

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

Výzkum vstřebatelnosti kovových osteosyntetických materiálů na zvířecích
biomodelech

MDDr. Jitka Machoň Levorová

2022

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor: Experimentální chirurgie

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

Školící pracoviště: Stomatologická klinika VFN a 1. LF UK, Praha

Školitel: prof. MUDr. et MUDr. René Foltán, Ph.D., FEBOMFS

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

Obsah

1	Souhrn.....	4
2	Summary.....	5
3	Úvod.....	6
4	Hypotézy a cíle práce.....	7
5	Materiál a metody.....	8
6	Výsledky.....	11
7	Diskuze.....	13
8	Závěry.....	18
9	Použitá literatura.....	19
10	Seznam publikací.....	23

1 Souhrn

Disertační práce se zabývá možností použití biodegradovatelných kovových slitin jako osteosyntetického materiálu v maxilofaciální chirurgii. Hypotéza předpokládá, že slitiny Zn-1,6Mg i WE43 jsou z hlediska doby vstřebávání i biologických interakcí vhodné k fixaci obličejového skeletu.

Experimentální část práce je rozdělena na dvě na sebe navazující fáze. V první fázi byl použit model potkanů k implantaci slitin Zn-1,6Mg a WE43. Cílem bylo srovnání délky jejich degradace a zjištění chování okolní kostní tkáně. V pravidelných intervalech byla zvířata euthanasována, ex vivo byla skenována pomocí cone-beam tomografie ke zjištění degradační periody každé slitiny. Bylo provedeno histopatologické vyšetření ke zjištění reakce kostní tkáně v okolí implantovaného materiálu. Závěr první fáze zhodnocuje, která ze slitin více vyhovuje potřebám osteosyntézy v obličejovém skeletu. Tou je podle výsledků slitina WE43, z toho důvodu je použita ve druhé fázi.

Ve druhé fázi byl použit model králíků k implantaci slitiny WE43 a titanu jako srovnávacího vzorku. Cílem bylo porovnání standardního materiálu a slitiny WE43 stran vlivu na hojení kostní tkáně a vhodnosti k implantaci do skeletu. Zvířata byla po implantaci v pravidelných intervalech euthanasována, ex vivo byla použita mikrotomografie ke sledování hojení kostního defektu a zjištění rychlosti degradace implantátů ze slitiny WE43. Za pomoci měření bone-interface-contact a změn objemu a povrchu implantátů byla sledována degradační perioda slitiny. Histopatologické vyšetření bylo použito ke zjištění reakce kostní tkáně na přítomnost konkrétního materiálu. Jako pomocné metody byly v obou fázích experimentu použity elektronová mikroskopie s energetická disperzní spektrometrie.

Teoretická část práce zhodnocuje současné trendy použití biodegradovatelných kovových slitin. Sleduje vývoj materiálů pro osteosyntézu v maxilofaciální chirurgii s důrazem na biologické chování materiálů a nežádoucí vlastnosti včetně jejich klinického dopadu.

Klíčová slova: biodegradovatelné materiály, WE43, biodegradovatelné slitiny

2 Summary

The dissertation is dealing with the option of using biodegradable metal alloys such as osteosynthetic material in maxillofacial surgery, The hypothesis presupposes that Zn-1,6Mg and WE43 alloys are from the viewpoint of the degradation period and biological interactions suitable for fixation of facial skeleton.

The theoretical part of the work evaluates current trends in the use of biodegradable metal alloys. It monitors the development of material for osteosynthesis in maxillofacial surgery emphasizing the biological reactions of material and undesirable qualities including their clinical impact.

The experiment part of the work is divided in two successive stages. The first stage used the rat biomodel to implant Zn-1,6Mg and WE43 alloys. The aim was to compare the duration of degradation and to receive the reaction of the ambient tissue. The animals were euthanized in regular intervals. They were scanned *ex vivo* by means of cone-beam tomography to find the degradation period of each alloy. Histopathological examination was performed to receive the reaction of the ambient bone tissue. The conclusion evaluates WE43 alloy is more suitable for osteosynthesis in the facial skeleton according to the results of the first stage.

The second stage used the rabbit biomodel for implantation of WE43 and titanium as a standard osteosynthetic material. The aim was to compare the used material and WE43 alloy as regards their impact on the healing of the bone defect and the suitability for implantation in the skeleton. The animals were euthanized in regular intervals, microtomography was used *ex vivo* to reveal the condition of the ambient bone, and to find out the speed of degradation of WE43 implants. Using the measuring of bone-interface-contact and changes in the volume and surface of implants degradation period of the alloy were monitored. Histopathological examination was used to find out the reaction of the ambient bone tissue. Secondary methods in both stages of the experiment were electron microscopy and energetic dispersion spectrometry.

Key words: biodegradable materials, WE43, biodegradable alloys

3 Úvod

Biodegradovatelné kovové slitiny představují materiály v současnosti intenzivně studované pro použití v humánní medicíně. V závislosti na metalurgických, mechanických a korozních vlastnostech se různí účel i vhodnost použití konkrétních slitin. V praxi byly biodegradovatelné slitiny použity např. jako vaskulární stenty nebo jako fixační materiál v ortopedii. (Zheng Y., 2016, Windhagen H. et al., 2013). Pro účely osteosyntézy v maxilofaciální chirurgii probíhá výzkum těchto materiálů zatím na úrovni preklinických in vivo studií. (Schaller B. et al., 2016). Jako osteosyntetický materiál je v obličejovém skeletu několik posledních dekad nejvíce používán titan, jeho slitiny (konkrétně Ti-6Al-4V a Ti-6Al-7Nb) a chrom-kobaltová slitina vitallium. Titanové slitiny a vitallium bezvýhradně vytýsnily z praktického použití dříve používanou korozivzdornou ocel 316SS. Své oblíbenosti tyto materiály vděčí vhodným mechanickým vlastnostem a vyhovujícím biologickému chování ve vnitřním prostředí organismu. (Ehrenfeld M. et al., 2012) Mezi nevýhody konvenčních materiálů se řadí termosenzitivita, hmatatelnost dlahy pod kůží a pocit tíhy nebo artefakty v obraze při vyšetření zobrazovacími metodami. U dětí nesou potenciální riziko omezení růstu skeletu s následným rozvojem deformit. V případě výskytu těchto nežádoucích reakcí vzniká nutnost odstranění dlah a s ní spojená operační zátěž pro pacienta. (Cembranos J.L.L., 2004, Ehrenfeld M. et al., 2012, Kanno T. et al., 2018, Levorova J. et al., 2017, Mühlbauer W. et al., 1987, Suuronen R. et al., 2004)

Řešení nevýhod konvenčních materiálů v minulosti nabídly syntetické polymerní materiály, kyselina polyglykolidová, polylaktidová nebo jejich kopolymer (PLGA). Tyto syntetické polymery měly být materiály plně degradovatelné za současného splňování mechanických nároků na stabilní osteosyntézu. Po zhruba dvou dekadách se od jejich užívání ustoupilo pro nežádoucí biologické chování. Častým problémem byla reakce z cizích těles s klinickými projevy otoků a bolesti. (Suuronen R. et al., 2004, Zheng Y., 2016)

Právě biodegradovatelné kovové slitiny mohou být z hlediska mechanických i biologických vlastností vhodným kompletně degradovatelným materiálem. Nejvíce pozornosti bylo dosud věnováno biodegradovatelným slitinám na bázi hořčíku. Slibným materiálem se jeví být slitina označovaná jako WE43 nebo také Mg-4Y-3RE. Jde o slitinu s majoritním zastoupením hořčíku, 4,2 hmotnostních % tvoří yttrium, 2,8 hmotnostních % neodýmium a 0,4 hmotnostních % zirkonium. Mez pevnosti v tahu této slitiny se pohybuje v rozmezí 224-410 MPa a elongace v rozmezí 2-25 %, tj. v rozmezí dostačujícím pro potřeby osteosyntézy ve střední etáži obličje (srovnání se slitinou Ti-6Al-4V, která má mez pevnosti v tahu zhruba 105 GPa a je dostačující i pro více mechanicky namáhanou dolní etáž). Princip degradace slitiny WE43 spočívá v elektrochemické korozi. Hlavním korozním produktem je hydroxid hořečnatý, který na povrchu slitiny vytváří ochrannou vrstvu, reaguje s chloridovými ionty z prostředí za rozpadu ochranné korozní vrstvy a opětovné expozici povrchu slitiny, která umožňuje pokračování koroze. K hromadění korozních produktů nedochází, všechny jsou z prostředí organismu plně vyloučeny. V množství, ve kterém vznikají, nejsou pro organismus toxické, naopak lokálně mohou podpořit hojení kostní tkáně. In vitro testy biokompatibility slitiny WE43 na buněčných kulturách vykazují dobré výsledky. (Zheng Y., 2016)

Negativním efektem degradace slitiny WE43 je tvorba vodíku. Pokud vodík vzniká ve větší míře, není možná jeho eliminace krevním řečištěm, ale hromadí se v měkkých

tkáních a způsobuje útlak cév a nervů i kostní tkáň. Důsledkem je omezení hojení rány. (Kubasek J. et al., 2019, Zheng Y. F. et al., 2014, Zheng Y., 2016) Nežádoucí tvorbu vodíku lze záměrně snížit přidáním zinku do slitiny. Hořčíkové slitiny s obsahem zinku nebo slitiny na bázi zinku jsou dalšími biokompatibilními plně degradovatelnými materiály potenciálně použitelné pro osteosyntézu v obličejovém skeletu. Mez pevnosti v tahu konkrétně slitiny označované jako Zn-1,6Mg, tj. slitiny s hlavní složkou zinku, 1,6 hmotnostních % zaujímá magnesium, minoritní složku tvoří železo - 0,1 hmotnostních %, dosahuje kolem 250 MPa a elongace v rozmezí 4-12 %, tj. hodnot srovnatelných s WE43. Princip degradace slitiny Zn-1,6Mg spočívá také v elektrochemické korozi, přesný způsob degradace ovšem není znám. (Kubasek J. et al., 2016, Liu S. et al., 2019, Makadia H.K., Siegel S.J., 2011, Prakasam M. et al., 2017, Pachla W. et al., 2012, Kutniy K.V. et al., 2009, Vroman I., Tighertz L., 2009, www.-azom.com – d, www.matweb.com – b, www.matweb.com - c, Zheng Y., 2016)

4 Hypotézy a cíle práce

4.1 Hypotézy

Slitina Zn-1,6Mg degraduje in vivo v kostní tkáni pomaleji než slitina WE43. Vliv přítomnosti slitin Zn-1,6Mg a WE43 umožňuje hojení kosti. Obě slitiny jsou biokompatibilní.

Slitina WE43 stimuluje kostní remodelaci. Z hlediska doby degradace je slitina WE43 vyhovujícím materiálem pro fixaci obličejového skeletu. Z hlediska biologického chování je slitina WE43 vyhovujícím materiálem pro fixaci obličejového skeletu.

4.2 Cíle práce

Práce je rozdělena na dvě na sebe navazující etapy, jsou označeny jako první a druhá fáze experimentu.

Cílem první fáze experimentu je evaluace vhodnosti použití slitiny Zn-1,6Mg a slitiny WE43 k implantaci do živé tkáně na zvířecích biomodelech potkanů

Díleč cíle první fáze:

- a) porovnání rychlosti degradace kovových slitin Zn-1,6Mg a WE43 užitím zobrazovací metody Cone Beam Computed Tomography (CBCT)
- b) zjištění případných negativních vlivů obou slitin na hojení kosti v jejich okolí histopatologickým vyšetřením
- c) srovnání vhodnosti použití obou slitin k dalšímu použití in vivo

Cílem druhé fáze experimentu je evaluace vhodnosti použití slitiny WE43 k implantaci do živé tkáně na zvířecích biomodelech králíků

Díleč cíle druhé fáze:

- a) Porovnání reakce kostní tkáně na přítomnost standardního materiálu (titan) a biodegradovatelné slitiny WE43 pomocí histopatologického vyšetření
- b) porovnání bone-interface contact titanového implantátu a implantátu ze slitiny WE43 na mikrotomografických skenech ve 2D a 3D zobrazení
- c) zjištění míry degradace implantátu ze slitiny WE43 v čase, přičemž míra degradace je definována změnou objemu a povrchu implantátů, které jsou měřeny pomocí mikrotomografie
- d) zhodnocení vhodnosti použití slitiny WE43 k implantaci do kostní tkáně, zhodnocení případné vhodnosti k fixaci obličejového skeletu.

5 Materiál a metody

5.1 Soubor

V první fázi pokusu bylo použito celkem 10 zvířecích modelů, potkanů, která byla rozdělena do dvou skupin – skupina A (5 zvířat), skupina B (5 zvířat). Zvířatům byl v celkové anestezii do kalvy ve střední čáře vyvrtán okrouhlý defekt. Zvířatům ze skupiny A bylo do defektu v kalvě vloženo po jedné pelotě ze slitiny Zn-1,6Mg, skupině B ze slitiny WE43. Rány byly zašity po vrstvách vstřebatelným materiálem. Ve dvou týdeních intervalech byla zvířata po jednom euthanasována atestovaným veterinárním lékařem. Z každého zvířete byl vyjmut bloček kosti v místě, kde byla původně pelota implantována, vzorky byly fixovány a zpracovány stejnou metodikou, jakou autorka publikuje ve svých pracích. Identický postup byl použit ve druhé fázi experimentu a je popsán níže. (Levorova J. et al., 2017, Levorova J. et al., 2018)

Druhá navazující fáze pokusu byla provedena na celkem 16 zvířecích modelech králíků, kteří byli rozděleni do dvou skupin – skupina I (8 zvířat, standardní srovnávací skupina) a skupina II (8 zvířat). Zvířatům byly v celkové anestezii do přední strany tibiae pod sebou vyvrtány dva identické tunelové defekty o průměru 1,5 mm a hloubce 3 mm. Do každého defektu bylo zavedeno po jednom implantátu z dané slitiny podle konkrétní skupiny, tzn. jedno zvíře obdrželo dva implantáty ze stejné slitiny (zvířata ze skupiny I obdržela implantáty z titanu, zvířata ze skupiny II obdržela implantáty ze slitiny WE43). Rány byly zašity po vrstvách vstřebatelným monofilním materiálem. Zvířata byla euthanasována atestovaným veterinárním lékařem ve 4týdenních intervalech, a to vždy jedno zvíře z každé skupiny. Průběh výkonu byl publikován v práci autorky (Levorova J. et al., 2018)

5.2 Příprava kovových implantátů

V první fázi experimentu byly použity dvě slitiny – Zn-1,6Mg a WE43. Příprava obou slitin probíhala na Ústavu kovových slitin a korozního inženýrství, Vysoká škola chemicko-technologická, Praha. Slitina Zn-1,6Mg byla připravena roztavením čistých kovů (99,9% čistota) v odporové peci v ochranné atmosféře argonu (čistota 99,9 %). Teplota taveniny byla udržována pod 500 °C, aby se zabránilo nadměrnému odpařování zinku a oxidaci magnesia. Po dostatečné homogenizaci byla tavenina slita do válcových forem (20 mm v průměru, 200 mm délka). WE43 slitky byly rozpuštěny ve vakuové indukční peci a odlity do ingotů stejných rozměrů jako Zn-1,6Mg. Před extruzí byly ingoty WE43 zahřáty na 525 °C po dobu 8 hodin. Následně byly kovy extrudovány za teploty 300 °C (Zn-1,6Mg) a 400 °C (WE43), rychlost extruze 5 mm/min. Ze slitků byly vysoustruženy peloty čočkovitého tvaru o průměru 2,5 mm, výšce 1 mm. V druhé fázi experimentu byla použita slitina WE43, připravena byla stejným způsobem. Ze slitků, resp. vytvořených prutů o průměru 7,5mm byly vysoustruženy implantáty tvaru vrutu – válcovité, délky 3 mm, (šířka hlavy 3 mm, vnější šířka závitu 1,5 mm, šířka těla 1,1 mm). Podložka pod vrutem slouží k simulaci reálného osteosyntetického materiálu, simuluje plate pod vrutem, tedy pohyb mezi spodní plochou hlavy vrutu a horní plochou podložky a dále mezi dolní plochou podložky a povrchem kosti. Sterilizace slitin v obou fázích experimentu a titanu v druhé fázi experimentu proběhla v 70 % etanolu (2 hodiny) a následnou expozicí UV záření (2 hodiny). Pro zhotovení stejných vrutů z titanu byla použita slitina Ti-6Al-4V, připravena metodou selektivního laserového tavení (Fousova M. et al., 2016).

Způsob přípravy je popsán v publikacích autorky (Kubasek J. et al., 2019, Levorova J. et al., 2017, Levorova J. et al., 2018)

5.3 Fixace vzorků, zpracování pro optické vyšetření

Zpracování probíhalo na pracovišti Zkušební laboratoře pro dentální implantáty Všeobecné fakultní nemocnice v Praze. Z každého zvířete byl vyjmut kalvariální kostní bloček bez kovových pelot v první fázi/ proximální část tibie s implantáty ve druhé fázi. Fixace probíhala roztokem 37 % formaldehydu a 80 % ethanolu v poměru 1:2, pH roztoku = 7,2, po dobu jednoho týdne ve dvou 12hodinových cyklech za pokojové teploty na vibračním přístroji a v chladničce. Tvrdé tkáně byly odvodňovány v řadě roztoků o vzrůstající koncentraci etanolu (70-100 %, v každém byly umístěny 72 hodiny) a poté byly vloženy do roztoku 100 % etanolu a acetonu v poměru 1:1, následně do 100 % etanolu. Vzorky byly ve vakuu zality čistým metylmetakrylátem (MMA), MMA byl následně vyměněn za zalévací médium složené z 100 g MMA, 12,5 ml dibutylftalátu a 1,28 g benzoylperoxidu. Po zpolymerizování byly z bločků kostí za konstantního chlazení vodou (titan) a 96 % etanolem (WE43) zhotoveny příčné řezy diamantovaným kotoučem, k broušení byl použit karborundový abrazivní papír (zrnitost P1200 a P2500), k leštění korundová suspenze (velikost částic 1 μm a 0,3 μm). Výsledná tloušťka histologického preparátu činila cca 60 μm. Barvení probíhalo 1% roztokem toluidinové modři.

Histologické preparáty byly zhotoveny z kosti vždy jen s jedním ze dvou implantovaných šroubů na původním jednom vzorku tibie. Snímky preparátů byly pořízeny za použití transmisního optického mikroskopu Nikon Eclipse E600 (Nikon, Japonsko). Identický postup byl použit v obou fázích experimentu. Způsob odběru, fixace a zpracování vzorků byl publikován v pracích autorky (Levorova J. et al., 2017, Levorova J. et al., 2018)

5.4 Histopatologické vyšetření

Histopatologické vyšetření proběhlo na Ústavu patologie Všeobecné fakultní nemocnice v Praze atestovaným patologem. Hodnocena byla přítomnost/nepřítomnost parametrů: bubliny plynu v kostní tkáni v okolí implantovaného materiálu, tvorba kostí v okolí implantátu, periostální apozice kostí, kvalita okolní kostí a kvantita parametrů: kostní kavity, periostální remodelace, endostální remodelace, periimplantační fibróza, lymfoplasmatickocelulární reakce, infiltrace makrofágy a tvorba reakce z cizích těles. Metodiku uvádí autorka v publikované práci (Levorova J. et al., 2018) na podkladě publikace jiné autorky. (Reifenrath J. et al., 2011)

5.5 Zobrazovací metody

5.5.1 Cone Beam Computed Tomography (CBCT)

Ke zjištění rychlosti desintegrace materiálu v první fázi experimentu byla provedena Cone Beam Computed Tomography kalvy (Planmeca ProMax 3D Plus; Planmeca, Finsko). Skenování proběhlo na nativních vzorcích ex vivo ihned po euthanasování zvířat. Po dekapitaci zvířete byla hlava umístěna na statický horizontální podstavec bez fixace.

5.5.2 Microfocus computed tomography (mikro-CT)

Ke skenování byl použit přístroj SkyScan 1272 od firmy Bruker, Belgie s rozlišením 0,35 μ m. Skenování celkem 16 vzorků tibíí samostatně pomocí mikrotomografie probíhalo ex vivo po zalití vzorku tibíí do polymethylmetakrylátu. Použito bylo zorné pole o velikosti 11 pixelů, napětí 100 kV, proudový zdroj 100 μ A, 0,11mm Cu filtr, s průměrováním obrazu, 360° rotace. Skenovací doba byla průměrně 11 hodin pro jeden vzorek. Řezy byly virtuálně rekonstruovány softwarově pomocí NRecon (Bruker, Belgie), k vizualizaci obrazu byl použit software Dataviewer (2D řezy) a CTVox (3D řezy implantátu a okolí, Bruker, Belgie). Jako oblast zájmu byla vymezena oblast mezi prvním a posledním závitem vrutu.

Bone-interface contact (BIC), tj. kontakt mezi povrchem implantátu a kosti, byl posuzován na 2D řezech ve třech rovinách. Oblast zájmu byla vymezena na kortikální kost, implantát, výška oblasti byla 10 mm. Struktura implantátu byla binarizována a zvětšena o 6 pixelů vůči původní velikosti pro lepší možnost odstranění artefaktů ze zobrazení kovu. BIC byl posuzován jako poměr mezi zvětšeným povrchem implantátu a zvětšenou okolní kostí. Dále byl měřen povrch a objem jednotlivých implantátů. Podle obrazu na mikro-CT byla provedena analýza BIC. Metodiku uvádí autorka v publikované práci. (Levorova J. et al., 2018)

5.5.3 Energetická disperzní spektrometrie, elektronová mikroskopie

Elektronová mikroskopie (SEM) byla použita v první i druhé fázi experimentu jako pomocná. K vyšetření elektronovým mikroskopem byl použit přístroj Tescan Vega 3, TESCAN Brno, s.r.o., Česká republika v kombinaci s použitím energetické disperzní spektrometrie (Oxford Instruments Aztec, Velká Británie. Za tímto účelem byly vzorky broušeny karborundovým abrazivním papírem o zrnitosti P180–P4000, leštěny diamantovanými pastami o velikosti zrn 2-0,7 μ m, k leptání povrchu byl použit roztok 2 ml kyseliny dusičné ve 100 ml vody. K určení fázového složení slitín byla užita rentgenová difrakce (X'Pert Philips, Velká Británie, 30 mA, 40 kV, RTG záření Cu K α). Metodika práce byla publikována v práci Kubáska (2019). (Kubasek J. et al., 2019)

5.6 Statistická analýza

5.6.1 Histologické parametry

Statisticky jsme analyzovali výsledky histologického vyšetření u skupiny zvířat s titanovým implantátem (skupina I) a s implantátem ze slitiny WE43 (skupina II). Měření probíhala v konkrétních časových obdobích, a to ve 4., 8., 12. a 16. týdnu po implantaci. K hodnocení parametrů a jejich vývoji v čase byly použity metody Kendallův test a Studentův dvouvýběrový t-test. Statistická analýza je součástí publikace autorky (Levorova J. et al., 2018)

5.6.2 Kontakt mezi povrchem implantátu a kosti – BIC

Statisticky jsme analyzovali míru BIC mezi oběma skupinami implantátů v každém časovém odběrovém bodě. K porovnání míry BIC byly použity metody Studentův dvouvýběrový t-test, pro odchylku od normality Wilcoxonův test a Shapiro-Wilkův test normality. Statistická analýza je součástí publikace autorky (Levorova J. et al., 2018)

5.6.3 Objem a povrch implantátů

Statistická analýza změny objemu a povrchu v čase a poměru mezi povrchem a objemem u každé skupiny (I a II) a vůči sobě byla provedena pomocí tvorby regresního modelu, ve kterém závisle proměnnou je čas a vysvětlovanou je poměr mezi povrchem a objemem.

6 Výsledky

6.1 První fáze experimentu

6.1.1 Klinické vyšetření při odběru vzorku, CBCT

V první fázi experimentu nebyly shledány na zvířatech negativní systémové účinky, lokálně u žádného nebyl pozorován rozpad rány nebo zánětlivá reakce, hojení kostní tkáně je přiměřené.

Nález u skupiny A (Zn-1,6Mg)

Ve všech odběrech je zastížen plyn pod periostem, a to s postupným snižováním jeho objemu v časových bodech, ve srovnání s množstvím plynu v okolí pelot ze slitiny WE43 je menším množstvím. Od druhého odběru začíná degradace materiálu, ve třetím odběru je pelota fragmentována a ve čtvrtém a pátém odběru dochází ke kompletní desintegraci. V okolí pelot v prvních dvou odběrech je v okolí pelot nalezen hustý žlutý exsudát a peloty jsou vhojeny ve vazivu.

Nález u skupiny B (WE43)

V prvním a druhém odběru jsou měkké tkáně nad pelotou vyklenuty v důsledku přítomnosti plynu, od třetího odběru přítomnost plynu nebyla zaznamenána. V prvních třech odběrech dochází k dislokaci peloty z místa implantace, ve čtvrtém a pátém odběru je pelota přehojena vazivem.

6.1.2 Histopatologické vyšetření

Nález u skupiny A (Zn-1,6Mg)

Ve všech odběrech jsou přítomny granulomy z cizích těles a fibrózní složka. Maxima zánětlivá infiltrace dosahuje ve třetím a čtvrtém odběru, stejně tak i přítomnost granulomů z cizích těles a fibroproliferace.

Nález u skupiny B (WE43)

V žádném odběru se nevyskytla reakce z cizích těles, zánětlivá reakce je patrna ve všech odběrech, od čtvrtého výrazněji klesá. Fibrózní složka je více výrazná od třetího odběru s narůstající tendencí v dalších odběrech.

6.1.3 Elektronová mikroskopie, energetická disperzní spektrometrie

Příliš rychlý rozpad pelot Zn-1,6Mg byl limitem použití obou metod (SEM a EDS) v této práci. Z toho důvodu se podařilo analyzovat ze skupiny A v první fázi experimentu pouze pelotu z prvních dvou odběrů. K degradaci materiálu dochází u druhého odběru, degradace probíhá z povrchu, současně vzniká i vnitřní fraktura materiálu. okraje peloty jsou výrazně nepravidelné.

6.2 Druhá fáze experimentu

6.2.1 Klinické vyšetření při odběru vzorku

V druhé fázi experimentu nebyly shledány na zvířatech negativní systémové účinky, lokálně u žádného nebyl pozorován rozpad rány nebo zánětlivá reakce.

Nález u skupiny I (Ti)

V žádném z odběrů nebyly zastíženy známky přítomnosti plynu a v žádném z odběrů nevykazují vruty známky pohyblivosti. Hojení kostní tkáně je ve všech odběrech přiměřené, kost nejeví známky patologie.

Nález u skupiny II (WE43)

V žádném z odběrů nebyl v měkkých tkáních přítomen plyn. Ve druhém odběru hlavici jednoho z vrutů přerůstá kostní tkáň, ve třetím odběru pak hlavice obou vrutů. Ve čtvrtém odběru je většina povrchu hlavic vrutů přehojena kostí. Vruty ve všech odběrech nejeví známky pohyblivosti, okolní kost nejeví známky patologie.

6.2.2 Mikrotomografie, BIC, změny objemu a povrchu

Změny objemu a povrchu titanových implantátů jsou zanedbatelné v průběhu celého experimentu. Kost v jejich okolí je bez patologie a BIC má vzrůstající tendenci v čase. Jedná se o předpokládaný průběh.

Nález u skupiny II (WE43)

V prvním odběru bone-interface contact dosahuje 36,05 %. Vruty nejeví známky degradace. Pokles objemu implantátu je zanedbatelný, stejně tak i nárůst povrchu. Ve druhém odběru je u implantátů patrná částečná degradace závitů, k novotvorbě kosti v okolí dochází. Jeden z implantátů byl částečně kostí přehojen. Dochází k poklesu objemu i povrchu obou vrutů vůči výchozí hodnotě. Tyto změny jsou statisticky nevýznamné. BIC dosahuje 44,76 %. V třetím odběru k degradaci implantátů dochází v místě závitů. Na závitech v blízkosti apexu je patrný výraznější rozpad, zde dochází i k degradaci těla implantátů. V okolí materiálu je patrná novotvorba kosti. BIC dosahuje 34,66 %. Kavity v kosti vznikající přítomností plynu jsou obtížně odlišitelné od normální struktury kosti. Pokles objemu vrutů je zanedbatelný, nárůst povrchu je statisticky nevýznamný. Ve čtvrtém odběru u jednoho z vrutů došlo k degradaci závitů a jejich odlomení i k fraktuře těla. Hlava vrutu je částečně přehojena kostí. U druhého implantátu dochází k výrazné fragmentaci bez možnosti rozeznání jednotlivých částí. Pokles objemu je oproti výchozí hodnotě signifikantní. Signifikantní je i nárůst povrchu. BIC dosahuje 27,5 %.

6.2.3 Histopatologické vyšetření

Nález u skupiny I (Ti)

V žádném z odběrů nebyla nalezena reakce z cizích těles, v okolí závitů je mírná fibrózní reakce zastížena v prvním, třetím a čtvrtém odběru, zánětlivá reakce není výrazná, nicméně přítomna ve všech odběrech, kostní remodelace jeví narůstající tendenci v čase.

Nález u skupiny II (WE43)

V prvním odběru je zastížena reakce z cizích těles, zde nelze vyloučit reakci na šici materiál, ve čtvrtém odběru je granulom z cizích těles opět zastížen. Fibrózní produkce zaujímá ve druhém odběru více než 51 % povrchu jednoho vrutu, u ostatních odběrů je přítomna, vždy do 51 % povrchu. Ve všech odběrech je patrná

probíhající endostální i periostální remodelace. Kostní kavity jsou přítomny ve všech odběrech.

6.2.4 Statistické zhodnocení výsledků – histologické parametry

Parametr BS má mírnou tendenci k růstu v čase, současně roste i pravděpodobnost výskytu BS (p-value=0,02, Kendallovo tau=0,23) a častější výskyt je zaznamenán u skupiny II (p-value=0,023). U kostních kavit (BC) je statisticky významný vztah mezi množstvím výskytu a časem (p-value=0,007). BC se vyskytují po celou dobu výzkumu, častěji u časnějších odběrů, mezi skupinami bez statisticky signifikantního rozdílu (p-value=0,12). Stupeň periostální remodelace závisí na čase, nicméně bez statistické signifikance (p-value=0,07). Významně vyšší je výskyt u skupiny II (p-value=0,04). Endostální remodelace se vyskytuje významně častěji u skupiny II (p-value=0,007), z pohledu časové distribuce je výskyt na hranici statistické významnosti (p-value=0,08). Periostální apozice je v čase distribuována nerovnoměrně (p-value=0,01), bez významného rozdílu mezi skupinami. Výskyt parametru tvorby kosti (PIF) v čase i mezi skupinami je bez statisticky významné nerovnoměrnosti (p-value=0,60, resp. p-value=0,13). PF nevykazuje vyšší pravděpodobnost výskytu v některém z časových období (p-value=0,51), častěji se vyskytuje u skupiny II (p-value=0,03). LYM ani MPH nemají statisticky významné období výskytu (p-value=0,55, respektive 0,24). Ani z pohledu skupin u obou parametrů neshledáváme statisticky významný rozdíl (p-value=0,59, respektive 0,55). Časová distribuce výskytu GC je na hranici statistické významnosti (p-value=0,06). Z pohledu obou skupin neshledáváme statisticky významný rozdíl (p-value=0,44).

6.2.5 Statistické zhodnocení výsledků – kontakt mezi povrchem implantátu a kosti – BIC

Ve všech odběrech sledujeme statisticky významný rozdíl v míře BIC mezi oběma skupinami implantátů (p-value = 5.767e-08, resp. p-value = 0.002716, resp. p-value = 3.703e-06, resp. p-value = 1.475e-09).

6.2.6 Statistické zhodnocení výsledků – změna povrchu a objemu implantátů WE43

Změnu objemu i povrchu, resp. poměru povrchu a objemu hodnotíme jako statisticky signifikantní pouze ve 4. odběru, tj. v 16. týdnu.

7 Diskuze

7.1 První fáze experimentu: Zn-1,6Mg a WE43

7.1.1 Rychlost degradace pelot a možné příčiny odchylky

Magnesium je oproti zinku ve vnitřním prostředí lidského organismu více reaktivním prvkem, proto se koroze biodegradovatelných slitin zrychluje současně se zvyšujícím se obsahem magnesia ve slitině. Přidáním zinku do slitiny lze její degradaci zpomalit. (Kubasek J. et al., 2016) Dosažené výsledky první fáze tohoto experimentu ale tomuto předpokladu odporují. Došlo zde totiž k výrazně rychlejšímu rozpadu pelot ze slitiny Zn-1,6Mg ve srovnání s pelotami ze slitiny WE43. Za zásadní otázku první fáze experimentu proto považují důvod rychlé degradace slitiny Zn-1,6Mg. V literatuře lze

nalézt rozpor. Většinou výsledky tohoto experimentu nekorespondují s výsledky jiných in vivo ani in vitro studií, tj. analogicky k tvrzení, které uvádím výše. Příkladem takových studií může být Lee J.W. et al., 2016, Windhagen H. et al., 2013, Yang H. et al., 2020. Tyto zdroje ukazují právě na pomalejší degradaci zinkových slitin nebo magnesiových slitin s obsahem zinku. Na stranu druhou jsou publikovány in vivo studie, které prokazují degradaci zinkových slitin včetně Zn-1,6Mg jako výrazně rychlejší. Konkrétně třeba Zhang (2010) nebo Yan (2013) uvádí začátek degradace již tři týdny po implantaci. He (2009) uvádí dobu degradace delší, nicméně stále poměrně krátkou, a to 24 týdny (Zhang S.X. et al., 2010, Yan J. et al., 2013, He Y.H. et al., 2009) Z časového hlediska se pak degradace slitin zinku více podobá experimentu v této práci.

Možnou příčinou rychlé degradace může být zánětlivý proces v ráně, tomu by odpovídal nálezh žlutého exsudátu v okolí pelot na počátku první fáze studie. Infekční zánět nicméně nebyl prokázán, s ohledem na délku studie se nemohl projevit případný infekční virulentní patogen. (Mercuri L.G., 2015) Příčinou neinfekčního zánětu může být chybná operační technika s důsledkem omezení cévního zásobení rány a tvorbou exsudátu. (Mercuri L.G., 2015) U všech zvířat ze skupiny A došlo k rychlejší degradaci, než jaká byla předpokládána, infekce nebo neinfekční zánět by pak musely proběhnout u všech pěti zvířat ze skupiny A. U žádného ze zvířat ze skupiny B nedošlo ani k vytvoření exsudátu, ani k rychlejší degradaci materiálu, než jaká byla předpokládána (zhruba 2,16 mm/rok). (Dobatkín S. et al., 2019). Postup implantace byl u zvířat obou skupin identický, takže kontaminaci rány nepředpokládáme, stejně tak chybu operační techniky. U skupiny A byla histopatologickým vyšetřením prokázána přítomnost reakce z cizích těles v malé míře ve všech odběrech, u skupiny B nikoli. Přesný způsob biodegradace slitin zinku není objasněn. Pravděpodobně je za degradaci odpovědné lokální zvýšení pH a tvorba vrstvy oxidu zinečnatého na povrchu implantátu, která chrání povrch implantátu před další korozi. K vlastnímu rozpadu zinkové slitiny dochází až s odstupem času po obměně molekul ochranné vrstvy. (Zheng Y., 2016) Probíhající zánět v ráně a s ním spojené lokální snížení pH by tak pořád mohl být vysvětlením pro zvýšenou rychlost degradace u skupiny A.

Průběh tvorby vodíku koreluje s údaji z literatury, kdy se vzrůstající rychlostí koroze se objem plynu zvětšuje (Zheng Y. F. et al., 2014, Zheng Y., 2016). Vyšší produkce vodíku je zaznamenána u skupiny A než u skupiny B. Rozpor opět vzniká s literárními zdroji, podle kterých se přidáním zinku do slitiny její degradace zpomaluje. (Kubasek J. et al., 2016, Zheng Y., 2016) Potom by skupina A měla degradovat pomaleji a v závislosti na tom i vodík by se měl vytvářet v menším množství.

Expozici vodnému prostředí před implantací lze jako příčinu rychlejší degradace vyloučit, sterilizace pelot v první i druhé fázi tohoto experimentu probíhala expozicí etylenoxidu a následně UV záření. Obě metody podle literatury nemají negativní vliv na korozní chování obou použitých slitin. (Charyeva O. et al., 2015, Li M. et al., 2021, Liu C.L. et al., 2011)

7.2 Druhá fáze experimentu: WE43 a Ti

7.2.1 Změna objemu a povrchu vrutů

V průběhu koroze slitiny WE43 na iniciální degradaci navazuje tvorba korozních produktů, které potencují další průběh degradace. (Levorova J. et al., 2018, Schumacher S. et al., 2014, Witte F., et al., 2008) Změna objemu a povrchu vrutů

proto narůstá v čase. Pokud dojde k rozpadu vrutu, zvětšení povrchu doprovází zmenšení jeho objemu. Oba parametry byly měřeny pomocí 2D mikrotomografického zobrazení. Významný pokles objemu u skupiny II nastal v posledním odběru. Pokles objemu v ostatních odběrech je statisticky zanedbatelný. V kontrolní skupině dochází k statisticky nevýznamným změnám objemu. Stejně je tomu u povrchu vrutů. Ten výrazněji narůstá u skupiny II poprvé ve 12. týdnu, výrazněji v 16. týdnu. Zde je nárůst povrchu i pokles objemu zapříčiněn fragmentací distálního implantátu. Např. Oshibe (2019) prezentuje ztrátu objemu šroubových implantátů v potkaních tíbích pouze 36,3 % z původní hodnoty za 12 měsíců. (Oshibe N. et al., 2019) Degradace v této práci je výrazně rychlejší. Příčina rychlejší iniciální degradace není známa, může se na ní podílet chybná operační technika, neinfekční nebo infekční zánět nebo „stress corrosion cracking“, jak uvádí Zheng (2016). (Zheng Y., 2016) Implantát je makroskopicky bez abnormalit, přitom je ale poškozen mikrofrakturami způsobujícími urychlení degradace po vystavení koroznímu prostředí. (Zheng Y., 2016). Ani jednu z příčin jsme neprokázali, ani je nemůžeme vyloučit. Experiment pracuje s materiálem bez povrchové úpravy, která by mohla být důvodem pro změnu korozní rychlosti. Bez klinických projevů došlo ve 4. odběru k fraktuře kosti u kaudálního implantátu, pravděpodobně vlivem oslabení a současné zátěže. Abnormální zatížení implantátu se nabízí být důvodem k rychlejší degradaci, to ovšem vylučuje nález fraktury kosti u proximálního implantátu, kde degradace probíhá podle předpokládaného schématu, tj. od povrchu závitů k tělu vrutu a k fragmentaci nedochází.

7.2.2 Bone-interface contact

Bone-interface contact, tj. míra dotyku kosti s povrchem implantátu je zásadním ukazatelem hojení kosti v okolí implantátu a jeho oseointegrace. Způsob měření BIC se v tomto experimentu opírá o 2D obraz mikro-CT. Je vyjádřen procentuálně jako poměr součtu délek zobrazeného kontaktu kosti a implantátu vůči celkovému obvodu implantátu v daném řezu (Han J.M. et al., 2016, Levorova J. et al., 2018) BIC u vrutů skupiny II dosahuje nejvyšších hodnot v 8. týdnu (45 %), dále pak klesá (postupně na 35 % a 28 %). Důvodem poklesu může být rychlejší degradace vzorku a s ní spojená výraznější tvorba vodíku, který vyvíjí tlak na okolní tkáň a tím omezuje novotvorbu kosti. (Levorova J. et al., 2018, Witte F. et al., 2008) To odpovídá i časové korelaci s poklesem periostální remodelace. V 16. týdnu je BIC hůře měřitelný pro značnou fragmentaci materiálu. Oseointegrace jednotlivých fragmentů neprobíhá, degradace je příliš rychlá na vytvoření pevného spojení povrchu implantátu s kostí. I to se nejspíše podílí na nižší hodnotě BIC. BIC je celkově vyšší u titanových vrutů. Zde dochází od prvního odběru k jeho postupnému nárůstu (51 %, 53 %, 61 %, 69 %). Tento nárůst BIC u standardního materiálu ve srovnání s poklesem u degradabilní slitiny podporuje předpoklad omezení tvorby kosti produkcí plynu.

7.2.3 Histopatologické vyšetření

Kovy WE43 a Ti byly zvířaty dobře tolerovány, nebyly pozorovány známky systémové reakce na přítomnost kovu. Se stejným průběhem se setkáváme i v pracích jiných autorů. Během hojení ran se u žádného zvířete nevyskytly komplikace v ráně. (Castellani C. et al., 2011, Oshibe N. et al., 2019, Reifenrath J. et al., 2011, Schaller B. et al., 2016)

V průběhu hojení rány na sebe navazují fáze koagulace, zánětu, proliferace a remodelace. (Ehrenfeld M. et al., 2012) Průběh jednotlivých dějů zaznamenává histopatologické vyšetření tkání. Zásadní reakcí na cizorodý materiál je fáze zánětu. Makrofágy perzistují ve tkáni v terénu reakce z cizích těles. Ta vzniká u vstřebatelné slitiny z částic, na které se materiál rozpadá, případně z materiálové debris vznikající třením. Reakce z cizích těles může vznikat kdykoli v průběhu zánětlivé fáze od infiltrace rány makrofágy. Charakteristické, i vzhledem k patogenezi, je pak přetrvávání reakce přes další fáze až po úplné zhojení rány. (Mercuri L.G., 2015) V experimentu byla v každém odběru zaznamenána přítomnost makrofágů u slitiny WE43, u Ti implantátů taktéž, nicméně statisticky signifikantně méně. U žádného ze zvířat nebyla klinicky patrná chronická zánětlivá reakce, na kterou by přítomnost GC ve tkáni ukazovala. Reifenrath (2011) neznáznamenává přítomnost obrovských buněk z cizích těles ani v jednom odběru. (Reifenrath J. et al., 2011) I v jiných in vivo studiích zahrnujících i humánní pilotní studii je slitina WE43 bez reakce z cizích těles až 6 měsíců po implantaci. (Schaller B. et al., 2016, Windhagen H. et al., 2013) V Lymfocytární i plasmatická infiltrace byla nalezena u obou skupin kovů ve všech časových bodech, bez statisticky signifikantního rozdílu mezi skupina i ve skupinách v časových bodech. Vzhledem k délce výskytu buněk lze hovořit o chronické zánětlivé celulizaci. (Ehrenfeld M. et al., 2012) Klinická manifestace zánětu v průřezu celé studie zcela chybí u obou skupin. Jiné studie ukazují zánětlivé komplikace u slitiny WE43 také minimálně. Absence zánětu je popsána v humánním použití při fixaci halux valgus (Windhagen H. et al., 2013), ve zvířecí studii na psech se manifestuje zánět dvanáct týdnů po implantaci slitiny WE43 vytvořením píštěle s aktivní exsudací spolu s vytvořením většího množství vodíku. Do 24 týdnů zánět i tvorba vodíku odeznívá. (Byun S.H. et al., 2020) Na modelech myši je prokázán zánět klinicky i histopatologicky dva týdny po implantaci, kompletní degradace materiálu probíhá do šesti týdnů. (Dobatkín S. et al., 2019) Jednou z komplikací hojení je periimplantační fibróza (PF), tedy tvorba vazivové mezivrstvy mezi kostí a implantátem. Rizikem je selhání osteosyntézy, uvolnění implantátu a zpomalení hojení kosti, Podle Reifenrath (2011) byla stanovena „nečitelná“ oblast v okolí implantátu na 50 µm (pro rozptýl paprsků), periimplantační fibróza je hodnocena až za touto oblastí. Periimplantační fibróza přesahující 51 % povrchu implantátu se v okolí vrutů u skupiny II vyskytuje v 8. týdnu, v ostatních odběrech je nižší, nicméně vyšší než v okolí titanu. Náleze koreluje s vyšší lymfoplazmocytární celulizací ve stejných odběrech. I přes „klinickou pevnost“ se slitina WE43 z ohledu tvorby PF jeví jako nevyhovující. Periimplantační fibróza v okolí WE43 v práci Reifenrath (2011) zjištěna nebyla. (Reifenrath J. et al., 2011) U jiných magnesiových slitin pozoruje fibrózu Von der Höh. (Von der Höh N. et al., 2006) Galli (2016) nalézá periimplantační fibrózu u magnesiové slitiny Mg-2Ag, přičemž u slitiny WE43 a slitiny Mg-10Gd nikoli (Galli S., 2016). Na tvorbu fibrózní vrstvy navazuje kostní remodelace. Apozice kosti na povrchu, periostální remodelace, probíhala signifikantně více u slitiny WE43 než u titanu ve všech časových bodech, nicméně bez zásadního rozdílu mezi jednotlivými časovými body. Nejvýraznější tvorba kostí byla u slitiny WE43 zaznamenána v 8. týdnu, u titanu se takto výrazná periostální remodelace nevyskytuje. Ke konci experimentu produkce u slitiny WE43 klesá, maximum periostální remodelace u titanu je naopak zaznamenáno v 8. a 12. týdnu. Důvodem k poklesu periostální remodelace, tj. zpomalení hojení, může být výraznější tvorba vodíku a jeho tlak na kost v okolí implantátu. (Levorova J. et al., 2018, Witte F. et al., 2008) Výraznější tvorba vodíku je

v tomto případě způsobena rychlejší degradací. Výsledek může navazovat na potenciaci osteoblastické aktivity i diferenciací progenitorových buněk v osteoblasty vlivem přítomnosti magnesiových iontů. Naopak díky přítomnosti vodíku a jeho tlaku na okolní kost lze předpokládat kostní remodelaci u degradovatelného materiálu pomalejší. (Janning C. et al., 2010, Liao Y. et al, 2015, Zheng Y., 2016)

Reifenrath (2011) popisuje, že periostální reakci u slitiny WE43 zaznamenává ve 12. a 24. měsíci po implantaci, nerozvádí ale její intenzitu. (Reifenrath J. et al., 2011) Jiné studie srovnávají kostní remodelaci implantátů ze slitiny WE43 bez úpravy povrchu s povrchově upravenými implantáty, a to s lepším výsledkem ve prospěch neupravovaného povrchu. Dále zkoumají vliv slitiny WE43, konkrétně jejího korozního produktu hydroxidu hořečnatého na kostní remodelaci a shodně zjišťují podporu osteoblastické aktivity a útlum osteoklastické aktivity účinkem právě hydroxidu hořečnatého. Předpokládaným mechanismem tohoto procesu je pozitivní ovlivnění aktivity vitamínu D3 korozním produktem (hydroxid hořečnatý) a podpoření diferenciací kmenových buněk v osteoblasty. (Janning C. et al., 2010, Liao Y. et al, 2015, Mammoli F. et al., 2019, Maradze D. et al., 2018, Torroni A. et al., 2021)

Statisticky signifikantně více probíhal růst kosti na endosteální straně kosti u slitiny WE43. Největších skóre dosahovala endostální remodelace postupně v 8., 12. a 16. týdnu. Z hlediska hojení kostní tkáně a růstu kosti stran časové distribuce se jedná o očekávaný jev. (Ehrenfeld M. et al., 2012) Za intenzivnější reakci kostní tkáně u slitiny WE43 ve srovnání s titanem zodpovídá podpora diferenciací osteoblastů a jejich funkce korozními produkty. U slitiny WE43 dokonce nově tvořená kost přerůstá hlavice vrutů v 8. až 12. týdnu, v 16. týdnu je částečně jeden vrut kryt novotvořenou kostí. U titanových implantátů kost nepřerůstá hlavice vrutů ani u jednoho odběru. (Janning C. et al., 2010, Liao Y. et al, 2015, Mammoli F. et al., 2019, Maradze D. et al., 2018)

Parametr BS semikvantitativně hodnotí kvalitu kosti v okolí implantátů jako pravidelnou či nepravidelnou (Reifenrath J. et al., 2011). Nově tvořená kost hodnotí Reifenrath (2011) v okolí WE43 poprvé až po třech měsících, a to jako pravidelnou. V tomto experimentu byla hodnocena v každém odběru, výsledky ukazují zvýšení v čase. To logicky odpovídá i době tvorby kosti, kdy konkrétně pro tento parametr je hodnocení ve 4. týdnu předčasné. Nelze říci, že nárůst tohoto parametru je přímo nežádoucí. Jiné literární zdroje nehodnotí homogenitu kostní tkáně jako zásadní parametr biologického chování implantátů, resp. nehodnotí jí vůbec. (Zhang Y., 2016) Nicméně lze při nepravidelnosti tkáně předpokládat větší fragilitu kosti a pomalejší oseointegraci materiálu a s ní spojenou i delší dobu nestability implantátů. Tento parametr se liší od výsledků studie Reifenrath (2011), kde se dle očekávání s postupem času tento parametr kvantitativně u slitiny WE43 zmenšuje. Titanový srovnávací vzorek u Reifenrath (2011) nebyl použit. (Reifenrath J. et al., 2011)

Délka experimentu byla stanovena na dobu 16 týdnů. In vitro se doba vstřebávání válce slitiny WE43 pohybuje v rozmezí 2,05-4,7mm/rok. (Dobatkin S. et al., 2019) Cílem budoucí případné implantace slitiny v obličejovém skeletu je jeho použití jako osteosyntetického fixačního materiálu. Degradace by tedy měla začít nejdříve 6-8 týdnů po implantaci, přitom ale po tuto dobu mají být zachovány původní mechanické vlastnosti. V této práci nebyla přímo vytvořena zlomenina, pozorováním hojení kostní tkáně ale simulujeme stav fraktury, tedy doba 16 týdnů je pro pozorování dostačující, a to i z hlediska sledování začátku a rychlosti rozpadu materiálu. Kompletní rozpad a chování okolní kosti z dlouhodobého hlediska (po dobu 12 měsíců) sleduje in vivo na

králičích tibích mikrotomografickým skenováním Oshibe (2019) (Oshibe N. et al., 2019) a po dobu 24 měsíců Reifenrath. (Reifenrath J., et al., 2011) Současně Oshibe (2019) v práci porovnává produkci vodíku a korozní rezistenci u implantátů bez a s povrchovým ošetřením PEO. Přítomnost vodíku je u obou typů vzorků detekovatelná po dobu čtrnácti dní, dále se už plyn neprodukuje. Taktéž implantáty s PEO ošetřením povrchu vykazují pomalejší rozpad. V okolí obou druhů implantátů probíhá dostatečná tvorba kvalitní kostní tkáně. (Oshibe N. et al., 2019)

Kavity v kosti v okolí implantátu byly nalezeny v okolí vrutů skupiny II nejvíce v 8. týdnu, poté výskyt klesá. Vyklenutí měkkých tkání u zvířat nepozorujeme. Od 8. týdne dochází současně ke zpomalení periostální remodelace a poklesu BIC. To může souviset se zvýšenou tvorbou vodíku a útlakem kostní tkáně. Jiní autoři tvorbu vodíku a jeho hromadění uvádějí. Důvodem této komplikace v daných studiích ovšem může být větší rozměr implantovaných šroubů. (Byun S.H. et al., 2020, Kim Y.K. et al., 2018, Marukawa E. et al., 2016) Další autoři, např. Windhagen (2013), Marukawa (2016) nebo Krause (2010) tuto komplikaci neuvádí vůbec. (Krause A. et al., 2010, Marukawa E. et al., 2016, Windhagen H. et al., 2013) Ani v práci jiných autorů ani v této nebyly prokázány známky poškození kosti, ale ani jednoznačného negativního vlivu vodíku na kostní hojení. Při srovnání s jinými studiemi časové hledisko této práce s nálezů koreluje, největší tvorba kavít v kosti připadá na začátek experimentu. V dalších in vivo studiích je nejvyšší produkce během prvních pěti až čtrnácti dnů, poté se snižuje, případně znovu epizodicky zvyšuje, vždy na podkladě výraznějšího pokroku v korozi.

8 Závěry

8.1 První fáze experimentu

- Hojení měkkých tkání i kosti v okolí slitiny WE43 probíhá nekomplikovaně.
- Nežádoucí reakce hromadění vodíku probíhá u WE43 pouze v prvním týdnu po implantaci.
- Zánětlivá reakce na přítomnost WE43 je přiměřená. Lze vyloučit přítomnost osteomyelitidy, nekrózy, osteoklastickou resorpci, trombózu cév.
- Reakci z cizích těles nelze jednoznačně vyloučit pro omezenou kvalitu jednoho preparátu. Na základě nálezů ostatních preparátů lze vyloučit reakci z cizích těles na WE43.
- WE43 je biokompatibilní materiál.
- Degradace Zn-1,6Mg je příliš rychlá. Je doprovázena hromaděním většího množství vodíku v měkkých tkáních po dobu minimálně 6 týdnů.
- Zánětlivá reakce Zn-1,6Mg je ve srovnání s WE43 výraznější. Zn-1,6Mg vyvolává reakci z cizích těles.
- Výsledky studie nekorelují s jinými literárními zdroji. Příčina spočívá buď v chybě materiálu, chybné operační technice nebo vzniku infekčního zánětu.

8.2 Druhá fáze experimentu

- Hojení měkkých tkání i kosti v okolí WE43 probíhá klinicky nekomplikovaně.

- Zánětlivá fáze hojení kosti v okolí WE43 je přiměřená. Časně i pozdně se spíše ojediněle vyskytují obrovskobuněčné granulomy, přitom v časném záchytu nelze vyloučit, že jde o reakci na šicí materiál.
- Periimplantační fibróza je mírná.
- Degradace WE43 probíhá v čase rovnoměrně, výraznější zrychlení rozpadu začíná ve 12. týdnu. Kompletní rozpad jednoho z vrutů nastává v 16. týdnu. Zde nelze vyloučit jako příčinu chybu materiálu a nepřiměřené zatížení.
- BIC v okolí WE43 klesá v čase, pravděpodobnou příčinou je tvorba vodíku. Kostní tvorbu ale umožňuje.
- Hojení měkkých tkání v okolí implantátů srovnávací skupiny je nekomplikované. Na mikroskopické úrovni probíhá nekomplikovaně i hojení kostní tkáně. V 8. týdnu byla přítomna ojediněle endarteriitis. Titan je biokompatibilní materiál.

8.3 Zhodnocení cílů a hypotéz

Ze srovnání biologického chování a rychlosti degradace slitin Zn-1,6Mg a WE43 je vyhovující stran implantace do živé tkáně WE43, Zn-1,6Mg se jeví jako nevyhovující. Důvodem pro to je příliš rychlá degradace Zn-1,6Mg, přílišná tvorba vodíku a intenzivnější zánětlivá reakce včetně reakce z cizích těles v okolí této slitiny. Pro navazující druhou fázi experimentu byla zvolena slitina WE43. Výsledky první fáze experimentu vyvrací hypotézu pomalejší degradace Zn-1,6Mg. Dále potvrzují předpoklad možného hojení kostní tkáně v okolí slitin WE43 a Zn-1,6Mg a vyvrací předpoklad biokompatibility slitiny Zn-1,6Mg.

WE43 se jeví jako biokompatibilní materiál vhodný k implantaci do živé tkáně, a to na základě klinického, histopatologického vyšetření i vyšetření zobrazovacími metodami. Výsledky podporují hypotézu zvýšení kostní remodelace přítomností WE43, a to i přes snížení BIC v čase. Z hlediska doby degradace se WE43 jeví jako materiál vyhovující pro fixaci v obličejovém skeletu. Původní tvar si po dobu 8 týdnů implantát zachovává. Z hlediska biologického chování je WE43 vyhovující pro fixaci v obličejovém skeletu. Získaná data potvrzují hypotézy druhé fáze experimentu.

9 Použitá literatura

Byun S.H., Lim H.K., Cheon K.H., Lee S.M., Kim H.E., Lee J.H. Biodegradable magnesium alloy (WE43) in bone-fixation plate and screw. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2020; 108: 2505–2512

Castellani C., Lindtner R.A., Hausbrandt P., Tschegg E., Stanzl-Tschegg S.E., Zanoni G., Beck S., Weinberg A.M. Bone-implant interface strength and osseointegration: Biodegradable magnesium alloy versus standard titanium control. *Acta Biomater.* 2011; 7(1): 432-40

Cembranos J.L.L. Maxillofacial osteosynthesis with resorbable material. *Rev Esp Ciruj Oral y Maxilofac.* 2004; 26(6): 369-383

- Dobatkin S., Martynenko N., Anisimova, N., Kiselevskiy M., Prosvirnin D., Terentiev V., Yurchenko N., Salishchev G., Estrin Y. Mechanical Properties, Biodegradation, and Biocompatibility of Ultrafine Grained Magnesium Alloy WE43. *Materials*. 2019; 12(21): 3627
- Ehrenfeld M., Manson P.N., Prein J. Principles of Internal Fixation of the Craniomaxillofacial Surgery. 1. vyd. New York: Thieme. 2012. 395 s
- Fousova M., Vojtech D., Kubasek J. Titanium Alloy Ti-6Al-4V Prepared by Selective Laser Melting (SLM). *Manufacturing technology*. 2016; 16(4): 691-697
- Galli S. On magnesium-containing implants for bone applications. (<https://dspace.mah.se/handle/2043/21277>). [online] c2016. [cit. 11.6.2021]
- He Y.H., Tao H.R., Zhang Y., Jiang Y., Zhang S.X., Zhao C.L., Li J.N., Zhang B.L., Song Y., Zhang X.N. Biocompatibility of bio-Mg-Zn alloy within bone with heart, liver, kidney and spleen. *Chinese Science Bulletin*. 2009; 54(3): 484-91
- Charyeva O., Feyerabend F., Willumeit R., Zukowski S., Gasqueres C., Szakacs G., Agha N.A., Hort N., Gensch F., Cecchinato F. Jimbo R., Wennerberg A., Lips K.S. In Vitro Resorption of Magnesium Materials and its Effect on Surface and Surrounding Environment. *MOJ Toxicology*. 2015; 1(1): 0004
- Janning C., Willbold E., Vogt C., Nellsen J., Meyer-Lindenberg A., Windhagen H., Thorey F., Witte F. Magnesium hydroxide temporarily enhancing osteoblast activity and decreasing the osteoclast number in peri-implant bone remodeling. *Acta Biomater*. 2010; 6(5): 1861–1868
- Kanno T., Sukegawa S., Furuki Y., Nariai Y., Sekine J. Overview of innovative advances in bioresorbable plate systems for oral and maxillofacial surgery. *Jpn Dent Sci Rev*. 2018; 54(3): 127-138
- Kim Y.K., Lee K.B., Kim S.Y., Bode K., Jang Y.S., Kwon T.Y., Jeon M.H., Lee M.H. Gas formation and biological effects of biodegradable magnesium in a preclinical and clinical observation. *Sci Technol Adv Mater*. 2018; 19(1): 324–335
- Krause A., Von der Höh N., Bormann D., Krause C., Bach F.W., Windhagen H., Meyer-Lindenberg A. Degradation behaviour and mechanical properties of magnesiumimplants in rabbit. *J Mater Sci*. 2010; 45: 624–632
- Kubasek J., Dvorsky D., Sedy J., Msallamova S., Levorova J., Foltan R., Vojtech D. The Fundamental Comparison of Zn–2Mg and Mg–4Y–3RE Alloys as a Perspective Biodegradable Materials. *Materials (Basel)*. 2019; 12(22): 3745
- Kubasek J., Vojtech D., Jablonska E., Pospisilova I., Lipov J., Ruml T. Structure, mechanical characteristics and in vitro degradation, cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity of novel biodegradable Zn–Mg alloys. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016; 58: 24-35

- Kutniy K. V., Papirov I. I., Tikhonovsky M. A., Pikalov A.I., Sivtsov S.V., Pirozhenko L.A., Shokurov V.S., Shkuropatenko V.A. Influence of grain size on mechanical and corrosion properties of magnesium alloy for medical implants. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik*. 2009; 40 (4): 242-6
- Lee J.W., Han H.S., Han K.J., Park J., Jeon H., Ok M.R., Seok H.K., Ahn J.P., Lee K.E., Lee D.H., Yang S.J., Cho S.Y., Cha P.R., Kwon H., Nam T.H., Lo Han J.H., Rho H.J., Lee K.S., Kim Y.C., Mantovani D. Long-term clinical study and multiscale analysis of in vivo biodegradation mechanism of Mg alloy. 2016; 113(3): 716-721
- Levorova J., Duskova J, Drahos M, Vrbova R, Vojtech D, Kubasek J, Bartos M, Dugova L, Ulmann D, Foltan R. In vivo study on biodegradable magnesium alloys: Bone healing around WE43 screws. *J Biomater Appl*. 2018; 32(7): 886-895
- Levorová J., Dušková J., Drahoš M., Vrbová R., Kubásek J., Vojtěch D., Bartoš M., Dugová L., Ulmann D., Foltán R. Výzkum vstřebatelnosti kovových materiálů na biologických modelech. *Česká stomatologie / Praktické zubní lékařství*. 2017; 117 (4): 79-84
- Li M., Benn F., Derra T., Smeets R., Molina-Aldareguia J. M., Kopp A., Lorca J. L. Microstructure, mechanical properties, corrosion resistance and cytocompatibility of WE43 Mg alloy scaffolds fabricated by laser powder bed fusion for biomedical applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2021; 119: 111623
- Liao Y., Xu Q., Zhang J., Niu J., Yuan G., Jiang Y., He Y., Wang X. Cellular response of chondrocytes to magnesium alloys for orthopedic applications. *International Journal of Molecular Medicine*. 2015; 36(1):73-82
- Liu C.L., Jiang J., Wang M., Wang Y.J., Chu P.K., Huang W.J. In Vitro Degradation and Biocompatibility of WE43, ZK60, and AZ91 Biodegradable Magnesium Alloys. *AMR* 2011; 287–290: 2008–14
- Liu S., Kenta D., Doanb N., Darguscha M., Wanga G. Effects of deformation twinning on the mechanical properties of biodegradable Zn-Mg alloys. *Bioactive Materials*. 2019; 4 (1): 8-16
- Makadia H.K., Siegel S.J. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers (Basel)*. 2011; 3(3): 1377–1397
- Mammoli F., Castiglioni S., Parenti S., Cappadone C., Farruggia G., Iotti S., Davalli P., Maier J.A.M., Grande A., Frassinetti C. Magnesium is a key regulator of the balance between osteoclast and osteoblast differentiation in the presence of Vitamin D₃. *Int J Mol Sci*. 2019; 20(2): 385
- Maradze D., Musson D., Zheng Y., Cornish J., Lewis M., Liu Y. High Magnesium Corrosion Rate has an Effect on Osteoclast and Mesenchymal Stem Cell Role During Bone Remodelling. *Sci Rep*. 2018; 8(1): 10003

Marukawa E., Tamai M., Takahashi Y., Hatakeyama I., Sato M., Higuchi Y., Kakidachi H., Taniguchi H., Sakamoto T., Honda J., Omura K., Harada H. Comparison of magnesium alloys and poly-L-lactide screws as degradable implants in a canine fracture model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2016; 104(7): 1282-9

Mercuri L.G. Temporomandibular Joint Total Joint Replacement – TMJ TJR. 1. Vyd. Cham: Springer International Publishing AG, 2016. 301 s

Mühlbauer W., Anderl H., Ramatschi P., Heeckt P., Zenker J., Deubzer M., Höpner F., Vertesy E. Radical treatment of craniofacial anomalies in infancy and the use of miniplates in craniofacial surgery. *Clin Plast Surg.* 1987; 14 (1): 101-11

Oshibe N., Murukawa E., Yoda T., Harada H. Degradation and interaction with bone of magnesium alloy WE43 implants: A long-term follow-up in vivo rat tibia study. *J Biomater Appl.* 2019; 33(9): 1157-1167

Pachla W., Mazur A., Skiba J., Kulczyk M., Przybysz S. Wrought magnesium alloys ZM21, ZW3 and WE43 processed by hydrostatic extrusion with back pressure. *Archives of Metallurgy and Materials.* 2012; 57 (2): 485-93

Prakasam M., Locs J., Salma-Ancane K., Loca D., Largeteau A., Berzina-Cimdina L. Biodegradable Materials and Metallis Implants – A Review. *J Funct Biomater.* 2017; 8 (4): 44

Reifenrath J., Bormann D., Meyer-Lindenberg A. Magnesium alloys – corrosion and surface treatments. 1. vydání, Czerwinski F. Rijeka: InTech, 2011. 344 s

Schaller B., Saulacic N., Imwinkelried T., Beck S. Wi Yang Liu E., Gralla J., Nakahara K., Hofstetter W., Iizuka T. In vivo degradation of magnesium plate/screw osteosynthesis implant systems: Soft and hard tissue response in a calvarial model in miniature pigs. *J Craniomaxillofac Surg.* 2016; 44(3): 309-17

Suuronen R., Kontio R., Ashammakhi N., Lindqvist C., Laine P. Bioabsorbable selfreinforced plates and screws in craniomaxillofacial surgery. *Biomed Mater Eng.* 2004; 14(4): 517-524

Torroni A., Witek L., Fahliogullari H.P., Bortoli J. A., Inrahim A., Hacquebord J., Gupta N., Coelho P. WE43 and WE43-T5 Mg alloys screws tested in-vitro cellular adhesion and differentiation assay and in-vivo histomorphologic analysis in an ovine model. *Journal of Biomaterials Applications.* 2021; 35(8): 901-911

Von der Höh N., Krause A., Hackenbroich C., Bormann D., Lucas A., Meyer-Lindenberg A. [Influence of different surface machining treatments of resorbable implants made from different magnesium-calcium alloys on their degradation--a pilot study in rabbit models]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 2006; 113(12): 439-46

Vroman I., Tighzert L. Biodegradable Polymers. *Materials (Basel).* 2009; 2(2): 307–344

Windhagen H., Radtke K., Weizbauer A., Diekman J., Noll Y., Kreimeyer U., Schavan R., Stukenborg-Colsman C., Waizy H. Biodegradable magnesium-based screw clinically equivalent to titanium screw in hallux valgus surgery: short term results of the first prospective, randomized, controlled clinical pilot study. *Biomed Eng Online* 2013; 62: 12

Witte F., Hort, N., Vogt, C., Cohen, S., Kainer, K. U., Willumeit, R., Feyerabend, F.: Degradable biomaterials based on magnesium corrosion. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*. 2008; 12(5): 63–72

www.azom.com - d. (<https://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=9279>). [online] [18.6.2013]. [cit. 1.10.2021]

www.edumos.eu. (<https://edumos.eu/wp-content/uploads/2020/10/Koroze-01-Uvod-do-koroznich-procesu-druhy-koroze.pdf>). [online] [10/2020]. [cit.23.5.2021]

www.matweb.com – b.
(<http://www.matweb.com/search/datasheet.aspx?matguid=217394aba5b3413b9fbc034c45310996&ckck=1>). [online]c1996-2021. [cit. 1.10.2021]

www.matweb.com – c.
(<http://www.matweb.com/search/DataSheet.aspx?MatGUID=ab96a4c0655c4018a8785ac4031b9278>). [online] c1996-2021. [cit. 1.10.2021]

Yan J., Chen Y.G., Yuan Q.L., Yu S., Qiu W.C., Yamng C.G., Wang Z.G., Gong J.F., Ai K.X., Zheng Q., Li J.N., Zhang S.X., Zhang X.N. Comparison of the effects of Mg-6Zn and titanium on intestinal tract in vivo. *Journal of Materials Science-Material in Medicine*. 2013; 24(6): 1515-25

Yang H., Jia B., Zhang Z., Qu Y., Li G., Lin W., Zhu D., Dai D., Zheng Y. Alloying design of biodegradable zinc as promisingbone implants for load-bearing applications. *Nature Communications*. 2020; 11(1): 401

Zhang S.X., Zhang X.N., Zhao C.L., Li J., Song Y., Xie X., Tao H., Zhang Y., He Y., Jiang Y., Bian Y. Research on an Mg–Zn alloy as a degradable biomaterial. *Acta Biomaterialia*. 2010; 6(2): 626-640

Zheng Y. *Magnesium Alloys as Degradable Biomaterials*. 1. vyd. Boca Raton: CRC Press, 2016, 578 s

Zheng Y.F., Gu X.N., Witte F. *Biodegradable Metals*. *Materials Science and Engineering Reports*. 2014; 77: 1-34

10 Seznam publikací

10.1 Publikace, které jsou podkladem disertace, s IF

1. Levorova J., Duskova J., Drahos M., Vrbova R., Vojtech D., Kubasek J., Bartos M., Dugova L., Ulmann D., Foltan R. In vivo study on biodegradable

magnesium alloys: Bone healing around WE43 screws. *J Biomater Appl.* 2018; 32 (7): 886-895

(IF 2,504)

2. Kubásek J., Dvorský D., Šedý J., Msallamová Š., Levorová J., Foltán R., Vojtěch D. The Fundamental Comparison of Zn-2Mg and Mg-4Y-3RE Alloys as a Perspective Biodegradable Materials. *Materials (Basel).* 2019; 12(22): 3745

(IF 3,260)

10.2 Publikace, které jsou podkladem disertace bez IF

1. Levorová J., Dušková J., Drahoš M., Vrbová R., Kubásek J., Vojtěch D., Bartoš M., Dugová L., Ulmann D., Foltán R. Výzkum vstřebatelnosti kovových materiálů na biologických modelech. *Česká Stomatologie/Praktické zubní lékařství*, 2017; 117 (4), 79-84

10.3 Publikace bez vztahu k tématu disertace s IF

1. Levorova J., Machon V., Hirjak D., Foltan R. Ultrasound-guided injection into the lower joint space of the temporomandibular joint. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2015; 44 (4): 491-2

(IF 1,851)

2. Machon V., Levorova J., Hirjak D., Foltan R. Condylar hyperplasia following unilateral temporomandibular joint replacement. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2015; 44 (6): 771-3

(IF 1,851)

3. Machon V., Levorova J., Foltan R., Hirjak D., Sidebottom A. Mini-instruments for minimally invasive arthroscopy of the temporomandibular joint: a technical note. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery.* *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2015; 53 (7): 662-3

(IF 1,489)

4. Machoň V., Klíma K., Vlachopoulos V., Valach J., Levorová J., Foltán R. Evaluation of complications after endoscopy assisted open reduction and internal fixation of unilateral condylar fractures of the mandible. Retrospective analysis 2010-2015. *Acta Chir Plast.* 2016; 58 (1): 5-11

(IF 0,627)

5. Levorova J., Machon V., Guha A., Foltan R. Septic arthritis of the temporomandibular joint caused by rare bacteria *Raoultella ornithinolytica*. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2017; 46 (1): 111-115

(IF 2,216)

6. Machon V., Levorova J., Hirjak D., Drahoš M., Foltan R. Temporomandibular joint disc perforation: a retrospective study. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 2017; 46 (11): 1411–1416

(IF 2,216)

7. Machon V., Levorova J., Hirjak D., Wisniewski M., Drahoš M., Sidebottom A., Foltan R. A prospective assessment of outcomes following the use of autologous blood for the management of recurrent temporomandibular joint dislocation. *J Oral Maxillofac Surg.* 2018; 22 (1): 53-57

(IF 1,714)

8. Machoň V., Levorová J., Hirjak D., Drahoš M., Brizman E., Beňo M., Foltán R. Evaluation of complications following stock replacement of the

temporomandibular joint performed between the years 2006 and 2015: a retrospective study. *J Oral Maxillofac Surg.* 2020; 24 (3): 373-379

(IF 1,5)

9. Machoň V., Levorová J., Hirjak D., Beňo M., Drahoš M., Foltán R. Does arthroscopic lysis and lavage in subjects with Wilkes III internal derangement reduce pain? *J Oral Maxillofac Surg.* 2021; doi: 10.1007/s10006-020-00935-7

(IF 1,642)

10.4 Publikace bez vztahu k tématu disertace bez IF

1. Levorová J., Machoň V., Foltán R. Ultrasonografie v diagnostice a léčbě onemocnění čelistního kloubu. *LKS*, 2015; 25 (9):176-180
2. Levorová J., Machoň V., Grill P., Hirjak D., Foltán R. Keratocystic Odontogenic Tumour with Extraosseal Spread: Evaluation of the Effect Carnoy's Solution. *Prague Med Rep.* 2015; 116 (4): 303-313
3. Levorová J., Machoň V., Guha A., Foltán R. Osteoarthritis of Temporomandibular Joint Related to the Defects of Posterior Dentition: A Retrospective Study. *Prague Med Rep.* 2016; 117 (4): 176-184
4. Levorová J., Machoň V., Pavlíková G., Dušková J., Foltán R. Keratocystický odontogenní tumor: současný pohled. *LKS*. 2017; 27 (2): 29-33
5. Konupková M., Tycová H., Kučera J., Hanzelka T., Levorová J. Vliv ortodonticko-chirurgické léčby na temporomandibulární kloub. *Ortodoncie.* 2017; 26 (1): 32-41
6. Levorová J., Machoň V., Foltán R. Surgical management of TMJ involvement in patients with rheumatoid disease; *Topics di Terapia Intra-Articolare*, 2017; 9 (2): 27
7. Levorová J., Machoň V., Holakovský J., Foltán R. Chondromatóza: postižení čelistního kloubu. *LKS*, 2018, 28 (12): 270-273
8. Machoň V., Desai A., Levorová J., Brizman E., Foltán R. Evaluation of complications following a trans-masseteric antero-parotid approach for patients with sub-condylar fractures of their temporomandibular joint. A retrospective study. *Prague Medical Report.* 2019; 120 (2-3):64-73
9. Machoň V., Vir J., Levorová J., Beňo M., Hirjak D., Foltán R. Discectomy with Subsequent Free Fat Flap Insertion in Disc Perforation Therapy of Temporomandibular Joint. *Assessment of Results 24 Months after Operation.* *Prague Med Rep.* 2020; 121 (2): 96-106
10. Stachová L., Levorová J., Tycová H., Kučera J. Kondylární hyperplazie. *Česká ortodoncie.* 2020; 29:99-109
11. Guha A., Gregova M., Sebek J., Levorová J., Foltán R. Fifteenyears of recurrent ameloblastoma: outcome of disease after reconstruction with fibula free flap. *International Medicine.* 2020; 2 (4): 244-247
12. Machoň V., Levorová J., Beňo M., Hirjak D., Drahoš M., Foltán R. Evaluating the Effect of Conservative Therapy in Patients with Wilkes Stage III Temporomandibular Joint Derangement. *Prague Med Rep.* 2021; 122 (4): 269-277
13. Machoň V., Levorová J., Hirjak D., Beňo M., Drahoš M., Foltán R. Does arthroscopic lysis and lavage in subjects with Wilkes III internal derangement reduce pain? *Oral Maxillofac Surg.* 2021; 25 (4): 463-470