

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní program: Experimentální chirurgie



MUDr. Rastislav Ballay

Biologické vlastnosti povrchů aloplastických materiálů

Biological characteristics of orthopaedic implant surfaces

Disertační práce

Školitel: Prof. MUDr. Ivan Landor, CSc.

Konzultant: Doc. MUDr. Filip Růžička PhD.

Praha 2021

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 podobností kvalifikačních prací.

V Praze, 12. 5. 2021

Podpis

Identifikační záznam:

BALLAY, Rastislav. Biologické vlastnosti povrchů aloplastických materiálů. [Biological characteristics of orthopaedic implant surfaces]. Praha, 2021. 91 stran, Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, 1. Ortopedická klinika, 1. LF UK, FN v Motole. Školitel Landor Ivan.

Poděkování

Ortopedie je obor medicíny, jehož krásu laikovi možná ukáže televizní seriál Nemocnice na kraji města, ale pro odhalení jeho tajů a hloubky vyžaduje zkušeného učitele, který Vás zasvětil do tohoto skvělého oboru a rozvine Vaše schopnosti. Já jsem měl to štěstí, že jsem na své cestě poznáním ortopedie potkal svého školitele prof. MUDr. Ivana Landora, CSc. Proto bych mu rád poděkoval za všechny cenné rady, které mi na této mé ortopedické cestě dal. Cení si především jeho ochoty být mi vždy a za všech okolností skvělým rádcem a pomáhat mi nejen s touto prací, ale i v osobním rozvoji mne, jako ortopeda.

Vzhledem k současné míře poznání by se práce neobešla bez spolupráce s řadou dalších odborníků. Proto patří poděkování též doc. MUDr. Filipu Ružičkovi, Ph.D. z Ústavu lékařské mikrobiologie MÚ v Brně za poskytnutí mikrobiální laboratoře a uvedení do tajů biofilmu. Děkuji Ing. Františkovi Denkovi za přípravu ortopedických materiálů vhodných pro testování. Dále, velké poděkování patří i Ing. Tomášovi Suchému Ph.D. z Ústavu struktury a mechaniky hornin AV ČR, za pomoc při statistickém vyhodnocení experimentálních dat a s nímž mám tu čest být členem týmu, který má za cíl najít nové materiály vhodné k použití v ortopedii. Za ovládnutí jazyka českého patří poděkování Mgr. Anně Marii Landor.

V neposlední řadě nemohu zapomenout tisícere díky za obětavost a pochopení mé manželky Olgy, která se vždy snažila vytvořit příjemné rodinné zázemí pro podporu mého pracovního a studijního života.

Obsah

Seznam použitých zkratk a symbolů	5
Abstrakt.....	5
1. Úvod a cíle práce	8
2. Popis současného stavu poznání řešeného tématu	13
2.1. Materiály používané pro ortopedické aplikace	13
2.1.1. Kovové materiály	15
2.1.2. Polymerní materiály	17
2.1.3. Keramické materiály	18
2.2. Hluboká infekce kloubních náhrad	19
2.2.1. Vznik biofilmu a „závod o povrch“	20
2.3. Úpravy povrchu materiálů.....	24
2.3.1. Morfologické modifikace povrchu.....	27
2.3.2. Fyzikálně-chemické modifikace povrchu	28
2.3.3. Modifikace pomocí bioaktivních vrstev.....	30
2.3.3.1. Keramické nástřiky	30
3. Experimentální část	41
3.1. Studované materiály.....	41
3.1.1. Výběr aloplastických materiálů.....	41
3.1.2. Příprava farmakologicky aktivních vrstev KOL/HA/ATB	42
3.2. Analytické metody	43
3.2.1. Charakterizace povrchové drsnosti aloplastických materiálů	43
3.2.2. Testování tvorby biofilmu <i>in vitro</i> na aloplastických materiálech.....	44
3.2.3. Testování citlivosti na ATB farmakologicky aktivních vrstvách.....	46
3.2.4. Statistické zpracování dat.....	48
3.3. Výsledky	49
3.3.1. Charakterizace povrchu aloplastických materiálů.....	49
3.3.2. Odolnost aloplastických materiálů vůči různým bakteriálním agens.....	54
3.3.3. Chování bakteriálních agens na různých površích aloplastických materiálů.....	59
3.3.4. Testování citlivosti na ATB farmakologicky aktivních vrstvách.....	63
3.4. Diskuze.....	65
3.4.1. Aloplastické materiály z pohledu jejich citlivosti ke kolonizaci bakteriemi.....	65
3.4.2. Farmakologicky aktivní vrstvy na bázi KOL/HA/ATB	69
4. Závěry a zhodnocení cílů a hypotéz práce	71
5. Výstupy práce autora ve vztahu k dizertaci - seznam	74
6. Použitá literatura	76

Seznam použitých zkratek a symbolů

OECD	The Organisation for Economic Co-operation and Development Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj
NRKN	Národní registr kloubních náhrad
USD	americký dolar
CoCrMo	Cobalt-Chrome-Molybdenum alloy kovová slitina na bázi kobaltu, chromu, molybdenu
FeNiCr	Iron-Nickel-Chrome alloy kovová slitina na bázi železa, niklu, chromu
Ti6Al4V	Titanium alloy slitina titanu, hliníku a vanadia
TiAlNb	Titanium alloy slitina titanu, hliníku a niobu
UHMWPE	Ultra-high-molecular-weight polyethylene, ultravysokomolekulární polyethylenu
PMMA	Polymethyl methacrylate, polymethylmetakrylát
ZrO ₂	zirconium dioxide, oxid zirkoničitý
Al ₂ O ₃	aluminium oxide, oxid hlinitý
HA	hydroxyapatite, hydroxyapatit
MPa, GPa	mega/giga pascal
CaO-P ₂ O ₅ -H ₂ O	ternar system calcium oxide-phosphorus oxide-water ternární systém oxid vápenatý-oxid fosforečný-voda
SBFs	simulated body fluids, médium simulující tělní prostředí
ATB	antibiotics, antibiotika
KOL	collagen, kolagen
%hm.	weight percentage, hmotnostní procento
EDC	N-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethylkarbodiimid hydrochlorid
NHS	N-hydroxysukcinimid
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

ABSTRAKT

Výměna kyčelního a kolenního kloubu představuje neodmyslitelnou část ortopedie. S narůstajícím počtem primárních operací ovšem narůstá také počet pooperačních komplikací. Nejčastějším důvodem je hluboká infekce totální kloubní náhrady, která patří k nejobtížněji řešitelným komplikacím této jinak velmi úspěšné operace.

První část této práce se zabývala stanovením primární odolnosti 14-ti typů nejčastěji užívaných alopatických materiálů, resp. jejich povrchových úprav vůči bakteriální kolonizaci mikrobiálními agens (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* a *Escherichia coli*). Studované materiály zahrnovaly kovové slitiny na bázi CoCrNo, FeNiCr a Ti6Al4V aplikované pro nosné části implantátu; dále polymerní a keramické materiály reprezentované ultravysokomolekulárním polyethylenem (UHMWPE) a oxidem hlinitým (Al_2O_3) využívané na konstrukce kluzných částí. Cílem bylo stanovení relací mezi povrchovou drsností a citlivostí vůči kolonizaci bakteriálními agens pro daný typ materiálu a dále sledování chování jednotlivých mikrobiálních agens na různých materiálech a posouzení jejich afinity k danému typu materiálu. Bylo zjištěno, že drsnost povrchu je určujícím faktorem při tvorbě biofilmu bez ohledu na typ materiálu v případech kmenů *E. coli*, *Enterococcus* a *P. aeruginosa*, zatímco *S. epidermis* a hlavně *S. aureus* poměrně velmi dobře adherují na všech typech materiálů bez ohledu na povrchovou drsnost materiálu. Bylo prokázáno, že *S. aureus* má vyšší afinitu spíše ke kovovým materiálům, dále také k Al_2O_3 než k UHMWPE. Další strategií, která se stále více dostává do popředí vědeckého zájmu, je pokrývání implantátů bioaktivními vrstvami, které zvyšují biokompatibilitu a osteointegraci daného implantátu a mohou také plnit antibakteriální funkci inkorporováním nebo navázáním antibiotik. Proto se druhá část předkládané práce zabývala biologickým hodnocením nanostrukturovaných kolagen-hydroxyapatitových vrstev obsahujících vankomycin a gentamicin a vytvořením korelací mezi jejich fyzikálními a biologickými vlastnostmi. Tyto kompozity s řízenou elucí antibiotik prokázaly významné snížení citlivosti vůči kolonizaci rezistentními bakteriálními kmeny. Svým složením a strukturou navíc imitují složení reálné kosti a jsou netoxické pro organismus.

Klíčová slova: Aloplastické materiály, infekce kloubních náhrad, biomateriály, bakteriální kmeny, drsnost povrchu, ortopedická chirurgie

ABSTRACT

Total hip and knee arthroplasty surgeries form an integral part of orthopaedic practice. With an increase of the primary arthroplasty surgeries performed, comes also an increase in the number of complications. The most common complications of these otherwise very successful procedures is periprosthetic joint infections which are also one of the most difficult to treat.

In the first part of the study, we evaluated the primary bacterial resistance of the 14 most commonly used materials in the construction of joint prostheses. More specifically, we concentrated on how their surface treatment resists colonisation by specific bacterial species (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* and *Escherichia coli*). The studied materials included metal alloys that are commonly used in the weight bearing parts of implants - CoCrNo, FeNiCr and Ti6Al4V - but also polymeric and ceramic materials used in the bearing materials, represented by ultra-high-molecular-weight polyethylene (UHMWPE) and aluminium oxide (Al₂O₃). Our aim was to assess the relationship between material surface roughness and the sensitivity to colonisation by specific bacterial strains and to evaluate their affinity to different materials. Previous studies have proven that the roughness of a material surface is a key factor in biofilm formation by *E. coli*, *Enterococcus* and *P. Aeruginosa* species without any differences in the type of material. Meanwhile, *S. epidermis* but mainly *S. aureus* have been shown to adhere well to all materials without any relation to their surface roughness. It has been proven that *S. aureus* has the highest affinity to metallic materials followed by Al₂O₃ and then UHMWPE. Another treatment strategy that is gaining increasing scientific interest is the covering of implants with bioactive materials which increases biocompatibility and osseointegration while also having an antibacterial function by incorporating or binding antibiotics inside them. Therefore, the second part of this presented study concerned the biological evaluation of nanostructured collagen-hydroxyapatite layers containing vancomycin and gentamycin antibiotics and finding possible correlations between their biological and physical properties. These materials with controlled antibiotic release (elution) showed minimal sensitivity to colonisation by bacterial species. Furthermore, their composition and structure mimics the composition of real bone and they are not toxic to the organism.

Keywords: Aoplastic materials, periprosthetic joint infections, biomaterials, bakterial strains, surface roughness, orthopaedic surgery

1. Úvod a cíle práce

Výměna kyčelního a kolenního kloubu zaznamenala velký pokrok, a to v celosvětovém měřítku. Podle zprávy OECD (Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj) z roku 2013 počet těchto ortopedických operací v poslední dekádě rapidně narostl. Zatímco nárůst počtu implantací náhrad kyčelního kloubu dosáhl 30 %, u výměny kolenního kloubu se tento počet dokonce zdvojnásobil. Vývojem nových operačních postupů a materiálů se z implantování kloubních náhrad stala vysoce úspěšná léčebná metoda, která prodlužuje kvalitní aktivní život našich pacientů. V České republice se počet totálních endoprotéz kyčelního kloubu rapidně zvýšil, a to z 6.902 případů v roce 2004 na 15.829 operací v roce 2018 (Národní registr kloubních náhrad (NRKN)).

Se zvyšujícím se počtem primárních operací narůstá také počet pooperačních komplikací zejména v dlouhodobém horizontu. Zvyšuje tedy i počet revizních operací, které tyto komplikace řeší. Data NRKN uvádí, že v České republice bylo v roce 2004 provedeno 1.091 revizí kyčelních kloubů a v roce 2018 se počet těchto revizí zvýšil na 1.590. Dle posledních dat NRKN z roku 2018 je 386 revizí z celkového počtu 2.293 revizí kyčelních a kolenních kloubů právě z důvodů infekčních komplikací, což činí 16,83%. I přes dodržení všech perioperačních zásad aseptiky a antibiotickou profylaxi činí incidence hluboké infekce kloubních náhrad 0,99 % (Dale et al. 2012, Lindeque et al. 2014). Ač se nejedná o vysoké procento, tyto infekční komplikace prodlužují hospitalizaci pacienta, který proto podstupuje opakovaně ortopedické výkony (Kraay et al. 2005, Toms et al. 2006). Zmistowski et al. 2013 uvádějí dokonce až pětinasobné zvýšení mortality u pacientů po revizi kloubní náhrady, a to právě z důvodů infekčních komplikací. Dalším negativním aspektem tohoto problému je nemalá ekonomická zátěž. Například v USA dosáhly náklady na řešení jednoho případu reimplantace náhrady kyčelního kloubu z důvodu infekce v průměru až 93.600 USD (Kurtz et al. 2012), tedy cca 2.150.000,- Kč. Z dat dostupných

na I. Ortopedické klinice FN Motol, stojí jen na přímých nákladech (hospitalizace, léky, operační výkon, krevní deriváty, implantáty) každá taková revizní operace okolo 400.000,- Kč. V této částce však není započítána následná rehabilitace, lázeňská léčba a náklady spojené s návratem pacienta do běžného života.

Podle prognózy vývoje počtu implantací v České republice (vztaženo pouze na náhrady velkých kloubů) vypracované Českou společností pro biomechaniku dojde do roku 2050, s ohledem na demografický vývoj, k nárůstu počtu implantací kloubů přibližně o 100 % (Jelen 2014). Dá se předpokládat, že tento nárůst s sebou přinese rovněž zvýšení počtu případů pooperačních komplikací. Společenská poptávka po trendu zvyšování kvality života v nemoci i v pokročilém věku je výzvou pro materiálové inženýry, farmakology a lékaře při vyvíjení nových materiálů a léčebných postupů. Proto problematika infekcí totálních kloubních náhrad získává stále více na významnosti, a to jak v ortopedické praxi, tak i v celospolečenském měřítku.

Hlavní a dílčí cíle práce

Bakteriální kolonizace povrchu implantátu byla popsána již v 80. letech 20. století. Následná tvorba biofilmu na povrchu implantátu je považována za klíčový moment patogeneze infekce kloubních náhrad. Citlivost jednotlivých materiálů, z nichž se endoprotézy vyrábí, k bakteriální kolonizaci je různá. Na základě provedené literární rešerše v této oblasti výzkumu je možné konstatovat, že literatura porovnává jen některé typy materiálů, a navíc s malým počtem mikrobiálních agens. Není tedy možné stanovit výčet míry rizika jednotlivých materiálů a jejich povrchových úprav v unifikovaném prostředí tak, aby bylo možno komplexně porovnat citlivost těchto materiálů ve vztahu ke kolonizaci.

Cílem této předkládané práce je testování 14 typů nejčastěji užívaných aloplastických materiálů *in vitro* v jednotných podmínkách mikrobiologické laboratoře a stanovení primární odolnosti jednotlivých aloplastických materiálů vůči bakteriální kolonizaci ve vztahu k jejich různým povrchovým úpravám. Studium zahrnuje testování kovových slitin na bázi CoCrMo, FeNiCr a Ti6Al4V a jejich aplikaci na nosnou část implantátu. Předmětem testování jsou také polymerní a keramické materiály reprezentované ultravysokomolekulárním polyethylenem a oxidem hlinitým, které se využívají na konstrukce kluzných tj. artikulačních částí, tj. artikulační vložky kloubní jamky a kloubní hlavice. Studované materiály jsou testovány ve formě různých užívaných povrchových úprav a s cílenou kontaminací mikrobiálními agens, která se nejčastěji vyskytují při hlubokých infekcích totálních náhrad (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* a *Escherichia coli*). Jsou to zástupci jednotlivých skupin významných z hlediska klinické mikrobiologie, které jsou spojené se schopností tvořit biofilm a způsobovat infekce

implantátů. Současně jsou to kmeny, u nichž je dobře znám způsob tvorby biofilmu a jsou vypracovány modely pro práci s jejich biofilmem.

Mezi další strategie, které se stále více dostávají do popředí vědeckého zájmu, patří pokrývání implantátů bioaktivními vrstvami. Tyto vrstvy mají za úkol zlepšení biokompatibility a zvýšení osteointegrace daného implantátu, dále mohou být rovněž farmakologicky aktivní a plnit např. antibakteriální funkci inkorporováním nebo navázáním antibiotik, antiseptik, organických molekul nebo anorganických iontů.

Důraz je kladen na statistické vyhodnocení všech provedených analýz a jejich interpretaci. Na základě poznatků z odborné literatury a klinické praxe o aplikačních vlastnostech těchto používaných materiálů jsem si stanovil následující hypotézy:

- drsnost povrchu je určujícím faktorem při tvorbě biofilmu bez ohledu na typ materiálu,
- hodnocení citlivosti povrchu jednotlivých typů aloplastických materiálů vůči bakteriální kolonizaci s použitím pouze jednoho typu bakteriálního agens může být zavádějící, a proto je nutné ke komplexnímu hodnocení použít více typů bakteriálních izolátů
- citlivost vůči kolonizaci je možné významně snížit nanesením farmakologicky aktivní vrstvy na povrch materiálů, které imitují složení a strukturu reálné kosti a jejichž osteointegrační potenciál je přes zvýšenou afinitu k infekci pro vývoj aloplasty nepostradatelný.

Za hlavní cíl si tato disertační práce klade potvrzení výše uvedených hypotéz, a to především pomocí experimentální analýzy, která zahrnuje studium fyzikálních a biologických vlastností daných materiálů. K dílčím cílům této disertační práce, které mají přispět k potvrzení stanovených hypotéz, patří:

- stanovení relace mezi povrchovou drsností a citlivostí vůči kolonizaci bakteriálními agens pro daný typ materiálu,
- sledování chování jednotlivých mikrobiálních agens na různých materiálech a posouzení jejich afinity k danému typu materiálu,
- biologické hodnocení elektrostaticky zvlákněných kolagen-hydroxyapatitových vrstev obsahujících vankomycin a gentamicin,
- vytvoření korelace mezi fyzikálními vlastnostmi a výsledky testů biologického hodnocení (*in vitro*).

Předkládaná disertační práce je uspořádána do čtyř základních kapitol. Po obecném úvodu a definování cílů práce následuje teoretická část, která se zabývá popisem a charakteristikou materiálů používaných v konstrukci kloubních náhrad. Dále se tato část věnuje hluboké infekci kloubních náhrad, infekčním agens a mechanismem jejich působení. Následující část se zaměřuje na možnosti prevence infekce v průběhu perioperačního období, a to pomocí pasivních a aktivních povrchových úprav implantátů. Třetí kapitola popisuje průběh samotné experimentální práce – studované materiály, použité analytické metody, dosažené výsledky a diskuze. Závěrečná, čtvrtá kapitola shrnuje zhodnocení cílů a hypotéz práce.

2. Popis současného stavu poznání řešeného tématu

2.1. Materiály používané pro ortopedické aplikace

Jedním ze zakladatelů alopplastiky kyčelního kloubu byl britský chirurg John Charnley, který jako první již v roce 1962 zkonstruoval a použil jamku z ultravysokomolekulárního polyethylenu (UHMWPE) v kombinaci s kovovým dříkem zavedeným do stehenní kosti. Zásadní inovací bylo to, že komponenty byly fixovány kostním cementem na bázi polymethylmetakrylátu (PMMA). V bývalém Československu byla první endoprotéza této „klasické“ konstrukce, implantována v roce 1969.

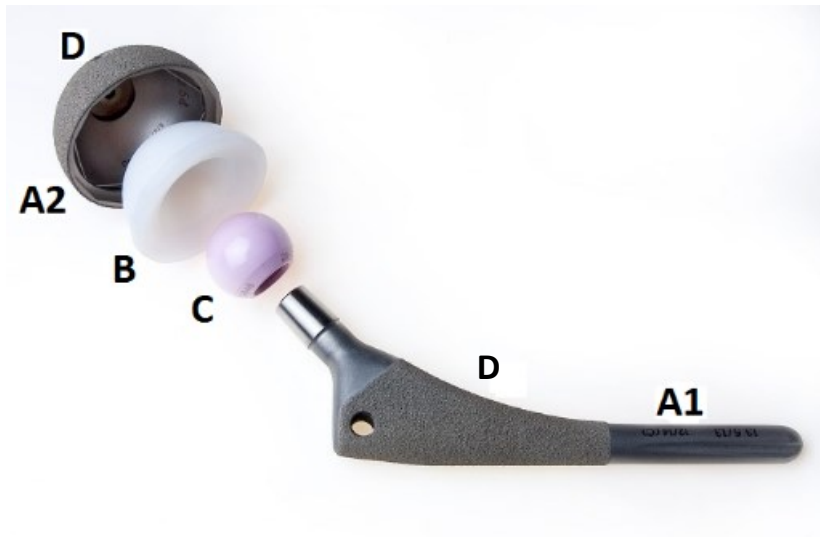
Při konstrukci a vývoji implantátů je kladen důraz na mechanické vlastnosti (pevnost, pružnost, tažnost). Z hlediska výroby je důležitá zpracovatelnost do požadovaného tvaru. Těmto požadavkům, co se týče nosných částí implantátu (Obr. 1A), vyhovují v současnosti hlavně následující tři skupiny kovových materiálů (Gurappa 2002):

- 1) austenitické korozivzdorné oceli - FeCrNi, FeCrNiMo
- 2) kobaltové slitiny - CoCrMo, CoCrNiMo
- 3) titan a jeho slitiny TiAlV, TiAlNb

Polymery, jako již výše zmíněný UHMWPE, a keramické materiály na bázi oxidu zirkoničitého (zirkonia – ZrO_2) nebo oxidu hlinitého (alumina - Al_2O_3) jsou využívány na konstrukci kluzných částí, tj. artikulační vložka kloubní jamky (Obr. 1B) a kloubní hlavice (Obr.1C). Další z řady keramických materiálů je hydroxyapatit (HA), který je aplikován především ve formě nástřiku na klasické kovové materiály ke zvýšení osteointegračního potenciálu implantátu (Obr. 1D).

Tyto materiály se vzájemně liší jak v chemickém složení, tak v mechanických charakteristikách (Tab. 1). Nicméně všechny vykazují optimální vlastnosti (biokompatibilita, modul pružnosti a odolnost proti otěru) pro specifické biomedicinální

aplikace. Velmi klíčová je z pohledu biomateriálů jejich korozní odolnost a biologická kompatibilita (Hanawa 2002).



Obr. 1. Příklad kyčelního primoimplantátu od firmy BEZNOSKA s.r.o.

(<http://www.beznoska.cz/product/necementovany-drik-tep-kycelniho-kloubu-typ-sf/>)

- A1) Cervikokapitální necementovaný dřík typu SF z titanové slitiny Ti6Al4V
- A2) Plášť necementované jamky typu SF z titanu
- B) Artikulační vložka necementované jamky typu SF z UHMWPE
- C) Kloubní hlavice z keramického materiálu BIOLOX[®] delta od firmy CeramTec – směsný disperzní keramický materiál na bázi aluminu a zirkonia
- D) Bioaktivní HA nástřík pro sekundární fixaci osteointegrací

Tabulka 1. *Mechanické vlastnosti kosti a materiálů používaných pro ortopedické aplikace (Helsen a Breme 1998, Bohner 2000, Black a Hastings 1998, Malito et al. 2019, https://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=1341#_Fracture_Toughness).*

Materiál	Youngův modul (GPa)	Pevnost v tahu (MPa)	Pevnost v tlaku (MPa)	Lomová houževnatost (MPa.m^{1/2})
Kost <i>kortikální</i>	14 – 20	50 – 150	170 – 193	2 – 12
<i>spongiózní</i>	0,05 – 0,5	10 – 20	7 – 10	0,1
Austenitická ocel	190	500 – 950	600	112 – 278
Kobaltová slitina	210	665 – 1277	655	120 – 150
Titanová slitina	120	860 – 1140	860	60 – 100
Titan	110	300 – 740	550	
Alumina	390	310	3900	5,2
Zirkonia	205	420	3000	12
Hydroxyapatit	80 – 110	50	400 – 900	0,7 – 1,2
UHMWPE	0,88	35 – 40	–	4,4 – 6,4

2.1.1. Kovové materiály

Austenitické korozivzdorné oceli obecných vzorců FeCrNi, FeCrNiMo obsahují legující prvky, kterými jsou nikl (Ni), molybden (Mo), mangan (Mn) a křemík (Si). Jejich použité množství musí být správně vyváženo, aby bylo docíleno austenitické struktury. Základním typem austenitických korozivzdorných ocelí je ocel obsahující 18 % chromu (Cr), 9 % niklu při obsahu uhlíku kolem 0,08 %, popřípadě obsahuje od 9 do 19 % manganu s možnou kombinací příměsí dusíku až do 0,5 %, jako náhradou za nikl. Úpravou chemického složení, co do obsahu uhlíku tak i legujících prvků, lze u austenitických korozivzdorných ocelí vylepšit mechanické vlastnosti, obrobitelnost nebo odolnost proti

praskání svarů, dále celkovou korozní odolnost, odolnost proti mezikrystalové, bodové a štěrbinové korozi a odolnost proti koroznímu praskání (Steinemann 1999).

Slitiny na bázi kobaltu jako CoCrMo (Aherwar et al. 2016) jsou využívány po mnohá desetiletí díky svým korozivzdorným vlastnostem, které souvisí s povrchovou pasivací (Valero-Vidal et al. 2012). V současnosti jsou využívány v případech variant kluzné části kov na kov. Základním prvkem je kobalt (Co), dále obsahují 25 – 30 hm. % chromu (Cr) a obsah molybdenu (Mo) se pohybuje kolem 6 hm. % (Toh et al. 2018).

Titan a jeho slitiny TiAlV, TiAlNb. Pro řadu aplikací nejsou mechanické vlastnosti čistého titanu dostatečné, proto se používají jeho slitiny. Ty patří v současné době k nejpoužívanějším materiálům při konstrukci ortopedických a dentálních implantátů. Stále frekventovaněji používané jsou slitiny s obecným vzorcem TiAlV (Elias et al. 2008), původně vyvinuté pro letecký a kosmický průmysl. Nejčastěji používaná je slitina Ti6Al4V. Existují 4 stupně čistoty v závislosti na obsahu železa a kyslíku. Excelentní korozní odolnost je dána snadnou tvorbou přirozeně odolné pasivní vrstvy oxidů titanu. Právě tato vrstva, jejíž tloušťka se pohybuje kolem 4 nm, je zodpovědná nejen za chemickou stabilitu, netečnost, korozní rezistenci ale také za biokompatibilitu (Kirmanidou et al. 2016). Titanové slitiny se vyznačují dobrými mechanickými vlastnostmi, především kombinací vysoké pevnosti s nízkou měrnou hmotností. Jak je patrné z Tabulky 1, hodnota Youngova modulu pružnosti titanu a jeho slitin se více blíží kosti, než je tomu v případech austenitické oceli a kobaltových slitin. Titanové slitiny na rozdíl od nich dokáží lépe redukovat „stress-shielding“ (nevhodný přenos napětí na kostní tkáň). Snížený přenos napětí v důsledku vede ke snižování kostní hmoty v periprotetické oblasti a riziku uvolnění implantátu nebo zvýšené náchylnosti ke zlomeninám. V porovnání s kobaltovými slitinami však vykazují horší frikční a otěrové vlastnosti. Proto

nejdou příliš využívány v případech, kdy je požadována vyšší tvrdost a otěrová odolnost (Dolinar et al. 2018).

2.1.2. Polymerní materiály

Kovová nebo keramická hlavice totální endoprotézy se pohybuje v polymerní jamce. Ta je vyráběna ze speciálního polymeru – ultravysokomolekulárního polyethylenu (UHMWPE), který je v současnosti považován za zlatý standard mezi materiály používanými v ortopedické praxi (Sobieraj a Marwin 2018). UHMWPE představuje nejzatěžovanější, a tudíž nejopotrebovanější část kloubní náhrady. K poškození polymeru dochází především dvěma mechanismy:

1. otěrem
2. oxidativní degradací

1) Při pohybu kovové či keramické komponenty v jamce se z povrchu UHMWPE uvolňují mikročástice, které stimulují zánětlivou reakci. Tento proces se často označuje jako polyetylenová choroba s tvorbou polyetylenového granulomu. Proces imunitní reakce je velmi složitý a vede ve finální fázi k aktivaci osteoklastů, které způsobují osteolýzu v okolí implantátu. Ta v důsledku vede k uvolnění fixační komponenty a tvorbě defektů kostního lůžka.

2) Oxidativní degradace je charakterizována reakcí volných radikálů polymeru (které vznikají účinky ionizujícího záření v průběhu modifikace polyethylenu s kyslíkem. Tyto reakce vedou ke štěpení řetězců polyethylenu a zhoršuje se jeho pevnost. Stav může v krajním případě vést až k desintegraci jamky. V každém případě však oxidativní degradace akceleruje proces otěru a dochází tak k rychlejšímu opotřebení komponenty. Zbytkové radikály se odstraňují tepelnou úpravou v inertní atmosféře za přesně definovaných podmínek nebo přidáním stabilizátoru (nejčastěji vitamínu E). Posledním krokem úprav je sterilizace, zde je důležité zvolit správný sterilizační postup (Kinnari et al. 2010). Vhodná

kombinace ozařování, tepelných úprav a sterilizačních postupů je klíčem k přípravě modifikovaného UHMWPE, který zajistí jeho vyšší životnost (Pokorný et al. 2016). V současné době se stále více objevují práce zabývající se chemickou modifikací UHMWPE pro zvýšení jeho oxidační a otěrové rezistence. Galliera et al. 2019 použili vitamín E (α -tokoferol), který má na chromanovém kruhu jednu hydroxylovou skupinu, která je donorem vodíkových protonů. Přenesením vodíku z fenolové skupiny na volný peroxiradikál (vznikající v molekule UHMWPE radiací) dochází k blokaci radikálové řetězové reakce. Ren et al. 2019 použili jako antioxidant polyfenoly obsažené v čaji, u kterých prokázali, vyšší antioxidační kapacitu v porovnání s vitamínem E. Jinou strategií využili Salari et al. 2019, kteří přidali do UHMWPE nanočástice hydroxyapatitu a zirkonia (oba 10 hm.%). Takto připravený nanokompozit vykázal nárůst pevnosti o 45% a redukci frikčního koeficientu až o 64%.

2.1.3. Keramické materiály

Keramické materiály našly své uplatnění v ortopedii díky výborným mechanickým vlastnostem a vysoké otěrové rezistenci (Zeng 2008). Mezi nejvíce používané materiály, pro kluzné části totální endoprotézy v podobě keramické hlavice, patří alumina (Zeng 2008). Vysoce kvalitní materiál medicínské třídy (medical grade) byl postupně vyvíjen od 70. do 90. let 20. století, kdy dosáhl požadovaných mechanických vlastností. V určitých případech je používána oxidová smíšená nebo disperzní keramika, která se připravuje ze směsí různých základních typů keramických materiálů určených konkrétně pro vylepšení a optimalizaci určitých vlastností (<http://www.beznoska.cz/product/necementovany-drik-tep-kycelniho-kloubu-ty-p-sf/>). Mezi příklady patří oxid zirkoničitý zesílený oxidem hlinitým (ATZ) a oxid hlinitý zesílený oxidem zirkoničitým (ZTA). Jedním z pozitivních efektů zesílení jednoho oxidu druhým je dosažení lepších pevnostních vlastností. Existují

materiály ZTA, které dosahují pevnosti v ohybu 1350 MPa a pevnosti v tlaku přes 4700 MPa.

Jiné možnosti použití keramických materiálů v bioimplantologii je jejich aplikace ve formě nástřiků na povrch implantátu. Nejčastěji používané jsou kalcium fosfáty, založené na ternárním systému $\text{CaO-P}_2\text{O}_5\text{-H}_2\text{O}$ (Dorozhkin 2009), které jsou reprezentovány především HA. Tyto biokeramické materiály obecně vykazují vysokou křehkost, přibližně o dva řády nižší hodnoty lomové houževnatosti v porovnání s kovovými materiály (viz. Tab.1). Jejich použití pro vysoce-zátěžové aplikace je silně limitováno. Díky svému složení a struktuře, které imitují kostní minerál, vykazují vysokou biokompatibilitu. Proto jsou aplikovány především ve formě nástřiku na místa kovových částí implantátu, která jsou ve styku s kostní tkání pro zvýšení jeho osteointegrace (Dorozhkin 2011). Nejčastěji bývá v podobě nástřiku aplikován právě HA (Dorozhkin 2012), jehož první použití se datuje do roku 1976 (Sudo et al. 1976).

V praxi se můžeme setkat s řadou nepříznivých efektů, které limitují životnost implantovaného materiálu, jako je infekce, aseptické uvolnění nebo nedostatečné vhojení (osteointegrace) implantátu.

2.2. Hluboká infekce kloubních náhrad

Pacient podstupující implantaci jakéhokoli protetického implantátu je vystaven riziku infekce. Kolonizace a následně rozvoj hluboké infekce je jeden z nejzávažnějších problémů spojený s implantologií. Problematiku infekce kloubních náhrad je možné studovat z různých hledisek jako etiologie, patogeneze, lokalizace, délka trvání, rozsah, mikrobiální etiologie a další. Při revizích kloubních náhrad jsou u 48 % až 56 % pozitivních nálezů identifikovatelné *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus epidermidis* (Garvin et al. 1999). U dalších testovaných mikrobů *Pseudomonas aeruginosa*,

Enterococcus faecalis a *Escherichia coli* se frekvence výskytu pohybuje v rozmezí 3 % až 5 % pozitivních kultivací. (Aggarwal et al. 2014, Sinha 2002). Tyto mikroby zároveň patří i mezi nejčastější příčiny infekce kloubních náhrad na našem pracovišti (Jahoda et al. 2000, Jahoda et al. 2004).

2.2.1. Vznik biofilmu a „závod o povrch“

Již v 80. letech minulého století popsal Gristina et al. (Gristina a Costerton 1985, Gristina 1987) bakteriální kolonizaci povrchu implantátu. V roce 1988 (Gristina et al. 1988) navrhl koncept: *“race for the surface – závod o povrch”*, ve kterém soutěží hostitelské buňky s bakteriemi o to, kdo dříve povrch obsadí. Model však bývá často kritizován, neboť bere v úvahu celou škálu zjednodušení, statické podmínky a vykazuje nízkou kapacitu pro predikci infekce v konkrétním případě. Kolonizace povrchu je mnohem komplikovanější a doposud není plně objasněna (Costerton et al. 1999, Costerton et al. 2005, Foster et al. 2014, Katsikogianni a Missirlis 2010, Laverty et al. 2013, Stoodley et al. 2011). Faktory, které celý proces ovlivňují, jsou přehledně uvedeny v Tabulce 2 (Campoccia et al. 2013).

Proces kolonizace má dvě základní fáze: reverzibilní a ireverzibilní. První (vratná) fáze je mechanicky a biologicky méně stabilní než fáze ireverzibilní. Interakce v této fázi jsou nespecifické a závisí na vlastnostech povrchu implantovaného materiálu a adhezinech bakterií (viz. Tab.2). Fáze ireverzibilní (adhezivní) se týká molekulárních a buněčných interakcí blízce spřízněných s expresí specifických genů navázaných bakterií (Laverty et al. 2013) pro vytvoření prvotní ochranné bariéry (hlen), která následně vede k vytvoření biofilmu (Foster et al. 2014). Biofilm je tvořen bakteriálními buňkami, které jsou navzájem propojeny hostitelskými proteiny (kolagen, fibrin, proteoglykany) a uloženy v extracelulární matrix polysacharidového charakteru vytvořené bakteriálními buňkami, tzv. *glykokalyx*.

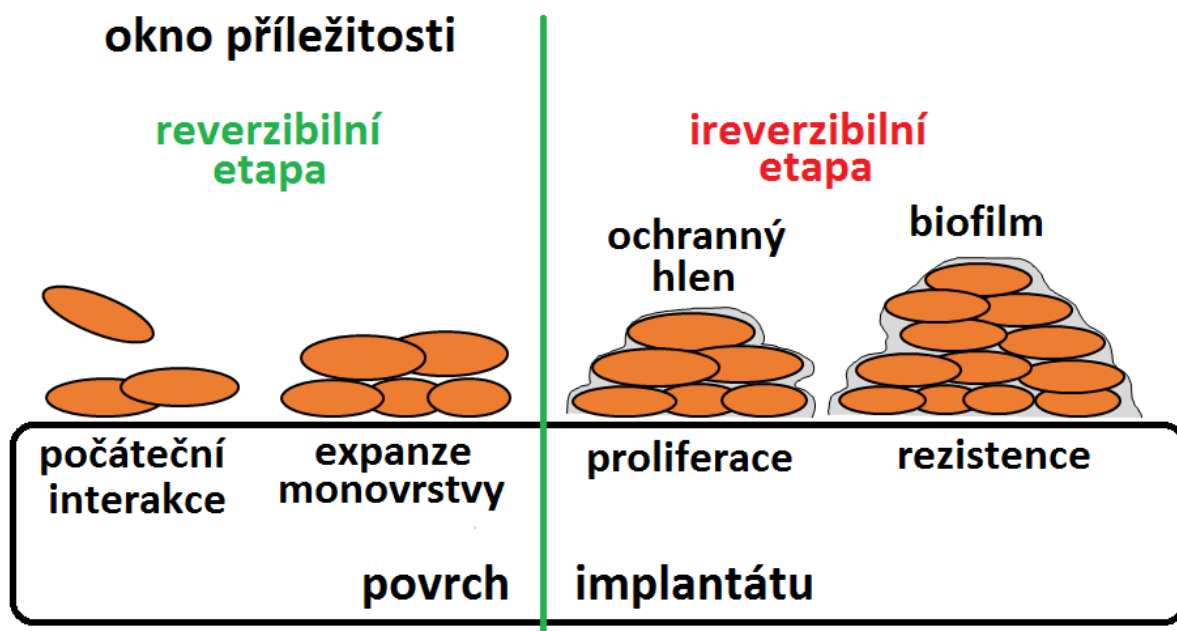
Tabulka 2. Faktory ovlivňující adhezi a kolonizaci bakterií na povrchu biomateriálu (Campoccia et al. 2013).

<p>Fyzikálně-chemické vlastnosti materiálu implantátu</p>	<p>Makro- a mikroporosita</p> <p>Mikro- a nanodrsnost</p> <p>Povrchová energie</p> <p>Hydrofilita</p> <p>Hydrofobicita</p> <p>Polární a nepolární funkční skupiny</p> <p>Funkční skupiny se specifickou aktivitou</p> <p>Stupeň hydratace</p>
<p>Podmínky prostředí</p>	<p>Složení elektrolytu</p> <p>pH</p> <p>Teplota</p> <p>Proteiny a adheziny hostitele</p> <p>Viskozita</p> <p>Rychlost toku média</p>
<p>Patogeny</p>	<p>Gram pozitivní a gram negativní</p> <p>Genotyp</p> <p>Tvar bakterie</p> <p>Povrchová energie</p> <p>Typ kmene a specifikace expresních adhezínů</p>

Bakterie v biofilmu spolu navzájem komunikují pomocí látek blízkých hormonům a vytvářejí signální systém nazývaný „**quorum sensing**“. Již prvotní ochranná bariéra a následně i biofilm způsobují nejen rezistenci bakterií vůči imunitnímu systému hostitele, ale komplikují i průnik antimikrobiálních a výživových látek do kosti (Fux et al. 2005). Reverzibilní fáze je tedy jakési časové „**okno příležitosti**“ pro inhibici vytvoření

bakteriálního biofilmu a nasměrování osteointegrace a hojení k pozitivnímu vývoji, viz.

Obr. 2 (Gallo et al. 2014, Katsikogianni a Missirlis 2004, Vuong a Otto 2002).



Obr. 2. Model tvorby biofilmu na povrchu implantátu; adaptováno dle (Gallo et al. 2014, Katsikogianni a Missirlis 2004, Vuong a Otto 2002).

Rovněž funkce mezenchymálních buněk v procesu osteointegrace není plně pochopena. Předpokládá se, že hostitelské buňky navázané na povrchu implantátu řídí celý proces tak, aby došlo k regeneraci a remodelaci kostní tkáně a zabránění bakteriální kolonizaci (Busscher et al. 2012).

Nicméně ani úspěšná osteointegrace není zárukou eliminace dlouhodobého přežití bakteriálních kolonií. Mezi nejčastější bakteriální agens způsobující infekci kloubních náhrad patří *Staphylococcus aureus*, který se vyznačuje vysokou metabolickou aktivitou a bohatou enzymatickou výbavou. Vytváří širokou řadu extra a intracelulárních faktorů, které umožňují jeho vysokou adaptabilitu (Nish a Medzhitov 2011). *Staphylococcus aureus* vykazuje rovněž vysokou schopnost adherence k extracelulárním proteinům, což je rozhodujícím faktorem vedoucím k časně a rychlé kolonizaci. Druhá skupina faktorů, jako

jsou *protein A* a *leukocidin*, mu pomáhá paralyzovat vlastní obranyschopnost hostitele. Třetí skupina faktorů (*enterotoxin*, *exfolianty* apod.) spolu s výše zmíněnými umožňují *Staphylococcus aureus* pronikat do buněk hostitele, kolonizovat tkáně a persistovat v těchto tkáních i po odeznění bakteriémie. Dle Bosse et al. (Bosse et al. 2005) je schopen tento *Staphylococcus aureus* přežít v kulturách osteoblastů mnoho let a tento způsob přežívání se nazývá “**Internalization of Bacteria by Osteoblasts**“. K dlouhodobému přežívání dochází v jeho metabolicky alterovaném stavu, tzv. „**small colony variants**“ a při jakémkoliv oslabení organismu pacienta může docházet k uvolňování bakterií z osteoblastů a způsobovat rekurenci chronické osteomyelitidy. K dalším významným patogenním bakteriálním kmenům patří *Staphylococcus epidermidis*, G+ kok typický původce katérových sepsí, a mj. subakutních infekcí implantátů, která má souvislost s „aseptickým uvolněním“. *Pseudomonas aeruginosa*, zástupci G- nefermentujících bakterií spojovaných s tvorbou biofilmu. Tato skupina bakterií je obecně spojená s větší odolností k antibiotikům. *Enterococcus faecalis*, další zástupce G+ koků, typický původce infekcí močových katétrů, podíl na infekcích dalších implantátů *Escherichia coli* zástupci G-bakterií, které jsou součástí normální mikroflóry a současně jsou spojované s tvorbou biofilmu.

Strategie prevence infekce v průběhu perioperačního období v podobě systematické a lokální profylaxe je v klinické praxi velmi dobře implementována (Legout a Senneville 2013, Hernigou et al. 2010, Grammatopoulos et al. 2017, Cobb et al. 2020). Strategie zahrnující použití antiseptických a antibakteriálních povrchů implantovaných materiálů je technologie, která se začala rozvíjet již před 30 lety (Gristina et al. 1988). Antibakteriální povrchy je možné kategorizovat do 3 skupin (Romanó et al. 2015):

- 1) perioperační antibakteriální lokální nosiče nebo povrchy, např. kostní cementy;

- 2) pasivní povrchová modifikace, která zahrnuje modifikaci morfologickou (viz. kapitola 2.3.1.) a fyzikálně-chemickou (viz. kapitola 2.3.2.);
- 3) aktivní povrchová modifikace pomocí bioaktivních vrstev s implementovanými léčivy (viz. kapitola 2.3.3.).

Materiálové inženýrství poskytuje velký prostor pro vývoj biokompatibilních materiálů s antibakteriálními povrchy (Chen et al. 2013), které je možno použít v případech s odůvodněným očekáváním zánětlivé reakce; zejména v případech pacientů se známým zánětem v oblasti kloubu, systémovým zánětem, endokarditidou nebo pro pacienty se sníženou imunitou (Berbari et al. 2012). Neustále rozvíjející se technologie v oblasti materiálového inženýrství, jako např. 3D tisk, spolu s technologiemi v oblasti biochemického inženýrství, umožňují „ušít“ implantát pacientovi na míru (Jahanmard et al. 2020)

Výsledky mnoha klinických a preklinických studií prokázaly, že kombinace materiálu implantátu spolu s jeho designem (velikost, topografie, povrchová úprava) je určující pro jeho náchylnost k infekci (Moriarty et al. 2010). Romanó et al. (Romanó et al. 2015) definoval ideální charakteristiky budoucích antibakteriálních povrchů. Ty by měly mít antibakteriální účinky vůči širokému spektru mikroorganismů a nízkou lokální nebo systematickou toxicitu spolu s podporou hojení kosti. Dále by měly být cenově dostupné a měly by vykazovat optimální zpracovatelnost a dobrou manipulaci.

2.3. Úpravy povrchu materiálů

Pasivní modifikace povrchu je založena na filozofii, že morfologická či fyzikálně-chemická modifikace povrchu implantovaného biomateriálu může redukovat schopnost bakterií adherovat k povrchu a následně tak minimalizovat pravděpodobnost formování biofilmu. Tyto modifikace jsou realizovány bez následného plánovaného uvolňování

bakteriostatických nebo bakteriocidních agens do okolní tkáně. Povrchové úpravy mají za cíl dosažení optimálních biologických a mechanických vlastností povrchu biomateriálu spolu se zachováním jeho původních vlastností ve zbytku objemu materiálu.

Mikrobiální zánět u implantátu může způsobit tzv. septické uvolnění (Koudela et al. 2010). Naproti tomu aseptické uvolnění může být způsobeno otěrovými mikročásticemi materiálu uvolněnými při každodenním mechanickém zatížení nebo sníženou osteointegrací samotného implantátu. Otěrové částice způsobují aktivaci buněk imunitního systému způsobující zánět s následnou stimulací osteoklastů vedoucí k osteolýze. Pro zvýšení fixace v obou těchto případech je možné provést modifikaci povrchu endoprotézy cestou změny morfologie povrchu či jeho modifikaci fyzikálně-chemickou cestou. Tyto povrchové úpravy uplatňují svůj vliv nejen při zvyšování fixace, ale mají rovněž významný vliv na adhezi a kolonizaci povrchu bakteriemi (Rochford et al 2012, Gallo et al. 2014). Je všeobecně známo, že různé aloplastické materiály mají různou náchylnost k bakteriální kolonizaci. Proces adheze zahrnuje celou škálu fyzikálně-chemických interakcí mezi substrátem a mikroorganismem, jak vyplývá z Tab. 2

Bakteriální adheze k povrchu materiálů se skládá z počáteční fáze přiblížení k povrchu materiálu, následované adhezí a poté navázáním bakterie k povrchu (Rijnaarts et al., 1995). Obecně, bakterie raději rostou na dostupných površích než v obklopující vodné fázi. Bakterie se samy pohybují k povrchu materiálu nebo jsou transportovány pomocí fyzikálních sil jako jsou Brownův pohyb, van der Waalsovy přitažlivé interakce, gravitační síly, účinek povrchového elektrostatického náboje nebo hydrofobní interakce. Fyzikální interakce je možné dále klasifikovat podle dosahu (Gottenboset al., 2002). Interakce dlouhého dosahu (nespecifické, vzdálenosti > 50 nm) mezi buňkami a povrchy jsou popsány vzájemnými silami, které jsou funkcí vzdálenosti a volné energie. Interakce s krátkým dosahem se uplatňují při těsném kontaktu (< 5 nm) a lze je rozdělit na interakce

chemické (např. vazba vodíková, iontová) a dipólové interakce a hydrofobní interakce (Mayer et al., 1999). Hydrofobní interakce se uplatňují v případě nepolárních skupin, které mají tendenci se ve vodných roztocích spojovat.

Bakteriální pohyb může být ovlivněn rovněž chemotaxí nebo haptotaxí (Brunk et al. 2016). Chemotaxe je pohyb ve směru chemického gradientu; do prostředí obsahujícího vyšší koncentraci benefiční nebo nižší koncentraci toxické látky, zatímco haptotaxe je pohyb k povrchově navázaným chemickým faktorům, např. aminokyseliny, sacharidy, atd. Toto „zahajovací“ připojení bakterií k povrchům je počáteční fází adheze, která dále umožňuje molekulární nebo buněčnou fázi adheze.

Navzdory významu bakteriální adheze není její mechanismus stále úplně objasněn. Obecně je mechanismus bakteriální adheze popisován z hlediska teorie Derjaguin – Landau – Verwey – Overbeek (Hori and Matsumoto, 2010). Tento model popisuje mikroorganismy zjednodušeně jako inertní, hladké, koloidní a geometricky pravidelné mikročástice, zatímco ve skutečnosti bakteriální membrána vykazuje komplexní heterogenní strukturu (např. přítomnost lipopolysacharidů, adhezínů apod). Bakteriální buňky a většina povrchů jsou při neutrální hodnotě pH negativně nabitě. Uplatňují se tedy převážně elektrostaticky repulsivní interakce a zvyšují se se vzrůstajícím negativním nábojem bakteriálních buněk nebo povrchu a poklesem iontové síly média. Důležitou vlastností povrchů je jejich hydrofilita nebo hydrofobita. Obecně platí, že hydrofobní bakterie preferují hydrofobní povrchy (van Loosdrecht et al. 1987a), zatímco hydrofilní bakterie preferují hydrofilní povrchy (Stenström 1989). Van Loosdrecht et al. 1987b prokázali, že hydrofobní bakterie adherují snáze a ve větším míře než bakterie hydrofilní.

Polarita povrchu, stejně tak jako jeho hydrofilita nebo hydrofobita souvisí s výskytem funkčních skupin. Funkční skupiny obsahující kyslík, jako např. –OH, –COH, –COOH mohou být v materiálu přítomny z výroby nebo mohou vznikat během sterilizace.

Mohou být také záměrně vytvářeny v případech povrchové modifikace. Zavedením těchto funkčních skupin, jakožto donorů elektronů, se zvyšuje polarita povrchu a narůstá jeho hydrofilita. Tyto vlastnosti mají, v konečném důsledku, významný vliv na adhezi bakterií k danému materiálu (Song et al. 2015).

Povrchy anorganických materiálů, jako jsou kovy a keramika, spíše jsou hydrofilní, mají vysokou povrchovou energii a spíše negativní náboj. Polymery jsou naopak spíše hydrofobní s nízkou povrchovou energií (An a Friedman 1998).

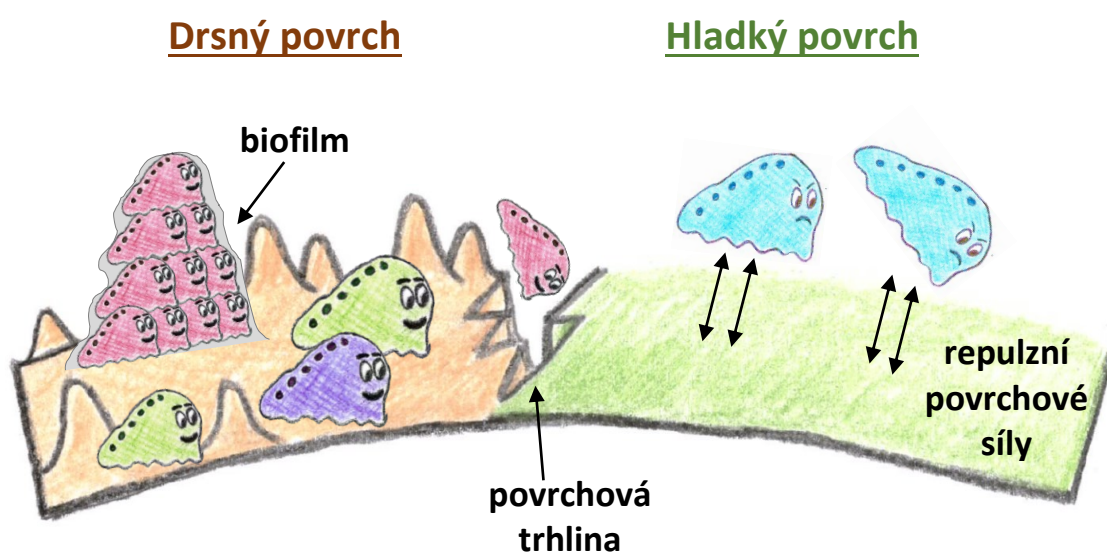
Hallab et al. 2001 prokázali, že povrchová energie je z hlediska náchylnosti materiálu k bakteriální adhezi důležitějším faktorem než jeho povrchová drsnost. Stejně tak afinita daného bakteriálního kmenu k různým materiálům může být rozdílná. Např. *Staphylococcus aureus* adheruje snáze ke kovům, zatímco *Staphylococcus epidermidis* k polymerům (Barth et al. 1989).

2.3.1. Morfologické modifikace povrchu

Morfologická modifikace, kdy dochází ke změně topografie a následně tak drsnosti povrchu, zahrnuje procesy jako leštění, kartáčování a tryskání. Tryskání se provádí v mnoha modifikacích. Jedním z nich je pískování, což je technologický postup opracování povrchu, obvykle u tvrdých materiálů, proudem natlakovaných abrazivních částic. Tváření povrchové vrstvy pomocí otryskávání kulovitými částicemi tryskačního prostředku je známé pod názvem kuličkování, konkrétně brokování (při použití kovových kuliček) nebo balotínování (při použití kuliček skleněných či keramických). K nejvýznamnějším parametrům ovlivňujícím konečný výsledek patří zejména úhel (50 až 80°) a rychlost dopadu částic (až 150 m.s⁻¹), doba tryskání a v neposlední řadě také rozměr, tvar, hmotnost a materiál tryskaných částic. Nevýhodou extrémně malých částic je, že mohou na tryskaném povrchu zůstat a kontaminovat jej.

2.3.2. Fyzikálně-chemické modifikace povrchu

Povrchová topografie a drsnost jsou klíčové faktory při kolonizaci povrchu bakteriálními koloniemi. Povrch s porézní strukturou a povrch se standardní mikrodrsností vykazují větší afinitu k adhezi bakterií než v případě varianty stejného materiálu s povrchem hladkým s nižší drsností (Cordero et al. 1994, Harris et al. 2007). Aktivní povrch s vysokou drsností a porozitou poskytuje mnoho „záchytných bodů“ pro bakteriální adhezi, jak je zobrazeno na Obr. 3.



Obr. 3. Vztah mezi povrchem biomateriálu a bakteriálními agens v závislosti na jeho povrchové morfologii (Gallo et al. 2014).

Povrch titanu je přirozeně pasivován oxidickou vrstvou TiO_2 , která je amorfní. Zvýšení bioaktivity, resp. osteointegračního potenciálu této vrstvy, se dosahuje převedením amorfního TiO_2 do krystalické formy (Uchida et al. 2003). Obdobného efektu lze docílit chemickým ošetřením povrchu titanu založeným na alkalických úpravách (Jonášová et al. 2004), kdy dochází k převedení TiO_2 na amorfni titaničitan sodný s různou stechiometrií, jak bylo prokázáno (Oh a Jin 2006). Následným žháním materiálu až na 600 °C dochází k jeho transformaci na krystalickou formu a při teplotách nad 700 °C vzniká rutil (Kim et al. 1997). Zajímavým způsobem modifikace titanového povrchu je fluoridace

pomocí fluoridu sodného, kterou použil Ellingsen v roce 1995. Fluor vykazuje vysokou afinitu k hydroxyapatitu a v *in vitro* a *in vivo* prostředí mohou fluoridové anionty sloužit jako iniciátory precipitace a mohou vznikat fáze jako hydroxyfluoroapatit či fluoroapatit, čímž je opět významně zvýšena bioaktivita povrchu. Na povrchu titanu a jeho slitin se mohou tvořit nanotrubičky oxidů základního kovu (Li et al. 2019). Tsuchiya et al. 2006 potvrdili, že existence trubkovité nanostruktury vede ke stimulaci růstu HA. Existence nanostruktury vede rovněž ke zvýšení adheze, proliferace a diferenciaci buněk (Brammer et al. 2012) bez poklesu osteointegrace. Liu et al. 2017 prokázali u těchto povrchů rovněž antimikrobiální účinky. Díky značnému aktivnímu povrchu nanostruktury mohou být na jejich površích adsorbovány biologicky a farmakologicky aktivní látky (Popat et al. 2007). Nejběžnějším způsobem přípravy nanostrukturovaného povrchu je anodická oxidace (Sul et al. 2005), kterou lze aplikovat i u povrchů titanových slitin (Diefenbeck et al. 2011, Moravec et al. 2014). Volba elektrolytu (chemického složení) a podmínek expozice (viskozity, pH, teploty) určují rozměrové parametry vznikajících nanotrubiček. Díky velké variabilitě možných podmínek lze připravit trubičky o průměrech od 15 do více jak 100 nm. Délka nanotrubiček je velmi významným faktorem pro pevnost vazby nanovrstvy s podkladovým materiálem, neboť při překročení určité délky těchto nanotrubiček dochází k odtržení povrchové vrstvy od substrátu.

Modifikace povrchu u polymeru jako UHMWPE je možná pomocí různých sterilizačních technik, které mohou ovlivnit hydrofobicitu/hydrofilitu povrchu spolu s jeho energií a následně tak adherenci bakterií. Jak bylo prokázáno v práci Kinnari et al. 2010, výsledný efekt je kombinace více faktorů jako typ aplikované sterilizační techniky a původní drsnosti studovaného materiálu. Dalšími technologiemi, které zvyšují hydrofilitu povrchu spolu se snížením bakteriální adheze, je aplikace UV záření (Gallado-Moreno et

al. 2009) nebo pokrytí povrchu implantátu pomocí hydrofilních polymerů nebo hydrogelů (Harris et al. 2004, Pfeufer et al. 2011, Ma et al. 2012, Chen et al. 2016).

Pasivní modifikace povrchu využívá širokou variabilitu morfologických či fyzikálně-chemických úprav povrchu implantátu. Vzhledem k tomu, že pozitivní účinek těchto modifikací je založen na snížení adheze bakterií, může zde vyvstat problém také s adhezí kostních buněk a následnou osteointegrací.

2.3.3. Modifikace pomocí bioaktivních vrstev

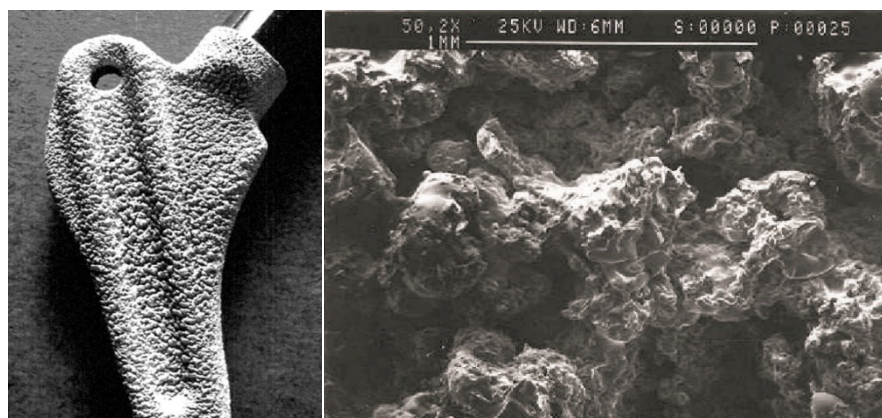
Další strategií je pokrytí implantátu bioaktivní vrstvou (Fuchs et al. 2008). K tomuto účelu se používají jak anorganické materiály na bázi kalcium fosfátu (Alghamdi et al. 2013, Romanó et al. 2015), tak organické materiály na bázi syntetických (Vester et al. 2010, Marie et al. 2012) nebo přírodních polymerů (Müller et al. 2006, Vester et al. 2010, Schmiemaier et al. 2006, Manara et al. 2008, Rammelt et al. 2006, Morra et al. 2003) a jejich vzájemné kombinace (Ao et al. 2013, Drago et al. 2014).

2.3.3.1. Keramické nástřiky

Zvýšení biokompatibility a porozity povrchů implantátů je běžně prováděno plazmatickým nástřikem hydroxyapatitu (Dorozhkin 2009). Tato úprava se velmi osvědčila převážně u titanových implantátů, kde je hrubost povrchu důležitá pro lepší osteointegraci. Porézní titan a zejména pak jeho HA vrstva totiž značně akcelerují osídlení povrchu osteoblasty, a tak i osteointegraci implantátu do kostního lůžka. Po osteointegraci takto upraveného povrchu nemá již mikrobiální agens prostor tento povrch kolonizovat. Problémem ovšem mohou být části porézních povrchů, které zůstávají mimo kontakt s kostí a jejich afinita ke kolonizaci tak zůstává trvale vysoká. Bakterie mohou velmi rychle vyplňovat porézní labyrint, kde chráněny glykokalyxovou vrstvou přežívají (Cordero et al.

1996, Gristina a Costerton 1985). Je třeba brát v úvahu i negativní vliv nesrovnatelně větší aktivní plochy porézního povrchu (Cordero et al. 1996).

Tloušťka apatitové vrstvy připravené plazmatickým nástřikem vrstvy může být velmi variabilní, pohybuje se od stovek nanometrů až po stovky mikrometrů. Vrstva velmi často obsahuje několik fází kalcium fosfátu; a to jak krystalické, tak amorfni formy. Mimo hydroxyapatitu může vrstva nástřiku obsahovat také kalcium-deficientní hydroxyapatit, kalcium pyrofosfát, oxyapatit a dále příměsi jako např. oxid vápenatý. Části vrstev obsahující amorfni fázi či části vrstev, které jsou velmi tenké, jsou více náchylné k degradaci v *in vitro* a *in vivo* prostředí. Gineste et al. 1999 prokázali, že v *in vivo* prostředí se resorpce HA pohybuje od 15 do 30 μm za rok. Díky nehomogenitě fází, velikosti částic a krystalinity, mají takto připravené vrstvy sklony k alteraci také mechanických vlastností, jako je křehkost, což může vyústit k jejich delaminaci. Následná produkce HA fragmentů způsobuje „third body wear“ sekundárně spojený s procesem uvolnění implantátu. Všechny tyto faktory mohou vést ke ztrátě fixace implantátu v kostním lůžku a způsobit tak aseptické uvolnění kloubní náhrady. Řešením může být kombinovaný povrch, kdy základní vrstvu tvoří makroporézní plazmatický nástřik základního substrátu, např. TiAl6V4 (Obr. 4), který vytváří optimální porozitu pro kostní vrůst a zároveň dává pevný podklad pro tenkou vrstvu HA (Landor et al. 2009).



Obr. 4. Ukázka makroporézního plazmatického nástřiku (vlevo) a detail vrstvy nástřiku ze skenovacího elektronového mikroskopu (vpravo).

Použití kalcium fosfátu ve formě plazmového nástřiku není limitováno pouze na kovy, ale je možné jej aplikovat také na uhlík nebo bioinertní keramiku (Okada a Furuzono 2010). Plazmový nástřik nebo nástřik plamenem patří mezi nejvíce aplikované metody. V praxi a v literatuře je možné se setkat i s dalšími metodami, které vyžadují při přípravě určitá specifika (Tab. 3). Depozice pomocí laseru, iontovým svazkem či magnetronovým naprašováním vyžadují vakuum a tloušťka připravené vrstvy je o dva řády nižší než v případě vysokoteplotních metod. Vysoká teplota aplikovaná při těchto procesech, která dosahuje až několika tisíc °C, je však nevhodná pro polymerní materiály. Alternativu nabízí nízkoteplotní procesy, které jsou ekonomicky méně náročné, a navíc umožňují zakomponování biologických agens, jako jsou léčiva, osteoinduktivní faktory či geny. Elektrochemická depozice umožňuje během procesu integrovat do vrstvy kalcium fosfátu také stopové množství iontů kovů, které vykazují antimikrobiální účinky (Wolf-Brandstetter et al. 2020).

Do popředí vědeckého zájmu se stále více dostává biomimetický přístup (Heimann 2016), který využívá principu „inspirace či napodobování“ biologických struktur a procesů. V tomto případě se jedná o imitaci mineralizace kostí. Biomimetická minerální vrstva je precipitována nejčastěji za fyziologických podmínek (37 °C, pH = 7.3), a to v roztocích, které imitují složení krevní plazmy – SBFs (Raucci et al. 2012). Formování vrstvy, její výsledné chemické a fyzikální vlastnosti jsou silně ovlivněny složením SBF, pH, teplotou a dobou trvání procesu nástřiku (Ren et al. 2017, Kokubo 2014, Zhao et al. 2017). K dosažení kvalitního navázání apatitu na povrch daného materiálu se provádí modifikace povrchu organickými molekulami, které napodobují glykoproteiny nebo proteoglykany extracelulární matrix. Tyto molekuly slouží jako matrice nebo „šablona“ pro precipitaci této apatitové vrstvy.

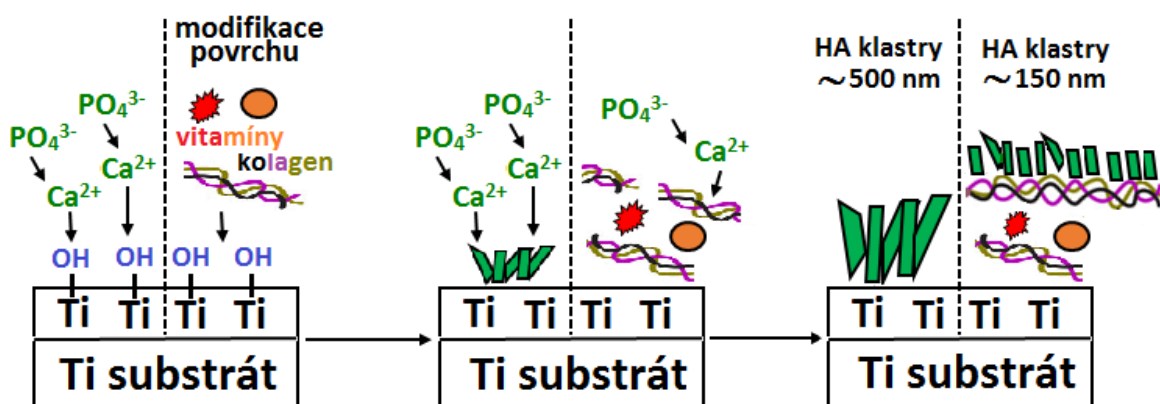
Tabulka 3. Příklady technik pro přípravu bioaktivních kalcium fosfátových vrstev na povrchu implantátu (Dorozhkin 2012).

	Metoda	Tloušťka vrstvy [μm]	Výhody	Nevýhody
Vysokoteplotní metody	Plazmový nástřik	30 – 200	Vysoká depoziční rychlost, zvýšení ořezové a korozní rezistence a biokompatibility	Vysoká teplota indukuje rozklad, rychlé zchlazení produkuje amorfni fáze, vysoká teplota (~ několik tisíc °C) - není možná simultánní inkorporace biologických agens
	Nástřik plamenem			
Vakuové metody	Magnetronové naprašování	0,05 – 5	Uniformní tloušťka vrstvy, vysoká čistota a adheze, vrstva s vysokou denzitou	Vysoká cena, nízká depoziční rychlost, produkce amorfni vrstev, vysoká teplota (~ několik set °C) - není možná simultánní inkorporace biologických agens
	Pulsní laserová depozice			
	Depozice iontovým svazkem			
Přípravy na mokré cestě	Metoda sol-gel	< 1	Pokrývání tvarově složitých povrchů, aplikace pokojové teploty, inkorporace biologických agens	Nutnost řízení atmosféry
	Elektroforetická depozice	100 - 2000		Nutnost vysoké teploty sintrování <i>ex post</i> , výskyt trhlin
	Elektrochemická (katodická) depozice	50 – 500		Zhoršená adheze k povrchu, nutnost kontroly parametrů elektrolytu
	Biomimetický přístup	< 30		Časová náročnost, nutnost stability pH SBFs

Tento způsob je možné aplikovat na různé typy materiálů využívaných pro implantáty, mezi něž patří kovy a jejich slitiny nebo keramické a polymerní kompozity. Jako matrice slouží celá škála molekul. Hojně používané jsou organické molekuly z přírodních zdrojů jako kolagen (Tapsir a Saidin 2016, Sukhodub 2009, Iafisco et al. 2012), želatina (Arafat et al. 2011, Chen et al. 2018), chitosan (Abdelkebir et al. 2012, Kong et al. 2018), polydopamin (Lin et al. 2015); dále vaječný albumin (Chakraborty et al. 2007), albumin bovinního (BSA) (Chakraborty et al. 2007b, Schickle et al. 2018) nebo lidského (Iijima et al. 2018, Iijima et al. 2017 Iijima et al. 2015) séra. Nicméně materiály izolované z přírodních zdrojů vykazují obvykle vysokou nehomogenitu, některé mohou také způsobovat alergické reakce, jako např. kolagen. Z toho důvodu se začala používat rekombinantní forma proteinu (Pan et al. 2011, Ceylan et al. 2014) vyrobeného genovými modifikacemi, při nichž je do genomu producenta (obvykle bakterie nebo kvasinky) uměle začleněn gen kódující požadovanou bílkovinu z jiného organismu. Mezi další možnosti se řadí peptidické aptamery, což jsou krátké peptidy složené ze dvou částí, z nichž každá má schopnost se specificky vázat k určité cílové molekule. Jedna část aptameru může díky specifickým aminokyselinovým sekvencím interagovat s amfoterním TiO_2 , který se tvoří na povrchu Ti. Vazba může vznikat jednak mezi pozitivně nabitou molekulou argininu a Ti-O^- a negativním nábojem kyseliny asparágové a Ti-OH_2^+ . Druhá část aptameru může obsahovat kyselinu polyglutamovou, která díky přebytku záporného náboje může efektivně vázat ionty Ca^{2+} a nastartovat tak nukleační a precipitační proces apatitu (Kelly et al. 2015).

V neposlední řadě mají i v tomto procesu nezanedbatelný efekt povrchové charakteristiky jako topografie, morfologie a drsnost (Stenport et al. 2008, Arvidsson et al. 2009). Porovnání precipitace přímo na Ti substrátu a na povrchu Ti s použitím organické matrice, dle Ciobanu a Ciobanu 2013, je znázorněno na Obr. 5. Přítomnost kolagenu a

vitamínů (A a D3) způsobuje urychlení precipitace a tvorbu HA krystalů malých velikostí, následkem čehož je vrstva více uniformní a má větší mechanickou stabilitu.



Obr. 5. Porovnání precipitace hydroxyapatitových (HA) klastrů přímo na povrchu Ti a na povrchu modifikovaném kolagenem a vitamíny; dle Ciobanu a Ciobanu 2013.

Existence organické fáze rovněž zvyšuje bioaktivitu celého implantátu. Takto připravené vrstvy vykazují osteokonduktivní vlastnosti, v některých případech ovšem vykazují nedostatečné vlastnosti osteoinduktivní. Pro dosažení optimální osteoinduktivity je možné do vrstev zakomponovat biologicky aktivní látky, jako např. růstové faktory, léčiva a geny (Shin et al. 2017, Gronowicz et al. 2017, Wang et al. 2017, Alhamdi et al. 2018, Pon-On et al. 2013, Kazemzadeh-Narbat et al. 2010). Proces biomimetické precipitace je v současné době hojně studován a diskutován především ve vědeckém mediálním prostoru, jeho využití v klinické praxi však prozatím chybí. Díky své mnohostrannosti a velkému potenciálu patří toto odvětví k progresivně se rozvíjející části biomateriálového inženýrství.

2.3.4. Farmakologicky aktivní vrstvy

Bioaktivní vrstva může být rovněž farmakologicky aktivní a plnit antibakteriální funkci inkorporováním nebo navázáním ATB, antiseptik, organických molekul nebo anorganických iontů (Zhang et al. 2021). Z hlediska životnosti se vrstvy dělí na

nedegradovatelné a degradovatelné. Pro efektivní antibakteriální působení existují dvě základní strategie:

- 1) „zabíjení kontaktem“,
- 2) uvolňováním léčiv.

Ad 1) Antibakteriální účinek většiny kovů je dán účinkem jejich iontů (Wang et al. 2021) a je přisuzován spíše jejich nano formě (Lemire et al. 2013). Ionty se zapojují do elektronových přenosů mezi enzymy dýchacího řetězce a dalších metabolismů bakterií, což vede k jejich odumření (Stoodley et al. 2013). Pro tyto účely se používají kovy jako stříbro (Mijnendonckx et al. 2013, Chernousova a Epple 2013 Kose et al 2013, Tsukamoto et al. 2014, Tran et al. 2015, Kuehl et al. 2016), zinek (Petrini et al. 2006), měď (Grass et al. 2011, Mauerer et al. 2014, Norambuena et al. 2017) a další anorganické prvky jako např. selen (Holinka et al. 2013, Tran a Webster 2011), jód (Tsuchiya et al. 2012) nebo substance na bázi uhlík – grafen či uhlíkové nanotrubičky (Martynkova a Valášková 2014). Tyto elementy samozřejmě mohou být toxické i vůči hostitelským buňkám. Proto musí být tyto vrstvy navrženy tak, aby umožňovaly uvolňování antimikrobiálních agens v koncentracích, které překračují minimální inhibiční koncentrace pro většinu známých patogenů, zároveň však bez vedlejších účinků na hostitele.

Ad 2) Bioaktivní vrstvy mohou sloužit současně jako nosiče ATB pro jejich postupné uvolňování (Schmidmaier et al. 2006, Zilberman a Elsner 2008, Nandi et al. 2009, Neut et al. 2011, Hickok a Shapiro 2012) při prevenci osteomyelitidy. Více se preferuje lokální aplikace antibiotik, neboť umožňuje vyšší dávkování a její výhodou je i kratší transport a minimální kolísání hladin ATB v krevním řečišti. Antibiotika tak působí i v avaskulárních zónách, a to bez zvýšení systémové toxicity. Antibiotikum pak působí jak na zbývající planktonické formy bakterií, tak i na sesilní formy v biofilmu. Lokální

nosiče antibiotik navíc vyplní "mrtvý prostor" po odstraněných nekrotických tkání infekcí postižené kosti. Výhodou je i snadnější uvedení do léčebné praxe.

Z nebiodegradabilních matric je nejznámější polymethylmetakrylát (kostní cement). Jeho nevýhodou je rychlé uvolňování ATB ve velmi vysokých koncentracích, což není vždy žádoucí (Jiranek et al. 2006) a také nutnost další operace po skončení léčby. K dalším problémům pak patří exotermická reakce během jeho polymerace, která limituje použití inkorporovaných ATB (Shi et al. 2010). Jak bylo prokázáno v případě vankomycinu, zvýšená teplota akceleruje jeho degradaci a výrazně snižuje jeho antimikrobiální aktivitu (Melicherčík et al. 2010).

Proto se v současnosti upírá pozornost na výzkum biodegradabilních systémů, jejichž aplikace předpokládá absenci sekundární operace (Yuan et al. 2020). Tyto systémy navíc skýtají možnost regulace rychlosti uvolňování léků pomocí fyzikálně-chemického uspořádání systému matrice (nosič)/léčivo. Tento systém by měl umožnit uvolňování ATB v koncentracích, které překračují minimální inhibiční koncentrace pro většinu známých patogenů bez vedlejších účinků (Ambrose et al. 2014, Malizos et al. 2017). Bioaktivní vrstvu lze také připravit ve formě nanovláken, což přispívá k vytvoření nanostrukturovaného povrchu (Chen et al. 2012). Jak potvrdily četné studie (Sirc et al. 2012, Li et al. 2012, Sofokleous et al. 2013, Foltran et al. 2010), antibiotika lze zakomponovat do vláken bez ztráty jejich farmakologické aktivity. Mezi nejvíce používaná antibiotika patří gentamicin, vancomycin a tobramycin (Zilbermann a Elsner 2008). Jde o jedny z nejčastěji používaných antibiotik a řadí se mezi tzv. bazická antibiotika (Stigter et al. 2004). Účinkují jak proti mnoha gramnegativním bakteriím, zvláště proti *Pseudomonas*, tak i proti určitým grampozitivním bakteriím jako je *Staphylococcus aureus*, který je nejčastěji kultivován z napadené tkáně a podílí se asi na 30 % infekcí (Trampuz a Zimmerli 2006).

Z důvodu nárůstu rezistence na určité typy antibiotik a výskytu geneticky různých kmenů jako např. methicillin-rezistentní nebo multi-rezistentní *Staphylococcus aureus*, se rozšířily také aplikace vzájemných kombinací ATB (Rauschmann et al. 2005, Kang et al. 2016, Nguyen a Graber 2010, Winkler et al. 2006).

Tempo řízeného uvolňování závisí na mnoha faktorech (Wallace a Rosenblatt 2003) jako je difúze, chemická modifikace matrice/nosiče, tloušťka vrstvy, stupeň zasítování matrice/nosiče (např. v případě kolagenů), velikost pórů a změna stability v prostředí (Lesiak-Cyganowska et al. 2001, Chai et al. 2007). Mezi další vlivné faktory patří vazba léků na matrici, fyzikálně-chemické vlastnosti léčiva, interakce mezi polymerní matricí, navázaným léčivem a rozpouštějícím médiem či vzájemném uspořádání složek (Ruszczak a Friess 2003). Konečný výsledek tedy vždy závisí na konkrétním systému. Vzhledem k velkému počtu faktorů není předem jasné, jak se daný systém bude chovat, a proto je vždy nutné daný systém podrobně analyzovat. Sledování uvolňování antibiotik *in vitro* se nejčastěji provádí pomocí UV spektrometrie nebo kapalinové chromatografie. Biologické testování *in vitro*, které se provádí na osteoblastech nebo mesenchymálních kmenových buňkách, charakterizuje cytotoxicitu nejen samotného materiálu, ale umožňuje přímo testovat, zda uvolněná koncentrace antibiotika není již inhibiční (Ince et al. 2007) nebo zda použité metody přípravy (např. síťování kolagenu) neovlivnily biokompatibilitu studovaného materiálu (Enea et al. 2011). Bakteriální testy, charakterizující antibakteriální aktivitu materiálu, se provádějí často se třemi bakteriálními kmeny – grampozitivním stafylokokem, gramnegativní pseudomonádou a *E-coli*.

Ke komplexnímu posouzení daného systému patří také biologické hodnocení *in vivo*. Rozvoj nových preventivních a terapeutických přístupů vyžaduje použití zvířecích modelů, a to pro posouzení biokompatibility a bezpečnosti ještě před implementací materiálu do klinické praxe (Calabro et al. 2013). Preklinické testování osteomyelitidy,

jejího průběhu a léčení bylo již v minulosti mnohokrát studováno s použitím četného množství zvířecích druhů, jako jsou ptáci nebo drobní a velcí savci (Pearce et al. 2007, Moojen et al. 2009, Lindsey et al. 2010, Calabro et al. 2013, Fassbender et al. 2013). Srovnání takto získaných výsledků je ovšem velmi komplikované a vzájemně nesrovnatelné nejen vzhledem k různým druhům zvířat použitých při testech, ale také kvůli počtu testovaných zvířat či metodologickým přístupům. Přestože tyto studie prokázaly, že antibiotické povlaky neovlivňují hojení kostí u zvířecích modelů, tato technologie farmakologicky aktivních vrstev nebyla klinicky příliš studována. První klinická studie na pacientech s použitím rychle vstřebatelného hydrogelového povlaku obsahujícího antibiotika s dobrým výsledkem byla provedena a publikována Romanó et al. 2016 (Zagra et al. 2019). Setkáváme se se stejným problémem jako v případě testů *in vitro*, při použití rozdílných typů buněk. Pokud výsledky *in vitro* studie nejsou doplněny testy *in vivo*, není jasná aplikovatelnost těchto výsledků v klinické praxi. Biologické testování *in vitro* spolu s *in vivo* testy tak napomáhá k systematictějšímu a komplexnímu přístupu (Shapiro et al. 2012), tzv. „*bench-to bedside*“ **neboli „od laboratorních stolů k lůžku nemocného“**.

Právě široká variabilita studovaných povlaků spolu s nepřehledností *in vitro* studií a s relativním nedostatkem *in vivo* studií prokazujících bezpečnost a účinnost této strategie způsobuje, že je nesmírně obtížné vyvodit závěry ze současné literatury. Jak bylo konstatováno na 2. mezinárodním konsenzu (International Consensus Meeting on Prosthetic Joint Infection) a deklarováno v dokumentu vydaném v srpnu 2018 (Noble et al. 2018), navzdory pozitivním výsledkům v těchto individuálních zprávách, nedostatek vysoce kontrolovaných studií spolu s nekomplexně nastaveným vyhodnocením naznačuje, že na závěry, dle nichž antibiotické povlaky sníží míru infekce po primárních nebo revizních postupech, je příliš brzy. Tyto strategie se však mohou ukázat jako prospěšné ve vysoce rizikových primárních nebo revizních případech. K získání relevantní odpovědi na tuto otázku jsou zapotřebí další vysoce kvalitní studie.

Hledání takového ideálního materiálu lze proto považovat prakticky za hledání pověstného „Svatého Grálu“ endoprotetiky (Riester et al. 2021).

3. Experimentální část

3.1. Studované materiály

3.1.1. Výběr alopplastických materiálů

Pro zjišťování adhezivních vlastností bylo vybráno 14 materiálů, resp. jejich nejčastěji užívaných povrchových úprav při výrobě ortopedických implantátů (Tab. 4).

Tabulka 4. Přehled testovaných materiálů a jejich povrchových úprav s teoretickou hodnotou povrchové drsnosti Ra^T [μm] zadanou výrobcí.

Označení	Materiál	Úprava povrchu	Ra^T [μm]
CL	Slitina CoCrMo (ISO 5832-4)	leštěný povrch	1
CM	Slitina CoCrMo (ISO 5832-4)	kuličkovaný matný	2
CLS	Slitina CoCrMo (ISO 5832-4)	leštěný, značený laserem *	3
OL	Slitina FeNiCr (ISO 5832/9)	leštěný povrch	1
OM	Slitina FeNiCr (ISO 5832/9)	kuličkovaný matný	2
OLS	Slitina FeNiCr (ISO 5832/9)	leštěný, značený laserem	3
TM	Slitina Ti6A14V (ISO 5832/3)	kartáčovaný povrch	2
TT	Slitina Ti6A14V (ISO 5832/3)	tryskání Al_2O_3	4
TA	Slitina Ti6A14V (ISO 5832/3)	povrch anodizovaný (zelený)	2
TALS	Slitina Ti6A14V (ISO 5832/3)	povrch anodizovaný (zelený), značený laserem	3
TPH	Slitina Ti6A14V (ISO 5832/3)	porézní TiO_2 nástřík + hydroxyapatit	5
TP	Slitina Ti6A14V (ISO 5832/3)	porézní TiO_2 nástřík	5
K	Keramika Al_2O_3 (ISO 6474)	jednostranně leštěný	0/2
PE	Polyetylen UHMWPE (ISO 5834/2)	leštěný povrch	2

* laserové značení se používá ke značení výrobních čísel, velikostí, šarží, firemních názvů atd. na povrch implantátu

Pro testování byl materiál připraven jako disk o průměru 5 mm a výšce 1,5 mm (Obr. 6), jímž bylo manipulováno v optimálních podmínkách mikrobiologické laboratoře. Všechny zkoumané materiálové vzorky patří k výrobkům společnosti MEDIN Orthopaedics a byly dodány ve sterilní formě v ochranné folii. Jejich výroba a následná sterilizace probíhala za standardních podmínek pro výrobu kloubních náhrad.



Obr. 6. Ukázka studovaných vzorků (vlevo) a jejich technický náčrt (vpravo).

3.1.2. Příprava farmakologicky aktivních vrstev KOL/HA/ATB

Vrstvy byly připravovány elektrostatickým zvlákněním roztoku kolagenu (KOL), hydroxyapatitu (HA) a polyetylen oxidu jako 8 % hmotnostních (%hm.) roztoku kolagenu ve směsi ethanolu a fosfátového pufru. Hmotnostní podíly jednotlivých složek v elektrostaticky zvlákněné vrstvě jsou 78,2 - 87,4 % hm.kolagenu, 5 - 15 %hm. hydroxyapatitu a 6,8 - 7,6 %hm. polyetylen oxidu. Degradční profil vrstev je dále upraven síťováním v roztoku 95% hm. ethanolu s N-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethylkarbodiimid hydrochloridem (EDC) a N-hydroxysukcinimidu (NHS) při teplotě 37°C, po dobu 24 hodin. Na 1 g zvlákněného kolagenu připadá minimálně 0,625 g EDC a 0,156 g NHS, tzn. ve vzájemném hmotnostním poměru EDC:NHS 4:1, smísené s minimálně 140 ml 95%hm. ethanolu. Vrstva je po zesíťování promývána ve fyziologickém roztoku nebo fosfátovém pufru po dobu minimálně 2 x 30 minut a nakonec promyta v destilované vodě po dobu

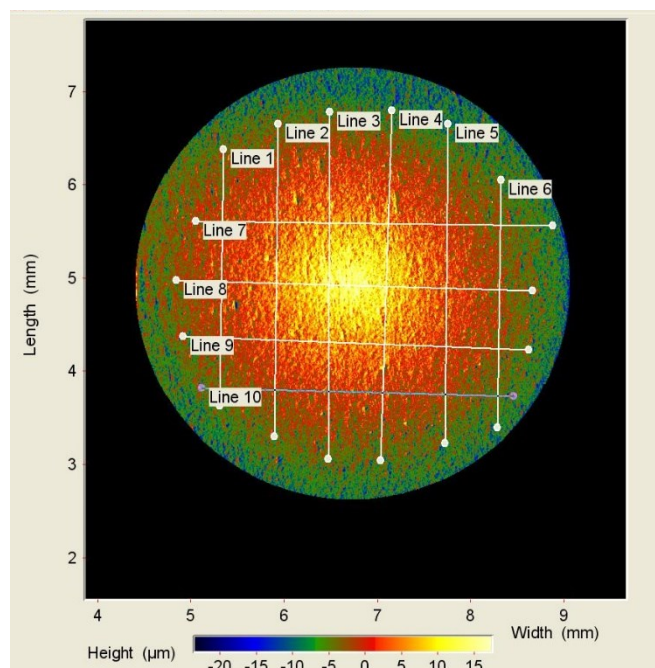
minimálně 30 minut. Během síťování a promývání vrstvy dojde v podstatě ke kompletnímu vymytí polyethylenoxidu. Sušení vrstvy je provedeno lyofilizací. Takto připravené vrstvy jsou poté impregnovány roztokem ethanolu obsahující kombinaci vankomycinu a gentamicinu (hm. poměr 1/1) přičemž finální množství ATB činí 10 hm.% na KOL+HA a dále jsou sušeny při pokojové teplotě do konstantní hmotnosti.

3.2. Analytické metody

3.2.1. Charakterizace povrchové drsnosti alopplastických materiálů

Na všech připravených vzorcích byla nejprve vyšetřena topografie povrchu s cílem ověření parametrů drsnosti. Standardní liniový parametr drsnosti R_a [μm] byl měřen pomocí bezkontaktní optické metody na přístroji MarSurf TS 50/4 (Mahr, SRN). Toto optické zařízení využívající projekce a detekce laserového svazku odráženého mikroreflektory – digitální kamera registruje interferenční proužky, které se vyhodnocují. Od každého typu materiálu byly proměřeny 3 náhodně vybrané vzorky, přičemž na každém z nich bylo provedeno deset měření v liniích o délce přibližně 4 mm (Obr. 7), s vyhodnocovanou délkou l_n 1,25 mm (dle ČSN EN ISO 4288 a 3274). 3D data povrchových vrstev byla zpracována v programu ODSCAD 5.075 (Mahr, SRN). Pro každý typ materiálu byla dále vytvořena vizualizace struktury povrchu.

Obr. 7. Ukázka vyhodnocení parametru drsnosti R_a .



3.2.2. Testování tvorby biofilmu *in vitro* na aloplastických materiálech

Pro sledování schopnosti tvořit biofilm byly vybrány mikroby považované za nejčastější původce infekcí kloubních náhrad viz teoretický úvod.

První testovanou bakterií byl *Staphylococcus epidermidis* CCM 7221 (Czech Collection of Microorganisms, CCM), původně klinický izolát č. A117 s deklarovanou schopností tvořit biofilm (Růžička et al. 2004). Další testované bakterie, *Pseudomonas aeruginosa* FB44, *Enterococcus faecalis* FB16, *Escherichia coli* FB42 a *Staphylococcus aureus* FB11, jsou původně klinické izoláty s ověřenou schopností tvořit biofilm (Sbírka mikroorganismů Mikrobiologického ústavu Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně): *Pseudomonas aeruginosa* FB44, *Enterococcus faecalis* FB16, *Escherichia coli* FB42 a *Staphylococcus aureus* FB11. Jsou to zástupci jednotlivých skupin významných z hlediska klinické mikrobiologie, které jsou spojené se schopností tvořit biofilm a způsobovat infekce implantátů. Současně jsou to kmeny, u kterých byl v době naší práce lépe znám způsob tvorby biofilmu a byly vypracovány modely pro práci s jejich biofilmem.

Staphylococcus epidermidis – G+ kok, typický původce katérových sepsí, a mj. subakutních infekcí implantátů – souvislost s „aseptickým uvolněním“

Enterococcus faecalis – další zástupce G+ koků, typický původce infekcí močových katétrů, podíl na infekcích dalších implantátů.

Pseudomonas aeruginosa – zástupci G – nefermentujících bakterií spojovaných s tvorbou biofilmu. Tato skupina bakterií je obecně spojená s větší odolností k antibiotikům.

Escherichia coli – zástupci G – bakterií, které jsou součástí normální mikroflóry a současně jsou spojované s tvorbou biofilmu.

Kmeny byly uchovávány v kryozkumavkách s kryoprotektivním médiem (ITEST plus, Hradec Králové) při teplotě $-76\text{ }^{\circ}\text{C}$. Před použitím byly zkumavky rozmrazeny, obsah byl očkovan na agar Muller-Hinton (Bio-Rad, Marnes La Coquette, France) a kultivován do druhého dne (18 hodin) při teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pro testování schopnosti tvořit biofilm byla pomocí denzitometru Densi-LA-Meter II (Pliva-Lachema, Brno) připravena suspenze testované bakterie ve fyziologickém roztoku o hustotě odpovídající stupni č. 1 McFarlandovy škály, který odpovídá $3,0 \times 10^8$ kolonie tvořících jednotek/ml. Jamky 24-jamkových destiček (Nunc, Roskilde, Denmark) obsahující disk zkoumaného materiálu a 900 ml BHI bujónu (Brain Heart Infusion, HiMedia, Mumbai, India) s 50 mM glukózy byly inokulovány s 100 ml suspenze testované bakterie. Po 24 hodinách inkubace při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ byl každý disk propláchnut ponořením a jemným tahem ve fyziologickém roztoku, aby se odstranily planktonické bakterie, které neulpěly na povrchu testovaného terčiku (Foster). Vrstva biofilmu vytvořená na povrchu disků byla fixována 24hodinovým sušením při $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ a následně barvena v 1 ml 1% roztoku krystalové violeti po dobu 20 min. Disky byly poté třikrát opláchnuty ve fyziologickém roztoku tak, aby se odstranilo přebytečné barvivo a následně sušeny. Suché disky s obarvenou vrstvou biofilmu byly eluovány v jamkách 96 jamkových destiček (GAMA Group, Trhové Sviny, CZ), obsahujících 150 μl 33% kyseliny octové, po dobu 20 minut na třepačce při 300 rpm. Vzhledem k tomu, že u některých vzorků bylo množství krystalové violeti v eluátu příliš velké na to, aby bylo možno přesně změřit hodnotu absorbance, byly všechny eluáty ředěny 1:4 roztokem 33% kyseliny octové. Poté bylo 100 μl naředěného eluátu přepipetováno do čistých jamek 96 jamkové mikrotitrační destičky (GAMA Group, Trhové Sviny, CZ). Pomocí spektrofotometru Anthos Labtec Instruments 2001 reader (Labtec Instruments, Salzburg, Austria) byly změřeny hodnoty absorbance (A) eluátu z jednotlivých vzorků při vlnové délce 595 nm (A_{595}). Absorbance pozadí byla měřena při 690 nm (A_{690}). Po odečtení

hodnoty A_{690} od hodnoty A_{595} byla získána skutečná hodnota absorbance měřeného eluátu. Aby byl eliminován vliv rozdílné přirozené afinity krystalické violeti k testovaným materiálům, byla pro každý testovaný materiál provedena negativní kontrola. To znamená, že disk byl testován za stejných podmínek bez inokulace mikrobem. Tři terčíky od každého zkoumaného materiálu prošly zcela identickým postupem, který je uveden výše, bez přidání bakteriální suspenze. Při výpočtu výsledné absorbance AV_{595} byla průměrná hodnota absorbance negativních kontrol (A_0) konkrétního materiálu odečtena od naměřených absorbancí eluátů při kvantifikaci biofilmu na povrchu daného materiálu. Výsledná absorbance byla stanovena na základě vztahu (1):

$$AV_{595} = (A_{595} - A_{690}) - (A_{0595} - A_{0690}) \quad (1)$$

Tvorba biofilmu na konkrétním materiálu byla testována ve třech nezávislých pokusech, přičemž v každém pokusu byly jedním testovaným mikroorganismem inokulovány tři vzorky příslušného materiálu. Za referenční materiál, se kterým byly porovnávány ostatní, byl zvolen vzorek s nejnižší průměrnou afinitou.

3.2.3. Testování citlivosti na ATB farmakologicky aktivních vrstvách

Pro testování ATB účinku elektrostaticky zvlákněných KOL/HA vrstev (Obr. 8) byly pro simulaci reálné aplikace vrstev použity čtyři klinické izoláty odebrané při infektu kloubních náhrad (Všeobecná fakultní nemocnice, Praha):

- 1) methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*,
- 2) gentamicin-rezistentní *Staphylococcus epidermidis*,
- 3) gentamicin-rezistentní *Enterococcus faecalis* (1),
- 4) gentamicin-susceptibilní *Enterococcus faecalis* (2).

Diskové difúzní testy byly provedeny s použitím agaru Mueller-Hintonové (Oxoid Ltd., Hampshire, UK; LOT1381672), jehož výška byla 4 mm. Postup přípravy probíhá tak,

že se kličkou nabere vhodné množství kolonií (většinou 1-5 dle druhu bakterie) a přenese se do 2 ml fyziologického roztoku, poté se zkumavka vloží do třepačky a protřepe. Hustota zákalu se zkontroluje pomocí denzimetru (Densi 2, Erba Lachema, Brno, ČR) a pokud je to nutné, hustota se upraví, dokud nedosáhne 0,5 McFarlanda. Inokulace na půdu se provádí pomocí vatového sterilního tampónu, kdy se válivým pohybem rozetře suspenze postupně po celé ploše půdy. Standardní inokulum musí po příslušné době inkubace (18-24 hodin u běžných bakterií) vytvořit souvislý splývavý nárůst po celé ploše agarové půdy. Na takto naočkovanou půdu se do 15 minut nanáší ATB disky pomocí sterilní injekční jehly (v tomto případě; jinak se využívají speciální raznice na disky). S takto naneseným diskem se již nesmí hýbat, protože antibiotikum začíná difundovat okamžitě. Připravené agarové půdy se do 15 minut od aplikace disků vloží do termostatu a při teplotě 37 °C se inkubují 18-24 hodin. Po uplynutí této doby je možné odečítat zóny inhibice růstu bakterií okolo ATB disků.



Obr. 8. Ukázka vzorků pro diskové difúzní testy

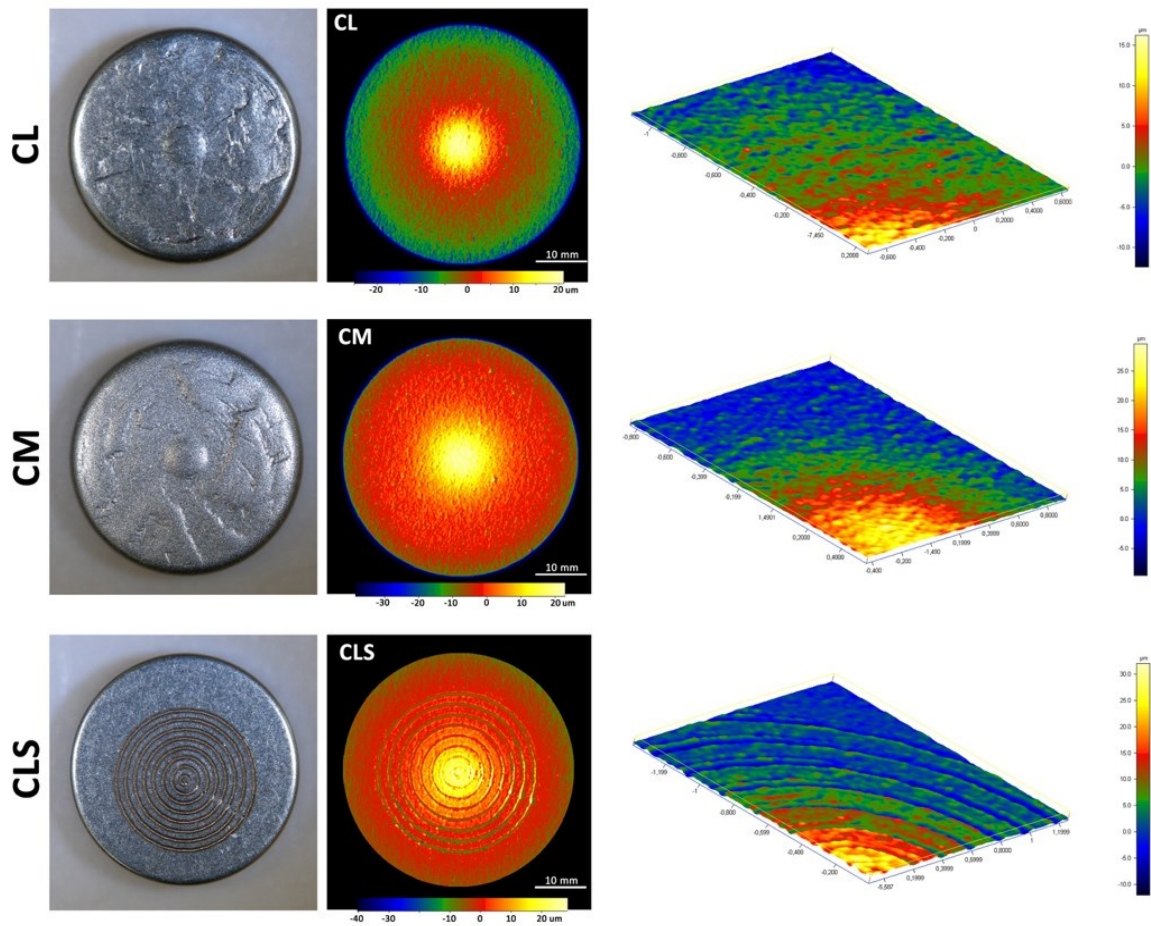
3.2.4. Statistické zpracování dat

Všechny výsledky byly statisticky zpracovány v programu Statgraphics Centurion XVII (Statpoint, USA). U souborů dat byla nejprve posuzována normalita (χ^2 test a Shapiro-Wilkův test). Shoda rozptylů při jednotlivých porovnáních byla provedena pomocí F-testu nebo Bartlettova testu. Při splnění obou podmínek, tedy normality dat a shody rozptylů, byl pro nalezení statisticky významných rozdílů použit parametrický Fisherův LSD test (Least Significant Difference). V případě porušení jedné z těchto podmínek byl použit neparametrický Kruskal-Wallisův test a Mann-Whitneyův post hoc test s Bonferroniho korekcí při vícenásobném porovnání. Hladina spolehlivosti ve všech testech byla 95 %. Pro vizualizaci naměřených hodnot byly použity krabicové grafy (box-plot), v nichž horní okraj krabice představuje 75 % kvantil, dolní pak 25 % kvantil, vně krabice tedy leží 50 % všech naměřených dat. Vodorovná čára vně krabice představuje medián (50% kvantil), křížek pak aritmetický průměr, resp. střední hodnotu normálního rozdělení. Vousy představují nejnižší a nejvyšší hodnotu ze všech dat. Odlehlé hodnoty za 1,5násobkem mezikvartilového rozpětí (75 %-25 % kvantil) jsou vyznačeny čtvercem. Pokud je ve čtverci ještě i křížek, jde o hodnoty ležící za trojnásobkem mezikvartilového rozpětí, resp. extrémní odchylky.

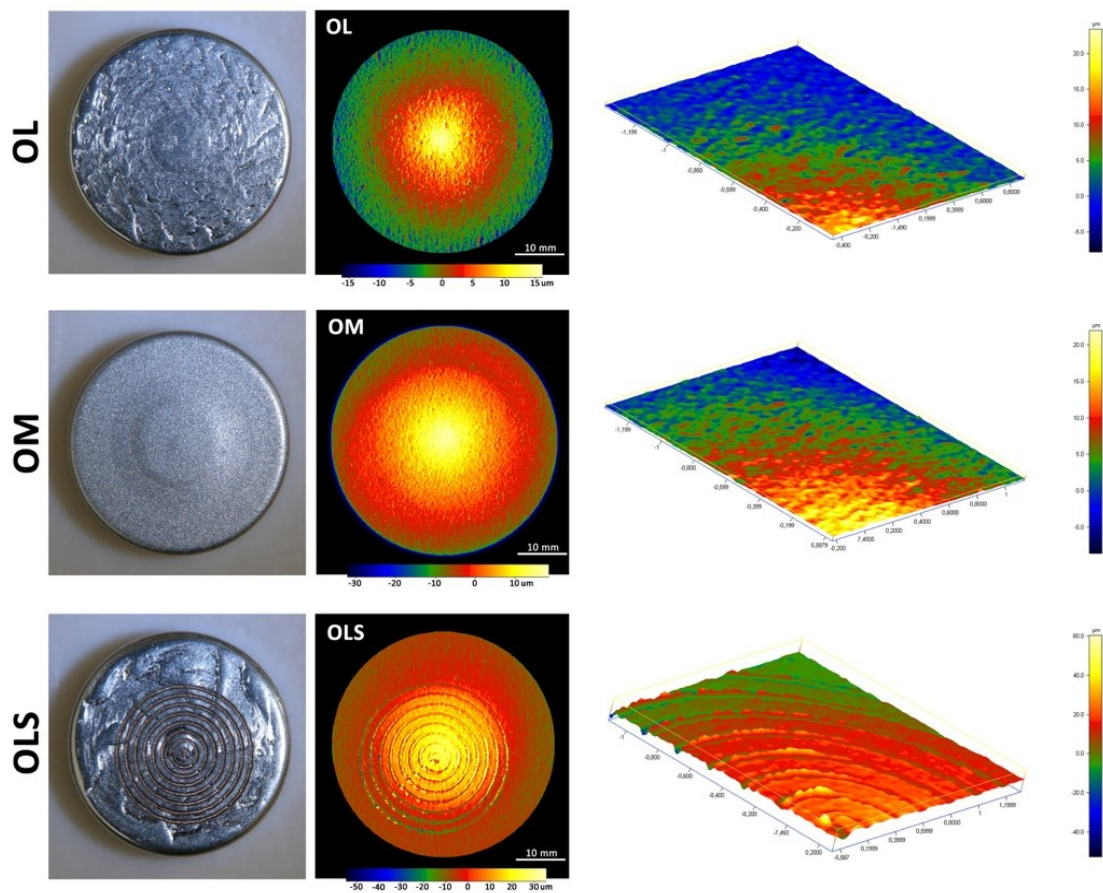
3.3. Výsledky

3.3.1. Charakterizace povrchu alopplastických materiálů

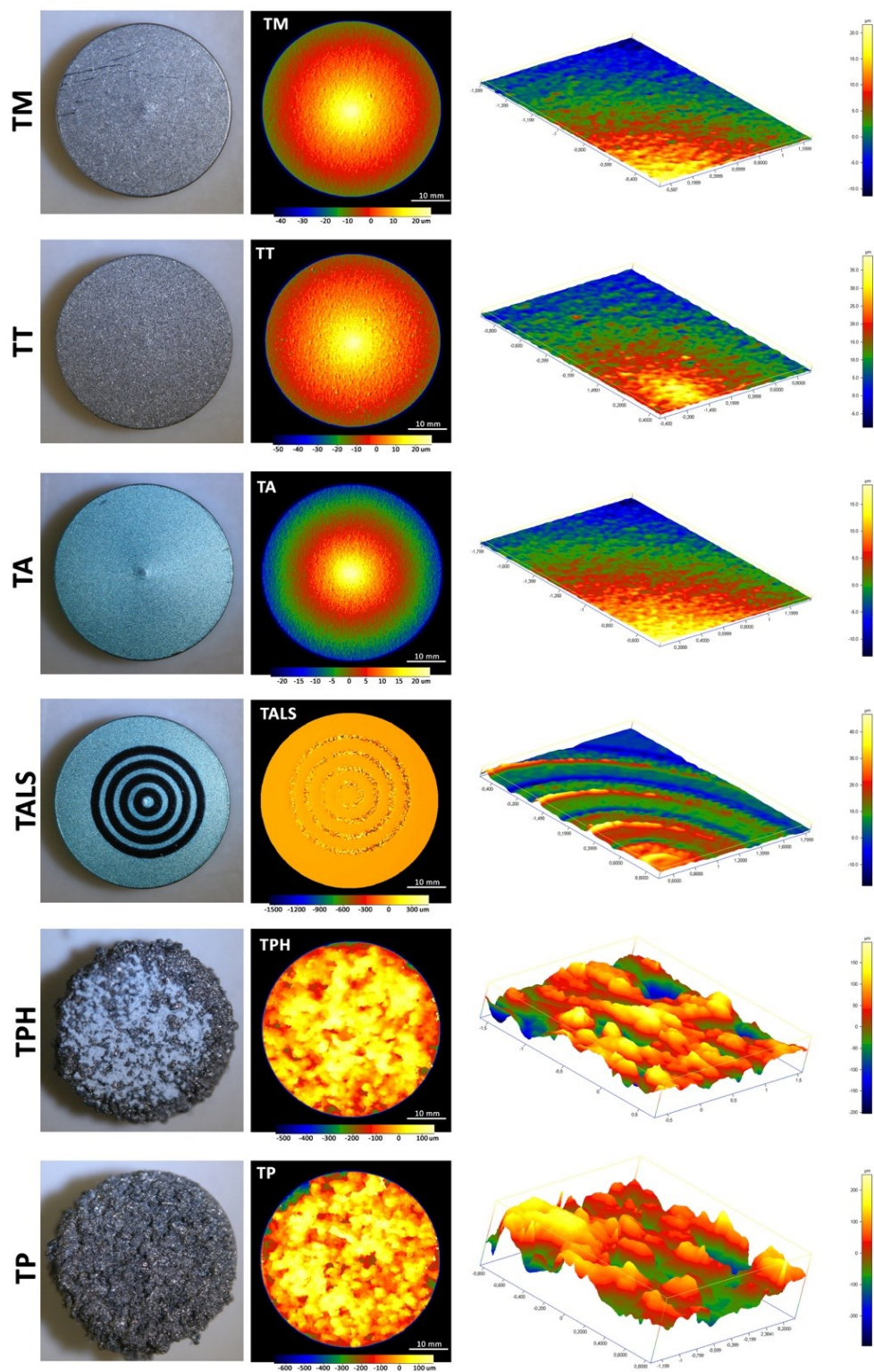
Povrchy všech typů analyzovaných materiálů byly vyfotografovány a dále byla nasnímána topografie jejich povrchu pomocí bezkontaktní optické metody s cílem ověření parametrů drsnosti. Na Obr. 9-13 jsou přehledně vyobrazeny fotografie povrchů jednotlivých analyzovaných materiálů, dále topografie jejich povrchů v 2D a 3D módu.



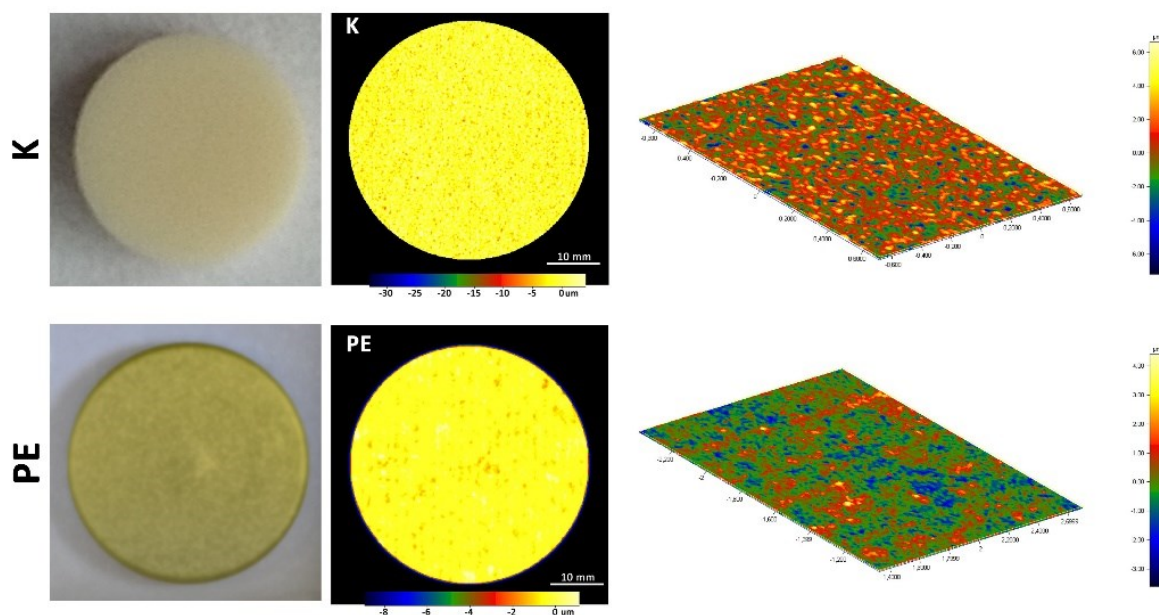
Obr. 9. Ukázka vzorků připravených ze slitiny CoCrMo (Vitalium) s leštěným povrchem (CL), kuličkovaným povrchem (CM) a leštěným povrchem značeným laserem (CLS). Fotografie a vyobrazení jejich topografie v 2D a 3D módu. Barevně kódovaný výškový profil: tmavá barva = nízká hodnota, světlá barva = vysoká hodnota.



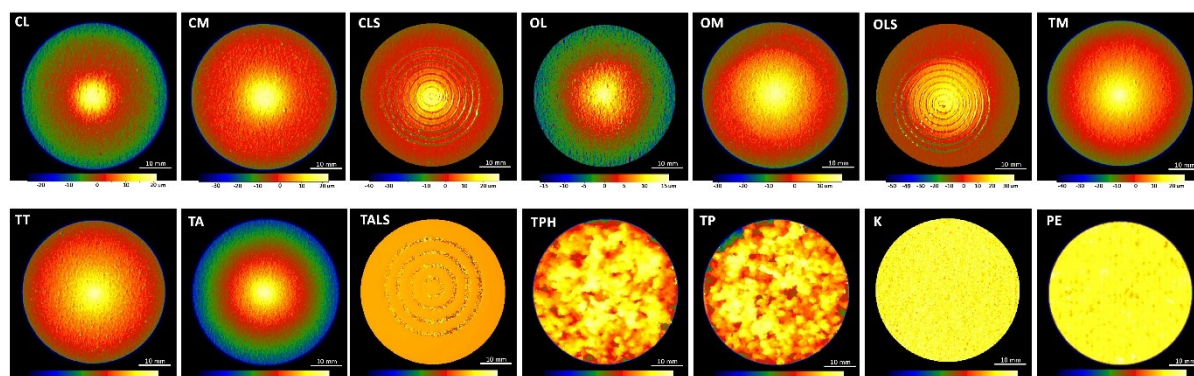
Obr. 10. Ukázka vzorků připravených ze slitiny FeNiCr s leštěným povrchem (OL), kuličkovaným povrchem (OM) a leštěným povrchem značeným laserem (OLS). Fotografie a vyobrazení jejich topografie v 2D a 3D módu. Barevně kódovaný výškový profil: tmavá barva = nízká hodnota, světlá barva = vysoká hodnota.



Obr. 11. Ukázka vzorků připravených ze slitiny Ti6Al4V s kartáčovaným povrchem (TM), tryskaným povrchem (TT), anodizovaným povrchem (TA), anodizovaným povrchem značeným laserem (TALS), s porézním HA nástřikem (TPH) a porézním TiO₂ nástřikem (TP). Fotografie a vyobrazení jejich topografie v 2D a 3D módu. Barevně kódovaný výškový profil: tmavá barva = nízká hodnota, světlá barva = vysoká hodnota.



Obr. 12. Ukázka vzorků připravených z Al_2O_3 keramiky s leštěným povrchem (K) a z UHMWPE s leštěným povrchem (PE). Fotografie a vyobrazení jejich topografie v 2D a 3D módu. Barevně kódovaný výškový profil: tmavá barva = nízká hodnota, světlá barva = vysoká hodnota.



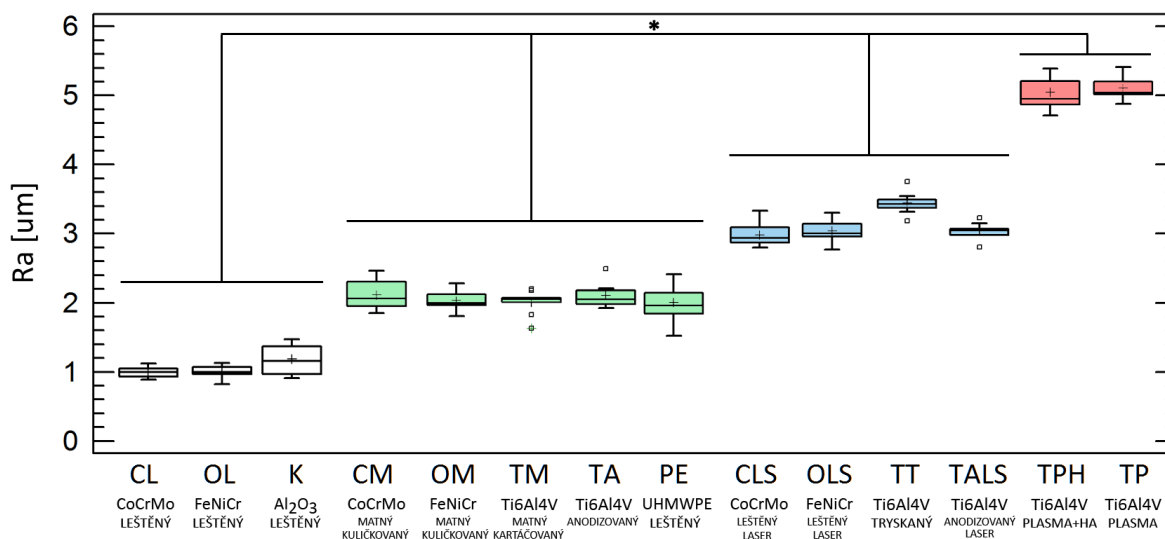
Obr. 13. Srovnání naskenovaných povrchů (2D) všech testovaných materiálů.

Tabulka 5 shrnuje naměřené parametry povrchové drsnosti R_a . V některých případech se stanovená drsnost mírně liší od teoretické hodnoty, která vycházela z předpokladů o drsnostech dosahovaných stejným postupem na ortopedických implantátech. Stanovené rozdíly mohou být způsobeny tím, že byly zpracovávány vzorky s nestandardní velikostí (menší, než je obvyklá). Materiály je možné na základě parametru

Ra seřadit do 4 skupin (Obr. 14). Statisticky významné rozdíly se vyskytují pouze mezi jednotlivými skupinami.

Tabulka 5. Přehled testovaných materiálů a jejich povrchových úprav s teoretickou a změřenou hodnotou povrchové drsnosti Ra [μm], aritmetický průměr, směrodatná odchylka, počet měření u každého typu materiálu (n) = 30.

Označení	Materiál	Úprava povrchu	Ra^T [μm]	Ra [μm]
CL	Slitina CoCrMo, Vitalium	leštěný povrch	1	$1,0 \pm 0,1$
CM	Slitina CoCrMo, Vitalium	kuličkovaný matný	2	$2,1 \pm 0,2$
CLS	Slitina CoCrMo, Vitalium	leštěný, značený laserem	3	$3,0 \pm 0,2$
OL	Slitina FeNiCr	leštěný povrch	1	$1,0 \pm 0,1$
OM	Slitina FeNiCr	kuličkovaný matný	2	$2,0 \pm 0,1$
OLS	Slitina FeNiCr	leštěný, značený laserem	3	$3,0 \pm 0,2$
TM	Slitina Ti6A14V	kartáčovaný povrch	2	$2,0 \pm 0,2$
TT	Slitina Ti6A14V	tryskaný Al_2O_3	4	$3,4 \pm 0,2$
TA	Slitina Ti6A14V	povrch anodizovaný	2	$2,1 \pm 0,2$
TALS	Slitina Ti6A14V	povrch anodizovaný, značený laserem	3	$3,0 \pm 0,1$
TPH	Slitina Ti6A14V	porézní nástřík hydroxyapatit (HA)	5	$5,0 \pm 0,3$
TP	Slitina Ti6A14V	porézní TiO_2 nástřík	5	$5,1 \pm 0,2$
K	Keramika Al_2O_3	jednostranně leštěný	0/2	$1,2 \pm 0,2$
PE	Polyetylen UHMWPE	leštěný povrch	2	$2,0 \pm 0,3$

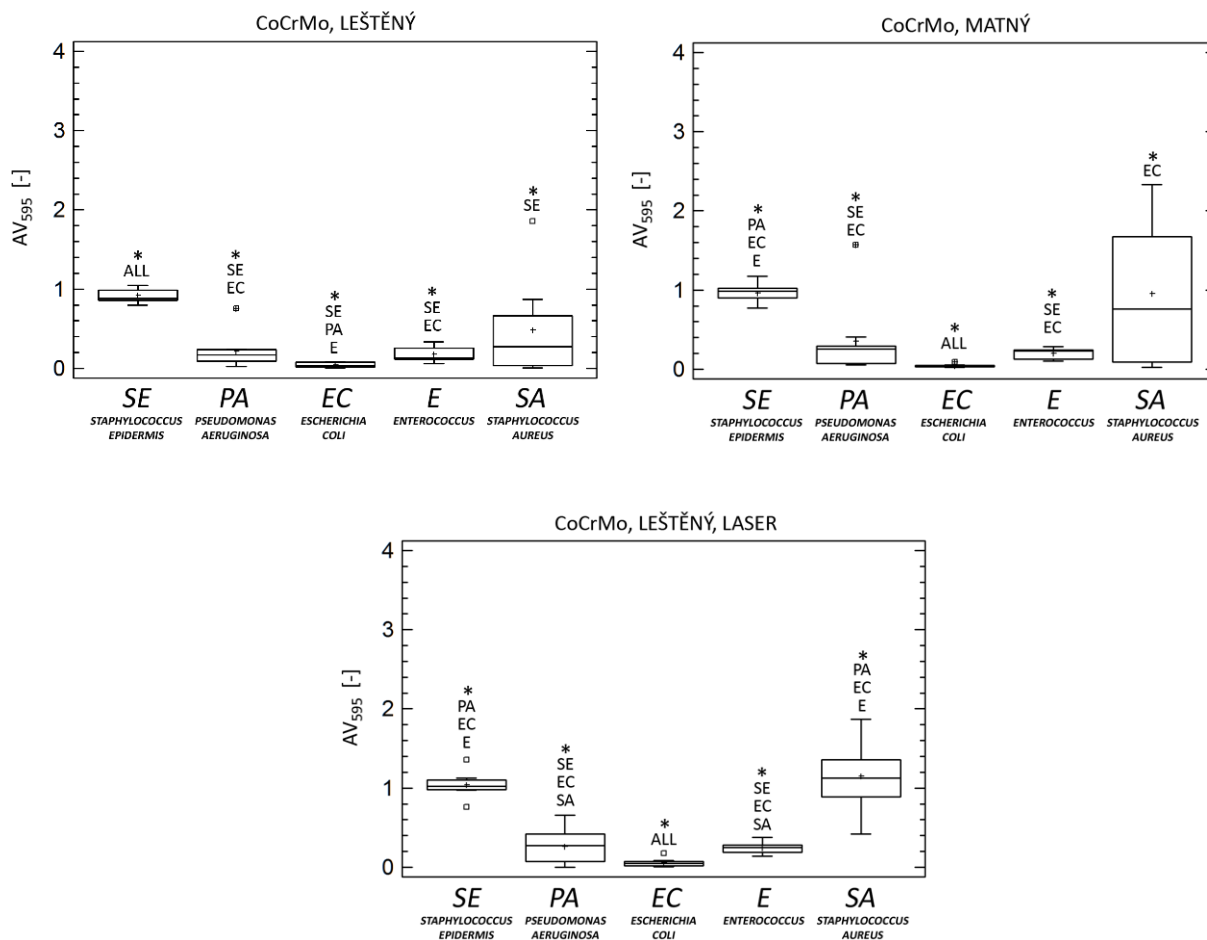


Obr. 14. Srovnání parametru drsnosti Ra všech testovaných vzorků. *značí statisticky významné rozdíly (Mann-Whitneyův test s Bonferroniho korekcí, 0,05, n = 30).

3.3.2. Odolnost aloplastických materiálů vůči různým bakteriálním agens

Výsledky sledování odolnosti jednotlivých materiálů s různou povrchovou úpravou, která se odráží v jejich povrchové drsnosti, vůči různým bakteriálním kmenům jsou uvedeny na Obr. 15-18. Data jsou zpracována jako výsledná absorbance výluhů po kolonizaci (AV₅₉₅), stanovená dle vztahu (1) v kapitole 3.2.2. v závislosti na jednotlivých bakteriálních agens.

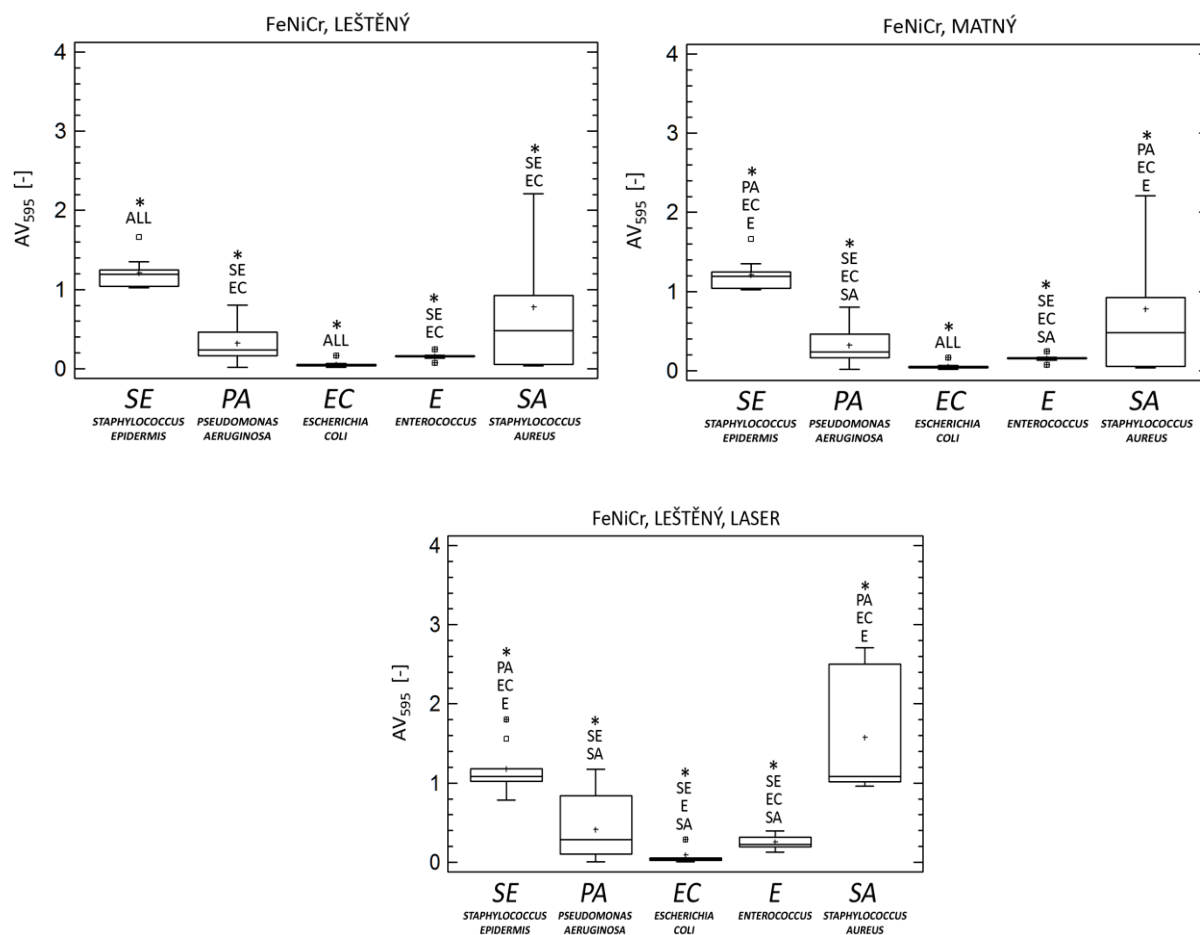
Jak je patrné z Obr. 15, všechny povrchy slitiny CoCrMo vykazují největší odolnost, tzn. nejnižší absorbanci, vůči *E. coli*. Nejlépe adheruje *S. epidermidis* ve všech případech a s postupně vzrůstající povrchovou drsností také *S. aureus*.



Obr. 15. Výsledná absorbance výluhů po kolonizaci jednotlivých bakteriálních agens na vzorcích ze slitiny CoCrMo s leštěným povrchem (CL; $Ra\ 1,0 \pm 0,1$), kuličkovaným matným povrchem (CM; $Ra\ 2,1 \pm 0,2$) a povrchem leštěným a značeným laserem (CLS; $Ra\ 3,0 \pm 0,2$). *značí statisticky významné rozdíly (Mann-Whitneyův test s Bonferroniho korekcí, 0,05, $n=9$).

Obdobný trend je možné vypočítat i u slitin FeNiCr (Obr. 16), kde nejnižší adherence a tedy nejvyšší odolnost se projevuje v případě *E.coli*, naopak nejvyšší citlivost ke kolonizaci vykazují povrchy slitiny FeNiCr v případech *S. epidermidis* a *S. aureus*. S dosažením hodnoty povrchové drsnosti ($Ra\ 3,0 \pm 0,2$) pro povrch značený laserem se začíná projevovat stále více pozitivní adherence i v případě *P. aeruginosa*, která se v grafu projevuje větším rozptylem dat a dosažením maximální hodnoty AV₅₉₅ až 1,2. Velmi

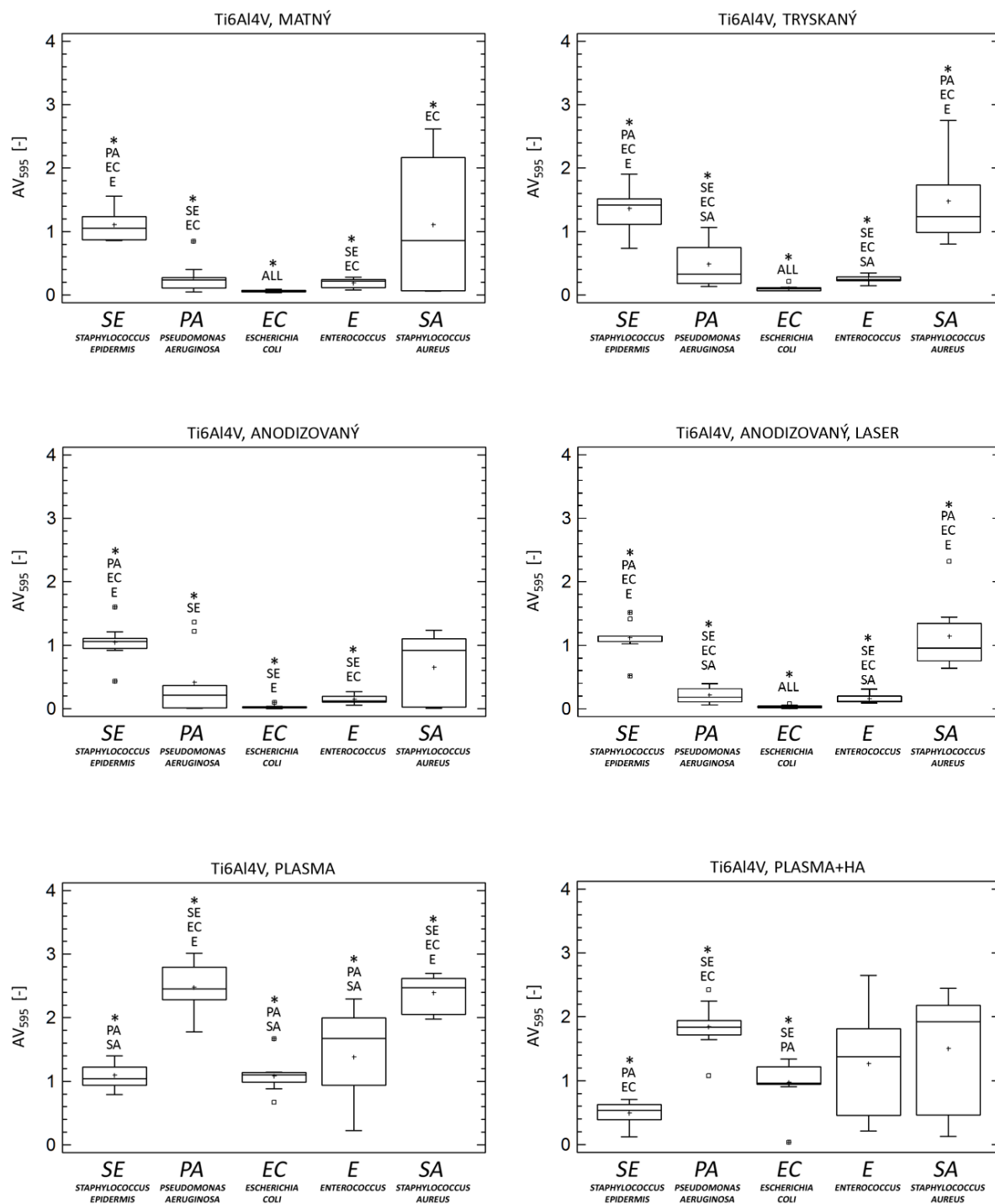
výrazně se projevuje nárůst výsledné absorbance v případě *S. aurea*, kdy 50 % všech změřených dat se pohybuje v intervalu 0,95 – 2,70.



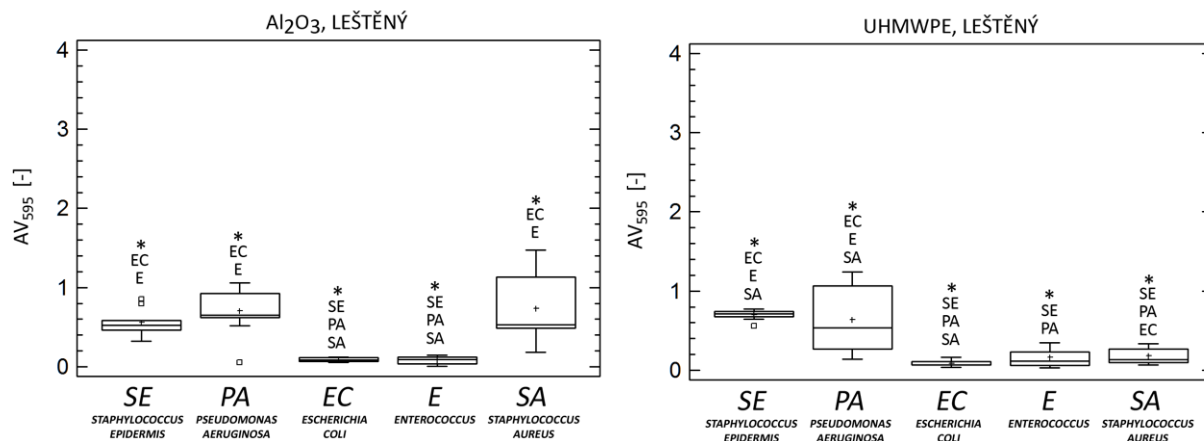
Obr. 16. Výsledná absorbance výluhů po kolonizaci jednotlivých bakteriálních agens na vzorcích ze slitiny FeNiCr s leštěným povrchem (OL; $Ra\ 1,0 \pm 0,1$), kuličkovaným matným povrchem (OM; $Ra\ 2,0 \pm 0,1$) a povrchem leštěným a značeným laserem (OLS; $Ra\ 3,0 \pm 0,2$). *značí statisticky významné rozdíly (Mann-Whitneyův test s Bonferroniho korekcí, 0,05, $n=9$).

Velmi zajímavá je situace v případě povrchů titanové slitiny Ti6Al4V (Obr. 17). Varianty povrchů bez plazmatického nástřiku (kartáčovaný, tryskaný, anodizovaný a značený laserem) mají podobný trend v odolnosti proti jednotlivým bakteriálním kmenům. Opět nejméně adhezuje *E. coli* a nejvíce *S. epidermidis*. Velmi dobře adhezuje také *S. aureus*, avšak na anodizovaných površích hůře než na povrchu matném či tryskaném. S aplikací plazmatického nástřiku, kdy se povrchová drsnost zvýší až na $Ra \sim 5 \mu m$, se situace významně mění. Všechny bakteriální kmeny vykazují nárůst absorbance, avšak trend v afinitě vůči povrchům je zcela odlišný. *S. epidermidis* zde adhezuje hůře než *P. aeruginosa* a *E. coli*. Nižší adherenci má i HA nástřik v porovnání s nástřikem titanovým. Nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly mezi *S. epidermidis* a *Enterococcus* ani v případě srovnání *S. epidermidis* a *S. aureus*, a to z důvodu velkého rozptylu dat u *Enterococcus* a *S. aureus*. Chování *S. aurea* u HA nástřiku se statisticky významně neliší od chování kmene *Enterococcus*, zatímco u titanového nástřiku je stanovená absorbance statisticky významně vyšší. Výrazný nárůst absorbance v porovnání s povrchy bez nástřiku a zároveň i se slitinami CoCrMo a FeNiCr je možné zaznamenat u *P. aeruginosa*.

Výsledky adherence na leštěných površích keramického (Al_2O_3) a polymerního (UHMWPE) materiálu jsou uvedeny na Obr. 18. V případě keramického materiálu je možné, na základě statisticky významných rozdílů, definovat dvě skupiny. První skupinu reprezentují *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* a *S. aureus*, jejichž hodnoty absorbance jsou vyšší v porovnání s druhou skupinou, kterou představují *E. coli* a *Enterococcus*. Na leštěném povrchu UHMWPE nastává pokles absorbance v případě *S. aurea*.



Obr. 17. Výsledná absorbance výluhů po kolonizaci jednotlivých bakteriálních agens na vzorcích ze slitiny Ti6Al4V s kartáčovaným (matným) povrchem (TM; $Ra\ 2,0 \pm 0,2$), tryskaným povrchem (TT; $Ra\ 3,4 \pm 0,2$), anodizovaným povrchem (TA; $Ra\ 2,1 \pm 0,2$), anodizovaným povrchem značeným laserem (TAL; $Ra\ 3,0 \pm 0,1$), s porézním TiO₂ nástřikem (TP; $Ra\ 5,1 \pm 0,2$) a s porézním TiO₂ nástřikem a s HA (TPH; $Ra\ 5,0 \pm 0,3$). *značí statisticky významné rozdíly (Mann-Whitneyův test s Bonferroniho korekcí, 0,05, $n=93$).

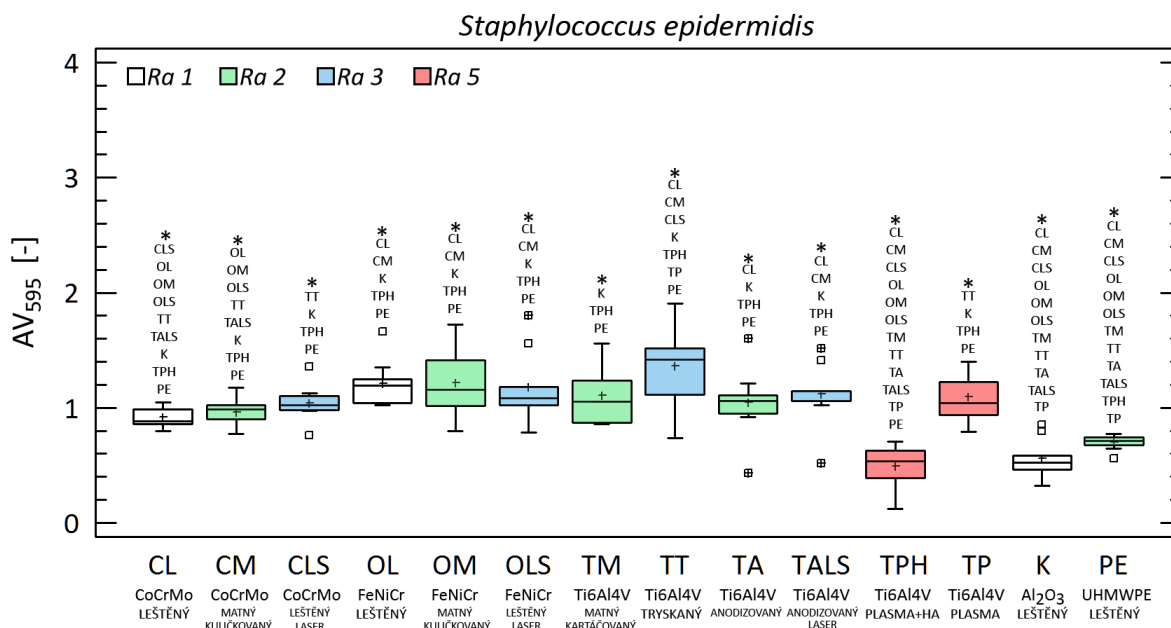


Obr. 18. Výsledná absorbance výluhů po kolonizaci jednotlivých bakteriálních agens na vzorcích z Al₂O₃ keramiky (Ra 1,2 ± 0,2) a UHMWPE (Ra 2,0 ± 0,3) s leštěnými povrchy. *značí statisticky významné rozdíly (Mann-Whitneyův test s Bonferroniho korekcí, 0,05, n=9).

3.3.3. Chování bakteriálních agens na různých površích aloplastických materiálů

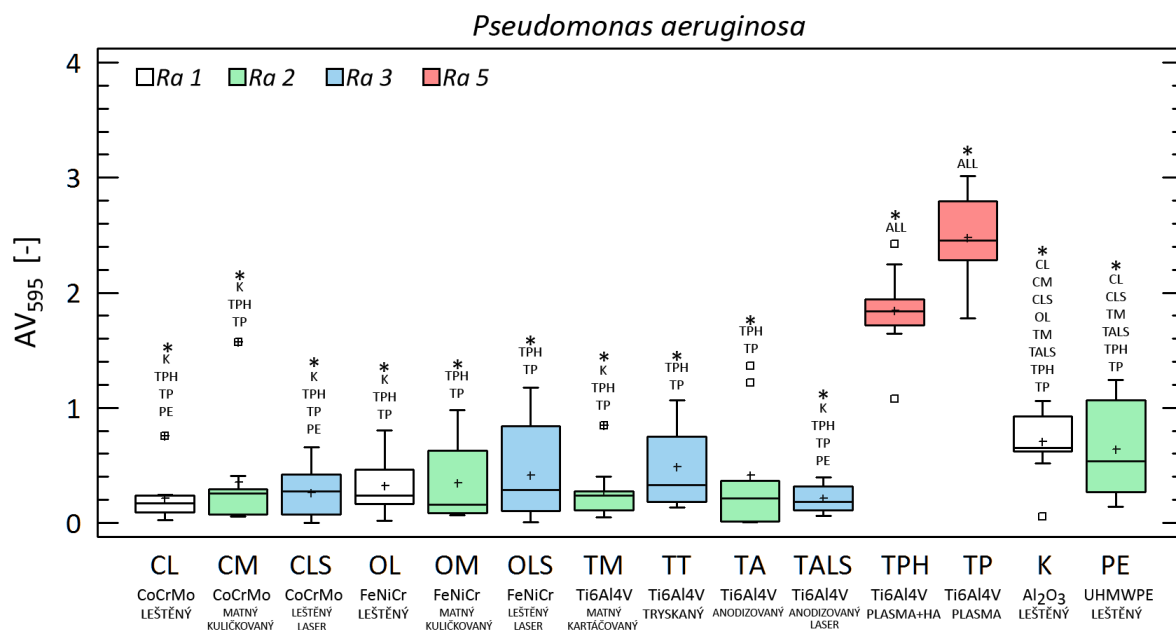
Pro shrnutí chování jednotlivých bakteriálních kmenů na různých površích materiálů byla data sestavena do grafů jako závislost výsledné absorbance výluhů po kolonizaci (AV₅₉₅), stanovené dle vztahu (1) v kapitole 3.2.2., na jednotlivých materiálech (Obr. 19-23). Boxploty jsou barevně rozlišeny na základě povrchové drsnosti.

Graf shrnující výsledky pro *S. epidermidis* je uveden na Obr. 19. Statisticky významně nižší absorbanci, a tudíž nižší adhezenci, prokazoval na površích Ti6Al4V s HA plazmatickým nástřikem (Ra 5,0 ± 0,3) a na leštěných površích Al₂O₃ (Ra 1,2 ± 0,2) a UHMWPE (Ra 2,0 ± 0,3).



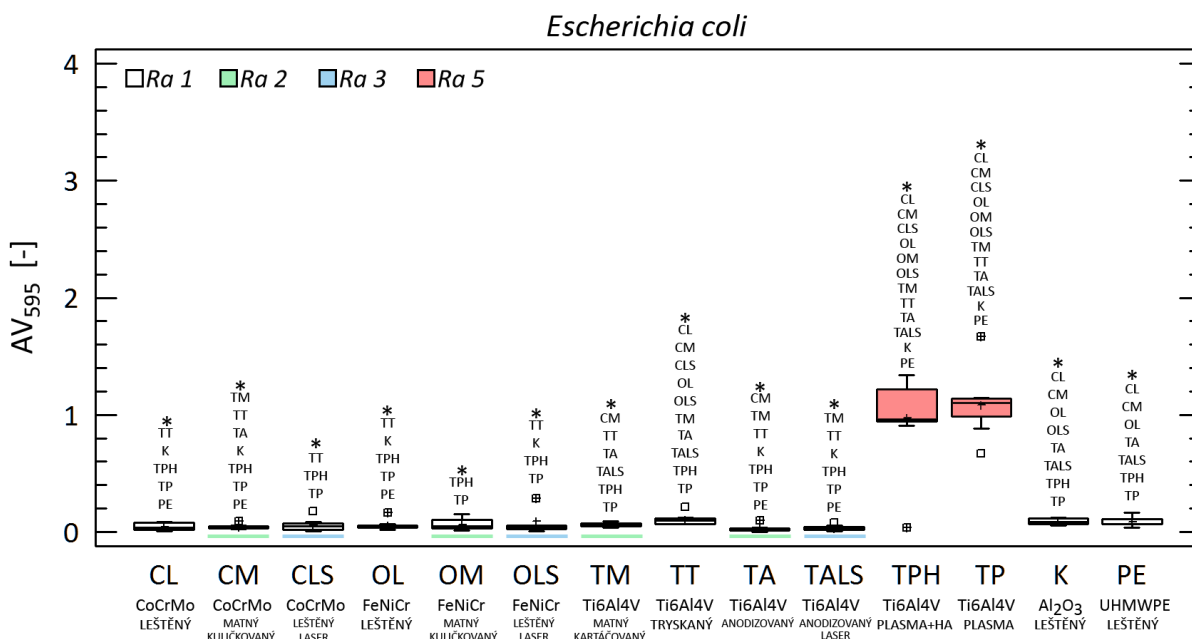
Obr. 19. Výsledná absorbance výluhů po kolonizaci *Staphylococcus epidermidis* na jednotlivých studovaných vzorcích. *značí statisticky významné rozdíly (Mann-Whitneyův test s Bonferroniho korekcí, 0,05, n=9).

Jiná situace nastává při kolonizaci povrchů bakteriálními kmeny *P. aeruginosa* (Obr. 20), *E. coli* (Obr. 21) a kmenem *Enterococcus* (Obr. 22). Všechny tyto zmíněné bakteriální kmeny nejlépe adherují na titanové slitině opatřené oběma typy plazmatického nástřiku (TiO₂ a HA), na površích s nejvyšší povrchovou drsností (Ra ~ 5 μm). Vyšší citlivost ke kolonizaci *P. aeruginosa* má povrch prostého titanového nástřiku (Obr. 20). Hodnoty výsledné absorbance, v případě *Enterococcus* (Obr. 22), mají velký rozptyl dat, a to v rozmezí hodnot od 0,2 do 2,5.

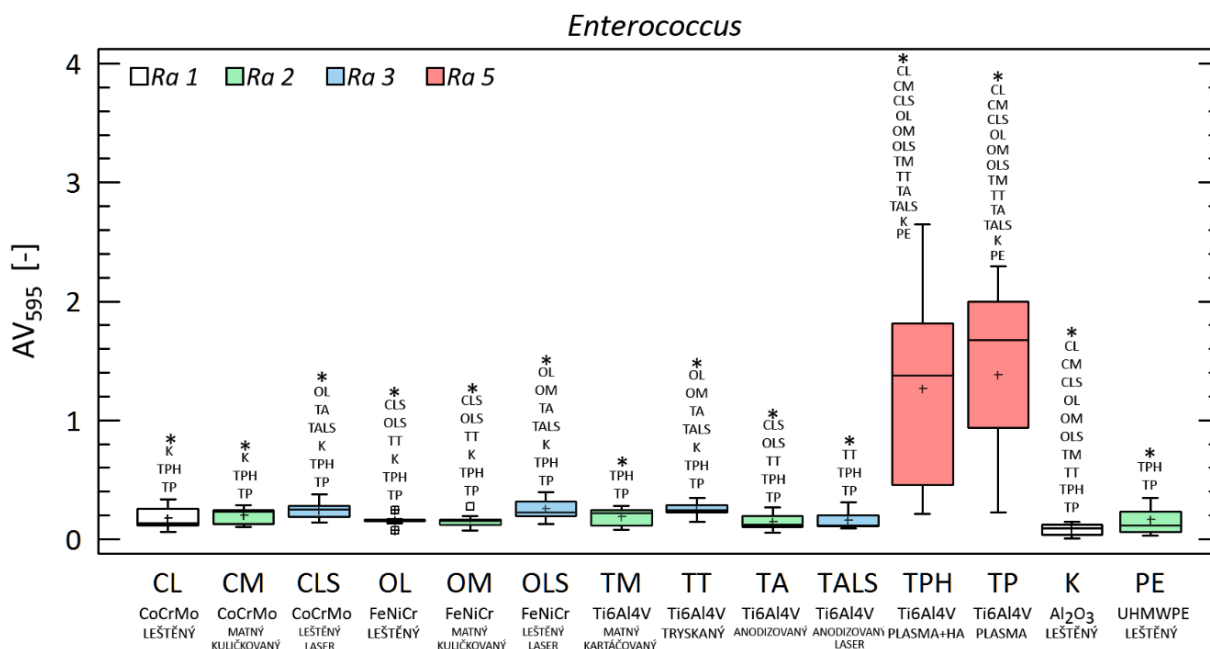


Obr. 20. Výsledná absorbance výluhů po kolonizaci *Pseudomonas aeruginosa* na jednotlivých studovaných vzorcích. *značí statisticky významné rozdíly (Mann-Whitneyův test s Bonferroniho korekcí, 0,05, n=9).

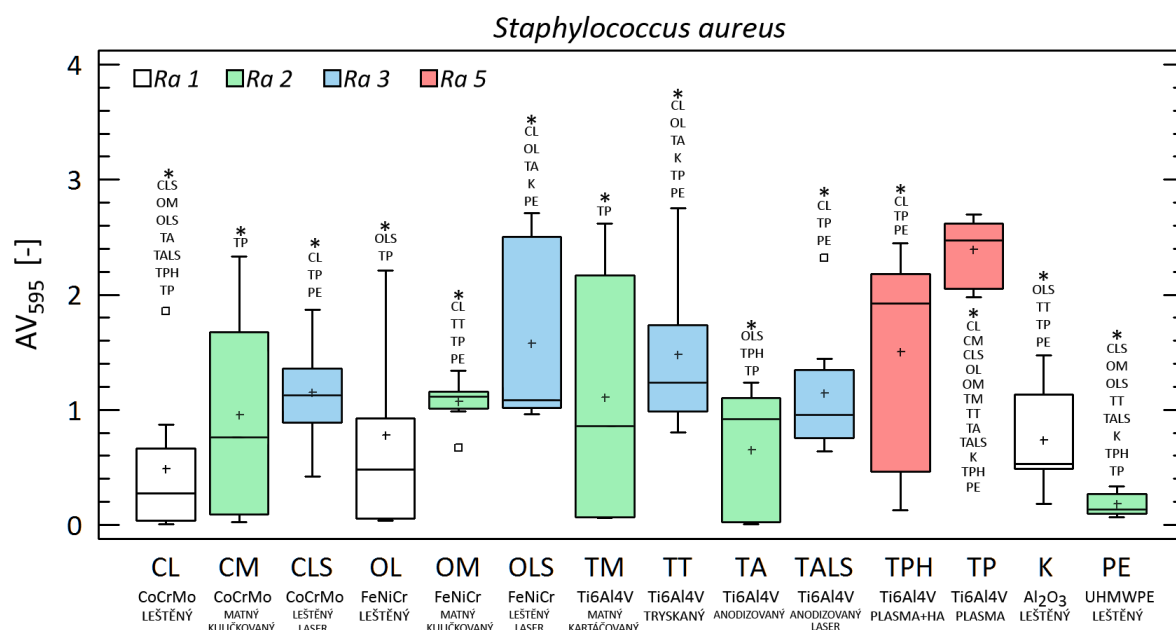
S. aureus (Obr. 23) nejméně ochotně kolonizuje leštěný povrch UHMWPE (Ra 2,0 ± 0,3), jehož hodnota výsledné absorbance se statisticky významně neliší od leštěných povrchů slitin CoCrMo a FeNiCr, kde hodnoty Ra dosahují ~ 1 μm, matných povrchů slitin CoCrMo a Ti6Al4V a anodizovaného povrchu Ti6Al4V, kde hodnoty Ra dosahují ~ 2 μm. Nejvyšší citlivost ke kolonizaci *S. aureus* se projevuje u titanového plazmatického nástřiku (Ra 5,1 ± 0,2), jehož hodnoty výsledné absorbance se statisticky shodují s povrchem slitiny FeNiCr značené laserem (Ra 3,0 ± 0,2).



Obr. 21. Výsledná absorbance výluhů po kolonizaci *Escherichia coli* na jednotlivých studovaných vzorcích. *značí statisticky významné rozdíly (Mann-Whitneyův test s Bonferroniho korekcí, 0,05, n=9).



Obr. 22. Výsledná absorbance výluhů po kolonizaci *Enterococcus* na jednotlivých studovaných vzorcích. *značí statisticky významné rozdíly (Mann-Whitneyův test s Bonferroniho korekcí, 0,05, n=9).



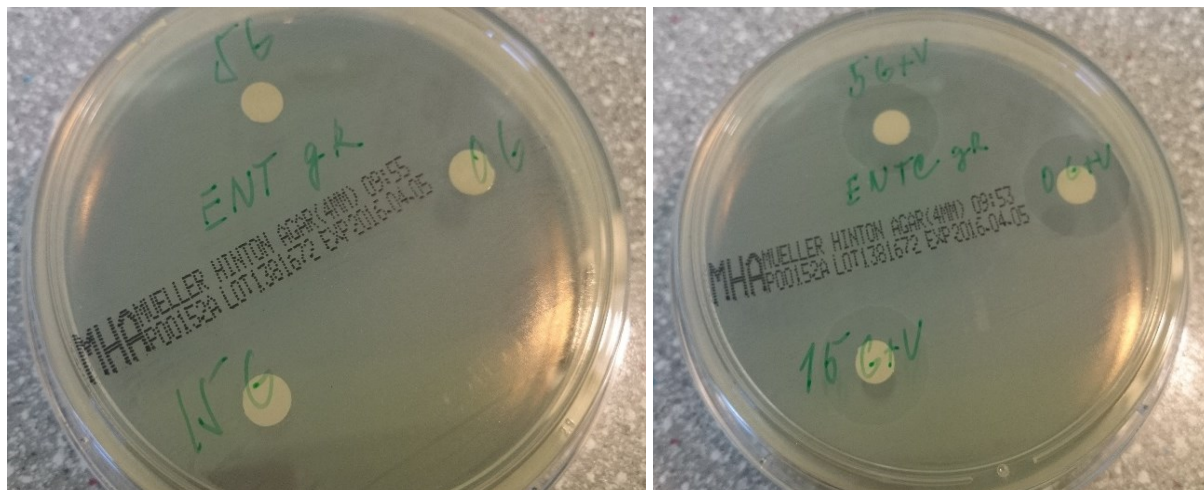
Obr. 23. Výsledná absorbance vyluhů po kolonizaci *Staphylococcus aureus* na jednotlivých studovaných vzorcích. *značí statisticky významné rozdíly (Mann-Whitneyův test s Bonferroniho korekcí, 0,05, n=9).

3.3.4. Testování citlivosti na ATB farmakologicky aktivních vrstvách

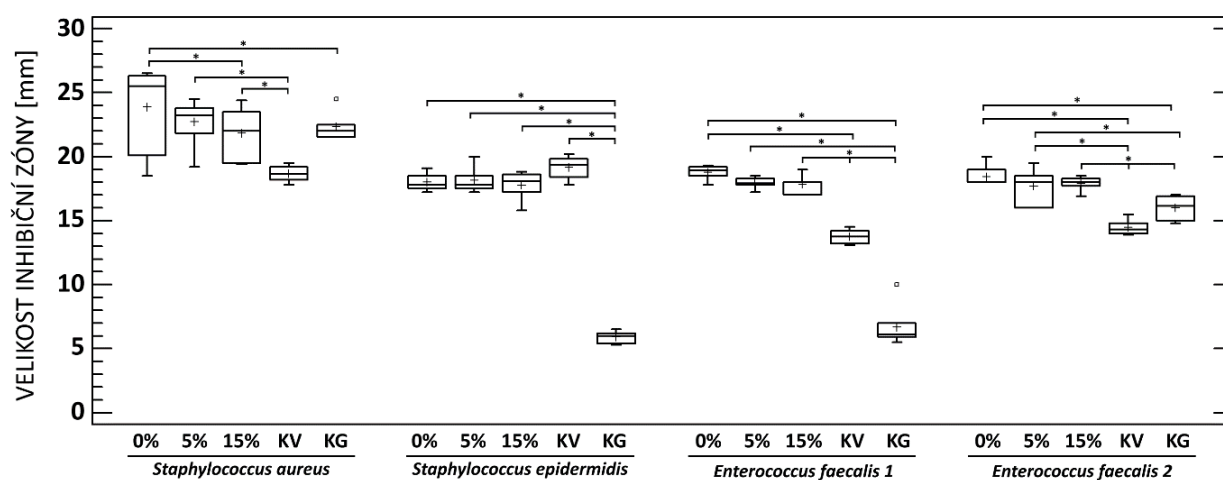
Mikrobiální aktivita všech elektrostaticky zvlákněných vrstev na bázi KOL/HA je testována s použitím diskových difúzních testů pomocí 4 bakteriálních kmenů izolovaných z pacientů. Citlivost je hodnocena na základě přítomnosti či absence inhibičních zón. Vzorky KOL/HA vrstev připravených bez ATB, které mají nulovou inhibiční zónu, byly použity jako negativní kontrola (Obr. 24). Velikost inhibičních zón obklopující vzorky je srovnávána s velikostí inhibičních zón kolem standardních kontrolních disků obsahujících vankomycin (KV) a gentamicin (KG).

Jak je patrné z Obr. 25, všechny studované KOL/HA/V+G vrstvy jsou z hlediska statisticky významných rozdílů srovnatelné nebo lepší než kontrolní vzorky bez ohledu na koncentraci HA. Velmi zajímavé jsou výsledky pro gentamicin-rezistentní kmeny *Staphylococcus epidermidis* a *Enterococcus faecalis* (1), kdy studované vrstvy prokázaly

lepší účinnost proti těmto bakteriálním agens s hodnotami inhibičních zón od 16 do 21 mm, zatímco velikosti inhibičních zón kontrolních vzorků pro gentamicin (KG) dosahovaly hodnot od 5 do 10 mm.



Obr. 24. Ukázka diskového difúzního testu. Disky bez antibiotik (vlevo) a s antibiotiky (vpravo) v prostředí s izolátem *Enterococcus faecalis*.



Obr. 25 Velikost inhibiční zóny v prostředí sledovaných izolátů. Jednotlivé skupiny kolagenových vrstev s 0, 5 a 15 hmot.% hydroxyapatitu obsahují dále kontrolní vzorky pro vankomycin (KV) a gentamicin (GV). *značí statisticky významné rozdíly (Mann-Whitneyův test s Bonferroniho korekcí, 0,05, n=7).

3.4. Diskuze

3.4.1. Aoplastické materiály z pohledu jejich citlivosti ke kolonizaci bakteriemi

Statisticky byl nalezen významný nárůst citlivosti k infekci v případě plazmatických nástřiků titanové slitiny ($R_a \sim 5 \mu\text{m}$), a to pro kmeny *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Enterococcus* a *S. aureus* (Obr. 20–23). Mezi Vitaliem a titanovou slitinou se srovnatelnými povrchovými úpravami nebyl prokázán statisticky významný rozdíl při sledování tvorby biofilmu.

Úpravy pomocí plazmatického nástřiku mají dnes zásadní význam u titanových implantátů, kde je hrubost povrchu důležitá pro lepší osteointegraci. Hrubší povrchy, více či méně porézní, jsou vytvářeny jednovrstevným nebo dvouvrstevným plazmatickým nástřikem. Pokud jsou porézně upravené povrchy porovnávány s hladkým anodizovaným povrchem titanu, je afinita porézního povrchu statisticky významně větší, a to v případech *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Enterococcus* a *S. aureus* (Obr. 20-23). V případě *S. epidermidis* tento závěr však neplatí, citlivost titanové slitiny s HA nástřikem má citlivost dokonce statisticky významně nižší ve srovnání s ostatními materiály (Obr. 19). V tomto případě se může jednat o vliv dalších fyzikálně-chemických faktorů vrstvy (Emery et al. 2003, Campoccia et al. 2013, Chouirfa et al. 2019), které byly uvedeny v Tab. 2 a popsány v kapitole 2.2.1. teoretické části této práce. Důležitou roli při tvorbě biofilmu hraje rovněž chemické složení substrátu, ke kterému bakterie adherují (Chu a Williams 1984). Anodizované povrchy titanové slitiny, jejichž R_a se pohybuje od 2 do 3 μm , jsou pokryty oxidy TiO_2 (Moravec et al. 2014) stejně jako je tomu v případě povrchu s plazmatickým nástřikem TiO_2 ($R_a \sim 5,1$). Jak je patrné z Obr. 20, 21 a 22 pro kmeny *P. aeruginosa*, *E. coli* a *Enterococcus* je rozhodujícím faktorem drsnost, ne chemické složení povrchu. V případech *S. epidermidis* (Obr. 19) a *S. aureus* (Obr. 23) drsnost nemá tak zásadní význam a výsledný efekt může být souhrou mnoha fyzikálních faktorů vrstvy, včetně jejího

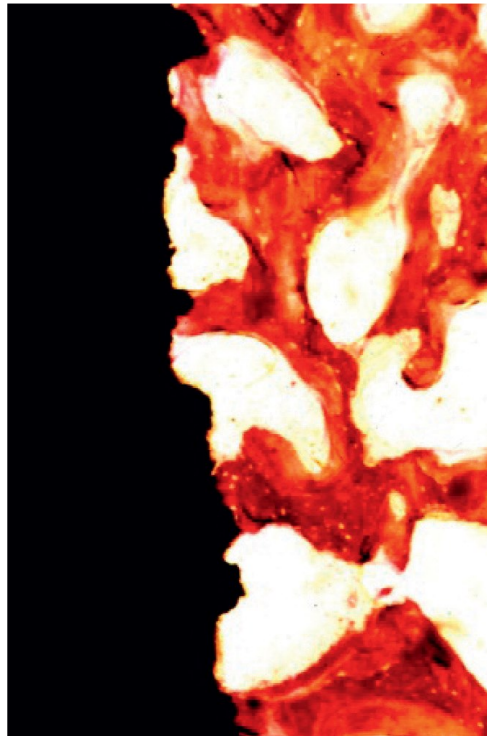
chemického složení. Statisticky významně se od sebe liší povrchy s plazmatickým nástřikem (HA a TiO₂) podle stupně porozity (Obr. 19, 20, 22, 23). V případě *E. coli* (Obr. 21) jsou však rozdíly statisticky nevýznamné.

Při porovnávání základních kovových materiálů v hladké (leštěné) povrchové úpravě má Vitalium nejnižší afinitu k adhezi a kolonizaci mikroorganismy, situace u titanu a oceli je srovnatelná. Statisticky však mezi nimi nenacházíme významný rozdíl. Všechny materiály se projeví jako velmi stabilní v parametru náchylnosti k infekci i při základních úpravách povrchu s menší hrubostí používaných v endoprotetice.

Při porovnání materiálů podle jejich průměrné afinity v jejich nejhladší povrchové úpravě vykazoval nejnižší afinitu UHMWPE v porovnání s ostatními materiály vůči *S. aureus* (Obr. 23), spíše nižší vůči *S. epidermidis* (Obr. 19), srovnatelná s ostatními je v případě *Enterococcus* (Obr. 22), spíše vyšší vůči *E. coli* (Obr. 21) a v případě *P. aeruginosa* patří UHMWPE k povrchům s vyšší afinitou v porovnání s ostatními povrchy (Obr. 20). Určitým překvapením se může zdát poměrně vysoká „odolnost“ UHMWPE, který dle klasické literatury patří ve vztahu ke kolonizaci spíše mezi citlivější materiály (Petty et al. 1985), a to z důvodu hydrofobicity povrchu (Fletcher a Loeb, 1979). Jiná studie, ve shodě se zde prezentovanými výsledky, uvádí preferenci *S. aureus* vytvářet biofilm na kovovém povrchu před UHMWPE (Barth et al. 1989, Gristina a Hobgood 1987). Tento nálezní potvrzuje i práce Gómez Barrena et al. 2012, kde při infekční komplikaci v oblasti implantované kloubní náhrady kolena je kolonizace artikulační vložky (UHMWPE) mikrobiálním agens nejnižší (Gristina and Corterton, 1987). Barth et al. 1989 a Gristina a Hobgood 1987 zjistili, že *S. epidermidis* dává přednost UHMWPE před kovovými slitinami. Tento fakt se však v této studii nepotvrdil (Obr. 19). Rovněž Kinnari et al. 2010 nenalezli rozdíly v adhezenci mezi *S. aureus* a *S. epidermidis* na povrchu sterilizovaného UHMWPE bez ohledu na povrchovou drsnost.

Je možné konstatovat, že *S. epidermidis* (Obr. 19) a *S. aureus* (Obr. 23) poměrně velmi dobře adherují na všech typech materiálů, nepreferují významně povrchovou drsnost v porovnání s ostatními testovanými kmeny (Obr. 20, 21, 22). Vyšší hodnoty absorbance v porovnání se *S. epidermidis* (Obr. 19) vykazoval *S. aureus* (Obr. 23), což potvrzuje jeho snadnou tvorbu biofilmu a adherenci k různým variacím povrchů materiálů a skutečnost, že je nejčastějším etiologickým agens způsobujícím osteomyelitidu. Není tedy náhoda, že bakterie *S. aureus* a *S. epidermidis* jsou zodpovědné za 48 % až 56 % pozitivních nálezů při revizích kloubních náhrad (Garvin et al. 1999). Jak v případě *S. aureus*, tak v případě *S. epidermidis* je možné nalézt rozdíly v adherenci mezi jednotlivými studovanými vzorky. Zdůvodnění, proč tomu tak je, však není zcela jednoznačné a na základě analytických metod, použitých v této práci, není možné tento trend rozklíčovat. Uplatňuje se zde celá škála faktorů (Tab. 2, kapitola 2.2.1.), které hrají důležitou roli ve vzájemném vztahu konkrétního bakteriálního kmene a konkrétního materiálu.

Určitou limitací této studie je hodnocení porézních povrchů *in vitro*, které vykazují zvýšenou citlivost ke kolonizaci. *In vivo* bude ve prospěch tohoto materiálu sloužit výhoda konceptu „race for surface“ (Gristina 1987). Porézní titan, a zejména pak jeho HA vrstva, totiž značně akceleruje osídlení povrchu osteoblasty a osteointegraci implantátu do kostního lůžka (Obr. 26).



Obr. 26. Optimální vazba dvouvrstevného povrchu implantátu s nástřikem HA do kostního lůžka (Landor et al. 2009).

Po osteointegraci tohoto povrchu nemá již bakteriální agens prostor tento povrch kolonizovat. Problémem mohou být části porézních povrchů, které zůstávají mimo kontakt s kostí a jejich afinita ke kolonizaci tudíž zůstává trvale vysoká. Bakterie tak mohou velmi rychle vyplnit porézní labyrint, kde v glykokalyxové vrstvě mohou přežívat (Cordero 1996, Gristina a Costerton 1985). Negativní vliv má i nesrovnatelně větší plocha porézního povrchu (Cordero 1996). Oga et al. 1993 sice prokázali *in vitro* srovnatelnou afinitu ke kolonizaci u HA nástřiku v porovnání s povrchem hladkého titanu, nicméně v tomto případě se jednalo o povrch s minimální porozitou. HA nástřik, který byl také použit ve studiích Landor et al. 2007, Landor et al. 2009, je kombinovaný, tzn. je nanesen na silně porézní základní vrstvu TiO₂. Tak se porozita původní vrstvy o něco sníží, což se projevuje snížením afinity ke kolonizaci v této studii (Obr. 19, 20, 22, 23).

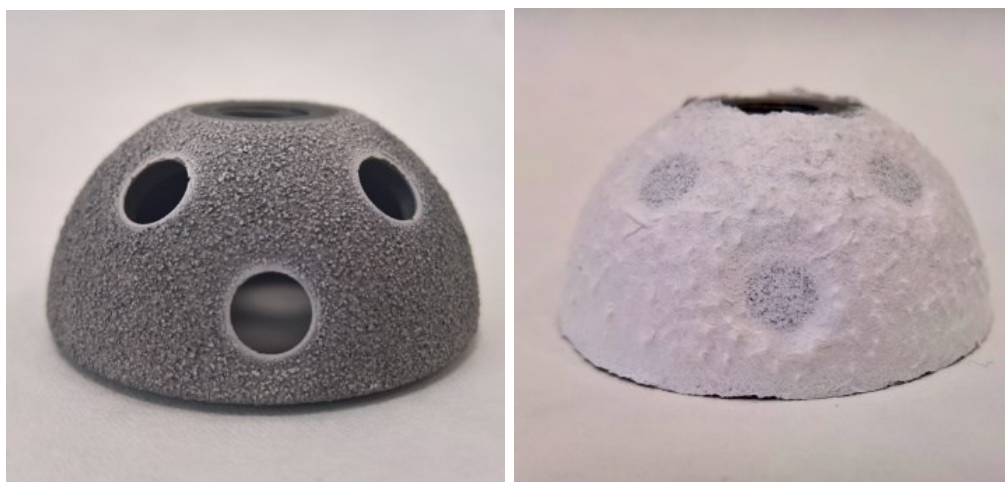
Materiálem volby pro konstrukci cementovaných endoprotéz je Vitalium, které má zejména v leštěné úpravě vynikající odolnost proti kolonizaci. Horší integrační možnosti materiálu nahrazuje fixace do kostního lůžka zprostředkovaná kostním cementem (polymetylmetakrylát). Výhodou užití kostního cementu je možnost jeho míchání s antibiotiky. Cement pak slouží jako lokální nosič antibiotik, což zvyšuje ochranu implantátu vůči kolonizaci bakteriemi (Jiranek 2005).

V případě titanových implantátů s porézními povrchy, které jsou dnes metodou volby u necementovaných aloplastik, je určitým obranným mechanismem rychlá integrace implantátu do kostního lůžka, kdy se vítězem závodu o povrch stává osteoblast. Navíc *in vivo* titan projevuje vynikající biokompatibilitu, kde měkké tkáně pevně adherují k implantátu, aniž by vznikal mrtvý prostor mezi implantátem a jeho vazivovým obalem, jako je tomu u materiálů z oceli. V tomto mrtvém prostoru se totiž bakterie bez vlivu obranných mechanismů volně šíří a množí (Jahoda et al. 2000).

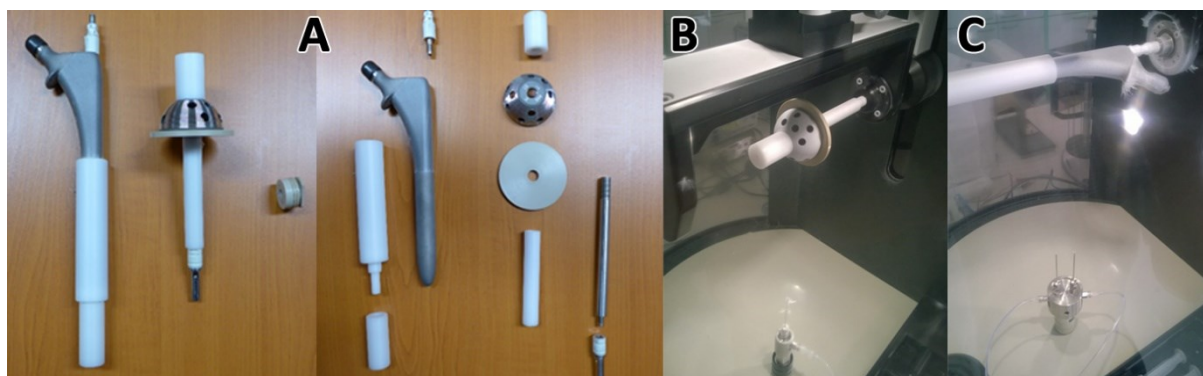
V současné době již existují různé druhy antimikrobiálních povrchů, založené na iontech nebo na nanočásticích kovů, které vedou ke zvýšení antibakteriální aktivity (Lemire et al. 2013). Otázkou zůstává jejich cytotoxicita (Mijnendonckx et al. 2013). Stále více se do popředí vědeckého zájmu dostávají farmakologicky aktivní vrstvy, které byly teoreticky popsány v kapitole 2.3.3. teoretické části této práce.

3.4.2. Farmakologicky aktivní vrstvy na bázi KOL/HA/ATB

V rámci projektu technologické agentury České republiky (TA04010330) jsem působil jako člen vědeckého týmu a aktivně jsem se tak podílel na vývoji osteokonduktivního kompozitního nano vláknenného nosiče na bázi KOL a HA. Jeho složení a příprava byly popsány v kapitole 3.1.2. experimentální části této práce. Idea tohoto nosiče spočívá v jeho schopnosti navázat se na hrubý titanový povrch protézy (Obr. 27), vyplnit mrtvý prostor mezi implantátem a kostním lůžkem a spolu s elucí antimikrobiálního agens chránit povrch implantátu před kolonizací bakteriálními kmeny. Tento povrch by mohl významně zvýšit rezistenci implantátu proti infekci (Obr. 28).



Obr. 27. Detailní ukázka jamek před a po pokryvu a zesílení KOL/HA/ATB vrstvy (Suchý et al. 2017a).



Obr. 28 Ukázka pomocných zařízení navržených pro pokryv vybraných částí endoprotéz (A) a jejich použití v zařízení 4Spin (B, C) (Suchý et al. 2018).

Nejprve byl tento kompozitní materiál testován pouze jako nosič vankomycinu (Suchý et al. 2016, Suchý et al. 2017) a posléze také pro kombinaci vankomycin + gentamicin.

Na základě výsledků testování účinnosti těchto vrstev, v kapitole 3.2.3. experimentální části této práce, všechny studované KOL/HA vrstvy, impregnované směsí vankomycinu a gentamicinu, vykazovaly srovnatelné nebo lepší výsledky než kontrolní vzorky. Koncentrace HA (5, 10 a 15 hm.%) nemá významný vliv na antimikrobiální účinnost. Pozitivum přidaného HA spočívá v tom, že imituje složení reálné kosti a přispívá tak ke zvýšení biokompatibility daného materiálu. Synergické účinky aplikovaných ATB (vankomycin – grampozitivní, gentamicin – gramnegativní) rozšiřují antimikrobiální spektrum navrhovaného materiálu proti různým vícenásobným rezistentním kmenům. Z tohoto hlediska je kombinace V+G, navíc jen v polovičních koncentracích, účinnější než monoterapie vankomycinem nebo gentamycinem (Suchý et al. 2019).

4. Závěry a zhodnocení cílů a hypotéz práce

Cílem této disertační práce bylo potvrdit či vyvrátit vytýčené hypotézy, a to pomocí experimentální analýzy fyzikálních a biologických vlastností s důrazem na statistické vyhodnocení použitých analýz a jejich interpretaci. Vytčené cíle disertační práce byly splněny podle zadaných cílů a prezentované výsledky potvrdily dvě ze tří stanovených hypotéz.

- drsnost povrchu je určujícím faktorem při tvorbě biofilmu bez ohledu na typ materiálu

Zvýšení drsnosti nevede u všech materiálů ke zvýšení citlivosti vůči všem izolátům. Drsnost povrchu je určujícím faktorem při tvorbě biofilmu bez ohledu na typ materiálu v případech kmenů *E. coli*, *Enterococcus* a *P. aeruginosa*. Zvýšení drsnosti povrchu do určité míry ($R_a = 1 - 3 \mu\text{m}$) nevede u těchto izolátů k rozdílné citlivosti. To se projeví až při dosažení hodnoty $R_a = 5$. U kmenů *S. epidermidis* a *S. aureus* tato hypotéza neplatí. U těchto dvou izolátů nemá drsnost povrchu statisticky významný vliv na změnu citlivosti. *S. epidermidis* a hlavně *S. aureus* poměrně velmi dobře adherují na všech typech materiálů bez ohledu na povrchovou drsnost materiálu. Bylo prokázáno, že *S. aureus* má vyšší afinitu spíše ke kovovým materiálům a k Al_2O_3 než k materiálu polymernímu (UHMWPE). Přesto je možné konstatovat, že vykazuje růstovou nenáročnost a dobrou adaptaci na různé variace materiálů, což potvrzuje situaci v klinické praxi. Značení laserem nevede nutně ke zvýšení citlivosti. První hypotézu není tedy možné zobecnit na všechny typy materiálu a bakteriální agens.

- hodnocení citlivosti povrchu jednotlivých typů alopplastických materiálů vůči bakteriální kolonizaci s použitím pouze jednoho typu bakteriálního agens může být zavádějící, a proto je nutné ke komplexnímu hodnocení použít více typů bakteriálních izolátů

Komplexní hodnocení všech běžně užívaných aloplastických materiálů, na základě testování pomocí bakteriálních kmenů považovaných za nejčastější původce infekcí kloubních náhrad, se ukázalo jako velmi efektivní. V literatuře prakticky není možné takovouto komplexní studii nalézt, vždy jsou porovnávány pouze některé typy materiálů s omezeným počtem bakteriálních agens. Na základě výsledků bylo možno bakteriální kmeny rozdělit do dvou skupin podle preference vysoké povrchové drsnosti. Jak bylo prokázáno, do první skupiny je možné zařadit kmeny *E. coli*, *P. aeruginosa* a *Enterococcus*, které preferují vysokou povrchovou drsnost. Druhá skupina, do níž patří *S. aureus* a *S. aeruginosa*, nemají povrchovou drsnost jako svou prioritu. Tato komplexní analýza prokázala, že pro pochopení trendu chování bakteriálních agens na površích implantátů není možné vytvářet závěry pouze na základě studia jednoho či dvou bakteriálních kmenů. Určujícím faktorem je daný bakteriální kmen, jeho daná afinita k danému materiálu, která je komplexem mnoha fyzikálně-chemických vlastností nejen samotného bakteriálního agens, ale také substrátu. Bez provedení takovéto komplexní analýzy je možné získat pouze nepřesné, zavádějící či dokonce zcela mylné závěry.

- citlivost vůči kolonizaci je možné významně snížit nanesením farmakologicky aktivní vrstvy na povrch materiálů, které imitují složení a strukturu reálné kosti a jejichž osteointegrační potenciál je přes zvýšenou afinitu k infekci pro vývoj aloplasty nepostradatelný.

Farmakologicky aktivní kompozity na bázi kolagen-hydroxyapatitové nanostrukturované vrstvy s řízenou elucí antibiotik (kombinace vankomycin a gentamicin) prokázaly minimalizaci citlivosti vůči kolonizaci rezistentními bakteriálními kmeny. Svým složením a strukturou imitují složení reálné kosti, akcelerují fixaci v kosti po implantaci a působí preventivně proti vzniku nebo rozšíření osteomyelitidy. Kinetika uvolňování antibiotik byla optimalizována s cílem dosažení vhodné míry uvolňování

antibiotik a s tím spojené degradace kolagenové složky a zastoupení hydroxyapatitové složky, takové, aby byla dostatečně antibakteriálně účinná a současně netoxická pro organismus. Vyvinuté kolagen-hydroxyapatitové vrstvy s řízeným uvolňováním antibiotik mají perspektivu stát se moderním zdravotnickým prostředkem první volby v ortopedii a traumatologii, a to pro pacienty s rizikem rozvoje infekčních komplikací, které v současnosti vedou k selhání léčby.

5. Výstupy práce autora ve vztahu k dizertaci - seznam

Výstupy vztahující se k 1. tématické části disertační práce

- 1) **BALLAY, R.**, LANDOR, I, RŮŽIČKA, F, MELICHERČÍK, P, TOMAIDES, J, JAHODA, D. Alloplastic Materials and their Propensity to Bacterial Colonisation. *Acta chirurgiae orthopaedicae et traumatologiae Cechoslovaca*, 2016, 83.3: 163-168.

IF=0.560

- 2) MELICHERČÍK, P, ČEŘOVSKÝ, V, NEŠUTA O, JAHODA D, LANDOR, I, **BALLAY, R**, FULÍN, P. Testing the efficacy of antimicrobial peptides in the topical treatment of induced osteomyelitis in rats. *Folia microbiologica*, 2018, 63.1: 97-104.

IF=1.448

- 3) LANDOR, I, VAVŘÍK, P, JAHODA, D, POKORNÝ, D, **BALLAY, R**, SOSNA, A. Long-term experience with the combined ARBOND hydroxyapatite coating in implant osteointegration. *Acta chirurgiae orthopaedicae et traumatologiae Cechoslovaca*, 2009, 76.3: 172-178.

IF=1.628

Ocenění

Vítěz 28. ročníku **Frejkovy ceny (2016)** s přednáškou "**Aloplastické materiály a jejich citlivost ke kolonizaci**".

Výstupy vztahující se k 2. tématické části disertační práce

Publikace

- 1) SUCHÝ, T, VIŠTEJNOVÁ, L, ŠUPOVÁ, KLEIN, P, BARTOŠ, M, KOLINKO, Y, BLASSOVÁ, T, TONAR, Z, POKORNÝ, M, SUCHARDA, Z, ŽALOUDKOVÁ, M, DENK, F, **BALLAY, R**, JUHÁS, Š, JUHÁSOVÁ, J, KLAPKOVÁ, E, HORNÝ, L, SEDLÁČEK, R, GRUS, T, ČEJKA, Z jr., ČEJKA, Z, CHUDĚJOVÁ, K, HRABÁK, J.

Vancomycin-loaded collagen/hydroxyapatite layers electrospun on 3D printed titanium implants prevent bone destruction associated with *S. epidermidis* infection and enhance osseointegration. *Biomedicines*, přijato k publikaci.

IF=4.717

- 2) SUCHÝ, T, ŠUPOVÁ, M, SAUEROVÁ, P, KALBÁČOVÁ, MH, KLAPKOVÁ, E, POKORNÝ, M, HORNÝ, L, ZÁVORA, J, **BALLAY, R**, DENK, F, SOJKA, M, VIŠTEJNOVÁ, L. Evaluation of collagen/hydroxyapatite electrospun layers loaded with vancomycin, gentamicin and their combination: Comparison of release kinetics, antimicrobial activity and cytocompatibility. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2019, 140: 50-59.

IF=4.604

- 3) SUCHÝ, T, ŠUPOVÁ, M, KLAPKOVÁ, E, ADÁMKOVÁ, V, ZÁVORA, J, ŽALOUKOVÁ, M, RÝGLOVÁ, Š, **BALLAY, R**, DENK, F, POKORNÝ, M, SAUEROVÁ, P, KALBÁČOVÁ, MH, HORNÝ, L, VESELÝ, J, VOŇAVKOVÁ, T, PRŮŠA, R. The release kinetics, antimicrobial activity and cytocompatibility of differently prepared collagen/hydroxyapatite/vancomycin layers: microstructure vs. nanostructure. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2017, 100: 219-229.

IF=3.466

- 4) SUCHÝ, T, ŠUPOVÁ, M, KLAPKOVÁ, E, HORNÝ, L, RÝGLOVÁ, Š, ŽALOUKOVÁ, M, BRAUN, M, SUCHARDA, Z, **BALLAY, R**, VESELÝ, J, CHLUP, H, DENK, F. The sustainable release of vancomycin and its degradation products from nanostructured collagen/hydroxyapatite composite layers. *Journal of pharmaceutical sciences*, 2016, 105.3: 1288-1294.

IF=2.713

Mezinárodní patent

SUCHÝ, T, ŠUPOVÁ, M, DENK, F, RÝGLOVÁ, Š, ŽALOUKOVÁ, M, SUCHARDA, Z, **BALLAY, R**, HORNÝ, L, ČEJKA, Z, POKORNÝ, M, KNOTKOVÁ, K, VELEBNÝ, V.: A nanocomposite layer on the basis of collagen nanofibers, and a method of preparation thereof. European Patent Office. Patent EP3311854. 2020-07-09.

6. Použitá literatura

- 2nd *International Consensus Meeting on Musculoskeletal Infection 2016-2018* [<https://icmphilly.com/>]. ©2018 ICM Philly [Cit. August 2018, Noble et al. International Consensus Meeting on Prosthetic Joint Infection]. Dostupné z: <https://icmphilly.com/questions/do-antibiotic-coatings-on-implants-reduce-the-rates-of-surgical-site-infections-periprosthetic-joint-infections-ssis-pjis/>
- ABDELKEBIR, K., et al. Biomimetic layer-by-layer templates for calcium phosphate biomineralization. *Acta biomaterialia*, 2012, 8.9: 3419-3428.
- AGGARWAL, Vinay K., et al. Organism profile in periprosthetic joint infection: pathogens differ at two arthroplasty infection referral centers in Europe and in the United States. *The journal of knee surgery*, 2014, 27.05: 399-406.
- AHERWAR, Amit; SINGH, Amit Kumar; PATNAIK, Amar. Cobalt Based Alloy: A Better Choice Biomaterial for Hip Implants. *Trends in Biomaterials & Artificial Organs*, 2016, 30.1.
- ALGHAMDI, Hamdan S., et al. Biological response to titanium implants coated with nanocrystals calcium phosphate or type 1 collagen in a dog model. *Clinical oral implants research*, 2013, 24.5: 475-483.
- ALHAMDI, Jumana, et al. Cell Type Influences Local Delivery of Biomolecules from a Bioinspired Apatite Drug Delivery System. *Materials*, 2018, 11.9: 1703.
- ALT, Volker, et al. The effects of combined gentamicin–hydroxyapatite coating for cementless joint prostheses on the reduction of infection rates in a rabbit infection prophylaxis model. *Biomaterials*, 2006, 27.26: 4627-4634.
- AMBROSE, Catherine G., et al. Evaluation of antibiotic-impregnated microspheres for the prevention of implant-associated orthopaedic infections. *JBJS*, 2014, 96.2: 128-134.
- AN, Yuehuei H.; FRIEDMAN, Richard J. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *Journal of biomedical materials research*, 1998, 43.3: 338-348.
- AO, Haiyong, et al. Fabrication and in vitro evaluation of stable collagen/hyaluronic acid biomimetic multilayer on titanium coatings. *Journal of The Royal Society Interface*, 2013, 10.84: 20130070.
- ARAFAT, M. Tarik, et al. Biomimetic composite coating on rapid prototyped scaffolds for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 2011, 7.2: 809-820.
- ARENS, St, et al. Influence of materials for fixation implants on local infection: an experimental study of steel versus titanium DCP in rabbits. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, 1996, 78.4: 647-651.
- ARVIDSSON, Anna, et al. Nucleation and growth of calcium phosphates in the presence of fibrinogen on titanium implants with four potentially bioactive surface preparations. An in vitro study. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2009, 20.9: 1869-1879.

- AZO MATERIALS. Titanium Alloys - Physical Properties. Dostupné z: https://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=1341#_Fracture_Toughness
- BARTH, Elin, et al. In vitro and in vivo comparative colonization of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* on orthopaedic implant materials. *Biomaterials*, 1989, 10.5: 325-328.
- BERBARI, Elie F., et al. The Mayo prosthetic joint infection risk score: implication for surgical site infection reporting and risk stratification. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 2012, 33.8: 774-781.
- BEZNOSKA. Necementovaný dřík TEP kyčelního kloubu. Dostupné z: <http://www.beznoska.cz/product/necementovany-drik-tep-kycelniho-kloubu-typ-sf/>
- BOHNER, M. Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. *Injury*, 2000, 31: D37-D47.
- BOSSE, Michael J.; GRUBER, Helen E.; RAMP, Warren K. Internalization of bacteria by osteoblasts in a patient with recurrent, long-term osteomyelitis: a case report. *JBJS*, 2005, 87.6: 1343-1347.
- BRAMMER, Karla S.; FRANDBSEN, Christine J.; JIN, Sungho. TiO₂ nanotubes for bone regeneration. *Trends in biotechnology*, 2012, 30.6: 315-322.
- BRUNK, Aaron; KOLBE, Niklas; SFAKIANAKIS, Nikolaos. Chemotaxis and haptotaxis on cellular level. In: *XVI International Conference on Hyperbolic Problems: Theory, Numerics, Applications*. Springer, Cham, 2016. p. 249-261.
- BUSSCHER, Henk J., et al. Biomaterial-associated infection: locating the finish line in the race for the surface. *Science translational medicine*, 2012, 4.153: 153rv10-153rv10.
- CALABRO, Lorenzo, et al. Animal models of orthopedic implant-related infection. In: *Biomaterials associated infection*. Springer, New York, NY, 2013. p. 273-304.
- CAMPOCCIA, Davide; MONTANARO, Lucio; ARCIOLA, Carla Renata. A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces. *Biomaterials*, 2013, 34.34: 8533-8554.
- CATON, Jacques; PRUDHON, Jean Louis. Over 25 years survival after Charnley's total hip arthroplasty. *International orthopaedics*, 2011, 35.2: 185-188.
- CEYLAN, Hakan, et al. Bone-like mineral nucleating peptide nanofibers induce differentiation of human mesenchymal stem cells into mature osteoblasts. *Biomacromolecules*, 2014, 15.7: 2407-2418.
- CHAI, Feng, et al. Antibacterial activation of hydroxyapatite (HA) with controlled porosity by different antibiotics. *Biomolecular engineering*, 2007, 24.5: 510-514.
- CHAKRABORTY, Jui; SINHA, Mithlesh K.; BASU, Debabrata. Biomolecular Template-Induced Biomimetic Coating of Hydroxyapatite on an SS 316 L Substrate. *Journal of the American Ceramic Society*, 2007, 90.4: 1258-1261.
- CHAKRABORTY, Jui, et al. Effect of albumin on the growth characteristics of hydroxyapatite coatings on alumina substrates. *Journal of the American Ceramic Society*, 2007, 90.10: 3360-3363.

- CHARLES, Lyndon F., et al. Effects of low dose FGF-2 and BMP-2 on healing of calvarial defects in old mice. *Experimental gerontology*, 2015, 64: 62-69.
- CHEN, Dave W., et al. Sustainable release of vancomycin, gentamicin and lidocaine from novel electrospun sandwich-structured PLGA/collagen nanofibrous membranes. *International journal of pharmaceutics*, 2012, 430.1-2: 335-341.
- CHEN, Meng; YU, Qingsong; SUN, Hongmin. Novel strategies for the prevention and treatment of biofilm related infections. *International journal of molecular sciences*, 2013, 14.9: 18488-18501.
- CHEN, Qian, et al. Bioinspired Modification of Poly (L-lactic acid)/Nano-Sized β -Tricalcium Phosphate Composites with Gelatin/Hydroxyapatite Coating for Enhanced Osteointegration and Osteogenesis. *Journal of biomedical nanotechnology*, 2018, 14.5: 884-899.
- CHEN, Renxun, et al. Antimicrobial peptide melimine coating for titanium and its in vivo antibacterial activity in rodent subcutaneous infection models. *Biomaterials*, 2016, 85: 142-151.
- CHEN, X. N., et al. Multifunctional surfaces with biomimetic nanofibres and drug-eluting micro-patterns for infection control and bone tissue formation. *Eur. Cells Mater*, 2012, 24: 237-248.
- CHERNOUSOVA, Svitlana; EPPLE, Matthias. Silver as antibacterial agent: ion, nanoparticle, and metal. *Angewandte Chemie International Edition*, 2013, 52.6: 1636-1653.
- CHOUIRFA, H., et al. Review of titanium surface modification techniques and coatings for antibacterial applications. *Acta biomaterialia*, 2019, 83: 37-54.
- CHU, Chih-Chang; WILLIAMS, David F. Effects of physical configuration and chemical structure of suture materials on bacterial adhesion: A possible link to wound infection. *The American journal of surgery*, 1984, 147.2: 197-204.
- CIOBANU, Gabriela; CIOBANU, Octavian. Investigation on the effect of collagen and vitamins on biomimetic hydroxyapatite coating formation on titanium surfaces. *Materials Science and Engineering: C*, 2013, 33.3: 1683-1688.
- COBB, Leah H.; MCCABE, Emily M.; PRIDDY, Lauren B. Therapeutics and delivery vehicles for local treatment of osteomyelitis. *Journal of Orthopaedic Research*, 2020, 38.10: 2091-2103.
- CORDERO, J.; MUNUERA, L.; FOLGUEIRA, M. D. Influence of metal implants on infection. An experimental study in rabbits. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, 1994, 76.5: 717-720.
- CORDERO, J.; MUNUERA, L.; FOLGUEIRA, M. D. The influence of the chemical composition and surface of the implant on infection. *Injury*, 1996, 27: S/C34-S/C37.
- COSTERTON, J. William; STEWART, Philip S.; GREENBERG, E. Peter. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *science*, 1999, 284.5418: 1318-1322.

- COSTERTON, J. William. Biofilm theory can guide the treatment of device-related orthopaedic infections. *Clinical Orthopaedics and Related Research*®, 2005, 437: 7-11.
- CUI, W., et al. Biomimetic coating of magnesium alloy for enhanced corrosion resistance and calcium phosphate deposition. *Acta biomaterialia*, 2013, 9.10: 8650-8659.
- DALE, Håvard, et al. Increasing risk of prosthetic joint infection after total hip arthroplasty: 2,778 revisions due to infection after 432,168 primary THAs in the Nordic Arthroplasty Register Association (NARA). *Acta orthopaedica*, 2012, 83.5: 449-458.
- DE JONGE, Lise T., et al. The osteogenic effect of electrosprayed nanoscale collagen/calcium phosphate coatings on titanium. *Biomaterials*, 2010, 31.9: 2461-2469.
- DEL POZO, Jose L., et al. The electricidal effect is active in an experimental model of Staphylococcus epidermidis chronic foreign body osteomyelitis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2009, 53.10: 4064-4068.
- DIEFENBECK, Michael, et al. The effect of plasma chemical oxidation of titanium alloy on bone-implant contact in rats. *Biomaterials*, 2011, 32.32: 8041-8047.
- DOLINAR, D. et al. Biomaterials in endoprosthetics. *Materiai in Technologije*, 2018, 52.1: 89-98.
- DOROZHKIN, Sergey V. Calcium orthophosphates in nature, biology and medicine. *Materials*, 2009, 2.2: 399-498.
- DOROZHKIN, Sergey V. Medical application of calcium orthophosphate bioceramics. *Bio*, 2011, 1.1: 1-51.
- DOROZHKIN, Sergey V. Calcium orthophosphate coatings, films and layers. *Progress in Biomaterials*, 2012, 1.1: 1.
- DRAGO, Lorenzo, et al. Does implant coating with antibacterial-loaded hydrogel reduce bacterial colonization and biofilm formation in vitro? *Clinical Orthopaedics and Related Research*®, 2014, 472.11: 3311-3323.
- DUAN, Xin, et al. Repair of large osteochondral defects in a beagle model with a novel type I collagen/glycosaminoglycan-porous titanium biphasic scaffold. *Materials Science and Engineering: C*, 2013, 33.7: 3951-3957.
- ELIAS, C. N., et al. Biomedical applications of titanium and its alloys. *Jom*, 2008, 60.3: 46-49.
- ELLINGSEN, J. E. Pre-treatment of titanium implants with fluoride improves their retention in bone. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 1995, 6.12: 749-753.
- EMERY, Brian E., et al. The resistance of maxillofacial reconstruction plates to biofilm formation in vitro. *The Laryngoscope*, 2003, 113.11: 1977-1982.
- ENEA, Davide, et al. Extruded collagen fibres for tissue engineering applications: effect of crosslinking method on mechanical and biological properties. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2011, 22.6: 1569.

- FASSBENDER, M., et al. Local gentamicin application does not interfere with bone healing in a rat model. *Bone*, 2013, 55.2: 298-304.
- FLETCHER, Madilyn; LOEB, G. I. Influence of substratum characteristics on the attachment of a marine pseudomonad to solid surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1979, 37.1: 67-72.
- FOLTRAN, I., et al. Electrospun collagen/hyaluronic acid nanofibers improve osteoblastic differentiation onto titanium surfaces. *Dental Materials*, 2010, 26: e80-e81.
- FOSTER, Timothy J., et al. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews Microbiology*, 2014, 12.1: 49-62.
- FUCHS, Thomas, et al. Bioactive-coated implants in trauma surgery. *European Journal of Trauma and Emergency Surgery*, 2008, 34.1: 60-68.
- FUCHS, Thomas, et al. The use of gentamicin-coated nails in the tibia: preliminary results of a prospective study. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*, 2011, 131.10: 1419-1425.
- FUX, C. A., et al. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends in microbiology*, 2005, 13.1: 34-40.
- GALLARDO-MORENO, Amparo M., et al. In vitro biocompatibility and bacterial adhesion of physico-chemically modified Ti6Al4V surface by means of UV irradiation. *Acta Biomaterialia*, 2009, 5.1: 181-192.
- GALLIERA, Emanuela, et al. Vitamin E-stabilized UHMWPE: Biological response on human osteoblasts to wear debris. *Clinica Chimica Acta*, 2018, 486: 18-25.
- GALLO, Jiri; HOLINKA, Martin; MOUCHA, Calin S. Antibacterial surface treatment for orthopaedic implants. *International journal of molecular sciences*, 2014, 15.8: 13849-13880.
- GARVIN, Kevin L.; HINRICHS, Steven H.; URBAN, Joshua A. Emerging antibiotic-resistant bacteria: their treatment in total joint arthroplasty. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*, 1999, 369: 110-123.
- GIAVARESI, Gianluca, et al. Preliminary investigations on a new gentamicin and vancomycin-coated PMMA nail for the treatment of bone and intramedullary infections: An experimental study in the rabbit. *Journal of Orthopaedic Research*, 2008, 26.6: 785-792.
- GINEBRA, Maria-Pau, et al. Calcium phosphate cements as drug delivery materials. *Advanced drug delivery reviews*, 2012, 64.12: 1090-1110.
- GINESTE, L., et al. Degradation of hydroxylapatite, fluorapatite, and fluorhydroxyapatite coatings of dental implants in dogs. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials*, 1999, 48.3: 224-234.
- GÓMEZ-BARRENA, Enrique, et al. Bacterial adherence to separated modular components in joint prosthesis: a clinical study. *Journal of Orthopaedic Research*, 2012, 30.10: 1634-1639.

- GOTTENBOS, B., et al. Pathogenesis and prevention of biomaterial centered infections. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2002, 13.8: 717-722.
- GRAMMATOPOULOS, George, et al. Outcome following debridement, antibiotics, and implant retention in hip periprosthetic joint infection—an 18-year experience. *The Journal of arthroplasty*, 2017, 32.7: 2248-2255.
- GRASS, Gregor; RENSING, Christopher; SOLIOZ, Marc. Metallic copper as an antimicrobial surface. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2011, 77.5: 1541-1547.
- GRISTINA, ANTHONY G.; COSTERTON, J. W. Bacterial adherence to biomaterials and tissue. The significance of its role in clinical sepsis. *JBJs*, 1985, 67.2: 264-273.
- GRISTINA, Anthony G. Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science*, 1987, 237.4822: 1588-1595.
- GRISTINA, A. G.; HOBGOOD, C. D.; BARTH, E. Biomaterial specificity, molecular mechanisms and clinical relevance of *S. epidermidis* and *S. aureus* infections in surgery. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg*, 1987, 143-157.
- GRISTINA, A. G.; NAYLOR, P.; MYRVIK, Q. Infections from biomaterials and implants: a race for the surface. *Medical progress through technology*, 1988, 14.3-4: 205-224.
- GRONOWICZ, Gloria, et al. Calvarial bone regeneration is enhanced by sequential delivery of FGF-2 and BMP-2 from Layer-by-Layer coatings with a biomimetic calcium phosphate barrier layer. *Tissue Engineering Part A*, 2017, 23.23-24: 1490-1501.
- GURAPPA, I. Characterization of different materials for corrosion resistance under simulated body fluid conditions. *Materials Characterization*, 2002, 49.1: 73-79.
- HALLAB, Nadim J., et al. Evaluation of metallic and polymeric biomaterial surface energy and surface roughness characteristics for directed cell adhesion. *Tissue engineering*, 2001, 7.1: 55-71.
- HANAWA, Takao. Evaluation techniques of metallic biomaterials in vitro. *Science and Technology of Advanced Materials*, 2002, 3.4: 289.
- HARRIS, L. G., et al. Staphylococcus aureus adhesion to titanium oxide surfaces coated with non-functionalized and peptide-functionalized poly (L-lysine)-grafted-poly (ethylene glycol) copolymers. *Biomaterials*, 2004, 25.18: 4135-4148.
- HARRIS, Llinos G., et al. Staphylococcus aureus adhesion to standard micro-rough and electropolished implant materials. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2007, 18.6: 1151-1156.
- HEIMANN, Robert B. The challenge and promise of low-temperature bioceramic coatings: An editorial. *Surface and Coatings Technology*, 2016, 301: 1-5.
- HELSEN, Jef A.; BREME, H. Jürgen. *Metals as biomaterials*. Wiley, 1998.
- HERNIGOU, Philippe, et al. Treatment of infected hip arthroplasty. *The open orthopaedics journal*, 2010, 4: 126.
- HICKOK, Noreen J.; SHAPIRO, Irving M. Immobilized antibiotics to prevent orthopaedic implant infections. *Advanced drug delivery reviews*, 2012, 64.12: 1165-1176.

- HOLINKA, J., et al. Effects of selenium coating of orthopaedic implant surfaces on bacterial adherence and osteoblastic cell growth. *The bone & joint journal*, 2013, 95.5: 678-682.
- HORI, Katsutoshi; MATSUMOTO, Shinya. Bacterial adhesion: from mechanism to control. *Biochemical Engineering Journal*, 2010, 48.3: 424-434.
- IAFISCO, Michele, et al. Electrospun nanostructured fibers of collagen-biomimetic apatite on titanium alloy. *Bioinorganic chemistry and Applications*, 2012, 2012: 123953.
- IJIMA, Kazutoshi, et al. Control of biomimetic hydroxyapatite deposition on polymer substrates using different protein adsorption abilities. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2015, 130: 77-83.
- IJIMA, Kazutoshi, et al. Effect of protein adsorption layers and solution treatments on hydroxyapatite deposition on polystyrene plate surfaces in simulated body fluids. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2017, 28.12: 193.
- IJIMA, Kazutoshi, et al. Preparation of 3D porous hydroxyapatite cell scaffolds using polystyrene templates under biomimetic conditions. *Journal of the Ceramic Society of Japan*, 2018, 126.11: 956-958.
- INCE, Akif, et al. Gentamicin negatively influenced osteogenic function in vitro. *International orthopaedics*, 2007, 31.2: 223-228.
- JAHANMARD, Fatemeh, et al. Toward Antibacterial Coatings for Personalized Implants. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2020, 6.10: 5486-5492.
- JAHODA, D., et al. Řešení infekce náhrady kolenního kloubu u pacientů s revmatoidní artritidou. *Čes Revmatol*, 2000, 8: 83-90.
- JAHODA, D., et al. Kanalizovaný artikulovaný spacer–funkční implantát pro řešení náhrady kyčelního kloubu. *Acta Chir Orthop Traumat čech*, 2004, 71: 73-79.
- JELEN, K., *Prognóza vývoje počtu implantací náhrad velkých kloubů v České republice*. Praha: Česká společnost pro biomechaniku, ©2014; vypracováno jako součást marketingové studie pro projekt TAČR (TA04010330).
- JIRANEK, William. Antibiotic-loaded cement in total hip replacement: current indications, efficacy, and complications. *Orthopedics*, 2005, 28.8: S873-S877.
- JIRANEK, William A.; HANSEN, Arlen D.; GREENWALD, A. Seth. Antibiotic-loaded bone cement for infection prophylaxis in total joint replacement. *JBJS*, 2006, 88.11: 2487-2500.
- JONÁŠOVÁ, Lenka, et al. Biomimetic apatite formation on chemically treated titanium. *Biomaterials*, 2004, 25.7-8: 1187-1194.
- KANG, Yu Ri, et al. In vitro synergistic effects of various combinations of vancomycin and non-beta-lactams against *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 2016, 86.3: 293-299.
- KATSIKOIANNI, M.; MISSIRLIS, Y. F. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *Eur Cell Mater*, 2004, 8.3: 37-57.

- KATSIKOIANNI, M. G.; MISSIRLIS, Y. F. Interactions of bacteria with specific biomaterial surface chemistries under flow conditions. *Acta biomaterialia*, 2010, 6.3: 1107-1118.
- KAZEMZADEH-NARBAT, Mehdi, et al. Antimicrobial peptides on calcium phosphate-coated titanium for the prevention of implant-associated infections. *Biomaterials*, 2010, 31.36: 9519-9526.
- KELLY, Micah, et al. Peptide aptamers: Novel coatings for orthopaedic implants. *Materials Science and Engineering: C*, 2015, 54: 84-93.
- KIM, H. M., et al. Effect of heat treatment on apatite-forming ability of Ti metal induced by alkali treatment. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 1997, 8.6: 341-347.
- KINNARI, T. J., et al. Effect of surface roughness and sterilization on bacterial adherence to ultra-high molecular weight polyethylene. *Clinical Microbiology and Infection*, 2010, 16.7: 1036-1041.
- KIRMANIDOU, Yvoni, et al. New Ti-alloys and surface modifications to improve the mechanical properties and the biological response to orthopedic and dental implants: a review. *BioMed research international*, 2016, 2016: 2908570.
- KOJU, Naresh, et al. Biomimetic coating technology for orthopedic implants. *Current opinion in chemical engineering*, 2017, 15: 49-55.
- KOKUBO, T. Implants for surgery – in vitro evaluation for apatite-forming ability of implant materials, *ISO 23317 (2014)* 2014.
- KONG, Junchao, et al. Biomineralization improves mechanical and osteogenic properties of multilayer-modified PLGA porous scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2018, 106.10: 2714-2725.
- KOSE, Nusret, et al. A silver ion-doped calcium phosphate-based ceramic nanopowder-coated prosthesis increased infection resistance. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*, 2013, 471.8: 2532-2539.
- KOTLUS, Brett S., et al. In vitro activity of fluoroquinolones, vancomycin, and gentamicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ocular isolates. *American journal of ophthalmology*, 2006, 142.5: 726-729. e1.
- KOUDELA, Jr K., et al. Comprehensive diagnosis of infection in revision total replacements of large joints. *Acta chirurgiae orthopaedicae et traumatologiae Cechoslovaca*, 2010, 77.5: 425-431.
- KRAAY, Matthew J., et al. Cementless two-staged total hip arthroplasty for deep periprosthetic infection. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*, 2005, 441: 243-249.
- KUEHL, Richard, et al. Preventing implant-associated infections by silver coating. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2016, 60.4: 2467-2475.
- KURTZ, Steven M., et al. Economic burden of periprosthetic joint infection in the United States. *The Journal of arthroplasty*, 2012, 27.8: 61-65. e1.

- LANDOR, Ivan, et al. Hydroxyapatite porous coating and the osteointegration of the total hip replacement. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*, 2007, 127.2: 81-89.
- LANDOR, I., et al. Dlouhodobé zkušenosti s kombinovaným hydroxyapatitovým povrchem ARBOND v osteointegraci implantátu. *Acta Chir. orthop. Traum. čech*, 2009, 76: 172-178.
- LAVERTY, Garry; GORMAN, Sean P.; GILMORE, Brendan F. Biomolecular mechanisms of staphylococcal biofilm formation. *Future microbiology*, 2013, 8.4: 509-524.
- LEGOUT, Laurence; SENNEVILLE, Eric. Periprosthetic joint infections: clinical and bench research. *The Scientific World Journal*, 2013, 2013: 549091.
- LEMIRE, Joseph A.; HARRISON, Joe J.; TURNER, Raymond J. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nature Reviews Microbiology*, 2013, 11.6: 371-384.
- LESIAK-CYGANOWSKA, Ewa; SLADOWSKI, Dariusz; KOMENDER, Janusz. Modification of collagen film by certain chemical agents. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, 2001, 49.3: 247-251.
- LI, Baoye, et al. Biocompatibility and antibacterial activity of plasma sprayed titania coating grafting collagen and gentamicin. *Journal of Biomedical Materials Research Part A.*, 2007, 83.4: 923-930.
- LI, Liang-liang, et al. Preparation of gentamicin-loaded electrospun coating on titanium implants and a study of their properties in vitro. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*, 2012, 132.6: 897-903.
- LI, Yuehong, et al. Enhanced antibacterial properties of orthopedic implants by titanium nanotube surface modification: a review of current techniques. *International journal of nanomedicine*, 2019, 14: 7217.
- LIN, Bingpeng, et al. Preparation and characterization of dopamine-induced biomimetic hydroxyapatite coatings on the AZ31 magnesium alloy. *Surface and Coatings Technology*, 2015, 281: 82-88.
- LINDEQUE, Bennie, et al. Infection after primary total hip arthroplasty. *Orthopedics*, 2014, 37.4: 257-265.
- LINDSEY, Brock A., et al. An animal model for open femur fracture and osteomyelitis: Part I. *Journal of Orthopaedic Research*, 2010, 28.1: 38-42.
- LIU, Luting; BHATIA, Ritwik; WEBSTER, Thomas J. Atomic layer deposition of nano-TiO₂ thin films with enhanced biocompatibility and antimicrobial activity for orthopedic implants. *International journal of nanomedicine*, 2017, 12: 8711.
- MA, Yibao, et al. Inhibition of Staphylococcus epidermidis biofilm by trimethylsilane plasma coating. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2012, 56.11: 5923-5937.
- MALITO, Louis G., et al. Fracture toughness of ultra-high molecular weight polyethylene: A basis for defining the crack-initiation toughness in polymers. *Journal of the Mechanics and Physics of Solids*, 2019, 122: 435-449.

- MALIZOS, Kostantinos, et al. Fast-resorbable antibiotic-loaded hydrogel coating to reduce post-surgical infection after internal osteosynthesis: a multicenter randomized controlled trial. *Journal of Orthopaedics and Traumatology*, 2017, 18.2: 159.
- MAYER, Christian, et al. The role of intermolecular interactions: studies on model systems for bacterial biofilms. *International journal of biological macromolecules*, 1999, 26.1: 3-16.
- MANARA, S., et al. Electrochemically-assisted deposition of biomimetic hydroxyapatite–collagen coatings on titanium plate. *Inorganica Chimica Acta*, 2008, 361.6: 1634-1645.
- MARIE, Hélène, et al. PEM anchorage on titanium using catechol grafting. *PloS one*, 2012, 7.11: e50326.
- MARTYNKOVÁ, Grażyna Simha; VALÁŠKOVÁ, Marta. Antimicrobial nanocomposites based on natural modified materials: a review of carbons and clays. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 2014, 14.1: 673-693.
- MARWIN, Scott. Ultra-High-Molecular-Weight Polyethylene (UHMWPE) in Total Joint Arthroplasty. *Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases*, 2018, 76.1: 38-46.
- MAUERER, Andreas, et al. Release of Cu²⁺ from a copper-filled TiO₂ coating in a rabbit model for total knee arthroplasty. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2014, 25.3: 813-821.
- MELICHERČÍK, P., et al. Monitoring vankomycinu uvolňovaného z kostních štěpů v pokuse in vitro. *ACHOT*, 2010, 77.5: 411-415.
- MIJNENDONCKX, Kristel, et al. Antimicrobial silver: uses, toxicity and potential for resistance. *Biomaterials*, 2013, 26.4: 609-621.
- MINABE, Masato, et al. Application of a local drug delivery system to periodontal therapy. *Journal of periodontology*, 1989, 60.2: 113-117.
- MOOJEN, Dirk Jan F., et al. Prophylaxis of infection and effects on osseointegration using a tobramycin-periapatite coating on titanium implants—An experimental study in the rabbit. *Journal of Orthopaedic Research*, 2009, 27.6: 710-716.
- MORRA, M., et al. Surface engineering of titanium by collagen immobilization. Surface characterization and in vitro and in vivo studies. *Biomaterials*, 2003, 24.25: 4639-4654.
- MOSKOWITZ, Joshua S., et al. The effectiveness of the controlled release of gentamicin from polyelectrolyte multilayers in the treatment of Staphylococcus aureus infection in a rabbit bone model. *Biomaterials*, 2010, 31.23: 6019-6030.
- MORAVEC, H.; FOJT, J.; JOSKA, L. Modifikace povrchu titanu pro medicínské aplikace. *Chemické listy*, 2014, 108.1: 40-45.
- MORIARTY, T. Fintan, et al. Infection in fracture fixation: can we influence infection rates through implant design?. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2010, 21.3: 1031-1035.

- MÜLLER, Rainer, et al. Influence of surface pretreatment of titanium-and cobalt-based biomaterials on covalent immobilization of fibrillar collagen. *Biomaterials*, 2006, 27.22: 4059-4068.
- NANDI, Samit Kumar, et al. Local antibiotic delivery systems for the treatment of osteomyelitis—A review. *Materials Science and Engineering: C*, 2009, 29.8: 2478-2485.
- NEUT, Daniëlle, et al. Antibacterial efficacy of a new gentamicin-coating for cementless prostheses compared to gentamicin-loaded bone cement. *Journal of Orthopaedic Research*, 2011, 29.11: 1654-1661.
- NGUYEN, Hien M.; GRABER, Christopher J. Limitations of antibiotic options for invasive infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: is combination therapy the answer? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2009, 65.1: 24-36.
- NISH, Simone; MEDZHITOV, Ruslan. Host defense pathways: role of redundancy and compensation in infectious disease phenotypes. *Immunity*, 2011, 34.5: 629-636.
- NORAMBUENA, German A., et al. Antibacterial and biocompatible titanium-copper oxide coating may be a potential strategy to reduce periprosthetic infection: an in vitro study. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*, 2017, 475.3: 722-732.
- OGA, Masayoshi; ARIZONO, Takeshi; SUGIOKA, Yoichi. Bacterial adherence to bioinert and bioactive materials studied in vitro. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 1993, 64.3: 273-276.
- OH, Seunghan; JIN, Sungho. Titanium oxide nanotubes with controlled morphology for enhanced bone growth. *Materials Science and Engineering: C*, 2006, 26.8: 1301-1306.
- OKADA, Masahiro; FURUZONO, Tsutomu. Hydroxyapatite nanocrystal coating on biodegradable microspheres. *Materials Science and Engineering: B*, 2010, 173.1-3: 199-203.
- OONISHI, H., et al. Handbook of Biomaterials properties. by J. Black and G. Hastings, Chapman & Hall, London, 1998, 406-419.
- ORHAN, Z., et al. The preparation of ciprofloxacin hydrochloride-loaded chitosan and pectin microspheres: their evaluation in an animal osteomyelitis model. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, 2006, 88.2: 270-275.
- PAN, Mingli, et al. Hydroxyapatite coating on the titanium substrate modulated by a recombinant collagen-like protein. *Materials Chemistry and Physics*, 2011, 126.3: 811-817.
- PEARCE, A. I., et al. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cell Mater*, 2007, 13.1: 1-10.
- PETRINI, Paola, et al. Antibacterial activity of zinc modified titanium oxide surface. *The International journal of artificial organs*, 2006, 29.4: 434-442.
- PETTY, WILLIAM, et al. The influence of skeletal implants on incidence of infection. Experiments in a canine model. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 1985, 67.8: 1236-1244.

- PFEUFER, Nadine Y., et al. Bioactive coating of titanium surfaces with recombinant human β -defensin-2 (rHu β D2) may prevent bacterial colonization in orthopaedic surgery. *JBJS*, 2011, 93.9: 840-846.
- PITARRESI, Giovanna, et al. Medicated hydrogels of hyaluronic acid derivatives for use in orthopedic field. *International journal of pharmaceuticals*, 2013, 449.1-2: 84-94.
- POKORNÝ, D., et al. UHMWPE-polyethylene for articulating surfaces of joint replacements. *Casopis lekaru ceskych*, 2016, 155.8: 433-437.
- PON-ON, Weeraphat, et al. In vitro study of vancomycin release and osteoblast-like cell growth on structured calcium phosphate-collagen. *Materials Science and Engineering: C*, 2013, 33.3: 1423-1431.
- RAMMELT, Stefan, et al. Coating of titanium implants with collagen, RGD peptide and chondroitin sulfate. *Biomaterials*, 2006, 27.32: 5561-5571.
- RAUCCI, Maria G.; GUARINO, Vincenzo; AMBROSIO, Luigi. Biomimetic strategies for bone repair and regeneration. *Journal of functional biomaterials*, 2012, 3.3: 688-705.
- RAUSCHMANN, Michael A., et al. Nanocrystalline hydroxyapatite and calcium sulphate as biodegradable composite carrier material for local delivery of antibiotics in bone infections. *Biomaterials*, 2005, 26.15: 2677-2684.
- REN, Yue, et al. Enhanced oxidation stability of highly cross-linked ultrahigh molecular weight polyethylene by tea polyphenols for total joint implants. *Materials Science and Engineering: C*, 2019, 94: 211-219.
- RIESTER, Oliver, et al. Challenges in Bone Tissue Regeneration: Stem Cell Therapy, Biofunctionality and Antimicrobial Properties of Novel Materials and Its Evolution. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22.1: 192.
- RIJNAARTS, Huub HM, et al. Reversibility and mechanism of bacterial adhesion. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 1995, 4.1: 5-22.
- ROCHFORD, E. T. J.; RICHARDS, R. G.; MORIARTY, T. F. Influence of material on the development of device-associated infections. *Clinical Microbiology and Infection*, 2012, 18.12: 1162-1167.
- ROMANÒ, Carlo Luca, et al. Antibacterial coating of implants in orthopaedics and trauma: a classification proposal in an evolving panorama. *Journal of orthopaedic surgery and research*, 2015, 10.1: 157.
- ROMANÒ, Carlo Luca, et al. Does an antibiotic-loaded hydrogel coating reduce early post-surgical infection after joint arthroplasty?. *Journal of bone and joint infection*, 2016, 1: 34.
- RUSZCZAK, Zbigniew; FRIESS, Wolfgang. Collagen as a carrier for on-site delivery of antibacterial drugs. *Advanced drug delivery reviews*, 2003, 55.12: 1679-1698.
- RŮŽIČKA, F., et al. Biofilm detection and the clinical significance of *Staphylococcus epidermidis* isolates. *Folia microbiologica*, 2004, 49.5: 596.
- SALARI, Meysam, et al. Improved wear, mechanical, and biological behavior of UHMWPE-HAp-zirconia hybrid nanocomposites with a prospective application in total hip joint replacement. *Journal of materials science*, 2019, 54.5: 4259-4276.

- SAX, Hugo; LEW, Daniel. Osteomyelitis. *Current infectious disease reports*, 1999, 1.3: 261.
- SCHICKLE, Karolina, et al. Biomimetic in situ nucleation of calcium phosphates by protein immobilization on high strength ceramic materials. *Journal of the European Ceramic Society*, 2018, 38.1: 271-277.
- SEIL, Justin T.; WEBSTER, Thomas J. Antimicrobial applications of nanotechnology: methods and literature. *International journal of nanomedicine*, 2012, 7: 2767.
- SHAPIRO, I. M., et al. Molecular engineering of an orthopaedic implant: from bench to bedside. *Eur Cell Mater*, 2012, 23: 362-370.
- SHI, Meng, et al. Antibiotic-releasing porous polymethylmethacrylate constructs for osseous space maintenance and infection control. *Biomaterials*, 2010, 31.14: 4146-4156.
- SHIN, Kyungsup, et al. Biomimetic mineralization of biomaterials using simulated body fluids for bone tissue Engineering and regenerative medicine. *Tissue Engineering Part A*, 2017, 23.19-20: 1169-1180.
- SCHMIDMAIER, Gerhard, et al. Prophylaxis and treatment of implant-related infections by antibiotic-coated implants: a review. *Injury*, 2006, 37.2: S105-S112.
- SINHA, Raj K. *Hip replacement: current trends and controversies*. CRC Press, 2002, 428.
- SIRC, Jakub, et al. Controlled gentamicin release from multi-layered electrospun nanofibrous structures of various thicknesses. *International journal of nanomedicine*, 2012, 7: 5315.
- SONG, F.; KOO, H.; REN, Dacheng. Effects of material properties on bacterial adhesion and biofilm formation. *Journal of dental research*, 2015, 94.8: 1027-1034.
- SOFOKLEOUS, Panagiotis; STRIDE, Eleanor; EDIRISINGHE, Mohan. Preparation, characterization, and release of amoxicillin from electrospun fibrous wound dressing patches. *Pharmaceutical research*, 2013, 30.7: 1926-1938.
- STEINEMANN, S. G. *Materials for Medical Engineering*, eds. H. Stallforth and P. Revell, Euromat 99. 1999, p. 199–203.
- STENPORT, V., et al. Precipitation of calcium phosphate in the presence of albumin on titanium implants with four different possibly bioactive surface preparations. An in vitro study. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2008, 19.12: 3497-3505.
- STENSTRÖM, Th A. Bacterial hydrophobicity, an overall parameter for the measurement of adhesion potential to soil particles. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1989, 55.1: 142-147.
- STEWART, Rena L., et al. The use of a biodegradable, load-bearing scaffold as a carrier for antibiotics in an infected open fracture model. *Journal of orthopaedic trauma*, 2010, 24.9: 587-591.
- STIGTER, M., et al. Incorporation of different antibiotics into carbonated hydroxyapatite coatings on titanium implants, release and antibiotic efficacy. *Journal of controlled release*, 2004, 99.1: 127-137.

- STOODLEY, Paul, et al. Orthopaedic biofilm infections. *Current orthopaedic practice*, 2011, 22.6: 558.
- STOODLEY, Paul, et al. Biofilms, biomaterials, and device-related infections. In: *Handbook of Polymer Applications in Medicine and Medical Devices*. William Andrew Publishing, 2013. p. 77-101.
- SUCHÝ, Tomáš, et al. The sustainable release of vancomycin and its degradation products from nanostructured collagen/hydroxyapatite composite layers. *Journal of pharmaceutical sciences*, 2016, 105.3: 1288-1294.
- SUCHÝ, Tomáš, et al. The release kinetics, antimicrobial activity and cytocompatibility of differently prepared collagen/hydroxyapatite/vancomycin layers: Microstructure vs. nanostructure. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2017, 100: 219-229.
- SUCHÝ, Tomáš, et al. Evaluation of collagen/hydroxyapatite electrospun layers loaded with vancomycin, gentamicin and their combination: Comparison of release kinetics, antimicrobial activity and cytocompatibility. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2019, 140: 50-59.
- SUCHÝ, Tomáš, et al. Endoprotéza s mikrostrukturovaným povrchem a bioaktivní terapeutickou nanokompozitní vrstvou na bázi kolagenu, kalcium fosfátu a antibiotik. 2017. Funkční vzorek, USMH/2017/220/108.
- SUCHÝ, Tomáš, et al. Závěrečná odborná zpráva o postupu prací a dosažených výsledcích projektu TA04010330, 2018, 42 s.
- SUDO, SARA Z.; SCHOTZKO, NANCY K.; FOLKE, L. E. Use of hydroxyapatite-coated glass beads for preclinical testing of potential antiplaque agents. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1976, 32.3: 428-432.
- SUKHODUB, L. Materials and coatings based on biopolymer-apatite nanocomposites: obtaining, structural characterization and in-vivo tests. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik: Entwicklung, Fertigung, Prüfung, Eigenschaften und Anwendungen technischer Werkstoffe*, 2009, 40.4: 318-325.
- SUL, Young-Taeg, et al. The bone response of oxidized bioactive and non-bioactive titanium implants. *Biomaterials*, 2005, 26.33: 6720-6730.
- TAPSIR, Zafirah; SAIDIN, Syafiqah. Synthesis and characterization of collagen-hydroxyapatite immobilized on polydopamine grafted stainless steel. *Surface and Coatings Technology*, 2016, 285: 11-16.
- THEIN, Eric, et al. In vitro activity of gentamicin-loaded bioabsorbable beads against different microorganisms. *Materials*, 2013, 6.8: 3284-3293.
- TOH, Wei Quan, et al. Tribochemical characterization and tribocorrosive behavior of CoCrMo alloys: A review. *Materials*, 2018, 11.1: 30.
- TOMS, A. D., et al. The management of peri-prosthetic infection in total joint arthroplasty. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, 2006, 88.2: 149-155.
- TORRES-GINER, Sergio, et al. Controlled delivery of gentamicin antibiotic from bioactive electrospun polylactide-based ultrathin fibers. *Advanced engineering materials*, 2012, 14.4: B112-B122.

- TRAMPUZ, Andrej; ZIMMERLI, Werner. Diagnosis and treatment of infections associated with fracture-fixation devices. *Injury*, 2006, 37.2: S59-S66.
- TRAN, Nhiem, et al. Silver doped titanium oxide–PDMS hybrid coating inhibits *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* growth on PEEK. *Materials Science and Engineering: C*, 2015, 49: 201-209.
- TRAN, Phong A.; WEBSTER, Thomas J. Selenium nanoparticles inhibit *Staphylococcus aureus* growth. *International journal of nanomedicine*, 2011, 6: 1553.
- TSUCHIYA, Hiroaki, et al. Hydroxyapatite growth on anodic TiO₂ nanotubes. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*: 2006, 77.3: 534-541.
- TSUCHIYA, Hiroyuki, et al. Innovative antimicrobial coating of titanium implants with iodine. *Journal of Orthopaedic Science*, 2012, 17.5: 595-604.
- TSUKAMOTO, Masatsugu, et al. Acute and subacute toxicity in vivo of thermal-sprayed silver containing hydroxyapatite coating in rat tibia. *BioMed research international*, 2014, 2014:902343.
- TU, Junjun, et al. Preparation and antibiotic drug release of mineralized collagen coatings on titanium. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2012, 23.10: 2413-2423.
- UCHIDA, Masaki, et al. Structural dependence of apatite formation on titania gels in a simulated body fluid. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*: 2003, 64.1: 164-170.
- VAN LOOSDRECHT, M. C., et al. Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measured to predict the initial steps of bacterial adhesion. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1987a, 53.8: 1898-1901.
- VAN LOOSDRECHT, M. C., et al. The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1987b, 53.8: 1893-1897.
- VAVŘÍK, P., et al. Hip joint replacements selected outputs and their analysis for the period 2003–2012, *Acta Chir. Orthop. Traum. Čech.* 2014;81, Suppl
- VESTER, Helen, et al. Gentamycin delivered from a PDLA coating of metallic implants: in vivo and in vitro characterisation for local prophylaxis of implant-related osteomyelitis. *Injury*, 2010, 41.10: 1053-1059.
- VIDAL, C. Valero, et al. Passivation of a CoCrMo PVD alloy with biomedical composition under simulated physiological conditions studied by EQCM and XPS. *Journal of The Electrochemical Society*, 2012, 159.5: C233-C243.
- VUONG, Cuong; OTTO, Michael. *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microbes and infection*, 2002, 4.4: 481-489.
- WADHAMS, George H.; ARMITAGE, Judith P. Making sense of it all: bacterial chemotaxis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2004, 5.12: 1024-1037.
- WALDVOGEL, Francis A.; MEDOFF, Gerald; SWARTZ, Morton N. Osteomyelitis: a review of clinical features, therapeutic considerations and unusual aspects. *New England Journal of Medicine*, 1970, 282.5: 260-266.

- WALLACE, Donald G.; ROSENBLATT, Joel. Collagen gel systems for sustained delivery and tissue engineering. *Advanced drug delivery reviews*, 2003, 55.12: 1631-1649.
- WANG, Qingge, et al. Nanostructured titanium alloys surface modification technology for antibacterial and osteogenetic properties. *Current Nanoscience*, 2021, 17.2:DOI:10.2174/1573413716666200217104004.
- WANG, Yanhua; HAO, Hang; ZHANG, Shengmin. Biomimetic coprecipitation of silk fibrin and calcium phosphate: Influence of selenite ions. *Biological trace element research*, 2017, 178.2: 338-347.
- WINKLER, Heinz, et al. Bone grafts impregnated with antibiotics as a tool for treating infected implants in orthopedic surgery—one stage revision results. *Cell and tissue banking*, 2006, 7.4: 319-323.
- WOLF-BRANDSTETTER, C., et al. Multifunctional calcium phosphate based coatings on titanium implants with integrated trace elements. *Biomedical Materials*, 2020, 15.2: 025006.
- YUAN, Zhang, et al. Antibacterial surface design of biomedical titanium materials for orthopedic applications. *Journal of Materials Science & Technology*, 2020, 78:51-67.
- ZAGRA, Luigi, et al. Two-stage cementless hip revision for peri-prosthetic infection with an antibacterial hydrogel coating: results of a comparative series. *International orthopaedics*, 2019, 43.1: 111-115.
- ZENG, Peng. Biocompatible alumina ceramic for total hip replacements. *Materials science and technology*, 2008, 24.5: 505-516.
- ZHANG, Erlin, et al. Antibacterial metals and alloys for potential biomedical implants. *Bioactive materials*, 2021, 6.8: 2569-2612.
- ZHAO, Weitian; LEMAÎTRE, Jacques; BOWEN, Paul. A comparative study of simulated body fluids in the presence of proteins. *Acta biomaterialia*, 2017, 53: 506-514.
- ZHU, Xiaojing, et al. In vitro study on the osteogenesis enhancement effect of BMP-2 incorporated biomimetic apatite coating on titanium surfaces. *Dental materials journal*, 2017, 36.5: 677-685.
- ZILBERMAN, Meital; ELSNER, Jonathan J. Antibiotic-eluting medical devices for various applications. *Journal of controlled release*, 2008, 130.3: 202-215.
- ZMISTOWSKI, Benjamin, et al. Periprosthetic joint infection increases the risk of one-year mortality. *JBJS*, 2013, 95.24: 2177-2184.
- Zpráva OECD, Health at a Glance 2013, OECD INDICATORS.