) a po ukončení experimentu množství CFU *Pseudomonas aeruginosa* v biopsii odebrané z místa inokulace.

A	Skupina s aktivní houbičkou (gentamicin) <i>12 zvířat</i>	Dva řezy na zádech inokulum + houbička s gentamicinem pouze inokulum (kontrola systémového účinku vstřebaného gentamicinu)
B	Skupina bez atb. <i>6 zvířat</i>	Dva řezy na zádech inokulum + houbička bez gentamicinu pouze inokulum
C	Aktivní kontrola s i. m. gentamicinem <i>6 zvířat</i>	Dva řezy na zádech inokulum + houbička bez gentamicinu pouze inokulum <i>Gentamicin byl aplikován se aplikoval i. m.</i>

Tabulka 3. Testované skupiny zvířat v pokusu s gentamicinem.

Skupiny byly navrženy tak, aby byl zjištěn vliv systémového vstřebání/podání atb. a odlišen od vlivu samotné houbičky.

10.1.1 Metodika:

Inokulace a aplikace houbiček:

Inokulace a aplikace houbiček/roztoku s gentamicinem. Zvířata byla uspána isofluranem. Chlupy na zádech byly oholeny pomocí depilačního krému. U zvířat byla na kraniální části zad na pravé i na levé straně od páteře chirurgicky vypreparována subkutánní kapsa řezem o délce cca 1 cm. Do kapsy bylo pomocí tuberkulinové injekční stříkačky aplikováno **0,5 mL fyziologického roztoku osahujícího *Pseudomonas aeruginosa* v koncentraci 2×10^7 CFU/mL (jednodenní bujón/5)**. Dále byla implantována 1 cm² sterilní houbička (skupina A s gentamicinem, skupina B a C bez gentamicinu). Kapsa byla uzavřena polypropylenovými stehy. Na levé straně zad bylo aplikováno stejné množství roztoku s *Pseudomonas aeruginosa* jako kontrola systémového efektu vstřebaného gentamicinu. Pro aplikaci ve skupině A byly houbičky nastříhány na rozměr 1x1 cm. Podle pokusů s uvolňováním gentamicinu jsou ve vzorku o rozměru 1 cm² obsaženy 2 mg gentamicinu. Ve skupině C bylo aplikováno 2 mg gentamicinu intramuskulárně.

Odběry krve pro farmakokinetickou studii a měření markerů zánětu (haptoglobin):

Pro farmakokinetickou studii a monitorování zánětu byly provedeny odběry krve na stanovení plazmatických hladin gentamicinu a haptoglobinu (marker akutní fáze u potkanů) z jugulární žíly v časech:

- 1 hodina (3 zvířata ze skupiny A a 2 ze skupiny C)
- 2 hodiny (3 zvířata ze skupiny A a 2 ze skupiny C)
- 4 hodiny (3 zvířata ze skupiny A a 2 ze skupiny C)
- 1. den byla rovněž v čase 1-4 hodiny odebrána všechna zvířata ze skupiny B (pro zjištění baseline hladiny haptoglobinu)
- 2. den (3 zvířata ze skupiny A) + 3 zvířata ze skupin B a C

Postup odběrů krve. Zvířata byla uspána isofluranem. Do heparinem vymyté eppendorfky byla odebrána krev heparinem promytou jehlou a stříkačkou. Následně byl vzorek stočen

(2500 otáček, 8 min). Následně bylo odebráno 300 mikrolitrů plasmy a naředěno pomocí 300 mikrolitrů FR na 50 % pro dosažení objemu 500 μ L (z důvodu mrtvého objemu při strojovém odběru vzorků při analýze). Analýza byla provedena v biochemické laboratoři VFN nefelometrickou imunochemickou metodou (Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA). Byl použit dostupný kit na lidský haptoglobin (beta podjednotka krysího haptoglobinu má 80 % homologii s lidským haptoglobinem). Po inokulaci a odběrech krve byla zvířata vrácena do individuálních klecí.

Utrácení zvířat a konečné zhodnocení:

Všetchna zvířata ze skupiny A, B i C, která přežila byla utracena 4. pooperační den. Zvířata byla utracena předávkováním anestézie – aplikováno 50 mg tiopentalu (0,5 mL roztoku o koncentraci 100 mg/mL) intraperitoneálně.

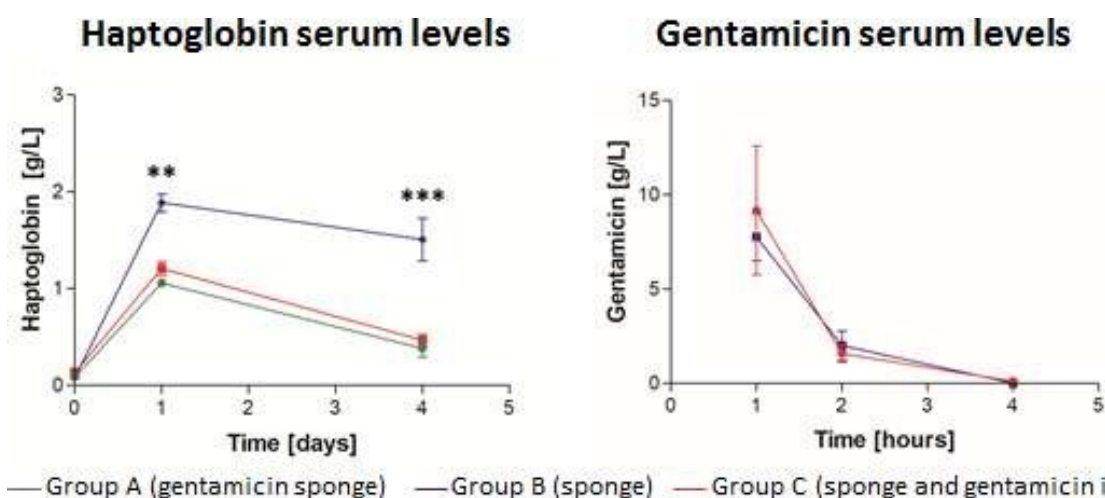
Při terminaci byly provedeny následující odběry:

- Intrakardiálně bylo odebráno větší množství krve do sérové zkumavky (červená s induktory srážení) na zjištění hladiny gentamicinu a haptoglobinu.
- Byl odebrán větší vzorek tkáně z obou míst inokula – vystříhány svaly i kůže, která předtím byla oholena. Vzorek byl předán do sterilní zkumavky a označen číslem zvířete a písmenem L či P podle toho, ze které strany byl odebrán (P je s houbičkami). Do hodiny od odběru byly vzorky předány na pracoviště mikrobiologie za účelem zpracování jako klasickou biopsií, tedy otřít na Petriho misce a následně kultivovat.

10.1.2 Výsledky

Laboratorní hodnoty (gentamicin, haptoglobin):

Byly zaznamenány mírně vyšší koncentrace po SC podání (houbičky), než po IM podání (obrázek 74). Poločas gentamicinu po s. c. aplikaci pomocí houbičky je 51 min., poločas po i. m. podání je 40 min., což přibližně odpovídá literárním údajům o farmakokinetice gentamicinu u malých laboratorních zvířat. Potkani skupiny B – tedy bez ATB vykazovali 2. a 4. den významně vyšší hladiny haptoglobinu, než skupina A (houbička) a C (i. m. gentamicin). Markery zánětu skupin A a C nabývaly téměř totožných hodnot. Hodnoty haptoglobinu odpovídaly klinickému vývoji i když se nepohybují mimo rozhraní referencí pro lidský haptoglobin (obrázek 74).



Obr. 74 Hladiny haptoglobinu a gentamicinu u testovaných skupin potkanů infikovaných *Pseudomonasaeruginosa*. A – houbička s gentamicinem; B – bez antibiotik; C – intramuskulární gentamicin. (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Klinický obraz:

Váha potkanů: potkani bez antibiotik výrazně neprospívali a ztratili na váze, zatímco v ostatních skupinách potkani přibírali na váze (tabulka 4).

Skupina	Počátek experimentu	Konec experimentu (4. denpo inokulaci)	Změna
A (houbička s gentamicinem)	248,1 ± 11,39 g (N=12)	269,3 ± 9,01 g (N=12)	+ 8,5 %
B (sine gentamicin)	248,7 ± 7,58 g (N=6)	218,3 ± 16,88 g (N=4)	- 12,2 %
C (gentamicin i. m.)	250,5 ± 12,14 g (N=6)	271,8 ± 15,17 g (N=6)	+ 8,5 %

Tab. 4 Váha potkanů v jednotlivých skupinách na počátku experimentu a na konci experimentu.

1. den po inokulaci byla měřena teplota potkanům per rectum (tabulka 5). Potkani bez atb. mělistatisticky významně (t-test) vyšší TT, než potkani s atb.

Skupina	Tělesná teplota per rectum 1. den po inokulaci
A (houbička s gentamicinem)	36,7 ± 0,9 °C (N=12)
B (bez gentamicinu)	38,2 ± 0,8 °C (N=6)
C (gentamicin i.m.)	36,4 ± 0,8 °C (N=6)

Tab. 5 Tělesná teplota potkanů v jednotlivých skupinách měřená per rectum 1. den po inokulaci.

Fyzikální vyšetření zkušenou veterinářkou 1. den po inokulaci:

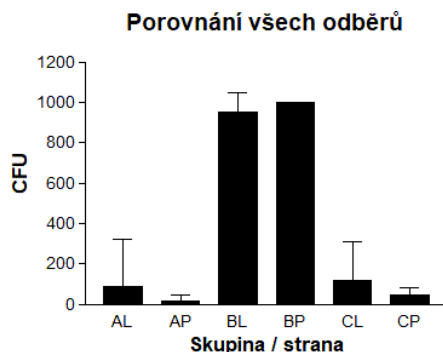
Skupina A: 9 bez pozoruhodností, 3 vykazují mírné odchylky od normálního chování (úlevová poloha

atd.). *Skupina B:* Jeden potkan bez pozoruhodností – sám se čistí. 5x viditelně strádající zvířata s četnou chromodacryorrhoeou – porfyriny u očí a u čumáku. Tachypnoe, záškuby, úlevová poloha. 2. den po inokulaci 2 zvířata uhynula. *Skupina C:* Zvířata byla zcela v pořádku, lezou nahoru a čistí se.

Poslechový nález na plicích:

Skupina A: u jednoho potkana mírné chrůpky, jinak normální poslechový nález. *Skupina B:* jeden potkan s normálním poslechovým nálezem, jeden výrazně nepravidelný dech, 4 pískoty, jeden i chrůpky. Zvířata, která uhynula měla pískoty. *Skupina C:* 4x normální nález, 1x chrůpky, 1x zastřený nádech

Výsledek mikrobiologické kultivace z biopsií odebraných 4. den po inokulaci při terminaci:



Obr. 75 Počet CFU (colony forming units) ve vzorcích z jednotlivých skupin zvířat. (L = levá strana, bez houbiček, P = pravá strana, s houbičkami).

Skupina	Vzorek	CFU
		median (IQR)
Houbička s 2 mg gentamicinu, bez i. m. gentamicinu A	pravá strana (houbička)	1 (0 to 8)
	levá strana (bez houbičky)	3 (0 to 19)
Houbička bez gentamicinu, bez i. m. gentamicinu B	pravá strana (houbička)	1000 (1000 to 1000)
	levá strana (bez houbičky)	1000 (950 to 1000)
Houbička bez gentamicinu 2 mg gentamicinu i. m. C	pravá strana (houbička)	28 (26 to 68)
	levá strana (bez houbičky)	18 (11-118)

CFU: colony forming units, IQR: interquart

Tabulka 6. Počet CFU (colony forming units) ve vzorcích z jednotlivých skupin zvířat.

Byla zaznamenána dobrá efektivita jak i. m., tak s. c. (pomocí houbičky) podaného gentamicinu. Byl zaznamenán trend k lepší efektivitě gentamicinu aplikovaného s. c., nicméně nebylo dosaženo statisticky signifikantního výsledku.

10.1.3 Závěr (*in vivo* pokusy s gentamicinem):

Jednoznačně bylo prokázáno, že připravené houbičky jsou efektivním nosičem gentamicinu. Pomocí této aplikace byl efektivně zaléčen intenzivní septický zánět, který je pro zvířata potenciálně letální. Jednou dávkou gentamicinu se podařilo snížit inokulum natolik, že zvířata úspěšně přežila do 4. dne. Rozdíl byl klinický, mikrobiologický (CFU) i laboratorní (haptoglobin). Podařilo se prokázat efektivitu houbiček, jako drug delivery matrix. Efektivně snižují inokulum lokálně (AP strana měla nejméně CFU ze všech – obr. 75) a poskytují i systémový efekt srovnatelný s i. m. podáním.

10.2 Vankomycin

Byl proveden pokus na potkanech, kde do chirurgicky vytvořené podkožní kapsy byl inokulován infekční bujona methicilin rezistentním *Staphylococcus aureus* (MRSA) a dané skupině zvířat je do této kapsy také přidána kolagenní houbička z rybiho kolagenu třeboňského kapra s implementovaným vankomycinem. Byly použity 2. skupiny zvířat (tabulka č. 7).

A	Skupina s aktivní houbičkou (vankomycin) <i>12 zvířat</i>	Dva řezy na zádech: - infekce + houbička s vankomycinem - <i>pouze infekce</i>
B	Skupina bez atb. <i>6 zvířat</i>	Dva řezy na zádech: - infekce + houbička bez vankomycinu - <i>pouze infekce</i>

Tabulka č. 7. skupiny zvířat použité v *in vivo* experimentu s vankomycinem.

Nastříhané houbičky k aplikaci o rozměru 1x1 cm obsahovaly 7,5 mg vankomycinu, tedy 30 mg/kg při předpokládané váze zvířat 250 g. Tato dávka odpovídá nejvyšším doporučeným nasycovacím dávkám u lidí.

10.2.1 Metodika:

Inokulace a aplikace houbiček:

Inokulace a aplikace houbiček s vankomycinem. Zvířata byla uspána isofluranem. Chlupy na zádech byly oholeny pomocí depilačního krému. U zvířat byla na kraniální části zad na pravé i na levé straně od páteře chirurgicky vypreparována subkutánní kapsa řezem o délce cca 1 cm. Do kapsy bylo pomocí tuberkulinové injekční stříkačky aplikováno **0,5 mL fyziologického roztoku obsahujícího *Staphylococcus aureus* (kmen CNCTC 6271) v koncentraci 2×10^7 CFU/mL (jednodenní bujón/5)**. Dále byla implantována 1 cm² sterilní houbička (skupina A s vankomycinem, skupina B bez vankomycinu). Kapsa byla uzavřena polypropylenovými stehy. Na levé straně zad bylo aplikováno stejné množství roztoku se *Staphylococcus aureus*. Pro aplikaci ve skupině A byly houbičky nastříhány na rozměr 1x1 cm.

Odběry krve pro farmakokinetickou studii a měření markerů zánětu (haptoglobin):

Pro farmakokinetickou studii a monitorování zánětu byly provedeny odběry krve na stanovení plazmatických hladin gentamicinu a haptoglobinu (marker akutní fáze u potkanů) z jugulární žíly (každé zvíře 2x v průběhu pokusu) v časech:

- 30 min (3 zvířata ze skupiny A)
- 1 hodiny (3 zvířata ze skupiny A)
- 2 hodiny (3 zvířata ze skupiny A, 6 zvířat ze skupiny C)
- 4 hodiny (3 zvířata ze skupiny A)
- 1. 2. a 3. den po inokulaci (4 zvířata ze skupiny A, 2 zvířata ze skupiny B)

Postup odběrů krve. Zvířata byla uspána isofluranem. Do heparinem vymyté eppendorfky byla odebrána krev heparinem promytou jehlou a stříkačkou. Následně byl vzorek stočen (2500 otáček, 8 min). Následně bylo odebráno 300 mikrolitrů plasmy a naředěno pomocí 300 mikrolitrů FR na 50 % pro dosažení objemu 500 μ L (z důvodu mrtvého objemu při strojovém odběru vzorků při analýze). Analýza byla provedena v biochemické laboratoři VFN nefelometrickou imunochemickou metodou (Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA). Byl použit dostupný kit na lidský haptoglobin (beta podjednotka krysího haptoglobinu má 80 % homologii s lidským haptoglobinem). Po inokulaci a odběrech krve byla zvířata vrácena do individuálních klecí.

Utrácení zvířat a konečné zhodnocení:

Všechna zvířata ze skupiny A i B byla utracena 4. pooperační den. Zvířata byla utracena předávkováním anestézie – aplikováno 50 mg tiopentalu (0,5 mL roztoku o koncentraci 100 mg/mL) intraperitoneálně.

Při terminaci byly provedeny následující odběry:

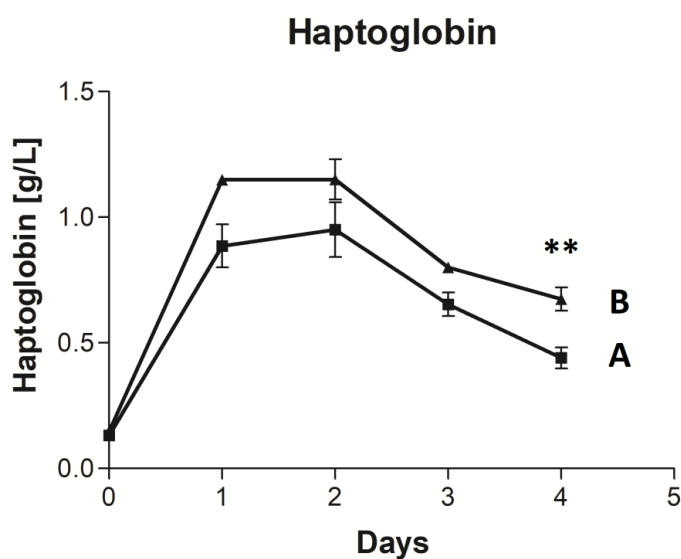
- Intrakardiálně bylo odebráno větší množství krve do sérové zkumavky (červená s induktory

srážení) na zjištění hladiny gentamicinu a haptoglobinu.

- Byl odebrán větší vzorek tkáně z obou míst inokula – vystříhány svaly i kůže, která předtím byla oholena. Vzorek byl předán do sterilní zkumavky a označen číslem zvířete a písmenem L či P podle toho, ze které strany byl odebrán (P je s houbičkami). Do hodiny od odběru byly vzorky předány na pracoviště mikrobiologie za účelem zpracování jako klasickou biopsií, tedy otřít na Petriho misce a následně kultivovat.

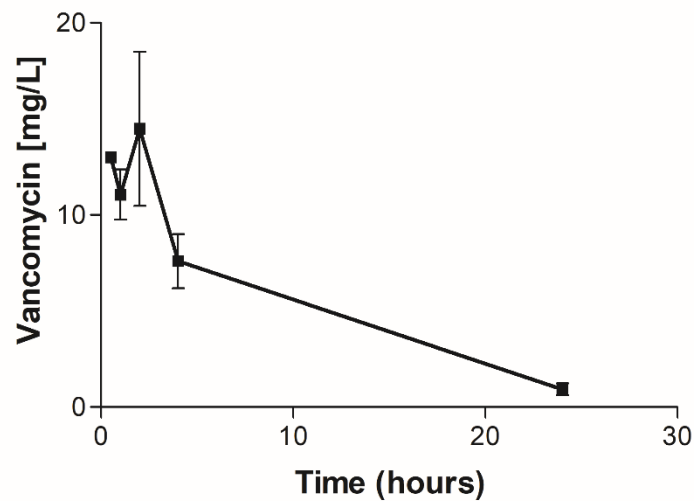
10.2.2 Výsledky

Klinický obraz pokusných zvířat v obou větvích byl bez vážnější alterace po celou dobu pokusu, stejně tak se neměnila tělesná teplota zvířat. Ve skupině B byl nesignifikantně pomalejší nárůst tělesné hmotnosti. Haptoglobin významně stoupl v obou větvích a následně poklesl. 4. den dosáhl rozdíl mezi skupinami A a B statistického významu (obrázek 76).



Obrázek 76. Vývoj haptoglobinu (protein akutní fáze u kryš) v průběhu pokusu s MRSA infekcí a vankomycinem impregnovanou houbičkou. A – aktivní větev s vankomycinem impregnovanou houbičkou, B – kontrolní větev bez antibiotik.

Vankomycin měl v prvních třech vzorcích (0,5, 1 a 2 hodiny po podání) srovnatelnou hladinu a následně začal klesat s poločasem 2,2 hodiny mezi 2. a 4. hodinou a 6,6 hodin mezi 4. a 24. hodinou od podání (obrázek č. 77).



Obrázek 77. Pokles hladiny vankomycinu po podání kolagenní houbičky impregnované vankomycinem s. c.

Srovnání počtu CFU mezi skupinami a v léčených a neléčených ránách je v tabulce 8. Hodnoty CFU ve skupině B byly na obou stranách statisticky významně vyšší, než ve skupině A, což svědčí pro efektivitu léčby podaným vankomycinem formou s. c. implantované kolagenní houbičky.

	CFU median (IQR)		
Vzorek	Skupina A <i>(houbička s vanco)</i>	Skupina B <i>(houbička bez vanco)</i>	
Pravá strana (houbička)	10.5 (5-26.25)	140 (107.5-187.5)	p=0.0066
Levá strana (bez houbičky)	25 (15-35)	65 (35-245)	p=0.0149
	p = 0.1839	p=0.5887	

Tabulka č. 8 – počet CFU MRSA v biopsiích krys léčených vankomycinovými houbičkami (skupina A) a v kontrolní skupině (skupina B).

10.2.3 Závěr (*in vivo* pokusy s vankomycinem):

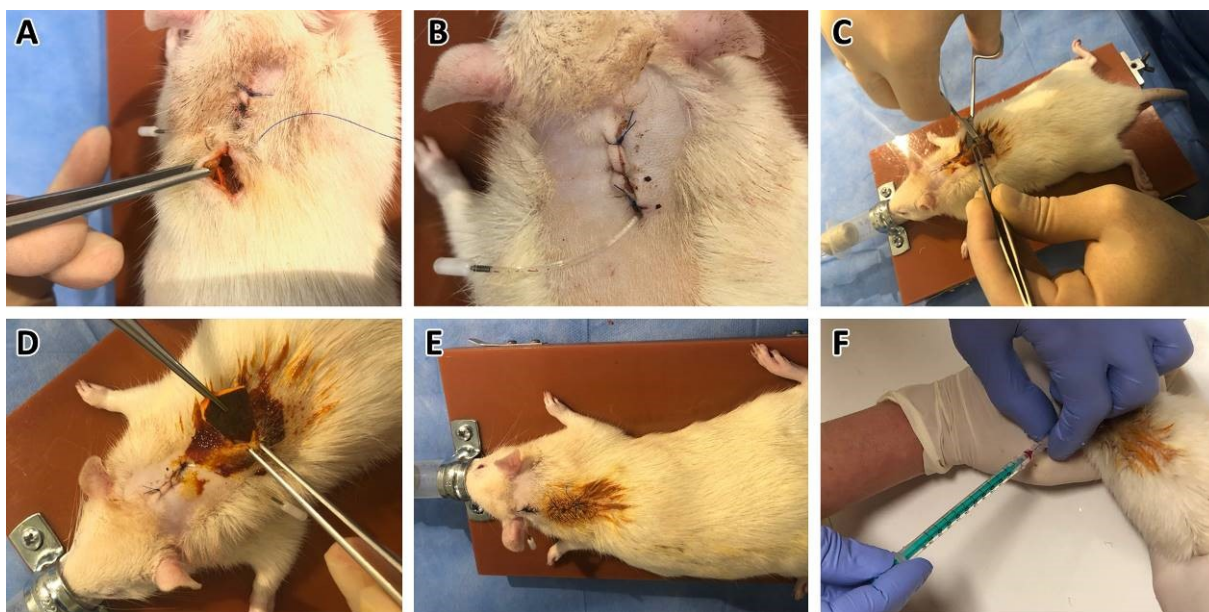
Jednoznačně bylo prokázáno, že připravené houbičky jsou efektivním nosičem vankomycinu. Houbičky se jeví jako ideální prostředek na pravidelné převazy ranifikovaných G+ bakteriemi á 24 hodin, neboť vankomycin je na rozdíl od aminoglykosidů na čase závislé antibiotikum (resp. PK/PD parametr, který zde sledujeme je AUC:MIC, (Rybak JM et al., 2020, Moise-Broder PA, et al., 2004). Nestačí tedy zajistit dostatečně vysokou koncentraci v počátku léčby a spolehnout se na postantibiotický efekt. Bylo prokázáno, že vankomycin se uvolňuje z houbiček 24 hodin.

10.3 Rifampicin

V rámci studia houbiček s rifampicinem bylo upuštěno od infekčních modelů a byla provedena pouze farmakokinetická studie monitorující uvolňování rifampicinu z houbiček aplikovaných do podkoží. Za tímto účelem byly potkanům implantovány karotické katetry pro opakované odběry krve. V rámci pokusů byly rovněž odebírány vzorky k patologické analýze (určené lokální reakce a biokompatibility houbiček).

10.3.1 Metodika:

Pro ověření rychlosti uvolňování rifampicinu *in vivo* byl použit potkaní model (obrázek 78). Byli použiti dospělí samci kmene Wistar rat. Potkanům byly chirurgicky zavedeny kanyly do arteria carotis dle standardního protokolu (Feng J, et al., 2015). Aplikace kanyly byly prováděny po 6-8 hodinovém lačnění za aseptických podmínek po anestézii aplikací kombinace anestetik xylazin+ketamin i.m. (5-10 mg/kg+60-80 mg/kg). Po katetrizaci a odeznění anestezie se potkani individuálně zotavovali v kleci s přístupem k potravě a vodě ad libitum. Potkani byli pozorováni v intervalech 2 hodiny po dobu alespoň 4 hodin, nebo dokud nebyly patrné žádné známky bolesti a pak jednou denně. Bezprostředně po ukončení anestézie byl aplikován ketoprofen (5 mg/kg, subkutánně) a event. bylo v dávkování pokračováno každých 12 hodin, pokud potkan vykazoval známky bolesti nebo strachu. Po 72 hodinách byli potkani, kteří se dostatečně zotavili a kteří dosáhli > 10 g hmotnosti před katetrizací, zařazeni do farmakokinetické studie. Až do ukončení odběrů vzorků krve byli potkani ponecháni jednotlivě v klecích, aby nedocházelo k vzájemnému napadání a poškozování zavedených kanyl. Objem odebrané krve (0,1-0,3 ml) byl průběžně nahrazován stejným objemem fyziologického roztoku, kanyly byly po každém odběru heparinizovány. Potkanům byl aplikován nízkomolekulární heparin 1x denně po dobu trvání experimentu. Po posledním odběru vzorku krve byli potkani uspáni isofluranem a usmrceni pomocí kombinace embutramidu, mebezonie a tetracainu (T-61 - přípravek k bezexcitační euthanasii zvířat, Intervet International B.V., Wim de Körverstraat 35, 5831 AN Boxmeer, Nizozemsko).



Obr. 78 Průběh implantace houbiček do podkoží potkanů: zavedení kanyly (A, B), příprava operačního místa (C), implantace houbičky do podkoží (D), potkan po sutuře (E), odběr krve pomocí katétru (F).

Vzhledem k tomu, že rifampicin podléhá enterohepatální recirkulaci, což by mohlo ovlivnit výsledky experimentu, byla pro účely pokusu ze standardních granulí vytvořena směs s 10 % aktivního uhlí (Carbosorb®, IMUNA PHARM, a.s. Jarková 17 082 22 Šarišské Michaľany, Slovenská republika). Aktivní uhlí v koncentraci 5% efektivně snížilo enterohepatální cirkulaci bilirubinu u potkanů (Davis DR, et al., 1983).

Obvyklá p. o. dávka rifampicinu u lidí je 10 mg/kg tělesné hmotnosti, u dětí až 20 mg/kg. Adekvátní p. o. dávka aplikovaná u potkanů je 25 mg/kg 2 x denně (Brinkman CL, et al., 2015, Vergidis P, et al 2015). Byl proveden jednodávkový farmakokinetický experiment s aplikací 25 mg/kg rifampicinu subkutánně buď pomocí testovaných houbiček (homogenní kolagenní pěna, nebo sandwichová struktura), případně jako roztok o koncentraci 60 mg/mL v aqua pro injectione (kontrolní větev) – viz tabulka. 9.

Označení	Popis	Počet zvířat
H	Skupina s aktivní houbičkou („homogenní pěna“) Řez na zádech, podkožní aplikace houbičky.	$n=5$
S	Skupina s aktivní houbičkou („sendvičová struktura“) Řez na zádech, podkožní aplikace houbičky.	$n=6$
K	Kontrolní skupina se s. c. aplikací rifampicinu. Řez na kůži a sešití (sham surgery), aplikace roztoku rifampicinu s.c.	$n=5$

Tabulka 9. Větev experimentu a počty použitých zvířat při studiu houbiček s rifampicinem.

Dávka byla určena buď pomocí váhy houbičky (větev H a S), nebo pomocí objemu roztoku rifampicinu (větev K, koncentrace 60 mg/mL) připraveného ředěním pomocí aqua pro injectione podle SPC bezprostředně před aplikací z přípravku Eremfat® (RIEMSER Pharma GmbH Ander Wiek, 17493 Greifswald - Insel Riems, Německo) podle SPC:

- **homogenní kolagenní pěna (větev H):** $\text{váha potkana (kg)} \times 0,082 = \underline{\text{váha houbičky (mg)}}$
- **houbičky sandwichové struktury (větev S):** $\text{váha potkana (kg)} \times 0,145 = \underline{\text{váha houbičky (mg)}}$
- **roztok rifampicinu (60 mg/mL, větev K):** $\text{váha potkana (kg)} \times 0,42 = \underline{\text{objem roztoku v } \mu\text{L}}$

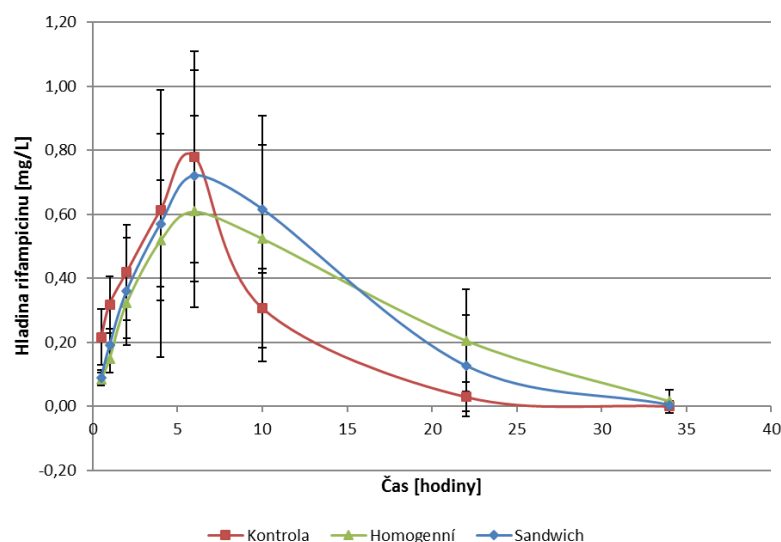
Po aplikaci vzorků byly provedeny odběry vzorků v časech **30 min; 60 min, 2h, 4h, 6h, 10h a dále á 12 hodin do ukončení pokusu 4. den experimentu** (jako den 0 byl označen den implantace houbiček). Vzorky krve byly přeneseny do Eppendorfových zkumavek. Po aktivaci koagulační kaskády byly vzorky centrifugovány 8 minut při 5 000 otáčkách a sérum přepipetováno do nové Eppendorfovy zkumavky a uloženo v -80°C do doby analýzy (postup HPLC popsán výše). 4.den byla zvířata terminována a oblast s implantovanými houbičkami (větev H a S), případně oblast, kam byl s. c. aplikován roztok rifampicinu, byla chirurgicky vyjmuta a ve sterilních zkumavkách dopravena na

patologickou analýzu. Do patologické laboratoře byly všechny vzorky dodány nejpozději 4 hodiny po odběru (viz dále).

10.3.2 Výsledky

FARMAKOKINETICKÁ ANALÝZA

Obr. 79 znázorňuje průběh hladin rifampicinu u jednotlivých skupin potkanů.



Obr. 79 Průběh hladin rifampicinu u jednotlivých skupin potkanů.

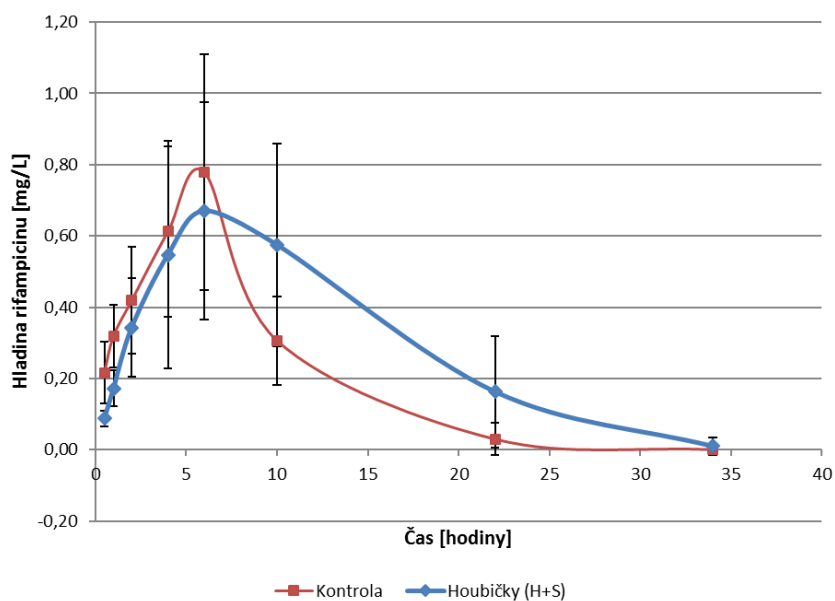
Parametry farmakokinetické analýzy jsou v tabulce č. 10. Vzhledem k variabilitě mezi jednotlivými potkany vyšla i při srovnatelných dávkách rozdílná AUC u kontrolní větve (K) a větví S a H ($7,1 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ oproti $10,5$, resp. $10,4 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$). Zároveň $T_{1/2}$ je mezi skupinou K a skupinou S srovnatelný i když graf na Obr.73 naznačuje pomalejší pokles hladin ve skupině S. Jedná se o chybu, která pravděpodobně vznikla při příliš malém množství odběrů v průběhu eliminační fáze. Pro skupiny K a S je poločas počítán pouze ze tří hodnot a proložení úsečky ve skupině S při semilogaritmickeém zobrazení hodnot je málo spolehlivé. Oproti tomu poločas ve skupině H je počítán ze čtyř hodnot a jedná se tedy o přesnější hodnotu.

Tab. 10 Parametry farmakokinetické analýzy.

parametr	jednotka	sendvič (S)	homogenní (H)	kontrola (K)	S + H
Lambda_z	1/h	0.205151	0.144321	0.20274	0.168502
t1/2	h	3.378725	4.802803	3.418901	4.113579
Tmax	h	6	6	6	6
Cmax	µg/ml	0.720789	0.609001	0.779227	0.669976
Tlag	h	0	0	0	0
Clast_obs/Cmax		0.006217	0.006274	0.037674	0.002592
AUC 0-t	µg/ml*h	10.50601	10.38566	7.166327	10.46597
AUC 0-inf_obs	µg/ml*h	10.52785	10.41214	7.311125	10.47628
AUC 0-t/0- inf_obs		0.997925	0.997457	0.980195	0.999016
AUMC 0- inf_obs	µg/ml*h ²	103.2784	121.5198	52.76836	111.5038
MRT 0-inf_obs	h	9.810016	11.67098	7.217543	10.64345
Vz/F_obs	(mg/kg)/(µg/ml)	11.57517	16.63679	16.86619	467.349
Cl/F_obs	(mg/kg)/(µg/ml)/h	2.374653	2.401044	3.419446	78.74934

Tabulka 10. Parametry farmakokinetické analýzy.

Vzhledem k tomu, že průběh hladin u testovaných houbiček (větve S a H) je velice podobný, byla rovněž provedena analýza výsledků větví S a H dohromady a srovnána s kontrolní větví (viz Tab. 10, skupina „S + H“ a Obrázek 80).



Obr. 80 Průběh hladin rifampicinu u jednotlivých skupin potkanů (větve S a H počítány dohromady).

Při porovnání houbiček dohromady (S+H) a kontrolní větve je patrné, že první dvě hodnoty se liší – kontrolní větev dosahuje o něco vyšších hodnot, což značí rychlejší vstřebávání rifampicinu při s. c. aplikaci roztoku. Oba výsledky se statisticky signifikantně liší ($p=0,0003$ pro 30 min a $p=0,0008$ pro 60 min). Dále je průběh křivek víceméně srovnatelný a výraznějších rozdílů je dosaženo v čase 10 h a 22 hodin, kdy pokles hladin ve skupině S+H je pomalejší oproti kontrole. Tyto výsledky téměř dosahují statistické signifikance ($p=0,0653$ pro 10 hodin a $p=0,0846$ pro 22 hodin).

Farmakokinetická analýza neprokázala rozdíly mezi homogenními a sendvičovými houbičkami. Houbičky se o něco lišily od subkutánně aplikovaného roztoku. Rozdíl však není vs klinicky významný. Poločas rifampicinu byl 3,4 hodiny po podání roztoku a 4,1 hodin po podání formou houbiček. To je výrazně menší hodnota, než byla v literatuře popsána pro p. o. aplikovaný rifampicin u krys ($T_{1/2}$ 10-14 h podle toho, zda byl podáván nalačno, či s potravou) (Shimomura H, et al., 2016). Uvolňování rifampicinu probíhalo cca 24 hodin u roztoku a kolem 30 hodin u houbiček. Případná snaha o delší retardace uvolňování rifampicinu z houbiček by ani neměla význam z důvodu jeho rozkladu při fyziologických podmínkách.

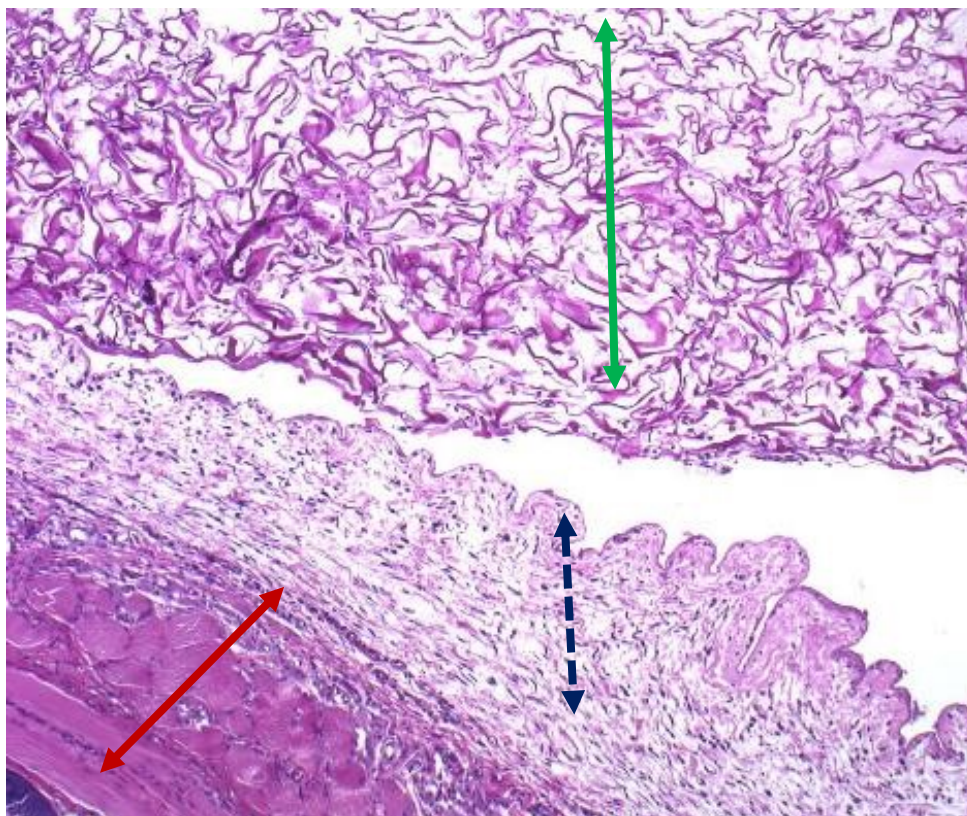
10.4 LOKÁLNÍ REAKCE NA HOUBIČKY S RIFAMPICINEM PODANÉ POTKANŮM DO PODKOŽÍ

Vzorky tkáně byly makroskopicky popsány a rozřezány na 3-4 části. Bylo použito klasické histotechnologické zpracování (fixace, dehydratace atd.) a připraveny standardní formalínem fixované parafinové bloky. Byly použity následující 3 barvicí techniky:

- 1. Standardní haematoxylin a eosin, kombinovaný s Weigertovou resorcin-fuchsinovou metodou pro zobrazení elastických vláken.*
- 2. Picrosiriová červeň za účelem identifikace kolagenových vláken, kombinovaná s Weigertovou resorcin-fuchsinovou metodou barvení elastických vláken.*
- 3. Alcianová modř (pH 2.5), kombinovaná s reakcí PAS (Periodic Acid Schiff).*

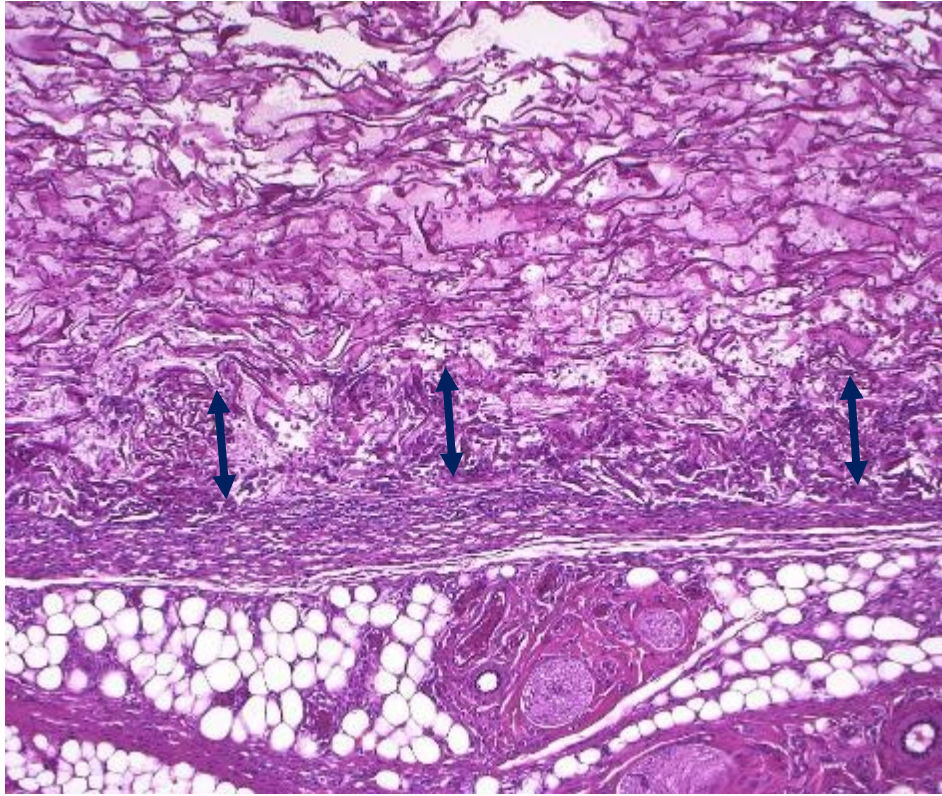
Homogenní kolagenní pěny

U všech zvířat byly nalezeny podobné morfologické změny s mírnou reakcí pojivové tkáně, která je projevem normálního hojícího procesu. Byla zaznamenána formace edematózní granulační tkáně kolem nových tenkostěnných kapilár (Obr. 81). Mikroskopické tkáňové výstupky (granulace) byly zaznamenány kolem nově tvořených kapilár (Obr. 81). S výjimkou jednoho zvířete, u kterého se projevila mírná zánětlivá reakce v nově tvořené granulační tkáni, nebyly zaznamenány známky zánětu okolo homogenní kolagenní pěny.

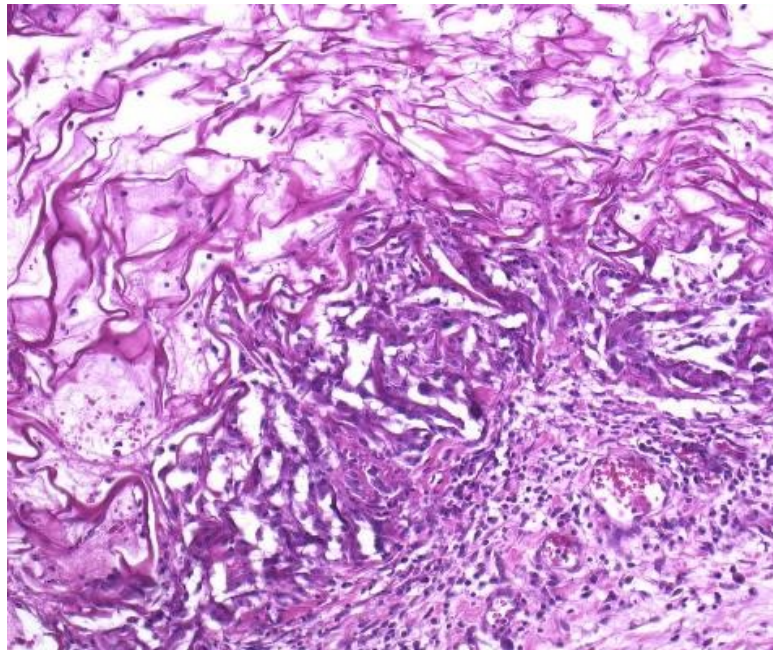


Obr. 81 V horní části (zelená šipka) je vidět mikroskopická struktura homogenní kolagenní pěny, která byla v rámci pokusu implantována do podkoží. Tmavě modrá šipka označuje mírnou reakci pojivové tkáně, která je normální při hojícím procesu (edematózní granulační tkáň kolem novotvořených tenkostěnných kapilár a formace malých výstupků bez známek zánětu). Červená šipka označuje svalovou tkáň. (barvení: H&E s Weigertovým resorcin-fuchsinem).

Byl kompletně zhodnocen celý povrch implantované homogenní kolagenní pěny v příčných řezech a zaznamenány srůsty mezi houbičkou a potkaní pojivovou tkání v různě dlouhých částech. V oblastech, kde ke srůstům docházelo, byly zaznamenány buňky, které pronikaly z tkáně přímo do struktury houbičky (Obr. 82 a 83).



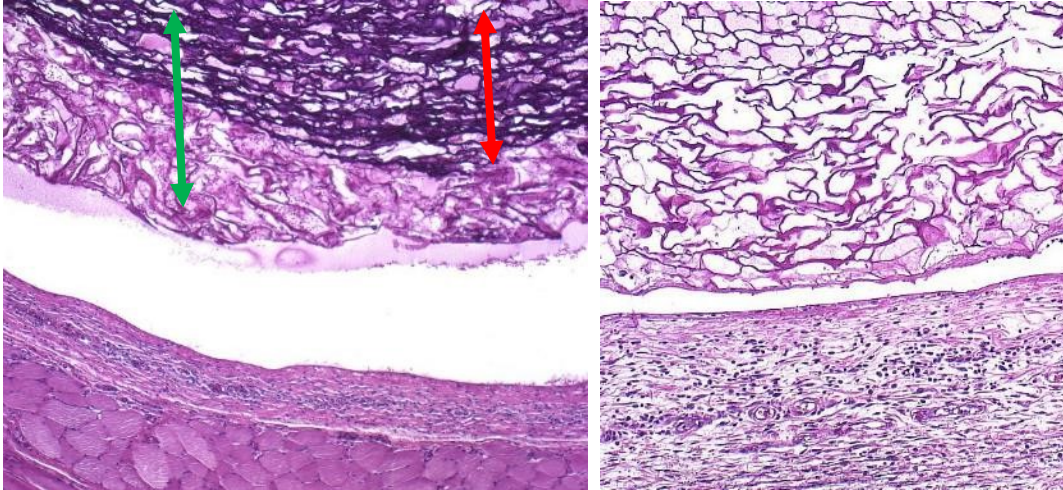
Obr. 82 U většiny zvířat ve skupině H byly nalezeny oblasti se srůsty homogenní kolagenní pěny a potkaní pojivové tkáně. Šipky vyznačují buňky, které pronikají z pojivové tkáně do struktury homogenní kolagenní pěny. (barvení: H&E a Weigertovým resorcin-fuchsinem).



Obr. 83 Detail buněk pronikajících do houbičky. (barvení: H&E a Weigertovým resorcin-fuchsinem).

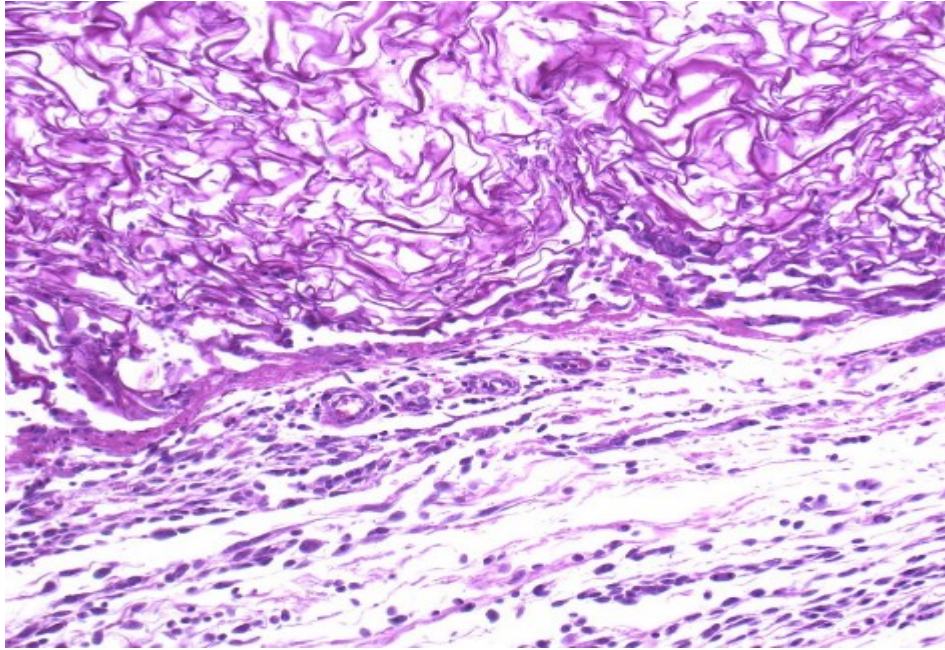
Houbičky sendvičové struktury

Všechna zvířata vykazovala podobné morfologické změny, jako skupina H (homogenní kolagenní pěny (Obr. 84).

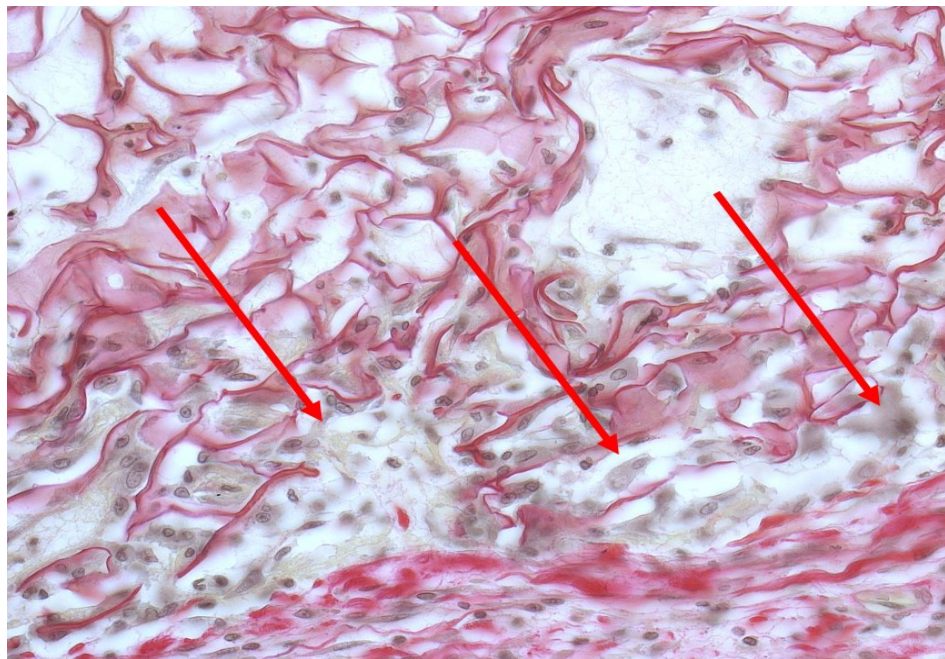


Obr. 84 Vlevo: podobně, jako na Obr. 81, je v horní části zelenou šipkou označena houbička, která má uprostřed odlišnou oblast (vyznačena červeně). Reakce okolní tkáně je velice mírná. Vpravo: ve spodní části obrázku je detail edematózní granulační tkáně s roztroušenými zánětlivými buňkami (normální reakce). (barvení: H&E s Weigertovým resorcin-fuchsinem).

Zaznamenali jsme mírně častější výskyt oblastí se srůsty potkaní tkáně s materiálem houbičky, včetně buněk, které do houbičky pronikaly (Obr. 85 a 86).



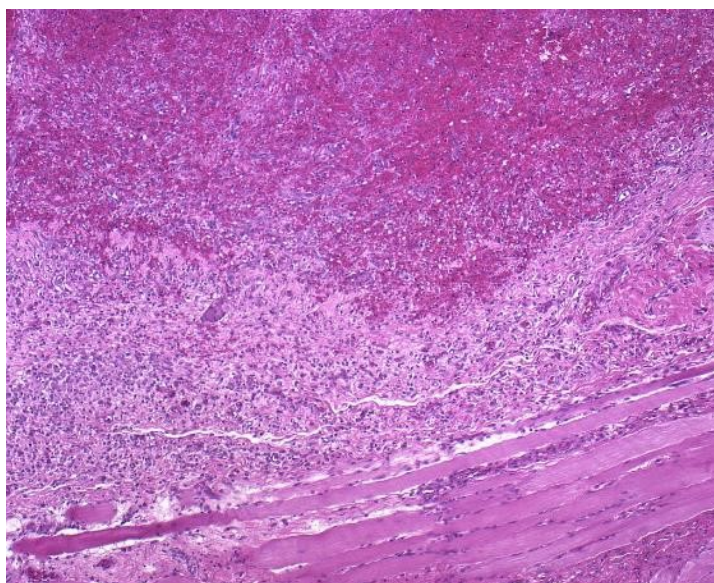
Obr. 85 V horní oblasti obrázku je ve střední části vrstvy tvořené houbičkou vidět pronikající buňky, které tvoří srůst pojivové tkáně s houbičkou. Na spodní části obrázku je edematózní granulační tkáň s rozptýlenými zánětlivými buňkami. (barvení: H&E s Weigertovým resorcin-fuchsinem).



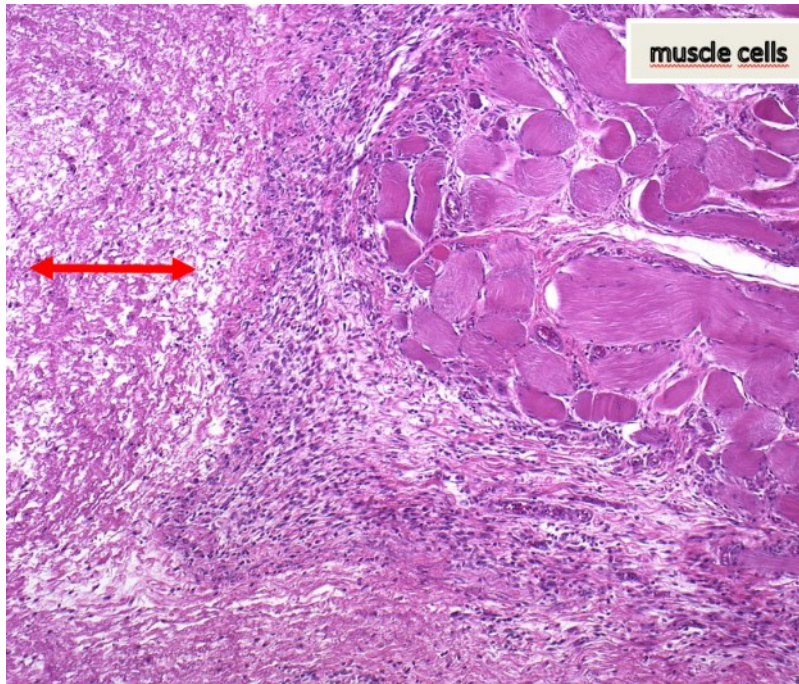
Obr. 86 Šipkami je označen detail buněk, které pronikají do struktury houbičky a tvoří srůst houbičky a potkaní tkáň. (barvení: Picrosiriová červená s Weigertovým resorcin-fuchsinem).

Tkáň v oblasti s. c. aplikace roztoku rifampicinu

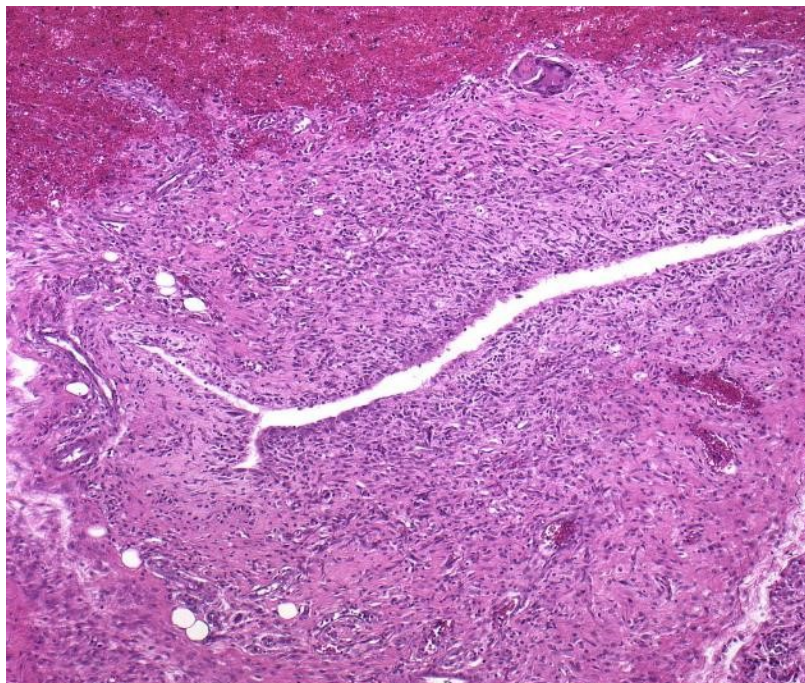
Všechna zvířata vykazovala podobné morfologické změny, nekrózy a těžkou zánětlivou tkáňovou reakci s demarkačními zónami a krvácením. Navíce byly patrné roztroušené vícejaderné buňky, které mohou charakterizovat reakci na cizí materiál, nebo reakci na těžké poškození tkáně (Obr. 87-89).



Obr. 87 Těžké zakrvácení v horní části obrázku. Ve střední části je granulační pojivová tkáň se zánětlivými buňkami a rozptýlenými vícejadernými buňkami, které mohou znamenat reakci na cizí materiál, nebo těžké poškození tkáně. Ve spodní části obrázku je provazec svalových vláken s městnáním a zánětem (barvení: H&E s Weigertovým resorcin-fuchsinem).



Obr. 88 Oblast tkáňové nekrózy (šipka) s periferní demarkační zónou a granulační pojivovou tkání s mírnými zánětlivými změnami (barvení: H&E s Weigertovým resorcin-fuchsinem).



Obr. 89 Množství granulační tkáně na okraji s vícejadernými buňkami a krvácením (barvení: H&E s Weigertovým resorcin-fuchsinem).

Závěr histologického hodnocení

Bylo zjištěno, že lokální reakce na houbičky je naprosto minimální, což je ve shodě s literaturou, která popisuje rybí kolagen jako méně alergenní, než kolagen savčí (Lukac P, et al., 2019, John P, et al., 2015, Yamada S, et al., 2014, Chou CH, et al., 2014, Lambert L, et al., 2019). Naopak samotný rifampicin (pravděpodobně pro vysokou koncentraci aplikovanou s.c.) působil na tkáň zčásti destruktivně. Zesíťovaný rybí kolagen by tak mohl sloužit i jako léková forma pro lokálně aplikované přípravky, která tlumí místní reakci.

10.4.1 Závěr (in vivo pokusy s rifampicinem)

Typ testovaných houbiček neměl vliv na uvolňování rifampicinu *in vivo*. Bylo nicméně zjištěno, že houbičky mírně zpomalují vstřebání antibiotika a budou tedy udržovat efektivní koncentraci v místě infekce min. 24 hodin. Po delší dobu by nemělo uvolňování smysl, neboť rifampicin ztrácí stabilitu při tělesné teplotě. Bylo rovněž zjištěno, že houbičky s rifampicinem jsou velice dobře tolerovány pouze s minimální tkáňovou reakcí v místě aplikace. Docházelo dokonce k proliferaci buněk do kolagenní matrix.

11 Závěr

V rámci výzkumu jsme vyvinuli nový prototyp převazového materiálu, který může ideálně sloužit jako krytí na infikovanou ránu. Podle původce infekce lze zvolit antibiotikum gentamicin, vankomycin, nebo rifampicin. Kolagen ze kterého je použita pěna vyrobena pochází z třeboňského kapra (*Cyprianus carpio*), je tedy ideální surovinou v podmínkách České republiky s dlouholetou tradicí chovu této ryby. Pro udržení stability při tělesné teplotě je rybí kolagen zesíťovaný karbodiimidem, který zpomaluje rychlost odbourávání a zvyšuje stabilitu krytí. Prokázali jsme rovněž excelentní biokompatibilitu, kdy docházelo m.j. k prorůstání buněk do kolagenní matrix. Nutnost síťování tedy není na překážku použití rybího kolagenu k tomuto účelu. Rybí kolagen je rovněž méně imunogenní, než kolagen bovinní. V rámci našich experimentů jsme prokázali imunotoleranci na myším modelu, která byla minimálně stejná jako u bovinního kolagenu a některých aspektech podle očekávání dokonce bovinní kolagen předčila.

Veškeré pokusy *in vivo* proběhly s finálním produktem po lyofilizaci a sterilizaci gama zářením, která prokazatelně mění vlastnosti kolagenního materiálu (Randall HC et al., 2018, Harrell CR, et al., 2018). Struktura byla hodnocena pomocí rastrovacích obrazů elektronové mikroskopie, mikropočítačové tomografie a infračervené spektrometrie. (Jackson M, et al., 1995)

Strukturální stabilita a vlastnosti uvolňování gentamicinu, vankomycinu a rifampicinu byly hodnoceny ve fyziologickém roztoku pufovaném fosfáty. Poté byly použity mikrobiologické testy a krysí model rány infikované *Pseudomonas aeruginosa*, nebo methicilin-rezistentním *Staphylococcus aureus* (MRSA) k testování účinnosti léčby infikované rány.

Po počáteční ztrátě hmoty v důsledku uvolnění vankomycinu zůstaly houbičky stabilní. Po 7 dnech expozice ve fyziologickém roztoku pufovaném fosfáty (37° C) zůstalo 60% materiálu se zachovanou sekundární strukturou kolagenu spolu s vysokým stupněm otevřené pórovitosti (více než 80%). Analýza uvolňování antibiotik odhalila ve všech případech homogenní distribuci antibiotika napříč i mezi houbami. Uvolňování vankomycinu a rifampicinu bylo mírně zpomaleno oproti i. p. podání, což odpovídá výsledkům *in vitro* testů. Dále byla určitá retardace absorpce potvrzena zvířecím

modelem, z něhož byly ve vzorcích krve pozorovány měřitelné koncentrace 24 hodin po subkutánní implantaci houby s vankomycinem a 30 hodin v případě rifampicinu, což bylo více, než po podání intraperitoneálním. Houba byla také vysoce účinná, pokud jde o snížení počtu jednotek tvořících kolonie v biopsiích extrahovaných z infikovaných ran 4 dny po naočkování ran roztokem MRSA, nebo *Pseudomonas*. Prezentované houby mají ideální vlastnosti, pro možné využití, jako obvazu na rány k prevenci infekce v místě chirurgického zákroku nebo k léčbě již infikovaných ran.

Vlastnosti, které komplikují klinické použití rybího kolagenu, je to, že jeho denaturační teplota je nižší než teplota lidského těla a že jeho vlastnosti se liší nejen mezi druhy, ale také podle jiných faktorů, zejména podle teploty, při které ryby žily. Rybí kolagen musí být proto stabilizován zesíťováním, aby se získal produkt s reprodukovatelnými vlastnostmi, které se nerozkládají a nerozpouštějí se v krvi a sekretech rány.

V rámci naší práce byly vyvinuty kolagenní hemostatické pěny z rybího kolagenu sladkovodních ryb – třeboňského kapra. Byly vyvinuty postupy, které umožňují programovat porozitu a degradaci tohoto rybího kolagenu. Byly vytvořeny postupy implementace léčiv do těchto kolagenních pěn. Výzkumem a vývojem v tomto projektu byly vytvořeny neantigenní implantáty z rybího kolagenu sladkovodních ryb, ve kterých je integrována i léčivá složka farmak a jejichž resorbovatelnost je řízena materiálovým složením implantátu.

V rámci projektu byly vygenerovány 3 funkční vzorky. V průběhu řešení vznikl a byl přijat Úřadem průmyslového vlastnictví jeden užitný vzor a druhý je připravován k podání. Shrnutí poznatků vzniklých v průběhu řešení projektu vedlo k vypracování a zahájení patentového řízení – byl podán český a evropský patent na tuto nově vyvinutou technologii.

Z hlediska potvrzení/vyvrácení hypotéz práce se ukázalo, že rybí kolagen není zcela neantigenní hmotou, eliminující imunitní reakci po implantaci *in vivo*, ale je podstatně méně imunogenní ve srovnání se standardně užívaným bovinním kolagenem. Potvrdili jsme hypotézu č. 2 – tedy je do značné míry možné navrženou konstrukcí programovat rozpad kolagenních pěn v čase téměř lineárním způsobem a stejně tak lze programovat uvolňování léčiva z této pěny tak, aby po dobu rozpadu zůstávala aktivní ve smyslu lokální antibiotické léčby.

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 rání a současně obdobně probíhající degradaci nosiče – kolagenu. Testovali jsme tři standardně užívané typy antibiotik.

12 LITERATURA:

Armaghani SJ, Menge TJ, Lovejoy SA, Mencio GA, Martus JE. Safety of topical vancomycin for pediatric spinal deformity: Nontoxic serum levels with suprathreshold drain levels. *Spine* 2014;39(20):1683-7.

Bae I, Osatomi K, Yoshida A, Osako K, Yamaguchi A, Hara K. Biochemical properties of acid-soluble collagens extracted from the skins of underutilised fishes. *Food Chemistry*, 108(1), 49-54 (2008).

Bell E, Ivarsson B, Merrill C. Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76(3):1274-8.

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).

Buttaro MA, Gimenez MI, Greco G et al. High active local levels of vancomycin without nephrotoxicity released from impacted bone allografts in 20 revision hip arthroplasties. *Acta Orthop* 2005; 76: 336-340

Cusack SL, Jaros M, Kuss M et al. Clinical evaluation of XaraColl((R)), a bupivacaine-collagen implant, for postoperative analgesia in two multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled pilot studies. *J Pain Res* 2012; 5: 217-225

Cusack SL, Minkowitz HS, Kuss M et al. A randomized, multicenter, pilot study comparing the efficacy and safety of a bupivacaine-collagen implant (XaraColl((R))) with the ON-Q PainBuster((R)) Post-op Pain Relief System following open gynecological surgery. *J Pain Res* 2012; 5: 453-461

Cusack SL, Reginald P, Hensen L et al. The pharmacokinetics and safety of an intraoperative bupivacaine-collagen implant (XaraColl((R))) for postoperative analgesia in women following total abdominal hysterectomy. *J Pain Res* 2013; 6: 151-159

Davis DR, Yeary RA, Lee K. Activated charcoal decreases plasma bilirubin levels in the hyperbilirubinemic rat. *Pediatr Res*, 17(3), 208-209 (1983).

de Araujo DR, Padula C, Cereda CM et al. Bioadhesive films containing benzocaine: correlation between in vitro permeation and in vivo local anesthetic effect. *Pharm Res* 2010; 27: 1677-1686

Eun Song, So Yeon Kim, Taehoon Chun, Hyun-Jung Byun, Young Moo Lee, Collagen scaffolds derived from a marine source and their biocompatibility, *Biomaterials*, Volume 27, Issue 15, 2006, Pages 2951-2961

- Feng J, Fitz Y, Li Y et al. Catheterization of the carotid artery and jugular vein to perform hemodynamic measures, infusions and blood sampling in a conscious rat model. *J Vis Exp*, (95) (2015).
- Gruessner U, Clemens M, Pahlplatz PV et al. Improvement of perineal wound healing by local administration of gentamicin-impregnated collagen fleeces after abdominoperineal excision of rectal cancer. *Am J Surg* 2001; 182: 502-509
- 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 (2018)
- Grus T., Mlček M., Chlup H. Využití neantigenního rybího kolagenu při konstrukci implantátů a jako nosiče léků (2015-2018, MZ0/NV), Grant NV15-27941A
- Grus T, Chlup H, Suchý T et al. Optimalizace výroby hemostatických kolagenních pěn pro medicínské a veterinární použití, Grant TAČR – COMIND - TG02010049
- Hamman BL, Stout LY, Theologes TT, Sass DM, da Graca B, Filardo G. Relation between topical application of platelet-rich plasma and vancomycin and severe deep sternal wound infections after a first median sternotomy. *Am J Cardiol*. 2014 Apr 15;113(8):1415-9. doi: 10.1016/j.amjcard.2013.12.046. Epub 2014 Jan 31. PMID: 24576548.
- Harrell CR, Djonov V, Fellabaum C, Volarevic V. Risks of using sterilization by gamma radiation: The other side of the coin. *Int J Med Sci* 2018;15(3):274-9.
- Hildebrand T, Rügsegger P. A new method for the model-independent assessment of thickness in three-dimensional images. *J Microsc* 1997;185(1):67-75.
- Chattopadhyay S and Raines RT. Review collagen-based biomaterials for wound healing. *Biopolymers*, vol. 101, no. 8, pp. 821–833, 2014.
- Charriere G, Bejot M, Schnitzler L, Ville G, Hartmann DJ. Reactions to a bovine collagen implant. Clinical and immunologic study in 705 patients. *J Am Acad Dermatol*, 21(6), 1203-1208 (1989).
- Chen MC, Liang HF, Chiu YL et al. A novel drug-eluting stent spray-coated with multi-layers of collagen and sirolimus. *J Control Release* 2005; 108: 178-189
- 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.
- Chou CH, Chen YG, Lin CC, Lin SM, Yang KC, Chang SH. Bioabsorbable fish scale for the internal fixation of fracture: a preliminary study. *Tissue Eng Part A*, 20(17-18), 2493-2502 (2014).
- Jackson M, Choo LP, Watson PH, Halliday WC, Mantsch HH. Beware of connective tissue proteins: Assignment and implications of collagen absorptions in infrared spectra of human tissues. *Biochim Biophys Acta* 1995;1270(1):1-6.

Jiřík M, Bartoš M, Tomášek P, Malečková A, Kural T, Horáková J, et al. Generating standardized image data for testing and calibrating quantification of volumes, surfaces, lengths, and object counts in fibrous and porous materials using X-ray microtomography. *Microsc Res Tech* 2018;81(6):551-68.

Jongjareonrak A, Benjakul S, Visessanguan W, et al. Isolation and characterization of collagen from bigeye snapper (*Priacanthus macracanthus*) skin. *J Sci Food Agricult* 2005; 85:1203–1210

John P, Lazarus F, George JP et al. Adjunctive Effects of A Piscean Collagen-Based Controlled-Release Chlorhexidine Chip in the Treatment of Chronic Periodontitis: A Clinical and Microbiological Study. *J Clin Diagn Res* 2015; 9: Zc70-74

Khanlari B, Elzi L, Estermann L. et al. A rifampicin-containing antibiotic treatment improves outcome of staphylococcal deep sternal wound infections. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 65, no. 8, pp. 1799–1806, 2010.

Kahramanca S, Kaya O, Azili C, Celep B, Gokce E, Kucukpinar T. Does topical rifampicin reduce the risk of surgical field infection in hernia repair? *Ulus Cerrahi Derg*, 29(2), 54-58 (2013).

Kirkland KB, Briggs JP, Trivette SL et al. The impact of surgical-site infections in the 1990s: attributable mortality, excess length of hospitalization, and extra costs. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, vol. 20, no. 11, pp. 725–730, 1999.

Krajíček M, Grus T, Špaček M, Vyšohlíd R, Chlup H, Horný L, Beran M, et al. Optimalizace fyzikálních charakteristik cévních náhrad pro nízké průtoky (2012-2015, MZ0/NT). Grant číslo NT13302

Lacraz S, Nicod LP, Chicheportiche R, et al. 1995; IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes. *J Clin Invest* 96(5): 2304– 2310.

Lambert L, Nováková M, Lukac P et al. Evaluation of the Immunogenicity of a Vascular Graft Covered with Collagen Derived from the European Carp (*Cyprinus carpio*) and Bovine Collagen (2019).

Ledvina M, Stoklasová A, Cerman J. *Biochemie pro studující medicíny*, Karolinum, Praha 2020

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.

Lukáč P, Hartinger JM, Mlček M et al. A novel gentamicin-releasing wound dressing prepared from freshwater fish *Cyprinus carpio* collagen cross-linked with carbodiimide. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 0883911519835143 (2019).

Mishra PK, Ashoub A, Salhiyyah K et al. Role of topical application of gentamicin containing collagen implants in cardiac surgery. *J Cardiothorac Surg* 2014; 9: 122

Moise-Broder PA, Forrest A, Birmingham MC, Schentag JJ. Pharmacodynamics of vancomycin and other antimicrobials in patients with *Staphylococcus aureus* lower respiratory tract infections. *Clin Pharmacokinet* 2004;43(13):925-42.

Morávek J, Málek P. Comparison of serum and coagulum antibiotic levels with respect to protected blood coagulum. *Czech Med* 1986;9(4):187-90.

Nandi SK, Mukherjee P, Roy S, et al. Local antibiotic delivery systems for the treatment of osteomyelitis – A review. *Mater Sci Eng C* 2009; 29: 2478–2485.

Nguyen, Huynh & Morgan, David & Forwood, Mark. (2007). Sterilization of allograft bone: Effects of gamma irradiation on allograft biology and biomechanics. *Cell and tissue banking*. 8. 93-105. 10.1007/s10561-006-9020-1.

Oh HH, Uemura T, Yamaguchi I, et al. Effect of enzymatically cross-linked tilapia scale collagen for osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Bioactive Compat Poly* 2015; 31: 31–41.

Parker SJ, Brown D, Hill PF, Watkins PE. Fibrinogen-impregnated collagen as a combined haemostatic agent and antibiotic delivery system in a porcine model of splenic trauma. *Eur J Surg*, 165(6), 609-614 (1999).

Pati, F., Datta, P., Adhikari, B., Dhara, S., Ghosh, K. and Mohapatra, P.K.D. (2012), Collagen scaffolds derived from fresh water fish origin and their biocompatibility. *J. Biomed. Mater. Res.*, 100A: 1068-1079.

Pearson SD, Trissel LA. Stability and Compatibility of Minocycline Hydrochloride and Rifampin in Intravenous Solutions at Various Temperatures. *American Journal of Hospital Pharmacy*, 50(4), 698-702 (1993).

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.

Randall Harrell C, Djonov V, Fellabaum C et al. Risks of Using Sterilization by Gamma Radiation: The Other Side of the Coin; 2018

Remy E, Thiel E. Medial axis for chamfer distances: Computing look-up tables and neighbourhoods in 2D or 3D. *Pattern Recognit Lett* 2002;23(6):649-61.

Ruszczak Z, Friess W. Collagen as a carrier for on-site delivery of antibacterial drugs. *Adv Drug Deliv Rev* 2003; 55: 1679-1698

Rybak MJ, Le J, Lodise TP et al. Therapeutic monitoring of vancomycin for serious methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: A revised consensus guideline and review by the American Society of Health-System Pharmacists, the Infectious Diseases Society of America, the Pediatric Infectious Diseases Society, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists. *Am J Health Syst Pharm* 2020; 77: 835-864.

Rybak M, Lomaestro B, Rotschafer JC et al. Therapeutic monitoring of vancomycin in adult patients: a consensus review of the American Society of Health-System Pharmacists, the Infectious Diseases Society of America, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists. *Am J Health Syst Pharm* 2009; 66: 82-98

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

Schimmer C, Ozkur M, Sinha B et al. Gentamicin-collagen sponge reduces sternal wound complications after heart surgery: a controlled, prospectively randomized, double-blind study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2012; 143: 194-200

Shimomura H, Nogami R, Shigeno A, Shimada S, Aoyama T. Influence of Food on Rifampicin Pharmacokinetics in Rats. *Biol Pharm Bull*, 39(1), 49-53 (2016).

Sripriya R, Kumar MS, Sehgal PK. Improved collagen bilayer dressing for the controlled release of drugs. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2004; 70: 389-396

Šíma M, Hartinger J, Cikánková T, Slanař O. Importance of vancomycin loading doses in intermittent infusion regimens. *J Infect Chemother* 2018;24(4):247-50.

Šíma M, Hartinger J, Štenglová Netíková I, Slanař O. Creatinine clearance estimations for vancomycin maintenance dose adjustments. *Am J Ther* 2018;25(5):e602-4.

Stein GE, Wells EM. The importance of tissue penetration in achieving successful antimicrobial treatment of nosocomial pneumonia and complicated skin and soft-tissue infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: vancomycin and linezolid. *Curr Med Res Opin* 2010; 26: 571-588 Stein GE, Wells EM, 2010

Suchý T, Šupová M, Klapková E, Horný L, Rýglová Š, Žaloudková M, et al. The sustainable release of vancomycin and its degradation products from nanostructured collagen/hydroxyapatite composite layers. *J Pharm Sci* 2016;105(3):1288-94.

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- κB Pathways in HaCaT Cells. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017, 9703609.

Suchý T, Šupová M, Klapková E, Adamková V, Závora J, Žaloudková M, et al. The release kinetics, antimicrobial activity and cytocompatibility of differently prepared collagen/hydroxyapatite/ vancomycin layers: Microstructure vs. nanostructure. *Eur J Pharm Sci* 2017;100:219-29.

Šíma M, Hronová K, Hartinger J, Slanař O. A simulation of loading doses for vancomycin continuous infusion regimens in intensive care. *Infect Dis (Lond)* 2017;49(9):674-9.

- Uçkay I, Kressmann B, Di Tommaso S et al. A randomized controlled trial of the safety and efficacy of a topical gentamicin-collagen sponge in diabetic patients with a mild foot ulcer infection. *SAGE Open Med.* 2018 May 13.
- Uçkay I, Kressmann B, Malacarne S, et al. A randomized, controlled study to investigate the efficacy and safety of a topical gentamicin-collagen sponge in combination with systemic antibiotic therapy in diabetic patients with a moderate or severe foot ulcer infection. *BMC Infect Dis* 2018; 18: 361.
- Vander Salm TJ, Okike ON, Pasque MK, Pezzella AT, Lew R, Traina V, et al. Reduction of sternal infection by application of topical vancomycin. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1989;98(4):618-22. [https://doi.org/10.1016/S0022-5223\(19\)34366-1](https://doi.org/10.1016/S0022-5223(19)34366-1).
- Vergidis P, Schmidt-Malan SM, Mandrekar JN, Steckelberg JM, Patel R. Comparative activities of vancomycin, tigecycline and rifampin in a rat model of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* osteomyelitis. *J Infect*, 70(6), 609-615 (2015).
- Versteegden LRM, ter Meer M, Lomme RMLM et al. Self-expandable tubular collagen implants, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, vol. 12, no. 6, pp. 1494–1498, 2018
- Wallace DG, Rosenblatt J. Collagen gel systems for sustained delivery and tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 2003; 55: 1631-1649
- Xiong L, Pan Q, Jin G, Xu Y, Hirche C. Topical intrawound application of vancomycin powder in addition to intravenous administration of antibiotics: A meta-analysis on the deep infection after spinal surgeries. *Orthop Traumatol Surg Res.* 2014 Nov;100(7):785-9. doi: 10.1016/j.otsr.2014.05.022. Epub 2014 Oct 3. PMID: 25281550.
- 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).
- Ye, Qingsong: “Molecular and cellular mechanisms of collagen degradation in the foreign body reaction,” <http://irs.ub.rug.nl/ppn/356097064>, (dizertační práce, 2013).
- Zhang X, Ookawa M, Tan Y et al. Biochemical characterisation and assessment of fibril-forming ability of collagens extracted from Bester sturgeon *Huso huso* x *Acipenser ruthenus*. *Food Chem* 2014; 160: 305-312
- Zimmerli W, Widmer AF, Blatter M et al. Role of rifampin for treatment of orthopedic implant-related staphylococcal infections: a randomized controlled trial. *JAMA*, vol. 279, no. 19, pp. 1537–1541, 1998.

13 Publikační výstupy

13.1 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
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

13.2 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

14 Přílohy

Články in extenso

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


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

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.

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.

Research Article

Evaluation of the Immunogenicity of a Vascular Graft Covered with Collagen Derived from the European Carp (*Cyprinus carpio*) and Bovine Collagen

Lukas Lambert ¹, Michaela Novakova,² Peter Lukac,³ Dana Cechova,² Lenka Sukanikova,² Jiri Hrdy,² Mikulas Mlcek,⁴ Hynek Chlup,⁵ Tomas Suchy,⁶ and Tomas Grus³

¹Department of Radiology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, U Nemocnice 2, 128 08 Prague 2, Czech Republic

²Institute of Immunology and Microbiology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Studnickova 7, 128 00 Prague 2, Czech Republic

³Department of Cardiovascular Surgery, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, U Nemocnice 2, 128 08 Prague 2, Czech Republic

⁴Institute of Physiology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Albertov 5, 128 00, Prague 2, Czech Republic

⁵Department of Mechanics, Biomechanics and Mechatronics, Faculty of Mechanical Engineering, Czech Technical University in Prague, Technicka 4, 166 07 Prague 6, Czech Republic

⁶Institute of Rock Structure and Mechanics of the Czech Academy of Sciences, V Holešovičkách 41, 182 09, Prague 8, Czech Republic

Correspondence should be addressed to Lukas Lambert; lambert.lukas@gmail.com

Received 27 July 2018; Accepted 3 February 2019; Published 28 February 2019

Academic Editor: Kibret Maqanint

Copyright © 2019 Lukas Lambert et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Aim. To assess the systemic and local immunological response to subcutaneous implants of a vascular graft covered with collagen extracted from the European carp (freshwater fish) or with collagen of bovine origin. **Methods.** Pieces of a vascular graft covered by pure bovine (*Bos taurus*, BOV, $n=14$) or carp (*Cyprinus carpio*, CYP, $n=14$) collagen 5 mm in size were implanted subcutaneously in the dorsum of a Balb/cOla mice. A sham operation group of 12 animals served as the control. At 7 and 14 days after the operation, one-half of each group was terminated and blood for serum, spleen, and implant with surrounding tissue were collected. Mean cytokine (TNF- α , IL-10, IL-4, IL-1 β , IL-1 α , and IFN- γ) levels in serum were determined using ELISA. Spleen cell cultures were used for *in vitro* testing of lymphocyte proliferation and cytokine secretion. Local expressions of IL-6, IL-10, TNF- α , TGF- β , CCL-2, and CCL-3 were determined using PCR. **Results.** We found no significant difference among control, BOV, and CYP groups in mean cytokine serum levels at seven days. At day 14, the BOV group had higher levels of TNF- α ($P=.018$) and both the BOV and CYP groups had lower levels of IL-4 ($P=.081$ and $P=.047$, respectively) compared with the control group. Both tested implants showed only a minimal effect on the production of selected cytokines. Cell proliferation in the CYP group stimulated by CYP gel at 14 days was significantly lower than by BOV gel in BOV group ($P=.0031$) or by CYP gel in the control group ($P=.041$). The difference between the groups in the local RNA expression of all the tested mediators both at 7 and at 14 days was not significant apart from a lower level of TNF- α in the BOV group compared to CYP at 14 days ($P=.015$). **Conclusions.** Implants covered with carp collagen induce an immunological response that is comparable to that of bovine collagen covered implants in a mouse model.

1. Introduction

Due to the limited availability of autologous veins for the revascularization of lower limbs in patients with peripheral arterial disease, there is a growing demand for prosthetic

bypasses with comparable long-term patency rates even in low-flow conditions [1, 2]. Expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE) grafts have become the second best option and widely accepted alternative to the autologous vein with further improvements towards their performance [3].

To overcome the limitations of ePTFE grafts especially in low-flow reconstructions, an effort has been made to engineer and evaluate new materials including collagen. Collagen-impregnated Dacron graft showed similar or even better patency rates in above-knee reconstructions compared to ePTFE grafts in clinical trials [4, 5]. Further development targeting the microstructure of the graft wall offered bi-, tri-, and quadri-laminal designs of the grafts with a scaffold mesh coated by specific fibers, mostly analogs of collagen and elastin, in order to mimic the natural structure of the wall and manipulate its mechanical properties, porosity, and surface properties of the inner layer to minimize the risk intimal hyperplasia or thrombosis [6–8]. However, these innovative grafts underwent limited clinical testing and there has not been a clear example of their bedside success [9].

Collagen is a natural polymer that has immunological properties that play a role in the incorporation of the graft into the body on the outer side and endothelialization on the inner side [10]. Common sources of collagen for medical purposes include bovine and porcine tissues, but recombinant human collagen is available as well. Recently, collagen from marine life forms and freshwater fish has been increasingly utilized due to their wide availability and suggested immunomodulatory properties [11]. To our best knowledge, no previous study compared the immunological response to collagen of bovine and freshwater fish origin.

The implantation of biomaterials always initiates an acute inflammatory response that can lead to disintegration and demarcation of the implant or persist as a chronic inflammatory process. The cascade of reactions by the host to the implanted material called the foreign body reaction is essentially an inflammatory response and persists as long as the implanted material is present. This reaction is influenced by the type of the implant, by the site of implantation, and it is species-dependent [12]. Therefore, assessing the nature, duration, and intensity of the immune response against the implanted material and its comparison with other known materials is essential to evaluate its biocompatibility [11].

An inflammatory response is induced at any site that has been damaged. Chemokines and cytokines regulate leukocyte migration and activation, differentiation, and an expression of adhesion molecules on leukocytes and endothelial cells. The production of proinflammatory and regulatory cytokines correlates with the intensity of the inflammatory response. Therefore, it can be used as a marker of its severity and extent [11, 13].

The aim of this study was to assess the systemic and local immunological response to subcutaneous implants of a vascular graft covered with collagen extracted from the European carp (freshwater fish) or with collagen of bovine origin.

2. Materials and Methods

This 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.

In this experimental study, we compared the systemic and local inflammatory response to subcutaneous implants of a vascular graft covered with pure bovine or carp (*Cyprinus carpio*) collagen in an animal model.

2.1. Animals. The animal model chosen for this study was Balb/c/Ola inbred female mouse (AnLab, Czech Republic). The mice were 8 weeks old at the beginning of the experiment and were housed under specific-pathogen-free conditions with free access to food and water and 12 hours dark/12 hours light cycle.

2.2. Implant. A sterile square piece (size, 5 × 5 mm; weight, 17 mg, Figure 1) of a vascular graft covered by pure bovine (*Bos taurus*) or carp (*Cyprinus carpio*) collagen (DCM Collagen, Czech Republic) was used as the implant in BOV (14 animals) or CYP (14 animals) groups, respectively [2, 14]. A sham operation control group (C) of 12 animals and no implant served as the control.

Briefly, the vascular graft had a three-layer structure and an internal diameter of 6 mm. The scaffold (middle layer) was manufactured from a polyester knitted mesh which was covered with collagen from the inner and outer sides using an extrusion device [2]. Both grafts were extruded from 8 wt% aqueous collagen dispersion.

2.3. Implantation. Each animal was shaved at its dorsum one day before the procedure. General anesthesia was introduced with 2% isoflurane and maintained with 1.5% isoflurane inhalation. Then the operation field was swabbed with iodopovidone (Betadine, Mundipharma, Switzerland). A small incision was created and the implant (marked with 5-0 Prolene filament) was inserted subcutaneously 1 cm away from the incision site (Figure 1). The incision was then closed with Prolene 5-0 (Ethicon) suture. In addition to the two experimental groups (BOV, CYP), twelve mice (C) underwent a sham operation to control for the effect of wound healing on the inflammatory reaction.

2.4. Postoperative Procedures. Each mouse was moved to a recovery area and monitored. Once recovered, the animals were returned to the cage and observed daily for overall health, macroscopic changes of the wound, and signs of pain.

Seven days after implantation, one-half of the animals from each group were selected for termination. The rest of the animals were sacrificed and analyzed 14 days after implantation. The mice were sacrificed by exsanguination under deep Narcotan anesthesia. The collected samples included blood for serum, spleen, and implant with surrounding tissue.

2.5. Serum Cytokine Levels. Mean cytokine levels in serum of experimental groups (BOV, CYP) and control group (C) were determined using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 7 days and 14 days after surgery. To measure the concentration of IL-1 β , IL-4, IL-10, IL-13, TNF- α , and IFN- γ , an ELISA kit (DuoSet, R&D Systems, USA) was used according to the manufacturer's instructions.

2.6. Tissue Culture. Spleen cell cultures were used for *in vitro* testing of lymphocyte proliferation and cytokine secretion.



FIGURE 1: A square piece obtained from the collagen-coated vascular graft (left). Operation in the sham group (middle) and the experimental group (right).

Mouse mononuclear leukocytes (MML) were isolated from individual spleens by homogenization in a glass tissue grinder and by centrifugation. All cell cultures were conducted in RPMI 1640 medium with L-glutamine and sodium bicarbonate, 40 mg/l gentamicin, 0.002 mol/l HEPES (hydroxyethyl-piperazineethanesulfonic acid), and 5% FCS (fetal calf serum) for both cytokine secretion and proliferation test (Sigma-Aldrich, USA). The number of viable cells present in cultures of mouse splenocytes was determined with trypan blue exclusion method. Equal parts of 0.4% trypan blue dye and cell suspension were mixed, incubated for 2 minutes, and immediately counted. Cell viability was good, above 85%.

2.7. Cytokine Production Analysis. Cultures of mouse splenocytes (1.1×10^6 per well of 1.9 cm^2) were incubated in 1 ml of a supplemented RPMI 1640 medium alone (negative control), with pokeweed mitogen (PWM; $1 \mu\text{g}/\text{ml}$; positive control; Sigma-Aldrich, USA), with bovine and carp gel ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$), and with bovine and carp implant ($0.5 \text{ mg}/\text{ml}$). The cultures were incubated at 37°C in a humid atmosphere with 5% CO_2 in 24-well plates for 72 hours; then culture supernatants were harvested and the concentration of IL-1 β , IL-4, IL-10, IL-13, TNF- α , and IFN- γ was determined using ELISA kit (DuoSet, R&D Systems, USA) according to the manufacturer's instructions.

2.8. Cell Proliferation Test (Blast Transformation Test). Cell proliferation was performed in 96-well polystyrene flat-bottomed microcultivation plates (Gama, Czech Republic) with 2×10^5 cells in 0.25 ml per well. Stimulators were added in the volume of 50 μl . PWM was used as a positive control in a concentration of $1 \mu\text{g}/\text{ml}$. Splenocyte cultures were stimulated with bovine and carp gel (both in the same concentration of $1 \mu\text{g}/\text{ml}$), and with 0.5 mg bovine and carp implant pieces per 1 ml of cell culture.

After 48 h incubation, an 18 h pulse of ^3H -thymidine (57 kBq; Lacomel, Czech Republic) was added. The cultures were harvested on a glass fiber Filtermat A (Wallac Oy, Belgium) by a 96 Mach 3 Harvester (Tomtec, Germany) and counted with 1450 MicroBeta counter (Wallac Oy, Belgium) using melt-on scintillator 1450-441 Metilex A (Wallac Oy, Belgium).

2.9. Local Expression of Cytokine RNA. For detailed characterization of microenvironment from the site of implantation, we analyzed and compared local expression of IL-6, IL-10, TNF- α , TGF- β , CCL-2, and CCL-3.

2.10. RNA Isolation. The small piece of tissue from the place of implantation was removed from each mouse, placed into RNA Stabilization Reagent (Qiagen, USA) and frozen at -80°C for later analysis. Later, total RNA was extracted from explanted tissue using RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen, USA) designed for optimal lysis of fiber-rich tissues and purification of high-quality total RNA. Briefly, 25-30 mg tissue was homogenized with Ultra-Turrax T8 homogenizer (IKA, Germany) and incubated with proteinase K at 55°C for 10 minutes. Then RNA was isolated following the manufacturer's instructions. The purity of the RNA was assessed by the ratio of absorbance at 260 and 280 nm. RNA purity was within the range of 2.0-2.1. The total RNA concentration was estimated by spectrophotometric measurements at 260 nm assuming that 44 μg of RNA per milliliter equals one absorbance unit. RNA was stored in aliquots at -20°C until used for reverse transcription.

2.11. Real-Time PCR. RNA was converted to cDNA using Taq-Man reverse transcription reagents (Applied Biosystems, USA). One microgram of total RNA was used to generate cDNA and then 50 ng of a cDNA was used for quantitative PCR analysis for each reaction. The PCR reaction of 40 cycles was performed using primers of interleukins (IL-6, IL-10), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), transforming growth factor beta (TGF- β), monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1/CCL-2), macrophage inflammatory protein 1a (MIP-1a/CCL-3), and the control gene β -actin (Applied Biosystems, USA).

The final reaction volume of 25 μl contained 20 μl of reaction mix and 5 μl of cDNA, each sample was analyzed in duplicate. The PCR reaction was run on a 7300 real-time PCR System (Applied Biosystems, USA) under standard conditions.

2.12. Statistical Analysis. Statistical tests were performed using Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)

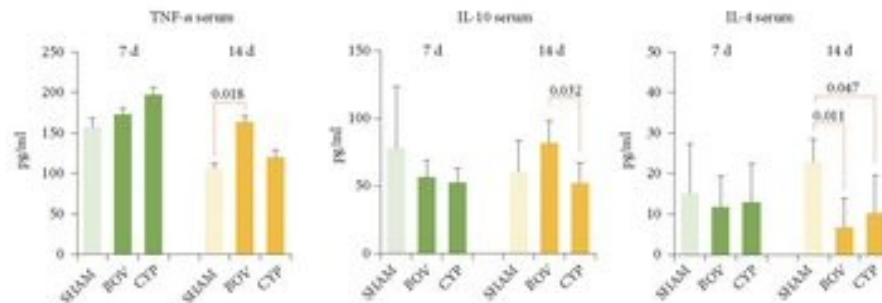


FIGURE 2: Mean cytokine levels (pg/ml) in serum of experimental groups (BOV, CYP) and control group (SHAM) determined using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 7 days (green bars) and 14 days (yellow bars) after surgery.

and R (R Core Team, Vienna, Austria). We used ANOVA with Tukey's HSD post hoc tests and the *t*-test to test for statistical significance. A *p*-value below 0.05 was considered significant.

3. Results

3.1. In Vivo Observation. All animals survived the surgical procedure and thrived well and did not show any signs of depression or pain and there were no complications of wound healing.

3.2. Serum Cytokine Levels. The concentration of the serum cytokines is presented in Figure 2. We found no difference among control, BOV, and CYP groups in mean serum cytokine levels (TNF- α , IL-4, and IL-10) at seven days after the surgery. At day 14, the BOV group had higher levels of TNF- α (163 \pm 34pg/ml vs. 107 \pm 27pg/ml, *P*=0.018), the level of IL-10 was higher in the BOV group compared to the CYP group (81.6 \pm 18.1pg/ml vs. 51.7 \pm 16.5pg/ml, *P*=.032), and both the BOV and CYP groups had lower levels of IL-4 (6.7 \pm 2.2pg/ml and 10.2 \pm 9.3pg/ml vs. 23.0 \pm 5.4pg/ml, *P*=.011 and *P*=.047, respectively) compared to the control group. Cytokine levels of IL-1 β , IL-13, and IFN- γ were below the detection limit.

3.3. Cytokine Production Analysis. Both tested implants showed only a minimal effect on the production of selected cytokines. Cytokine levels of IL-1 β , IL-13, and IFN- γ were below the detection limit (\leq 7 pg/ml) in both the serum and culture supernatant. Furthermore, there was no significant difference among the cytokine responses of sham-operated control mice and response to collagen-implanted mice of both groups in cytokine levels of TNF- α , IL-10, or IL-4 (Figure 3).

3.4. Cell Proliferation (Blast Transformation Test). Cell proliferation in the CYP group stimulated by CYP gel at 14 days was significantly lower than by BOV gel in BOV group (*P*=.0031) or by CYP gel in control group (*P*=.041, Figure 4).

3.5. Local Expression of Cytokine RNA. We found no significant difference between the control group and the BOV or CYP groups in the expression of IL-6, IL-10, TGF- β , or CCL-2 both at 7 and at 14 days after implantation (Figure 5). At 14 days, TNF- α levels were higher in the CYP group (1.23 \pm 0.30) compared to the BOV group (0.76 \pm 0.24, *P*=.013).

4. Discussion

This experimental study showed that implant of a vascular graft covered with carp collagen has at least comparable immunogenicity with regard to circulating cytokine levels, stimulated cytokine production and cell proliferation, and local expression of cytokine RNA as graft covered with bovine collagen in a mouse model.

In medicine, collagen is mostly used as wound dressing material, as a scaffold for tissue regeneration, or as a biodegradable mechanical support for hollow viscus (stents) or in orthopedics (screws) [15, 16]. The process of extraction of collagen fibers has repeatedly been described in numerous species including marine life forms and freshwater fish [17, 18]. Apart from pure mechanical support, fish collagen known for its low antigenicity also promotes spatial cell organization by intercellular signaling and cell adhesion and modulates local inflammatory reaction [19, 20]. Intravascular deployment of collagen-based or coated structures is more challenging. Beside programming mechanical properties by the arrangement of the fibers and supporting scaffold, antigenicity and thrombogenicity have to be rigorously tested [21].

To determine the nature and intensity of the inflammatory response to the implant covered with carp collagen and compare it to that induced by bovine collagen covered implant, we chose albino mice BALB/c strain, which has been previously shown to be responsive to collagens [22, 23]. We measured the serum level of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-4, IL-10, IL-13, TNF- α , and IFN- γ), their secretion by *in vitro* stimulated splenocytes, proliferating activity of *in vitro* stimulated splenocytes, and

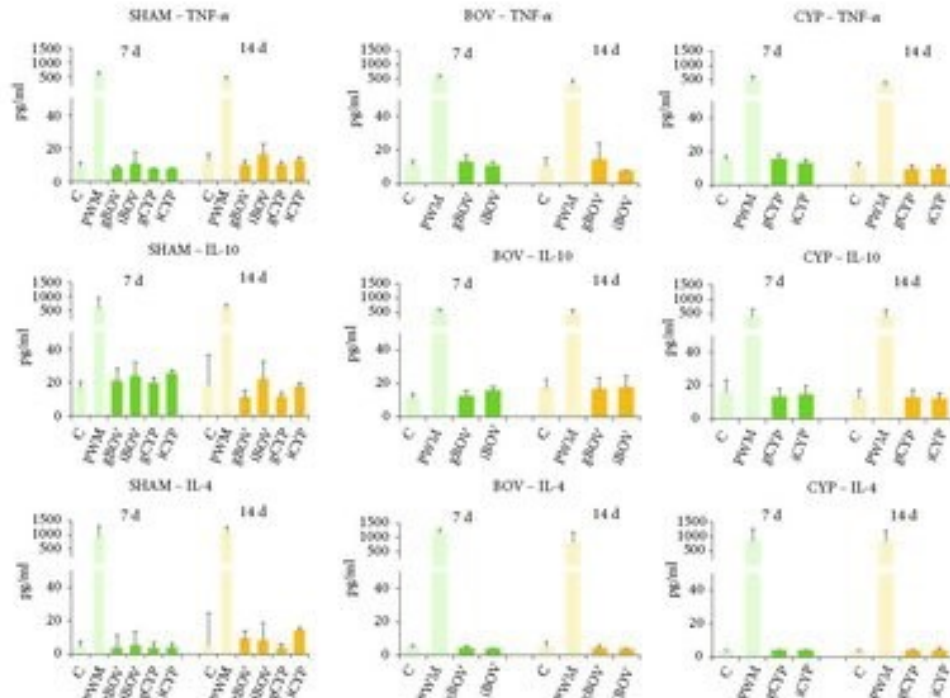


FIGURE 3: Mean cytokine levels (pg/ml) in supernatants of *in vitro* stimulated splenocytes of implanted (BOV, CYP) and control groups (SHAM) determined using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 7 days (green bars) and 14 days (yellow bars) after surgery. Cultures of mouse splenocytes were incubated in supplemented RPMI 1640 medium alone (C, negative control), with pokeweed mitogen (PWM, positive control), with bovine and carp gel (gBOV or gCYP), and bovine and carp implant (BOV or BOY). After a 72-hour incubation, the cultures were centrifuged and cytokine expression was measured in supernatants. All differences are not significant.

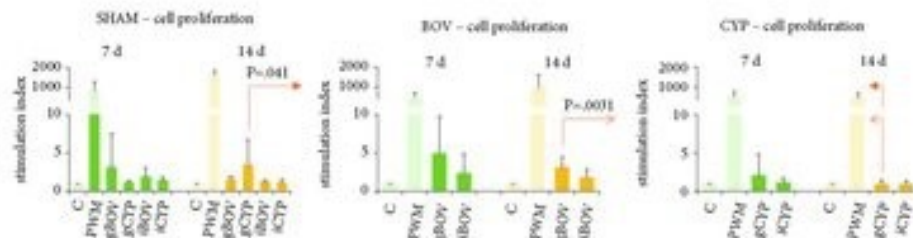


FIGURE 4: Cell proliferation of *in vitro* stimulated splenocytes of implanted (BOV, CYP) and control groups (SHAM) determined 7 days (green bars) and 14 days (yellow bars) after surgery expressed as stimulation index. Cultures of mouse splenocytes were incubated in supplemented RPMI 1640 medium alone (C, negative control), with pokeweed mitogen (PWM, positive control), with bovine and carp gel (gBOV or gCYP), and bovine and carp implant (BOV or BOY). After 48h incubation, an 18h pulse of ³H-thymidine (37 kBq) was added. Its incorporation by mouse lymphocytes was measured by a beta-counter. The results are expressed as stimulation index - mean activity (count per minute) relative to the negative control (K). Cell proliferation in the CYP group by CYP gel at 14 days was significantly lower than by BOV gel in BOV group (P=.0031) or by CYP gel in control group (P=.041).

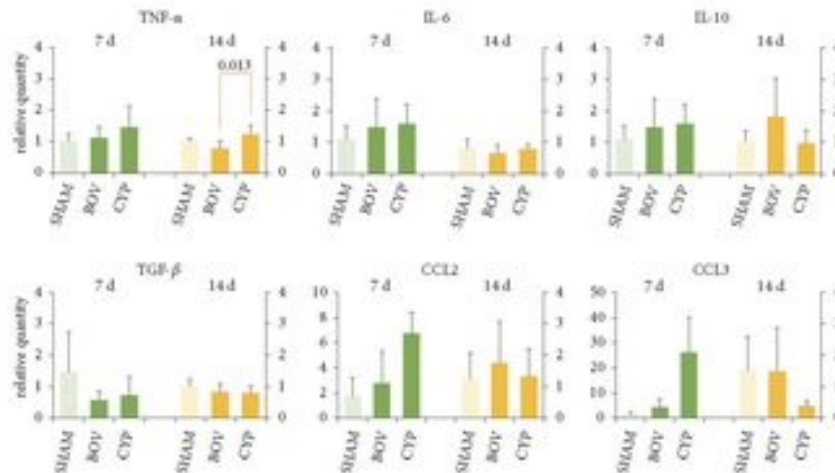


FIGURE 5: RNA relative quantity (RQ) in implant surrounding micro-environment tissue. Results are calculated from normalized gene expression data. The RQ values indicate the difference between the implanted group (BOV, CYP) and controls (SHAM). For each group, the RQ values are charted as average \pm SD. Statistical analysis showed decreased TNF-alpha in BOV at 14 days.

local production of selected cytokine (TNF- α , IL-6, IL-10, TGF- β) and chemokine (CCL2 and CCL3) mRNA as previously done by our group and others [11, 15].

In general, many chemokines (e.g., CCL2 and CCL3) are involved in the recruitment of inflammatory macrophages, and cytokines (e.g., IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, IFN- γ , and TGF- β) determine the behavior of macrophages through different pathways of activation. Furthermore, the cytokines IL-4 and IL-13 can induce multiple fusogenic effects, which result in membrane fusion and giant cell formation and are responsible for the polarization of immunity towards Th2 response and IgE mediated allergy [24]. In addition, many of these mediators are also involved in the regulation of proteolysis and cellular phagocytosis of collagen [12].

Values of serum TNF- α in naïve mice depend on the mouse strain, analytic technique, and even housing conditions. According to some authors, serum level of TNF- α in healthy unstimulated mice is low (≤ 20 pg/ml, ELISA test) [25, 26]. But we and also others [27, 28] measured higher TNF- α values (range 100-200 pg/ml) in the sera of the control mice. Furthermore, in our study, serum levels of TNF- α were similar in each group of mice no matter what group (control or implanted) it was. It must be noted that control mice underwent all procedures as implanted animals, including surgery, and that all animals were doing well after the surgery. There was no difference among the groups. Higher levels of TNF- α are found in inflammatory and infectious conditions; it has been confirmed that serum and tissue levels of this cytokine correlate with the severity of the inflammation. Values of serum TNF- α in stimulated mice can reach up to 1-10 ng/ml [29].

Based on our pilot experiments, we decided to assess the immune response at day 7 and day 14 after the implantation, as we observed high activity of systemic response in these days that was later decreasing [30]. We focused on monitoring the immune response to implant at the following time points after implantation that were related to the distinct phases of the foreign body reaction in mice: one week (early progression) and two weeks (intermediate progression) [12]. We did not monitor the early phase of the response as the focus of our interest was a specific response to collagen, which develops up to several days after activation. Furthermore, this onset phase of response is strongly influenced by surgery.

The spectrum of tested cytokines provides basic orientation in the reactivity of the organism to the implant [22, 30]. Very low levels of both pro- and anti-inflammatory cytokines in serum and in supernatants of stimulated splenocytes are indicative of a good tolerance of the implant. Lower concentrations of IL-4 in serum in BOV and CYP group and at 14 days compared to the sham group and lower proliferation activity of splenocytes stimulated by the carp collagen compared both to the sham and BOV groups at 14 days may be explained by the immunomodulatory effect of the collagen which is more pronounced in the CYP type described by other authors [19, 20].

The difference in the production of TNF- α RNA in the microenvironment surrounding the BOV and CYP implants at two weeks should be regarded in the perspective of the low levels of other mediators in all groups (including sham) and the absence of any significant difference between the sham and CYP groups as a merely faster decrease of this cytokine in the BOV group.

In general, our findings of low immunological reactivity to fish collagen in an animal model are in agreement with previously conducted research on the biocompatibility of collagen extracted from marine and freshwater sources by other research groups [11, 31]. Immunological response to collagen material depends on collagen source as well as the processing of the collagen product including crosslinking, softening, and sterilization. For these reasons, we tested the reactivity of mice to the final prosthetic graft [32].

Because implants impregnated with the carp collagen induce only a mild immune reaction in mice or even slightly downmodulate the reaction, we believe that they can be a substitute to bovine collagen in the future. Further preclinical evaluation of the implants is warranted to assess whether carp collagen coated vascular prostheses influence thrombogenicity and patency in the long term. On a macroscopic level, the mechanical stability of the implants and their integration into the body need to be studied as well [2, 30].

This study has several limitations. Firstly, we attempted to minimize the number of study animals, which were divided into a total of six groups (sham, BOV, CYP) terminated at 7 and 14 days. Secondly, we used only a selected range of methods for the analysis of the immunological response. Other methods such as western blotting or immunofluorescence microscopy could have contributed to a better insight into the data. Thirdly, the research was performed in an animal model and the results cannot be generalized to humans. Lastly, the assessment of biocompatibility was performed only in the short term.

5. Conclusions

Vascular implants covered with carp collagen induce a minimal immunological response that is comparable to that of bovine collagen covered implants. These findings pave the way for the design and preclinical evaluation of a carp collagen coated vascular implants.

Data Availability

All data are included in the manuscript.

Conflicts of Interest

The authors state that there are no conflicts of interest regarding the publication of this article.

Acknowledgments

This study was supported by the Czech Ministry of Health [Grant no. 15-27941A].

References

[1] G. K. Ambler and C. P. Twine, "Graft type for femoro-popliteal bypass surgery," *Cochrane Database of Systematic Reviews*, vol. 2, Article ID CD001487, 2018.

[2] T. Grus, L. Lambert, M. Micek et al., "In vivo evaluation of short-term performance of new three-layer collagen-based vascular graft designed for low-flow peripheral vascular reconstruction," *BioMed Research International*, vol. 2018, Article ID 3595996, 7 pages, 2018.

[3] R. H. Samson, R. Morales, D. P. Showalter, M. R. Lepore, and D. G. Nair, "Heparin-bonded expanded polytetrafluoroethylene femoropopliteal bypass grafts outperform expanded polytetrafluoroethylene grafts without heparin in a long-term comparison," *Journal of Vascular Surgery*, vol. 64, no. 3, pp. 638-647, 2016.

[4] L. J. Rychlik, P. Dawey, J. Murphy, and M. E. O'Donnell, "A meta-analysis to compare Dacron versus polytetrafluoroethylene grafts for above-knee femoropopliteal artery bypass," *Journal of Vascular Surgery*, vol. 60, no. 2, pp. 506-505, 2014.

[5] J. Chlopáč, E. Filová, and L. Bacáková, "Blood vessel replacement: 50 years of development and tissue engineering paradigms in vascular surgery," *Physiological Research*, vol. 58, Suppl 2, pp. S119-S130, 2009.

[6] M. J. McClure, S. A. Sell, D. G. Simpson, B. H. Walpoth, and G. L. Bowlin, "A three-layered electrospun matrix to mimic native arterial architecture using polycaprolactone, elastin, and collagen: a preliminary study," *Acta Biomaterialia*, vol. 6, no. 7, pp. 2422-2433, 2010.

[7] S. Sarkar, H. J. Salacinski, G. Hamilton, and A. M. Seifalian, "The mechanical properties of infrapopliteal vascular bypass grafts: their role in influencing patency," *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, vol. 31, no. 6, pp. 627-636, 2006.

[8] V. A. Kumar, J. M. Caves, C. A. Haller et al., "Acellular vascular grafts generated from collagen and elastin analogs," *Acta Biomaterialia*, vol. 9, no. 9, pp. 8067-8074, 2013.

[9] S. Sarkar, T. Schmitz-Fixen, G. Hamilton, and A. M. Seifalian, "Achieving the ideal properties for vascular bypass grafts using a tissue engineered approach: A review," *Medical & Biological Engineering & Computing*, vol. 45, no. 4, pp. 327-336, 2007.

[10] R. Parenteau-Bareil, R. Gauvin, and F. Berthod, "Collagen-based biomaterials for tissue engineering applications," *Materials*, vol. 3, no. 3, pp. 1863-1887, 2010.

[11] K. Yamamoto, K. Igawa, K. Sugimoto et al., "Biological safety of fish (tilapia) collagen," *BioMed Research International*, vol. 2014, Article ID 650757, 9 pages, 2014.

[12] Q. Ye, *Molecular and Cellular Mechanisms of Collagen Degradation in the Foreign Body Reaction*, University of Groningen, 2013, <http://rx.uh.rug.nl/yppn/356097064>.

[13] P. Zarrif, A. Tschoppá, M. Havlíková et al., "Adjuvant effect of *Bacillus firmus* on the expression of cytokines and toll-like receptors in mouse nasopharynx-associated lymphoid tissue (NALT) after intranasal immunization with inactivated influenza virus type A," *Immunology Letters*, vol. 134, no. 1, pp. 26-34, 2010.

[14] M. Spáček, H. Chlopáč, E. Mitas et al., "Three-layer collagen-based vascular graft designed for low-flow peripheral vascular reconstructions," *Journal of Applied Biomedicine*, vol. 17, no. 1, 2019.

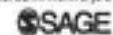
[15] C. Jinno, N. Morimoto, R. Ito et al., "A comparison of conventional collagen sponge and collagen-gelatin sponge in wound healing," *BioMed Research International*, vol. 2016, Article ID 4567146, 8 pages, 2016.


[16] S. Yamada, K. Yamamoto, Ta. Ikeda, K. Yanagisuchi, and Y. Hayashi, "Potency of fish collagen as a scaffold for regenerative medicine," *BioMed Research International*, vol. 2014, Article ID 302912, 8 pages, 2014.

- [17] M. Ogawa, M. W. Moody, R. J. Portier, J. Bell, M. A. Schenayder, and J. N. Losso, "Biochemical properties of black drum and sheephead seabream skin collagen," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 51, no. 27, pp. 8088–8092, 2003.
- [18] S. Kimura, Y. Miyachi, and N. Uchida, "Scale and bone type I collagens of carp (*Cyprinus carpio*)," *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry and Physiology*, vol. 99, no. 2, pp. 473–476, 1991.
- [19] F. Subhan, H. Y. Kang, Y. Lim et al., "Fish scale collagen peptides protect against CoCl₂/TNF- α -induced cytotoxicity and inflammation via inhibition of ROS, MAPK, and NF- κ B pathways in HaCaT cells," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2017, Article ID 9703609, 17 pages, 2017.
- [20] C. Liu, X. Liu, Y. Xue, Y. Ding, and J. Sun, "Hydrolyzed tilapia fish collagen modulates the biological behavior of macrophages under inflammatory conditions," *RSC Advances*, vol. 5, no. 59, pp. 30727–30736, 2015.
- [21] J. Foerst, M. Vorpahl, M. Engelhardt, T. Koehler, K. Throch, and R. Westdy, "Evolution of coronary stents from bare-metal stents to fully biodegradable, drug-eluting stents," *Combination Products in Therapy*, vol. 3, no. 1-2, pp. 9–24, 2013.
- [22] F. Pati, P. Datta, B. Adhikari, S. Dhara, K. Ghosh, and P. K. D. Mohapatra, "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.
- [23] H. Nowack, E. Hahn, C. S. David, R. Timpl, and D. Götz, "Immune response to calf collagen type I in mice: A combined control of Ir-1A and non H-2 linked genes," *Immunogenetics*, vol. 2, no. 1, pp. 331–335, 1975.
- [24] S. J. Van Dyken and R. M. Locksley, "Interleukin-4 and interleukin-13-mediated alternatively activated macrophages: Roles in homeostasis and disease," *Annual Review of Immunology*, vol. 31, pp. 317–343, 2013.
- [25] M. Kramer, S. Dadou, M. Hasanreisoglu et al., "Proinflammatory cytokines in a mouse model of central retinal artery occlusion," *Molecular Vision*, vol. 15, pp. 885–894, 2009.
- [26] J. Lee, W. Yang, A. Hostetler et al., "Characterization of the anti-inflammatory *Lactobacillus reuteri* BM36301 and its probiotic benefits on aged mice," *BMC Microbiology*, vol. 16, no. 1, p. 69, 2016.
- [27] F. Jiang, J. He, N. Navarro-Alvarez et al., "Elongation factor Tu and heat shock protein 70 are membrane-associated proteins from *Mycoplasma ovipneumoniae* capable of inducing strong immune response in mice," *PLoS ONE*, vol. 11, no. 8, Article ID e0181170, 2016.
- [28] A. A. Qureshi, J. C. Reis, C. J. Papasian, D. C. Morrison, and N. Qureshi, "Tocotrienols inhibit lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory cytokines in macrophages of female mice," *Lipids in Health and Disease*, vol. 9, no. 1, p. 143, 2010.
- [29] R. Blanqué, C. Meakin, S. Millet, and C. R. Gardner, "Selective enhancement of LPS-induced serum TNF- α production by carrageenan pretreatment in mice," *General Pharmacology: The Vascular System*, vol. 31, no. 2, pp. 301–306, 1998.
- [30] Q. Ye, M. C. Harmsen, M. J. A. van Luyn, and R. A. Bank, "The relationship between collagen scaffold cross-linking agents and neutrophils in the foreign body reaction," *Biomaterials*, vol. 31, no. 35, pp. 9192–9201, 2010.
- [31] E. Song, S. Yeon Kim, T. Chua, H.-J. Byun, and Y. M. Lee, "Collagen scaffolds derived from a marine source and their biocompatibility," *Biomaterials*, vol. 27, no. 15, pp. 2951–2961, 2006.
- [32] W. Friess, "Collagen—biomaterial for drug delivery," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 45, no. 2, pp. 113–136, 1998.

A novel gentamicin-releasing wound dressing prepared from freshwater fish *Cyprinus carpio* collagen cross-linked with carbodiimide

Journal of Bioactive and
Compatible Polymers
2019, Vol. 34(3) 246–262
© The Author(s) 2019
Article reuse guidelines:
sagepub.com/journals-permissions
DOI: 10.1177/0883911519835143
journals.sagepub.com/home/jbc



Peter Lukáč¹, Jan Miroslav Hartinger² ,
Mikuláš Mlček³, Michaela Popková³,
Tomáš Suchý^{4,5}, Monika Šupová⁴, Jan Závora⁶,
Václava Adámková⁶, Hana Benáková⁶,
Ondřej Slanař², Martin Bartoš⁷, Hynek Chlup⁵,
Lukáš Lambert⁸ and Tomáš Grus¹

Abstract

Our study presents a novel collagen wound dressing prepared from freshwater fish skin (*Cyprinus Carpio*) collagen type I. Half of the sponges were cross-linked with carbodiimide. The cross-linked and non-cross-linked collagen sponges were subsequently impregnated with gentamicin

¹2nd Department of Surgery - Department of Cardiovascular Surgery, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Czech Republic

²Department of Clinical Pharmacology and Pharmacy, Institute of Pharmacology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic

³Institute of Physiology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic

⁴Department of Composites and Carbon Materials, Institute of Rock Structure and Mechanics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic

⁵Department of Mechanics, Biomechanics and Mechatronics, Faculty of Mechanical Engineering, Czech Technical University in Prague, Prague, Czech Republic

⁶Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic

⁷Department of Stomatology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic

⁸Department of Radiology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic

Corresponding author:

Jan Hartinger, Department of Clinical Pharmacology and Pharmacy, Institute of Pharmacology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Na Bojišti 1, Praha 2, 128 08, Czech Republic.
Email: hartinger.jan@vfn.cz

and lyophilized thus allowing for the attainment of the appropriate gentamicin content without the removal thereof during the cross-linking stage. The structure was evaluated via micro-CT and infrared spectrometry and the structural stability and gentamicin release properties were evaluated in phosphate buffer solution. The sponges were further tested via a rat model of an infected wound with *Pseudomonas aeruginosa* inoculation and compared with a reference commercial product. The sponges thus prepared provided a degree of open porosity that was comparable to or higher than that of the reference commercial product. Spectrometry analysis revealed that the cross-linked collagen sponge and reference commercial product sponge preserved their secondary collagen structure after 168 h while early accelerated degradation was observed with respect to the non-cross-linked collagen sponge. Gentamicin was released rapidly from all the sponges. Compared to those animals with gentamicin-containing sponges or gentamicin administered intramuscularly, the animals with the cross-linked collagen sponge without gentamicin exhibited marked clinical and laboratory infection signs. Both the administration routes (intramuscular and via gentamicin-containing sponges) provided similar gentamicin plasma levels. The resulting highly homogeneous product which was characterized by excellent structural and clinical properties proved effective in terms of the treatment of a surgical wound infection in a rat model. We demonstrated that all the gentamicin was released from the sponge and was absorbed in the systemic circulation. This is the first time that *Cyprinus Carpio* collagen has been used in the preparation of wound dressings. Thus, gentamicin-containing sponges provide a promising tool for the treatment and prevention of surgical site infections.

Keywords

Carp, freshwater fish, collagen, sponge, gentamicin, wound, infection, rat, cross-linking

Introduction

Surgical site infections may lead to a marked worsening in patient outcomes and represent a financial burden due to prolonged hospital stay.¹ Local antibiotic treatment has been proven to provide an effective way in which to reduce wound infection at the surgical site.^{2,3} Collagen-based materials have been successfully tested and clinically applied as wound dressings⁴ as well as effective antibiotic delivery matrices for the prevention and treatment of post-operative wound infection.⁵

Even though collagen derived from mammals (especially bovine, equine, and porcine collagen) represents the most widely studied collagen type to date in terms of medical use,⁶ it exhibits antigenic properties that may cause allergic reactions in as much as 3%–4% of the population even after telopeptides (the most antigenic part of the molecule) have been removed.⁷ Bovine collagen entails the risk of

bovine spongiform encephalopathy, transmissible spongiform encephalopathy, and foot-and-mouth disease contamination.⁸ Moreover, the application of porcine collagen may present a problem for religious reasons. Thus, increasing attention is being devoted to alternative sources of collagen, especially fish skin and bone. Freshwater fish scale collagen is less antigenic than its mammalian counterparts, exhibits excellent biocompatibility, and promotes direct cell adhesion⁹ and differentiation.¹⁰ A further advantage of fish collagen is that it does not bear the risk of the transmission of ruminant zoonosis,^{10,11} thus rendering wound dressings made from fish collagen potentially safer than those based on other collagens.

The critical features that complicate the clinical use of fish collagen are that its denaturation temperature is lower than that of the human body and that its properties vary not only between species but also according to other factors, especially the temperature in which the

fish lived.¹² Therefore, fish collagen must be stabilized by means of cross-linking so as to obtain a product with reproducible properties that do not degrade and dissolve in blood and wound secretions.¹³ In this respect, carbodiimide may serve as a nontoxic, biocompatible cross-linking agent for obtaining collagen products with stable properties that can be approved for clinical use.^{13,14} Cross-linked fish collagen materials have been proven to be highly biocompatible.¹⁵

Several antibiotic-releasing collagen sponges or beads produced from various materials intended for local treatment use are currently being investigated or are already commercially available.^{5,6,16} Gentamicin makes up the most frequently studied and clinically applied antibiotic with respect to collagen-based drug delivery systems and, moreover, it has already been approved for clinical use. Gentamicin is suitable for post-operative wound treatment applications since it is highly active against G- and, in high concentrations, against G+ bacteria.⁵ In clinical practice, gentamicin-containing collagen sponges provide an effective tool for preventing infection at various sites.^{5,17,18} Several studies have investigated the gentamicin deposition capacity of collagen sponges with comparable results. Gentamicin is almost entirely released as a bolus in the first 30 min and only a minimal amount of the drug is released or remains at the site of application after this time.¹⁹ In vivo experiments on rabbits have revealed that even though most of the gentamicin is released and washed out immediately, clinically significant concentrations remain locally for as long as 10 days.²⁰ Moreover, with respect to post-operative wound drainage following the abdominoperineal extirpation of rectal cancer, gentamicin concentrations have been found to be significantly above the minimum inhibitory concentration (MIC) of sensitive pathogens after the application of 3 fleeces with 70 mg of gentamicin.⁶

Our study presents a novel collagen wound dressing sponge prepared from freshwater fish *Cyprinus carpio* (common carp) skin collagen cross-linked with carbodiimide and

co-lyophilized together with a gentamicin solution. We provide a description of both the in vitro characterization of the material and preclinical microbiological and in vivo tests of an infected wound in a rat model. We also compared the gentamicin deposition and physical properties of this novel material with a commercial equine collagen wound dressing containing gentamicin (Garamyein Schwamm®). Even though cross-linked collagen obtained from other members of the *Ciprinidae* family has been tested in vitro for biocompatibility, this is the first time collagen obtained from *Cyprinus carpio* has been combined with gentamicin in order to obtain a sponge applicable to surgical wounds and tested on an animal model of an infected wound.

Materials and methods

This study was approved by the Animal Care and Use Committee of the First Faculty of Medicine, Charles University (ref. no. MSMT-11255/2015-5), and conducted in accordance with Czech Act No. 246/1992 Coll. as amended on the protection of animals against cruelty that has been harmonized with European Union (EU) legislation.

Collagen extraction

Collagen type I was isolated from freshwater fish skin (*Cyprinus Carpio*, *Třeboň carp*) using an adaptation of a procedure published by Bell et al.²¹ The fish skins were collected and supplied by the Třeboň fishery (Třeboň, Czech Republic); all the fish were of food grade and were produced via controlled breeding. The skin was degreased for 30 min in 70% ethanol (Penta, Czech Republic) and subsequently washed in distilled water. Collagen extraction was conducted in 0.001 vol% acetic acid (Penta, Czech Republic) for 48 h under continuous stirring conditions, whereupon the mixture was centrifuged at 10,000 r/min for 1 h. The supernatant was drawn off and precipitated in 0.1 M NaOH (Penta, Czech Republic) at a ratio of 6:1

(v/v) so as to neutralize the acetic acid. The mixture was then re-centrifuged at 10,000r/min for 50 min and the supernatant discarded. The precipitated collagen in the form of a pellet was then solubilized in 0.001 vol% acetic acid. The final solution was then frozen at -15°C and lyophilized (BenchTop 4KZL, VirTis, Prague, Czech Republic). The purity of the isolated collagen was checked repeatedly using several methods. The lipid content as determined by the Schmidt-Bondzyfiski-Ratzlaff method (EN ISO 1735:2004) was 9.2 ± 1.2 wt%. The content of inorganic impurities as determined by thermogravimetric analysis was less than 0.5 wt%. The impurities were found to contain mainly calcium phosphate and sodium chloride which was proved via element analysis performed using energy dispersive spectrometry. In addition, the secondary structure of the isolated collagen was verified by means of electrophoresis and infrared spectrometry. The yield of the collagen was approximately 25 wt%, which is in accordance with the theoretical yield.²² The toxicity of the source collagen isolated from the same fish skin source and isolated using the procedure described above had already been tested by means of a biological evaluation under *in vitro* conditions using mesenchymal stem cells.²²

Preparation of the collagen sponges

Composite sponges were prepared via the following procedure: an aqueous collagen dispersion (0.8 wt%) was prepared by means of the swelling of collagen in deionized water (8°C , 1h), homogenized using a disintegrator (10,000r/min, 10min), left for 20 min at a temperature of 20°C and further homogenized (10,000r/min, 2min). The resulting dispersion was placed in separate containers with dimensions of $5 \times 5 \times 2$ cm³, frozen at -80°C for 5h and then lyophilized.

The stability of half the collagen sponges was enhanced by cross-linking with a 95% ethanol solution containing EDC (*N*-(3-dimethylamino propyl)-*N*-ethylcarbodiimide hydrochloride) and NHS (*N*-hydroxysuccinimide) at a weight ratio

of 4:1; the EDC and NHS (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) were used as received. Following a reaction period of 3h at 37°C , all the layers were washed in 0.1 M Na₂HPO₄ (Penta, Czech Republic) (2×45 min), followed by rinsing in deionized water (30min). They were then frozen at -15°C for 5h and lyophilized.

All the non-cross-linked collagen sponge (nCLCS) and cross-linked collagen sponge (CLCS) with dimensions of approximately 40×40 mm² were impregnated with 5mL of 95 wt% ethanol solution containing 21 mg of gentamicin which was applied in the form of gentamicin sulfate (Gentamicin sulfate, Dr. Kulich Pharma, s. r. o., Hradec Králové, Czech Republic). Prior to application, the content of the gentamicin in the gentamicin sulfate was determined using an analytical method described elsewhere;²⁴ medical grade pure gentamicin (GENTAMICIN LEKØ, Lek Pharmaceuticals d.d., Ljubljana) was used as the standard material. The impregnated sponges were frozen at -80°C and lyophilized. The final stage involved the cutting of the specimens into the appropriate dimensions for the subsequent analysis phase.

Both the nCLCS and CLCS loaded with gentamicin were then subjected to gamma sterilization—all the samples were packed and sealed in indicator bags and exposed to a nominal dose of 25kGy (BIOSTER, a.s., Neverská Bítýška, Czech Republic). In terms of sterilization, the reference commercial product (RCP) was used as received. The final sterilized product was used in all the experiments.

Microstructure of the collagen sponges

Scanning electron microscopy. The morphology of the sponges was characterized using scanning electron microscopy (SEM; Quanta 450 Microscope, FEI, Hillsboro, OR, USA) in high vacuum mode. Sections of the sponges were coated with a thin layer of gold in an ion sputter (Emitech K550X, Quorum Technologies, UK) prior to microscopy.

Micro-CT. The structural parameters of the sponges were quantified by means of micro-CT analysis. Projection images were acquired using a SkyScan 1272 (Bruker micro-CT, Kontich, Belgium) micro-CT device with the following scanning parameters: pixel size 3 μm ; rotation step 0.2°; source voltage 60 kV; source current 166 μA ; no filter; frame averaging 4 and rotation 180°. The specimens ($n = 3$) were attached to a specimen holder and scanned in air. The scanning time was ~2 h for each specimen. The flat-field correction was updated prior to each acquisition. Cross-section images were reconstructed from the projection images via NRecon software (Bruker micro-CT, Kontich, Belgium) using a modified Feldkamp algorithm. Three volumes of interest (VOI) subjected to analysis in the shape of a rectangular prism (3 mm \times 3 mm \times specimen thickness) were marked within each scaffold. Image-processing, binarization, and scaffold structure analysis were performed by means of CTAn (Bruker micro-CT, Kontich, Belgium) and optimized using Test Image Generator software.²⁴ Three parameters were evaluated in all. Porosity (P_o) was calculated as

$$P_o = \frac{\text{volume of open + closed pores}}{\text{VOI volume}}$$

Pore size was evaluated using a "structure separation" parameter calculated in three dimension (3D) using a sphere-fitting algorithm.^{25,26} The object surface density (OSD) was calculated as

$$OSD = \frac{\text{object surface}}{\text{VOI volume}}$$

Infrared spectrometry. The structure of the prepared samples was evaluated by means of attenuated total reflection infrared spectrometry (FTIR) using a Protégé 460 E.S.P. infrared spectrometer (Thermo Nicolet Instruments, Madison, WI, USA) equipped with an ATR device (GladiATR, PIKE Technologies, Madison, WI, USA) with a diamond crystal. All the spectra were recorded in absorption mode at a resolution of 4 cm^{-1} and 128 scans. The areas of the bands (integral absorbencies) were

determined using OMNIC 7 software (Thermo Nicolet Technologies).

Structural stability

Structural stability was analyzed via the testing of the degradation (mass loss) and swelling ratio of 8 \times 8 \times 4 mm³ collagen sponges in a phosphate buffer solution (PBS, Sigma Aldrich, Steinheim, Germany, pH = 7.4) at 37°C and in a 5% CO₂ atmosphere. The volume of the medium was maintained at a weight/volume ratio of 30 mg/15 mL. The extent of in vitro-degradation was calculated according to the following equation

$$D = \frac{W_o - W_t}{W_o} 100[\%]$$

where D is the mass loss, W_o is the initial dried weight of the sample, and W_t is the dried weight of the sample after degradation ($n = 6$). The swelling ratio (E_{sw}) was calculated using the following equation

$$E_{sw} = \frac{W_{sw} - W_o}{W_o} 100[\%]$$

where W_o is the initial dried weight of the sample, W_t is the dried weight of the sample after degradation, and W_{sw} is the weight of the swollen sample ($n = 6$). The weight of the swollen samples was measured following the removal of each sample from the medium and after a 1 min delay and the removal of any excessive medium surrounding the sample; the dried weight of the samples was measured following lyophilization.

Disk diffusion tests

Small disks of 6 mm diameter were cut from the sponges. Five disks were cut from the varicous CLCSs and various nCLCSs; a further five disks were cut from different locations on one RCP. The microbiological response was tested via the standard disk diffusion test with *Pseudomonas aeruginosa* strain CNCTC 5482.

Gentamicin release tests

Collagen sponge samples of size $1 \times 2 \text{ cm}^2$ were studied. Three samples were obtained, each from different CLCS so as to test for the variability of gentamicin content between the sponges and additional two samples were obtained from other two places in one of the tested CLCS for the study of the gentamicin distribution. Four $1 \times 2 \text{ cm}^2$ samples of the RCP (Garamycin Schwamm®, Eurocept B.V., Ankeveen) sponge were used as the reference. Each sample was submerged in 10 mL of 37°C PBS (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) in a test tube and gently rocked on a laboratory rocker placed in an incubator at 37°C. After 20, 40, 60, 120, and 240 min, the sponge samples were transferred to a newly tempered 10 mL of PBS. The PBS samples with the released gentamicin were subsequently analyzed via nephelometric immunochemical assay (GEN-kit, Synchro system, Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA) for the determination of gentamicin concentration. The analysis kit was used as received according to best laboratory practice. The analysis was performed by the analyzing laboratory according to the ISO 15189 standard. The amount of gentamicin released was calculated according to the concentration in the eluting solution. Since the amount of released gentamicin during the final 2-h exchange was only minimal and the total amount of released gentamicin matched the expected amount in the specimens, we assumed that all of the gentamicin had been released. Therefore, the sum of the gentamicin released during all of the five exchanges was regarded as the total gentamicin content in the sponge sample.

Rat model of an infected wound

Male Wistar rats ($n=24$) aged 7 weeks with a median weight of 252 g (IQR = 241–256 g) were anesthetized with isoflurane, following which approximately 1 cm long incisions were made on both sides of the back at least 2 cm apart. A *Pseudomonas aeruginosa* solution (0.5 mL, 2×10^7 CFU/mL) was then injected into a subcutaneous pocket created by means of blunt dissection on each side.

With respect to group A ($n=12$), $1 \times 1 \text{ cm}^2$ pieces of collagen sponge with gentamicin were inserted into pockets on the right side and the wounds closed using a non-resorbable monofilament suture. Concerning groups B ($n=6$) and C ($n=6$), $1 \times 1 \text{ cm}^2$ pieces of collagen sponge without gentamicin were inserted instead, 2 mg of gentamicin diluted in 0.5 mL of saline were injected intramuscularly into the thighs of the group C rats ($1 \times 1 \text{ cm}^2$ pieces of sponge containing 2 mg of gentamicin). The pockets on the left side were sutured with no sponge content as the control.

The animals were then transferred into individual cages with free access to food and water and checked daily. The body temperature was measured on the first post-implantation day and a physical examination was conducted by an experienced veterinarian blinded to the study protocol. The animals were sacrificed on the fourth post-implantation day. Tissue specimens were then excised from both of the inoculation sites and examined microbiologically (numbers of *Pseudomonas aeruginosa* colony forming unit (CFU)).

Microbiological evaluation. Tissue samples were imprinted directly on Columbia agar plates with sheep's blood (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK). The plates were then incubated at 37°C for 24 h. The colonies of *Pseudomonas aeruginosa* were counted following incubation.

Gentamicin and haptoglobin levels in the serum. Blood samples (volume, 0.5 mL) for the determination of gentamicin and haptoglobin levels were drawn from the jugular vein into a 0.5 mL heparinized syringe under isoflurane anesthesia. Samples from 3 of the animals in group A and 2 in group B were taken 1, 2, and 4 h following implantation and samples from all 6 animals in group C were taken 2 h following implantation. Samples from 3 animals from all the groups were taken 24 h following implantation. The final blood samples from all the living animals (12 in group A, 4 in group B, and 6 in group C) were taken from the heart at the time of termination (fourth post-implantation day).

The samples were centrifuged (2500r/min, 8min), following which supernatant plasma was taken and diluted with saline so as to obtain a volume of at least 0.5ml, required for sample measurement purposes. The gentamicin concentrations in the blood were analyzed as mentioned above. Haptoglobin levels (rat acute phase marker) were determined via the nephelometric method (HPT-kit, IMMAGE system, Beckman coulter, Indianapolis, IN, USA). The analysis kit was used as received according to best laboratory practice. The analysis was performed by the analyzing laboratory according to the ISO 15189 standard.

Statistical analysis

The statistical analysis was performed in Statgraphics Centurion XVII (StatPoint, Warrenton, VI, USA). The normality of the data was tested using the Shapiro-Wilk and χ^2 tests. Outliers were identified using the Grubbs or Dixon tests. Homoscedasticity was verified by means of the Levene and Bartlett tests. If either the assumption of normality or homoscedasticity were violated, the Kruskal-Wallis test with Bonferroni post hoc tests was used for the multiple comparisons and the Mann-Whitney *U* test for two-sample comparisons, and the values were expressed as the median and the interquartile range (IQR). Otherwise, analysis of variance (ANOVA) and the *t*-test were used with the values expressed as mean \pm standard deviation (*SD*). The data in the contingency tables were evaluated using Fisher's exact test. GraphPad Prism (Graph software, La Jolla, CA, USA) was used for the visualization of the microbiological, gentamicin-releasing, and in vivo tests. Statistical significance was accepted at $p \leq 0.05$.

Results

The processing of the material according to the described technique yielded material that was macroscopically similar to the RCP. Photographs and SEM images of the collagen sponges are shown in Figure 1.

Microstructure of the collagen sponges

The pore size measured via micro-CT varied between the scaffold types (Figures 1 and 2). The median pore size of the CLCS was 66 μm (IQR 42–120 μm) compared to 96 μm (IQR 54–150 μm) for the nCLCS and 72 μm (IQR 48–90 μm) for the RCP sponges (Figure 2). The open porosity values were 85.8% for the CLCS and 89.9% for the nCLCSs. Both the CLCS and nCLCS provided a degree of open porosity that was comparable to or higher than that of the RCP sponge. All the sponges exhibited a very low degree of closed porosity, that is, between 2×10^{-3} and 4×10^{-3} percent which indicated a minimal proportion of non-interconnected pores. No significant difference in the OSD was observed between the CLCS (35.5 mm^{-3}) and RCP (36.4 mm^{-3}) sponges, while the nCLCS surface density was lower (27.3 mm^{-3}), which is in agreement with both the highest assessed pore size and the open porosity.

FTIR analysis of the collagen sponges

Infrared spectrometry (FTIR) can be used as an analytical technique for the interpretation of changes in the secondary structure of collagen following various processes (isolation, cross-linking, denaturation, and sterilization). The FTIR spectra of collagen contain amide bands such as amide I bands ($\sim 1655 \text{ cm}^{-1}$) which originate from C=O stretching vibrations coupled with N-H bending vibration, amide II bands ($\sim 1555 \text{ cm}^{-1}$), and amide III bands ($\sim 1240 \text{ cm}^{-1}$) that arise from N-H bending vibrations coupled with C-N stretching vibrations (Figure 3). Amide III is composed of a band triplet at ~ 1205 , 1240, 1280 cm^{-1} . The presence of amide III together with a band at 1340 cm^{-1} provide important proof of the existence of a triple helical structure.^{27,28} The IR spectra of the studied collagen materials containing gentamicin sulfate before and after the degradation tests are shown in Figure 3.

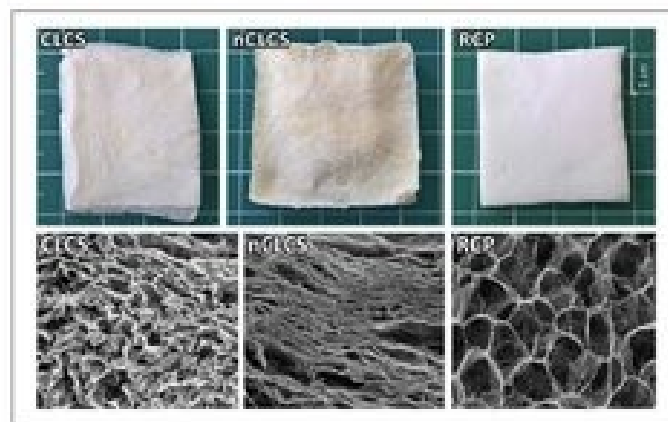


Figure 1. Photographs and SEM images ($\times 500$) of non-cross-linked (nCLCS) and cross-linked collagen sponges (CLCS), and reference commercial product (RPC) sponges.

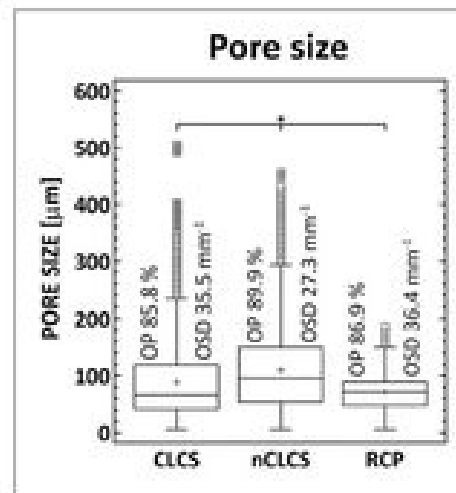


Figure 2. Comparison of pore size, open porosity (OP), and object surface density (OSD) of non-cross-linked (nCLCS) and cross-linked collagen sponges (CLCS), and reference commercial product (RPC) measured by micro-CT 3D analysis. All differences were statistically significant (Kruskal-Wallis, Bonferroni procedure, $p < 0.05$).

The infrared spectra of the three studied collagen materials that contained gentamicin sulfate before degradation exhibited similar structural features (Figure 3). The discrete absorptions visible at 1205, 1240, and 1280 cm^{-1} in the amide III region can be attributed to the unusual nature of the glycine and proline side

chains which may have exerted an effect on amide III intensity due to mixing with the CH_2 wagging vibration.²⁷ A further typical additional absorption visible in the collagen and polypeptide films at 1340 cm^{-1} provides confirmation of the collagen structure. Apparent changes in the nCLCS spectrum visible in the

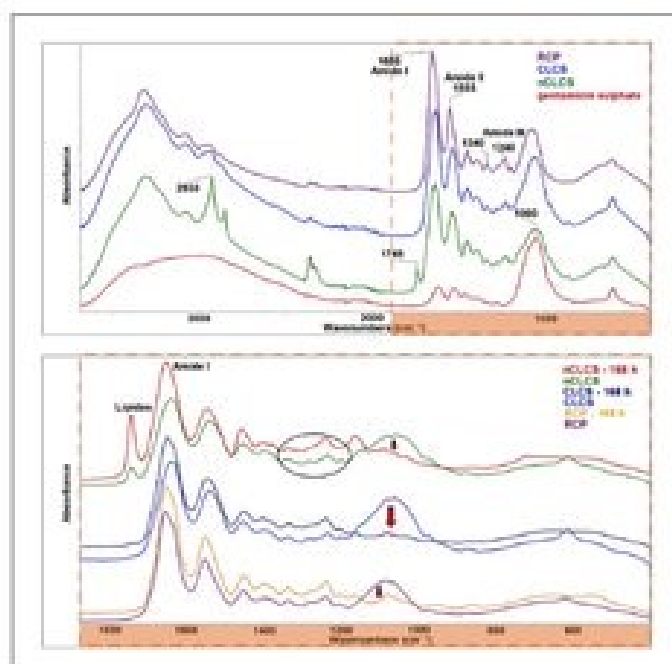


Figure 3. Infrared spectra of all studied collagen materials before (above) and after (below) degradation tests. Spectra after 168h of degradation in PBS show that both the reference commercial product (RPC) and cross-linked collagen sponges (CLCS) preserved their secondary collagen structure. Spectral changes in amide III region (black ellipse) in non-cross-linked collagen sponge (nCLCS) reflect alterations of secondary collagen structure. The disappearance of bands at 1060 cm^{-1} relating to gentamicin is apparent in all three collagen materials (red arrows).

spectral region from 1700 to 1800 cm^{-1} and 2930 cm^{-1} are related to the presence of lipids consisting of, for example, residual impurities remaining in the collagen following the isolation procedure.²⁷ The spectra of all the studied samples were seen to contain a strong and wide band at 1060 cm^{-1} , which provides proof of the presence of gentamicin in these samples.

The post-degradation spectra revealed that both the RCP and CLCS preserved their secondary collagen structures even after 168h of degradation in the PBS medium (Figure 3). In contrast, the spectral changes in the nCLCS amide III region reflect alterations in the secondary collagen structure. Non-cross-linked collagen undergoes more rapid degradation and its products are eluted to the surrounding medium more quickly than cross-linked

materials, which leads to a decrease in the ratio of amide I/lipid absorption. The disappearance of bands at 1060 cm^{-1} relating to gentamicin is apparent with respect to all three collagen materials.

Structural stability of the collagen sponges

Early accelerated degradation was observed concerning the nCLCS (Figure 4), that is, 72% after 4 h and 85% at 7 days, thus indicating the lower degree of stability of the collagen. In contrast, with respect to the CLCS and RCP, no rapid increase was observed in the degradation rate. The mass loss of the CLCS (20%, IQR) was similar to that of the RCP (up to 20%) within the first 8 h, whereas by the

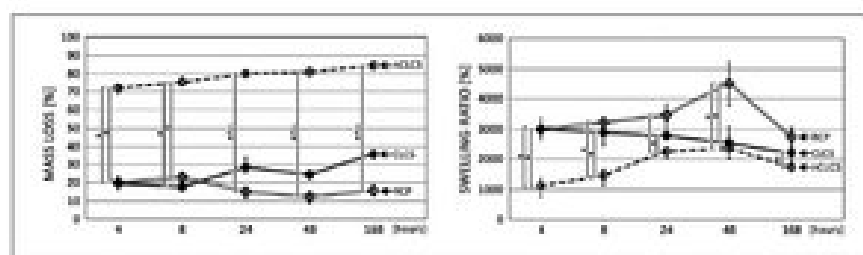


Figure 4. Mass loss and swelling ratio (median, interquartile range) of gentamicin loaded non-cross-linked (nCLCS) and cross-linked collagen sponges (CLCS) and reference commercial product (RCP). Asterisks denote statistically significant differences (Mann-Whitney, $p < 0.05$) at each time point.

end of the experiment, the mass loss of the CLCS had increased to 36% and that of the RCP remained at approximately 20% (Figure 4), thus indicating the relative stability and gradual degradation of the CLCS samples. The immediate drop in weight of both the CLCS and RCP samples after 4 h of exposure in PBS may also be attributed to the rapid elution of gentamicin, which represented up to 50% of the weight of the sponge.

The nCLCS samples exhibited lower swelling ratios than the other materials, that is, between 1125% after 4 h of exposure to PBS and 2400% after 48 h (Figure 4). Both the CLCS and RCP samples were observed to swell to a similar extent, that is, up to 3000% of their initial weight after 4 h; however, the swelling ability of the CLCS decreased gradually to 2200% at 7 days most probably in the context of overall mass loss. Conversely, both the nCLCS and RCP sponges exhibited a gradual increase in the swelling ratio up to 48 h, with a decrease following 7 days of exposure.

Disk diffusion tests

All the tested products exhibited wide inhibition zones (Figure 5). The inhibition zones of the CLCS and nCLCS were observed to be slightly less extensive than that of the RCP; however, the difference was considered to be of little significance since the zones were wide with concern to all three of the studied materials and the limit of sensitivity for distinguishing between minor differences in terms of the

concentrations in the tested samples was exceeded.

Given the improved characteristics revealed by the aforementioned tests, only the CLCS and RCP were further tested for their deposition and release characteristics and *in vivo* efficacy.

Gentamicin release tests

The total amount of gentamicin released from the all $1 \times 2 \text{ cm}^2$ CLCS samples after five exchanges over 240 min was $4.3 \pm 0.3 \text{ mg}$. When three samples were measured from a single sponge, the total amount was observed to be the same, that is, $4.3 \pm 0.1 \text{ mg}$. Therefore, the resulting product exhibited an uniform gentamicin content across the sponge. In the case of the RCP, the amount of gentamicin released was $3.1 \pm 0.1 \text{ mg}$. In order to achieve a gentamicin concentration per sponge area similar to that of the RCP, the CLCS samples were impregnated with the corresponding amount of gentamicin. The 33% higher concentration in the CLCS was probably due to shrinkage of around 0.5 cm with respect to both the sample dimensions during the second lyophilization process following impregnation. Further *in vitro* testing employed a 1×1 sponge size which resulted in a gentamicin content of approximately 2 mg.

The amount of released gentamicin in the first 20 min was $79.5\% \pm 3.7\%$ and $27.0\% \pm 6.4\%$ for the CLCS and RCP, respectively (Figure 6). After 2 h and following 4 PBS exchanges, the amount of released gentamicin

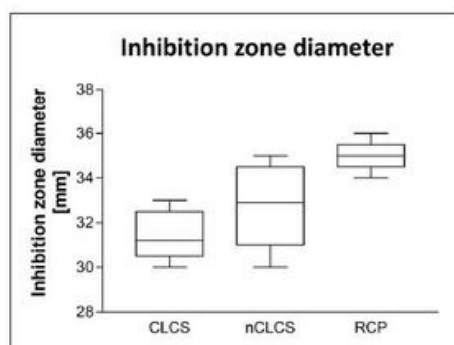


Figure 5. Comparison of inhibition zone diameters among cross-linked collagen sponge (CLCS) with gentamicin, non-CLCS with gentamicin (nCLCS), and reference collagen product (RCP).

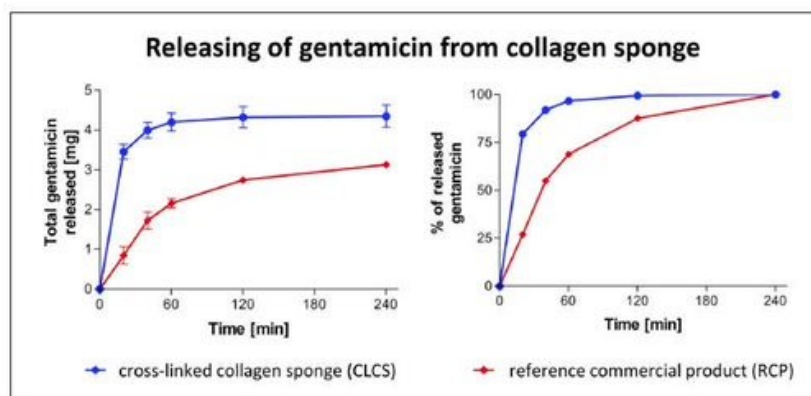


Figure 6. Total (left) and relative (right) values of gentamicin releasing from the cross-linked collagen sponge (CLCS, blue) and the reference commercial product (RCP, red). Both CLCS and RCP release all gentamicin at 240 min, the release of gentamicin from RCP is slightly slower.

was $99.4\% \pm 0.4\%$ and $87.6\% \pm 1.2\%$, respectively. All the gentamicin had been released at 240 min and following five PBS exchanges. The final exchange revealed very low gentamicin concentrations even though it lasted for 2 h, which suggested the negligible deposition capacity of both the CLCS and RCP which, in turn, is in accordance with previous tests on similar products.²⁹

Rat model of an infected wound

The examination of the animals on the first day following *Pseudomonas aeruginosa* inoculation revealed that the rats in group A (collagen sponge

with gentamicin, no gentamicin intramuscularly) and group C (collagen sponge without gentamicin, gentamicin administered intramuscularly) exhibited no noticeable deviation in their behavior or body temperature. However, the animals in group B (collagen sponge without gentamicin, no gentamicin intramuscularly) showed marked signs of generalized infection (chromodacryorrhea in 5/6 animals, irregular tachypnea, wheezing on auscultation, pain relief positions) and their body temperature measured rectally was significantly higher than that of the animals in groups A and C (Table 1). Two of the group B animals died on the second day following inoculation. Upon the termination of the experiment 4 days following

Table 1. Body temperature of the rats first day after inoculation of *Pseudomonas aeruginosa* in the wound was significantly higher in animals without gentamicin in any form (group B). These animals also decreased their weight (fourth day after inoculation).

Group	Body temperature first day after inoculation	Body weight fourth day after inoculation/change from baseline
A—gentamicin sponge	36.7°C ± 0.9°C (n=12)	269.3 ± 9.0 g / + 8.5% (n=12)
B—no gentamicin	38.2°C ± 0.8°C (n=6) (p < 0.005)	218.3 ± 16.9 g / - 12.2% (n=4) (p < 0.0005)
C—gentamicin intramuscular	36.4°C ± 0.8°C (n=6)	271.8 ± 15.2 g / + 8.5% (n=6)

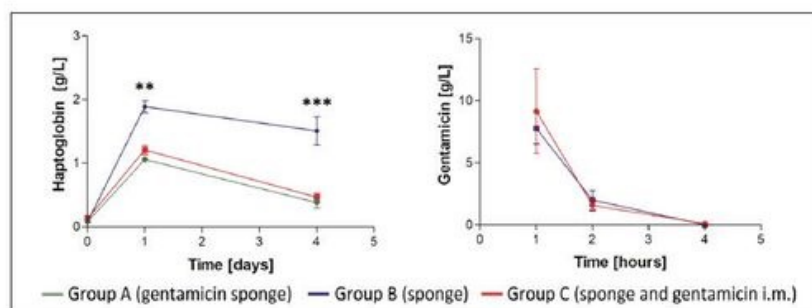


Figure 7. Haptoglobin (left) and gentamicin (right) serum levels after inoculation of the wound with *Pseudomonas aeruginosa* in rats with gentamicin sponge (group A), sponge without gentamicin with (group C) or without (group B) intramuscular injection of gentamicin. Asterisks denote significance (**p < 0.01; ***p < 0.001).

inoculation, the remaining animals in group B were seen to have significantly lower body weights than the group A and C animals (Table 1).

Haptoglobin levels on days 1 and 4 were significantly higher with concern to the group B rats (without gentamicin) than those in groups A and C (Figure 7).

Both administration routes (intramuscularly and via gentamicin-containing sponges) demonstrated similar development in terms of gentamicin plasma levels over time. The half-life ($T_{1/2}$) for gentamicin is calculated according to

$$T_{1/2} = \frac{\ln(\text{level}_1) - \ln(\text{level}_2)}{\text{interval}} [h],$$

where level_1 and level_2 are measured levels and the interval is the time between blood sampling. According to the calculation from the first two measured levels (1 and 2 h following administration), the half-lives were $23.6 \pm \text{SD min}$ and $30.6 \pm \text{SD min}$ for groups A and C, respectively.

Measurable gentamicin levels could be detected only in one sample from group A after 4 h and in none of the samples from group C. After 24 h, all the samples exhibited levels below the detection limit. The short half-life of around half an hour is in accordance with literature data covering gentamicin pharmacokinetics in rats.³⁰

Microbiological examination. A comparison of the numbers of CFU cultivated from both inoculation sites (with and without sponges) in the animals from groups A, B, and C is provided in Table 2. The number of CFU cultivated from the group B samples was significantly (2–3 orders of magnitude) greater than values obtained from biopsies in groups A or C (Table 2). The difference in the number of CFUs between groups A and C on the left side (without sponges, $p=0.81$) and on the right side (with sponges, $p=0.09$) was not significant. Moreover, the differences between the left and

Table 2. Numbers of CFUs cultivated from biopsies obtained from sites of *Pseudomonas aeruginosa* inoculation.

Group	Specimen	CFU median (IQR)
A	Sponge containing 2.2 mg of gentamicin, no gentamicin intramuscularly	Right side (sponge)
		Left side (without sponge)
B	Sponge without gentamicin, no gentamicin intramuscularly	Right side (sponge)
		Left side (without sponge)
C	Sponge without gentamicin, gentamicin 2 mg intramuscularly	Right side (sponge)
		Left side (without sponge)

CFU: colony forming units, IQR: interquartile range.

right sides for groups A and C were not statistically significant ($p=0.28$ and 0.39 , respectively).

Discussion

The study describes the preparation of a novel carbodiimide cross-linked freshwater fish collagen sponge containing gentamicin via the double lyophilization method, the testing thereof in vitro and in vivo and its comparison with a commercially available product. Via the application of this novel method, we successfully prepared a highly homogeneous product with excellent structural and clinical properties.

Most of the comparable products described in the literature were prepared via the direct lyophilization of gentamicin with collagen^{20,31} which renders them unsuitable for further chemical cross-linking due to the washing out of most of the antibiotics with the cross-linking agent.¹³ Cross-linking provides the material with higher stability in vivo and during the gamma irradiation sterilization process which may result in the fission of the polypeptide chains and finally to the denaturation of the collagen molecule, increased solubility, and weaker product stability.^{32,33} Our study confirmed that the cross-linking process results in smaller pores with greater uniformity and surface density and with a minimal proportion of non-interconnected pores. Gentamicin-loaded CLCSs exhibited suitable stability in the simulated body environment which constitutes one of the most important parameters in terms of the

effective delivery and release of antimicrobial agents.³⁴

In addition, sponge stability in body fluids is required for the purposes of wound dressing and hemostatic activity. The CLCSs exhibited a mass loss of around 36% after 1 week of exposure to a simulated body environment, which is in agreement with recent collagen sponge studies that revealed their complete degradation within 3–6 weeks.⁴ The rate of degradation under in vivo conditions is further accelerated by collagenases.⁴ The accelerated mass loss (above 70%) determined for the non-cross-linked nCLCSs after 4 h of incubation, which may have limited their clinical use, was improved via EDC/NHS chemical cross-linking.³⁴ Moreover, the preservation of the collagen secondary structure was confirmed by means of FTIR analysis. Further important factors relating to collagen wound dressings consist of their ability to absorb large amounts of tissue exudate, maintain a moist environment,³⁵ and the promotion of cellular motility³⁶ and differentiation.¹⁰ Swelling ability also plays an essential role in the overall performance of collagen wound dressings in terms of fluid mass transport and, consequently, antibiotic release.³⁷ We demonstrated that the CLCSs swelled by around 3000% following 4 h of immersion in PBS and maintained a high volume (2200%) over the whole 7 days of the experiment. Moreover, this ability was comparable to that of the RCP.

Most of the fish collagen sponges tested to date have been derived from marine species or

tilapia. However, we present a novel wound dressing derived from collagen isolated from *Cyprinus carpio*, a fish that is bred extensively in Central Europe. The novel collagen/gentamicin sponge proved to be effective in a locally infected rat wound treatment model. The numbers of CFU cultivated from biopsies obtained 4 days following inoculation were found to be three orders of magnitude less with respect to the gentamicin-releasing sponges than for the bare sponges. The infection induced by *Pseudomonas aeruginosa* inoculation was so severe that it caused sepsis and the subsequent death of two of the animals. Despite its severity, however, the CLCS effectively suppressed infection in most of the group A animals and not only on the right side in which the sponges were inserted, but also on the left side. The study further proved that subcutaneous gentamicin administration via sponges results in similar systemic gentamicin levels and exposure to those of intramuscular administration and that while both administration routes are effective in terms of local infection treatment, the local sponge application tends to be more effective in this respect.

The gentamicin dose tested was approximately 8 mg/kg, which is similar to maximum systemically administered doses of gentamicin applied in clinical practice.³⁸ In the case of sponge application into a wound, local gentamicin concentrations are much higher than those administered into the systemic circulation. Because of the negligible amount of gentamicin released during the final exchange in the *in vitro* release test, it was assumed that all the gentamicin had been released from both the CLCS and RCP sponges after 4 h. It can be concluded that the differences in the deposition characteristics of the RCP and CLCS are not clinically important^{39,40} especially when one considers the well described post-antibiotic effect of gentamicin, which is dependent on peak concentration (i.e. the concentration established after the initial "burst" of gentamicin from the sponge) rather than on the length of exposure to high concentrations.

Since the initial accelerated release of gentamicin from commercially available wound dressing sponges has also been confirmed elsewhere, it is recommended not moistening the sponge prior to application thus preventing the washing out of the gentamicin.¹⁹ *In vivo*, most of the gentamicin is released from the sponge immediately following its administration,²⁰ following which the local concentration decreases according to the degree of vascularization and secretion at the application site.⁵ Therefore, the rate of gentamicin washout from the site of infection may be slower in poorly vascularized wounds that are difficult to treat (e.g. diabetic foot wounds). Under such circumstances, local gentamicin levels most probably remain higher for longer time periods than they do in well-perfused tissue. Moreover, such poorly perfused wounds would also be characterized by much lower gentamicin penetration from the systemic circulation upon the intravenous (IV) administration of gentamicin; thus, local administration appears to be more favorable in this respect.

The high degree of effectiveness in terms of the reduction in the number of CFUs at sites of infection not treated with sponges in group A may have been due to the relative proximity of the two inoculation sites and the possible diffusion of the antibiotic to the nearby inoculation side or, more likely, to the systemic effect of resorbed gentamicin which was administered in relatively high doses. This effect would not occur under most clinical scenarios since it is very unlikely that the maximum daily gentamicin dose (7.5 mg/kg) would be administered by means of gentamicin collagen sponges positioned in the wound. Therefore, systemic levels (albeit similar to those concerning the IV administration of a small gentamicin dose) would not be sufficient to treat distal foci and, moreover, treatment would be locally targeted without reaching toxic systemic levels. On the contrary, systemic gentamicin absorption must be considered in the treatment of large well-perfused areas, and the amount of gentamicin in the administered sponges should not

exceed maximal recommended single dose for systemic administration. However, little is known about gentamicin absorption from poorly vascularized wounds, for example, diabetic foot ulcers. Notwithstanding the theoretical potential for gentamicin systemic toxicity, it has been reported that gentamicin sponges are tolerated to a very high degree.^{41,42}

Compared to traditionally employed RCP prepared from mammalian collagen, a sponge prepared from freshwater fish collagen may well both be better immunologically tolerated⁹ and reduce the risk of the transmission of ruminant zoonoses.¹¹

Limitations

This study has several limitations. First, we used a rat model in order to assess the clinical performance of CLCS and, clearly, the results cannot be simply extrapolated to the treatment of humans. Second, we pursued a model of a fresh wound in viable tissue, whereas the local pharmacokinetics of gentamicin and its entry to the circulation may be different with respect to chronic wounds with a compromised blood supply. Third, gentamicin levels were measured via the nephelometric immunochemical method which is commonly used with an adequate degree of accuracy in clinical practice as an alternative to high-performance liquid chromatography as the “gold standard.”

Conclusion

This study considered the preparation of a novel carbodiimide cross-linked freshwater fish collagen sponge with gentamicin via the double lyophilization method, the testing thereof in vitro and in vivo, and its comparison with a commercially available product. The resulting highly homogeneous product characterized by excellent structural and clinical properties proved effective in terms of the treatment of a surgical wound infection in a rat model. We demonstrated that gentamicin was released in its entirety from the sponge and was absorbed

in the systemic circulation. Therefore, we propose that such a gentamicin-containing sponge provides a promising tool for the treatment and prevention of surgical site infection.

Acknowledgements

Special thanks go to Darren Ireland for the language revision of the English manuscript.

Data Availability

All the data used in this study are presented in the manuscript in the form of either text or figures.


Declaration of conflicting interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

This study was supported by the Ministry of Health of the Czech Republic under AZV 15-27941A. The micro-CT analysis was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (Progress Q29/LF1) and by project Reg. No. CZ.1.05/41.00/16.0346 supported by the Research and Development for Innovations Operational Program (RDIOP), co-financed by European regional development funds and the state budget of the Czech Republic.

ORCID iD

Jan Hartinger  <https://orcid.org/0000-0002-6320-3273>

References

1. Kirkland KB, Briggs JP, Trivette SL, et al. The impact of surgical-site infections in the 1990s: attributable mortality, excess length of hospitalization, and extra costs. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1999; 20: 725–730.
2. Ostermann PA, Seligson D and Henry SL. Local antibiotic therapy for severe open fractures. A review of 1085 consecutive cases. *J Bone Joint Surg Br* 1995; 77: 93–97.
3. Craig J, Fuchs T, Jenks M, et al. Systematic review and meta-analysis of the additional benefit of local prophylactic antibiotic therapy for infection rates in open tibia fractures treated with intramedullary nailing. *Int Orthop* 2014; 38: 1025–1030.

4. Chattopadhyay S and Raines RT. Review collagen-based biomaterials for wound healing. *Biopolymers* 2014; 101: 821–833.
5. Ruszczak Z and Friess W. Collagen as a carrier for on-site delivery of antibacterial drugs. *Adv Drug Deliv Rev* 2003; 55: 1679–1698.
6. Gruessner U, Clemens M, Pahlplatz PV, et al. Improvement of perineal wound healing by local administration of gentamicin-impregnated collagen fleeces after abdominoperineal excision of rectal cancer. *Am J Surg* 2001; 182: 502–509.
7. Charriere G, Bejot M, Schnitzler L, et al. Reactions to a bovine collagen implant. Clinical and immunologic study in 705 patients. *J Am Acad Dermatol* 1989; 21: 1203–1208.
8. Jongjareonrak A, Benjakul S, Visessanguan W, et al. Isolation and characterization of collagen from bigeye snapper (*Priacanthus macracanthus*) skin. *J Sci Food Agricult* 2005; 85: 1203–1210.
9. Pati F, Datta P, Adhikari B, et al. Collagen scaffolds derived from fresh water fish origin and their biocompatibility. *J Biomed Mater Res A* 2012; 100: 1068–1079.
10. Oh HH, Uemura T, Yamaguchi I, et al. Effect of enzymatically cross-linked tilapia scale collagen for osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Bioactive Compat Poly* 2015; 31: 31–41.
11. Yamada S, Yamamoto K, Ikeda T, et al. Potency of fish collagen as a scaffold for regenerative medicine. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 302932.
12. Bae I, Osatomi K, Yoshida A, et al. Biochemical properties of acid-soluble collagens extracted from the skins of underutilised fishes. *Food Chem* 2008; 108: 49–54.
13. Suchy T, Supova M, Klapkova E, et al. The release kinetics, antimicrobial activity and cytocompatibility of differently prepared collagen/hydroxyapatite/vancomycin layers: microstructure vs. nanostructure. *Eur J Pharm Sci* 2017; 100: 219–229.
14. Versteegden LRM, Ter Meer M, Lomme R, et al. Self-expandable tubular collagen implants. *J Tissue Eng Regen Med* 2018; 12: 1494–1498.
15. Nagai N, Nakayama Y, Zhou YM, et al. Development of salmon collagen vascular graft: mechanical and biological properties and preliminary implantation study. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2008; 87: 432–439.
16. Dernell WS, Withrow SJ, Kuntz CA, et al. In vivo evaluation of gentamicin impregnated polylactic acid beads implanted in sheep. *J Bioactive Compat Poly* 2001; 16: 119–135.
17. Schimmer C, Ozkur M, Sinha B, et al. Gentamicin-collagen sponge reduces sternal wound complications after heart surgery: a controlled, prospectively randomized, double-blind study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2012; 143: 194–200.
18. Mishra PK, Ashoub A, Salhiyyah K, et al. Role of topical application of gentamicin containing collagen implants in cardiac surgery. *J Cardiothorac Surg* 2014; 9: 122.
19. Lovering AM and Sunderland J. Impact of soaking gentamicin-containing collagen implants on potential antimicrobial efficacy. *Int J Surg* 2012; 10(Suppl. 1): S2–S4.
20. Mehta S, Humphrey JS, Schenkman DI, et al. Gentamicin distribution from a collagen carrier. *J Orthop Res* 1996; 14: 749–754.
21. Bell E, Ivarsson B and Merrill C. Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76: 1274–1278.
22. Rýglová Š, Braun M and Suchý T. Collagen and its modifications—crucial aspects with concern to its processing and analysis. *Macromol Mater Eng* 2017; 302: 1600460.
23. Suchy T, Supova M, Sauerova P, et al. The effects of different cross-linking conditions on collagen-based nanocomposite scaffolds—an in vitro evaluation using mesenchymal stem cells. *Biomed Mater* 2015; 10: 065008.
24. Jirik M, Bartos M, Tomasek P, et al. Generating standardized image data for testing and calibrating quantification of volumes, surfaces, lengths, and object counts in fibrous and porous materials using X-ray microtomography. *Microsc Res Tech* 2018; 81: 551–568.
25. Hildebrand T and Rügsegger P. A new method for the model-independent assessment of thickness in three-dimensional images. *J Microscop* 1997; 185: 67–75.
26. Remy E and Thiel E. Medial axis for chamfer distances: computing look-up tables and neighbourhoods in 2D or 3D. *Pattern Recog Lett* 2002; 23: 649–661.
27. Jackson M, Choo LP, Watson PH, et al. Beware of connective tissue proteins: assignment and

- implications of collagen absorptions in infrared spectra of human tissues. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1270: 1–6.
28. Pielasz A. Temperature-dependent FTIR spectra of collagen and protective effect of partially hydrolysed fucoidan. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2014; 118: 287–293.
 29. Parker SJ, Brown D, Hill PF, et al. Fibrinogen-impregnated collagen as a combined haemostatic agent and antibiotic delivery system in a porcine model of splenic trauma. *Eur J Surg* 1999; 165: 609–614.
 30. Hatala M, Moravek J and Schuck O. Gentamicin pharmacokinetics in rats with reduced renal parenchyma. *Int J Clin Pharmacol Biopharm* 1975; 11: 1–6.
 31. Wachol-Drewek Z, Pfeiffer M and Scholl E. Comparative investigation of drug delivery of collagen implants saturated in antibiotic solutions and a sponge containing gentamicin. *Biomaterials* 1996; 17: 1733–1738.
 32. Grant RA, Cox RW and Kent CM. The effects of gamma irradiation on the structure and reactivity of native and cross-linked collagen fibres. *J Anat* 1973; 115: 29–43.
 33. Ohan MP and Dunn MG. Glucose stabilizes collagen sterilized with gamma irradiation. *J Biomed Mater Res A* 2003; 67: 1188–1195.
 34. Nandi SK, Mukherjee P, Roy S, et al. Local antibiotic delivery systems for the treatment of osteomyelitis—A review. *Mater Sci Eng C* 2009; 29: 2478–2485.
 35. Yannas IV. Biologically active analogues of the extracellular matrix: artificial skin and nerves. *Angew Chem Int Edit* 1990; 29: 20–35.
 36. Chvapil M, Chvapil TA and Owen JA. Reaction of various skin wounds in the rat to collagen sponge dressing. *J Surg Res* 1986; 41: 410–418.
 37. Suchy T, Supova M, Bartos M, et al. Dry versus hydrated collagen scaffolds: are dry states representative of hydrated states? *J Mater Sci Mater Med* 2018; 29: 20.
 38. Nicolau DP, Freeman CD, Belliveau PP, et al. Experience with a once-daily aminoglycoside program administered to 2,184 adult patients. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 650–655.
 39. Isaksson B, Nilsson L, Maller R, et al. Postantibiotic effect of aminoglycosides on gram-negative bacteria evaluated by a new method. *J Antimicrob Chemother* 1988; 22: 23–33.
 40. Isaksson B, Maller R, Nilsson LE, et al. Postantibiotic effect of aminoglycosides on staphylococci. *J Antimicrob Chemother* 1993; 32: 215–222.
 41. Uckay I, Kressmann B, Di Tommaso S, et al. A randomized controlled trial of the safety and efficacy of a topical gentamicin-collagen sponge in diabetic patients with a mild foot ulcer infection. *SAGE Open Med*. Epub ahead of print 13 May 2018. DOI: 10.1177/2050312118773950.
 42. Uckay I, Kressmann B, Malacarne S, et al. A randomized, controlled study to investigate the efficacy and safety of a topical gentamicin-collagen sponge in combination with systemic antibiotic therapy in diabetic patients with a moderate or severe foot ulcer infection. *BMC Infect Dis* 2018; 18: 361.

Research Article

Rifampin-Releasing Triple-Layer Cross-Linked Fresh Water Fish Collagen Sponges as Wound Dressings

Jan Miroslav Hartinger,¹ Peter Lukáč,² Mikuláš Mlček,³ Michaela Popková,³ Tomáš Suchý,^{4,5} Monika Šupová,⁴ Hynek Chlup,⁵ Lukáš Horný,⁵ Jan Závora,⁶ Václava Adámková,⁶ Ondřej Slanař,¹ Petr Kozlík,⁷ Katarina Molnarova,⁷ Eva Honsová,⁸ Lukáš Lambert,⁹ and Tomáš Grus²

¹Department of Clinical Pharmacology and Pharmacy, Institute of Pharmacology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic

²2nd Department of Cardiovascular Surgery, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic

³Institute of Physiology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic

⁴Department of Composites and Carbon Materials, Institute of Rock Structure and Mechanics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic

⁵Department of Mechanics, Biomechanics and Mechatronics, Faculty of Mechanical Engineering, Czech Technical University in Prague, Prague, Czech Republic

⁶Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic

⁷Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic

⁸Clinical and Transplant Pathology Centre, Institute of Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

⁹Department of Radiology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic

Correspondence should be addressed to Tomáš Grus; tgrus@seznam.cz

Received 12 May 2020; Revised 27 July 2020; Accepted 4 August 2020; Published 17 October 2020

Academic Editor: Costantino Del Gaudio

Copyright © 2020 Jan Miroslav Hartinger et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Objectives. Surgical wounds resulting from biofilm-producing microorganisms represent a major healthcare problem that requires new and innovative treatment methods. Rifampin is one of a small number of antibiotics that is able to penetrate such biofilms, and its local administration has the potential to serve as an ideal surgical site infection protection and/or treatment agent. This paper presents two types (homogeneous and sandwich structured) of rifampin-releasing carbodiimide-cross-linked fresh water fish collagen wound dressings. **Methods.** The dressings were prepared by means of the double-lyophilization method and sterilized via gamma irradiation so as to allow for testing in a form that is able to serve for direct clinical use. The mechanical properties were studied via the uniaxial tensile testing method. The *in vivo* rifampin-release properties were tested by means of a series of incubations in phosphate-buffered saline. The microbiological activity was tested against methicillin-resistant *staphylococcus aureus* (MRSA) employing disc diffusion tests, and the *in vivo* pharmacokinetics was tested using a rat model. A histological examination was conducted for the study of the biocompatibility of the dressings. **Results.** The sandwich-structured dressing demonstrated better mechanical properties due to its exhibiting ability to bear a higher load than the homogeneous sponges, a property that was further improved via the addition of rifampin. The sponges retarded the release of rifampin *in vitro*, which translated into at least 22 hours of rifampin release in the rat model. This was significantly longer than was achieved via the administration of a subcutaneous rifampin solution. Microbiological activity was proven by the results of the disc diffusion tests. Both sponges exhibited excellent biocompatibility as the cells penetrated into the scaffold, and virtually no signs of local irritation were observed. **Conclusions.** We present a novel rifampin-releasing sandwich-structured fresh water fish collagen wound dressing that has the potential to serve as an ideal surgical site infection protection and/or treatment agent.

1. Introduction

Surgical wound infections constitute one of the most frequently occurring postsurgical complications and often lead to prolonged hospital stays, increased healthcare costs, and a deterioration in the overall treatment results [1]. Perioperative local antibiotic treatment has been widely clinically studied to date with generally promising results [2–5]. While most such studies have considered gentamicin [2] or vancomycin [3, 4], it has been suggested that the administration of systemic rifampin improves the outcome in deep sternal wound infections caused by staphylococci following cardiac surgery [6] as well that of staphylococcal infections associated with stable orthopedic implants [7]. The local application of 250 mg of rifampin over the mesh during the inguinal hernia repair procedure has been reported to significantly reduce the occurrence of postoperative surgical site infection [5] without the need for systemic administration. Rifampin penetrates readily through the biofilm and is often recommended for the treatment of surgical site infections together with other antibiotics that act to prevent the rapid development of rifampin resistance [8–10]. Since around 80% of surgical site infections are associated with the formation of a poorly permeable biofilm [8], a rifampin-releasing local wound dressing would serve as an ideal protection against, and for the treatment of, surgical site infections.

Since antibiotic-releasing collagen-based wound dressings have been proven to be effective in terms of the prevention and treatment of postoperative wound infection [11], we hypothesized that the combination of a collagen-based wound dressing with rifampin would also be beneficial in the case of surgical wound treatment. Various types of collagen scaffolds/sponges have been described in the literature as suitable wound dressings [12] that can be employed as carriers of antibiotics [11]. Grzybowski et al. created a two-layered dressing with membrane and sponge layers. They applied aminoglycosides between these two layers so as to produce a sponge which allowed for the controlled release of the antibiotics. They also proved that the dressing was effective in terms of the reduction of a *Pseudomonas aeruginosa* colony-forming unit (CFU) in a mouse model of a wound infection [13].

To the best of our knowledge, no collagen sponges containing rifampin have been used regularly to date in the clinical setting. Parker et al. conducted an experiment with a rifampin-soaked fibrinogen-implanted collagen sponge and suggested that the rifampin is partially bonded to the sponge after the sponge had been immersed in a rifampin solution. Only 75% of the rifampin was washed out during elution testing. They also measured rifampin concentrations in the blood of rats that had been treated with the sponges and determined that the concentration remained higher than 0.001 mg/L for 6 hours [14].

Most studies conducted on collagen dressings have considered collagen of mammal origin which induces an immune reaction in 3–4% of the treated population [15]. It has been proven that the use of fresh water fish scale-derived collagen is advantageous due to its enhanced biocompatibility and high level of direct cell adhesion [16]. Since

fish collagen loses stability at body temperature [17], it has to be cross-linked in order to maintain its spongy consistency when used as a collagen dressing [16, 18]; carbodiimide has been demonstrated to provide a highly biocompatible collagen cross-linking agent [16, 19, 20].

We previously tested a homogeneous spongy matrix based on gentamicin- and vancomycin-containing homogeneous fresh water fish collagen cross-linked with carbodiimide as a wound dressing in a rat surgical site infection model [21, 22]. The presented study also involved the further modification of the structure of the sponge and the testing of its characteristics as a potential carrier of rifampin. A homogeneous collagen sponge and a three-layered sandwich-structure sponge were tested *in vivo* and *in vitro* with respect to their mechanical properties, stability in aqueous environments, and their *in vitro* and *in vivo* rifampin release properties. In addition, the histological reaction to the collagen sponges was investigated employing a rat model.

2. Materials and Methods

2.1. Preparation of Homogeneous and Sandwich Collagen Sponges. Homogeneous sponges and sandwich sponges (Figure 1) were prepared from collagen type I isolated from the skin of fresh water fish (*Cyprinus carpio*, Třeboň carp, Třeboň fishery, Czech Republic, controlled breeding). The isolation and extraction of the collagen have been described previously by Suchý et al. [23]. The homogeneous sponges were prepared from an aqueous collagen dispersion (1 wt%) acquired via the swelling of the collagen in deionized water (10°C, 3 hours), which was homogenized using a disintegrator (10,000 rpm, 10 min), left for 20 minutes at room temperature, and homogenized for a second time (10,000 rpm, 5 min). The resulting dispersion was placed in containers, frozen at a temperature of -80°C for 6 hours, and then lyophilized (BenchTop 4KZL, VirTis, USA). The sandwich sponges were prepared via the following procedure: an aqueous collagen dispersion was prepared by means of the swelling of the collagen in deionized water (10°C, 3 hours), which was homogenized using a disintegrator (10,000 rpm, 10 min), left for 20 minutes at room temperature, and homogenized for a second time (10,000 rpm, 5 min). The collagen dispersion concentration of the core was 5 wt% while that of the peripheral layers was 1 wt%. The resulting 5 wt% dispersion was placed in containers, frozen at a temperature of -80°C for 6 hours, and then lyophilized, and subsequently, the core was impregnated with the resulting 1 wt% dispersion in separate containers and left for 3 hours at room temperature, frozen at a temperature of -80°C for 6 hours, and then lyophilized.

The stability of the homogeneous and sandwich collagen sponges was enhanced via cross-linking with a 95 wt% ethanol solution containing EDC (N-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide hydrochloride) and NHS (N-hydroxysuccinimide) at a molar ratio of 4:1. The EDC and NHS were used as received (Sigma-Aldrich, Germany). 0.625 g of the EDC was applied for 1 g of collagen and mixed with 150 mL of 95 wt% ethanol solution (Penta, Czech Republic). Following a reaction period of 3 hours at 37°C, the sponges were

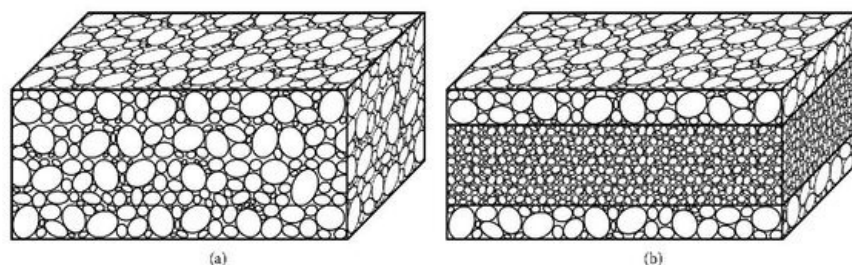


FIGURE 1: Simplified scheme of (a) highly porous homogeneous sponge and (b) sandwich sponge with rigid core with lower porosity and highly porous peripheral layers.

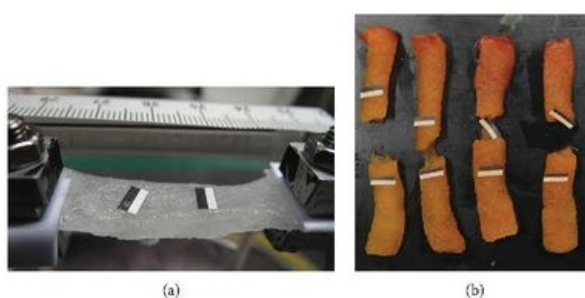


FIGURE 2: Samples of the homogeneous collagen sponges without rifampin (a) and with rifampin (b).

washed in 0.1 M Na_2HPO_4 (for at least 30 min), followed by rinsing with deionized water (for at least 30 min), frozen at -30°C for 6 hours, and lyophilized.

Finally, the cross-linked homogeneous and sandwich collagen sponges were impregnated with a 95 wt% ethanol solution containing a weighed amount of rifampin sodium (Eremfat, RIEMSER Pharma GmbH, Germany) so as to attain a final weight ratio of the collagen to the pure rifampin of 5:4. The impregnated sponge was frozen at -80°C and lyophilized again. The final stage involved the cutting of samples of the appropriate dimensions. The final amount of rifampin was verified following the conclusion of the preparation phase (see In Vitro Pharmacokinetic Tests), i.e., prior to the subsequent testing phase.

2.2. Scanning Electron Microscopy. Scanning electron microscopy (SEM) was conducted in the high vacuum mode using a Quanta 450 electron microscope (FEI, USA). The samples were coated with a thin layer of gold in an ion sputter (Emitech K550X, Quorum Technologies, U.K.).

2.3. Testing of the Mechanical Properties of the Collagen Sponges. The mechanical properties of the collagen sponges were studied by means of uniaxial tensile tests. The experiments are aimed at elucidating the effect of the addition of rifampin and the design of the sponge on the mechanical integrity. Experiments were performed on homogeneous collagen sponges (H) (Figure 2(a)), homogeneous collagen

sponges with rifampin (H-R) (Figure 2(b)), sandwich-structured collagen sponges without (S) and with rifampin (S-R) (Figure 3), the core material of the sandwich structure without (S-C) and with rifampin (S-C-R) and, finally, with the face sheet material of the sandwich sponges, again without (S-F) and with incorporated rifampin (S-F-R). The sponges took the form of lyophilized layers from which rectangular strips were cut. The samples were hydrated in phosphate-buffered saline (PBS, pH ~ 7.4 , Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) prior to the mechanical testing; Figure 2 depicts the typical geometry of the samples. The dimensions were determined via the image analysis of photographs taken before the commencement of the experiments. Each of the dimensions was determined at five different positions on the sample. Figure 3 illustrates the natural variability of the thickness of the sponges, a summary of which is provided in Figure 4.

Tensile testing was conducted using a Zwick/Roell multi-purpose testing machine with HBM U9C 50 N load cell which was connected in $\pm 25\text{ N}$ regime (tension/compression). HBM U9C is in 0.2 accuracy class. The testing machine was also equipped with a built-in videoextensometer. The stress-strain relationships were obtained from the force-displacement data recorded on a PC during loading. The nominal stress, σ , was calculated as the ratio of the current force to the reference cross-sectional area determined prior to experimentation. The deformation, ϵ , was expressed as the ratio of the displacement, measured using the



FIGURE 3: Samples of the sandwich-structured collagen sponges with rifampin.

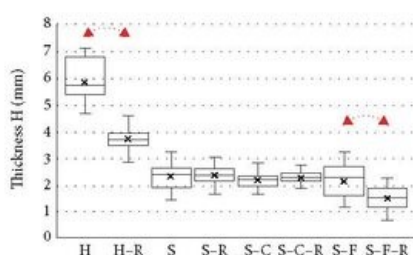


FIGURE 4: Thicknesses of the tested collagen sponges ($N=10$): homogeneous collagen sponges (H), sandwich-structured sponges (S), sandwich-structured sponges—core material (S-C), sandwich-structured sponges—face sheet (S-F), sponges with rifampin (-R). The arrows denote statistically significant differences between identical sponges with or without rifampin (t -test, $p < 0.05$).

videostensometer, to the distance between marks that were created on the surface of the samples prior to experimentation (see Figure 2).

Since the mechanical behavior of collagenous material in the hydrated state is known to be nonlinear, the comparison of the mechanical properties of the sponges based on the Young's modulus determined at $\varepsilon = 0.01$ and $E_{0.01}$ and at $\varepsilon = 0.1$ and $E_{0.1}$. $E_{0.01}$ was considered to be the modulus of elasticity corresponding to small deformation regions, whereas $E_{0.1}$ characterized the stiffness of the material in the large strain regions; both were determined as the slope of the tangent made to the σ - ε curve. Ten samples were mechanically tested for each group of samples.

2.4. Rifampin Stability Tests. Since the stability of rifampin at 37°C is limited [24], we performed the stability testing of rifampin in PBS at 37°C protected from light. We incubated solutions with 3 differing rifampin concentrations (600 mg/L, 60 mg/L, and 6 mg/L) in PBS under such conditions. The samples were drawn after 0 and 4 hours and after 1, 2, 6, and 7 days of incubation and subsequently analyzed using HPLC for the determination of the rifampin concentration.

2.5. Rifampin Release Tests. The release test was performed separately for the homogeneous and sandwich sponges. Sections of the collagen sponges with dimensions of 10 × 20 mm were studied. Six sections were obtained from three different sponges (three from the edges and three from the central parts) in order to test the variability of the rifampin content between the sponges and the homogeneity of the rifampin content within the sponges. The weight of the tested samples was 33.7 ± 7.4 mg for the homogeneous sponges and 43.3 ± 2.7 mg for the sandwich sponges (mean \pm SD). Each of the tested sections was submerged in 20 mL of 37°C PBS in a test tube and gently rocked in an incubator at 37°C. The sponge sections were transferred to a newly tempered 20 mL of PBS after 15, 30, 60, 120, 180, 240, and 360 minutes, 24 hours, and 8 days of incubation. Samples of PBS with the released rifampin were subsequently analyzed using HPLC for the determination of the rifampin concentration. We discovered that the amount of the eluted rifampin was proportional to the weight rather than to the size of the samples (see Results). This information was used for dosing in the *in vivo* experiments.

2.6. Disc Diffusion Tests. The tests were performed separately for the homogeneous and sandwich sponges. Nine discs (6 mm in diameter) were cut from the sponges. The microbiological response was tested via the standard disc diffusion test with methicillin-resistant *staphylococcus aureus*, strain CNCTC 6271 (MRSA).

2.7. Animals and Catheter Implantation. With respect to the *in vivo* pharmacokinetic tests, we used adult male Wistar rats with median weights of 390 g (IQR = 362 – 411 g), 375 g (IQR = 353 – 390 g), and 379 g (IQR = 360 – 397 g) for the sandwich sponge group (S, $N=6$), homogeneous sponge group (H, $N=6$), and control group with subcutaneous (s. c.) rifampin (C, $N=8$), respectively. The differences in the weights between the groups were not statistically significant. Intra-arterial catheters were implanted into the carotid arteries for the purpose of repeated blood sampling according to our standard protocol described in detail elsewhere [25]. Briefly, the catheters were implanted after 6-8 hours of fasting in aseptic conditions. The anesthesia took the form of the administration of 10 mg/kg of xylazine and 80 mg/kg of ketamin intramuscularly; no perioperative antibiotic prophylaxis was used in the study. The rats were placed in separate cages following catheter implantation with free access to food and water.

The food consisted of 90% of maintenance solid mixture diet for laboratory rats (Altromin International, Im Seelenkamp 20, D-32791 Lage, Germany) and 10% of powdered charcoal (Carbosorb, IMUNA PHARM, Jarková 17, 082 22, Šarišské Michalany, Slovakia) in order to disrupt the enterohepatic circulation of the rifampin. 5% of charcoal added to standard food was previously proven to lower bilirubin levels in rats due to the adsorption of bilirubin in the gut and the disruption of its enterohepatic recirculation [26]. The rats were kept in separate cages until the conclusion of the experiment so as to prevent damage to the cannulas. The cannulas were heparinized following each sampling campaign. The

rats were administered nadroparine once daily so as to prevent the formation of thrombi in the catheters. The rats were anesthetized following the final sample draw by means of isoflurane and euthanized using a combination of embutramide, mebezonium, and tetracaine (T-61, Intervet International B.V., Wim de Körverstraat 35, 5831 AN Boxmeer, Netherlands). Samples intended for the histological examination were excised from the administration site following euthanasia.

In order to exclude the influence of tissue damage during the sham surgery incision and subsequent administration of rifampin on the histological examination, an additional control (C2) group of 6 female Wistar rats was formed for the study of the effect of rifampin on local tissues. The rats were administered a rifampin solution subcutaneously at the same dose as for the other groups with no incision. Tissue from the administration site was used for the histological examination.

The experimental protocol was approved by the Institutional Animal Expert Committee of the First Faculty of Medicine, Charles University, and was performed at the University's accredited laboratory in accordance with Czech Act No. 246/1992 Coll. on the protection of animals against cruelty. All the animals were treated and cared for in accordance with European Guidelines on Laboratory Animal Care.

2.8. In Vivo Pharmacokinetic Tests. The pharmacokinetic study was initiated 72 hours following catheter implantation on those rats that had fully recovered from the catheter implantation procedure. An approximately 1 cm long incision was made on the backs of the rats. With respect to the S and H groups, a piece of rifampin-containing collagen sponge was inserted into the pocket and the wound was closed with a nonresorbable monofilament suture. The weight of the sponges inserted was calculated according to the results of the *in vitro* elution tests (see Results) so that the dose of the administered rifampin was 25 mg/kg. Concerning the C group ($N=8$), 25 mg/kg of rifampin was administered s. c. to the sham surgery pocket in the form of a solution (Eremfat® i.v. RIEMSER Pharma GmbH, An der Wiek 7, 17493 Greifswald-Insel Riems, Germany) in water for the injection application, and the wounds were closed with a nonresorbable monofilament suture. The samples intended for the determination of rifampin levels were drawn 0.5, 1, 2, 4, 6, 10, 22, 34, 46, 58, 70, 82, and 94 hours following the implantation of the sponges. The sample volume was replaced with saline, and the catheters were heparinized following each sample draw.

2.9. HPLC Analysis of the Rifampin Levels in the Serum. The determination of rifampin in the PBS solution and the plasma samples was conducted using the Acquity UPLC H-class system (Waters Corporation, Milford, MA). A Kinetex C18 LC column (2.1 mm i.d. × 50 mm, 1.3 μm) from Phenomenex (Torrance, California, USA) thermostated at 40°C was used for analysis purposes. The mobile phase consisted of 0.1% of trifluoroacetic acid (solvent A) and acetonitrile (solvent B). The flow rate of the mobile phase was maintained at 0.3 mL/min. The optimized gradient program (min/% B) was 0/20, 1/20, 5/80, 7/80, 8/20, and 11/20. The injection vol-

ume was 5 μL, and the samples were maintained at 5°C. Detection was performed by means of a diode array detector (DAD), and the wavelength was set at 340 nm. The samples were deproteinized using acetonitrile prior to the analysis of the plasma samples (the addition of 60 μL of 100% acetonitrile to 20 μL of plasma), and deproteinization was performed in an Eppendorf tube via vortexing for 20 s. The plasma samples were then centrifuged at 16000 ×g for 8 min, and 60 μL of the supernatant was transferred to an LC vial. The PBS samples were injected directly into the LC system.

The method was validated in terms of linearity, the limit of detection (LOD), the limit of quantification (LOQ), accuracy, precision, selectivity, recovery, and matrix effects in order to demonstrate that it was suitable for the intended purpose. The selectivity of the method was verified via mass spectrometry operated in the full scan mode (Triple Quad 6460 mass spectrometer; Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Selectivity was monitored via the injection of five plasma samples and one PBS sample. The resulting chromatograms evinced no interfering compound (no *m/z* was observed except the *m/z* corresponding to the rifampin) within the rifampin retention time window. Moreover, the DAD peak purity test for all the analyzed samples was successfully met for the rifampin peak, which ensured high selectivity. Selectivity was thus confirmed independently via both DAD and mass spectrometry. Calibration curves were constructed in both the blank plasma and the PBS solution with seven concentrations by means of the plotting of the peak rifampin area against its concentration. Standard plots were constructed, and the linearity was evaluated statistically by means of linear regression analysis employing the least-squares regression method. The method was linear (coefficients of determination (R^2) of higher than 0.9996) in the concentration range 0.02–100 mg/L for the plasma samples and in the range 0.008–100 mg/L for the PBS samples. The LOD value was 0.004 mg/L for the plasma and 0.001 mg/L for the PBS, determined as the lowest concentration that provided a visible peak in the chromatogram. The LOQ values were the lowest calibration points (0.02 mg/L). The accuracy and precision of the method were evaluated via the measurement of 5 replicates at four different concentrations (0.1; 1; 5; and 50 mg/L) prepared by means of spiking rifampin into the blank plasma and the PBS solution. The accuracy (relative error %) was within ±5.1% and the inter- and intraday precisions (RSD %) were within ±3.9%. These samples were also used as the quality control (QC) samples. The recovery from the plasma samples was evaluated via the comparison of the area of the rifampin standard peak of the pre-protein-precipitation spiked plasma sample with that of the corresponding post-protein-precipitation spiked sample at three concentrations (0.05, 1, and 50 mg/L). The recovery ranged from 97.9 to 100.3%. The matrix effect was evaluated at two concentration levels (0.05 and 50 mg/L) for six plasma samples and one PBS sample. Concerning the plasma samples, it was determined by comparing the area of the rifampin standard peak of the post-protein-precipitation spiked plasma sample with that of the 80% acetonitrile (without the matrix effect), while with respect to the PBS samples, it

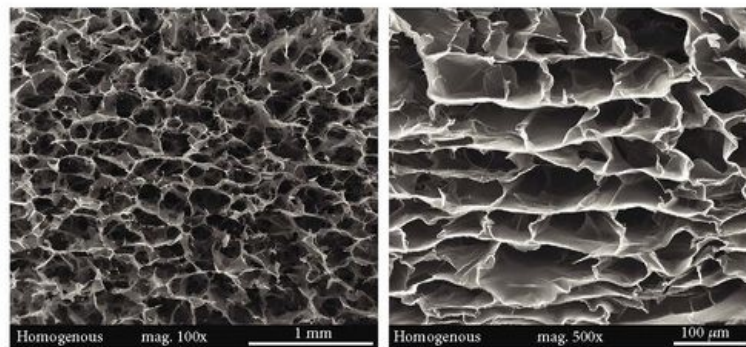


FIGURE 5: Representative SEM images of the homogeneous collagen sponges.

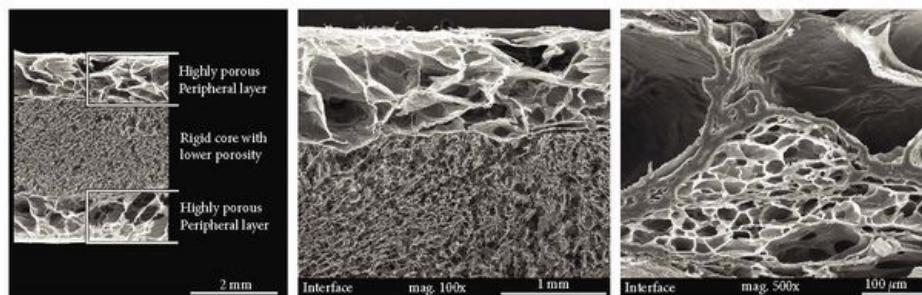


FIGURE 6: Scheme and representative SEM images of the sandwich sponges with details of the interface between the rigid core with lower porosity and the highly porous peripheral layers.

was determined by comparing the area of the rifampin standard peak that spiked into the PBS sample with that which spiked into pure water. The matrix effect ranged from 97 to 101%. This result proved that neither the plasma matrix nor the PBS exerted a significant effect on the reliable quantification of the rifampin. In order to assess the validity of the analytical method, calibration was performed every day prior to the measurement of the samples, and the quality control samples were injected after each 6th sample.

2.10. Histological Examination. Following the euthanasia of the animals, tissue samples (the whole area with the implanted sponge and the surrounding tissue) were surgically removed and submitted for further histological analysis. The tissue samples were macroscopically described and dissected into three and/or four parts (cross-sections). We employed classical histotechnological processing (fixating, dehydrating, tissue clearing etc.) and prepared standard formalin-fixed paraffin embedded blocks. We applied the following three distinct staining techniques: (1) standard hematoxylin and eosin combined with the Weigert's resorcin-fuchsin method for the staining of elastic fibers, (2) Picrosirius red for the identification of collagen fibers combined with the Weigert's resorcin-fuchsin method for the staining of

elastic fibers, and (3) Alcian blue (pH 2.5) staining combined with the Periodic Acid Schiff (PAS) reaction.

2.11. Statistical Analysis. If either the assumption of normality or homoscedasticity was violated, the Mann-Whitney *U* test for two-sample comparisons was applied. Otherwise, ANOVA and the *t*-test were used with the values expressed as the mean \pm standard deviation (SD). The data in the contingency tables was evaluated using the Fisher exact test. GraphPad Prism (Graph software, La Jolla, CA, USA) was used for the visualization of the microbiological, rifampin release, and *in vivo* tests. The thickness of the sponges and the tangent elastic moduli for the selected deformation states were compared with the inequality of the sample variance via the two-sample *t*-test (results presented as arrowheads). Statistical significance was accepted at $p \leq 0.05$.

3. Results

3.1. Scanning Electron Microscopy. Representative SEM images of the homogeneous and sandwich sponges are presented in Figures 5 and 6. Figure 6 shows SEM images of the interface between the highly porous peripheral layer and the rigid core with lower porosity. The interface between

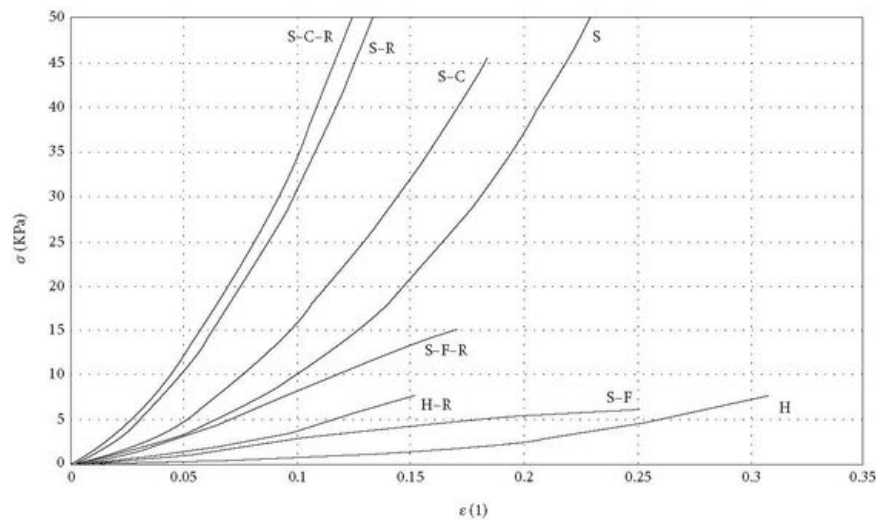


FIGURE 7: Typical stress-strain curves obtained in uniaxial tensile test.

the layers with different degrees of porosity does not evince any signs of delamination.

3.2. Mechanical Properties of the Collagen Sponges. The thicknesses of the studied samples are depicted in Figure 4. The results demonstrated that during the incorporation of the rifampin into the H and S-F collagen sponges which, in the lyophilized state evinced a lower collagen concentration, the thickness of the samples decreased. No changes in thickness were observed, however, with respect to the sandwich design (S) and sandwich core (S-C) sponges.

Typical stress-strain curves obtained in uniaxial tensile test are shown in Figure 7. The tangent moduli $E_{0,0.1}$ and $E_{0,1}$ were employed to clarify whether the mechanical properties of collagen sponges depend on the design of the sponge. A comparison of H versus S revealed that the sandwich-structured sponges were significantly stiffer than the homogeneous collagen sponges and that they were able to bear higher loads. The same results were also obtained for the H-R versus the S-R sponges. Moreover, a higher degree of stiffness was also determined for the S-C and S-F material when compared to the homogeneous sponges. Figure 8 provides specific numerical values.

With regard to the effect of rifampin, the comparisons based on both the elastic moduli revealed that the samples with rifampin were stiffer than those with no added antibiotics. The results attained statistical significance ($p < 0.05$) in all cases with the sole exception of S-F versus S-F-R. Figure 8 displays the results obtained in the form of box plots.

3.3. Rifampin Stability Tests. Figure 9 illustrates the stability of rifampin in PBS at 37°C protected from light. The rifampin degradation process in the 600 µg/mL and 60 µg/mL concentrations slowed down and became linear following a rapid

decline in concentration within the first 2 days. This may have been due to the fact that equilibrium between the rifampin and its degradation products was attained after this time period. The degradation of the rifampin in the 6 mg/mL concentration proceeded markedly more rapidly. After 7 days, approximately 40%, 60%, and 90% of the rifampin degraded in the 600 µg/mL, 60 µg/mL, and 6 µg/mL solutions, respectively.

3.4. Rifampin Release Test. Figure 10 illustrates the kinetics of the release of rifampin from the sponges. It was determined that the amount of the released rifampin was more variable in the H sponges than in the S sponges (Figure 10(a)). The variability originated from the significant variability in the weight of the samples. Although the samples were in the same size (10 × 20 mm), they had different thicknesses and, therefore, different weights as revealed by the mechanical testing results (Figure 4). A linear correlation was determined between the weights and the amount of rifampin released from the H samples (data not shown). The variability of the amount of rifampin in the S sponges was lower; indeed, the H sponges had generally higher contents of rifampin than the S sponges. It was determined that the amount of rifampin was $30.5 \pm 4.6\%$ and $17.3 \pm 2.4\%$ for the H sponges and S sponges, respectively. This represented a lower amount of rifampin than was expected since the weight ratio of the rifampin added during the preparation of the sponges was 4:5 (rifampin:collagen). The difference was possibly due to the loss of part of the rifampin during the lyophilization process.

Since the amount of rifampin released from the sponges during the final medium exchange after 24 hours of incubation was below the quantification limit (0.05 mg/L) for most of the samples, the total amount of rifampin released after

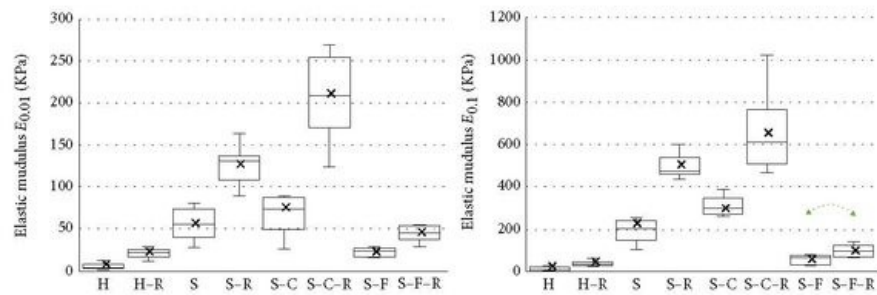


FIGURE 8: Tangent elastic moduli $E_{0.01}$ and $E_{0.1}$ obtained for all the groups ($N = 10$). The arrows denote pairs of identical sponges with or without rifampin and without statistically significant differences (t -test, $p > 0.05$).

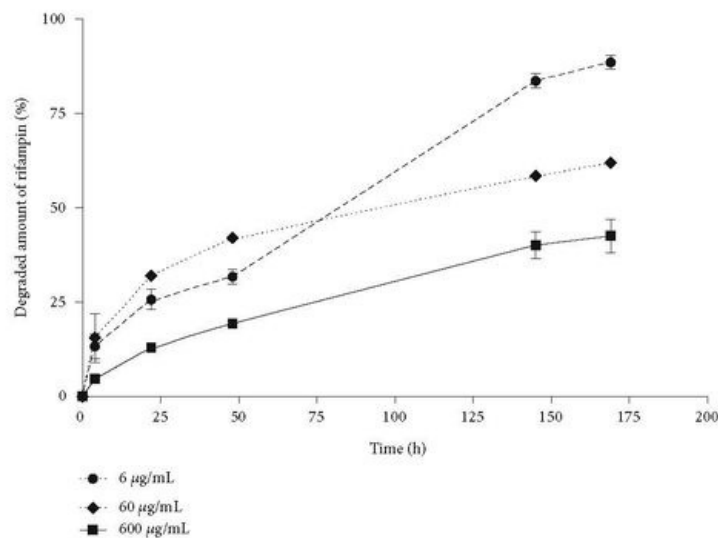


FIGURE 9: Mean \pm SD of the percentage of rifampin that degraded over time when dissolved in PBS and incubated at 37°C protected from light.

24 hours of incubation and nine PBS exchanges was accepted as the total amount of rifampin in the sponges. Figure 10(b) provides a comparison of the rifampin release kinetics of the H and S sponges. The release of rifampin from the S sponges was slightly slower than that from the H sponges.

3.5. Disc Diffusion Tests. Figure 11 illustrates the results of the disc diffusion tests with standard microbiological discs with rifampin and the tested sponges (S and H).

The disc diffusion zones proved that the sponges contained rifampin in its active form and that they released the rifampin in amounts high enough to cause the growth inhibition of the MRSA strain. Both the tested groups exhibited significantly greater inhibition zones than the standard (p values

of lower than 0.001 for both sponges compared to the standard). The difference in the diameter of the inhibition zones between the sponges was not statistically significant. The variability of the diameters of the inhibition zones was higher for the H sponges than for the S sponges.

3.6. In Vivo Pharmacokinetic Tests. As the sponges that were administered s. c. to rats were cut to contain the same rifampin amount and values of rifampin plasmatic levels were not statistically significantly different in any of the measured time points for S and H groups, we analyzed both sponges as one group (S+H, $N = 12$) and compared it with control group with SC rifampin (C, $N = 8$). Figure 12 shows the comparison of plasmatic levels of

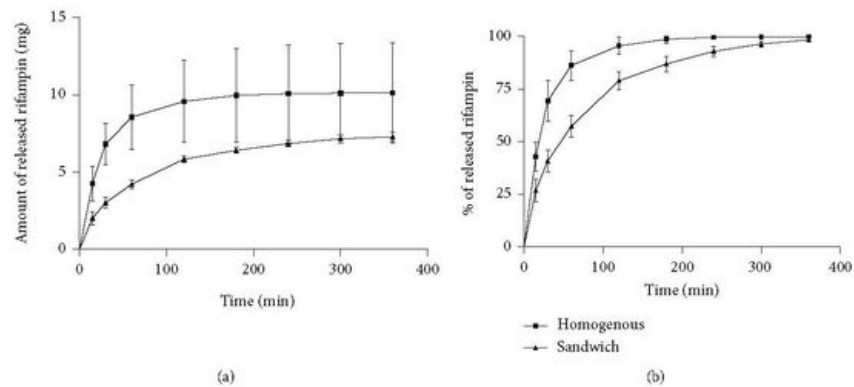


FIGURE 10: In vitro rifampin release tests: (a) mean \pm SD of the absolute amount of released rifampin over time; (b) mean \pm SD of the percentage of released rifampin over time (100% = amount eluted at 24 hours).

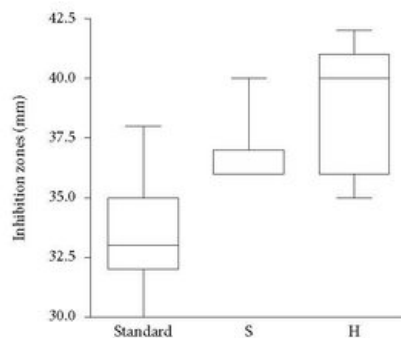


FIGURE 11: Disc diffusion tests. Comparison of the inhibition zones of the standard microbiological discs with the sandwich-structured sponges (S) and the homogeneous collagen sponges (H).

rifampin in S+H and C groups. Table 1 shows the main pharmacokinetic parameters in S+H and C groups.

A significant difference was observed between the groups with respect to the AUC. The C group had a lower degree of exposure (AUC) to the rifampin, which may have been caused by interindividual variability. The mean T_{max} occurred significantly later in the S+H group than it did in the C group, which proved a certain delay in terms of absorption in the S+H group (Table 1). Figure 12 depicts the comparison of processes of S+H and C groups' mean plasmatic concentration curves. It is clearly shown that sponges slow down the rifampin release, and most of the sponges sustained measurable and clinically meaningful concentration of rifampin for 24 hours. Nevertheless, the variability of rifampin concentrations in most of the time points is higher in the case of sponges than in the case of s. c. administration.

3.7. Histological Examination. The histological examination demonstrated the excellent biocompatibility of the sponges

with the surrounding tissue (Figures 13 and 14). In Figure 13 (H/1), the upper part (green arrow) was formed by the H sponge material that was implanted within the subcutaneous tissue. The dark blue arrow highlights a mild connective tissue reaction on the material that forms a normal part of the healing process represented by edematous granulation tissue around new thin-walled capillaries and the formation of small prominences and with no inflammation. Muscles can be observed (red arrow) in the bottom left corner of the image. Only one animal in the H group exhibited significant inflammation and hemorrhage within the granulation tissue; otherwise, normal healing process occurred and the cells readily entered the sponge scaffold and grew within the sponges. The majority of the animals in group H evinced segments with the adhesion of the sponge material and the rat connective tissue as is depicted in Figure 13 (H/2). Cells can be observed penetrating from the connective tissue (black arrows) into the sponge structure. Figure 13 (H/3) depicts detail of cells penetrating into the sponge scaffold.

Figure 13 (S/1) depicts a reaction to the sandwich-structured sponge in a similar way to that shown in H/1. The upper part (green arrow) was formed by the sponge material with a different central component (red arrow) implanted within the subcutaneous tissue with a very mild tissue reaction. Figure 13 (S/2) shows detail of edematous granulation tissue with scattered inflammatory cells (normal tissue reaction) at the bottom of the image. In Figure 13 (S/3), the scaffold is seen in the upper part of the image and a layer of scaffold structures can be observed in the center with cells in the adhesion zone of the sponge material and the connective tissue. Edematous granulation tissue with scattered inflammatory cells can be seen at the bottom of the image. The detailed image of cells penetrating into the implanted sandwich-structured sponge is depicted in Figure 14.

A much more remarkable inflammatory reaction to the rifampin solution administered s. c. was observed (group C, data not shown), and since this result may have been caused by administration via surgery, we decided to perform

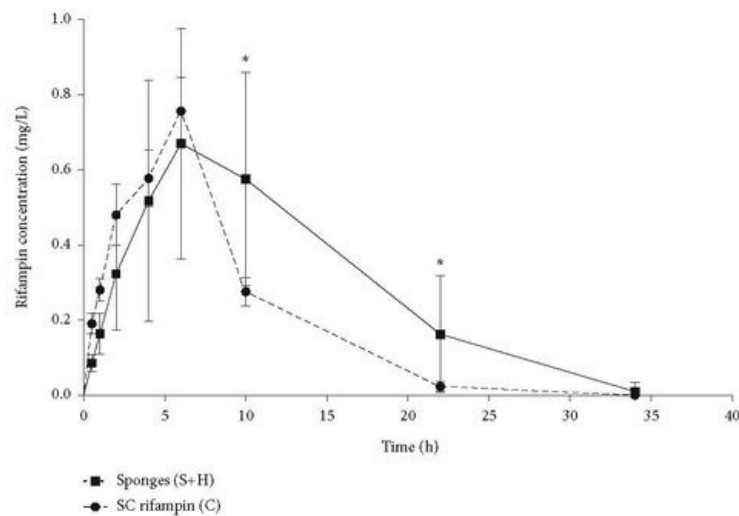


FIGURE 12: Mean \pm SD rifampin plasma levels in rats with rifampin-containing sponge implantations (S+H group) and with the s. c. administration of the rifampin solution (C group). The dose was 25 mg/kg for both groups. * Mann-Whitney test, $p < 0.05$.

TABLE 1: Mean \pm SD of the rifampin pharmacokinetic parameters in the rats—comparison of the s. c. injection of the rifampin solution in water (C) and the s. c. administered rifampin-containing sponges (S+H).

	$T_{1/2}$ [h]	T_{max} [h]	C_{max} [mg/L]	AUC_{0-inf} [mg * h/L]
SC sponges (S+H)	6.5 ± 1.5	6.9 ± 0.8	0.8 ± 0.1	11.5 ± 1.5
SC rifampin solution (C)	3.8 ± 0.4	4.5 ± 0.5	0.9 ± 0.1	6.9 ± 0.7
p value	0.11	0.03	0.55	0.02

additional tests further on 6 female Wistar rats (group C2); the results of which revealed that the rifampin solution was tolerated well without the occurrence of any remarkable local reactions. Figure 13 (C2/1) depicts a mild interstitial reaction in the center of the picture with a small area of necrotic tissue (red arrow) surrounded by a thin layer of granulation connective tissue with scattered inflammatory cells. Mild inflammation can also be observed in the fat tissue adjacent to the area around the injection site. In Figure 13 (C2/2), injection site (red arrow) with the formation of minor necrosis surrounded by mildly inflamed reactive granulation connective tissue is depicted. This represents the normal healing process. Figure 13 (C2/3) depicts the injection site in the center of the upper part of the image. The mild connective tissue reaction represents a normal part of the healing process with the formation of granulation tissue accompanied by mild inflammation.

4. Discussion

The study presented two types of collagen sponges with the addition of rifampin with the potential to serve as wound dressings that prevent postoperative wound infection. The first type consists of a homogeneous collagen sponge and

the second a sandwich-like sponge comprising a dense core layer surrounded by porous layers that both enhance adhesion to the surrounding tissues and provide for effective fluid absorption from the wound.

The results of the uniaxial tensile tests conducted on the homogeneous collagen sponges, the sandwich-structured sponges, and individual components of sandwich-structured samples (core and face sheet) suggested that from the mechanical point of view, the design of the sponge constitutes an important factor. The experiments on hydrated sponges clearly demonstrated that the sandwich structure is significantly stiffer than the homogeneous material and, therefore, potentially provides for the enhanced protection of healing wounds. The same results were determined following the study of the effect of rifampin. In particular, following the application of rifampin, the sandwich design was observed to bear a higher load than the homogeneous sponges. Thus, it was concluded that from the handling point of view, the sandwich-structured collagen sponges appear to provide better candidates for further research and that the addition of rifampin significantly alters the mechanical properties of collagen sponges (Figure 8).

Moreover, the structure of the sandwich sponges with respect to thickness was found to be more uniform than that

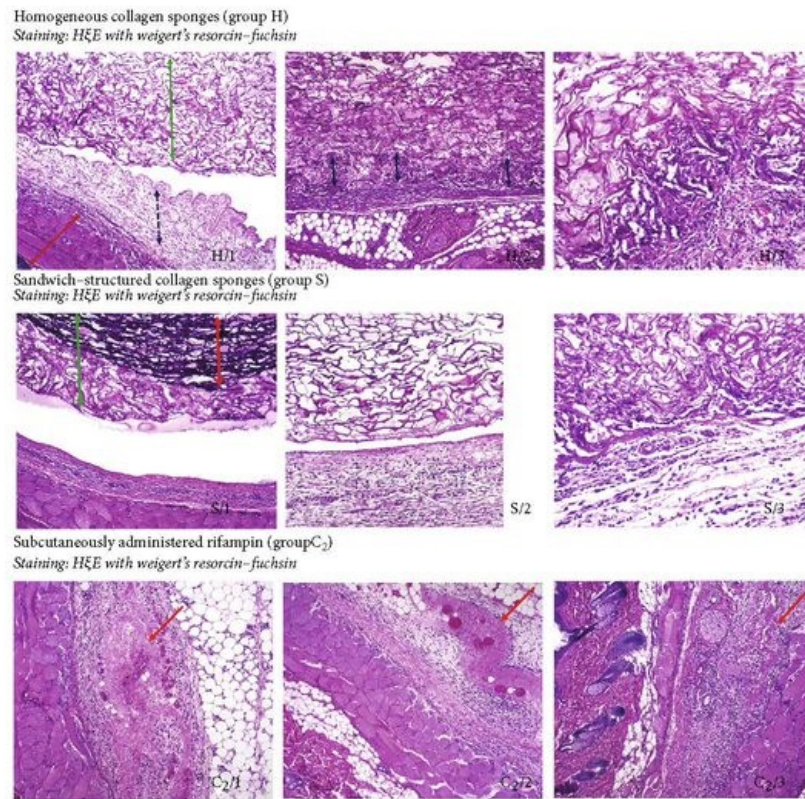


FIGURE 13: Histological examination of tissues surrounding the area of sponges (groups H and S) or s. c. (group C₂) rifampin administration.

of the homogeneous sponges (Figure 9), and even though the sandwich sponges contained lower amounts of rifampin in the same unit area than did the homogeneous sponges, the amount of rifampin was significantly less variable (Figure 10). With the exception of differences in terms of rifampin content variability, the two sponges evinced similar rifampin release properties (Figure 10). We proved that all the rifampin was completely released from the sponges after 6 hours of *in vitro* eluting testing. This is in contradiction to the results obtained by Parker et al. [14] who soaked their collagen sponges in a rifampin solution and determined that 25% of the rifampin was not released during release testing. Even though the authors suggested that the rifampin bonded within the sponges, the most probable explanation for this observation is that the rifampin degraded during testing in line with our observation that 10-30% of the rifampin degraded during the first day at 37°C (Figure 9).

When compared *in vivo*, the release of rifampin from the sponges was slower than that from the direct s. c. application of the rifampin solution (Figure 12), and moreover, the sponges maintained systemic rifampin levels at above 0.2 mg/mL for at least 22 hours, which is a higher level than

the MIC for streptococci and staphylococci according to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing database (<https://mic.eucast.org>, cited in 01/2020). This was not attainable via the administration of a single dose of rifampin s. c. Rifampin concentrations are much higher in the location of absorption than in the systemic circulation, and rifampin has been proved to be effective in terms of postsurgical wound infection prevention when administered locally [5]. The sponges presented in this study have the potential to serve as ideal postoperative dressings following surgery in infection-susceptible areas including those colonized by methicillin-resistant *staphylococcus aureus* (MRSA). Moreover, since rifampin readily penetrates biofilms [8-10], we suggest that the presented sponges will be effective when applied locally for the treatment of infected postoperative wounds complicated by the formation of biofilms, especially in cases where the wound requires a new dressing every 24 hours.

We also proved the excellent biocompatibility parameters of the sponges, which is in agreement with previous studies that described carbodiimide-cross-linked collagen sponges derived from the *cyprinidae* family as being highly

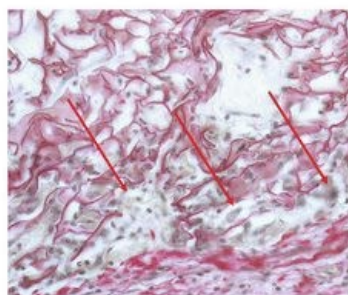


FIGURE 14: Sample from animal in group S (sandwich-structured collagen sponges). Detail of cells (arrows) penetrating between the structures of the scaffold in the adhesion zone of the sponge and the animal connective tissue (staining: Picrosirius red with Weigert's resorcin-fuchsin).

biocompatible [16]. We also proved in previous research that the immunogenicity of *cyprinus carpio*-coated vascular grafts is comparable to that of collagen of bovine origin [27]. Although some authors have proved rifampin to be cytotoxic in very high concentrations of over 1 mg/mL [28], we proved that rifampin (although classified as a local irritant) does not diminish the excellent biocompatibility of *cyprinus carpio* collagen cross-linked with carbodiimide. The histological studies showed that the edges of both types of sponges were settled by cells that migrated from the surrounding tissues and that the healing process was initiated as soon as after just 5 days (Figures 13 and 14). This is also in agreement with previously conducted studies involving bone healing rat models in which neither rifampin nor vancomycin powder added to a bone fracture proved any signs of healing impairment [29].

One drawback of the sponges presented herein is that they release the antibiotic for 24 hours only. However, it would be extremely complicated to prepare sponges that prolong the release of rifampin beyond 24 hours due to the rapid degradation of rifampin under body conditions (Figure 9).

5. Conclusions

The study presented a novel three-layered cross-linked fresh water fish collagen wound dressing *in vivo* that released rifampin for at least 22 hours and which has the potential to serve as an ideal surgical wound infection prevention or treatment approach. Its mechanical properties and the homogeneity of the rifampin content were compared with those of a simple homogeneous collagen sponge and proved to be superior in terms of both these aspects. The dressing demonstrated excellent bioavailability properties and no inhibition of the wound healing process in an animal model.

Data Availability

All data are included in the manuscript. Further details can be obtained upon request to the corresponding author.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Acknowledgments

The research was funded by a grant provided by TAČR (COMIND—TG02010049).

References

- [1] K. B. Kirkland, J. P. Briggs, S. L. Trivette, W. E. Wilkinson, and D. J. Sexton, "The impact of surgical-site infections in the 1990s: attributable mortality, excess length of hospitalization, and extra costs," *Infection Control and Hospital Epidemiology*, vol. 20, no. 11, pp. 725–730, 1999.
- [2] U. Gruessner, M. Clemens, P. V. Pahlplatz et al., "Improvement of perineal wound healing by local administration of gentamicin-impregnated collagen fleeces after abdominoperineal excision of rectal cancer," *American Journal of Surgery*, vol. 182, no. 5, pp. 502–509, 2001.
- [3] L. Xiong, Q. Pan, G. Jin, Y. Xu, and C. Hirche, "Topical intra-wound application of vancomycin powder in addition to intravenous administration of antibiotics: a meta-analysis on the deep infection after spinal surgeries," *Orthopaedics & Traumatology, Surgery & Research*, vol. 100, no. 7, pp. 785–789, 2014.
- [4] B. L. Hamman, L. Y. Stout, T. T. Theologes, D. M. Sass, B. da Graca, and G. Filardo, "Relation between topical application of platelet-rich plasma and vancomycin and severe deep sternal wound infections after a first median sternotomy," *The American Journal of Cardiology*, vol. 113, no. 8, pp. 1415–1419, 2014.
- [5] Ş. Kahramanca, O. Kaya, C. Azlı, B. Celep, E. Gökce, and T. Küçükpınar, "Does topical rifampicin reduce the risk of surgical field infection in hernia repair?," *Ulusal Cerrahi Dergisi*, vol. 29, no. 2, pp. 54–58, 2013.
- [6] B. Khanlari, L. Elzi, L. Estermann et al., "A rifampicin-containing antibiotic treatment improves outcome of staphylococcal deep sternal wound infections," *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 65, no. 8, pp. 1799–1806, 2010.
- [7] W. Zimmerli, A. F. Widmer, M. Blatter, R. Frei, and P. E. Ochsner, "Role of rifampin for treatment of orthopedic implant-related staphylococcal infections: a randomized controlled trial," *JAMA*, vol. 279, no. 19, pp. 1537–1541, 1998.
- [8] C. E. Edmiston, A. J. McBain, C. Roberts, and D. Leaper, "Clinical and microbiological aspects of biofilm-associated surgical site infections," *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 830, pp. 47–67, 2015.
- [9] S. M. Shiels, D. J. Tennent, and J. C. Wenke, "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.
- [10] W. Zimmerli and P. Sendi, "Orthopaedic biofilm infections," *APMIS*, vol. 125, no. 4, pp. 353–364, 2017.
- [11] Z. Ruszczak and W. Friess, "Collagen as a carrier for on-site delivery of antibacterial drugs," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 55, no. 12, pp. 1679–1698, 2003.
- [12] S. Chattopadhyay and R. T. Raines, "Review collagen-based biomaterials for wound healing," *Biopolymers*, vol. 101, no. 8, pp. 821–833, 2014.

- [13] J. Grzybowski, W. Kolodziej, E. A. Trafny, and J. Struzyna, "A new anti-infective collagen dressing containing antibiotics," *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 36, no. 2, pp. 163–166, 1997.
- [14] S. J. Parker, D. Brown, P. F. Hill, and P. E. Watkins, "Fibrinogen-impregnated collagen as a combined haemostatic agent and antibiotic delivery system in a porcine model of splenic trauma," *The European Journal of Surgery*, vol. 165, no. 6, pp. 609–614, 1999.
- [15] G. Charriere, M. Bejot, L. Schnitzler, G. Ville, and D. J. Hartmann, "Reactions to a bovine collagen implant. Clinical and immunologic study in 705 patients," *Journal of the American Academy of Dermatology*, vol. 21, no. 6, pp. 1203–1208, 1989.
- [16] F. Pati, P. Datta, B. Adhikari, S. Dhara, K. Ghosh, and P. K. Das Mohapatra, "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.
- [17] I. Bae, K. Osatomi, A. Yoshida, K. Osako, A. Yamaguchi, and K. Hara, "Biochemical properties of acid-soluble collagens extracted from the skins of underutilised fishes," *Food Chemistry*, vol. 108, no. 1, pp. 49–54, 2008.
- [18] S. Yamada, K. Yamamoto, T. Ikeda, K. Yanagiguchi, and Y. Hayashi, "Potency of fish collagen as a scaffold for regenerative medicine," *BioMed Research International*, vol. 2014, Article ID 302932, 8 pages, 2014.
- [19] T. Suchý, M. Šupová, E. Klápková et al., "The release kinetics, antimicrobial activity and cytocompatibility of differently prepared collagen/hydroxyapatite/vancomycin layers: microstructure vs. nanostructure," *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 100, pp. 219–229, 2017.
- [20] L. R. M. Versteegden, M. ter Meer, R. M. L. M. Lomme et al., "Self-expandable tubular collagen implants," *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, vol. 12, no. 6, pp. 1494–1498, 2018.
- [21] P. Lukáč, J. M. Hartinger, M. Mlček et al., "A novel gentamicin-releasing wound dressing prepared from freshwater fish *Cyprinus carpio* collagen cross-linked with carbodiimide," *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, vol. 34, no. 3, pp. 246–262, 2019.
- [22] J. M. Hartinger, P. Lukáč, P. Mitáš et al., "Vancomycin-releasing cross-linked collagen sponges as wound dressings," *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 2019.
- [23] T. Suchý, M. Šupová, P. Sauerová et al., "The effects of different cross-linking conditions on collagen-based nanocomposite scaffolds-an in vitro evaluation using mesenchymal stem cells," *Biomedical Materials*, vol. 10, no. 6, article 065008, 2015.
- [24] S. D. Pearson and L. A. Trissel, "Stability and compatibility of minocycline hydrochloride and rifampin in intravenous solutions at various temperatures," *American Journal of Hospital Pharmacy*, vol. 50, no. 4, pp. 698–702, 1993.
- [25] T. Boleslavská, S. Světlík, P. Žvátora et al., "Preclinical evaluation of new formulation concepts for abiraterone acetate bioavailability enhancement based on the inhibition of pH-induced precipitation," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 151, pp. 81–90, 2020.
- [26] D. R. Davis, R. A. Yeary, and K. Lee, "Activated charcoal decreases plasma bilirubin levels in the hyperbilirubinemic rat," *Pediatric Research*, vol. 17, no. 3, pp. 208–209, 1983.
- [27] L. Lambert, M. Novakova, P. Lukac et al., "Evaluation of the immunogenicity of a vascular graft covered with collagen derived from the European carp (*Cyprinus carpio*) and bovine collagen," *BioMed Research International*, vol. 2019, Article ID 5301405, 8 pages, 2019.
- [28] M. Herten, E. A. Idelevich, S. Sielker et al., "Vascular graft impregnation with antibiotics: the influence of high concentrations of rifampin, vancomycin, daptomycin, and bacteriophage endolysin HY-133 on viability of vascular cells," *Medical Science Monitor Basic Research*, vol. 23, pp. 250–257, 2017.
- [29] S. M. Shiels, D. J. Tennent, A. L. Lofgren, and J. C. Wenke, "Topical rifampin powder for orthopaedic trauma part II: topical rifampin allows for spontaneous bone healing in sterile and contaminated wounds," *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 36, no. 12, pp. 3142–3150, 2018.

Vancomycin-releasing cross-linked collagen sponges as wound dressings

Jan Miroslav Hartinger¹, Peter Lukáč², Petr Mitáš², Mikuláš Mlček³, Michaela Popková³,
Tomáš Suchý^{4,5}, Monika Šupová⁴, Jan Závora⁶, Václava Adámková⁶, Hana Benáková⁶,
Ondřej Slanař¹, Martin Šíma^{1*}, Martin Bartoš⁷, Hynek Chlup⁵, Tomáš Grus²

ABSTRACT

The study presents a novel vancomycin-releasing collagen wound dressing derived from *Cyprinus carpio* collagen type I cross-linked with carbodiimide which retarded the degradation rate and increased the stability of the sponge. Following lyophilization, the dressings were subjected to gamma sterilization. The structure was evaluated via scanning electron microscopy images, micro-computed tomography, and infrared spectrometry. The structural stability and vancomycin release properties were evaluated in phosphate buffered saline. Microbiological testing and a rat model of a wound infected with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) were then employed to test the efficacy of the treatment of the infected wound. Following an initial mass loss due to the release of vancomycin, the sponges remained stable. After 7 days of exposure in phosphate buffered saline (37°C), 60% of the material remained with a preserved collagen secondary structure together with a high degree of open porosity (over 80%). The analysis of the release of vancomycin revealed homogeneous distribution of the antibiotic both across and between the sponges. The release of vancomycin was retarded as proved by *in vitro* testing and further confirmed by the animal model from which measurable concentrations were observed in blood samples 24 hours after the subcutaneous implantation of the sponge, which was more than observed following intraperitoneal administration. The sponge was also highly effective in terms of reducing the number of colony-forming units in biopsies extracted from the infected wounds 4 days following the inoculation of the wounds with the MRSA solution. The presented sponges have ideal properties to serve as wound dressing for prevention of surgical site infection or treatment of already infected wounds.

KEYWORDS: Wound dressing; sponge; carp; freshwater fish; collagen; vancomycin; infection; crosslinking; MRSA

INTRODUCTION

To date, the application of vancomycin-releasing collagen sponges as wound dressings has not been studied to any

significant extent. Current approaches involve either the incorporation of other antibiotics into collagen sponges [1-3] or the use of vancomycin as one element of hydroxyapatite beads in the treatment of musculoskeletal injuries [4,5]. Moreover, various studies have described the administration of a vancomycin powder directly on surgical wounds so as to prevent wound infection following spinal, cardiac, or vascular surgery, with good effects [6,7]. In addition to the prevention of infection, a hemostatic effect is desirable in the postoperative wound healing process. Vander Salm et al. mixed a vancomycin powder with thrombin and an absorbable gelatin paste, which served for hemostatic purposes [8]. Further, Hamman et al. described mixing of vancomycin with platelet-rich plasma and calcium-thrombin [7]. It is proposed that a vancomycin-releasing hemostatic collagen sponge would be ideal for this purpose since it consists of a ready-to-use device that does not require preparation during surgery via the mixing of the antibiotic with hemostatic compounds.

Since neither vancomycin nor aminoglycosides do not readily penetrate into tissues [9], their effect in terms of postoperative wound treatment and prophylaxis may be insufficient in the case of systemic administration, and systemic toxicity may follow; therefore, local administration is preferable. High local vancomycin levels were achieved with no signs of nephrotoxicity [10], when vancomycin-impregnated bone grafts

¹Department of Clinical Pharmacology and Pharmacy, Institute of Pharmacology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic

²Department of Cardiovascular Surgery, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic

³Institute of Physiology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic

⁴Department of Composites and Carbon Materials, Institute of Rock Structure and Mechanics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic

⁵Department of Mechanics, Biomechanics and Mechatronics, Faculty of Mechanical Engineering, Czech Technical University in Prague, Prague, Czech Republic

⁶Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic

⁷Department of Stomatology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic

*Corresponding author: Martin Šíma, Department of Clinical Pharmacology and Pharmacy, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Albertov 4, 128 00 Prague 2, Czech Republic. Phone: +420 224 968 161; Fax: +420 224 968 149. E-mail: martin.sima@lf1.cuni.cz

DOI: <https://dx.doi.org/10.17305/bjbms.2019.4496>

Submitted: 23 October 2019/Accepted: 27 November 2019

Conflict of interest statement: The authors declare no conflict of interests



©The Author(s) (2021). This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

in combination with an aminoglycoside-containing cement were used in hip joint replacement surgery [10]. Following the application of 1000 mg of vancomycin powder during surgery for spinal deformity in children, supratherapeutic levels were achieved in a fluid drained by a subfascial drain up to the second postoperative day (403 mg/L, 251 mg/L, and 115 mg/L for day 0, day 1, and day 2, respectively) and the same study recorded non-toxic levels in plasma (2.5 mg/L, 1.9 mg/L, and 1.1 mg/L for day 0, day 1, and day 2, respectively) [11].

Mammal collagens, such as calf or bovine, are the most used collagen types for biomaterial engineering [4,5].

However, the use of mammal collagen may be complicated by an allergic reaction induced in 3–4% of the population [12]. Therefore, fish collagen is being subjected to intensive research with an emphasis on its application for medical purposes [3,13–16]. Since fish-derived collagen exhibits a lower melting temperature and less reproducible properties than mammal collagen [17], it must be crosslinked in order to obtain a product that exhibits reproducible properties [14]. A further reason for crosslinking is to enhance durability during the sterilization process since non-crosslinked collagen is significantly degraded upon exposure to gamma rays [18]. Therefore, if gamma sterilization is a part of the fabrication of the ready-to-use medical device, crosslinking provides a reliable way to preserve the properties of both fish and mammal collagen [3,19]. One of our previous studies showed successful testing of a gentamicin-releasing carbodiimide cross-linked with freshwater fish (*Cyprinus carpio*, *C. carpio*) collagen wound dressing on a rat model of surgical site infection [3]. The current study presents the results of structural, drug-releasing, and microbiological testing of an animal model of infected wound treated with a novel vancomycin-releasing cross-linked freshwater fish-derived collagen wound dressing.

MATERIALS AND METHODS

Collagen extraction

Collagen type I was isolated from freshwater fish skin (*C. carpio*, *Třeboň carp*, Třeboň fishery Třeboň, Czech Republic) by adapting the procedure published by Bell et al. [20]; all the fish were of food grade and controlled breeding. The degreasing procedure was performed in 70% ethanol (Penta, Czech Republic), followed by washing 30 min in distilled water. Collagen was extracted by 0.001 vol% acetic acid (Penta, Czech Republic) for 48 h under continuous stirring, followed by centrifugation at 10,000 r/min for 1 h. The supernatant was precipitated in 0.1 M NaOH (Penta, Czech Republic) at a ratio of 6:1 (v/v) to neutralize acetic acid. The mixture was then re-centrifuged at 10,000 r/min (50 min). The collagen precipitates were again solubilized in 0.001 vol% acetic acid, frozen at -15°C and lyophilized (BenchTop 4KZL,

VirTis, Prague, Czech Republic). The purity of the isolated collagen was verified repeatedly by a number of methods, e.g., the determination of the lipid content and inorganic impurities. Moreover, the collagen structure was verified through electrophoresis and by infrared spectrometry. Possible cytotoxicity of isolated collagen was determined by *in vitro* tests; detailed results have been published elsewhere [21].

Preparation of collagen sponges

Sponges were prepared from a collagen dispersion (0.8 wts%) in deionized water; after swelled collagen (8°C, 1 h) was homogenized by disintegrator (10,000 rpm, 10 min and 10,000 rpm, 2 min with 20 min delay at 20°C). The resulting product was frozen at -80°C for 5 h and lyophilized.

Collagen sponges were crosslinked in a 95% ethanol solution containing N-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS) at a weight ratio of 4:1; a 3-h reaction period at 37°C with EDC and NHS (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) was followed by washing with 0.1 M Na₂HPO₄ (2 × 45 min), rinsing in deionized water for 30 min, freezing at -15°C (5 h), and lyophilization.

Each of the cross-linked sponges with dimensions of approximately 40 mm × 40 mm was impregnated with 5 mL of 95% wt ethanol solution with 64 mg of vancomycin (Mylan S.A.S, France). After impregnation, sponges were frozen and lyophilized. Finally, specimens were cut to the dimensions suitable for further analyses. The final collagen to the vancomycin weight ratio was 5:4.

The sterilization of vancomycin-loaded sponges was performed by gamma sterilization. All samples were packed and exposed to a nominal dose of 25 kGy (BIOSTER, a.s., Veverská Bítýška, Czech Republic). The samples used in all experiments were sterilized.

Microstructure of collagen sponges

Scanning electron microscopy (SEM)

The microstructure of sponges was characterized by SEM (Quanta 450 Microscope, FEI, Hillsboro, Oregon, USA) in high vacuum mode. Prior to microscopy, the cross-sections of sponges were covered by a thin layer of gold (Emitech K550X ion Sputter, Quorum Technologies, United Kingdom).

Micro-computed tomography (CT)

The quantification of structural parameters was carried out by micro-CT analysis using SkyScan 1272 micro-CT device (Bruker micro-CT, Kontich, Belgium). The scanning parameters were as follows: pixel size 3 μm; source voltage 60 kV; source current 166 μA; rotation step 0.2°; rotation 180°; frame averaging 4; and scanning time approximately 2 h for each sample (n = 4). The flat-field correction was updated

prior to each acquisition. The reconstruction of cross-section images was carried out from the projection images by NRecon software (Bruker micro-CT, Kontich, Belgium) using a modified Feldkamp algorithm. Three volumes of interest [VOI] (3 mm × 3 mm × sample thickness) were analyzed in each sample. Image-processing and analyses were performed by CTAn (Bruker micro-CT, Kontich, Belgium) and optimized using Test Image Generator software [22]. The porosity (Po) was calculated as: $Po = (\text{volume of open} + \text{closed pores}) / \text{VOI volume}$. The pore size was evaluated via a "structure separation" parameter calculated in 3D using a sphere-fitting algorithm [23,24], and the object surface density (OSD) was calculated as $OSD = \text{object surface} / \text{VOI volume}$.

Structural stability

The structural stability was analyzed in terms of mass loss and swelling ratio. Collagen sponges (8 mm × 8 mm × 4 mm) were immersed in phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4, Sigma-Aldrich) in 5% CO₂ atmosphere at 37°C. The volume of the medium was kept at a ratio of 30 mg/15 mL (sample weight/PBS volume). The mass loss (D) was calculated as $D = 100 \times (W_o - W_f) / W_o$ [%], where the initial dried weight of the sample ($n = 6$) is W_o and the dried weight following degradation is W_f . The dried weight of the samples was measured following lyophilization. The swelling ratio (E_{sw}) was calculated as: $E_{sw} = 100 \times (W_{sw} - W_o) / W_o$ [%], where the initial weight is W_o , the dried weight of the sample following degradation is W_f , and the weight of the swollen sample is W_{sw} ($n = 6$). The weight of the swollen samples was measured after the removal of the sample from the medium and after a 1-minute delay and the removal of any excessive medium surrounding the sample.

Infrared spectrometry

The secondary structure of collagen sponges was evaluated by attenuated total reflection Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectrometry using a Protégé 460 E.S.P. infrared spectrometer (Thermo Nicolet Instruments, Madison, WI, USA) equipped with an ATR device (GladiATR, PIKE Technologies, Madison, WI, USA). All the spectra were recorded in absorption mode, in the range of 4000–400 cm⁻¹ with a resolution of 4 cm⁻¹ and 128 scans. The integral absorbance (areas of the bands) was determined using deconvolution procedure (OMNIC 7 software, Thermo Nicolet Technologies).

Vancomycin release tests

Pieces of the collagen sponges sized 10 mm × 20 mm were studied. Four pieces were obtained from two different sponges (two from the edges and two from the central parts) in order to test the variability of the vancomycin content between the sponges and the homogeneity of the vancomycin content

within the sponges. The weight of tested samples was 43.0 ± 3.9 mg. The expected amount of vancomycin in the pieces of tested sponges according to the 4:5 collagen: vancomycin ratio was 19.1 ± 1.8 mg. Each tested piece was submerged in 10 mL of 37°C PBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) in a test tube and gently rocked on a laboratory rocker placed in an incubator at 37°C. The pieces of sponges were transferred to a newly tempered 10 mL of PBS after 30, 60, 120, 180, 240, 330, and 480 min and 24 h. The final samples were obtained 7 days following the commencement of the experiment. The samples of PBS with released vancomycin were subsequently analyzed by a nephelometric immunochemical assay (Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA) for the concentration of vancomycin.

Disk diffusion test

Six discs of 6 mm in diameter were cut from sponges, three from different sponges and additional three from one sponge (corner, edge, and central part). The microbiological response was tested via a standard disk diffusion test with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), strain CNCTC 6271.

Rat model of infected wound

Male Wistar rats ($n = 30$) with a median weight of 280.5 g (interquartile range [IQR] = 272.25–285 g) were anesthetized with isoflurane. An approximately 1-cm long incision was then made on both sides of the back at least 2 cm apart, followed by an injection of a MRSA solution (0.2 mL of 1×10^8 colony-forming unit [CFU]/mL) into a subcutaneous (s.c.) pocket created by a blunt dissection on each side.

With respect to vancomycin group ($n = 12$), a 10 mm × 10 mm piece of vancomycin-containing collagen sponge was inserted into the pocket on the sponge side and the wound was closed with a non-resorbable monofilament suture. The weight of the pieces applied was 25.2 ± 1.6 mg (mean ± standard deviation [SD]) and the amount of vancomycin in the collagen sponge pieces was 11.2 ± 0.7 mg (mean ± SD). For placebo group ($n = 6$), a 10 mm × 10 mm piece of placebo-containing collagen sponge was applied. The pocket on the sham surgery side was sutured with no sponge so as to provide for a control.

Along with the active and control arms, additional 12 rats were used for the determination of vancomycin pharmacokinetics. We administered 7.5 mg of vancomycin intraperitoneally to rats accompanied by a similar induction of s.c. infection; we measured the plasma levels in the same way as we did for the active arm.

The animals were then transferred to individual cages with free access to food and water; they were checked daily for weight, body temperature, and behavioral changes. The

animals were sacrificed on the 4th post-implantation day. Tissue specimens were then excised from both inoculation sites and examined microbiologically (numbers of MRSA CFU).

Microbiological evaluation

Tissue samples were imprinted directly on Columbia Agar plates with sheep's blood (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK). The plates were then incubated at 37°C for 24 h. MRSA colonies were counted following incubation.

Vancomycin and haptoglobin levels in serum

Blood samples (volume, 0.5 mL) for determination of vancomycin and haptoglobin levels were drawn from the jugular vein into a 0.5 mL heparinized syringe under isoflurane anesthesia. Samples were drawn from three animals in vancomycin group 0.5, 1, 2, and 4 h following inoculation on the 1st day to determine vancomycin and haptoglobin levels. Samples were also taken from all animals in placebo group on the 1st day 2 h following inoculation to determine haptoglobin level only. Samples from four animals in vancomycin group and two animals in placebo group were drawn on the 1st, 2nd, and 3rd day following inoculation. The final sample was drawn intracardially upon termination on day 4 following inoculation. The samples were centrifuged (12,000 rpm, 2 min) and the samples from days 1, 2, and 3 following inoculation were frozen at -20°C until analyzed. Vancomycin concentration in the blood as well as haptoglobin level (rat acute phase marker) were determined using a nephelometric method (Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA).

Ethical statement

The study was approved by the Animal Care and Use Committee of the First Faculty of Medicine, Charles University (ref. no. MSMT-11255/2015-5) and conducted in accordance with Czech Act No. 246/1992 Coll. as amended on the protection of animals against cruelty according to the EU legislation.

Statistical analysis

Shapiro–Wilk and Chi-square tests were used for the verification of data normality. Grubbs' or Dixon's tests were applied for outlier identification. The variance was checked by the Bartlett's Levene's tests. The Kruskal–Wallis test with Bonferroni procedure was used for multiple sample comparisons. The Mann–Whitney U test was applied for two-sample comparisons in the case of violation of normality or homoscedasticity assumptions. In that case, values are expressed as median with IQR. All tests were conducted using Statgraphics Centurion XVII (StatPoint, Warrenton, VA, USA). ANOVA and t-test were used for data expressed as mean ± SD. Fisher's exact test was applied to data in the contingency tables. The visualization of the microbiological, gentamicin release, and *in vivo* tests was performed using GraphPad Prism version 7.00 for Windows (GraphPad software, La Jolla, CA, USA). Statistical significance was accepted at $p \leq 0.05$.

RESULTS

Microstructure of collagen sponges

Figure 1 shows the image and SEM images of collagen sponges. The median pore size was 66 µm (IQR 42–120 µm) and the open porosity (OP) was 84.2% (Figure 1). The degree of closed porosity of sponges was very low, i.e., between 2×10^{-5} and $4 \times 10^{-3}\%$. This value indicates minimal proportion of non-interconnected pores. Finally, the OSD was determined at 39.1 mm⁻³.

Structural stability of collagen sponges

The degradation rate of collagen samples increased rapidly to 22% (median) during the initial 4 h (Figure 2). This initial rapid mass loss may have been the result of the release of vancomycin from the inner structure of the sponges. The mass loss had been almost linear between 4 and 48 h. Subsequently the mass loss did not continue. The maximal mass loss was

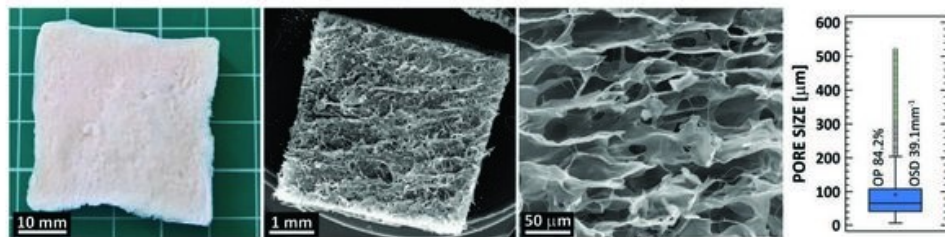


FIGURE 1. Photograph and scanning electron microscopy micrographs (from left) of the surface and the inner structure of vancomycin-containing collagen sponges. The box-plot shows the pore size, open porosity (OP), and object surface density (OSD) of the prepared samples ($n = 4$). The median pore size was 66 µm (interquartile range 42–120 µm) and OP was 84.2%. The degree of closed porosity of sponges was very low, i.e., between 2×10^{-5} and $4 \times 10^{-3}\%$. This value indicates minimal proportion of non-interconnected pores. Finally, OSD was determined at 39.1 mm⁻³.

approximately 41%, indicating stability and gradual degradation of the samples.

Vancomycin-loaded collagen samples exhibited considerable swelling with approximately constant swelling ratios during the first 168 h (Figure 2). The constant swelling ability indicates appropriate exchange of body liquids despite the 40% mass loss.

FTIR analysis of collagen sponges

Infrared spectroscopy (FTIR) can be used as an analytical technique to determine changes in the secondary structure of collagen after various processes, such as isolation, crosslinking, denaturation, and sterilization. The FTIR spectra of collagen includes amide bands such as amide I bands ($\sim 1655 \text{ cm}^{-1}$) that

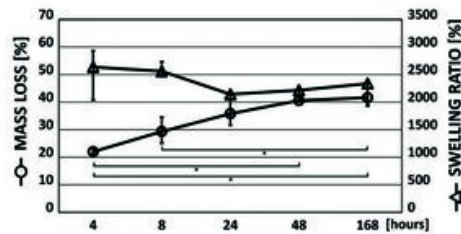


FIGURE 2. Mass loss and swelling ratio (median, interquartile range) of vancomycin-loaded collagen sponges. The asterisks denote statistically significant differences at the 95% confidence level (Kruskal-Wallis test with Bonferroni procedure). The degradation rate of collagen samples increased rapidly to 22% (median) during the initial 4 h. This initial rapid mass loss may have been the result of the release of vancomycin from the inner structure of the sponges. The mass loss had been almost linear between 4 and 48 h. Subsequently the mass loss did not continue. The maximal mass loss was approximately 41%, indicating stability and gradual degradation of the samples.

arise from C–O stretching vibrations coupled with N–H bending vibrations, and also amide II bands ($\sim 1555 \text{ cm}^{-1}$) and amide III bands ($\sim 1240 \text{ cm}^{-1}$) that belong to N–H bending vibrations coupled with C–N stretching vibrations (Figure 3). Amide III consists of a band triplet at ~ 1205 , 1240 , and 1280 cm^{-1} and, together with another band at 1340 cm^{-1} , can be considered as the proof of the existence of a triple helical structure [25,26]. The FTIR spectra of the studied collagen materials containing vancomycin hydrochloride before and after the degradation tests and their comparison with vancomycin hydrochloride and the original collagen material are presented in Figure 3.

The infrared spectra of vancomycin-loaded collagen sponges (violet spectrum) exhibited the fundamental spectrum of pure (without vancomycin) collagen (red spectrum) enriched by the spectral features of vancomycin hydrochloride (violet arrows). The bands at 1740 and 2930 cm^{-1} in the figure 3 are related to the presence of lipids, such as residual impurities that remained within collagen following the isolation procedure [25]. The lipids disappeared from the collagen matter after the immersion in PBS buffer during degradation tests.

The post-degradation spectrum of vancomycin-loaded collagen (blue) revealed disappearance of the vancomycin hydrochloride-related bands, proving that almost all vancomycin was released from collagen sponges within 168 hours. The material preserved its secondary collagen structure beyond 168 h of degradation in PBS medium, as proven by the quartet – amide III (~ 1205 , 1240 , and 1280) together with the 1340 band (black ellipse).

Vancomycin release tests

The vancomycin release profile and the percentage of vancomycin released from sponges over time are presented in Figure 4. The total amount of vancomycin released from

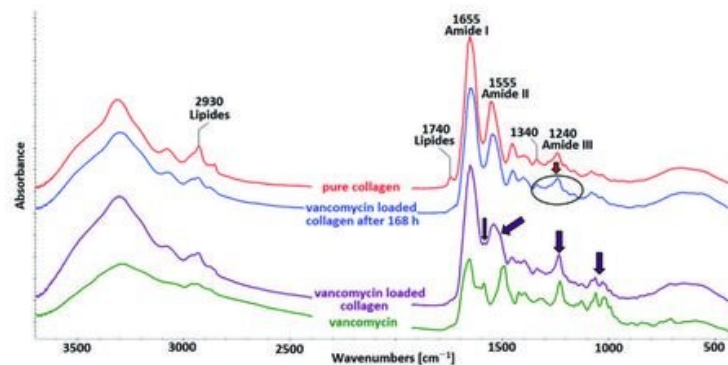


FIGURE 3. Infrared spectra of vancomycin-loaded collagen materials before and after the degradation tests in phosphate buffered saline. The almost total release of vancomycin was proven. The spectral features of vancomycin disappeared from the spectra of tested collagen sponges after 7 days. The small amount of vancomycin that was not released to the medium was most probably bound to the sponge.

sponges after 7 days was 16.3 ± 2.3 mg, corresponding to $85.25\% \pm 7.4\%$ of the total vancomycin content. One of the tested sponges was found to have released $79.6\% \pm 0.9\%$ and another $90.9\% \pm 5.9\%$ of the expected vancomycin content. Most of vancomycin was released during the first 8 h (Figure 4).

The almost total release of vancomycin was further proven using infrared spectrometry, which revealed that the spectral features of vancomycin disappeared from the spectra of tested collagen sponges after 7 days (Figure 3). The small amount of vancomycin that was not released to the medium was most probably bound to the sponge.

Disk diffusion test

The tested collagen sponge discs exhibited broad inhibition zones that were even larger than those of standard discs used for testing antibiotic susceptibility (Figure 5). The mean \pm standard error of the mean (SEM) of the inhibition zones was 20.3 ± 0.33 and 17.0 ± 0.37 for the sponges and the microbiological standard discs, respectively ($p < 0.0001$).

Rat model of infected wound

No significant changes were determined in terms of the body weight (BW), behavior, or body temperature for either of the groups, although the increase in the median (IQR) weight of animals in vancomycin group was greater on day 4, i.e., 18 g (14.75–20.25) vs. 4 g (-5.75–13.75). Haptoglobin levels increased in both groups from baseline levels and were higher in placebo group throughout the duration of the study. The difference reached statistical significance on day 4 ($p = 0.0034$; Figure 6). The haptoglobin area under the curve (AUC) was 2.78 and 3.51 $\text{g}^2\text{day/L}$ for vancomycin and placebo groups, respectively.

Pharmacokinetic analysis of intraperitoneal (i.p.) vancomycin

The mean vancomycin levels following i.p. administration of 7.5 mg of the antibiotic are shown in Figure 7. Almost

all vancomycin was eliminated during the first 4 h following administration. Vancomycin was detected in one animal only after 24 h (0.2 mg/L). The AUC calculated according to the obtained levels was $87.71 \text{ mg}^2\text{h/L}$. Following the administration of 11.2 mg (the same amount that was administered via the sponges), the AUC was expected to be $130.9 \text{ mg}^2\text{h/L}$.

Pharmacokinetic analysis of vancomycin released from sponges

The mean vancomycin plasma levels following s.c. administration via the sponges are presented in Figure 8. The release of vancomycin was significantly prolonged compared to that following i.p. administration. Vancomycin was still measurable in all four samples 24 h following implantation ($0.93 \pm 0.6 \text{ mg/L}$) and subsequently decreased to below detectable limits (Figure 8). The AUC calculated according to the determined levels was $115.5 \text{ mg}^2\text{h/L}$, i.e., 88.2% of the AUC calculated for the same dose by the i.p. pharmacokinetic analysis described above. We assume that the rest of vancomycin was bound to those sponges that were not degraded during the 4-day study period.

Microbiological examination of infected wound biopsies

Table 1 shows a comparison of the numbers of CFU cultivated from the two inoculation sites (with and without sponges) in the animals from vancomycin and placebo groups.

Even though differences between the sham surgery and the sponge sides in vancomycin and placebo groups were not statistically significant, the numbers of CFU were lower in the treated side in vancomycin group and in the side without sponges in placebo group.

DISCUSSION

This study presents the preparation of a novel carbodiimide cross-linked freshwater fish collagen sponge containing

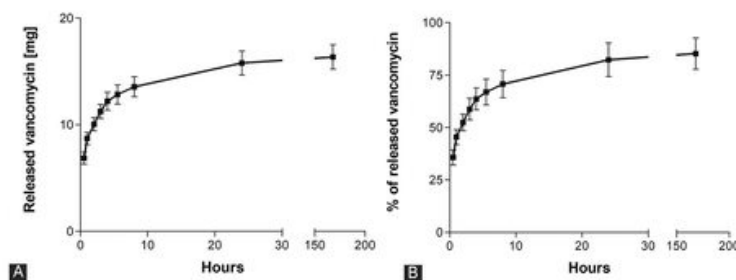


FIGURE 4. Vancomycin dissolution into phosphate buffered saline. (A) Absolute amount in mg, (B) relative to the expected amount according to the gravimetric assumption. The total amount of vancomycin released from sponges after 7 days was 16.3 ± 2.3 mg, corresponding to $85.25\% \pm 7.4\%$ of the total vancomycin content. One of the tested sponges was found to have released $79.6\% \pm 0.9\%$ and another $90.9\% \pm 5.9\%$ of the expected vancomycin content. Most of vancomycin was released during the first 8 h.

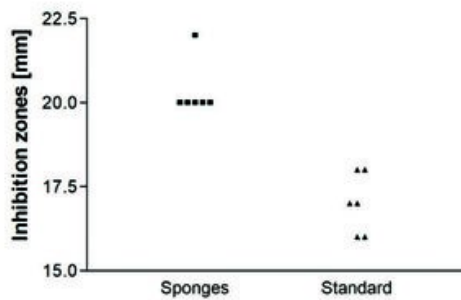


FIGURE 5. Disk diffusion test of vancomycin-containing collagen sponges and standard susceptibility testing of vancomycin discs. The mean \pm standard error of the mean (SEM) of the inhibition zones was 20.3 ± 0.33 and 17.0 ± 0.37 for the sponges and the microbiological standard discs, respectively ($p < 0.0001$). The tested collagen sponge discs exhibited broad inhibition zones that were even larger than those of standard discs used for testing antibiotic susceptibility.

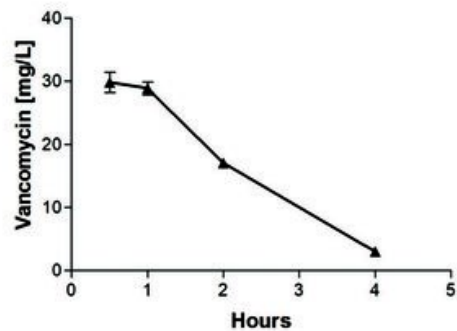


FIGURE 7. Mean \pm standard deviation (SD) vancomycin levels in rats administered with 7.5 mg of vancomycin intraperitoneally. Almost all vancomycin was eliminated during the first 4 h following administration. Vancomycin was detected in one animal only after 24 h (0.2 mg/L). The area under the curve calculated according to the obtained levels was 87.71 mg \cdot h/L.

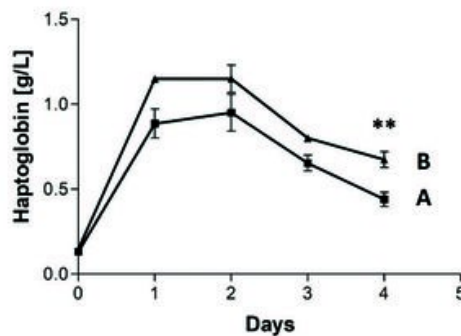
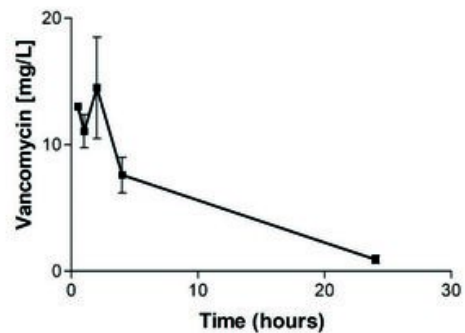


FIGURE 6. Haptoglobin mean \pm standard deviation (SD) plasma levels for vancomycin- (A) and placebo- (B) containing sponge groups. Haptoglobin levels increased in both groups from baseline levels and were higher in placebo group throughout the duration of the study. The difference reached statistical significance on day 4 ($p = 0.0034$). The haptoglobin area under the curve was 2.78 and 3.51 g \cdot day/L for vancomycin and placebo groups, respectively. $**p < 0.01$.



FIGURES 8. Mean \pm standard deviation (SD) vancomycin plasma levels in rats treated with vancomycin-containing sponges. The release of vancomycin was significantly prolonged compared to that following intraperitoneal administration. Vancomycin was still measurable in all four samples 24 h following implantation (0.93 ± 0.6 mg/L) and subsequently decreased to below detectable limits. The area under the curve (AUC) calculated according to the determined levels was 115.5 mg \cdot h/L, i.e., 88.2% of the AUC calculated for the same dose by the intraperitoneal pharmacokinetic analysis described above. We assume that the rest of vancomycin was bound to those sponges that were not degraded during the 4-day study period.

vancomycin via double lyophilization method and *in vitro* and *in vivo* testing of the resulting sponge. Excellent stability was attained via crosslinking. Following an initial rapid mass loss caused by the release of the antibiotic, the sponges remained compact and stable until at least day 7 in a simulated body environment. To the best of our knowledge, this is the first time freshwater fish collagen is combined with vancomycin to form a hemostatic sponge, which also prevents wound infection due to the Gram-positive bacteria most commonly found on the skin. In addition, it may prevent wound infection in the case of surgery in MRSA contaminated area.

Vancomycin is a partly time-dependent antibiotic and the value of $AUC_{24}/\text{minimum inhibitory concentration (MIC)}$

TABLE 1. Numbers of CFU cultivated from biopsies taken from the inoculation sites

	CFU median (IQR)	
	Vancomycin group (sponge with vancomycin)	Placebo group (sponge without vancomycin)
Sponge side ($p \leq 0.01$)	10.5 (5-26.25)	140 (107.5-187.5)
Sham surgery side ($p \leq 0.05$)	25 (15-35)	65 (35-245)

IQR: Interquartile range; CFU: Colony-forming unit

ratio as the primary PK/PD parameter should exceed 400 to ensure clinical efficacy in the case of MRSA infections [27].

Thus, vancomycin for systemic infections should ideally be administered repeatedly or via continuous infusion with a loading dose sufficient for rapid and effective exposure [28,29]. Regarding the treatment of local surgical site infections, the ideal PK/PD characteristics can be achieved by slowing down the release of vancomycin from a collagen dressing applied directly to the wound. With the retardation of vancomycin release from the sponge, the drug levels should still be sufficiently high over a reasonable period of time to achieve an AUC_{24}/MIC ratio of over 400. Since drug absorption depends not only on the drug concentration at the site of action but also on local vascularization [30], the degree of protection may be higher in low vascularized wounds. This may even be advantageous since such wounds are otherwise difficult to treat. Moreover, in the case of surgical wound infection prophylaxis this may provide the so-called "protected coagulum", which would normally be attainable only via the application of high doses of intravenous (i.v.) vancomycin with related potential adverse effects. In addition, drug distribution variability may play a role in peripheral infective focus treatment or prophylaxis via systemic drug administration. Therefore, the administration of the drug must be carefully timed to achieve effective levels in the tissue during surgery. Since the antibiotic concentration in a surgical coagulum is approximately 10 times lower than in plasma, even with the proper timing of the administration of the antibiotic [31], the plasma levels of i.v. vancomycin required for effective surgical wound protection would be toxic.

We prepared sponges that retarded the release of vancomycin for at least 8 hours, according to the results of the *in vitro* tests (Figure 4). We also determined significantly different vancomycin plasma profiles following i.p. administration and s.c. administration via the tested sponges in rats (Figures 7 and 8). Although the bioavailability was similar (88.2% of the AUC obtained via i.p. administration), the release of vancomycin to the plasma compartment was markedly slower in the case of administration via the sponges. Therefore, the vancomycin levels in the wound had to be much higher than those achievable by i.v. administration. This allows effective local exposure for the treatment of wound infections by vancomycin as a time-dependent antibiotic. Interestingly, this is in contrast to our former results concerning gentamicin-releasing sponges, where the release profiles were the same for both intramuscular (i.m.) administration and administration via s.c. implanted sponges [3].

The microbiological results of disk diffusion tests revealed effective release of vancomycin as well as effective treatment of wounds infected by MRSA, i.e. the CFU numbers in vancomycin-treated rats were significantly lower than in control group (Table 1). Moreover, the levels of haptoglobin, which is an acute phase marker in rats, were lower in the treated group (the AUC was 21% lower) during the whole duration of the experiment.

The wound care procedure for postoperative wounds in the clinical setting, consisting of daily replacement of wound dressing and the application of vancomycin by sponges that allow slow release of the drug, would be ideal in this case in terms of maintaining effective exposure to the drug over a sufficiently long time period. We prepared sponges that release almost all vancomycin content over 8 hours *in vitro* but continue to release vancomycin after 24 hours *in vivo*. Our sponges would, therefore, release most of the drug before a replacement of the dressing, and the release would be slow enough to prolong the local exposure to the levels above the MIC for at least most of the wound dressing replacement period. Nevertheless, it is important to consider that local vancomycin levels may differ according to vascularization in the treated tissue and may, therefore, vary according to the type of wound (e.g., crural ulcers vs. sternotomy).

By exposing collagen sponges to PBS we showed that approximately 60% of the material remained after 168 hours; moreover, using infrared spectroscopy we confirmed that the material retained its collagen secondary structure. This collagen sponge provided a high degree of OP (over 80%), which plays an important role in terms of fluid mass transport (i.e. nutrients and oxygen), removal of waste and, potentially, cell penetration through the sponge. Suchý et al. [32] showed that collagen scaffold hydration does not affect OP, thus ensuring stable permeability over time. Therefore, following elimination of infection during the first few days, the sponge can remain in the wound as a biocompatible scaffold for the enhancement of granulation and epithelization.

We found no significant difference in terms of CFU count between the sites with and without sponge administration. This may be the result of local vancomycin diffusion to the MRSA inoculation sites not protected by the sponges, due to the small size of the rats and the fact that the treated and control sites were not located far enough from each other. A second possible explanation includes the systemic effect of vancomycin absorbed from the administration site. The situation would, clearly, be very different in larger animals and humans, considering that the distribution volume would be much larger and the dose administered would be much smaller in relation to the BW. Nevertheless, in the case of large wounds involving the use of several sponges, it should be borne in mind that the drug from the sponges is finally absorbed into the systemic circulation and systemic adverse effects may occur. This is of particular importance with respect to renal patients since the half-life of vancomycin is significantly extended in cases of renal failure [33].

CONCLUSION

This study presents an effective antimicrobial hemostatic wound dressing that is able to serve as a ready-to-use

device and that will assist surgeons with respect to both surgical wound infection prophylaxis and the treatment of local infection. We employed freshwater fish collagen, which is less immunogenic than mammal collagen, and increased the stability of the collagen via crosslinking with carbodiimide. The added antibiotic is vancomycin which is not commonly used in combination with hemostatic wound dressing and may prevent surgical wound infection caused by Gram-positive bacteria commonly found on the skin. The other possible use is to prevent infection during surgery involving MRSA contaminated area. The sponge remained stable at 37°C for at least 7 days and released the vancomycin content gradually for several hours following implantation. The efficacy of the treatment of infected wounds was proven in a rat model, by a decrease in the number of MRSA CFUs in the infected site following the local administration of vancomycin-releasing sponge.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Technology Agency of the Czech Republic (TAČR COMNID, TG02010049, DPK/2018/15).

The micro-CT analysis was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (Progress Q29/LF1); and by the Research and Development for Innovations Operational Programme (RDOP), co-financed by European regional development funds and the state budget of the Czech Republic (CZ.1.05/41.00/16.0/346).

REFERENCES

- [1] Schimmer C, Özkur M, Sinha B, Hain J, Gorski A, Hager B, et al. Gentamicin-collagen sponge reduces sternal wound complications after heart surgery: A controlled, prospectively randomized, double-blind study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2012;143(1):194-200. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2011.05.035>.
- [2] Mishra PK, Ashoub A, Salhiyyah K, Aktuerk D, Ohri S, Raja SG, et al. Role of topical application of gentamicin containing collagen implants in cardiac surgery. *J Cardiothorac Surg* 2014;9:122. <https://doi.org/10.1186/1749-8090-9-122>.
- [3] Lukáč P, Hartinger JM, Mlček M, Popková M, Suchý T, Šupová M, et al. A novel gentamicin-releasing wound dressing prepared from freshwater fish *Cyprinus carpio* collagen cross-linked with carbodiimide. *J Bioact Compat Polym* 2019;34(3):246-62. <https://doi.org/10.1177/0883911519835143>.
- [4] Suchý T, Šupová M, Klapková E, Horný L, Rýgllová Š, Záloudková M, et al. The sustainable release of vancomycin and its degradation products from nanostructured collagen/hydroxyapatite composite layers. *J Pharm Sci* 2016;105(3):1288-94. <https://doi.org/10.1016/j.xcp.2015.11.015>.
- [5] Suchý T, Šupová M, Klapková E, Adamková V, Závora J, Záloudková M, et al. The release kinetics, antimicrobial activity and cytocompatibility of differently prepared collagen/hydroxyapatite/vancomycin layers: Microstructure vs. nanostructure. *Eur J Pharm Sci* 2017;100:219-29. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.01.032>.
- [6] 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. <https://doi.org/10.1016/j.sp.2013.12.046>.
- [7] Hamman BL, Stout LY, Theologes TT, Sass DM, da Graca B, Filardo G. Relation between topical application of platelet-rich plasma and vancomycin and severe deep sternal wound infections after a first median sternotomy. *Am J Cardiol* 2014;113(8):1415-9. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2013.12.046>.
- [8] Vander Salm TJ, Okike ON, Pasque MK, Pezzella AT, Lew R, Traina V, et al. Reduction of sternal infection by application of topical vancomycin. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1989;98(4):618-22. [https://doi.org/10.1016/S0022-5223\(19\)34366-1](https://doi.org/10.1016/S0022-5223(19)34366-1).
- [9] Stein GE, Wells EM. The importance of tissue penetration in achieving successful antimicrobial treatment of nosocomial pneumonia and complicated skin and soft-tissue infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Vancomycin and linezolid. *Curr Med Res Opin* 2010;26(3):571-88. <https://doi.org/10.1185/03007990903512057>.
- [10] Buttaro MA, Gimenez MI, Greco G, Barcan L, Picaluga F. High active local levels of vancomycin without nephrotoxicity released from impacted bone allografts in 20 revision hip arthroplasties. *Acta Orthop* 2005;76(3):336-40. <https://doi.org/10.1080/00016470510030797>.
- [11] Armaghani SJ, Menge TJ, Lovejoy SA, Mencia GA, Martus JE. Safety of topical vancomycin for pediatric spinal deformity: Nontoxic serum levels with supratherapeutic drain levels. *Spine (Phila Pa 1976)* 2014;39(20):1683-7. <https://doi.org/10.1097/BRS.0000000000000465>.
- [12] Charriere G, Bejot M, Schnitzler L, Ville G, Hartmann DJ. Reactions to a bovine collagen implant. Clinical and immunologic study in 705 patients. *J Am Acad Dermatol* 1989;21(6):1203-8. [https://doi.org/10.1016/0019-0622\(89\)70330-3](https://doi.org/10.1016/0019-0622(89)70330-3).
- [13] John P, Lazarus F, George JB, Selvam A, Prabhuji ML. Adjunctive effects of a piscoan collagen-based controlled-release chlorhexidine chip in the treatment of chronic periodontitis: A clinical and microbiological study. *J Clin Diagn Res* 2015;9(5):ZC70-4. <https://doi.org/10.7860/jcdr/2015/11534.5965>.
- [14] Yamada S, Yamamoto K, Ikeda T, Yanagiguchi K, Hayashi Y. Potency of fish collagen as a scaffold for regenerative medicine. *Biomed Res Int* 2014;2014:302932. <https://doi.org/10.1155/2014/302932>.
- [15] Chou CH, Chen YG, Lin CC, Lin SM, Yang KC, Chang SH. Bioabsorbable fish scale for the internal fixation of fracture: A preliminary study. *Tissue Eng Part A* 2014;20(17-18):2493-502. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2013.0174>.
- [16] Lambert L, Novakova M, Lukac P, Cechova D, Sukenikova L, Hrdy J, et al. 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;2019:5301405. <https://doi.org/10.1155/2019/5301405>.
- [17] Bae I, Osatomi K, Yoshida A, Osako K, Yamaguchi A, Hara K. Biochemical properties of acid-soluble collagens extracted from the skins of underutilized fishes. *Food Chem* 2008;108(1):49-54. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.10.039>.
- [18] Harrell CR, Djonov V, Fellabaum C, Volarevic V. Risks of using sterilization by gamma radiation: The other side of the coin. *Int J Med Sci* 2018;15(3):274-9. <https://doi.org/10.7150/ijms.22644>.
- [19] Grus T, Lambert L, Mlcek M, Chlup H, Honsova E, Spacek 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;2018:3519596. <https://doi.org/10.1155/2018/3519596>.
- [20] Bell E, Ivarsson B, Merrill C. Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76(3):1274-8. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.3.1274>.
- [21] Suchý T, Šupová M, Sauerová R, Verdánová M, Sucharda Z, Rýgllová Š, et al. The effects of different cross-linking conditions

- on collagen-based nanocomposite scaffolds-an in vitro evaluation using mesenchymal stem cells. *Biomed Mater* 2015;10:065008. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/10/6/065008>.
- [22] Jiřík M, Bartoš M, Tomášek P, Malečková A, Kural T, Horáková J, et al. Generating standardized image data for testing and calibrating quantification of volumes, surfaces, lengths, and object counts in fibrous and porous materials using X-ray microtomography. *Microsc Res Tech* 2018;81(6):551-68. <https://doi.org/10.1002/jemt.23011>.
- [23] Hildebrand T, Rüeggsegger P. A new method for the model-independent assessment of thickness in three-dimensional images. *J Microsc* 1997;185(1):67-75. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2818.1997.1340694.x>.
- [24] Remy E, Thiel E. Medial axis for chamfer distances: Computing look-up tables and neighbourhoods in 2D or 3D. *Pattern Recognit Lett* 2002;23(6):649-61. [https://doi.org/10.1016/S0167-8655\(01\)00141-6](https://doi.org/10.1016/S0167-8655(01)00141-6).
- [25] Jackson M, Choo LP, Watson PH, Halliday WC, Mantsch HH. Beware of connective tissue proteins: Assignment and implications of collagen absorptions in infrared spectra of human tissues. *Biochim Biophys Acta* 1995;1270(1):1-6. [https://doi.org/10.1016/0925-4439\(94\)00056-v](https://doi.org/10.1016/0925-4439(94)00056-v).
- [26] 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. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2013.08.056>.
- [27] Moise-Broder PA, Forrest A, Birmingham MC, Schentag JJ. Pharmacodynamics of vancomycin and other antimicrobials in patients with *Staphylococcus aureus* lower respiratory tract infections. *Clin Pharmacokinet* 2004;43(13):925-42. <https://doi.org/10.2165/00003088-200443130-00005>.
- [28] Šíma M, Hartinger J, Cikánková T, Slanař O. Importance of vancomycin loading doses in intermittent infusion regimens. *J Infect Chemother* 2018;24(4):247-50. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2017.11.002>.
- [29] Šíma M, Hronová K, Hartinger J, Slanař O. A simulation of loading doses for vancomycin continuous infusion regimens in intensive care. *Infect Dis (Lond)* 2017;49(9):674-9. <https://doi.org/10.1080/23744235.2017.1328741>.
- [30] Ruszczak Z, Friess W. Collagen as a carrier for on-site delivery of antibacterial drugs. *Adv Drug Deliv Rev* 2003;55(12):1679-98. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.08.007>.
- [31] Morávek J, Málek P. Comparison of serum and coagulum antibiotic levels with respect to protected blood coagulum. *Czech Med* 1986;9(4):187-90.
- [32] Suchý T, Šupová M, Bartoš M, Sedláček R, Piola M, Soncini M, et al. Dry versus hydrated collagen scaffolds: Are dry states representative of hydrated states? *J Mater Sci Mater Med* 2018;29(3):20. <https://doi.org/10.1007/s10856-017-6024-2>.
- [33] Šíma M, Hartinger J, Štenglová Nettková I, Slanař O. Creatinine clearance estimations for vancomycin maintenance dose adjustments. *Am J Ther* 2018;25(5):e602-4. <https://doi.org/10.1097/mjt.0000000000000616>.

Related articles published in BJBMS

1. [Wound-healing potential of the fruit extract of *Phaleria macrocarpa*](#)
Walaaj Najm Abood et al., BJBMS, 2015
2. [Biomaterials and host versus graft response: a short review](#)
Tomaz Velnar et al., BJBMS, 2016
3. [Effect of topically applied sildenafil citrate on wound healing: experimental study](#)
Koray Gürsoy et al., BJBMS, 2014