

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Postgraduální doktorský program

Experimentální chirurgie



MUDr. Pavel Melicherčík

Využití lokálních nosičů antibiotik při léčbě infekcí pohybového aparátu

Utilization of local carriers of antibiotics for treatment of infections of locomotive apparatus

Disertační práce

Vedoucí závěrečné práce:

Doc. MUDr. David Jahoda, CSc.

Praha, 2011

Prohlášení:

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

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

V Praze, 10.2.2011

MUDr. Pavel Melicherčík

Podpis

Identifikační záznam:

MELICHERČÍK, Pavel. Využití lokálních nosičů antibiotik při léčbě infekcí pohybového aparátu. [Utilization of local carriers of antibiotics for treatment of infection of locomotive apparatus]. Praha, 2011. Počet stran 94, příloh: 3. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, I. ortopedická klinika 1. LF UK a FN Motol. Vedoucí práce Jahoda, David.

Abstrakt

Infekce pohybového ústrojí představuje vážný problém v ortopedii a traumatologii pro svůj typický průběh s recidivami a častým rozvojem rezistence. Eradikace bakteriálních původců infekcí pohybového aparátu nemusí být vždy spolehlivá. Jednou z možností jak zvýšit terapeutický potenciál je využití lokální aplikace antibiotik.

Cílem disertační práce je ověřit účinnost uvolňovaného glykopeptidového antibiotika vankomycinu z kostních štěpů v experimentu *in vitro* po předchozím porovnání vlastností u 34 vybraných nosičů jak z pohledu materiálového složení, tak z pohledu eluční charakteristiky pro různá antibiotika na podkladě zdrojů z dostupné literatury.

Nejrozšířeněji používaný lokální nosič antibiotik je kostní cement určený především k řešení infekcí kloubních náhrad dvoudobou reimplantací. U něho je však nutná následná extrakce, narušil od novějších nosičů, které jsou biodegradabilní. Nejlepších vlastností z pohledu kritérií vhodného lokálního nosiče antibiotik jsou nosiče složené z několika druhů materiálů, tzv. kompozity.

Na podkladě výsledků provedeného experimentu v laboratorních podmínkách jsme ověřili, že k léčbě osteomyelitid jsou dobrým lokálním nosičem vankomycinu kostní štěpy. Nejvyšší průměrné koncentrace vankomycinu (500 mg/l) jsme naměřili mezi 2.-4. dnem. Hladiny antibiotika vysoce přesahovaly minimální inhibiční koncentraci i pro *vankomycin-rezistentní Staphylococcus aureus* po celou dobu měření-16 dnů.

Klíčová slova:

Osteomyelitida, lokální nosiče antibiotik, minimální inhibiční koncentrace, bakteriální rezistence, biofilm, vankomycin, vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Abstract

Infections of locomotive apparatus presents serious problem in orthopedic and traumatology for a typical course with recidivisms and often evolution to bacterial resistance. Eradication of bacterial causers of infections of locomotive apparatus not have to be always reliable. One of possibility how to increase therapeutic potential is utilization a local application of antibiotics.

Aim of dissertation thesis is verify influence of released glycopeptide antibiotic vancomycin from bone grafts in experiment *in vitro* after previous comparasion of properties in 34 chosen carriers from point of view both material constitution and elution characterization for different antibiotics on the strength of sources from accessible literature.

The most widespread used local carrier of antibiotics is bone cement intended firstly to solve infections of alloplasties by two-stroke reimplantation. There is necessary subsequent its extraction compared to newer, biodegradable carriers. The best properties from a view of criteria suitable local carrier of antibiotics in orthopedic and traumatology have carriers composed from several sort of materials, so-called composites.

On the strength of results performed experiment we verified that bone grafts could be a good local carrier of vancomycin. Highest average concentrations of vancomycin (500 mg/l) were measured between 2.-4. day. Antibiotic levels highly exceed minimal inhibition concentration also for *vancomycin-resistant Staphylococcus aureus* during all time of measurement-16 days.

Key words:

Osteomyelitis, local carriers of antibiotics, minimal inhibition concentration, bacterial resistance, biofilm, vancomycin, high performance liquid chromatography

Poděkování

V první řadě bych rád poděkoval svému školiteli, docentovi Davidu Jahodovi a profesorovi Antonínu Sosnovi, kteří mi umožnili seznámení se se zajímavou částí ortopedie. Částí, která se zabývá řešením infekčních komplikací v ortopedii. Děkuji jim za cenné rady a připomínky při vzniku vědeckých studií, které jsou nedílnou součástí této disertační práce.

Dále bych rád poděkoval všem lékařům Ortopedické kliniky 1. LF UK a FN Motol, s nimiž jsem měl a mám tu čest spolupracovat, za vytvoření přátelské atmosféry a pomoc v mých ortopedických začátcích.

Neméně bych rád poděkoval MUDr. Otakarovi Nyčovi, Ph.D., přednostovi Ústavu lékařské mikrobiologie 2. LF UK a FN Motol, za cenné postřehy při vzniku mých vědeckých prací

a Ing. Evě Klapkové, Ph.D., školské zástupkyni přednosta Ústavu klinické biochemie a patobiochemie 2. LF UK a FN Motol (ÚKBP), která mi zprostředkovala měření vzorků u provedeního experimentu a podala cenné postřehy při vzniku mé vědecké práce.

V neposlední řadě bych rád poděkoval své přítelkyni Janě a rodičům za podporu během mého studia.

Obsah

Cíl práce	9
Shrnutí současných poznatků:	
1. Úvod	10
1.1 Problematika ortopedické infekce	10
1.2 Biofilm	10
1.3 Bakteriální původci a rezistence	12
1.4 Chirurgická léčba	15
1.5 Lokální antibiotická terapie	16
1.6 Lokální nosiče antibiotik	17
1.6.1 Syntetické polymery	19
1.6.1.1 Kostní cement	19
1.6.1.2 Polyahydrid	39
1.6.1.3 Polyhydroxyalkonát	40
1.6.1.4 Polyhydroxybutyrát-ko-hydroxyvalerát	40
1.6.1.5 Polykaprolakton	40
1.6.1.6 Polylaktid	41
1.6.2 Přirozené polymery	41
1.6.2.1 Fibrin	41
1.6.2.2 Želatinová houba	42
1.6.2.3 Kolagen	42
1.6.2.4 Demineralizovaná kostní matrix (DBM)	44
1.6.2.5 Krevní koagulum	45
1.6.3. Keramika	45
1.6.3.1 Bioaktivní sklo	45
1.6.3.2 Apatit-wollastonitové keramické sklo	46
1.6.3.3 Hydroxyapatit (HA)	46
1.6.3.4 β -trikalcium fosfát	47
1.6.3.5 Kalcium sulfát	48
1.6.3.6 Kalcium fosfát	48
1.6.4 Kompozity	49
1.6.4.1 Hydroxyapatit s kolagenem	49
1.6.4.2 Hydroxyapatit s trikalcium fosfátem a fibrilárním kolagenem	49
1.6.4.3 Hydroxyapatit s trikalcium fosfátem a poly(DL-laktidem)	50
1.6.4.4 Nano-HA s PHBV-PEG	50

1.6.4.5	Bioaktivní sklo s polymetylmetakrylátem.....	50
1.6.4.6	Mezoporózní biosklo s poly(D,L-laktid-ko-glykolidem)	50
1.6.4.7	A-W GC s bisphenol-alpha-glycidyl methakrylátu	51
1.6.4.8	β – trikalcium fosfát s autologní krví nebo aspirátem kostní dřevě	51
1.6.4.9	Trikalcium fosfát lysin	51
1.6.4.10	Kalcium fosfát s poly(laktid acid-ko-glykolovou kyselinou)	51
1.6.4.11	Kalcium fosfát s bovinním kolagenem	51
1.6.4.12	Kalcium sulfát s kostním cementem	52
1.6.4.13	Kalcium sulfát s autologním kostním štěpem	52
1.6.4.14	Kalcium sulfát s demineralizovanou kostní matrix	52
1.6.4.15	Kalcium sulfát a hydroxyapatit	52
1.6.4.16	Kalcium sulfát s kalcium karbonátem a hydrogenovaným triglyceridem.....	53
1.6.5	Kostní štěpy	57
1.7	Antibiotika	59
1.7.1	Vankomycin a jeho chemická stabilita	60

Experimentální část:

2.	Materiál a metoda	63
3.	Výsledky	67
4.	Diskuze	70
5.	Závěry	78

Literatura	80
-------------------------	-----------

Cíl práce

I při stále zlepšujících se preventivních opatření, technice operování, pooperační péči a lepší dostupnosti nově vyvinutých antibiotik jsou infekce pohybového aparátu vážným problémem v septické ortopedii a traumatologii. Počet infekcí úměrně narůstá s rozšiřující se zvyšujícím se počtem ortopedických operací, především kloubních náhrad.

Terapie infektu pohybového ústrojí vyžaduje často řadu náročných organizačních opatření. Přes veškeré úsilí nemusí být ani dlouhodobá a opakovaná léčba plně úspěšná.

Velmi nadějným řešením infekcí pohybového aparátu se jeví být aplikace antibiotik přímo do místa infektu po předchozím debridement pomocí lokálních nosičů antibiotik. Je známa celá řada lokálních nosičů lišících se různými charakteristickými vlastnostmi, které jsou dány složením materiálu. Také ne všechna antibiotika jsou vhodná pro použití lokální léčby pomocí nosičů.

Disertační práce si stanovila za cíl zhodnotit, které dostupné lokální nosiče a v kombinaci s jakými antibiotiky budou nejvhodnější k řešení infekcí pohybového aparátu.

Vzhledem k tomu, že stále častěji zaznamenáváme nárůst rezistence Gram-pozitivních bakterií na glykopeptidová antibiotika, prozatím především u koaguláza negativních stafylokoků, zaměřili jsme se na ověření možnosti využití kostních štěpů, jako jsou lokálního nosiče vankomycinu k místní léčbě osteomyelitidy.

Pro léčbu kostních infekcí je zásadní eluční charakteristika vankomycinu vylučovaného z kostních štěpů. Kostních štěpy, jsme vybrali především pro jejich vlastnosti, které se z určitých hledisek blíží k charakteristice ideálního nosiče antibiotik. Jako aplikační formu jsme zvolili spongiózní morselizované (namleté) kostní štěpů, které jsou v současné době obecně preferovány .

Cílem práce je ověřit, zda množství vyloučeného vankomycinu přesahuje minimální inhibiční koncentraci pro vankomycin – resistantní *Staphylococcus aureus* po dobu šestnácti dnů experimentem provedeným *in vitro*, po předchozím porovnání vlastností u 34 vybraných nosičů jak z pohledu materiálového složení, tak z pohledu eluční charakteristiky pro různá antibiotika na podkladě zdrojů z dostupné literatury.

1. Úvod

1.1. Problematika ortopedické infekce

Osteomyelitida představuje vážný problém v ortopedii a traumatologii pro svůj typický průběh s recidivami a častým rozvojem rezistence. Navzdory zlepšující se prevenci, technice operování, pooperační péči a lepší dostupnosti nově vyvinutých antibiotik patří stále mezi nejčastější pooperační komplikace v ortopedii a traumatologii (**Bahrs** et al, 2006, **Džupa** et al, 2008a, **Džupa** et al, 2008b, **Gallo** et al, 2006, **Gallo** et al, 2009, **Jahoda** et al, 2006a, **Jahoda** et al, 2006b, **Jahoda** et al, 2007, **Jahoda** et al, 2008a, **Jahoda** et al, 2008b, **Jahoda** et al, 2008c, **Meani** et al, 2008, **Nejedlý** et al, 2007, **Nyč a Matějovská** 2010, **Krbec** et al, 2004).

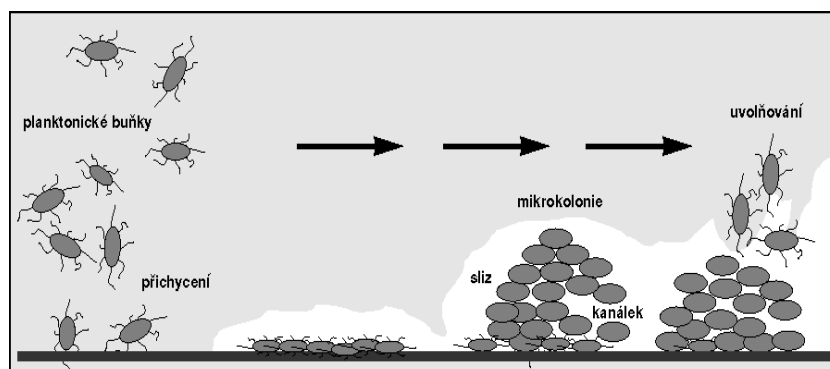
Pro pochopení úskalí systémové antibiotické terapie bakteriálního zánětu v kosti, je třeba si uvědomit, že je kost mineralizovaná tkáň, která se nemůže se rozpínat. V případě že se v kosti rozvine infekce, tlak zánětlivých změn redukuje krevní průtok (**Kuhn**, 2000). Obdobná situace je pak v případě implantované kloubní náhrady. Eradikace bakteriální původců infekcí pohybového aparátu systémovou antibiotickou terapií tak není spolehlivá, což souvisí s především se špatnou dostupností systémových antibiotik v místě infekce. Dalším klíčovým faktorem je schopnost bakterií formovat biofilm.

1.2. Biofilm

Biofilm je odvěkou a nedílnou formou existence a strategií bakterií pro jejich přežití. Miliardy let adaptace poskytly mikrobům schopnost kolonizovat povrchy (**Stoodley** et al, 2005). Představa, že se bakterie vyskytují v organismu v planktonické formě je mylná. Bakterie preferují život v biofilmu. Biofilm je komplikovanou komunitou buněk, sdružených na površích, uzavřených polymerovou matrix s vodními kanálky. Bakterie jsou v biofilmu rozloženy nehomogenně a rostou v mikrokoloniích, spojených kanálky. Na povrchu je biofilm omýván okolní kapalinou, obsahující molekuly živin (**Schindler** et al, 2001). Sesilní komunity jsou vysoce strukturované. Buňky v biofilmu získávají jiný fenotyp a také komunikují mezi sebou různými signály (**Hanssen** 2005). Produkce glykokalix dovoluje mikroorganismu adherovat na povrchy syntetických materiálů, které představují vhodné podmínky pro tvorbu biofilmu, jako jsou např. kanyly, katétry či kloubní náhrady a osteosyntetický materiál, kde ohrožují svým působením nejen okolní tkáň, ale mohou ohrozit člověka i na životě (**Schindler**, 2001). Bakteriální glykokalix je vysoce hydratovaná

struktura s obsahem vody až 99%, zajišťující výbornou bariéru proti účinkům imunitního systému. Exopolysacharidy bakteriálního glykokalix snižují fagocytózu, opsonizaci, chemotaxi, aktivaci komplementu, cytotoxickou aktivitu a tvorbu imunoglobulinů, blastogenezu T a B lymfocytů a citlivost k antibiotikům (Gristina et al, 1994, Krbec et al, 2004, Masterson et al, 1998). Tloušťka biofilmu kolísá od několika mikrometrů k několika stovkám mikrometrů. Biofilm není homogenní, ale skládá se z četných dutin a spletitých kanálků rozmanitého tvaru. Pomocí mikroelektrod byla měřena koncentrace kyslíku. Ta je důležitá pro společnou existenci bakterií aerobních a anaerobních. Koncentrace kyslíku na povrchu biofilmu je nízká, o trochu hlouběji stoupá a dále do hloubky podle očekávání klesá, takže v základní vrstvě je nulová. V různých vrstvách má biofilm rozdílný elektrický náboj, což napomáhá transportu živin (Schindler, 2001).

Pro praxi je třeba chápat, že při přechodu bakterie z planktonické do přisedlé formy dochází ke změně bakteriálních vlastností. Kolonizované bakterie mají jak změněný vzhled, tak i antigenní vybavení. Jsou převážně v klidovém stavu, množí se velmi pomalu a antibiotika, která působí na rostoucí buňky, na ně neúčinkují (Schindler et al, 2001). U rezistence vůči některým antibiotikům se současně především uplatňuje gen označovaný jako *mar* (multiple antibiotic resistance), který ovládá nescifický efluxní systém, který antibiotikum proniklé do buňky, opět aktivně vypudí (Schindler et al, 2001). Některé bakterie se také z mikrokolonií na určitý impuls odlučují, přecházejí do planktonického stavu, odplouvají a kolonizují další část povrchu (obr.1). Důležité je, že si po určitou dobu zachovávají některé vlastnosti, jako je rezistence (Schindler et al, 2001). Z biofilmu uvolňující se bakterie mohou způsobit akutní ataku chronické infekce (Ehrlich et al, 2005).



obr. 1.: Schéma tvorby biofilmu, převzato z Vesmír 2001. Planktonické buňky se pomocí bičíků a fimbrií přichytí na pevný povrch, který jim poskytuje živiny. Brzy začnou vytvářet mikrokolonie kuželovitého tvaru, které jsou spojeny kanálky. Když elasticita biofilmu nestačí udržet buňky pohromadě, odtrhávají se (Schindler et al, 2001).

Bakterie v biofilmu získávají ochranu matrix proti účinku protilátek a fagocytů. Tyto takzvané „frustrované fagocyty“ pak způsobují většinu destrukce měkkých tkání při chronickém zánětu (**Costerton et al, 2005**). **Gristina** uvádí, že bakterie tvořící biofilm jsou nejméně 500x rezistentnější k antibiotikům než planktonické formy. Jiní dokonce zmiňují tisícinásobnou rezistenci (**Costerton et al, 2005**, **Gristina et al, 1994**, **Schindler et al, 2001**, **Trampuz et al, 2005**).

Bohužel právě mnoho forem *Staphylococcus aureus* a koaguláza negativní stafylokoky jsou výbornými producenty glykokalix. Mezi další bakterie se schopností tvorby biofilmu řadíme streptokoky, legionely, klebsiely, aktinomycety, *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*, která formuje takzvaný alginát (**Gristina et al, 1985**, **Krbec et al, 2004**). Gramnegativní bakterie, jako *Pseudomonas aeruginosa* tvoří slabší biofilm, ale jejich eradikace je na druhou stranu komplikována pomalým množením, nízkou metabolickou aktivitou a rezistencí k antibiotikům (**Gristina et al, 1985**).

Klinicky zásadní je pak skutečnost, že je-li biofilm v organismu zformován, není ho možné eradikovat sebevětší dávkou antibiotik (**Ehrlich et al, 2005**).

Koaguláza negativní stafylokoky které tvoří glykokalix jsou daleko více rezistentní k cefalosporinům, než koaguláza negativní stafylokoky nacházející se v planktonické formě (**Fischer et al, 1996**). Vankomycin a teikoplanin, vstupují-li do biofilmu, adherují k určitým částem glykokalix a výrazně se tak redukuje jejich účinnost. Naopak rifampicin neadheruje ke glykokalix a je tím v určitých situacích daleko účinnější. Tohoto faktu se nyní úspěšně využívá v terapii (**Cordero et al, 1999**).

1.3. Bakteriální původci a rezistence

Výše zmíněné obtíže při léčbě infekcí pohybového aparátu jsou v posledních letech ještě komplikovány významným nárůstem bakteriální rezistence k antibiotikům. **Jacoby** a **Archer** vyslovili podezření, že bakterie jsou schopné za určitých podmínek vytvářet rezistenci ke kterémukoliv antibiotiku (**Jacoby et al, 1991**).

Bakteriální rezistenci k antibiotikům můžeme rozdělit na přirozenou a získanou. Přirozenou rezistenci má bakteriální druh v důsledku chybění specifických struktur včetně specifických transportních systémů, na které antibiotikum působí nebo pomocí kterých proniká do bakteriální buňky. Příkladem přirozené rezistence je enterokoková rezistence k cefalosporinům. Získaná rezistence nastává genetickou mutací, získáním genů výměnou

mobilních DNA segmentů, tzv. plasmidů či transpozony. Geny rezistence se mohou šířit vertikálně (na další generace) nebo horizontálně (přenosem v rámci jednoho druhu, stejně jako mezidruhovým šířením mobilními genetickými elementy). Ke vzniku a šíření bakteriální rezistence dochází zejména při nadměrné, dlouhodobé, a mnohdy neracionální antibiotické terapii. Selekcčním tlakem tak v daném prostředí přežívají především kmeny zvýhodněné odolností k používaným antibiotikům.

Významnou roli pak hrají plazmidy, což jsou úseky extrachromozomální DNA, přítomné v bakteriích. Mnohé plazmidy nesou geny, které jim umožňují přechod z jednoho organismu na druhý. Replikace plazmidové DNA nastává nezávisle na chromozomální replikaci a může mít i několik kopií v hostitelské buňce. Transpozony, také známé pod označením skákající geny jsou sekvence DNA lokalizované v bakteriálním chromozomu či plazmidu. Mají schopnost přecházet z jednoho chromozomu či plazmidu na druhý, či z jednoho místa na chromozomu na druhé místo téhož chromozomu a měnit tím jeho funkci. Transpozony mohou kódovat antimikrobiální rezistenci, nebo způsobují takovou genovou mutaci, jež vede k této rezistenci (**Garvin et al, 1999**).

Jako jedna z hlavních příčin přibývání multirezistentních Gram-pozitivních původců závažných infekčních komplikací se uvádí častá aplikace širokospektrých antimikrobiálních přípravků s primárním zaměřením na gram negativní bakterie. Ta zřejmě přispívá selekcčním tlakem k častějšímu uplatnění stafylokoků, enterokoků a streptokoků (**Luzzaro et al, 2002, Rayner et al, 2004, Votava et al, 2003**). K nejzávažnějším fenotypům rezistence v tomto směru patří : methicillin rezistentní kmeny *Staphylococcus aureus* (MRSA), vankomycin rezistentní enterokoky (VRE), methicilin rezistentní koaguláza negativní stafylokoky (MRSE), kmeny *Staphylococcus aureus* se sníženou citlivostí resp. rezistencí k vankomycinu (VISA, VRSA), kmeny *Streptococcus pneumoniae* s rezistencí k penicilinu a k makrolidům a kmeny *Streptococcus pyogenes* s rezistencí k erytromycinu (**Dlouhý et al, 2005, Dlouhý et al, 2006**).

Většina nákaz MRSA vzniká v souvislosti s poskytováním léčebně preventivní péče, ale existují i komunitní onemocnění. Za vysoce ohrožené z hlediska vzniku infekčních komplikací je třeba považovat především MRSA kolonizované staré lidi, pacienty s těžkým imunodeficitem a závažným základním onemocněním. Častěji jsou infikováni lidé staří a závažně nemocní, a intubovaní pacienti. Mezi hlavní rizikové faktory kolonizace MRSA a případného rozvoje infekce patří dlouhodobý pobyt v nemocnici, léčba širokospektrými

antibiotiky, pobyt na JIP nebo v blízkosti jiného pacienta s infekcí či kolonizací MRSA (CDC 2006).

Vzhledem k tomu, že stafylokoky jsou nejčastějším původcem zánětů pohybového aparátu je narůstající počet infekcí MRSA velmi závažný. Molekulárním podkladem rezistence k methicillinu je přítomnost modifikovaného PBP (penicilin-binding protein), konkrétně PBP2a s velmi nízkou afinitou k methicillinu, stejně jako všem dalším dosud v klinické praxi používaným beta laktamovým antibiotikům. Rezistence tohoto typu je navíc často sdružena s rezistencí k dalším nepříbuzným skupinám antibiotik (aminoglykosidy, fluorochinolony, makrolidy) (Jahoda et al, 2006).

Koaguláza-negativní stafylokoky jsou stále častějšími původci kloubních infekcí. Koaguláza-negativní stafylokoky byly prvními Gram-pozitivními mikroorganismy, u kterých byla v roce 1986 prokázána rezistence ke glykopeptidům. Brzy se ukázalo, že rezistence k teikoplaninu vzniká mnohem snáze než k vankomycinu. Nejčastěji je pozorována u druhů *Staphylococcus haemolyticus* a koaguláza negativní stafylokoky (Biavasco et al, 2000). Také v českých nemocnicích se v posledních letech tyto kmeny stávají vážným terapeutickým problémem zejména u infekcí kloubních náhrad, cévních implantátů a katetrů.

Enterokoky jsou přirozeně rezistentní k řadě antibiotik (Cetinkaya et al, 2000, Hájek et al, 1996, Swaney et al, 1998). Sekundárně získávají rezistenci k vysokým koncentracím aminoglykosidů, k aminopenicilinům, tetracyklinu, chloramfenikolu i makrolidům. K velmi účinným antibiotikům patřily do nedávné doby glykopeptidy, avšak jejich intenzivní používání vede ke vzniku a šíření rezistence i k této skupině rezervních přípravků. Výsledky surveillance antibiotické rezistence invazivních enterokoků v České republice za rok 2004 (EARSS 2006) uvádí četnost vankomycin-rezistentních kmenů *Enterococcus faecalis* v 0,4 % a kmenů *Enterococcus faecium* v 2,8 % (EARSS 2006). VRE byly rovněž dokumentovány ve výtěrech z rektu u zdravých osob v komunitním prostředí České republiky (Kolář et al, 2003). *Enterococcus faecalis* je často citlivý na penicilinová antibiotika, na druhé straně *Enterococcus faecium* je většinou rezistentní na veškeré peniciliny i karbapenemy. V poslední době začínají být problémem vankomycin-rezistentní enterokoky. Zde je možnost užití nových antibiotik, jako je quinupristin/dalfopristinu (pouze *Enterococcus faecium*) a linezolidu.

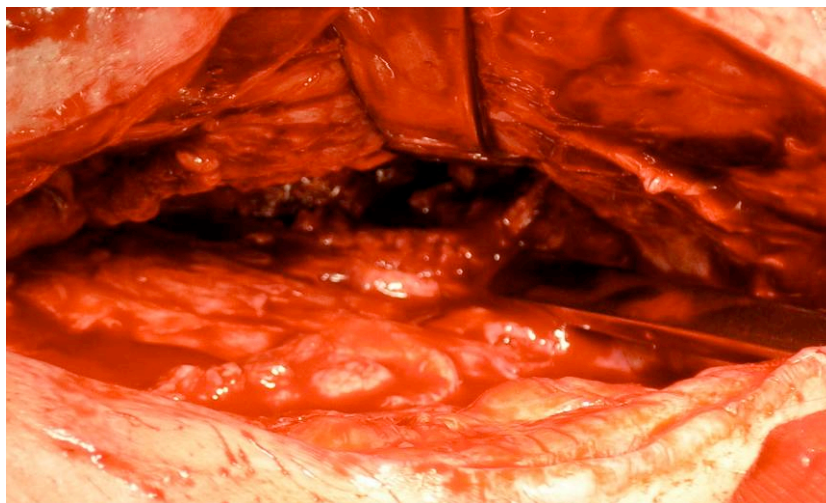
Gram-negativní bakterie způsobují jak akutní, tak chronické infekce. Problémem, stejně jako u Gram-pozitivních původců, bývá jejich eradikace. Většinou se k terapii užívají beta-laktamy jako třetí generace cefalosporinů (ceftriaxon, ceftazidim, cefepim),

karbapenemy, aztreonam eventuelně chinolony (ciprofloxacín, levofloxacín, gatifloxacín, moxifloxacín) (**Bernard** et al, 2004). Současné poznatky ukazují, že infekce gram-negativními bakteriemi může být léčena stejně úspěšně jako infekce gram-positivními patogeny. Chinolony jsou vhodné pro léčbu gram-negativních infekcí pro svojí efektivitu a praktičnost danou jejich výbornou tkáňovou dostupností při perorálním podávání. Jejich nadměrné požívání ale přináší značná epidemiologická rizika ve smyslu rychlého vzniku rezistence, která může vznikat i v průběhu terapie, zejména u stafylokoků a pseudomonád. Navíc je vzniklá rezistence téměř vždy zkřížená v rámci celé skupiny chinolonů. (**Tsukayama** et al, 2003, **Nyč** et al, 2007).

1.4 Chirurgická léčba

Léčba chronických zánětů pohybového aparátu musí být komplexní a dlouhodobá. Celková antibiotická terapie má svá úskalí. Jak jsme již zmínili obtížně proniká do místa zánětu. Problémem jsou také její časté vedlejší účinky, referované ve 22% a též skutečnost, že nezastaví „race for surface bakterií“ (**Meani** et al, 2007).

Součástí léčby tak musí být i operační revize, která zahrnuje vždy radikální debridement, sequestrotomii a nekrectomii až do krvácející kosti (obr. 2a, b).



obr. 2a: Debridement musí být rozsáhlý, radikální a kompletní. Nekrectomii provádíme dlátem

Tento postup se nazývá dle makroskopického obrazu „paprika sign“, dále jsou doporučovány rozsáhlé výplachy. Dříve se užívala průpachová laváž. Ta přinášela výrazný diskomfort pro pacienta, který trávil mnoho dní na lůžku a též vedla k prodloužení

hospitalizace. Výrazně bylo zvýšeno riziko superinfekce a především v podstatě znemožňovala širší a racionální užití lokálních nosičů antibiotik. Nyní k toiletě rány užíváme systém tlakové pulzní laváže, který významně omezil nutnost užití průplachové laváže a umožnil rozšíření využití lokálních nosičů antibiotik.



obr. 2b: Výhodou je užití vrtačky s rotační frézou tzv. „burákem“

Tento postup se nazývá dle makroskopického obrazu „paprika sign“, dále jsou doporučovány rozsáhlé výplachy. Dříve se užívala průplachová laváž. Ta přinášela výrazný diskomfort pro pacienta, který trávil mnoho dní na lůžku a též vedla k prodloužení hospitalizace. Výrazně bylo zvýšeno riziko superinfekce a především v podstatě znemožňovala širší a racionální užití lokálních nosičů antibiotik. Nyní k toiletě rány užíváme systém tlakové pulzní laváže, který významně omezil nutnost užití průplachové laváže a umožnil rozšíření využití lokálních nosičů antibiotik.

1.5 Lokální antibiotická terapie

Jednou z možností jak zvýšit náš terapeutický potenciál, omezit vedlejší účinky systémové aplikace a regulovat dopady nepříznivého vývoje rezistence k antibiotikům je využití lokální aplikace antibiotik.

Historie lokální antimikrobiální léčby sahá do devatenáctého století, kdy **Dreesman** v roce 1892 vyplnil „mrtvý“ prostor sádrou (kalcium sulfátem). První, kdo užil antiseptika byla **Petrova**, která v roce 1920 do sádry přidávala kaolin či rivanol. Později byly do sádry přidávány sulfonamidy či penicilinový prášek (**Meani et al, 2007**). V osmdesátých letech pak

byl poprvé přidán do sádry gentamicin. Antibiotika smíšená se sádrou byla dlouhodobě a úspěšně užívána k léčbě kostních defektů u pacientů s osteomyelitidou, výhodou byla dobrá snášenlivost a absorbovatelnost sádry (**Garvin** et al, 2005). Od 70. let dvacátého století se stal nejrozšířenějším lokálním nosičem antibiotik kostní cement. V dnešní době se vývoj lokálních nosičů antibiotik zaměřuje především na materiály prvotně sloužící jako substitute poškozené nebo odstraněné tkáně, především kostní. V posledních letech se výzkum zabývá syntetickými polymery, které nabízejí prodlouženou dobu uvolňování antibiotik ve vysokých místních koncentracích.

Způsob léčby infekcí lokálními nosiči antibiotik při vhodně volené strategii přináší řadu výhod: vysokou lokální koncentraci antibiotika, omezení nežádoucích účinků spojených se systémovým podáním a snížení rizika vzniku rezistence (**Campoccia** et al. 2010).

Dřívější typy lokálních nosičů měly nevýhodnou farmakokinetiku s vylučováním antibiotika pod MIC a rizikem vzniku rezistentních bakteriálních kmenů. Nové kompozitní materiály pak řeší i tento problém, neboť jsou do nich přidávány látky které optimalizují charakteristiku vylučování antibiotik z nosiče.

Díky lokálnímu nosiči se antibiotikum může dostat i do avaskulárních zón, typicky přítomných v místech s probíhající osteomyelitidou. Antibiotikum pak může působit jak na zbývající planktonické formy bakterií, tak i na sesilní formy v biofilmu (**Kuhn** 2000)

1.6 Lokální nosiče antibiotik

Lokální nosiče antibiotik používané v ortopedii a traumatologii lze rozdělit buď podle schopnosti biodegradace (biodegradability) na biodegradabilní a nebiodegradabilní materiály. Další možností je pak dělení lokálních nosičů podle složení materiálu na:

- 1) Syntetické polymery: polymetylmakrylát (PMMA), PMMA/polyhydroxyethylmetakrylát (PHEMA), polyhanhydrid, polylaktid, polyglykolid, polyhydroxybutyrát-co-hydroxyvalerát, polyhydroxyalkanoát, polykaprolakton, želatinová houba z glycerinu;
- 2) Přírodní polymery, také nazývány proteiny extracelulární matrix: kolagen a produkty na bázi kolagenu, fibrin, trombin, krevní koagulum, demineralizovaná kostní matrix;
- 3) Keramiku: hydroxyapatit (HA), nano-hydroxyapatit (nano-HA), beta-trikalcium fosfát, kalcium sulfát, kalcium fosfát, bioaktivní sklo, apatit-wollastonitové keramické biosklo;
- 4) Kompozity - materiály složené z keramiky a polymerů;
- 5) Kostní štěpy;

Hlavním představitelem nebiodegradabilních nosičů antibiotik v ortopedii je kostní cement, který se řadí mezi syntetické polymery. Kostní cement s antibiotiky je v současnosti standardně užíván nejen k fixaci kloubních náhrad, ale i jako nosič antibiotika. Nevýhodou kostního cementu jako nosiče antibiotik je proměnlivé vylučování antibiotika a nutnost odstranění kostního cementu v případech, kdy nebyl užit k fixaci implantátu (**Garvin et al, 2005**).

Většina nových materiálů jsou biodegradabilní (schopné biologického rozpadu, při kterém dochází k rozkladu polymerů působením biologických činitelů), dále jsou biokompatibilní (materiál je akceptován v biologickém prostředí), bioaktivní (schopnost tvorby vazeb s živou tkání) a většinou mají schopnost osteoindukce a osteokondukce. Osteoindukce je schopnost materiálu indukovat tvorbu kosti buňkami okolní tkáně, jejichž cytokiny působí na místní progenitorové bunky (např. mezenchymové kmenové buňky), které se diferencují v osteoblasty. Nejvíce takto např. působí „morfo-genetický kostní protein“ (BMP – bone morphogenetic protein) jako např. Infuse® (BMP-2), podobně se chovají různé demineralizované kostní matrix (DBM – demineralised bone matrices) jako např. Allomatrix®, Bioset®, Accel®. Princip osteokondukce spočívá v tom, že nosič vytváří skelet, na který se mohou mineralizující struktury a buňky kosti uchytit a kde dále mohou buňky růst a dělit se. Působí tak jako kontaktní vodič a podporující faktor pro osteogenezi. Tyto materiály jsou cytologicky inaktivní. Pro osteokondukcí je nutný těsný kontakt materiálu s kostí. Mezi tyto materiály patří především hydroxyapatit, kalcium sulfát, kalcium fosfát a zpracovaný minerální kostní štěp.

K biodegradaci materiálů dochází v pozdějších stádiích po implantaci v důsledku hydrolýzy a aktivní fagocytózy, čímž se také zvyšuje uvolňování antibiotika. Následně pak dochází k novotvorbě kosti (**Castro et al, 2005**). Výhodou biodegradabilních produktů je možnost vyhnout se druhé operaci, kdy odstraňujeme cizorodý materiál (**Hanssen et al, 2005**).

Průběh uvolňování antibiotik z lokálních nosičů užívaných v ortopedii je typický. Po iniciálním uvolnění většího množství antibiotika je následováno postupné uvolňování antibiotik v nižších koncentracích. Doba trvání uvolňování antibiotika z lokálního nosiče je závislá na fyzikálně-chemických vlastnostech nosiče (**Meani et al, 2007**). Různé druhy lokálních nosičů uvolňují různě dlouhou dobu antibiotika v takovém množství, které přesahuje minimální inhibiční koncentrace (MIC) pro nejběžnější patogeny způsobující chronickou osteomyelitidu. Je třeba stanovit bezpečnou dávku antibiotika nutnou k eradikaci infekce bez nepřiměřené inhibice procesů vedoucích ke kostní regeneraci.

1.6.1 Syntetické polymery

1.6.1.1 Kostní cement

Polymetylmetakrylát (PMMA), tzv. kostní cement, patří mezi nejčastěji používané nebiodegradabilní lokální nosiče antibiotik. První použití kostního cementu s antibiotikem bylo popsáno jako prevence infekce při primoimplantaci cementované totální kyčelní endoprotézy koncem šedesátých let v Hamburku (**Bucholtz et al, 1970**). Bez užití antibiotika do kostního cementu pozoroval Bucholtz 6% výskyt infekčních komplikací u 1154 nemocných. Oproti tomu u 1655 pacientů u kterých byl při náhradě kyčelního kloubu použit kostní cement s antibiotikem byl výskyt infekčních komplikací redukován na 2% (**Bucholtz et al, 1984**). Antibiotika přidaná do kostního cementu dosahují vysoké lokální koncentrace bez rizika systémové toxicity, přetrvávající v baktericidní hladině až 4 měsíce (**Jiranek et al, 2005**). Velmi důležitým zjištěním byl též průkaz skutečnosti, že antibiotikum uvolňující se z kostního cementu aplikovaného do dřevové dutiny kadaverózního femuru, prochází mrtvou kortikální kostí. Tato skutečnost má evidentní terapeutický význam u nemocných s infekcí náhrady kloubní s osteomyelitidou a devaskularisovanou kostní tkání (**Elson et al, 1977**).

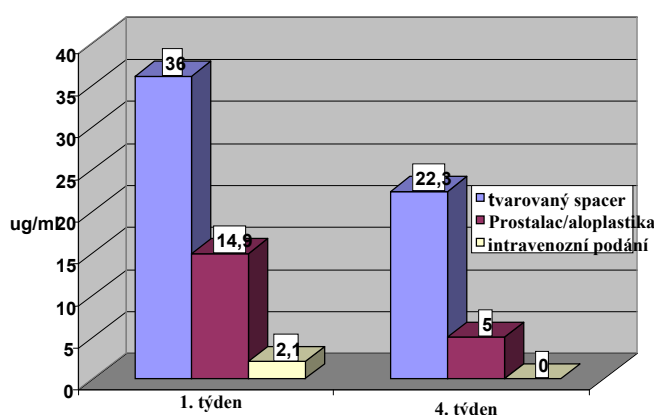
Kostní cement s antibiotiky je užíván v ortopedii ve třech základních indikacích. První možností je preventivní užití při fixaci kloubní náhrady. Druhou variantou je aplikace kostního cementu s antibiotiky ve formě řetězců, kuliček a pelet. Třetí, nejmodernější variantou je využití cementu k přípravě spaceru při dvoudobé reimplantaci infikované endoprotézy.

Farmakokinetika vylučování antibiotik z kostního cementu je pro léčbu kostních zánětů příznivá. Na základě in vitro studie lze dělit vylučování antibiotik z kostního cementu do tří fází. V prvních 10 hodinách je vyloučeno 30 % obsažených antibiotik. V dalších 16 dnech se vyloučí dalších 60 %. V poslední fázi, trvající 54 dní, se vyloučí zbylých 10% (**Del Real et al, 2000**). Podobnou farmakokinetiku uvádí i Seldes, podle kterého se většina gentamicinu uvolnění v prvních 24 hodinách (**Seldes et al, 2005**).

Lokální hladina antibiotik při uvolňování z kostního cementu vysoce přesahuje minimální inhibiční koncentraci nutnou k účinku na většinu citlivých patogenů. Tyto hladiny jsou vyšší než při parenterálním podávání (**Adams et al, 1992, Baker et al, 1988, Bayston et al, 1982, Deskmuth et al, 1998, Elson et al, 1977, Goodell et al, 1986, Hoff et al, 1981, Chapman et al, 1976, Jupiter et al, 1981, Lawson et al, 1990, Marks et al, 1976, Salvati et al, 1986, Wahling et al, 1980, Wahling et al, 1984**). Farmakokinetické studie odhadují, že

lokální koncentrace antibiotika je při užití kostního cementu s antibiotiky až 200x vyšší, než při systémovém podávání (Gee et al, 2003).

V případě použití kostního cementu s gentamicinem při totální náhradě kyčelního kloubu byla lokální antibiotická hladina v prvním pooperačním dnu 14,9ug/ml, což je sedminásobek oproti nemocným s intravenózním podáváním antibiotik (2,1ug/ml). V případě užití cementového spaceru s antibiotikem dosáhla lokální hladina gentamicinu až 36ug/ml. Bylo též sledováno přetrvávání uvolňování antibiotik, které dosahovalo 5 ug/ml u pacientů s implantátem po čtyřech týdnech a 22,3 ug/ml s cementovaným spacerem po šesti týdnech (graf č.1) (Garvin et al, 1994).



graf 1.: Grafické srovnání hladin lokálně uvolňovaného antibiotika při různých způsobech aplikace (Garvin 1994).

Uvolňování antibiotik přidaných do kostního cementu je komplexní proces, který závisí především na typu kostního cementu a jeho přípravě. Antibiotika se uvolňují z povrchu, prasklin a dutin v cementu. Baker popsal při vyšetření rastrovacím elektronovým mikroskopem mechanismus uvolňování antibiotika z kostního cementu. Polymetylmakrylát je neprostupný pro vodu, ale antibiotikum je skladováno v mikroskopických dutinkách a štěrbinách. Z těchto depozit, prohlubní a prasklin difunduje antibiotikum navenek (Baker et al, 1988). Eluční schopnost kostního cementu koreluje přímo se schopností absorbovat vodu. Vylučování antibiotika z kostního cementu probíhá nejspíše podle Fickových zákonů. (První Fickův zákon říká, že rychlost difúze je dána látkovým množstvím látky, která projde za časovou jednotku určitou plochou). Vzhledem k extrémně pomalému transportu molekul v kostním cementu vylučování probíhá hromadnou difúzí. Difúze probíhá velmi pomalu v místech bez přítomnosti nějaké tekutiny (rozpuštědla). To totiž zrychluje difúzi a v případě,

že molekuly antibiotika přicházejí do kontaktu s vodou jsou vymývána velmi rychle. Vylučování antibiotika zevnitř kostního cementu je pomalé a naopak z povrchu je velmi rychlé. Jak již bylo zmíněno, v době prvního kontaktu kostního cementu s tekutinou jsou antibiotika vylučována rychle, ve vysoké koncentraci a po velmi krátkou dobu. Poté následuje dlouhé období vylučování antibiotika z kostního cementu se stále klesající koncentrací. Tyto eluční charakteristiky platí nejen pro antibiotika ale i pro ostatní látky přidané do kostního cementu (**Kuhn** et al, 2000). Montali uvádí, že až 70% z aplikovaných antibiotik je zadržováno v kostním cementu kvůli jeho nebiodegradabilitě (**Montali** et al, 2006).

Pro úspěšnost kostního cementu jako lokálního nosiče jsou vzhledem výše popsanému typu vylučování antibiotika, je více než absolutní množství přidaného antibiotika důležitý typ a vlastnosti kostního cementu. Cement s větší porozitou umožní větší uvolňování antibiotika než cement s porozitou menší. Nepřekvapuje tedy, že nejlepším nosičem antibiotik je cement Palacos s vysokou porozitou, který má nejlepší eluční charakteristiky. Překvapivě byl však Palacos zprvu užíván ne pro své vlastnosti, ale protože byl nejčastěji užívaným kostním cementem v Německu. Postupně se však jeho výjimečnost potvrdila ve studiích, kdy byl Palacos porovnáván s cementy jako Simplex, Sulfix nebo CMV (**Elson** et al, 1977, **Garvin** et al, 1994, **Stevens** et al, 2005).

Nové postupy přípravy cementu, jako je centrifugace či míchání cementu ve vakuu, mají za cíl zlepšení především mechanických vlastností. Při užití těchto metod však dochází ke snížení porozity kostního cementu a snižuje se tak schopnost cementu uvolňovat antibiotika (**Baker** et al, 1988, **Davies** et al, 1989, **Duncan** et al, 1994).

Pro praxi je velmi významné je ovlivnění pevnostních vlastností polymetylmakrylátu přidáním antibiotika. Vzhledem k velkým mechanickým nárokům na kostní cement, jak při fixaci reimplantované kloubní náhrady, tak při tvorbě spaceru, je této skutečnosti věnována velká pozornost. Některé studie uvádějí, že malé množství práškového antibiotika přidané do kostního cementu neovlivňuje výrazněji jeho mechanickou pevnost (**Davies** et al, 1989, **Lautenschlager** et al, 1976). Naopak při použití antibiotika v roztoku s rozpouštědlem se výrazně oslabuje pevnost kostního cementu (**Lautenschlager** et al, 1976). Bargar poukazuje na to, že přidání jakéhokoliv množství práškového antibiotika způsobuje snížení pevnosti kostního cementu (**Bargar** et al, 1986). Například přidání 1,2g tobramycinu snižuje ohybovou pevnost kostního cementu s antibiotikem proti čistému cementu o 13%. V případě ovlivnění pevnosti cementu antibiotikem jde o přímou úměru a tak přidání například více jak 4,5g gentamicin sulfátu do 40g kostního cementu může oslabit mechanickou pevnost kostního

cementu natolik, že je jeho kompresní odolnost snížena pod mez, kterou určuje Americká společnost pro testování materiálů (**Lautenschlager et al, 1976**).

Ke zvýšení pevnosti polymetylmakrylátu je třeba zajistit přípravu cementu s antibiotikem tak, aby byla získána vysoce homogenní směs o určité porositě, ale bez míst s nadměrnou koncentrací antibiotika, která jsou pak biomechanicky slabá. Experimentálně bylo potvrzeno, že cement Palacos má proti jiným cementům větší pevnost (**Garvin et al, 1994**). Přidání antibiotika do kostního cementu se tedy mění vlastnosti kostního cementu, ale klinicky není pozorován vzestup počtu uvolnění kloubních náhrad. Přidání 1g práškového antibiotika do 40g PMMA signifikantně nezvýší riziko únavového lomu kostního cementu (**Jiranek et al, 2005**). Užití tekutého antibiotika snižuje pevnost v tlaku o 49% a v tahu o 46%. (**Seldes et al, 2005**).

Snížení mechanických vlastností cementu koreluje nejen s množstvím přidaného antibiotika ale i s homogenitou směsi. V přípravě cementu s antibiotiky v továrně lze spolehlivě zajistit homogenitu směsi. To však v případě míchání cementu přímo na sále není možné. Proto je preferována tovární příprava cementu s antibiotiky. V případě nedostupnosti optimálního kostního cementu s antibiotiky můžeme přimíchávat na operačním sále pouze antibiotikum ve formě prášku. Antibiotika v tekutém stavu ničí mechanické vlastnosti kostního cementu a průběh vylučování je nepředvídatelný. Kostní cement s antibiotiky musí odpovídat standardu ISO 5833. To znamená, že ohybová pevnost musí převyšovat 50 Mpa a kompresivní pevnost 70 Mpa. Antibiotika přidávaná do kostního cementu by měli být vysoce rozpustné ve vodě a mít malý efekt na mechanickou pevnost kostního cementu. Neměli by chemicky reagovat s PMMA nebo mediátory polymerizace a musí být tepelně stabilní během polymerizace. Z takzvaných „biologických“ vlastností je důležitá široká antimikrobiální aktivita proti G- i G+ bakteriím a baktericidní efekt v malé koncentraci (mimo klindamycinu). Zvolená antibiotika by měla mít malý podíl primárně rezistentních kmenů a nízkou frekvenci vznikajících rezistencí. Musí mít nízkou vazbu na proteiny a neměla by reagovat s okolními tkáněmi (**Kuhn et al, 2000**).

Dle dostupné literatury se při užití kostního cementu, jako lokálního nosiče antibiotik není třeba obávat celkových nežádoucích účinků. Systémová toxicita antibiotik v kostním cementu nebyla prokázána a vyšší sérové hladiny jsou zjevně jen krátkodobé s minimálním rizikem uplatnění toxických účinků. Na druhou stranu je zde otázkou lokální toxicity, tedy ovlivnění buněk v okolí kostního cementu s antibiotikem. Jsou popsány změny v buněčných funkcích. Vlivem kostního cementu je snížena aktivita jak osteoklastů, tak i osteoblastů a to

hlavně jejich proliferace (**Jiranek et al, 2005**). Polymetylmetakrylát *in vivo* zhoršuje také chemotaxi a fagocytózu makrofágů (**Krbec et al, 2004**). Pro podporu metabolismu kostních buněk a regulaci pH po aplikaci kostního cementu s antibiotikem lze dosáhnout přidáním Ca(OH)_2 . Navíc kostní cement s Ca(OH)_2 vykazuje lepší antibakteriální účinnost (**Murakami et al, 1997**).

Duncan referuje ve své studii fakt, že nebyla nikdy prokázána sérová hladina tobramycinu vyšší než 3mg v litru a to ani po přidání 3,6g práškového tobramycinu do 40g kostního cementu (**Duncan et al, 1994**). Tato skutečnost byla prokázána jak na zvířecích modelech (**Baker et al, 1988, Hoff et al, 1981, Chapmann et al, 1976, Marks et al, 1976**) tak studii na lidech (**Elson et al, 1977, Wahling et al, 1984**). Důležitá je i skutečnost, že nízké a přechodné sérové hladiny gentamicinu, vznikající jeho uvolněním z cementu nezpůsobují renální, vestibulární ani jiné nežádoucí komplikace (**Garvin et al, 1994**).

Vysoká lokální koncentrace gentamicinu je efektivní nejen proti Gram-negativním, ale i gram-positivním bakteriím. Citlivé kmeny nejčastějších patogenů působících periprotetické infekce tj. *Staphylococcus aureus* a koaguláza negativní stafylokoky, jsou účinně inhibovány při lokální hladině antibiotik okolo 0,23 ug/ml (**Garvin et al, 1994**). Duncan změřil hladiny tobramycinu, která dosáhly 232mg/l a vancomycinu s 54 mg/l v drénech u pacientů po náhradě kyčelního kloubu. Systémová hladina nepřesáhla 3 mg/l (terapeutická hladina tobramycinu v séru je 7 mg/l a vankomycinu 24 mg/l) (**Duncan et al, 1995**).

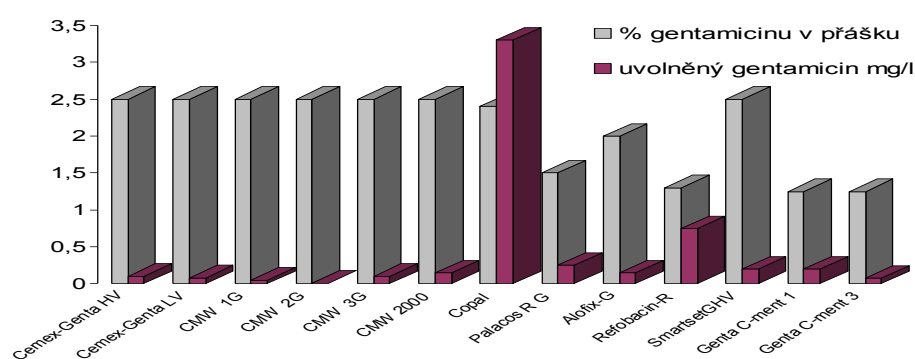
Problematický je ale stoupající výskyt gentamicin rezistentních bakterií. Při užití cementu s gentamicinem nalézáme rezistenci u koaguláza-negativních stafylokoků způsobujících infekci těchto náhrad v 88%. Bez užití kostního cementu s gentamicinem byla pozorována rezistence pouze v 16% (**Tunney et al, 1998**). Přítomnost antibiotika má tak zjevně selekční potenciál pro vznik rezistence, která kromě selhání účinku lokálního přípravku může navozovat i neúčinnost systémově podaných antibiotik. Tunney ve své práci, ve které kultivoval bakteriální původce z kloubních náhrad extrahovaných při reimplantacích zjistil, že 74% stafylokoků je rezistentních na gentamicin. Minimální baktericidní koncentrace, která usmrtí 99,9% inokula gentamicin rezistentních bakterií je větší než 1024 mg/l gentamicinu (**Tunney et al, 1998**). K diskuzím ohledně účinnosti antibiotik na rezistentní bakterie přispěla práce Neut z roku 2001. Ta našla na vzorcích kostního cementu s antibiotikem odebraných v druhé době reimplantace pro infekci kloubní náhrady přítomnost bakterií na kostním cementu v 18 ze 20 vzorků (**Neut et al, 2001**). Neut pozorovala výskyt bakteriální kolonizace na peletách z kostního cementu s gentamicinem. Normální kultivace

ještě nebyla pozitivní, ale až kultivace prodloužená na dva týdny eventuálně kultivace na speciálních půdách byla pozitivní (Neut et al, 2001).

Hanssen prokázal, že 3,6g antibiotika na 40g kostního cementu dostatečně zajistí uspokojivou kinetiku vylučování antibiotika v terapeuticky dostatečné dávce. Přesto ke tvorbě pelet někteří autoři užívají 6 i 8g na 40g kostního cementu (Hanssen et al, 2005).

Wahling ve své práci referuje o tom, že vyšší koncentrace antibiotika v kostním cementu vede ke zvýšení jeho uvolňování. Zdvoji-li se množství gentamicinu z 0,5g na 40g cementu na 1,0g gentamicinu na 40g cementu dojde ke zdvojnásobení koncentrace gentamicinu v sekretu z rány (Wahling et al, 1980).

Ukazuje se že, vlastnosti pro uvolňování antibiotika závisí nejen na jeho množství v kostním cementu ale také na kombinaci antibiotik. V přítomnosti klindamycinu je vylučování gentamicinu výrazně lepší než u samotného gentamicinu. Toho využívají nové cementy, především cement Copal (Heraeus), který obsahuje 1g gentamicinu a 1g klindamycinu. Při porovnání s ostatními cementy ukazuje nejlepší eluční vlastnosti (graf. 2) (Kuhn, 2000).



graf 2.: Porovnání elučních vlastností cementu Copal (Heraeus) s ostatními cementy s antibiotiky

Někteří autoři doporučují kombinaci s 2,4-3,6g tobramycinu a 1-2g vankomycinu na 40g cementu (Duncan et al, 1994). Ještě vyšší dávku užívá Hofmann (Hofmann et al, 1995), kdy při tvorbě spaceru mísí 40g balení cementu Simplex se 4,8g práškového tobramycinu. Při užití dvoudobé reimplantace při léčbě infikované kloubní náhrady, Jiranek doporučuje užití 3,6g antibiotického prášku na 40g cementu. V případech, kdy provádí rekonstrukční výkon a kdy jsou požadavky na pevnost kostního cementu důležitější, doporučuje na podkladě in vitro

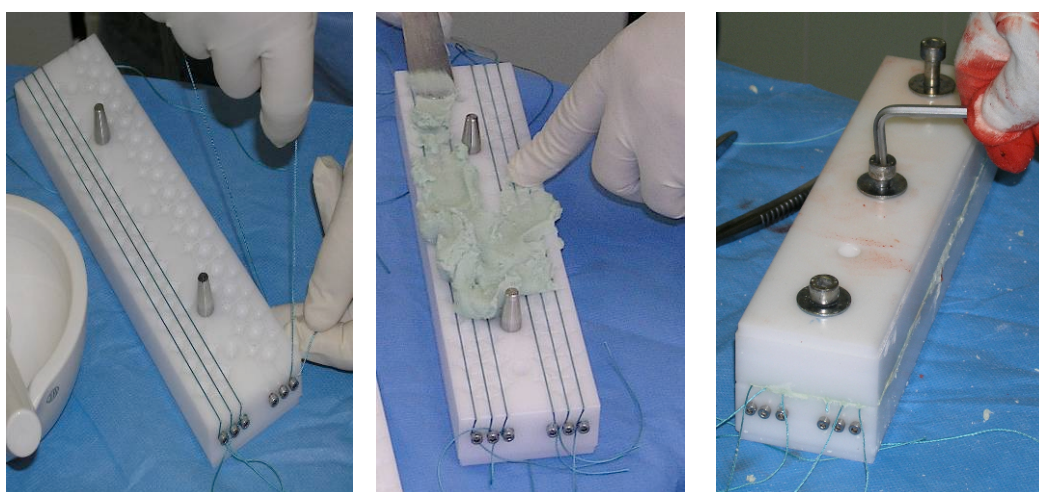
i in vivo výzkumů užití 1g antibiotického prášku do 40g kostního cementu (**Jiraneck** et al, 2005).

Gallo doporučuje přidávat kombinaci gentamicinu s vankomycinem do kostního cementu protože tato kombinace zabraňuje kolonizaci bakteriemi lépe, než firemně užívaný samotný gentamicin (**Gallo** et al, 2005).

Anguita-Alons vzhledem k narůstající rezistenci na aminoglykosidy a vankomycin zkoumá v laboratorní studii, vylučování nových antibiotik z kostního cementu. Doporučuje cefazolin, ciprofloxacin, gatifloxacin, levofloxacin, linezolid a rifampicin k inkorporaci do kostního cementu. Jejich vylučování má typický mód, kdy po rychlém uvolnění části antibiotika následuje pomalé, dlouhodobé vylučování zbytku antibiotik (**Anguita-Alons** et al, 2006).

Rozhodně nejčastější indikací kostního cementu s antibiotiky je fixace kloubní náhrady. Především je užíván při reimplantaci kloubních náhrad. Poměrně časté je ale užití preventivní, při primoimplantaci endoprotézy. Mezi faktory hovořící proti užití kostního cementu s antibiotikem při primoimplantaci kloubní náhrady patří možnost snížení mechanické pevnosti po přidání většího množství antibiotika, dále vzestup počtu infekcí koaguláza-negativními stafylokoky, výskyt rezistentních kmenů a vyšší počet povrchových infekcí, není-li zároveň užitá profylaktická parenterální antibiotická terapie (**Duncan** et al, 1994, **Duncan** et al, 1995). Dalším důvodem proti užití cementu s antibiotikem při primoimplantaci náhrady jsou komplikace při odebrání peroperačních kultur v případě revize implantátu. Při odstraňování kostního cementu dochází k jeho zlomeninám a tak i po letech může dojít k uvolnění antibiotik (**Powels** et al, 1998). Přestože se většina antibiotik vyloučí z kostního cementu v prvních devíti týdnech, jsou měřeny podstatné hladiny antibiotik několik let po provedené implantaci v případech, že dojde k prasklinám kostního cementu (**Jiraneck** et al, 2005). Jiraneck proto doporučuje užití kostního cementu s antibiotiky při primoimplantaci pouze v situacích, kdy je riziko rozvoje infekce vysoké. Mezi takové nemocné patří pacienti s anamnézou infekce operovaného kloubu, po opakovaných revizních operacích nebo se selhanou osteosyntézou periartikulárních zlomenin. Dále do této skupiny nemocných, u kterých je užití plně indikováno, můžeme zařadit také nemocné s diabetes mellitus, imunosupresí či malnutricí (snížený albumin, snížený počet lymfocytů), ale též nemocné nad 80 let. V případě revizních operací pravděpodobně asepticky uvolněných je užití kostního cementu s antibiotiky plně doporučováno (**Jiraneck** et al, 2005, **Tunney** et al, 2001).

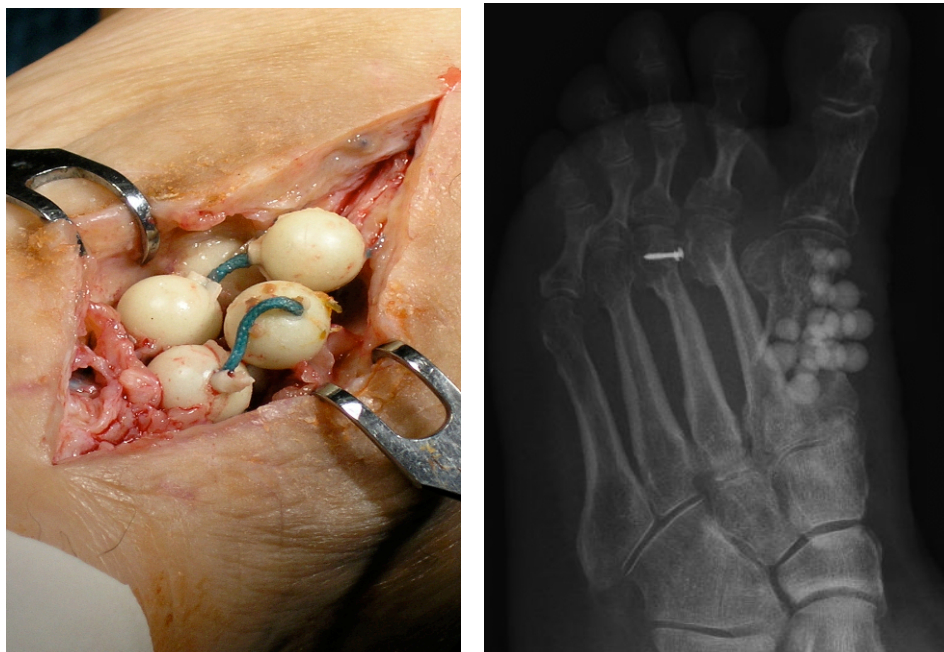
Klasickou formou užití kostního cementu k léčbě kostních infekcí jsou řetízky z PMMA kuliček (Septocoll, Biomet-Merck, Darmstadt). Sférický tvar tohoto nosiče představuje ideální plochu pro uvolňování antibiotik ve větším množství. Použití PMMA kuliček je však časově omezené v porovnání s kostním cementem určeným k fixaci kloubních náhrad a je třeba je po doléčení zánětu odstranit (Frommelt et al, 2008). Tento postup byla velmi populární především na chirurgických pracovištích. Pro nutnost další operace nutné k odstranění řetězců byla tato metoda postupně nahrazována jinými postupy. Nárůst obtížně léčitelných infekcí způsobených rezistentními kmeny znamenal renesanci tohoto postupu i když v pozměněné podobě. V současné době je přidáván do kostního cementu pro tvorbu pelet na sále především vankomycin.



obr. 4a, b, c: Formička na tvorbu pelet z kostního cementu s antibiotikem vyrobená firmou ProSpon dle našeho návrhu

Příprava peletek je velmi náročná. Je třeba zajistit co nejlepší smísení antibiotika a cementu. Správný postup přimíchání antibiotik do kostního cementu je složitý. Nejprve vysypeme celý obsah balení práškového antibiotika za sterilních podmínek do nádoby. Pečlivě rozdrtíme antibiotikum. Poté přidáme stejné množství polymetylmakrylátového prášku a dobře zamícháme. Dodáme opět množství polymetylmakrylátového prášku v množství odpovídající již smíchané směsi. Dobře zamícháme. Tuto akci opakujeme dokud nepřimícháme veškerý kostní cement. Do nové nádoby nalijeme monomerovou tekutinu a přimícháme směs antibiotik a polymetylmakrylátového prášku. I tento složitý postup nezajistí rozložení antibiotika ve směsi a proto dáváme přednost firemě připraveným cementům s antibiotiky. Samotná příprava peletek je již jednodušší. S výhodou je cement

před smícháním vychladit, čímž se prodlouží doba polymerizace a máme tak delší dobu na formování peletek. Dříve jsme peletky tvarovali v ruce a navlékali na slabý cerkázní drát či na silné silonové vlákno. V současné době užíváme speciální formičku, která zjednoduší přípravu a zajistí standardizovaný tvar peletek (obr. 4a, b, c, 5a, b).



obr. 5a: Peroperační snímek aplikovaných pelet z kostního cementu s vankomycinem

obr. 5b: RTG snímek pelet v oblasti prvního metatarzu při léčbě sekundární osteomyelitidy

Nejsofistikovanějším užitím kostního cementu s antibiotiky představují spacers. Při léčbě infekcí kloubních náhrad dvoudobou reimplantací byly nejprve užívány také pelety. **Tsukayama** aplikoval 90 kuliček kostního cementu s antibiotikem (1,2g tobramycinu na 20g kostního cementu) do proximálního femuru a 90 kuliček velikosti cca 6mm do acetabula. Toto užití kostního cementu však mělo funkci pouze nosiče antibiotika a nezajistilo postavení v kyčelním kloubu. Úspěšnost tohoto postupu dosahovala 85 % (**Tsukayama** et al, 1996). Nyní dáváme přednost, použití dočasné artikulační vložky, zvané spacer.

Hlavním úkolem spaceru je prevence nadměrné kontrakce měkkých tkání. Slouží k podpoře končetiny, kdy při jeho správné konstrukci nedochází k usuraci kosti, ale naopak se zvyšuje kostní kvalita (**Booth** et al, 1989, **Calton** et al, 1997). Dobře tvarovaný spacer umožňuje uspokojivou mobilitu pacienta. Užíváme-li spacer aplikovaný intramedulárním

dříkem do dřevné dutiny proximálního femuru, slouží spacer jako armování a chrání stehenní kost před zlomeninou (**Deshmukh et al, 1998**). Při užití antibiotikem impregnovaného cementu slouží spacer též jako systém lokálně uvolňující antibiotikum.

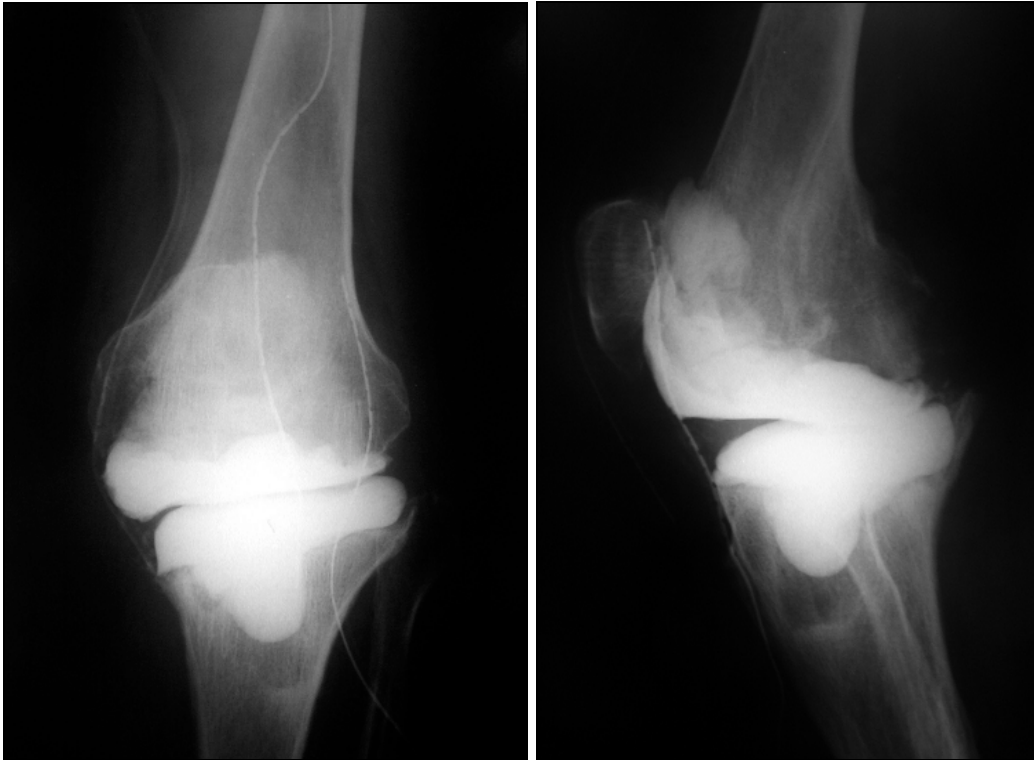


obr. 6a, b: Statický jednodílný spacer v oblasti kolena. Tvar využívající nerovností kostního lůžka zajišťuje stabilitu a klid k zhojení zánětu. Femorální štít zabraňuje srůstu pately a femuru

Přes velmim intezivní výzkum nejsou spacery vyřešenou problematikou. U některých typů je udáváno až 58,5% komplikací. Nepanuje shoda na délca užití, která osciluje mezi 3 týdny a “ čím déle tím lépe “, na tvaru, materiálu a typu fixace.

Spacery můžeme dělit na neartikulované - statické (blokové) (obr. 6a, 6b) a spacery umožňující pohyb tzv. artikulované (mobilní). Mobilní spacery pak dělíme do několika skupin: 1. na sále tvořené artikulované spacery z kostního cementu, 2. protéza ve funkci spaceru (užita použitá resterilizovaná protéza nebo nová komponenta jako spacer), 3. cementový spacery tvarované na sále pomocí komerčně vyráběné formy a 4. továrně vyráběné spacery (ready made spacery).

Tradiční statické spacersy užívané v první době dvoudobé reimplantace náhrady kolenního kloubu jsou rigidní a fixují kolenní kloub v extenzi (obr. 6a, b). **Hofmann** uvádí horší funkční výsledky při jejich použití (**Hofmann et al, 1995**). Při užití rigidních spacerů dochází ke značnému zjizvení dorzálně a na mediální a laterální ploše femuru. Rigidní spacersy jsou často nestabilní a jejich užití vede ke kostním erozím (**Haddad et al, 2000**).



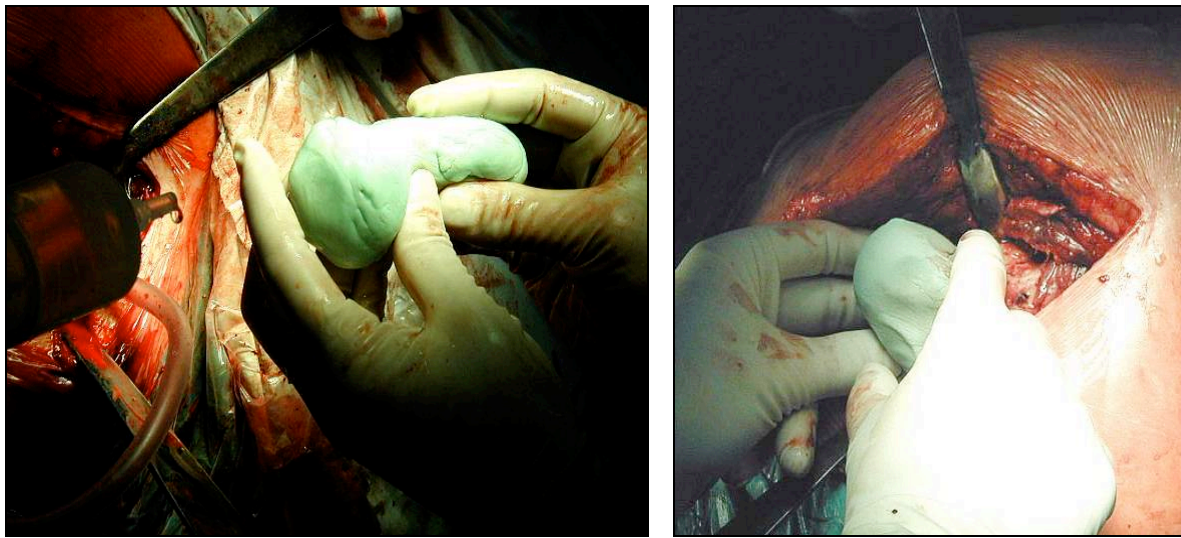
obr. 7a, b: Nevhodně tvarovaný artikulovaný dvoudílný spacer v oblasti kolena, který rozhodně není kongruentní a neumožňuje hladký pohyb. Naopak nezajišťuje stabilitu a vede k subluxaci v kolenním kloubu.

Klasickým na sále modelovaným spacerům je vytýkáno především nestandardizované modelování, kdy jejich tvar často závisí na zručnosti operátora a jeho uměleckém nadání (obr.6, 7, 8).

V oblasti kolenního kloubu jsou největším úskalím rigidních spacerů problémy s extenzorovým aparátem, postranními vazy a dorzálním pouzdrém. Nestabilita špatně tvarovaných, rigidních spacerů vede k mikropohybům, které způsobují eroze a tím dochází ke kostním ztrátám (**Calton et al, 1997, Haddad et al, 1999**). Část autorů poukazuje na omezení pohyblivosti s následnou rigiditou a z ní rezultující zhoršený komfort pro pacienta a ne zcela

ideální funkci (**Duncan** et al, 1994, **Haddad** et al, 1999, **Haddad** et al, 2000, **Younger** et al, 1997).

Ha preferuje artikulované spacers, neboť u rigidních spacerů vidí jako zásadní problém riziko kontraktur m. quadriceps a zjizvení měkkých tkání, které velmi komplikuje reimplantaci. Zdůrazňuje riziko avulze tuberositas tibiae či rupturu ligamentum patellae. Častěji je nutné použít Y nebo V plastiku quadricepsu. Jako další problém vidí destrukci kostního lůžka, osteoporózu, adheze mezi m. quadriceps a přední plochou femuru (**Ha** et al, 2006).



obr. 8a : Tvarování spaceru do tvaru původního proximálního femuru

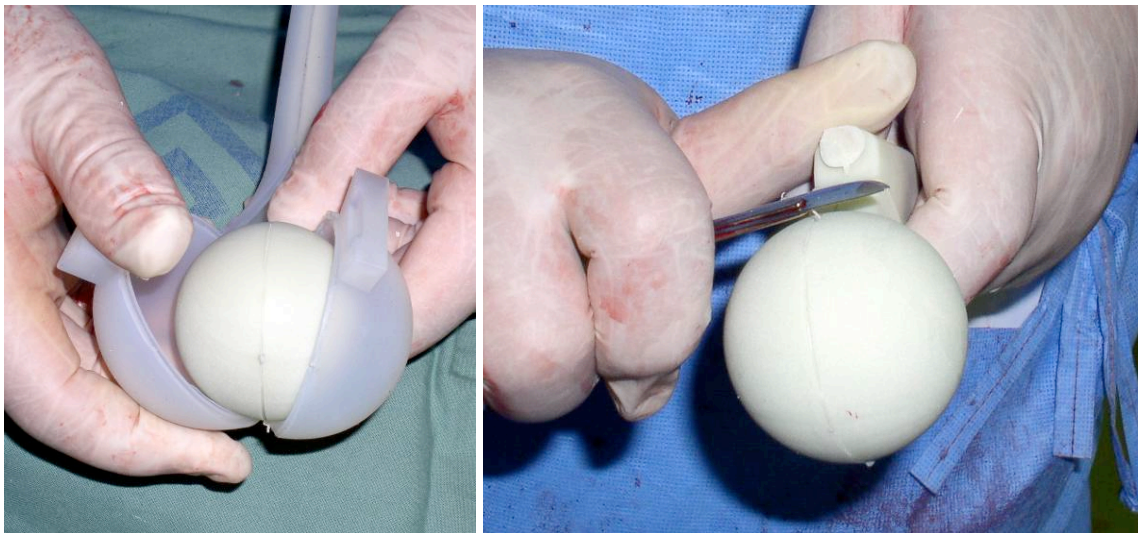
obr. 8b: Definitivní úprava spaceru po aplikaci do proximálního femuru

Spacerů modelované na sále za užití formy přináší standardizaci metody. Jejich příprava je však stále komplikovaná. Dříve mnozí z nás užívali různě získané formičky (například staré Smith-Petersenovy čepičky). Nyní jsou však na trhu dostupné systémy formiček ze silikonu, některé i s armováním. Silikonová formička pro kyčelní kloub má tvar cervikokapitální endoprotézy a je dostupná v několika velikostech. Formička je plněna vakuově míchaným kostním cementem s antibiotiky z kartuše (obr. 9). Tento proces je relativně zdlouhavý a náročný ale přináší velmi uspokojivé výsledky (obr. 10 a, b, 11a, b). Hlavice spaceru je bezvadně tvarována a hladká. U systémů, které nepoužívají armování však zůstává riziko zlomeniny spaceru (obr. 12a, b, c). Podobný systém je k dispozici i pro oblast

kolenního kloubu.

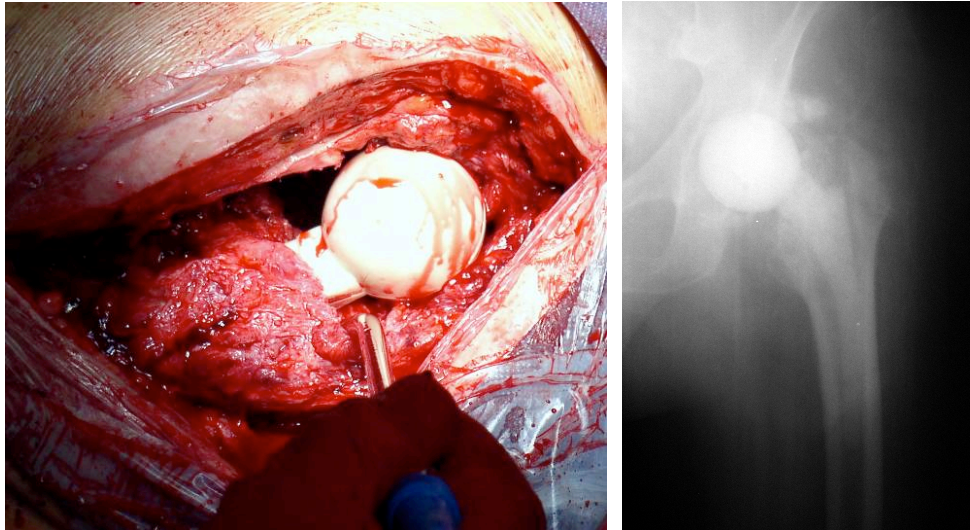


obr. 9: Silikonová formička (Biomet) pro přípravu kyčelního spaceru s kartuší naplněnou kostním cementem s antibiotikem



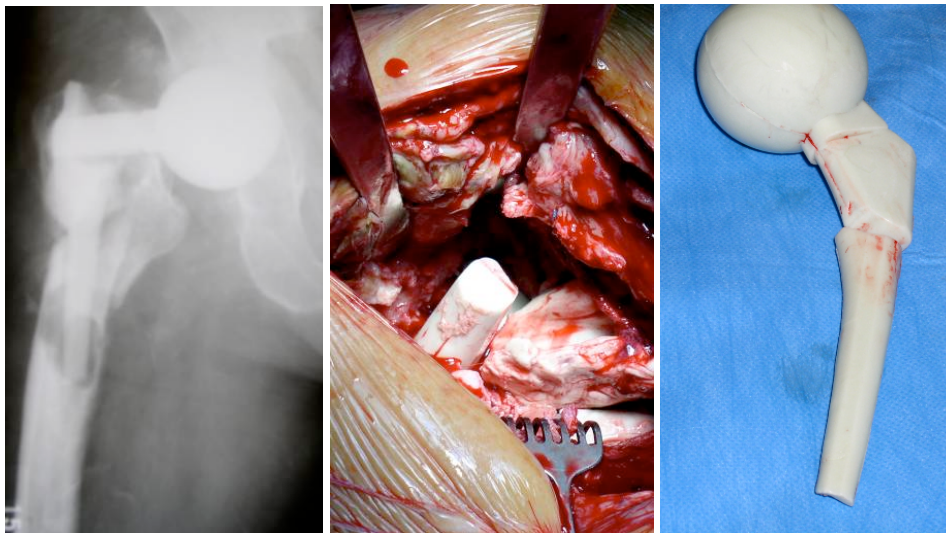
obr. 10.a: Spacer lze po zatuhnutí ze silikonové formičky lehce vyjmout

obr. 10b: Po vyjmutí z formičky je třeba zbavit povrch spaceru nerovností



obr.11a: Spacer lze lehce aplikovat i extrahovat

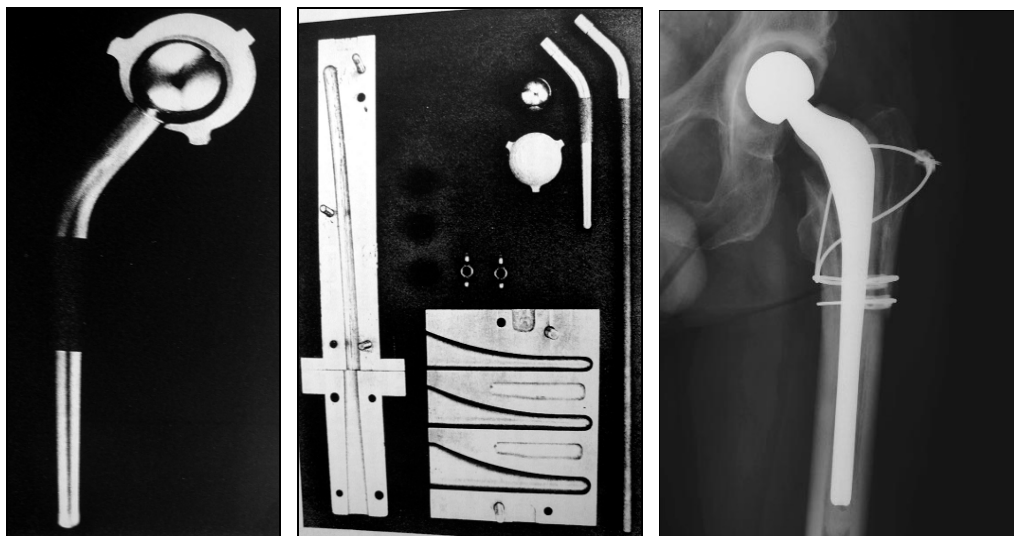
obr. 11b: RTG spaceru tvarovaného pomocí formičky



obr. 12a, b, c: Komplikace spaceru tvarovaného pomocí formičky – zlomenina spaceru

Další skupinou jsou endoprotézy ve formě spaceru. Klasickým představitelem je systém PROSTALAC, který byl vyvinut **Duncanem** a **Beuchampem** (Duncan et al, 1993). Od roku 1989 začal **Duncan** užívat artikulovaný spacer v oblasti kyčelního kloubu s myšlenkou především minimalizovat nevýhody dlouhého pobytu pacienta na extenzi, ale též odstranit nevýhody z ruky tvarovaných spacerů. Nejprve užíval pouze cementový spacer armovaný nitrodřeňovým hřebem. Později vypracoval metodu PROSTALAC (De-Puy), což je zkratka názvu Prosthesis of Antibiotic Loaded Acrylic Cement. Při operaci zprvu postupuje obdobně jako při kterékoliv revizní operaci. Extrahuje infikovaný implantát, zbytky cementu

a provádí kompletní debridement. Při konstrukci spaceru využívá velmi slabé polypropylenové jamky obalené vrstvou cementu s antibiotikem, kterou aplikuje do acetabula. Femorální komponenta je zhotovena za pomoci šablon, kdy je skelet z nerezavějící oceli důsledně celý obalen cementem s antibiotikem (obr. 13a, b, c).



obr.13a: Implantát PROSTALAC

obr.13 b: Komplikované instrumentarium PROSTALAC pro bezcementovu fixaci

obr. 13 c: RTG implantátu PROSTALAC

Po zatvrdnutí kostního cementu je pak spacer aplikován jako press-fit implantát do femorálního kanálu. **Duncan** se spolupracovníky uvádí při užití tohoto postupu vynikající výsledky. Dosahují úspěšnosti 93,5 % ve skupině 86 nemocných při dvouletém sledování (**Duncan et al, 1994**). **Younger** udává při užití metody PROSTALAC v oblasti kyčelního kloubu úspěšnost 94 % ve skupině 48 pacientů sledovaných 43 měsíců. Harrisovo kyčelní skóre po operaci bylo u 80 % pacientů vyšší než 80 bodů a nárůst dosahoval nejméně 30 bodů (**Younger et al, 1997**). PROSTALAC poskytuje cenově efektivní možnost terapie hluboké infekce zjednodušením léčby a zvýšením komfortu pro nemocného. Zkracuje nejen dobu hospitalizace a rehabilitace, ale i operační čas (**Gee et al, 2003**). Přestože je lokální působení antibiotik časově omezené, jsou spacers i PROSTALAC přínosem pro nemocného (**Kraay et al, 2005**). Bohužel pro extrémě vysokou cenu se tento systém v Evropě nikdy nerozšířil.

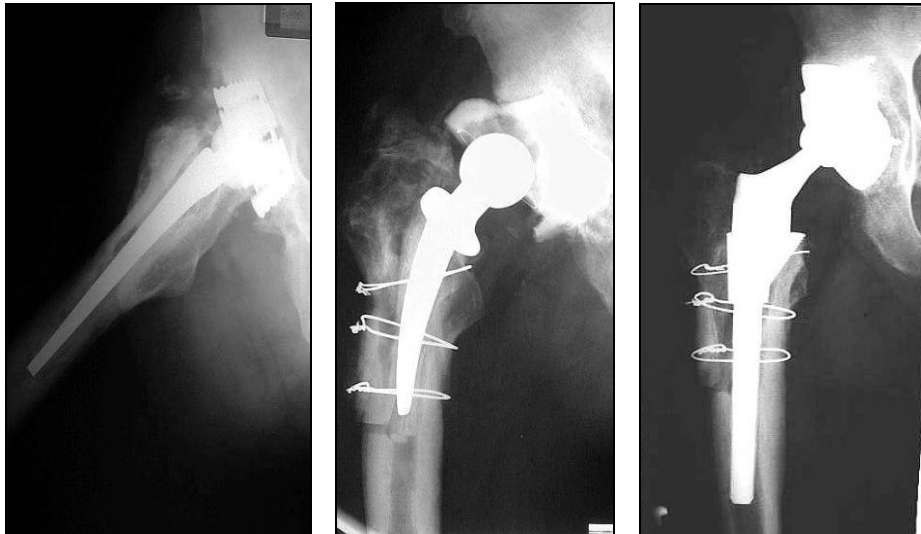
Systém PROSTALAC pro náhradu kolenního kloubu byl poprvé užit v roce 1987. Po extrakci uvolněné endoprotézy a debridementu všech nekrotických a infikovaných měkkých tkání, jsou distální femur a proximální tibie připraveny stejným způsobem, jako by šlo o reimplantaci endoprotézy s opatrnou resekci kosti. Poté jsou užity zkušební implantáty standardního instrumentaria. Formy mají tři rozdílné tloušťky, které umožňují správně zvolit kloubní linii. Kostní defekty jsou při definitivní implantaci spaceru vyplněny kostním cementem. Tloušťka tibiální komponenty je v intervalu mezi 12 a 34mm. Jakmile cement zatuhne, jsou komponenty extrahovány z forem a zacementovány do kostního lůžka kostním cementem v pozdním stadiu polymerizace. V případě dobrého kostního lůžka je možné aplikovat PROSTALAC jako press-fit implantát. Patela není nahrazována (**Haddad et al, 2000**).

Úspěšnost sanace infekce náhrady kolenního kloubu za užití systému PROSTALAC je 91% (**Haddad et al, 2000**). Průměrné Hospital for Special Surgery score je po extrakci kloubní náhrady a aplikaci PROSTALAC 55,9 a po definitivní reimplantaci v průměru 71,4 (**Haddad et al, 2000**). PROSTALAC zjednodušuje průběh rehabilitace i reimplantaci. Přestože komponenty systému PROSTALAC obsahují malé množství polyetyleny a kovu, není tím ovlivněna úspěšnost sanace infekce (**Haddad et al, 2000**).

Artikulované spacers přinášejí přiměřenou funkci po reimplantaci náhrady kolenního kloubu, dané především intenzivní rehabilitací v pooperačním období. Významný je i psychosociální aspekt. Jsou vyzdvihovány malé destrukce kostního lůžka oproti rigidním spacerům, tvořených vloženým monoblokem (Jahoda et al, 2008). **Mee** při tvorbě artikulovaného kolenního spaceru do jednoho balení cementu Palacos přidává 3,6g tobramycinu a 1,5g vankomycinu. Femorální i tibiální komponenty modeluje peroperačně ve formách několika velikostí. Užívá malé femorální a tibiální artikulační komponenty, konstruované jako „posterior-stabilized“, ukotvené do cementu. Ihned se začíná s mobilizací. Podává 6 týdnů intravenózně antibiotika. Na základě laboratoře a praxe indikuje reimplantaci, kdy k fixaci implantátu užívá kostní cement Palacos s 0.6g tobramycinu na jedno balení. Výhodu vidí v prevenci zkrácení a zjizvení m.quadriceps (**Meek et al, 2003**).

Meek udává úspěšnost dvoudobé reimplantace kolenního kloubu za užití PROSTALAC 96% s velmi dobrými funkčními výsledky danými designem implantátu (**Meek et al, 2004**). **Fehring** uvádí úspěšnost dvoudobé reimplantace za užití artikulovaného spaceru 93%. Při užití artikulovaného spaceru dosahuje průměrné flexe 105 stupňů (**Fehring et al,**

2000). **Hofmann** referuje o 100% úspěšnosti při užití artikulovaného spaceru s průměrným rozsahem pohybu 2-120 stupňů (**Hofmann et al, 1995**).



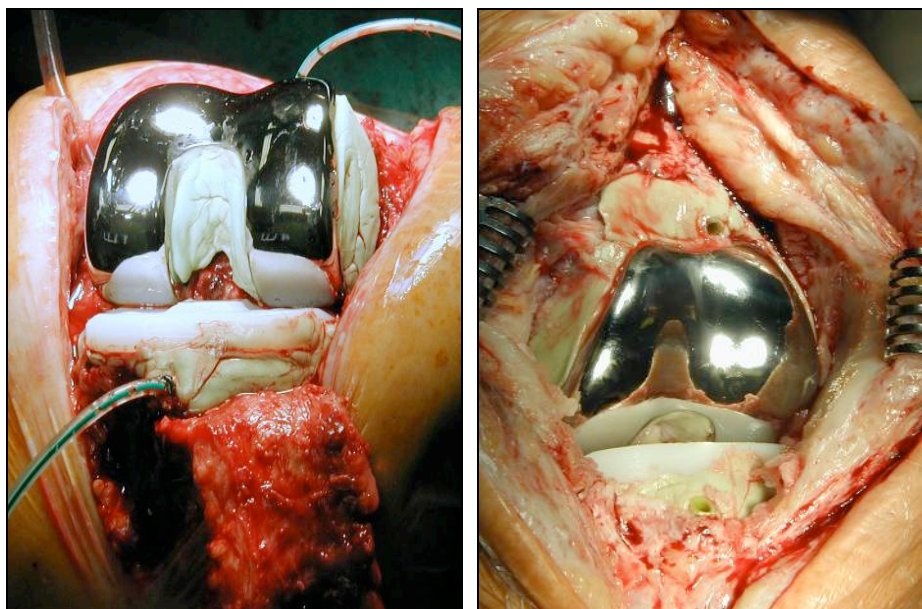
obr. 14a, b, c: Použití artikulovaného spaceru při řešení infekce náhrady kyčelního kloubu Balgrist/CF30 (Sulzer). Při extrakci dřívku byl použit Wagnerův přístup. Artikulovaný spacer je zkonstruován za užití malé komponenty Poldi. Po zaléčení infekce byla implantována jamka Oblong, dřívík S-ROM(De-Puy).

Vzhledem k dobrým výsledkům je i na některých našich pracovištích populární tvorba využití resterilizované protézy jako spaceru navržené Hoffmanem (**Hofmann et al, 1995**) (obr. 14a, b, c). Jako spacer je nejčastěji použita malá endoprotéza Poldi obalená cementem s antibiotikem a vložena do kostního lůžka. Problémem jsou určité negativní právní aspekty užití již použitého implantátu, nebo cena v případě užití nového implantátu jako spaceru.

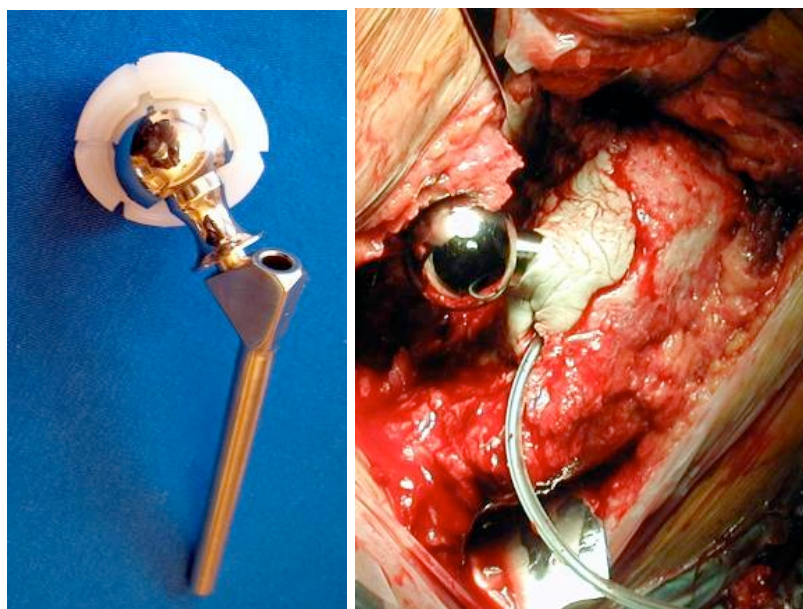
My s tímto postupem máme jednotlivé, ale velmi dobré zkušenosti (obr. 15 a, b).

Hsieh užívá na zakázku vyrobené formy pro přípravu femorální komponenty, které plní cementem s antibiotikem. Na zpevnění užívá tři a více Kirschnerových drátů, které jsou umístěny jako vnitřní kostra. Po zatuhnutí dřívku cementuje kostním cementem do kanálu. Neaplikuje ji jako cervikokapitální endoprotézu z kostního cementu, ale tvoří acetabulární komponentu. Aplikuje cement do jamky a tvaruje ho tlačkou ve tvaru polokoule odpovídající velikosti (**Hsieh et al, 2004**). **Hsieh** vidí výhodu svého postupu na rozdíl od PROSTALAC v

tom, že není třeba tolika forem, neboť je dřík manuálně docementován. Výhodou vidí také možnost částečného zatěžování (Hsieh et al, 2004).



obr.15 a ,b: Artikulovaný spacer vytvořený z femorální komponenty a nové artikulační vložky úspěšně užitý k léčbě infekce náhrady kolenního kloubu. Zavedená kanalizovaná drenáž do dutiny femuru a tibie.



obr. 16a, b: Kanalizovaný artikulovaný spacer

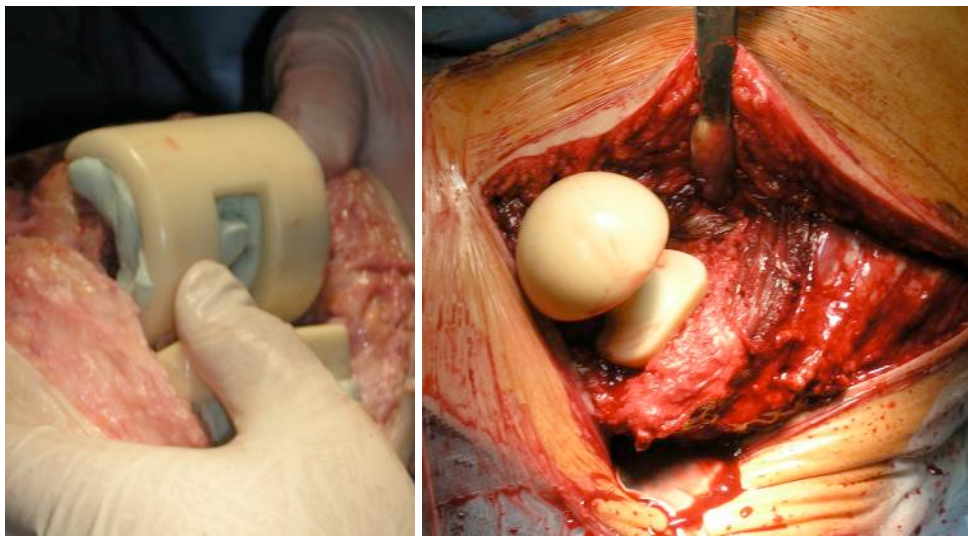
Pro zlepšení vlastností spaceru byl na 1.Ortopedické klinice 1.LF UK FN Motol navržen vlastní implantát pro tvorbu spaceru: Kanalizovaný artikulovaný spacer. Přes velmi dobré výsledky byl tento systém postupně opuštěn, především pro dlouhou a náročnou operační techniku (**Jahoda** et al, 2004) (obr. 16a, b).

Zajímavým řešením je užití továrně vyrobených, takzvaných „ready-made“ spacerů z kostního cementu s antibiotikem (obr. 17, 18a, b). Preformovaný spacer, jako je Spacer-K a Spacer-G (Tecres) přináší úsporu operačního času, standardizaci metodiky, méně mechanických komplikací a lepší funkční výsledky ve srovnání s ručně tvarovaným spacerem (**D'Angelo** et al, 2005). **Pitto** udává 100% úspěšnost léčby infikované náhrady kolenního kloubu za užití preformovaného spaceru. Průměrné Knee score dosáhlo po léčbě 84 bodů (**Pitto** et al, 2005).



obr. 17: Extrahovaný ready made spacer pro kyčelní kloub s naneseným dalším cementem, který slouží k lepší fixaci spaceru

Magnan užívá prefabrikovaný kyčelní Spacer-G (Tecres) tvaru cervikokapitální endoprotézy, vyztužen cylindrickým ocelovým hřebem. Má 3 velikosti hlavice 46, 54 a 60mm. Jako antibiotikum je k cementu Cemex přidáván gentamicin nebo vankomycin. Úspěšnost terapie byla 80%. Výhodou je standardizace léčby, zrychlení operace, snížení počtu luxací. Dobře tvarovaná hlavice zabraňuje kostním ztrátám (**Magnan et al, 2001**). Do Spaceru-G je možno přidat vankomycin do vyvrtaných děr v těle spaceru (**Bertazzoni Minelli et al, 2004**). Nově jsou vyráběny i ready-made spacersy z kostního cementu s kombinací vankomycin-gentamicin.

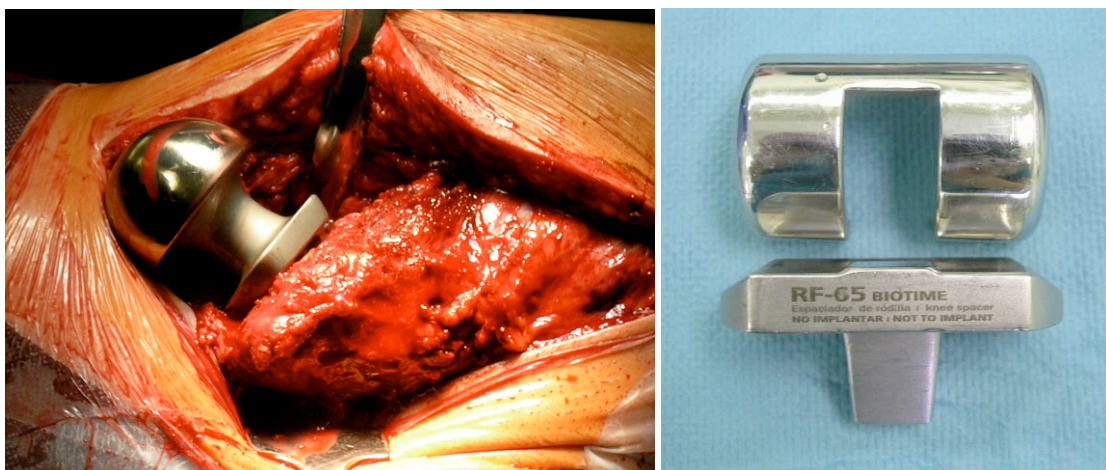


obr. 18a: Implantovaný ready made spacer pro kolenní kloub

obr. 18b: Implantovaný ready made spacer pro kyčelní kloub

Velikou výhodou je propracovaná operační technika a dostupnost zkušebních komponent (obr. 19a, b).

Prefabrikované, ready made spacersy jsou zajímavým technickým řešením. Často je jim vyčítána vysoká cena. To je ale v podstatě omyl. Cena těchto spacerů odpovídá 3-4 balením kostního cementu s antibiotiky, tedy množství které je na tvorbu ručně zhotoveného spaceru obvykle použito. Navíc ušetříme operační čas a také výrazně lepší funkční výsledky vedou k rychlejší dimisi pacienta.



obr. 19a: zkušební komponenta ready made spaceru pro kyčelní kloub

obr. 19a: zkušební komponenta ready made spaceru pro kolenní kloub

1.6.1.2 Polyanhydrid

Polyanhydridy patří mezi biodegradabilní a biokompatibilní syntetické polymery, které se mohou použít jako lokální nosiče léků včetně antibiotik (**Jain et al, 2005**). V závislosti na přítomnosti či nepřítomnosti dusíku během působení tepla o velikosti 60°C vzniká různě tvrzený materiál a tím i schopnost uvolňovat antibiotikum. S přítomností dusíku při výrobě nosiče se stává nosič méně rigidní a uvolňování antibiotika probíhá delší dobu (**Deng et al, 2004**). K léčbě kostních zánětů lze použít buď samotný polyanhydrid nebo polyanhydrid smíšený s dalším biodegradabilním polymerem. Samotný polyanhydrid s gentamicinem byl testován v experimentu na zvířatech. Osteomyelitida byla potlačena u 93% pokusných zvířat léčených tímto nosičem s 20% gentamicinu. Ke zhojení infektu za použití nosiče s 10% gentamicinu došlo u 67%, při aplikaci nosiče bez antibiotika a při intramuskulární aplikaci gentamicinu došlo k zhojení jen u 25% případů a při implantaci nosiče bez antibiotika a bez aplikace gentamicinu intramuskulárně došlo k uzdravení pouze u 7% pokusných zvířat. Ve 12,5% byla infekce eradikována jen debridmentem. V případech, kde byl aplikován nosič s gentamicinem, tak i po 8 týdnech od implantace bylo toto antibiotikum detekováno v okolní kostní tkáni. Koncentrace gentamicinu v prvních sedmi dnech po implantaci nosiče z ranného exudátu byla 4,746 ug/ml, hladiny v séru byly 1,03 ug/ml a koncentrace gentamicinu v moči byla 135 ug/ml. (**Nelson et al, 1997**). Polyanhydrid smíchaný s polylaktidem v poměru 1:9 a s ofloxacinem byl testován v pokuse in vitro i na pokusných zvířatech. Dostatečná MIC ofloxacinu pro *Staphylococcus aureus* byla měřena v okolní kosti z místa aplikace nosiče také po dobu 8 týdnů (**Chen et al, 2007**).

1.6.1.3 Polyhydroxyalkanoát

Polyhydroxyalkanoátový nosič antibiotik složený z poly(3-hydroxybutyrátu-co-3-hydroxyvalerátu) a poly(3-hydroxybutyrátu-co-4-hydroxybutyrátu) **Gürsel** impregnoval 50% Sulperazonem nebo Duocidem. Použil ho k léčbě indukované osteomyelitidy *Staphylococcus aureus* na pokusných zvířatech. Po 6 týdnech nebyla kultivována žádná bakterie v oblasti původního místa infekce. Rentgenový obraz v oblasti operované na konci 6. týdne byl obdobný jak po aplikaci nosiče s antibiotikem, tak bez antibiotika. Veškerá část antibiotik se z nosiče vyloučila v průběhu prvního týdne a oblast akutní osteomyelitidy byla po 6 týdnech bez známek infekce (**Gürsel et al, 2001**).

1.6.1.4 Polyhydroxybutyrát-ko-hydroxyvalerát

Polyhydroxybutyrát-ko-hydroxyvalerát (PHBV) patří do skupiny polymerů mikrobiálního původu s vlastnostmi biodegradability, biokompatibility a osteoinduktivity. Tyto vlastnosti jsou dány jeho schopností piezoelektrického efektu (**Yagmurlu et al, 1999**). Téměř kompletní remise indukované osteomyelitidy na pokusných zvířatech byla dosažena ve 30. dnu po aplikaci PHBV se sulbaktamem-cefoperazonem. Antibakteriální účinnost byla hodnocena makroskopicky, radiograficky, bakteriologicky, a histopatologicky. (**Yagmurlu et al, 1999**).

1.6.1.5 Polykaprolakton

Polykaprolakton (PCL) je materiál s vláknitou strukturou patřící mezi bioplasty, tvořený kombinací škrobových a ropných složek. Je biodegradabilní, biokompatibilní a má široké uplatnění. PCL vlákna s gentamicin sulfátem se osvědčila jako dobrý lokální nosič antibiotika v pokuse *in vitro*. Chang zaznamenal ve své studii inhibici růstu *Staphylococcus epidermidis* déle jak 2 týdny, kdy se gentamicin po tuto dobu postupně uvolňoval z PCL vláken v hladinách s antibakteriální aktivitou (**Chang et al, 2008**). Ze studie porovnávající vlastnosti PCL a PMMA jako lokálního nosiče antibiotik vyšlo, že PCL je lepším lokálním nosičem antibiotik, neboť dosahuje množství vyšších hladin antibiotik v kostní tkáni (**Hendricks et al, 2001**). V dalším experimentu na pokusných zvířatech **Rutledge** sledoval antibakteriální efekt PCL s tobramycinem po čtyřtýdenní léčbě osteomyelitidy vyvolané *Staphylococcus aureus*. Kostní tkáň byla po aplikaci PCL i po aplikaci PMMA nosiče s antibiotikem histologicky srovnatelná s normální kostí. Výhodou PCL je jeho biodegradabilita. (**Rutledge et al, 2003**). PCL potažený kolagenem vytváří lokální nosič

antibiotik, který je měkký, porózní a transparentní. Antibiotika jsou z tohoto nosiče uvolňována déle jak deset dní. Navíc je kolagen dobrým substrátem pro buněčnou adhezi a poskytuje tak stabilní prostředí pro buněčnou proliferaci a regeneraci. Tento materiál by mohl být vhodným lokálním nosičem antibiotik v případech, kde je potřeba uvolňování antibiotika po kratší dobu a který zajistí aseptické prostředí pro adhezi a růst buněk poškozené tkáně (Aishwarya et al, 2008).

1.6.1.6 Polylaktid

Polylaktid se jeví jako jeden z nejperspektivnějších nových nosičů antibiotik v ortopedii. Patří mezi biodegradabilní lokální nosiče léčiv s prodlouženou dobou uvolňování antibiotik a to i v koncentracích sto až tisíckrát přesahujících MIC (Haerdi-Landerer et al, 2008). Polylaktid se často používá v kombinaci s ostatními nosiči. Haerdi-Landerer studoval vlastnosti uvolňování doxycyclinu z polylaktid-ko-glykolidu, možnost jeho intra-artikulární aplikace při artritidě a mikrobiální aktivitu v místě osteomyelitidy po aplikaci nosiče. Výzkum přinesl dobré výsledky s vyhovujícími vlastnostmi tohoto nosiče, které se ověřují experimenty *in vivo*. (Haerdi-Landerer et al, 2008). V dalším experimentální práci Burcu impregnoval 300 mg mikrosferického polylaktid-ko-glykolidu (PLGA 75:25) 30 mg vankomycinu. Hladina vankomycinu v okolní tkáni byla v pokusech *in vitro* nad MIC po dobu 5 týdnů, během kterých se uvolnilo téměř 80% impregnovaného antibiotika (Burcu et al, 2003). V dalším pokuse *in vitro* byl polylaktid-ko-glykolid (PLGA) s ciprofloxacinem (PLGA+C) účinný v prevenci infekce vyvolané *Staphylococcus epidermidis* i proti formování biofilmu (Niemelä et al, 2006). Polylaktid s antibiotikem lze totiž použít také k potažení kovových materiálů. Antibiotika (gentamicin, teicoplanin) se z tohoto nosiče uvolňovala po dobu 96 hodin v baktericidních hladinách (Meani et al, 2007). Polylaktid je tedy možné použít k prevenci infekčních komplikací při implantaci cizorodých materiálů, například k potažení osteosyntetických implantátů pro aplikaci v terénu, kde je zvýšené riziko infekce.

1.6.2 Přirozené polymery

1.6.2.1 Fibrin

Fibrin je degradabilní lokální nosič, který neovlivňuje hojení kostní tkáně (Goudarzi et al, 1983). Fibrin se stále častěji používá v chirurgii k zástavě krvácení a ke zlepšení hojení ran (Tredwell et al, 2006). Nevýhodou samotného fibrinu jako nosiče antibiotik je rychlé vylučování antibiotika difuzí během několika dnů po implantaci. (Zich et al, 1986, Tredwell

et al, 2006). Záleží však také na volbě typu antibiotika. Například cefazolin v porovnání s erytromycinem se z fibrinového nosiče vylučoval stabilněji a více jak o 2 dny. (Tredwell et al, 2006). Prodloužení doby uvolňování antibiotika z fibrinu lze opět dosáhnout kombinací s dalším z nosičů. Příkladem je kombinace fibrinu s aspirátem kostní dřeně. Tento nosič v pokusu dokázal potlačit chronická osteomyelitidu a po 12 týdnech od implantace materiálu byla téměř kompletně dokončena rekonstrukce kosti (Goudarzi et al, 1983). Kombinací fibrinu s roztokem CaCl_2 a trombinu (Shinjo et al, 1993), nebo s nano-HA či s polyethylenglykolem lze výrazně prodloužit dobu vylučování antibiotik (Zhongguo et al, 2006). Mader v experimentu na pokusných zvířatech dospěl k závěru, že léčba osteomyelitidy fibrinovou pěnou s tobramycinem by mohla být stejně účinná jako při užití kostního cementu s tobramycinem. Redukce množství *Staphylococcus aureus* v kostní tkáni byla po 4 týdnech srovnatelná u obou typů nosičů (Mader et al, 2002).

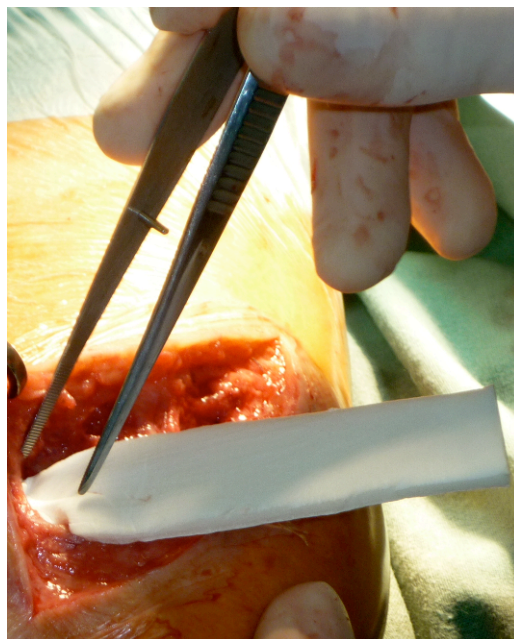
1.6.2.2 Želatinová houba

Želatina je protein získávaný částečnou kyselou nebo alkalickou hydrolyzou živočišného kolagenu extrahovaného z kůže, kostí, chrupavek a vazů. Z hlediska složení aminokyselin je možné želatinu považovat za chemicky velmi čistou formu kolagenu bez nevláknité bílkoviny, mukopolysacharidu a tuku s velkým množstvím glycinu (skripta, 2008). Drognitz použil v pokusu *in vitro* glycerinovou želatinovou houbu obsahující 10% nebo 20% želatinu, kterou impregnoval vancomycinem a teicoplaninem po dobu 1 nebo na 24 hodin. U nosičů, impregnovaných antibiotiky po delší dobu, bylo potvrzeno prodloužené uvolňování antibiotik. Dvojnásobné množství želatiny neovlivnilo dobu eluce antibiotik z nosiče. U vankomycinu byla zaznamenána delší doba uvolňování z nosiče v porovnání s teicoplaninem (a to více jak o 5 dnů) (Drognitz et al, 2006).

1.6.2.3 Kolagen

Kolagenní nosič s antibiotikem je dlouhodobě užíván pro lokální léčbu zánětů kostí a měkkých tkání (obr. 20). Nejznámějším kolagenním nosičem antibiotik v chirurgii je Garamycin®, obsahující gentamicin sulfát. Nově používaným materiálem z kolagenu je Septocoll®E, který obsahuje dva typy gentamicinu: gentamicin sulfát a gentamicin krobefát, který zajistí prodlouženou dobu účinku. Eluce gentamicinu je v tomto případě zajištěna na více jak 48-72 hodin (Frommelt et al, 2008). Tento materiál se kompletně vstřebává a též zmírňuje krvácivost při chirurgických zákrocích. Kolagenní nosič, např. Garamycin® je

možné nastříhat na malé kousky a smíchat s kostními štěpy. Může se tak snížit výskyt recidivy infekce až o 7% (**Hasellbach** et al, 1989, **Wernest** et al, 1992). Většina gentamicin sulfátu se z kolagenního nosiče vyloučí během prvních pár hodin po jeho aplikaci. Prodloužení doby eluce lze dosáhnout pomocí výše zmíněného gentamicinu krobefátu (**Frommelt** et al, 2008). Bovinní kolagen s teikoplaninem (Targobone®) v porovnání s autologním kostním štěpem nepřinesl dle RTG kontrol při řešení kostních defektů lepší výsledky hojení kosti v experimentu *in vivo* na zvířatech. Za 24 týdnů došlo ke zmenšení kostního defektu o 79% při použití Targobone®, kdežto při použití autologního kostní štěpu byl defekt zmenšen o 95,3% (**Rupprecht** et al, 2007). Výhoda Targobone® však spočívá pouze v uvolňování teikoplaninu, antibiotika se silným antibakteriálním účinkem. Kolagenní nosič tak může být přínosem v léčbě osteomyelitidy bez toxicity na okolní tkáň (**Galjour** et al, 2005). Kolagen se dále používá k výrobě kompozitů (např. Bio-Oss collagen®, Collapat®, Healos®, Collagraft®). Kompozity kolagenních nosičů s materiály z keramiky mají větší pevnost a je u nich prodloužena doba uvolňování antibiotika v porovnání se samotným kolagenem.



obr. 20: Peroperační snímek aplikace kolagenního nosiče s antibiotiky

1.6.2.4 Demineralizovaná kostní matrix (DBM)

Demineralizovaná kostní matrix se získává z lidské (Accell Connexus®) nebo bovinní (Colloss®E) kosti zpracované na malé kousky, které jsou následně demineralizovány kyselinou chlorovodíkovou. Hlavní komponentou DBM je reorganizovaný kolagen typu I a nekolagenní proteiny, které podporují formování kostní tkáně stimulací vlastních regeneračních mechanismů. DBM má jak osteokonduktivní tak osteoinduktivní vlastnosti. Osteokonduktivní účinek spočívá v tom, že demineralizovaná kostní matrix vytváří skelet z troj-helikální struktury kolagenu typu I, který chemotakticky přitahuje buňky, které se mohou uchytit, růst a dělit se. Osteoinduktivní účinek demineralizované kostní matrix je dán přítomností řady růstových faktorů v demineralizované kostní matrix, včetně morfogenetických proteinů kostní tkáně (bone morphogenetic proteins). Tyto růstové faktory ovlivňují dělení, růst a diferenciaci buněk kosti. Morfogenetické proteiny kostní tkáně indukují osifikaci a jsou schopny transformovat nediferencované mesenchymální buňky do diferencovaných progenitorových kostních buněk. Ostatní růstové faktory indukují množení buněk (**Boskey et al, 1996, Kloss et al, 2004**).

Dostupná literatura uvádí, že morfogenetické proteiny kostní tkáně jsou růstové faktory náležející do skupiny TGF- β růstových faktorů, jež mají schopnost indukovat tvorbu kosti a chrupavky. Morfogenetické proteiny kostní tkáně interagují se specifickými receptory na buněčném povrchu, tzv. receptory morfogenetických proteinů kostní tkáně, což vede k fosforylaci cytoplasmatických proteinů ze skupiny Smad, jejichž komplex pak vstupuje do buněčného jádra a aktivuje transkripční faktory některých genů. Během procesu hojení pak dochází k nahrazení DBM novotvořenou kostí (**Boskey, 1996, Kloss et al, 2004**).

DBM můžeme kombinovat s dalšími materiály proto, aby lokální nosič antibiotik splňoval požadované vlastnosti. Například lze urychlit proces hojení kosti smísením DBM s aspirátám kostní dřevě (**BTEC, 2008**).

V experimentu *in vitro* a *in vivo* DBM s gentamicinem nepotvrdil negativní účinek antibiotika na osteoindukci použitého nosiče. Gentamicin se v pokuse *in vitro* uvolňoval z DBM po dobu 13 dnů (**Christine et al, 2010**). V dalším experimentu provedeném nejprve *in vitro* a poté na pokusných zvířatech byla potvrzena účinnost DBM s vankomycinem k léčbě osteomyelitidy vyvolané MRSA, kdy se antibiotikum uvolňovalo po dobu 3 týdnů. Došlo také k dobré inkorporaci nosiče s okolní kostí (**Shyam et al, 2010**).

1.6.2.5 Krevní koagulum

V roce 1951 **Winter** poprvé indikoval plombáž autologní krví s antibiotikem do kostní dutiny postižené infektem. Výplň krevním koagulem se mění v pojivovou tkáň a po sedmi týdnech dochází k přestavbě na tkáň kostní. V experimentu na zvířatech hladina Streptomycinu v periferní krvi poklesla na 0.008 g/ml po 130 hodinách od aplikace tohoto typu nosiče. Ve studii Faupela u 74 ze 112 pacientů s osteomyelitidou léčených auto-krevní plombáží s antibiotikem byl zaznamenán rychlý ústup symptomů. U dvou třetin těchto pacientů došlo k uzdravení. (**Faupel et al, 1986**). V dnešní době se krevní koagulum jako lokální nosič antibiotik v ortopedii nepoužívá z důvodu náročné přípravy, relativně rychlého uvolnění antibiotika a malé úspěšnosti léčby v porovnání s ostatními nosiči.

1.6.3 Keramika

1.6.3.1 Bioaktivní sklo

Originální bioaktivní sklo (biosklo) popsané **Henchem** obsahuje SiO_2 , Na_2O , CaO a P_2O_5 . Jednotlivá bioskla se pak liší různým poměrem jednotlivých oxidů. Bioaktivní sklo má hierarchickou porózní strukturu velmi podobnou spongiózní kosti, je biokompatibilní a bioaktivní. Není však osteoinduktivní a nedokáže formovat kost v ektopických místech. V přirozeném stavu je ve formě granulí. Bioaktivita je výsledkem reaktivního povrchu kalcia, fosfátu a především křemíku. Biosklo může být nosičem jak antibiotik tak podpůrných růstových faktorů pro osteoblasty (**Thomas et al, 2005**). V iniciální fázi po implantaci bioaktivního skla s gentamicinem dochází k rychlému uvolňování tohoto antibiotika v prvních 10 hodinách a poté již následuje jen pozvolné uvolňování antibiotika (**Ragel et al, 2000**).

Z bioaktivního křemíku lze také syntetizovat měkký bioaktivní materiál polymerizací křemíku s flexibilním polymerem (polydimethylsiloxan nebo polytetramethyloxid) za vzniku anorganicko-organického nano-hybridu, který má kosti podobnou strukturu a mechanické vlastnosti (**Kokubo et al, 2003**). Tento materiál daleko lépe nahradí defekt v kosti, navíc společně s antibiotiky by mohl být vhodnou formou lokálních nosičů použitelných v ortopedii.

Další formou bioaktivního skla jsou mezoporózní bioskla s dvojí velikostí pór (MBGs). Oba dva typy MBGs v porovnání s klasickým biosklem lépe udržují a déle uvolňují léčiva. MBG s větším objemem pór a povrchem má lepší vlastnosti nosiče antibiotik než MBG s menší velikostí pór (**Zhao et al, 2008**).

Kromě antibiotik lze biosklo impregnovat ionty stříbra, $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-Ag}_2\text{O}$ (AgBG). Ionty stříbra se v experimentu *in vitro* dlouhodobě uvolňovaly z nosiče v takovém množství, které má bakteriostatický i baktericidní účinek jak na aeroby, tak na anaeroby bez dosažení cytotoxických hladin pro kostní buňky (**Balamurugan et al, 2008**).

1.6.3.2 Apatit-wollastonitové keramické sklo

Apatit-wollastonitové keramické sklo (A-W GC) připravené Nippon Electric Glass Co Ltd (Otsu, Japonsko) se skládá ze 4,6% MgO, 44,7% CaO, 34% SiO_2 , 16,2% P_2O_5 , 0,5% CaF_2 . Samotné apatit-wollastonitové keramické sklo má identickou odolnost ke kompresivním silám jako spongiózní kost. Pro zvýšenou indukci kostní tvorby lze A-W GC zkombinovat s morfogenetickými proteiny (BMP) anebo s kolagenem (**Fujita et al, 2000**).

Kawanabe měřil antibakteriální účinnost bločků porózního apatit-wollastonitového keramického skla (A-W GC) impregnovaných antibiotiky isepemacin sulfátem (ISP) a cefmetazolem (CMZ). Baktericidní koncentrace antibiotik uvolňovaných z A-W GC bločků *in vitro* měřil po dobu více jak 6 týdnů. Koncentrace CMZ byla nižší v porovnání s ISP. V *in vivo* studii na pokusných zvířatech bylo naměřeno množství ISP nad MIC z kosti kolem aplikovaného nosiče i v 8. týdnu od operace. **Kawabane** použil tento lokální nosič antibiotik u čtyřech pacientů s infekcí náhrady kyčelního kloubu a u jednoho pacienta s osteomyelitidou tibie. U všech pacientů byla infekce vyléčena. **Kawanabe** také uvádí, že A-W GC je lepším nosičem antibiotik k léčbě osteomyelitidy než hydroxyapatitem (**Kawanabe et al, 1998**).

1.6.3.3 Hydroxyapatit (HA)

HA, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (Endobon®) je povrchově velmi bioaktivní, anorganický, krystalický a nebiodegradabilní materiál s osteokonduktními vlastnostmi. Hydroxyapatit je RTG kontrastní. Vytváří pevnou chemickou vazbu mezi kostní tkání a implantátem již za dva měsíce po implantaci, bez vytvoření vazivové mezivrstvy. Hydroxyapatit je v ortopedii používán především k potažení kovových materiálů. Jeho vnitřní struktura je dána spojením systému makro a mikro pórů velikosti od 100 do 1,5 μm umožňující novotvořené kosti prorůst skrz celý materiál. Hydroxyapatit lze použít ve tvaru bločků, cylindrů nebo granulí o různém rozměru (**Großpeter et al, 2004**). Do HA byla inkorporována různá antibiotika (cephalotin, carbenicillin, amoxicilin, cefamandol, tobramycin, gentamicin, vancomycin) a jejich eluce byla též pozitivně hodnocena. HA tak může být používán k prevenci pooperační infekce a k podpoření kostního propojení s kovovým materiálem kloubních náhrad. Studiemi na zvířatech byla prokázána redukce infekčních komplikací při použití osteosyntetického

materiálu potaženého hydroxyapatitem s antibiotiky (cephalotin, carbenicillin, amoxicilin, cefamandol, tobramycin, gentamicin, vancomycin) (**Meani et al, 2007**).

Hydroxyapatitový nosič impregnovaný vancomycinem a fusomycinem stabilně uvolňoval antibiotika až po dobu tří měsíců a to nad MIC pro methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (**Buranapanitkit et al, 2004**). Dle další studie antimykotická aktivita amphotericinu B inkorporovaného do HA trvala nejméně 1 měsíc (**Buranapanitkit et al, 2005**). **Buranapanitkit** uvádí, že HA má mnohem lepší vlastnosti lokálního nosiče antibiotik a antimykotik v porovnání s kostním cementem (**Buranapanitkit et al, 2004, 2005**). Podle **Zenkela**, však není hydroxyapatit jako lokální nosič antibiotik vhodnějším prostředkem k lokální léčbě osteomyelitidy v porovnání s kostním cementem, protože vancomycin uvolňovaný z hydroxyapatitu méně inhiboval růst bakteriálních kolonií, než vancomycin uvolňovaný z polymethylmetakrylátového nosiče (**Zenkel et al, 2007**). Monitoring gentamicinu uvolňovaného z HA nosiče v pokuse *in vitro* prokázal, že veškeré množství gentamicinu (125 mg) bylo uvolněno za 48 hodin (**Laurent et al, 2008**). Máme možnost použít HA buď samotný nebo v kombinaci s ostatními nosiči, např. kombinace HA s kalcium karbonátem (ProOsteon®). Kalcium karbonát zajistí regulaci pH v oblasti defektu a tím podporuje kostní hojení (**Pietrzak a Ronk et al, 2000**).

1.6.3.4 β -trikalcium fosfát

β -trikalcium fosfát (β -Ca₃(PO₄)₂) je povrchově bioaktivní, resorbovatelný, anorganický a krystalický materiál s osteoindukčními a osteokondukčními vlastnostmi. Používá se především pro náhradu kostní tkáně. Materiál připravovaný při vysokých teplotách je chemicky dlouhodobě stálý, snáší opakovanou sterilizaci a má dlouhou expirační dobu (např. 5 let u přípravku Poresorb®). Struktura materiálu je blízká kostní matrix a vykazuje dvě dominantní velikosti pórů. Makropóry (100 μ m) umožňují osídlení celého povrchu kompetentními buňkami a vrůst kostní tkáně do centra defektu. Mikropóry (1-5 μ m) zajišťují jednak rychlou penetraci tělní tekutiny a současně vytvářejí „mikro-drsný“ povrch materiálu podporující adhezi proteinů a buněk. Mezi kostní tkání a implantátem se vytváří pevná chemická vazba bez vytvoření vazivové mezivrstvy (**Lasak, 2009**). Porózní β – trikalcium fosfát nepůsobí cytotoxicky na kmenové buňky kostní dřeně (**Liu et al, 2007**). β – trikalcium fosfát jako lokální nosič antibiotika se může použít buď samotný nebo v kombinaci s jinými materiály. Při použití samotného β – trikalcium fosfátu jako lokálního nosiče antibiotika v kombinaci např. s ciprofloxacinem, dochází k uvolňování antibiotika v místě osteomyelitidy u pokusných zvířat po dobu 6 týdnů. U všech pokusných zvířat bylo zaznamenáno zlepšení

zdravotního stavu do 4 týdnů a po 12 týdnech po implantaci nosiče nedošlo k reinfekci. Navíc podle radiologických známek dochází k dobré integraci nosiče do kostních struktur (**Alvarez** et al, 2008). Jiným experimentem na pokusných zvířatech bylo demonstrováno, že gentamicin se sice z β – trikalcium fosfátu uvolnil kompletně velice brzo (před 3. dnem po implantaci), ale v okolní kosti přetrvával ještě po dobu 10 dnů (**Lambotte** et al, 1998).

1.6.3.5 Kalcium sulfát

Kalcium sulfát, CaSO_4 , představuje základní složku kostní matrix. Patří mezi nejčastěji používané nosiče antibiotik z řady umělých kostních štěpů (Osteoset T®). Kalcium sulfát je lehce resorbovatelný materiál se schopností lokálního nosiče léčiv umožňující formování nové kostní tkáně (**Richelsoph** et al, 2007). Pro lokální léčbu osteomyelitidy se osvědčila kombinace 1g vancomycinu nebo 1,2g gentamicinu na 25g kalcium sulfátu (**Hanessen** et al, 2005). Gentamicin se z kalcium sulfátu po iniciálním větším uvolnění vylučuje postupně po dobu 12 týdnů v množství nad MIC pro běžné patogeny (**Hui** et al, 2008). Kalcium sulfát lze použít k léčbě osteomyelitidy buď samotný nebo v kombinaci s ostatními nosiči. V klinické retrospektivní studii zahrnující 39 pacientů **Chang** porovnal účinnost léčby osteomyelitidy pouhým debridementem infekčního ložiska a debridementem s aplikací kalcium sulfátu se 4% tobramycinem (Osteoset T®). Léčba osteomyelitidy debridementem s aplikací nosiče byla 1,6 x účinnější než léčba pouhým debridementem. V další oddělené studii bylo 28 pacientů s osteomyelitidou vyvolanou *Staphylococcus aureus*. Terapie osteomyelitidy debridementem s aplikací Osteosetu T® byla 1,7 x účinnější v porovnání se samotným debridementem. Rozdíl však nebyl tak signifikantní, jak se předpokládalo a navíc vrůst kosti bylo limitované (**Chang** et al, 2007). Gentamicin v samotném kalcium sulfátu měl cytotoxický účinek ve 2 vzorcích ze 4. Cytotoxicitu lze snížit kombinací kalcium sulfátu např. s hydroxyapatitem (PerOssal®) (**Rauschmann** et al, 2005).

1.6.3.6 Kalcium fosfát

Kalcium fosfát (Calcibon®) je biodegradabilní materiál s osteokonduktivními vlastnostmi. Svým chemickým složením a krystalickou strukturou je podobný minerální části přirozené kosti. K biodegradaci materiálu dochází během kostní remodelace okolní živou kostí působením osteoklastů a osteoblasty se postarají o tvorbu nové kosti. Calcibon® je k dispozici ve 2 formách a to ve formě pasty nebo granulí. Pasta se vytváří před aplikací ze složky tekuté a z prášku. Je vhodná k výplni kostních defektů. Vyznačuje se také svojí pevností proti kompresivním silám, kdy po 6 hodinách od přípravy materiálu in vitro odolává

kompresivní síle přibližně 15 MPa. Po 3 dnech materiál odolá kompresivní síle více než 45 MPa. Calcibon® ve formě granulí má makroporézní povrch velikosti od 150-550 µm, což umožní kostním buňkám migrovat do povrchu granulí a postupně formovat novou kost. (Driessens et al, 2000).

Z kalcium fosfátového nosiče se gentamicin uvolnil do 10 dnů od implantace (Stallmann et al, 2006). Kalcium fosfát s ciprofloxacinem (ENC-41-HP (E41)) použil **Buxton** ve své studii k léčbě indukované osteomyelitidy *Staphylococcus aureus* na zvířecím modelu. Za 14 dnů od implantace nosiče došlo k výraznému zlepšení v léčbě osteomyelitického ložiska s histologickými známkami hojení defektu (**Buxton** et al, 2004). Kalcium fosfát lze použít k léčbě osteomyelitidy buď samotný nebo v kombinaci s ostatními nosiči.

1.6.4 Kompozity

Vlastnosti kompozitu jsou výsledkem kombinace fyzikálně-chemických vlastností jednotlivých materiálů nosiče.

Kromě schopnosti postupně uvolňovat antibiotika mají histochemické vlastnosti nezbytné pro osteoindukci a osteointegraci. Jejich skelet navíc umožňuje využít jejich strukturálních vlastností k zabezpečení fixace implantátu (**Hanssen** et al, 2005).

1.6.4.1 Hydroxyapatit s kolagenem

Hydroxyapatit s kolagenem (Collapat ® II, Healos ®) obsahující syntetické granule HA dávají materiálu osteokonduktivní vlastnosti. Navíc díky malé velikosti částic HA se materiál stává biodegradabilním. Kolagen zde působí především svým hemostatickým účinkem, který zabrání krvácení během pár minut. K biodegradaci tohoto materiálu dochází v průběhu několika týdnů (**Katthagen** et al, 1984). Strukturální vlastnosti HA s kolagenem zlepšil **Wang** přidáním chitosanu, pozitivně nabitého polysacharidu, který má 3D porózní strukturu, zvýhodňující vrůstání buněk do tohoto materiálu (Wang et al, 2008). Během prvních 5 hodin se z nosiče vyloučí 15% antibiotik a poté během dalších 7 dnů uvolní dalších 16% antibiotik (Martins et al, 1998).

1.6.4.2 Hydroxyapatit s trikalciem fosfátem a fibrilárním kolagenem

Hydroxyapatit (60%) s trikalciem fosfátem (40%) (Graftys®) a fibrilárním kolagenem (Collagraft®) má lepší osteoinduktivní vlastnosti v porovnání se samostatnými nosiči.

V experimentu *in vivo* na zvířecím modelu kompozit prokázal nejlepší vlastnosti ve smyslu osteointegrace, kdy po 3 měsících dle RTG kontroly došlo ke kostnímu vhojení z 56% (**Leupold** et al, 2006). Antimikrobiální aktivita gentamicinu po smíchání Collagraftu® měřená *in vitro* byla pod 61%, u vancomycinu nad 73%. Na podkladě laboratorních výsledků Heijink doporučuje užití tohoto kompozitu k léčbě osteomyelitid (**Heijink** et al, 2006).

1.6.4.3 Hydroxyapatit s trikalcium fosfátem a poly(DL-laktidem)

Hydroxyapatit (12%) s trikalcium fosfátem (36%) a poly(DL-laktidem) (PLA) (12%) byl impregnován 40% ciprofloxacinem. Ve studii na pokusných zvířatech byla ověřena účinnost tohoto kompozitu k léčbě osteomyelitidy. Téměř 90% ciprofloxacinu se uvolnilo z nosiče v průběhu 8 týdnů a to v terapeutických dávkách. Rentgenovou analýzou se potvrdila osteoinduktivita a biokompatibilita tohoto materiálu (**Castro** et al, 2005).

1.6.4.4 Nano-HA s PHBV-PEG

Nano-HA s poly (3-hydroxybutyrát-hydroxyvalerát)-polyethylén glykolem (PHBV-PEG) byl v kombinaci s gentamicinem použit **Tang** při experimentu na pokusných zvířatech. Ověřil dostatečnou MIC pro *Staphylococcus aureus* v místě aplikace nosiče i po 8 týdnech od operace (**Tang** et al, 2006).

1.6.4.5 Bioaktivní sklo s polymetylmetakrylátem

Bioaktivní sklo s polymetylmetakrylátem v pokuse *in vitro* uvolňovalo gentamicin ve vysokých dávkách během prvních několika hodin. V dalších týdnech byla eluce byla pomalejší. Porózní struktura tohoto kompozitu umožňuje vrůstání kostní tkáně na povrch a do pórů nosiče (**Arcos** et al, 2001). Tento kompozit umožní lépe kontrolovat uvolňování antibiotik v porovnání se samotným kostním cementem, ale vzhledem k nebiodegradabilitě kostního cementu, je nezbytná jeho následná extrakce.

1.6.4.6 Mezoporózní biosklo s poly(D,L-laktid-ko-glykolidem)

Mezoporózní biosklo (MBG) s poly(D,L-laktid-ko-glykolidem) (PLGA) a s gentamicinem prokázalo v pokuse *in vitro* dobré vlastnosti k jeho použití jako lokálního nosiče antibiotik. Během 1. dne došlo k inciálnímu uvolnění gentamicinu ze 33% a dalších 2 dnech 48%. Poté se gentamicin postupně uvolňoval déle jak 4 týdny (**Li** et al, 2008).

1.6.4.7 A-W GC s bisphenol-alpha-glycidyl methakrylátu

A-W GC v pryskyřičném tmelu složený z bisphenol-alpha-glycidyl methakrylátu (Bis-GMA) a triethylen-glykol dimethakrylátu (TEGDMA). Různé množství prášku A-W GC ovlivňuje regulaci uvolňování léčiv z tohoto bioaktivního nosiče. Se zvyšujícím se množstvím keramického prášku v nosiči jsou antibiotika uvolňována rychleji z důvodu zvětšení objemu pór v kompozitu. V pozdější fázi uvolňování antibiotik klesá, jakmile hydroxyapatit precipituje na povrchu nosiče. V *in vitro* studii se cephalexin kontinuálně uvolňoval déle jak 2 týdny (Otsuka et al, 2001).

1.6.4.8 β -trikalcium fosfát s autologní krví nebo aspirátem kostní dřevě

β -trikalcium fosfát s autologní krví nebo aspirátem kostní dřevě prodlouží dobu průniku gentamicinu z nosiče do okolní tkáně nad 2 týdny (Silverman et al, 2007). β – trikalcium fosfát v kombinaci s trombocytárním koncentrátem zesiluje osteogenní účinek. Navíc takto připravený materiál je v podobě gelovité konzistence, která usnadňuje aplikaci materiálu (Polenik, 2004).

1.6.4.9 Trikalcium fosfát lysin

Trikalcium fosfát lysin (TCPL) je připravován ve formě keramické kapsule obsahující antibiotikum. Experiment **Benghuzziho** potvrzuje snížení výskytu infekce v místě kostního zánětu po implantaci TCPL s tobramycinem. Navíc si TCPL zachovává schopnost osteoindukce po dobu více jak 15-ti týdnů (Benghuzzi et al, 2006).

1.6.4.10 Kalcium fosfát s poly(laktid acid-ko-glykolovou kyselinou)

Kalcium fosfát s poly(laktid acid-ko-glykolovou kyselinou) (PLGA). Díky mechanickým vlastnostem nosiče nedochází k typickému iniciálnímu uvolnění značného množství gentamicinu. Antibiotikum se uvolní jen v 10-30% z celkového množství protože je kompozit tvořen biodegradabilními makrosférami nosiče (Schnieders et al, 2006).

1.6.4.11 Kalcium fosfát s bovinním kolagenem

Kalcium fosfát (Calcibon ®) s bovinním kolagenem s tobramycinem (Targobonem®) byl úspěšně použit k léčbě kostních defektů po debridementu osteomyelitidy u 16 pacientů. U všech pacientů po 1 roce od aplikace kompozitu nebyly shledány žádné známky infekce. Radiograficky byla zaznamenána novotvorba kostní tkáně, ale také nekompletní resorpce nosiče (Meani et al, 2007).

1.6.4.12 Kalcium sulfát s kostním cementem

Kalcium sulfát s kostním cementem poskytuje možnost uvolňování antibiotik ve větším množství oproti samotnému kostnímu cementu. Přidání kalcium sulfátu však způsobí snížení pevnosti proti kompresním a ohybovým silám a pokles pevnosti v tlaku a pružnosti materiálu v porovnání s čistým kostním cementem (**Tuzuner et al, 2007**).

1.6.4.13 Kalcium sulfát s autologním kostním štěpem

Kalcium sulfát s autologním kostním štěpem a tobramycinem byl aplikován do osteomyelitického ložiska při dvoudobém léčebném postupu po extrakci implantovaného kostního cementu s antibiotikem. Po dvou letech od implantace nosiče nedošlo k rekurenci osteomyelitidy. Kalcium sulfát s kostním štěpem byl kompletně inkorporován se schopností plné funkční zátěže u 24-leté pacientky s osteomyelitidou patní kosti (**Papagelopoulos et al, 2006**).

1.6.4.14 Kalcium sulfát s demineralizovanou kostní matrix

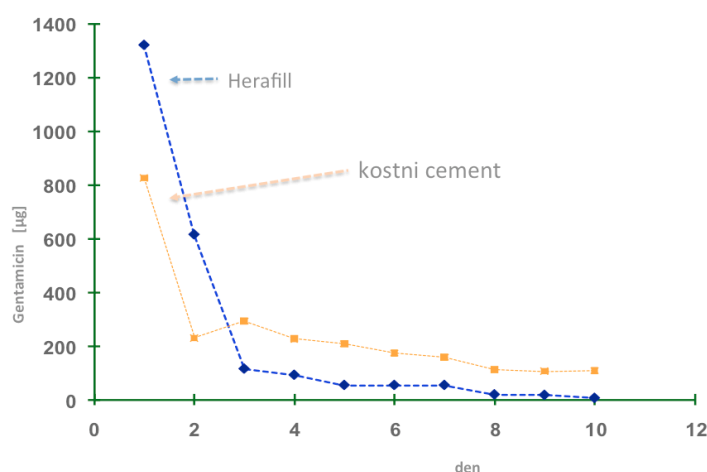
Kalcium sulfát s demineralizovanou kostní matrix a vancomycinem byl použit jako substituce defektu kosti při intra-artikulární zlomenině patní kosti u 33 pacientů. Po 22,4 měsících nebyla u žádného pacienta pozorována osteomyelitida (**Bibbo a Patel, 2006**).

1.6.4.15 Kalcium sulfátem s hydroxyapatitem

Hydroxyapatit s kalcium sulfátem (PerOssal®) má osteoinduktivní, osteokonduktivní a degradabilní vlastnosti. Sádra (48,5%) je resorbovatelná složka mezi jednotlivými zrnky drtě hydroxyapatitu, v případě PerOssalu® nanokrystalického hydroxyapatitu (51,5%). Přibližně po pěti týdnech je nahrazena novotvořenou kostí. Tento materiál má kapilární strukturu, která zajišťuje okamžité prolínání tekutiny. Vancomycin i gentamicin z tohoto nosiče mají prodlouženou dobu eluce o více jak 10 dnů a to v koncentracích nad MIC pro běžné patogeny. Mechanická pevnost PerOssalu je dostatečná pro náhradu defektu spongiózní kosti v místech nezátěžové zóny nebo v kombinaci s osteosyntézou (**Englert et al, 2007**). Ve srovnání se samotným kalcium sulfátem má lepší vlastnosti v resorpci, biokompatibilitě a uvolňování antibiotik (**Rauschmann et al, 2005**). Doporučené množství antibiotik na 5 cylindrických pelet PerOssalu (6x6 mm) je 40 mg gentamicinu, 40 mg tobramycinu, 50 mg vankomycinu, 60 mg rifampicinu. Tento materiál lze kombinovat s autologním kostním štěpem pro zlepšení kostního hojení.

1.6.4.16 Kalcium sulfát s kalcium karbonátem a hydrogenovaným triglyceridem

Kalcium sulfát s kalcium karbonátem, hydrogenovaným triglyceridem a gentamicinem sulfátem (Herafill® beads G) představuje syntetickou náhradu kostní tkáně, kterou lze použít k rekonstrukci defektu kosti a též k léčbě osteomyelitidy. Naše první klinické zkušenosti jsou velmi pozitivní. Jedna kulička 250 mg obsahuje 179 mg kalcium sulfátu (CaSO_4), 45 mg kalcium karbonátu (CaCO_3), 22 mg glycerintripalmitát a 3 mg gentamicin sulfátu (2,5 mg gentamicinu). Toto složení zajišťuje efektivní a bezpečné vylučování. Hladina gentamicinu v plazmě nepřevyšuje 0,2 ng/ml. Na druhou stranu je hladina gentamicinu v sekretu z rány 600 µg/ml (graf 3). Během několika málo měsíců dochází k degradaci materiálu a zároveň je formována nová kostní tkáň. Proces degradace materiálu závisí na velikosti a struktuře defektu, stejně tak jako na fyziologickém stavu operované kosti. Herafill® beads G zajišťuje dostatečnou strukturální stabilitu. Díky sférickému tvaru vytváří velký povrch, který usnadňuje eluci antibiotika (obr. 21). Přítomnost kalcium karbonátu v nosiči navíc zajistí regulaci pH v oblasti defektu a tím podporuje hojení kosti (Pietrzak a Ronk et al, 2000).



graf 3.: Eluční křivka vylučování gentamicinu z Herafillu je z mikrobiologického hlediska velmi pozitivní. Je patrné velké vylučování gentamicinu v prvních třech dnech, poté hladina klesá a po 10 dnech je veškerý gentamicin vyloučen.

Herafill je indikován k rekonstrukci kostního defektu v situaci s infekcí, s kontaminací nebo s vysokým rizikem infekce. Především pro řešení velkých kostních defektů, složitých zlomenin, defektů po odběru štěpů z os. ilium, pseudoartróz, kostních defektů v aloplastice, kostních cyst a benigních nádorů, korekčních osteotomií, artrodéz a řešení defektů při prolongaci kostí (obr. 22a, b, c, 23a, b, c, d, e, 24a, b, c). Je kontraindikován u pacientů s alergií a hyperkalcemií, u pacientů se známou hypersensitivitou k složkám Herafillu a hypersensitivitou k

aminoglycosidovým antibiotikům. Nesmí být užit ke stabilizaci implantátu (jako náhrada strukturálního štěpu) a nemá být aplikován ke kloubnímu povrchu v zátěžové zóně kosti.



obr. 21: Herafill je dodáván v bikonvexních peletách 6mm v průměru. 20 pelet vyplní prostor cca 5 ml.

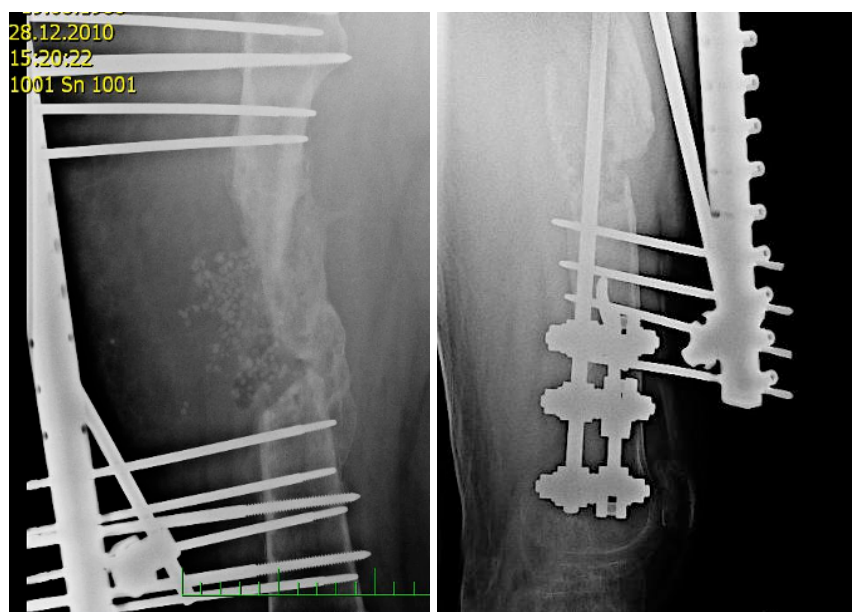


obr. 22a, b, c: Doporučujeme aplikovat Herafil ve směsi se s autospongioplastikou, čímž dosáhneme zlepšení osteoindukčních vlastností.

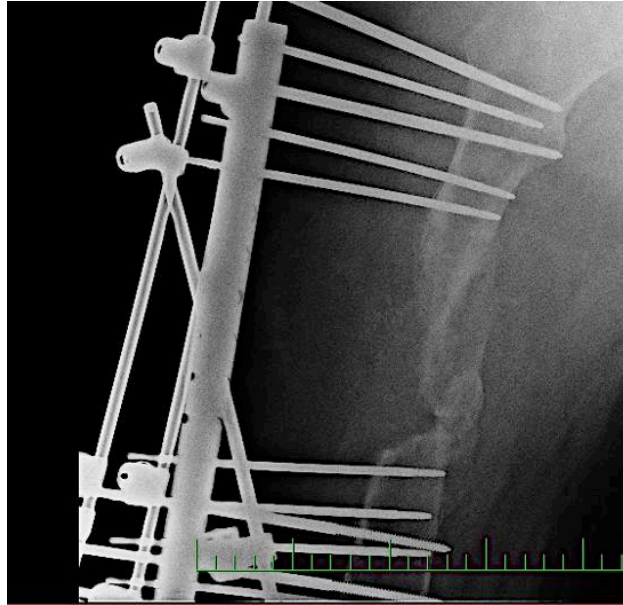


obr. 23a: RTG dokumentace infikovaného pakloub femuru

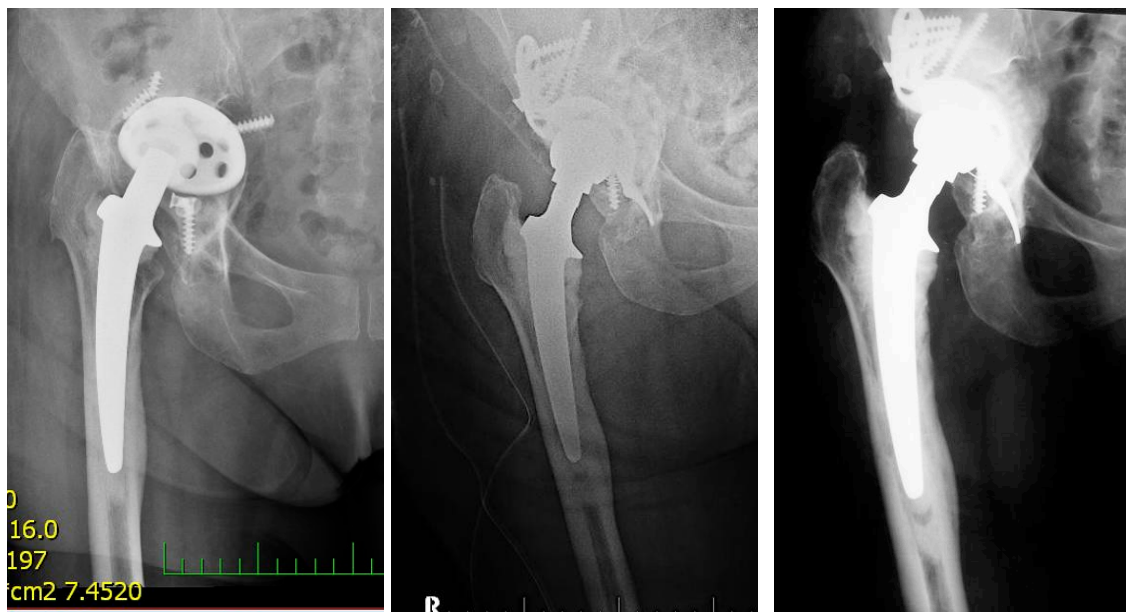
obr. 23b: Pooperační RTG snímek po aplikaci Herafill beads G



obr. 23c, d: RTG snímek měsíc po aplikaci Herafill beads G s patrnou částečnou degradací kuliček



obr. 23e: RTG snímek 2 měsíce po aplikaci Herafill beads G s patrnou resorbí kuliček a počínající novotvorbou kosti.



obr. 24a, b, c: Herafill beads G je užíván i při reimplantaci uvolněné acetabulární komponenty.

a. RTG dokumentace před operací s patrnou migrací jamky do pánve

b. Pooperační snímek s aplikovanou směsí Herafillu a spongioplastiky

c. Přestavěná spongioplastika a herafill po 3 měsících

1.6.5 Kostní štěpy

Spongiozní kostní štěpy jsou buď ve formě autoštěpů, alloštěpů (OSTEOmycin®) či jako xenografty (bovinní spongiózní kost, Bio-Oss®). Jsou tedy nejpřirozenějším materiálem. Jejich výhodou je snadné přijetí štěpu příjemcem, schopnost osteoindukce, osteokonduktivity, osteointegrace a remodelace dle aktuálních místních potřeb operované kosti. V současné době jsou preferovány morselizované (namleté) kostní štěpy, především spongiózní. Problematické jsou masivní kostní štěpy, často užívané v USA, neboť jejich dlouhodobá inkorporace je nepředvídatelná a po letech u nich dochází k resorpci. Kostní štěpy musí být zbaveny fibrózní tkáně, chrupavky, kortikální vrstvy. Zkušenosti ukazují, že použití kostních štěpů bez antibiotik k řešení kostních defektů zvyšuje riziko infekce (**Jackson et al, 2000**). Je proto snaha inkorporovat antibiotikum do kostních štěpů. Můžeme tak kostní štěpy s antibiotiky užít preventivně ke snížení rizika infekce, ale kostní štěpy s antibiotiky mohou také sloužit k léčbě infekce, jako lokální nosič antibiotik.

Kostní štěpy ať ve formě auto či alloštěpů jsou často užívány k vyplnění „mrtvého“ prostoru při reimplantaci. Doplnujeme kostní lůžko abychom zajistili sekundární stabilitu implantátů. Koncepce užití kostních štěpů s antibiotiky spočívá v zajištění lokální hladiny antibiotika do té doby, než dojde k inkorporaci kostních štěpů, jejich vaskularizaci a převzetí odpovědnosti za obranu před infekcí imunitním systémem hostitele (**Hanssen et al, 2005**). Kostní štěpy totiž představují potenciální sekvestr. Je však experimentálně, radiologicky, histologicky i imunochemicky dokázáno, že je možné užít kostní štěpy jako nosiče antibiotik bez poškození jejich inkorporace (**Buttaro et al, 2005**). Riziko přenosu infekce z dárce při užití alloštěpů z kostní banky je stejné jako při rutinním krevním převodu (**Krbec et al, 2003**).

Antibiotika mohou být přidána do morselizovaných kostních štěpů formou prášku, nebo je možno štěpy koupat v roztoku antibiotik. Antibiotika jsou absorbována přímo do povrchu kostních štěpů. Po důkladném promísení kostního štěpu s antibiotiky je doporučeno nechat nosič před implantací 10-15 minut impregnovat přidanými antibiotiky (**Buttaro et al, 2005**). Antibiotika z kostních štěpů mají charakteristickou křivku uvolňování: časně rychlá eluce z nosiče, následována exponenciálním poklesem. Různá antibiotika mají odlišné charakteristiky uvolňování z kostních štěpů. Například aminoglykosidy jsou uvolněny v kompletním množství. Vancomycin a aminoglykosidy se vylučují z kostního štěpu po dobu 5-6 týdnů s téměř stejným elučním profilem (na rozdíl od kostního cementu, kde aminoglykosid je uvolňován mnohem rychleji). Uvolňování beta-laktamů je tak rychlé, že je obtížné odečíst eluční profil antibiotika. Eluční profil ze studií in vitro a in vivo u

aminoglykosidů, vancomycinu, clindamycinu a rifampicinu jsou obdobné. Vylučování antibiotik z kostního štěpu je závislé na koncentraci antibiotika, době trvání impregnace, pH, velikosti namletých částic, kombinaci antibiotik (**Meani et al, 2007**). Chloramfenicol a methicillin v kostním štěpu inhiboval osteogenezi. Tobramycin o koncentraci <200 mg/l neovlivňuje replikaci osteoblastů, avšak koncentrace tobramycinu >400 mg/l omezila osteogenezi. Koncentrace vancomycinu <1000 mg/l a cefazolinu <100 mg/l má minimální nebo žádný efekt na replikaci osteoblastů (**Edin et al, 1996**). Přidáním 500mg vankomycinu k štěpům z hlavice femuru dosáhneme 220x vyšší lokální hodnoty vankomycinu než je MIC a tato hladina nevede ke smrti osteoblastů (**Buttaro et al, 2005**). Histologické vyšetření biopsií kostní tkáně po předchozí aplikaci kostního štěpu s vancomycinem ozřejmilo novou kostní tvorbu podobnou u allograftů bez použití antibiotika (**Edin et al, 1996**). Chinolony mají významný, negativní vliv na hojení zlomenin v dávkách užívaných pro systémovou léčbu. Je tedy třeba se značnou opatrností užívat kombinaci rifampicinu a chinolonů v případech, kdy nám v terapeutickém plánu záleží na regeneraci kosti, jako třeba při užití kostních štěpů a bezcementových implantátů (**Hanssen et al, 2005**).

Při osteomyelitidě se ztrátovým defektem kosti se osvědčila dvoudobá operace, kdy první fáze je debridement kostní a měkké tkáně, následováno po 30-40 dnech druhou fází, tedy augmentací kostními štěpy s antibiotikem.

Dlouhodobý efekt kostní regenerace kostního štěpu s antibiotikem zatím dle dostupné literatury nebyl studován. Doporučená množství antibiotik do kostních štěpů získaných z 1 femorální hlavice k bezpečnému lokálnímu použití jsou: 1000-1500 mg vankomycinu, 800-1200 mg gentamicinu, 1200-1800 mg klindamycinu (**Meani et al 2007**).

Nyní jsou nově dostupné kostní štěpy, které představují novou generaci zpracovaných štěpů strukturální kosti jako allograftu impregnovaného antibiotiky, např. vankomycinem nebo tobramycinem (u OSTEOMycinu V/T®). Tyto štěpy byly vyvinuty Evropskou buněčnou a tkáňovou bankou (ECTB). Mají sloužit k biologické rekonstrukci kostního defektu a k efektivní lokální léčbě nebo prevenci infekce. Odebrané kostní štěpy od dárce jsou zpracovány superkritickou CO₂ technologií, jsou čištěny a dále zpracovávány. Během přípravy těchto štěpů dochází k inaktivaci virů, tuky a buněčné komponenty jsou kompletně odstraněny. Kolagen a osteoinduktivní proteiny jsou v allograftu zachovány. Štěpy jsou sušeny, baleny do dvou obalů a sterilizovány gama zářením minimálně 25 KGy. Impregnace antibiotiky je prováděna speciální technikou, která zajistí distribuci antibiotika skrze celý štěp. Tím je zajištěno, že se antibiotikum uvolňuje ze štěpů dlouhodobě. Mechanické vlastnosti jsou víceméně srovnatelné s živou kostí. Proto dochází bezpečně k inkorporaci štěpu

příjemcem s lokálním antibakteriálním účinkem, kde antibiotika jsou pomalu uvolňována ve vysokých místních koncentracích. (**Winkler et al, 2000.**). Winkler doporučuje používání OSTEOMycinu® nejen k řešení kostních defektů po předchozím debridement, ale také při jednodobé reimplantaci necementovaných náhrad kloubních (**Winkler et al, 2008.**). Obvykle Winkler používá při jednodobé reimplantaci 3 balení OSTEOMycinu V® a 3 balení OSTEOMycinu T® smíchané dohromady s fyziologickým roztokem.

1.7 Antibiotika

Podle všeobecných doporučení by antibakteriální terapie měla být vedena antibiotiky s baktericidním účinkem, spektrem účinnosti proti mikroorganismům adherujícím k povrchům, pomalu rostoucích a produkujících biofilm.

Infekce v ortopedii jsou způsobeny hlavně stafylokoky (*St. aureus*: 33-43%, *St. epidermidis*: 17-21%), dále streptokoky (11-12%), Gram-negativními bakteriemi (5-14%), enterokoky a anaeroby. V 5-13% je infekt způsoben smíšenou flórou (**Meani et al, 2007**). Antibiotikum volíme dle typu nosiče, závažnosti a druhu infekce. Antibiotika jak z biodegradabilních, tak z nedegradabilních nosičů se mohou uvolňovat v koncentracích přesahujících MIC pro nejčastější původce ortopedických infekcí s limitovaným vylučováním do systémové cirkulace bez toxických komplikací. Eluce různých antibiotik z různých nosičů ze studií in vitro a in vivo je typická. Iniciální fáze piku je následována pomalým vylučováním malého množství antibiotik (**Meani et al, 2007**). Ne všechna antibiotika, která se podávají systémově, lze aplikovat lokálně pomocí nosičů. Doba trvání eluce je závislá na fyzikálně-chemických vlastnostech nosiče. Rozhodující jsou farmakodynamické vlastnosti antibiotika (koncentrace v místě aplikace, šířka antimikrobiálního spektra, rezistence, tolerabilita, stabilita vůči teplu, pH, organickým tekutinám, k přítomné nekróze, cizímu tělesu, aj.) a vlastnosti nosiče (porozita, velikost povrchu, počáteční látková koncentrace, termostabilita, možnost smíchání s práškem, manipulace). Samozřejmostí je biotolerance s kostí a měkkými tkáněmi. U kostního cementu se antibiotikum uvolňuje několik let. V moči byl gentamicin měřen ještě 2 roky po operaci (**Meani et al, 2007**).

Aminoglykosidy (gentamicin, tobramycin, arbekacin) jsou lékem volby pro široké antibakteriální spektrum, rozpustnost ve vodě, chemickou a tepelnou stabilitu, biokompatibilitu, nízkou alergenicitu a nízký vývoj rezistentních bakteriálních kmenů během léčby. Nicméně dochází k rozvoji aminoglykosid-rezistentních bakterií. Proto se začínají užívat další antibiotika: vancomycin, clindamycin, kyselina fusidová, daptomycin,

oxazolidinony, fluorochinolony, peptidy, aj. Systémová toxicita gentamicinu uvolňovaného z PMMA nebo kolagenního nosiče byla zaznamenána raritně a to pouze ve dvou publikacích a to u 7 ze 12 pacientů od 1. do 10. dne po operaci a u 10 pacientů došlo k poklesu clearance kreatininu. Sérová koncentrace u netilmycinu a vancomycinu nedosahovaly toxických hodnot (**Swieringa a Tulp**, 2005).

Vancomycin má obdobné fyzikálně-chemické vlastnosti jako aminoglykosidy, avšak jeho účinnost v kostním cementu je limitována polymerizací PMMA a kratší dobou uvolňování (**Chohfi et al**, 1998). Vancomycin v závislosti na teplotě a době působení tepla podléhá termální degradaci za vzniku krystalických degradačních produktů a k poklesu jeho aktivní formy (**Allison et al**, 1999). Tobramycin i ve vysokých koncentracích neovlivní kostní hojení. Stejně tak vankomycin je méně toxický pro osteoblasty než cefazolin nebo aminoglykosidy. Chinolony především v kombinaci s rifampicinem mají významný vliv na hojení zlomenin již v dávkách užívaných pro systémovou léčbu (**Hanssen et al**, 2005). Uvolňování ciprofloxacinu z nosiče je limitováno jeho nízkou rozpustností. Navíc ciprofloxacin aplikovaný podkožně u králíků zhoršoval hojení zlomenin (**Castro et al**, 2005).

Různá antibiotika mají různé eluční charakteristiky. Kupříkladu tobramycin je uvolňován výrazně více než vancomycin. V kalcium fosfátovém nosiči se impregnovaný daptomycin vylučuje rychleji v porovnání s tobramycinem (**Richelsoph et al**, 2007). Betalaktamy (peniciliny, cefalosporiny, imipenemy) se z kostního cementu vylučují rychle v limitovaném čase (48 hod). Rifampicin je nekompatibilní s kostním cementem se ztrátou jeho antimikrobiální účinnosti (**Meani et al**, 2007). Do kostního cementu se doporučuje aplikovat kombinace antibiotik např. gentamicin s vankomycinem. Tato kombinace zabraňuje kolonizaci lépe než firemě užívaný samotný gentamicin (**Gallo et al**, 2005). Dále se doporučuje kombinace gentamicinu s klindamycinem a gentamicinu s kyselinou fusidovou (**Neut et al**, 2005).

1.7.1 Vankomycin a jeho chemická stabilita

K antibiotikům považovaným díky své stabilitě za vhodná k lokálnímu podání patří zejména glykopeptidy, aminoglykosidy, makrolidy a linkosamidy (Randelli et al. 2009).

Vankomycin, jako zástupce glykopeptidové skupiny patří mezi přípravky, které v současnosti patří k základním lékům využívaným v léčbě závažných infekcí vyvolaných methicillin – rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA) a methicillin – rezistentní koaguláty negativní *Staphylococcus* (MRCoNS). Jeho nevýhodou při systémovém podání může být relativně častý výskyt nežádoucích účinků a riziko nefrotoxicity a to zejména v situacích, kde

se aplikují vysoké dávky za účelem dosažení spolehlivé inhibiční koncentrace v místě infekce. (Cunha et al, 2008). Proto optimálně zvolené lokální použití vankomycinu tam, kde je to možné, představuje mimo jiné i epidemiologicky bezpečnější variantu z hlediska rizika navození rezistence na základě nízkých (subinhibičních koncentrací), které nelze vyloučit při systémové, zejména dlouhodobé léčbě (Campoccia et al. 2010).

Podmětem pro vývoj vankomycinu byl právě rozvoj bakteriální rezistence. Vankomycin je glykopeptidové baktericidní antibiotikum izolované z mikrobiálního kmene *Amycolatopsis orientalis*. Od padesátých let dvacátého století se vankomycin používal především k léčbě těžkých infekcí způsobených gram - pozitivními mikroorganismy. Jeho užití vzrostlo celosvětově koncem dvacátého století kvůli nárůstu methicillin/oxacillin rezistentních kmenů *Staphylococcus aureus* (MRSA) a *Staphylococcus epidermidis* (MRSE) (Somerville et al. 1999). Právě z důvodu zvyšujícího se výskytu MRSA u chronicky a vážně nemocných pacientů je vankomycin aplikován stále častěji. To vede ke vzniku kmenů MRSA rezistentních na glykopeptidy (s mnohočetným MRSA fenotypem). Clinical and Laboratory Standards Institute (USA) rozděluje vankomycin-rezistentní MRSA podle minimální inhibiční koncentrace (MIC) na vankomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA, MIC: 4-8 mg/l), heterogenní kmeny VISA (hVISA, MIC: ≥ 4 mg/l) a na vankomycin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (VRSA, MIC: ≥ 16 mg/l) (Appelbaum et al, 2007). VRSA se nejčastěji objevuje u starších pacientů s bércovými vředy anebo dekubity, především obsahují-li vankomycin-rezistentní enterokoky. Tito enterokoky jsou pravděpodobně donory genu *vanA* pro *Staphylococcus aureus*, který je zodpovědný za rezistenci na vankomycin (Appelbaum et al, 2007, Bert et al. et al, 2009, Chang et al, 2003).

Jednou z možných teorií vysvětlující proč dochází k nárůstu VRSA by mohla být tepelná degradace vankomycinu. K tomuto poznatku se přišlo v době, kdy se začala monitorovat sérová hladina vankomycinu především u pacientů se sníženou renální funkcí z důvodu zjištění nefrotoxicity a ototoxicity při jeho systémovém podávání. Zjistilo se, že při teplotě lidského těla dochází k termální degradaci vankomycinu za vzniku krystalických degradačních produktů (CDP-1) a k poklesu aktivní formy vankomycinu (faktoru B). Existují dva izomery tohoto degradačního produktu: CDP-1M (major) a CDP-1m (minor). Oba dva degradační produkty vankomycinu postrádají antibakteriální účinnost v důsledku rozpadu vodíkového můstku v oblasti vazebného místa specifického receptoru vankomycinu pro antigen (Somerville et al. 1999). Zvýšená produkce CDP-1 byla zaznamenána u pacientů s poruchou renálních funkcí z důvodu prodlouženého biologického poločasu antibiotika. Akumulace CDP-1 může vést k toxickému poškození tkání nebo může mít za následek selhání

léčby z důvodu poddávkování vankomycinem. Z pokusů in vitro a in vivo bylo potvrzeno, že degradace vankomycinu na CDP-1 je závislá na teplotě a době působení tepla. Při teplotě 20-25°C in vitro je až 50% celkové hmotnosti vankomycinu konvertováno na CDP-1 za 16 hodin a 90% je konvertováno na CDP-1 za 40 hodin. Také kyselé pH (4,1 - 4,2) přispívá ke tvorbě CDP-1. Eliminační poločas vankomycinu u zdravého dospělého člověka je 5-11 hodin, zatímco u pacientů se sníženou renální funkcí je eliminační poločas vancomycinu 5 dnů a více. Farmakokinetika CDP-1M a CDP-1m zatím nebyla dle dostupné literatury studována. Jejich poločas a eliminační cesty jsou zatím neznámé (**Somerville** et al, 1999).

Experimentální část

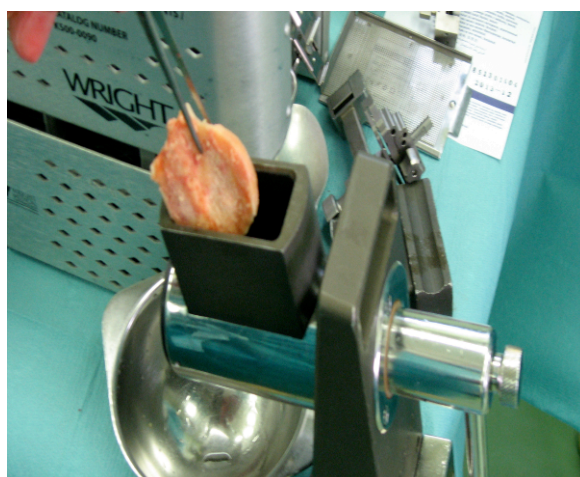
2. Metodika

Pro experiment *in vitro* jsme zvolili jako lokální nosič antibiotik morselizované (namleté) spongiózní kostní štěpy pro jejich vhodné vlastnosti a dostupnost. K impregnaci kostních štěpů jsme vybrali vankomycin (Edicin®), který je ve formě prášku. Toto antibiotikum splňuje dle dostupné literatury podmínky pro vhodnost k jeho použití při místní léčbě infekcí pohybového aparátu pomocí lokálních nosičů antibiotik.

Za sterilních podmínek jsme připravili dvacet vzorků, tedy dvacet zkumavek obsahující kostní štěp s vankomycinem a fosfátový pufrovací roztok.

Kostní štěpy jsme získali z hlavic kostí stehenních od pacientů, u kterých byla provedena náhrada kyčelního kloubu s jejich písemným souhlasem. Kostní štěpy získané během operace byly na operačním sále zbaveny fibrózní tkáně, chrupavky a kortikální vrstvy. Takto upravenou spongiózní kost jsme namleli standardním kostním mlýnkem (ProSpon, otvor struhadla 4,5 mm) (obr. 25a, b, c, d).

Namleté kostní štěpy jsme impregnovali po důsledném promísení prášku vankomycinu na 15 minut v poměru 10 g kostního štěpu a 0,1 g Edicinu®. Tento poměr kostního štěpu a Edicinu® jsme zvolili pro minimalizaci chyby během měření při stanovování koncentrací uvolněného vankomycinu. K tomuto poznatku jsme došli na podkladě předchozích měření, kdy pokaždé byly vzorky připraveny ve stejném poměru, avšak o různé hmotnosti nosiče a antibiotika. Hodnotili jsme hladinu antibiotika uvolněného z kostního štěpu do okolního pufru s očekávanou koncentrací antibiotika. Nejpřesnější hodnoty, jak je zmíněno výše, vycházely u přípravy vzorků z 10 g nosiče a 0,1 g antibiotika. Hmotnost kostních štěpů a antibiotika jsme vážili analytickými laboratorními vahami.





obr. 25a: spongiózní kost připravená k dalšímu zpracování

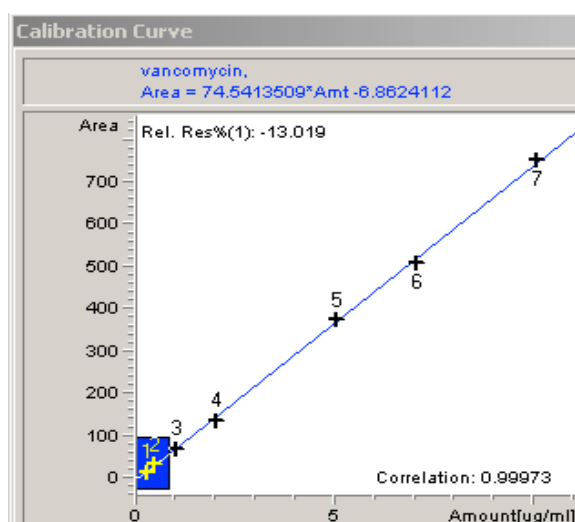
*obr. 25b: vytvoření morselizovaných spongiózních kostních štěpů namletím kosti
kostním mlýnkem ProSpon, otvor struhadla 4,5 mm*

obr. 25c: aplikace prášku vankomycinu do kostních štěpů

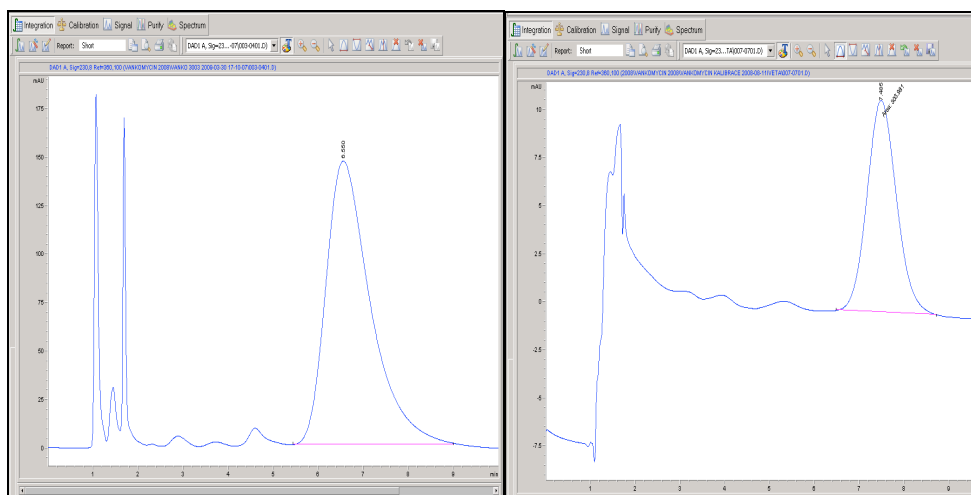
*obr.: 25d: důkladné promíchání namletých kostních štěpů s práškem vankomycinu s 15
minutovou impregnací*

Po impregnaci kostních štěpů s Edicinem® jsme odebrali dvacet vzorků nosiče o hmotnosti 1 g. Aplikovali jsme je jednotlivě do sterilních čtverců, které jsme pevně utěsnili a vložili do 50 ml zkumavek, do kterých jsme pipetou aplikovali fosfátový pufr (pH 7,4) o objemu 20 ml/1 zkumavku, uzavřeli je a vložili do termostatu nastaveného na teplotu 37 °C. V daných intervalech po dobu 16 dnů jsme za sterilních podmínek vždy odebrali po předchozím jemném ručním promíchání z každé zkumavky 100 µl vzorku pufru a doplnili jsme odebraný pufr stejným množstvím novým pufrovací roztokem. Postup, kdy vždy doplňujeme malé množství odebraného pufru a neměníme celý objem pufrovacího roztoku ve zkumavce, jsme zvolili proto, že dle našeho názoru tento způsob monitorace více odpovídá prostředí v organizmu.

Z odebraných vzorků pufru byly postupně měřeny koncentrace uvolněného vankomycinu z kostních štěpů. Pro monitorování hladiny vankomycinu v mg/l jsme použili vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC) na přístroji Agilent 1200 s DAD detektorem (Agilent Technologies, USA) (obr. 26). Stanovení bylo prováděno při laboratorní teplotě (21 °C). Použili jsme kolonu s reverzní fází (Purospher RP-18e, 125 x 3,5 mm, 5 µm, Merck). Mobilní fáze byla tvořena směsí acetonitril-voda-kys. fosforečná (8,5:91,5:0,125, v/v/v). pH bylo upraveno na hodnotu 2,8 triethylaminem. Průtok mobilní fáze byl 0,5 ml/min a detekce byla prováděna při 230 nm. Doba analýzy se pohybovala okolo 10 minut. Veškeré použité chemikálie byly HPLC kvality. Metoda byla nejprve validována pro měření exaktní formy vankomycinu z fosfátového pufru.



obr. 26a: Kalibrace vankomycinu byla lineární v celém kalibračním rozsahu s variačním koeficientem 0,99973



obr. 26b: Analýza vzorku-na obrázku je znázorněna analýza vankomycinu uvolněného z kostního štěpu. Z obrázku je zřejmé, že v retenčním čase 6, 5 min. nedocházelo k interferenci s žádným jiným analytem.

obr. 26c: Analýza kalibrátoru-na obrázku je vidět analýza kalibračního vzorku

Výsledky byly statisticky zpracovány za pomoci programu Statistica 6.0. Statistické zpracování výsledků je znázorněno jako průměr a směrodatná odchylka z dvaceti nezávislých měření. Pomocí T - testu jsme porovnávali významnost rozdílu koncentrace mezi jednotlivými časovými intervaly.

3. Výsledky

Již při prvním měření, tedy po první hodině od aplikace nosiče do pufovacího roztoku, jsme zaznamenali hladiny vankomycinu vysoce přesahující MIC pro VRSA, kdy se uvolnilo cca 33 % impregnovaného vankomycinu z celkového množství. Průměrná koncentrace uvolněného vankomycinu byla 165 mg/l.

Poté byla rychlost uvolňování antibiotika z nosiče od 1. do 4. hodiny pomalejší, ale podíl uvolněného vankomycinu v daném intervalu byl téměř stejný. Od 5. hodiny po aplikaci nosiče se rychlost uvolňování antibiotika postupně zpomalovala. Po 12 hodinách od implantace jsme naměřili průměrné koncentrace uvolněného vankomycinu 420,98 mg/l, což odpovídá zhruba 84 % z nejvýše možné dosažitelné koncentrace vankomycinu v jednom vzorku.

Maximální průměrné koncentrace uvolněného vankomycinu a zároveň jeho veškeré množství v okolním pufru jsme naměřili mezi 2.-4. dnem, kdy průměrná hladina antibiotika byla téměř 500 mg/l (tab. 1). Koncentraci lze přitom v tomto časovém intervalu považovat za ustálenou, neboť mezi oběma hodnotami nebyl statisticky významný rozdíl ($p > 0,005$).

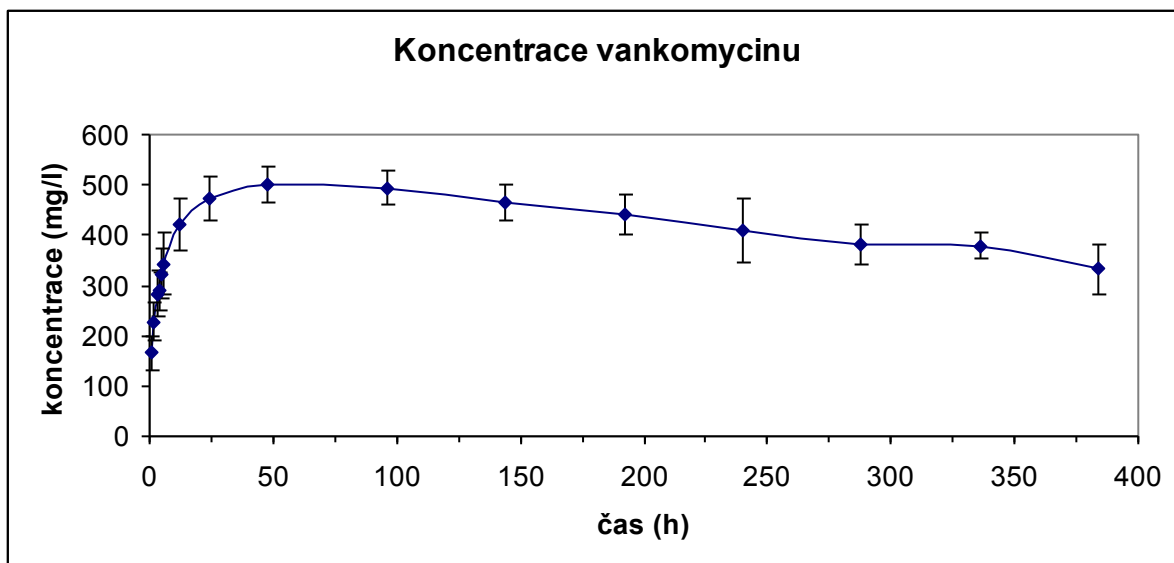
Po dosažení maximální průměrné koncentrace vankomycinu (2.-4. den) jsme zaznamenali velmi pozvolný pokles koncentrací uvolněného antibiotika do okolního pufru až do konce doby měření, tj. do 16. dne. Průměrná koncentrace vankomycinu ve fosfátovém pufru z posledního měření byla 332,3 mg/l. Tato hladina stále převyšuje MIC pro VRSA.

Jednotlivé průměrné koncentrace vankomycinu v mg/l (Mean), síla T – testu (T) a signifikace (významnost) (p value) mezi časovými intervaly jsou zaznamenány v tab. 1. Grafické znázornění dynamiky uvolňování vankomycinu z kostních štěpů do okolního pufovacího roztoku v jeho průměrných koncentracích je vyobrazeno v grafu 4.

Čas (h)	Počet vzorků (N)	Průměr $\bar{X} \pm SD$	Rozpětí	T test	p value
1	20	165,1 ± 34,6	116,6 – 265,3		
				8,532	0,000
2	20	228,3 ± 38,1	185,3 – 311,7		
				8,059	0,000
3	20	283,7 ± 44,6	211,3 – 360,5	0,479	0,637

4	20	289,3 ± 38,4	238,6 – 362,8		
				2,621	0,017
5	20	323,5 ± 50,5	250,6 – 419,6		
				4,510	0,000
6	20	343,2 ± 60,5	263,2 – 458,8		
				27,472	0,000
12	20	420,9 ± 53,1	340,1 – 524,6		
				13,866	0,000
24	20	472,9 ± 43,8	412,4 – 563,6		
				4,602	0,000
48	20	499,7 ± 36,2	456,7 – 571,2		
				0,987	0,336
96	20	494,6 ± 31,9	446,3 – 537,1		
				6,439	0,000
144	20	463,8 ± 35,9	403,3 – 533,9		
				1,905	0,072
192	20	441,6 ± 40,3	358,0 – 538,3		
				3,067	0,006
240	20	401,2 ± 61,8	240,7 – 456,5		
				1,434	0,167
288	20	380,4 ± 40,5	320,2 – 436,4		
				0,252	0,803
336	20	377,8 ± 25,7	322,9 – 427,1		
				4,209	0,000
384	20	332,3 ± 48,8	227,5 – 405,7		

tab. 1: Počet vzorků (N), průměrné koncentrace v mg/l (Mean), síla T – testu (T) a signifikace (p value) mezi časovými intervaly



graf 4: Dynamika uvolňování vankomycinu z kostních štěpů v průměrných koncentracích z 20 nezávislých měření

4. Diskuze

Infekce pohybového aparátu je v dnešní době stále velmi diskutované téma, nejen mezi ortopedy a traumatology. Závažný průběh osteomyelitidy má nejen zdravotní dopad na pacienta, ale tento problém získává také ekonomický a sociální rozměr.

Osteomyelitidy mají typický průběh s častým přechodem do chronicity a vznikem bakteriálních rezistencí k běžně používaným antibiotikům. Svá specifika mají infekce kostní a měkčotkáňové kolem kloubních náhrad, které se vyznačují tvorbou biofilmu. Biofilm brání průniku antibiotik k bakteriím už i v tak těžko přístupném prostředí pro léčiva. Terapie akutní i chronické osteomyelitidy vyžaduje multidisciplinární přístup, který mimo jiné zahrnuje aplikaci antibiotik ve speciálních režimech, jejichž optimalizace je stále předmětem zájmu a diskuzí.

Základním předpokladem úspěšné antibiotické terapie je koncentrace antibiotik, která je schopna inhibovat etiologické agens v místě infekce. V případě osteomyelitidy není vždy jednoduché tuto podmínku splnit. Řada antibiotik má při celkovém podání velmi omezený průnik do kostní tkáně, beta-laktamová antibiotika například pouhých 10 -20 % sérových koncentrací (**Fraimow et al, 2009**). V případě výskytu snížené citlivosti mikroorganismu, či jednoznačné rezistence k podanému antibiotiku se pak pravděpodobnost selhání léčby dále zvyšuje. Navíc původce se ne vždy podaří laboratorně prokázat a empirické použití antibiotik vychází z předpokladu, že nejpravděpodobnějším vyvolavatelem je *Staphylococcus aureus*. (**Fraimow et al, 2009**). Pravděpodobnost výskytu MRSA regionálně kolísá, v případě neznalosti původce konkrétní infekce, musí volba protistafylokových antibiotik také vycházet z lokální epidemiologické situace. Vzhledem k tomu, že tato infekce vyžaduje podání maximálních dávek, po dobu minimálně jednoho měsíce, pravděpodobnost výskytu nežádoucích účinků a toxického poškození narůstá (**Faden a Faden et al, 2009**). Lokální aplikace antibiotik pomocí nosičů, může v určitých situacích kompenzovat limity systémového podání a zkrátit celkovou systémovou léčbu. Navíc vysoká koncentrace antibiotika po dobu dostatečně dlouhou je cenná z hlediska prevence vzniku bakteriální rezistence. Lokální nosiče vyplní prostor po odstranění nekrotických tkání a většina z nich usnadní hojení kostního defektu.

K dispozici je celá řada různých druhů lokálních nosičů antibiotik používaných a použitelných v ortopedii a traumatologii. U větší části nosičů především složených z keramiky, přirozených polymerů, kostního cementu a kostních štěpů byly provedeny klinické studie na pacientech. Ostatní nosiče byly ověřeny zatím studiemi *in vitro* nebo *in vivo*

na pokusných zvířatech, především u syntetických polymerů a kompozitů. Jednotlivé nosiče se liší svým složením, původem, schopností biodegradace a samozřejmě elučními vlastnostmi pro antibiotika. Volba nejvíce vyhovujícího lokálního nosiče by měla být zhodnocena na základě způsobu uvolňování antibiotika, typu a farmakokinetiky antibiotika, které můžeme použít. Dále podle možnosti aplikace nosiče jako výplně nebo potažení, možnosti kombinace nosičů s vlastnostmi osteokonduktivity a osteoinduktivity a podle užití nosiče k profylaxi nebo k léčbě. Samozřejmě je nutné zvážit i nevýhody daného nosiče (Meani et al, 2007).

V dnešní době se nejčastěji používají k lokální léčbě osteomyelitidy tyto lokální nosiče antibiotik: kostní cement, kostní štěpy, kolagen, kalcium sulfát a demineralizovaná kostní matrix. Jejich jednotlivé vlastnosti jsou vyobrazeny v tabulce č. 2.

	PMMA	Kostní štěpy	Kolagen	Kalcium sulfát	Demineralizovaná kostní matrix
Biodegradace	Nebiodegradabilní	Biodegradabilní	Biodegradabilní	Biodegradabilní	Biodegradabilní
Typ antibiotika	Aminoglycosidy, glycopeptidy, ostatní	Gentamicin, vancomycin	Gentamicin	Tobramycin	Teicoplanin
Farmakokinetika	Pomalá, dlouhodobá eluce	Rychlá eluce	Rychlá eluce	Pomalá eluce	Rychlá eluce
Výplň	Ano	Ano	Ne	Ano	Ne
Osteoindukce	Ne	Ano	-	Ne	Ano
Osteokondukce	Ne	Ano	-	Ano	Ano
Profylaxe	Ano	Ano	Ano	-	Ano
Léčba	Ano	Ano	Ano	Ano	Ano
Nevýhody	Lomivost cementu, neresorbovatelnost	Limitované použití, cena, virová kontaminace	Málo klinických studií, cena, rezistentní kmeny	Dlouhá doba resorbce	Nízká konzistence materiálu, cena

tab. 2: Shrnutí vlastností nejčastěji používaných lokálních nosičů antibiotik.

Aminoglykosidy = gentamicin, tobramycin, amikacin, ...

Glykopeptidy = vancomycin, teicoplanin

Ostatní = clindamycin, erythromycin, colostin, imipenem, meropenem, ...

Převzato z Infection and Local Treatment in Orthopedic Surgery, Meani et al, 2007.

V posledních letech se vývoj lokálních nosičů antibiotik v ortopedii a traumatologii zaměřuje také na nosiče, které slouží jako náhrada postižené tkáně, především kostní. Jejich výhodou je nejen přirozenější řešení defektu kosti, ale také se vyznačují schopností biodegradace, případně remodelace a tím je umožněna přestavba nové kostní hmoty bez dalšího chirurgického zásahu. Různé typy těchto lokálních nosičů mají další specifické vlastnosti, které umožňují volbu materiálu podle individuálních potřeb dané lokality v místě probíhající infekce pohybového aparátu. Např. materiály označované jako keramika se vyznačují osteokonduktivními vlastnostmi. Jednotlivé charakteristiky u vybraných druhů bezpečných materiálů sloužících jako náhrada kosti použitelné i jako lokální nosič antibiotik jsou vyobrazeny v tabulce č. 3.

Typ	Mechanické vlastnosti	Konduktivní potenciál	Induktivní potenciál	Osteogenetický potenciál	Dostupnost	Problém s extrakcí
Autograft Spongiózní k.	+	++++	++++	++++	++	+ - +++
Autograft Kortikální k.	++++	++++	++	++	++	+ - +++
Allograft	+++	++++		++	+++	0
BMP	+	0	+++(+)	++	++++	0
DBM	++	++	+++	0	++++	0
HA	+++	++++	0	0	++++	0
Koralit	+++	++++	0	0	++++	0
Ca-fosfát	+++	++++	0	0	++++	0
Ca-sulfát	+++	++++	0	0	++++	0
Biosklo	+++	++++	0	0	++++	0
Biopolymery	+++	++++	0	0	++++	0

tab.3: Vybrané charakteristiky u bezpečných materiálů sloužících jako náhrada kosti

BMP: kostní morfogenetický protein, DBM: demineralizovaná kostní matrix,

HA: hydroxiapatit

převzato z Structure, mode of action, and field of application of modern bone substitution and bone regeneration materials, Bösebeck H., Bühner H.

Nejrozšířeněji používaný lokální nosič antibiotik, především určený k fixaci kloubních náhrad, je polymethylmetakrylát. Kostní cement dokáže uvolňovat antibiotika dlouhou dobu v dostatečně vysokých lokálních hladinách. Antibiotikum se však z kostního cementu může

uvolňovat i řadu let při vzniku prasklin (**Posela** et al, 1998). Takovýto materiál tak může představovat ideální prostředí pro rozvoj rezistentních bakteriálních kmenů v porovnání s biodegradabilními nosiči, které uvolní antibiotika kompletně za mnohem kratší dobu. Navíc u kostního cementu je nutná po určité době jeho extrakce. Biodegradabilní nosiče nevyžadují jejich extrakci ve druhé době. Kostní cement má své významné místo při řešení infekcí kloubních náhrad dvoudobou reimplantací, kde je využívána především mechanická pevnost polymetylmakrylátu. Kostní cement s antibiotikem je také vhodným materiálem k potažení osteosyntetického materiálu, např. intramedulárního hřebu. Takovýto materiál nabízí velkou mechanickou pevnost s dlouhodobým uvolňováním antibiotik ve vysokých hladinách (**Meani** et al, 2007). Značná mechanická pevnost, dokonce až třikrát větší než u kostního cementu, byla dosažena po určitou dobu u kompozitu složeného z apatit-wollastonitového keramického skla s pryskyřičným tmelem, který je na rozdíl od kostního cementu biodegradabilní (**Gerhart** et al, 1993). Ostatní keramické nosiče založené na bázi vápníku mají sice nižší mechanickou pevnost z důvodu jejich porózní struktury (**Meani** et al, 2007), ale nabízejí značnou bioaktivitu a osteokonduktivitu, především u hydroxyapatitu.

Kostní štěpy s antibiotiky jsou také často používanými nosiči. V USA je prováděno ročně 600 000 aplikací kostních štěpů. Jsou přirozenou tkání organismu s velmi dobrými vlastnostmi. V porovnání např. se syntetickými polymery jsou ale antibiotika z kostních štěpů uvolňována rychleji. Prodloužit dobu uvolňování antibiotik u kostních štěpů se podařilo speciální průmyslovou úpravou allograftu (OSTEOmycin V/T®), kdy se antibiotika vážou na povrch nosiče skrz celou šířku materiálu (**Winkler** et al, 2000).

Současný výzkum se také zaměřuje na syntetické polymery jako např. polylaktid-polyglykolid, u kterého byla zaznamenána prodloužená doba uvolňování antibiotik ve vysokých místních koncentracích. Výhodou syntetických polymerů je jednodušší kontrola vylučování antibiotik a možnost snadněji modulovat další vlastnosti, jako např. ovlivnění kostní regenerace za pomoci růstových faktorů (**Jahoda** et al, 2008). Kopolymery hlavně u polylaktidu s antibiotiky ze studií in vitro ukazují slibné výsledky vylučování antibiotik z absorbovatelných mikrosfér (**Garvin** et al, 2005). Navíc SR-Polylactid-glycolidový (80/20) hřeb prokázal vhodné vlastnosti k fixaci spongiózní kosti po osteotomii femuru na zvířecím modelu (**Mäkelä** et al, 2008).

Slibnými lokálními nosiči antibiotik v ortopedii se jeví být kompozity, jako např. hydroxyapatit s tricalcium fosfátem a polylaktidem. Kombinace materiálů spojuje vlastnosti kontrolovaného uvolňování antibiotik, u výše zmíněného kompozitu až po dobu osmi týdnů (**Castro** et al, 2005), s dostatečnou mechanickou pevností, biodegradabilitou a s vlastnostmi

nezbytné pro osteokondukci a osteoindukci. Osteoinduktivního účinku může být dosaženo vytvořením kompozitu obsahujícího např. demineralizovanou kostní matrix.

Dalšími možnosmi v lokální léčbě osteomyelitid, které jsou ve fázi výzkumu jsou např. kovalentní vazba vankomycinu, stříbro, peptid lidský laktoferin 1 (hLF1-11). Kovalentní vazba vancomycinu s kovem (titanem) má efektivní baktericidní aktivitu. Tato technologie je slibná pro výrobu implantátů k prevenci nebo léčbu infekcí spojené s kloubní náhradou. Stříbro je známé svými antibakteriálními vlastnostmi také proti multi-rezistentním bakteriím, MRSE a MRSA bez toxicity na kostní buňky. Stříbro lze také použít jako nástřík kloubních náhrad (Silver-coated Tumorendoprothesen, vyráběné firmou implantcast GmbH) k prevenci kostních infekcí. Systémová toxicita stříbra po aplikaci těchto náhrad nebyla na zvířecím modelu shledána (**Meani** et al, 2007). Peptid lidský laktoferrin 1-11 (hLF1-11) inkorporovaný do kalcium fosfátového nosiče prokázal srovnatelnou účinnost v léčbě osteomyelitidy vyvolanou MRSA ve srovnání s gentamicinem v experimentu na zvířatech (**Faber** et al, 2005).

Při léčbě kostních infekcí lokálními nosiči antibiotik se samozřejmě snažíme vybrat antibiotika, pokud je to možné, dle citlivosti a podle vybraného druhu lokálního nosiče. Obecně lepším lokálním nosičem antibiotik bude materiál biodegradabilní, dostatečně pevný, osteokonduktivní a osteoinduktivní s prodlouženou dobou vylučování antibiotik. Největší část těchto vlastností je splněno u tzv. vícenásobných kompozitů. Kompozity se proto zdají být velmi slibnými lokálními nosiči antibiotik, na jejichž rozsáhlejší výsledky z klinických zkoušek si ještě musíme počkat.

Je však důležité si uvědomit, že použití i ostatních nosičů antibiotik může být z různých hledisek výhodné. Z klinických studií prokázaly velmi slušné výsledky i u reimplantacích při řešení infekcí kloubních náhrad také kostní štěpy, především speciálně upravené allografty. Tyto kostní štěpy představují přirozený materiál organismu a tudíž „lidské tělo ví, jak s tímto materiálem nakládat“.

Aplikace lokálních nosičů při léčbě infekcí pohybového ústrojí má samozřejmě i svá úskalí. Problémem v dnešní době je především cena, dále způsob a rychlost impregnace antibiotikem, biokompatibilita a spektrum citlivosti užitého antibiotika.

Pro náš experiment *in vitro* jsme zvolili kostní štěpy pro jejich vhodné vlastnosti jako je biokompatibilita, schopnost osteoindukce, osteointegrace a remodelace dle aktuálních místních potřeb operované kosti postižené infektem a také pro jejich relativně snadnou dostupnost, cenu a všeobecně pozitivní zkušenosti uváděné jak v literatuře tak na našem pracovišti (**Buttaro** et al, 2003, 2005a, 2005b, 2007, **Jahoda** et al, 2008b, **Winkler** et al, 2000, 2006, 2008, **Witso** et al, 1999, 2000, 2005).

Z antibiotik jsme vybrali vankomycin, neboť se cenově i vlastnostmi zdá být nejvýhodnějším antibiotikem pro léčbu infekcí vyvolaných multirezistentními gram - pozitivními bakteriemi, ze kterých se stává nový a závažný problémem v septické ortopedii. Navíc vankomycin v místní koncentraci až do 1000 mg/l nemá žádný nebo má minimální efekt na replikaci osteoblastů (**Edin** et al, 1996). Vankomycin patří svou účinností k vysoce spolehlivým přípravkům. O tom svědčí jeho dlouhá, více než šedesátiletá historie. Další perspektivy však přináší nové generace glykopeptidů, například telavancin, který je derivátem vankomycinu a představuje další rozšíření terapeutického potenciálu celé skupiny zejména díky vylepšeným farmakologickým vlastnostem a dvojímu mechanismu účinku (**Barcia-Macay** et al, 2008).

Koncentraci 1 g vankomycinu na 100 g kostního štěpu jsme zvolili na podkladě předchozích studií zabývajících se touto tematikou. Např. Buttaro doporučuje 1 g vankomycinu na 1 femorální hlavici (**Buttaro** et al, 2005). V jiném experimentu použil 1 g vankomycinu na 300 mg štěpu (**Buttaro** et al, 2004). Tato koncentrace antibiotika je však zbytečně příliš vysoká.

Metoda HPLC ke stanovení koncentrací antibiotika v pufovacím roztoku byla zvolena pro její vysokou specifitu a senzitivitu (**Dorothy** et al, 1998) a lepší dostupnost oproti jiným metodám, např. imunochemickým, které byly použity v experimentech jiných autorů.

Množství odebíraného vzorku pufru (100 μ l) ke stanovení koncentrace uvolněného vankomycinu v daných intervalech jsme zvolili proto, že tento způsob odběru více odpovídá modelu organismu v porovnání s odběrem celého pufru ze vzorku. Tento způsob odběru vzorku pufru navíc odhalil i dlouhodobější změny v koncentracích vankomycinu vyloučeného z kostních štěpů do pufovacího roztoku ve zkumavce, která takto představovala v podstatě jen částečně propustný prostor.

Podobnou práci, zabývající se uvolňováním vankomycinu z kostních štěpů bez speciální průmyslové úpravy je např. práce **Witsoho** a **Buttara**. **Witso** ve svém *in vitro* pokusu uvádí nejvyšší rychlost nárůstu koncentrace vankomycinu a zároveň maximální hladiny tohoto antibiotika v prvním měření, tj. po prvním dnu od aplikace nosiče. Poté

popisuje postupný pokles koncentrací měřeného antibiotika. Po dvou týdnech uvádí hladinu vankomycinu už pod MIC (**Witso** et al, 1999). V jiné studii provedené *in vivo* **Buttarem** byla stanovována koncentrace vankomycinu z drenážní tekutiny. Maximální hladiny antibiotika byly naměřeny po 5-9 hodinách od aplikace kostního štěpu s antibiotikem (**Buttaro** et al, 2005).

Witso v jeho experimentu použil morselizovaný spongiózní kostní štěp s vankomycinem také o hmotnosti 1 g aplikovaného do zkumavky s pufrovací roztokem. V daných intervalech (první odběr po prvním dnu, další ve dvoudenním rozmezí) odebíral veškeré množství pufru, ze kterého měřil koncentraci antibiotika imunochemickou metodou (bioassay). Odebraný pufr vždy nahradil novým pufrovací roztokem o stejném množství. Právě rozdíl v objemech odebíraného pufru a v odlišných intervalech měření u našeho experimentu a u pokusu provedeném **Witsem** má s největší pravděpodobností za následek odlišné charakteristiky dynamiky uvolňování vankomycinu z kostních štěpů. Odlišné metody pro stanovení hladiny vankomycinu (HPLC a bioassay) by neměly mít vliv na rozdílné výsledky měření.

Rozdílnost výsledků našeho experimentu proti studii provedené *in vivo* **Buttarem** se dalo předpokládat. Množství uvolněného vankomycinu bylo v jeho pokuse měřeno z drenážní tekutiny, tj. ne z uzavřeného kompartmentu jako v případě *in vitro* studií. Navíc **Buttaro** aplikoval vankomycin do osteomyelitického ložiska, kde se předpokládá spotřeba antibiotika na likvidaci bakteriálního původce infekčního onemocnění.

Zásadní je však shoda **Buttarových** a **Witsových** výsledků s našimi v tom, že největší část antibiotika se uvolnila během prvních měření. Z toho vyplývá, že v situaci *in vivo* jsou nejvyšší hladiny vankomycinu dosaženy v prvních hodinách, poté se rychlost vylučování antibiotika zpomaluje. Podle naší studie by se ale i v 16. dnu pohybovaly hladiny vankomycinu nad MIC pro VRSA.

Jak je zmíněno výše, vankomycin je nejrychleji uvolňován z kostních štěpů v průběhu prvních hodin. K tomuto jevu s největší pravděpodobností dochází proto, že toto antibiotikum je při přípravě absorbováno především do povrchu nosiče. Také doba impregnace (15 min.) může být krátká.

Vzhledem k tomu, že jsme odebírali minimální množství pufrovacího roztoku a tudíž docházelo k minimálnímu ředění během odběru pufru ze vzorků, tak jsme zaznamenali takový pokles hladin vankomycinu po dosažení jeho maximálních hodnot, který by teoreticky bez dalších vnějších vlivů neměl nastat. Jedním z vysvětlení, proč se uvolněný vankomycin do okolního pufrovacího roztoku ztrácí by mohla být tepelná degradace vankomycinu na

krystalické degradační produkty (CDP-1 M/m), jejichž množství se zvyšuje a koncentrace jeho aktivní formy (faktoru B) se snižuje. K termální degradaci vankomycinu dochází totiž již při teplotě nad 20 °C a degradační produkty vankomycinu postrádají antibakteriální účinnost (**Somerville et al, 1999**).

V našem experimentu jsme však stanovovali pouze exaktní vankomycin, bez rozlišení jeho aktivní formy a degradačních produktů. Navíc pokud bychom zaznamenali pokles aktivní formy vankomycinu, tak by podle studie provedené **Somervilem** byla koncentrace antibiotika ve druhém dni přibližně 45 mg/l. Tato koncentrace by však ještě převyšovala MIC pro VRSA. Zůstává tedy otázkou proč od 2.-4. dne do konce doby měření dochází k poklesu koncentrace exaktního vankomycinu. Naskytá se několik hypotéz. Vankomycin může být spotřebováván jako substrát plísněmi či bakteriemi, které mohly kontaminovat vzorky. A to i přesto, že odběr, zpracování a měření probíhalo za sterilních podmínek. Může být také postupně rozkládán enzymy přítomnými v kostní tkáni nebo se vytváří molekula odlišná od CDP-1, faktoru B a exaktního vankomycinu a tudíž neidentifikovatelná použitou metodou. Další možností, proč došlo k neočekávanému poklesu hladin uvolněného vankomycinu z kostních štěpů do okolního pufru může být jev, při kterém dochází k reabsorpci antibiotika zpět na nosič a vytvoření tzv. rovnovážného stavu.

Jednoznačná odpověď je zatím neznámá. Z provedeného pokusu se zdá, že následný pozvolný pokles hladin vankomycinu není způsoben pouze jeho termální degradací. Pro klinickou praxi je však podstatné, že i přes vlastnost vankomycinu vytvářet degradační produkty v závislosti na okolní teplotě a délce jejího působení, by měla zůstat po určitou dobu zachována jeho účinná koncentrace převyšující MIC pro MRSA i VRSA.

5. Závěry

Lokální nosiče antibiotik jsou vhodnou alternativou v léčbě infekcí pohybového aparátu. Jejich užitím dokážeme zajistit vysokou lokální hladinu antibiotik přímo v místě zánětu bez systémové toxicity. Díky užití lokálního nosiče antibiotik můžeme řešit problém dutiny, tedy tzv. mrtvého prostoru v tkáni postižené osteomyelitidou. Některé druhy lokálních nosičů antibiotik navíc pozitivně ovlivní regeneraci zánětem postižené kostní tkáně.

V poslední době dáváme přednost lokálním nosičům antibiotik se schopností biodegradace, které umožňují vyhnout se dalšímu operačnímu zákroku. Použití kostního cementu jako nosiče antibiotik má stále svá opodstatnění. Především tam, kde je nutná jeho pevnost a nebiodegradabilita, např. při řešení infekcí kloubních náhrad dvoudobou reimplantací.

Nejlepších vlastností z pohledu kritérií vhodného lokálního nosiče antibiotik v ortopedii a traumatologii jsou nosiče složené z několika druhů materiálů, nejčastěji to jsou tzv. kompozity složené z materiálů keramických a polymerů jak syntetických, tak přirozených. Jsou biodegradabilní, biokompatibilní, mají schopnost osteoindukce anebo osteokondukce a mají schopnost prodloužené doby uvolňování antibiotik.

Nejpřirozenějším lokálním nosičem antibiotik je samotná kostní tkáň, tedy kostní štěpy. Jejich nedostatek spočívající v relativně rychlé eluci antibiotik ve srovnání např. s kompozity lze alespoň částečně řešit speciální úpravou, která zajistí prodloužení doby po kterou se antibiotika uvolňují.

Na podkladě výsledků provedeného experimentu v laboratorních podmínkách jsme ověřili, že :

- 1. Kostní štěpy mohou být dobrým lokálním nosičem vankomycinu.**
- 2. Koncentrace uvolněného antibiotika v exaktní formě by byly jednoznačně terapeuticky účinné.**
- 3. Dlouhodobé uvolňování vankomycinu je cenné z hlediska prevence vzniku bakteriální rezistence jak k tomuto antibiotiku, tak případně k celé glykopeptidové skupině.**

- 4. Účinná koncentrace vylučovaného vankomycinu převyšuje MIC pro MRSA i VRSA, což je zásadní zjištění, umožňující racionalizovat léčbu kostních a kloubních infekcí způsobených rezistentními bakteriálními kmeny.**

- 5. Stále však není dořešena otázka termické degradace vankomycinu, která by mohla ovlivnit přístup k terapeutickému využití vankomycinu při jeho místní aplikaci pomocí lokálních nosičů.**

Literatura

Adams K., Couch L., Cierny G., Calhoun J., Mader J. T.: In vitro and in vivo evaluation of antibiotic diffusion from, antibiotic-impregnated polymethylmetacrylate beads. *Clin. Orthop.* **278**, 244-225 (1992).

Aishwarya S., Mahalakshmi S., Sehgal P. K.: Collagen-coated Polycaprolactone Microparticles as a Controlled Drug Delivery System. *J Microencapsul.* **25**, 298-306 (2008).

Alvarez H., Castro C., Moujir L., Perera A., Delgado A., Soriano I., Evora C., Sánchez E.: Efficacy of ciprofloxacin implants in treating experimental osteomyelitis. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* **85**, 93-104 (2008).

Anguita-Alons P., Rouse M. S., Piper, K. E., Jacofsky D. J., Osmon D. R., Patel R.: Comparative study of antimicrobial release kinetics from polymethylmethacrylate. *Clin. Orthop.* **445**, 239-24 (2006).

Appelbaum P.C.: Reduced glycopeptide susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Int J Antimicrob Agents.* **30**, 398-408 (2007).

Arcos D., Ragel C. V., Vallet-Regí M.: Bioactivity in glass/PMMA composites used as drug delivery system. *Biomaterials.* **22**, 701-708 (2001).

Bahrs Ch., Marschal M., Weise K., Lingenfelter E., Dietz K., Heeg P., Eingartner CH.: Acute Musculoskeletal Infection: Comparison of Different Methods for Intraoperative Bacterial Identification. *Acta Chir. orthop. Traum. čech.* **73**, 237 (2006).

Baker A. S., Greenham L. W.: Release of gentamycin from acrylic bone cement. Elution and diffusion studies. *J. Bone Jt Surg.* **70**, 1551-1557 (1988).

Balamurugan A., Balossier G., Laurent-Maquin D., Pina S., Rebelo A. H., Faure J., Ferreira J. M.: An in vitro biological and anti-bacterial study on a sol-gel derived silver-incorporated bioglass system. *Dent Mater.* **24**, 1343-1351 (2008).

Barcia-Macay M., Mouaden F., Mingeot-Leclercq M. P., Tulkens P. M., Van Bambeke F.: Cellular pharmacokinetics of telavancin, a novel lipoglycopeptide antibiotic, and analysis of lysosomal changes in cultured eukaryotic cells (J774 mouse macrophages and rat embryonic fibroblasts). *J Antimicrob Chemother.* **61**, 1288-1294 (2008).

Bargar W. L., Martin R. B., de Jesus R., Madison M. T.: The addition of tobramycin to contrast bone cement. Effect on flexural strength. *J. Arthroplasty*, **1**, 165-168 (1986).

Bayston R., Milner R. D. G.: The sustained release of antimicrobial drugs from bone cement. An appraisal of laboratory investigations and their significance. *J. Bone Jt Surg.* **64**, 460-464 (1982).

Benghuzzi H., Tucci M., Russell G., Ragab A., Graves M., Conflitti J.: Targeted sustained delivery of tobramycin at the site of a femoral osteotomy. *Biomed Sci Instrum.* **42**, 530-535 (2006).

- Bernard L., Hoffmeyer P., Assal M., Vaudaux P., Schrenzel J., Lew D.: Trends in the treatment of orthopaedic prosthetic infections. *J. Antimicrob. Chemother.* **53**, 127-129 (2004).
- Bert F., Leflon-Guibout V., Le Grand J., Bourdon N., Nicolas.Chanoine M.H.: Emergence of vancomycin-dependent enterococci following glycopeptide therapy: case report and review. *Pathol Biol (Paris)*. **57**, 56-60 (2009).
- Bertazzoni Minelli E., Benini A., Magnan B., Bartolozzi P.: Release of gentamicin and vancomycin from temporary human hip spacers in two-stage revision of infected arthroplasty. *J. Antimicrob. Chemother.* **53**, 329-334 (2004).
- Biavasco F., Vignaroli C., Varaldo P. E.: Glycopeptide Resistance in Coagulase-Negative Staphylococci. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **19**, 403-417 (2000).
- Bibbo C., Patel D. V.: The effect of demineralized bone matrix-calcium sulfate with vancomycin on calcaneal fracture healing and infection rates: a prospective study. *Foot Ankle Int.* **27**, 487-493 (2006).
- Booth R. E., Lotke P. A.: The Results of Spacer Block Technique in Revision of Total Knee Arthroplasty. *Clin. Orthop.* **248**, 57-60 (1989).
- Boskey A. L.: Matrix proteins and mineralisation: An overview. *Connective Tissue Research.* **35**, 357-363 (1996).
- Boucher H., Miller G. L., Ranozabler R.: Serious Infection Caused by Methicillin – Resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis.* **51**, 184-197 (2010).
- btec, no date. Biomaterials Tutorial [online]. Pittsburgh, USA. Available from: <http://www.btec.cmu.edu/tutorial/biomaterials/biomaterials.htm#ceramics> [Accessed 10.11.2008]
- Bucholtz H. W., Engelbrecht H.: Über die Depotwirkung einiger Antibiotica bei Vermischung mit dem Kunsthartz Palacos. *Chirurg.* **41**, 510-515 (1970).
- Bucholtz H. W., Elson R. A., Heinert K.: Antibiotic-loaded acrylic cement: current concepts. *Clin.Orthop.* **190**, 98-108 (1984).
- Buranapanitkit B., Srinilta V., Ingviga N., Oungbho K., Geater A., Ovatlarnporn C.: The efficacy of a hydroxyapatite composite as a biodegradable antibiotic delivery system. *Clin Orthop Relat Res.* **424**, 244-252 (2004).
- Buranapanitkit B., Oungbho K., Ingviya N.: The efficacy of hydroxyapatite composite impregnated with amphotericin B. *Clin Orthop Relat Res.* **437**, 236-241 (2005).
- Burcu S., Sema Ç., Bülent A., Mustafa S. A., Atilla H.: Evaluation of in vitro antibiotic release from vancomycin impregnated human bone grafts and vancomycin loaded poly(lactide-co-glycolide) PLGA (75:25) microspheres-human bone grafts blend. Controlled Release Society 30th Annual Meeting PROCEEDINGS. (2003).

- Buttaro M., González D., Valle A. M., Pineiro L., Mocetti E., Morandi A. A., Piccaluga F.: Incorporation of vancomycin-supplemented bone incorporation of vancomycin-supplemented bone allografts: radiographical, histopathological and immunohistochemical study in pigs. *Acta Orthop Scand.* **74**, 505-13 (2003).
- Buttaro M., Pusso R., Piccaluga F.: Vancomycin-supplemented impacted bone allografts in revision total hip arthroplasty. Two stage revision results. *J bone Joint Surg (Br).* **87**, 314-319 (2005).
- Buttaro M., Gimenez M. I., Greco G., Barcan L., Piccaluga F.: High local levels of vancomycin without nephrotoxicity released from impacted bone allograft in 20 revision hip arthroplasties. *Acta Orthopaedica.* **76**, 336-340 (2005).
- Buttaro M., Comba F., Piccaluga F.: Vancomycin-supplemented cancellous bone allografts in hip revision surgery. *Clin Orthop Relat Res.* **461**, 74-80 (2007).
- Buxton T. B., Walsh D. S., Harvey S. B., McPherson J.C., Hartmann J. F., Plowman K. M.: Bisphosphonate-ciprofloxacin bound to Skelite is a prototype for enhancing experimental local antibiotic delivery to injured bone. *Br J Surg.* **91**, 1192-1196 (2004).
- Calton T. F., Fehring T. K., Griffin W. L.: Bone Loss Associated with the Use of Spacer Blocks in Infected Total Knee Arthroplasty. *Clin. Orthop.* **345**, 148-154 (1997).
- Campoccia D, Montanaro L, Speziale P, Arciola C. R.: Antibiotic-loaded biomaterials and the risks for the spread of antibiotic resistance following their prophylactic and therapeutic clinical use. *Biomaterials.* **31**, 6363-7637 (2010).
- Castro C., Evora C., Baro M., Soriano I., Sánchez E.: Two-month ciprofloxacin implants for multibacterial bone infections. *Eur J Pharm Biopharm.* **60**, 401-406 (2005).
- Cetinkaya Y., Falk P., Mayhall C. G.: Vancomycin-resistant enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**, 686-707 (2000).
- Cordero J.: Infection of Orthopaedic Implants. *European Instructional Course od Lectures.* **4**, 165-173 (1999).
- Costerton J. W.: Biofilm theory can guide the treatment of device-related orthopaedic infections. *Clin. Orthop.* **437**, 7-11 (2005).
- Cunha B. A.: Vancomycin revisited: a reappraisal of clinical use. *Crit Care Clin.* **24**, 393-420 (2008).
- D'Angelo F., Negri L., Zatti G., Grassi F. A.: Two-stage revision surgery to treat an infected hip implant. A comparison between a custom-made spacer and a pre-formed one. *Chir. Organi Mov.* **90**, 271-279 (2005).
- Davies J. P., O'Connor D. O., Burke D. W., Hartus W. H.: Influence of antibiotic impregnation on the fatigue life of Simplex P and Palacos R acrylic bone cement with and without centrifugation. *J. Biomed. Mater. Res.* **23**, 379-397 (1989).
- Del Real, R. P., Padilla S., Vallet-Regi M.: Gentamicin release from hydroxyapatite/polyethyl methacrylate/polymethyl methacrylate composites. *J. Biomed. Mater. Res.* **52**, 1-7 (2000).

Deng J., Li L., Stephens D., Tian Y., Robinson D.: Effect of postmolding heat treatment on in vitro properties of a polyanhydride implant containing gentamicin sulfate. *Drug Dev Ind Pharm.* **30**, 341-346 (2004).

Deshmukh R. G., Thervarajan K., Kok C. S., Sivapathasundaram N., George S. V.: An intramedullary cement spacer in total hip arthroplasty. *J. Arthropl.* **13**, 197-199 (1998).

Dlouhý P., Herold I., Kolář M., Beneš J., Cetkovský P., Doležal T., Jahoda D., Kouba M., Novák I., Nyč O., Pilnáček J., Ráčil Z., Sechser T., Ševčík P., Švihovec P.: Postavení linezolidu v léčbě rezistentních gram pozitivních infekcí. *Anest. Inteziv. Med.* **16**, (2005).

Dlouhý P., Herold I., Kolář M., Beneš J., Cetkovský P., Doležal T., Jahoda D., Kouba M., Novák I., Nyč O., Pilnáček J., Ráčil Z., Sechser T., Ševčík P., Švihovec P.: Role of linezolid in the treatment of resistant gram-positive infections. *Klin. Mikrobiol. Infekc. Lek.* **2**, 4-9, (2006).

Dorothy W., Backes Hoda I., Aboleneen Janice A., Simpson: Quantitation of Vancomycin and its Crystalline Degradation Product (CDP-1) in Human Serum by High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* **16**, 1281-1287 (1998).

Driessens F. C. M., Boltong M. G., Wenz R.: Calcium phosphate bone cements: State of the art 2000. 12th Conference of the European Society of Biomechanics, Dublin, Ireland, 27-30th August (2000).

Drognitz O., Thorn D., Krüger T.: Release of vancomycin and teicoplanin from a plasticized and resorbable gelatin sponge: in vitro investigation of a new antibiotic delivery system with glycopeptides. *Infection.* **34**, 29-34 (2006).

Duncan C. P., Masri B. A.: The role of antibiotic-loaded cement in the treatment of an infection after a hip replacement. *J. Bone Jt Surg.* **76**, 1742-1749 (1994).

Džupa V., Nejedlý A., Čech O: Rekurentní osteomyelitida tibie po transportu kosti a její radikální interdisciplinární léčba. *Acta Chir. orthop. Traum. čech.* **75**, 387 – 391 (2008).

Džupa V., Ryantová V., Skála-Rosenbaum J., Vyhnánek F., Fric M., Grill R., Horák L., Pavelka T: Infekční komplikace operační léčby zlomenin pánve. *Acta Chir. orthop. Traum. čech.* **75**, 293 – 296 (2008).

Edin M. L., Miclau T., Lester G. E. et al: Effect of cefazolin and vancomycin on osteoblasts in vitro. *Clin Orthop Relat Res.* **333**, 245-251 (1996).

von Eiff C., Peters G., Heilmann C.: Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. *Lancet Infect Dis.* **2**, 677-685. (2002).

Ehrlich G.D., Stoodley P., Kathju S., Zhao Y., McLeod B. R., Balaban N., Hu F. Z., Sotereanos N. G., Costerton J. W., Stewart P. S., Post J. C., Lin Q.: Engineering approaches for the detection and control of orthopaedic biofilm infections. *Clin. Orthop.* **437**, 59-66 (2005).

Elson R. A., Jephcott A. E., McGeachie D. B., Verettas D.: Antibiotic-loaded acrylic cement. *J. Bone Jt Surg.*, **59**, 200-205 (1977).

Englert C., Angele P., Fierbeck J., Dendorfer S., Schubert T., Müller R., Lienhard S., Zellner J., Nerlich M., Neumann C.: Conductive bone substitute material with variable antibiotic delivery. *Unfallchirurg*. **110**, 408-413 (2007).

Faber C., Stallmann H. P., Lyaruu D. M., et al.: Comparable efficacies of the antimicrobial peptide human lactoferrin 1-11 and gentamicin in a chronic methicillin –resistant *Staphylococcus aureus* osteomyelitis model. *Antimicrob Agents Chemother*. **49**, 2438-2444 (2005).

Faden D., Faden H. S.: The high rate of adverse drug events in children receiving prolonged outpatient parenteral antibiotic therapy for osteomyelitis. *Pediatr Infect Dis J*. **28**, 539-541 (2009).

Faupel L., Kunze K., Ecke H.: Autologous blood-antibiotic filling as effective therapy of chronic osteomyelitis. *Unfallchirurgie*. **12**, 110-113 (1986).

Fehring T. K., Odum S., Calton T. F., Mason J. B.: Articulating versus static spacers in revision total knee arthroplasty for sepsis. *Clin. Orthop*. **380**, 9-16 (2000).

Fischer B., Vaudaux P., Mangin M.: Novel animal model for studying the molecular mechanisms of bacterial adhesion to bone-implanted metallic devices: role of fibronectin in *Staphylococcus aureus* adhesion. *J. Orthop. Res*. **14**, 914-920 (1996).

Formmelt L.: Local Antibiotic Therapy. In: Stuttgart, Germany: Septic Bone Surgery. Georg Thieme Verlag. KG (2008).

Fraimow H. S.: Systemic antimicrobial therapy in osteomyelitis. *Semin Plast Surg*. **23**, 90-99 (2009).

Fridkin S. K.: Vancomycin intermediate and resistant *S aureus*: What infectious disease specialists need to know. *Clin Infect Dis*. **32**, 429-439 (2001).

Fujita H., Iida H., Ido K., Matsuda Y., Oka M., Nakamura T.: Porous apatite-wollastonite glass-ceramic as an intramedullary plug. *J Bone Joint Surg Br*. **82**, 614-618 (2000).

Galjour C., Dzugan S., Graves M., Benghuzzi H., Russell G., Tucci M., Tsao A.: Stimulation of fracture healing by continuous delivery of demineralized bone matrix proteins and tobramycin. *Biomed Sci Instrum*. **41**, 122-127 (2005).

Gallo J., Kolář M., Florschütz A.V., Novotný R., Pantucek R., Kesselová M.: In vitro testing of gentamicin-vancomycin loaded bone cement to prevent prosthetic joint infection. *Biomed. Pap*. **149**, 153-158 (2005).

Gallo J., Sauer P., Dendis M., Lovečková Y., Kolář M., Zapletalová J., Janout V.: Molekulární diagnostika infekcí kloubních náhrad. *Acta Chir. orthop. Traum. čech*. **73**, 85 (2006).

Gallo J., Smižanský M., Radová L., Potomková J.: Porovnání léčebných postupů používaných v terapii infekce kloubních náhrad kyčle a kolena. *Acta Chir. orthop. Traum. čech.* **76**, 302-309 (2009).

Garvin K. L., Evans B. G., Salvati E. A., Brause B. D.: Palacos gentamycin for treatment of deep periprosthetic hip infections. *Clin. Orthop.* **298**, 97-105 (1994).

Garvin K. L., Hinrichs S. H., Urban J. A.: Emerging antibiotic-resistant bacteria. Their treatment in total joint arthroplasty. *Clin. Orthop.* **369**, 110-123 (1999).

Garvin K., Feschuk C.: Polylactide-polyglycolide antibiotic implants. *Clin Orthop Relat Res.* **437**, 105-110 (2005).

Gee R., Munk P. L., Keogh C., Nicolaou S., Masri B., Marchinkow L. O., Ellis J., Chan L. P.: Radiography of the PROSTALAC (prosthesis with antibiotic-loaded acrylic cement) orthopedic implant. *AJR Am. J. Roentgenol.*, **180**, 1701-1706 (2003).

Goldstein W. M., Kopplin M., Wal I. R., Berland K.: Temporary articulating methylmethacrylate antibiotic spacer (TAMMAS). A new method of intraoperative manufacturing of a custom articulating spacer. *J. Bone Jt Surg.* **83**, 92-97 (2001).

Goodell J. A., Flick A. B., Herbert J. C., Howe J. G.: Preparation and release characteristics of tobramycin-impregnated polymethylmetacrylate beads. *Am. J. Hosp. Pharm.* **43**, 1454-1461 (1986).

Goudarzi Y. M.: Clinical experiences with a fibrin-nebacetin-spongy bone seal in the treatment of chronic bone infections and as local prophylaxis of infection in uninfected bones. *Aktuelle Traumatol.* **13**, 205-9 (1983).

Gristina A. G.: Implant Failure and the Immuno-incompetent Fibro-inflammatory Zone. *Clin. Orthop.* **298**, 106-118 (1994).

Gristina A. G., Costerton J. W.: Bacterial Adherence to Biomaterials and Tissue. *J. Bone Jt Surg.* **67**, 265-74 (1985).

Großpeter A. S., Pretzsch M., Frh. van Salis-Soglio G.: Die Behandlung knöcherner Defekte mit der Hydroxylapatitkeramik Endobon® - Eine mittelfristige klinische und radiologische Verlaufsbeobachtung bei 58 Patienten. *Orthopädische Praxis.* **40**, 290-294 (2004).

Gürsel I., Korkusuz F., Türesin F., Alaeddinoglu N. G., Hasirci V.: In vivo application of biodegradable controlled antibiotic release systems for the treatment of implant-related osteomyelitis. *Biomaterials.* **22**, 73-80 (2001).

Ha C. W.: A technique for intraoperative construction of antibiotic spacers. *Clin. Orthop.* **445**, 204-209 (2006).

Haerdi-Landerer M. C., Suter M. M., Steiner A., Wittenbrink M. M., Pickl A., Gander B. A.: In vitro cell compatibility and antibacterial activity of microencapsulated doxycycline designed for improved localized therapy of septic arthritis. *J Antimicrob Chemother.* **61**, 332-340 (2008).

Haddad F. S., Masri B. A., Campbell D., McGraw R. W., Beuchamp C. P., Duncan C. P.: The PROSTALAC Functional Spacer in Two-stage Revision for Infected Knee Replacements. Prosthesis of Antibiotic-Loaded Acrylic Cement. *J. Bone Jt Surg.* **82**, 807-812 (2000).

Hájek V., Součková A.: Grampozitivní koky. v: Bednář, M., Fraňková, V., Schindler, J., Souček, A., Vávra, J.: Lékařská mikrobiologie. Praha, Marvil, 193-214 (1996).

Hanssen A. D., Osmon D.R., Patel R.: Local antibiotic delivery systems: where are we and where are we going?. *Clin. Orthop.* **437**, 111-114 (2005).

Haznar D., Pluta J.: Effect of composition on the physicochemical properties and active substance release from gelatin-alginate sponge. *Polim Med.* **33**, 17-27 (2003).

Heijink A., Yaszemski M. J., Patel R., Rouse M. S., Lewallen D. G., Hanssen A. D.: Local antibiotic delivery with OsteoSet, DBX, and Collagraft. *Clin Orthop Relat Res.* **451**, 29-33 (2006).

Hendricks K. J., Lane D., Burd T. A., Lowry K. J., Day D., Phaup J. G., Anglen J. O.: Elution characteristics of tobramycin from polycaprolactone in a rabbit model. *Clin Orthop Relat Res.* **392**, 418-26 (2001).

Hoff S. F., Fitzgerald R. H.Jr., Kelly P. J.: The depot administration of penicillin G and gentamycin in acrylic bone cement. *J. Bone Jt Surg.* **63**, 798-804 (1981).

Hofmann A. A., Kane K. R., Tkach T. K., Plaster R. L., Camargo M. P.: Treatment of infected total knee arthroplasty using an articulating spacer. *Clin Orthop Relat Res.* **321**, 45-54 (1995).

Huang J., Lin Y. W., Fu X. W., Best S. M., Brooks R. A., Rushton N., Bonfield W.: Development of nano-sized hydroxyapatite reinforced composites for tissue engineering scaffolds. *J Mater Sci Mater Med.* **18**, 2151-7 (2007).

Hsieh P. H., Shih C. H., Chang Y. H., Lee M. S., Shih H. N., Yang W. E.: Two-stage revision hip arthroplasty for infection: comparison between the interim use of antibiotic-loaded cement beads and a spacer prosthesis. *J. Bone Jt Surg.* **86**, 1989-1997 (2004).

Hui T., Yongqing X., Tiane Z., Gang L., Yonggang Y., Muyao J., Jun L., Jing D.: Treatment of osteomyelitis by liposomal gentamicin-impregnated calcium sulfate. *Arch Orthop Trauma Surg.* **129**, 1301-1308 (2009).

Chang S., Sievert D. M., Hageman J. C., Boulton M. L., Tenover F. C., Downes F. P., Shah S., Rudrik J. T., Pupp G. R., Brown W. J., Cardo D., Fridkin S. K.: Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the vanA resistance gene. *N Engl J Med.* **348**, 1342-1347 (2003).

Chang H. I., Lau Y. C., Yan C., Coombes A. G.: Controlled release of an antibiotic, gentamicin sulphate, from gravity spun polycaprolactone fibers. *J Biomed Mater Res A.* **84**, 230-237 (2008).

Chang W., Colangeli M., Colangeli S., Di Bella C., Gozzi E., Donati D.: Adult osteomyelitis: debridement versus debridement plus Osteoset T pellets. *Acta Orthop Belg.* **73**, 238-43 (2007).

Chapman M. V., Hadley W. K.: The effect of polymethylmethacrylate and antibiotic combinations on bacterial viability. An in vitro and preliminary in vivo study. *J. Bone Jt Surg.* **58**, 76-81 (1976).

Chen L., Wang H., Wang J., Chen M., Shang L.: Ofloxacin-delivery system of a polyanhydride and polylactide blend used in the treatment of bone infection. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* **83**, 589-95 (2007).

Chohfi M., Langlais F., Fourastier J., et al.: Pharmacokinetics, uses, and limitations of vancomycin-loaded bone cement. *Int Orthop.* **22**, 171-177 (1998).

Christine S. Lewis, Peter R. Supronowicz, Rasa M. Zhukauskas, Elise Gill and Ronald R. Cobb: Local antibiotic delivery with demineralized bone matrix. *Springer Science+Business Medica B.V.* (2010).

Jacoby G. A., Archer G. L.: New mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *New Engl.J. Med.* **324**, 601-612 (1991).

Jahoda D., Sosna A., Landor I., Vavřík P., Pokorný D.: Kanalizovaný artikulovalý spacer - funkční implantát pro řešení náhrady kyčelního kloubu. *Acta Chir. orthop. Traumat. čech.* **71**, 73-79 (2004).

Jahoda D., Nyč O., Pokorný D., Landor I., Sosna A.: Antibiotika v prevenci infekčních komplikací u operací kloubních náhrad. *Acta Chir. orthop. Traum. čech.* **73**, 108 (2006).

Jahoda D., Nyč O., Pokorný D., Landor I., Sosna A.: Linezolid v léčbě rezistentních grampozitivních infekcí pohybového aparátu. *Acta Chir. orthop. Traum. čech.* **73**, 329 (2006).

Jahoda D., Nyč O., Šimša J., Kučera E., Hanek P., Chrz P., Pokorný D., Tawa N., Landor I., Sosna A.: Výskyt pozdní hematogenní infekce kloubních náhrad v našem souboru a návrh systému prevence. *Acta Chir. orthop. Traum. čech.* **74**, 397 (2007).

Jahoda D., Nyč O., Šimša J., Kučera E., Hanek P., Chrz P., Pokorný D., Tawa N., Landor I., Sosna A.: Pozdní hematogenní infekce kloubních náhrad. *Acta Chir. orthop. Traum. čech.* **75**, 88 – 92 (2008).

Jahoda D., Sosna A., Nyč O., et al: Infekční komplikace kloubních náhrad. Praha, Triton (2008).

Jahoda D., Pokorný D., Nyč O., Barták V., Hromádka R., Landor I., Sosna A.: Infectious complications of total shoulder arthroplasty. *Acta Chir. orthop. Traum. čech.* **75**, 422-428 (2008).

Jain J. P., Modi S., Domb A. J., Kumar N.: Role of polyanhydrides as localized drug carriers. *J Control Release.* **103**, 541-563 (2005).

- Jiranek W.: Antibiotik-loaded cement in total hip replacement: current indications, efficacy and complications. *Orthopaedics*. **28**, 873-877 (2005).
- Jupiter J. B., Karchmer A. W., Lowell D. J., Harris W.H.: Total hip arthroplasty in the treatment of adult hips with current or quiescent sepsis. *J. Bone Jt Surg.*, **63**, 194 (1981).
- Katthagen B. D., Mittelmeier H.: Experimental animal investigation of bone regeneration with collagen-apatite. *Arch. Orthop. Trauma surg.* **103**, 291-302 (1984).
- Kawanabe K., Okada Y., Matsusue Y., Iida H., Nakamura T.: Treatment of osteomyelitis with antibiotic-soaked porous glass ceramic. *J Bone Joint Surg Br.* **80**, 527-30 (1998).
- Kloss F. R., Schlegel K. A., Felszeghy E., Falk S., Wiltfang J.: Anwendung eines osteoinduktiven Protein-komplexes zur Regeneration knocherne Defekte. *Mund Kiefer Gesichtschirurgie*. **8**, 12-17 (2004).
- Kokubo T., Kim H. M., Kawashita M.: Novel bioactive materials with different mechanical properties. *Biomaterials*. **24**, 2161-75 (2003).
- Kolář M., Čekanová L., Vágnerová I.: Průkaz vankomycin-rezistentních enterokoků u komunitní populace České republiky. *Zprávy CEM*. **12**, 73-74 (2003).
- Kraay M. J., Goldberg V. M., Fitzgerald S. J., Salata M. J.: Cementless two-staged total hip arthroplasty for deep periprosthetic infection. *Clin. Orthop.* **441**, 243-249 (2005).
- Krbec M., Čech O., Džupa V., Pacovský V., Klézl Z.: Infekční komplikace TEP kyčelního kloubu. *Acta Chir. orthop. Traumat. Čech.* **71**, 179-188 (2004).
- Kuhn K-D: Bone Cements. 272, Springer (2000).
- Lambotte J. C., Thomazeau H., Cathelineau G., Lancien G., Minet J., Langlais F.: Tricalcium phosphate, an antibiotic carrier: a study focused on experimental osteomyelitis in rabbits. *Chirurgie*. **123**, 572-579 (1998).
- Lasak, no date. TCP [online]. Prague, Czech Republic. Available from: <http://www.lasak.cz/?t=poresorb-tcp>, [Accessed 25.11.2009]
- Laurent F., Bignon A., Goldnadel J., Chevalier J., Fantozzi G., Viguier E., Roger T., Boivin G., Hartmann D.: A new concept of gentamicin loaded HAP/TCP bone substitute for prophylactic action: in vitro release validation. *J Mater Sci Mater Med*. **19**, 947-951 (2008).
- Lautenschlager E. P., Marshall G. W., Marks K. E., Schwartz J., Nelson C. L.: Mechanical strength of acrylic bone cement impregnated with antibiotics. *J. Biomed. Mater. Res.* **10**, 837-845 (1976).
- Lawson K. J., Marks K. E., Brems J., Rehm S.: Vancomycin vs tobramycin elution from polymethylmethacrylate: in vitro study. *Orthopaedics*. **13**, 521-524 (1990).
- Leupold J. A., Barfield W. R., An Y. H., Hartsock L. A.: A comparison of ProOsteon, DBX, and collagraft in a rabbit model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. **79**, 292-297 (2006).

- Li X., Wang X., Zhang L., Chen H., Shi J.: MBG/PLGA composite microspheres with prolonged drug release. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* no page (2008).
- Luzzaro F., Viganò E. F., Fossati D., Grossi A., Sala A., Sturla C., Saudelli M., Toniolo A.: Prevalence and drug susceptibility of pathogens causing bloodstream infections in northern Italy: A two-year study in 16 hospitals. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **21**, 849-855 (2002).
- Mader J. T., Stevens C. M., Stevens J. H., Ruble R., Lathrop J. T., Calhoun J. H.: Treatment of experimental osteomyelitis with a fibrin sealant antibiotic implant. *Clin Orthop Relat Res.* **403**, 58-72 (2002).
- Magnan, B. Regis D., Biscaglia R., Bartolozzi P.: Preformed acrylic bone cement spacer loaded with antibiotics: use of two-stage procedure in 10 patients because of infected hips after total replacement. *Acta Orthop. Scand.* **72**, 591-594 (2001).
- Mäkelä E., Mäkelä E. A., Partio E. K., Juutilainen T., Lähteenkorva K., Törmälä P., Rokkanen P.: Fixation of experimental osteotomies with bioabsorbable SR-poly(lactide-polyglycolide) (80/20) polymeric rods. *J Mater Sci Mater Med.* **19**, 1061-1067 (2008).
- Martins V. C., Goissis G., Ribeiro A. C, Marcantônio E. Jr, Bet M. R.: The controlled release of antibiotic by hydroxyapatite: anionic collagen composites. *Artif Organs.* **22**, 215-221 (1998).
- Marks K. E., Nelson C.L., Lautenschlager E .P.: Antibiotic-impregnated acrylic bone cement. *J. Bone Jt Surg.* **58**, 358-364 (1976).
- Masterson E. L., Masri B. A., Duncan C. P.: Treatment of infection at the site of total hip replacement. *AAOS Instructional Course Lectures.* **47**, 297-306 (1998).
- Meani E., Romanò C., Crosby L., Hofmann G.: Infection and Local Treatment in Orthopedic Surgery, first edition. US.: Springer (2007).
- Meek R. M., Masri B. A., Dunlop D., Garbuz D. S., Greidanus N. V., Mc Graw R., Duncan C. P.: Patient satisfaction and functional status after treatment of infection at the site of a total knee arthroplasty with use of the PROSTALAC articulating spacer. *J. Bone Jt Surg.* **85**, 1888-1892 (2003).
- Meek R. M., Dunlop D., Garbuz D. S., Mc Graw R., Greidanus N. V., Masri B. A.: Patient satisfaction and functional status after aseptic versus septic revision total knee arthroplasty using the PROSTALAC articulating spacer. *J Arthropl.* **19**, 874-879 (2004).
- Melter O., Aires de Sousa M., Laskafeldová K., Urbásková P., Wünschová M., deLencastre H.: Delineation of the endemic and sporadic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in a Czech hospital. *Microb Drug Resist.* **10**, 218-223 (2004).
- Montali A.: Antibacterial coating système. *Injury.* **37**, 81-86 (2006).

Murakami T., Murakami H., Ramp W. K., Hudson M. C., Nousiainen M. T.: Calcium hydroxide ameliorates tobramycin toxicity in cultured chick tibiae. *Bone*. **21**, 411-418 (1997).

Nejedlý A., Džupa V., Záhorka J., Tvrdek M.: Využití muskulárního laloku při léčení infikovaných zlomenin a chronické osteomyelitidy v oblasti bérce a hlezna. *Acta Chir. orthop. Traumat. Čech*. **74**, 162 (2007).

Nelson C. L., Hickmon S. G., Skinner R. A.: Treatment of experimental osteomyelitis by surgical debridement and the implantation of bioerodable, polyanhydride-gentamicin Brada. *J Orthop Res*. **15**, 249-255 (1997).

Neut D., van de Belt H., Stokroos I., van Horn J. R., van der Mei H. C., Busscher H. J.: Biomaterial-associated infection of gentamicin-loaded PMMA beads in orthopaedic revision surgery. *J. Antimicrob. Chemother.* **47**, 885-891 (2001).

Neut D., de Groot E. P., Kowalski R. S. et al: Gentamicin loaded bone cement with clindamycin or fusidic acid added: biofilm formation and antibiotic release. *J Biomed Mater Res A*. **73**, 165-170 (2005).

Niemelä S. M., Ikäheimo I., Koskela M., Veiranto M., Suokas E., Törmälä P., Waris T., Ashammakhi N., Syrjälä H.: Ciprofloxacin-releasing bioabsorbable polymer is superior to titanium in preventing Staphylococcus epidermidis attachment and biofilm formation in vitro. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. **76**, 8-14 (2006).

Nyč O., Urbánková P., Marešová V., Prokeš M., Jindrák V., Švihovec J., Sechser T., Karen I., Hoza J.: Konsensus používání antibiotik. Chinolony. *Praktický lékař*. **86**, 570-574 (2006).

Nyc O., Matejkova J.: Stenotrophomonas maltophilia: Significant contemporary hospital pathogen – review. *Folia Microbiologica*. **55**, 286-294 (2010).

Otsuka M., Fujita H., Nakamura T., Kokubo T.: Effects of ceramic component on cephalexin release from bioactive bone cement consisting of Bis-GMA/TEGDMA resin and bioactive glass ceramics. *Biomed Mater Eng*. **11**, 11-22 (2001).

Papagelopoulos P. J., Mavrogenis A. F., Tsiodras S., Vlastou C., Giamarellou H., Soucacos P. N.: Calcium sulphate delivery system with tobramycin for the treatment of chronic calcaneal osteomyelitis. *J Int Med Res*. **34**, 704-12 (2006).

Parvizi J., Azzam K., Ghanem E., Austin M. S., Rothman R. H.: Periprosthetic infection due to resistant staphylococci: serious problems on the horizon. *Clin Orthop Relat Res*. **467**, 1732-1739 (2009).

Pietrzak W. S., Ronk R.: Calcium sulfate bone void filler: a review and look ahead. *J Craniofac Surg*. **11**, 327-333 (2000).

Pitto R. P., Castelli C. C., Ferrari R., Munro J.: Pre-formed articulating knee spacer in two-stage revision for the infected total knee arthroplasty. *Int. Orthop*. **29**, 305-308 (2005).

Poleník P.: Treatment of alveolar bone defects by porous β -TCP and PRP. *Clin. Oral. Impl. Res.* **15**, 4 (2004).

Powles J. W., Spencer R. F., Lovering A. M.: Gentamycin release from old cement during revision hip arthroplasty. *J Bone Jt Surg.* **80**, 607-610 (1998).

Ragel C. V., Vallet-Regí M.: In vitro bioactivity and gentamicin release from glass-polymer-antibiotic composites. *J Biomet Mater Res.* **51**, 424-429 (2000).

Rayner C. R., Baddour M. C., Birminham M. C., Norden A. K., Meagher A. K., Schentag J. J.: Linezolid in the Treatment of Osteomyelitis: Results of Compassionate Use Experience. *Infection.* **32**, 8-14 (2004).

Randelli P., Evola F. R., Cabitza P., Polli L., Denti M., Vaienti L.: Prophylactic use of antibiotic-loaded bone cement in primary total knee replacement. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* **18**, 181-186 (2009).

Rauschmann M. A., Wichelhaus T. A., Stirnal V., Dingeldein E., Zichner L., Schnettler R., Alt V.: Nanocrystalline hydroxyapatite and calcium sulphate as biodegradable composite carrier material for local delivery of antibiotics in bone infections. *Biomaterials.* **26**, 2677-2684 (2005).

Richelsoph K. C., Webb N. D., Haggard W. O.: Elution behavior of daptomycin-loaded calcium sulfate pellets: a preliminary study. *Clin Orthop Relat Res.* **461**, 68-73 (2007).

Rupprecht S., Petrovic L., Burchhardt B., Wiltfang J., Neukam F. W., Schlegel K. A.: Antibiotic-containing collagen for the treatment of bone defects. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* **83**, 314-319 (2007).

Rutledge B., Huyette D., Day D., Anglen J.: Treatment of osteomyelitis with local antibiotics delivered via bioabsorbable polymer. *Clin Orthop Relat Res.* **411**, 280-287 (2003).

Salvati E. A., Callaghan J. J., Brause B. D., Klein R. F., Small R. D.: Reimplantation in infection. Elution of gentamycin from cement and beads. *Clin. Orthop.* **207**, 83-93 (1986).

Seldes R. M., Winiarsky R., Jordan L. C., Baldini T., Brause B., Zodda F., Sculco T. P.: Liquid gentamicin in bone cement: a laboratory study of a potentially more cost-effective cement spacer. *J Bone Jt Surg.* **87**, 268-272 (2005).

Shinjo K., Nagaya I., Asai T., Tukamoto M.: One stage operation for dead space of pyogenic and tuberculous osteomyelitis. *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi.* **67**, 572-82 (1993).

Shyam K. S., Awadhesh Y., Santosh N., MR Sen: Decal bone matrix as a local antibiotic delivery vehicle in a MRSA-infected bone model: An experimental study. *Indian J Orthop.* **44**, 246-251 (2010).

Schnieders J., Gbureck U., Thull R., Kissel T.: Controlled release of gentamicin from calcium phosphate-poly(lactic acid-co-glycolic acid) composite bone cement. *Biomaterials.* **27**, 4239-4249 (2006).

Schindler J.: Mikrobiální biofilm. *Vesmír.* **4**, 203-206 (2001).

Schindler O. S., Spencer R. F., Smith M. D.: Should we use a separate knife for the skin? *J. Bone Jt Surg.* **88**, 382-385 (2006).

Silverman L. D., Lukashova L., Herman O. T., Lane J. M., Boskey A. L.: Release of gentamicin from a tricalcium phosphate bone implant. *J Orthop Res.* **25**, 23-29 (2007).

Skripta, no date. Biomedicinální polymery [online]. Liberec, Czech Republic. Available from: <https://skripta.ft.tul.cz/akreditace/data/2008-07-18/12-34-14.pdf> [Accessed 15.11.2008]

Somerville A. L., Wright D. H., Rotschafer J. C : Implications of Vancomycin Degradation Products on Therapeutic Drug Monitoring in Patients with End-Stage Renal Disease. *Pharmacotherapy.* **19**, 702-707 (1999).

Stallmann H. P., Faber C., Bronckers A. L., Nieuw Amerongen A. V., Wuisman P. I.: In vitro gentamicin release from commercially available calcium-phosphate bone substitutes influence of carrier type on duration of the release profile. *BMC Musculoskelet Disord.* **26**, 18 (2006).

Stevens C. M., Tetsworth K. D., Calhoun J. H., Mader J. T.: An articulated antibiotic spacer used for infected total knee arthroplasty: a comparative in vitro elution study of Simplex and Palacos bone cements. *J. Orthop. Res.* **23**, 27-33 (2005).

Stoodley P., Kathju S., Hu F. Z., Erdos G., Levenson J. E., Mehta N., Dice B., Johnson S., Hall-Stoodley L., Nistico L., Sotereanos N., Sewecke J., Post J. C., Ehrlich G. D.: Molecular and imaging techniques for bacterial biofilms in joint arthroplasty infections. *Clin. Orthop.* **437**, 31-40 (2005).

SÚKL, no date. Seznam hraničních výrobků, u nichž SÚKL rozhodl podle § 9 odst. 1 písm. h) zákona č. 79/1997 Sb.... [online]. Prague, Czech Republic. Available from: www.sukl.cz/_download/cs12hranicprip/rozhodnuti_sukl20070822.rtf [Accessed 20.11.2008]

Swaney S. M., Aoki H., Ganoza M. C., Shinabarger D. L.: The oxazolidinone linezolid inhibits initiation of protein synthesis in bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 3251-3255 (1998).

Swieringa A. J., Tulp N. j.: Toxic serum gentamicin levels after use of gentamicin – loaded sponges of infected total hip arthroplasty. *Acta Orthop.* **76**, 75-77 (2005).

Tang S., Jin A., Wang Y.: Preparation of plastic nano-hydroxyapatite/poly (3-hydroxybutyrate-hydroxyvalerate)-polyethylene glycol gentamicin drug delivery system. *Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery.* **20**, 758-761 (2006).

Thomas M. V., Puleo D. A., Al-Sabbagh M.: Bioactive glass three decades on. *J long Term Eff Med Implants.* **15**, 585-597 (2005).

Trampuz A., Zimmerli W.: Prosthetic joint infections: update in diagnosis and treatment. *Swiss Med. Wkly.* **30**;135, 243-251 (2005).

Tredwell S., Jackson J. K., Hamilton D., Lee V., Burt H. M.: Use of fibrin sealants for the localized, controlled release of cefazolin. *Can J Surg.* **49**, 347-352 (2006).

- Tsukayama D. T., Goldberg V. M., Kyle R.: Diagnosis and management of infection after total knee arthroplasty. *J Bone Jt Surg.* **85**, 75-80 (2003).
- Tunney M. M., Patrick S., Gorman S. P., Nixon J. R., Anderson N., Davis R. I., Hanna D., Ramage G.: Improved detection of infection in hip replacements. *J. Bone Jt Surg.* **80**, 568-572 (1998).
- Tuzuner T., Uygur I., Sencan I., Haklar U., Oktas B., Ozdemir D.: Elution characteristics and mechanical properties of calcium sulfate-loaded bone cement containing teicoplanin. *J Orthop Sci.* **12**, 170-177 (2007).
- Votava M.: Lékařská mikrobiologie speciální. Brno, Neptun (2003).
- Wahling H., Dingeldein E.: Antibiotics and bone cement. Experimental and clinical long term observations. *Acta Orthop. Scandinavica.* **51**, 49-56 (1980).
- Wahling H., Dingeldein E., Bucholtz H. W., Bucholtz M., Bachmann F.: Pharmacokinetic study of gentamycin -loaded cement in total hip replacements. Comparative effects of varying dosage. *J. Bone Jt Surg.* **66**, 175-179 (1984).
- Wang Y., Zhang L., Hu M., Liu H., Wen W., Xiao H., Niu Y.: Synthesis and characterization of collagen-chitosan-hydroxyapatite artificial bone matrix. *J Biomed Mater Res A.* **86**, 244-252 (2008).
- Winkler H., Janata O., Berger C., Wein W., Georgopoulos A.: In vitro release of vancomycin and tobramycin from impregnated human and bovine bone grafts. *J Antimicrob Chemother.* **46**, 423-428 (2000).
- Winkler H., Kaudela K., Stoiber A., Menschik F.: Bone grafts impregnated with antibiotics as a tool for treating infected implants in orthopedic surgery - one stage revision results. *Cell Tissue Bank.* **7**, 319-323 (2006).
- Winkler H., Stobier A., Kaudela K., Winter F., Menschik F.: One stage uncemented revision of infected total hip replacement using cancellous allograft bone impregnated with antibiotics. *J Bone Joint Surg Br.* **90**, 1580-1584 (2008).
- Witso E., Persen L., Loseth K., Bergh K.: Adsorption and release of antibiotics from morsolized cancellous bone. *Acta Orthop Scand.* **70**, 298-304 (1999).
- Witso E., Persen L., Loseth K., Benum P., Bergh K.: Cancellous bone as an antibiotic carrier. *Acta Orthop Scand.* **71**, 80-84 (2000).
- Witso E., Persen L., Benum P., Bergh K.: Cortical allograft as a vehicle for antibiotic delivery. *Acta Orthop.* **76**, 481-486 (2005).
- Yagmurlu M. F., Korkusuz F., Gürsel I., Korkusuz P., Ors U., Hasirci V.: Sulbactam-cefoperazone polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate (PHBV) local antibiotic delivery system: in vivo effectiveness and biocompatibility in the treatment of implant-related experimental osteomyelitis. *J Biomed Mater Res.* **46**, 494-503 (1999).

Younger A. S., Duncan C. P., Masri B. A., McGraw R. W.: The Outcome of Two-stage Arthroplasty Using a Custom-made Interval Spacer to Treat the Infected Hip. *J. Arthropl.* **12**, 615-623 (1997).

Zelken J., Wanich T., Gardner M., Griffith M., Bostrom M.: PMMA is superior to hydroxyapatite for colony reduction in induced osteomyelitis. *Clin Orthop Relat Res.* **462**, 190-194 (2007).

Zhao Y. F., Loo S. C., Chen Y. Z., Boey F. Y., Ma J.: In situ SAXRD study of sol-gel induced well-ordered mesoporous bioglasses for drug delivery. *J Biomed Mater Res A.* **85**, 1032-1042 (2008).

Zhongguo X. F., Chong J. W., Ke Z. Z.: Preparation of plastic nano-hydroxyapatite/poly (3-hydroxybutyrate-hydroxyvalerate)-polyethylene glycol gentamicin drug delivery system. **20**, 758-761 (2006).

Zilch H., Lambiris E.: The sustained release of cefotaxim from a fibrin-cefotaxim compound in treatment of osteitis. Pharmacokinetic study and clinical results. *Arch Orthop Trauma Surg.* **106**, 36-41 (1986).