



Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce

Biologické vlastnosti povrchů aloplastických materiálů

MUDr. Rastislav Ballay

Praha 2021

Doktorské studijní programy v biomedicině

*Univerzita Karlova v Praze
a Akademie věd České republiky*

Obor: Experimentální chirurgie

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

Školící pracoviště: 1. Ortopedická klinika, 1. LF UK, FN v Motole

Autor: MUDr. Rastislav Ballay

Školitel: Prof. MUDr. Ivan Landor, CSc.

Konzultant: Doc. MUDr. Filip Růžička PhD.

Oponenti

.....
.....
.....

Autoreferát byl rozeslán dne:

Obhajoba se koná dne:v.....hod.

.....
.....

S disertací je možno se seznámit na děkanátě 1. lékařské fakulty Univerzity
Karlovy v Praze

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: Alopastické 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 %. Ač se nejedná o vysoké procento, tyto infekční komplikace prodlužují hospitalizaci pacienta, který proto podstupuje opakovaně ortopedické výkony. Uvádí se 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. 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 %. 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*).

2. Teoretická část

2.1. Materiály používané pro ortopedické aplikace

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, 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 – ZrO₂) nebo oxidu hlinitého (alumina - Al₂O₃) jsou využívány na konstrukci kluzných částí, tj. artikulační vložka kloubní jamky a kloubní hlavice. Další z řady keramických materiálů je hydroxyapatit (HA), který je aplikován především ve formě nástříku na klasické kovové materiály ke zvýšení osteointegračního potenciálu implantátu.

2.2. Hluboká infekce kloubních náhrad

Bakteriální kolonizaci povrchu implantátu byla popsána již v 80. letech minulého století. Byl navržen koncept: *“race for the surface – závod o povrch”*, ve kterém soutěží hostitelské buňky s bakteriemi o to, kdo dříve povrch obsadí. Kolonizace povrchu není doposud plně objasněna a ovlivňuje ji celá škála faktorů.

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. Fáze ireverzibilní (adhezivní) se týká molekulárních a buněčných interakcí blízkce spřízněných s expresí specifických genů navázaných bakterií pro vytvoření prvotní ochranné bariéry (hlen), která následně vede k vytvoření biofilmu. 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*.

Bakterie v biofilmu spolu navzájem komunikují pomocí látek blízkých hormonům a vytvářejí signalizační 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. Reverzibilní fáze je tedy jakési časové „okno příležitosti“ pro inhibici vytvoření bakteriálního biofilmu a nasměrování osteointegrace a hojení k pozitivnímu vývoji.

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. *Staphylococcus aureus* vykazuje rovněž vysokou schopnost adherence k extracelulárním proteinům, což je rozhodujícím faktorem vedoucím k časně a rychlé kolonizaci. Dle literatury je schopen tento *Staphylococcus aureus* přežívat 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. Strategie zahrnující použití antiseptických a antibakteriálních povrchů implantovaných materiálů je technologie, která se začala rozvíjet již před 30 lety. Antibakteriální povrchy je možné kategorizovat do 3 skupin:

- 1) perioperační antibakteriální lokální nosiče nebo povrchy, např. kostní cementy;
- 2) pasivní povrchová modifikace, která zahrnuje modifikaci morfologickou a fyzikálně-chemickou;
- 3) aktivní povrchová modifikace pomocí bioaktivních vrstev s implementovanými léčivy.

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. 1).

Tabulka 1. 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 Ti6Al4V (ISO 5832/3)	kartáčovaný povrch	2
TT	Slitina Ti6Al4V (ISO 5832/3)	tryskání Al_2O_3	4
TA	Slitina Ti6Al4V (ISO 5832/3)	povrch anodizovaný (zelený)	2
TALS	Slitina Ti6Al4V (ISO 5832/3)	povrch anodizovaný (zelený), značený laserem	3
TPH	Slitina Ti6Al4V (ISO 5832/3)	porézní TiO_2 nástřik + hydroxyapatit	5
TP	Slitina Ti6Al4V (ISO 5832/3)	porézní TiO_2 nástřik	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. 1), 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.



Obr. 1. Ukázka studovaných vzorků (vlevo) a jejich technický náčrt (vpravo).

3.1.2. Příprava farmakologicky aktivních vrstev KOL/HA/ATB

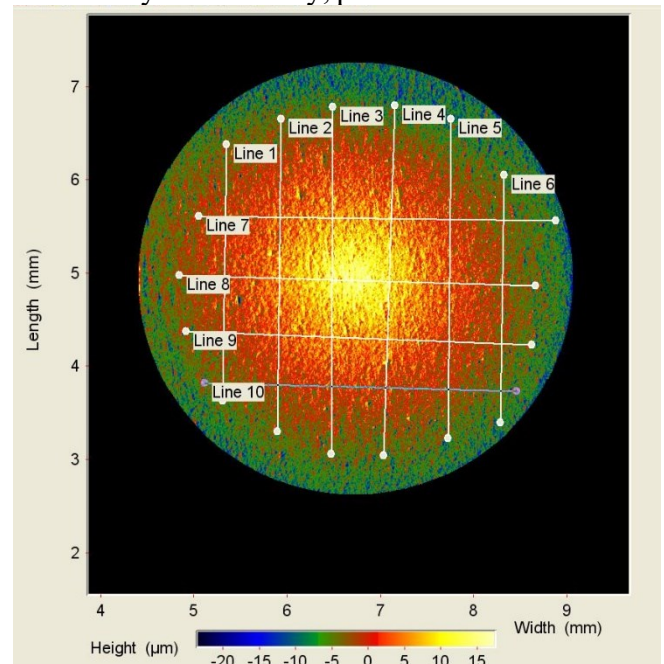
Vrstvy byly připravovány elektrostatickým zvlákněním roztoku kolagenu (KOL), hydroxyapatitu (HA) a polyethylen oxidu jako 8 % hmotnostních (%hm.) roztoku kolagenu ve směsi ethanolu a fosfátového pufru. Hmotnostní podíly jednotlivých složek v elektrostaticky zvlákněné vrstvě jsou 78,2 - 87,4 % hm.kolagenu, 5 - 15 %hm. hydroxyapatitu a 6,8 - 7,6 %hm. polyetylen oxidu. Degradací 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 aloplastických 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. 2), 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. 2. 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 °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 °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 °C byl každý disk propláchnut ponořením a jemným tahem ve fyziologickém roztoku, aby se odstranily planktonické bakterie, které neulpěly na povrchu testovaného terčíku (Foster). Vrstva biofilmu vytvořená na povrchu disků byla fixována 24hodinovým sušením při 45 °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 μ l 33% kyseliny octové, po dobu 20 minut na třepače 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 μ l 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 přenesou 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.

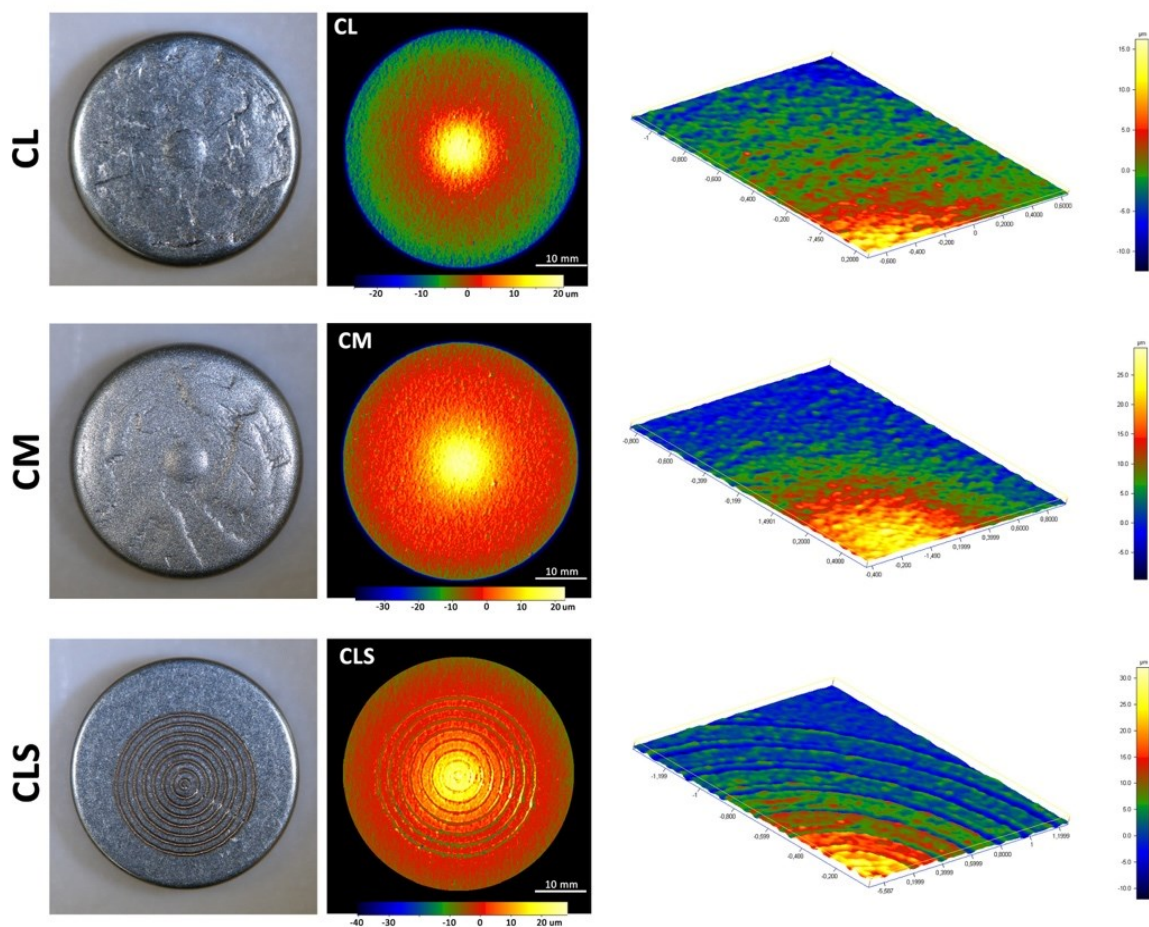
3.2.4. Statistické zpracování dat

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 nejnížší 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

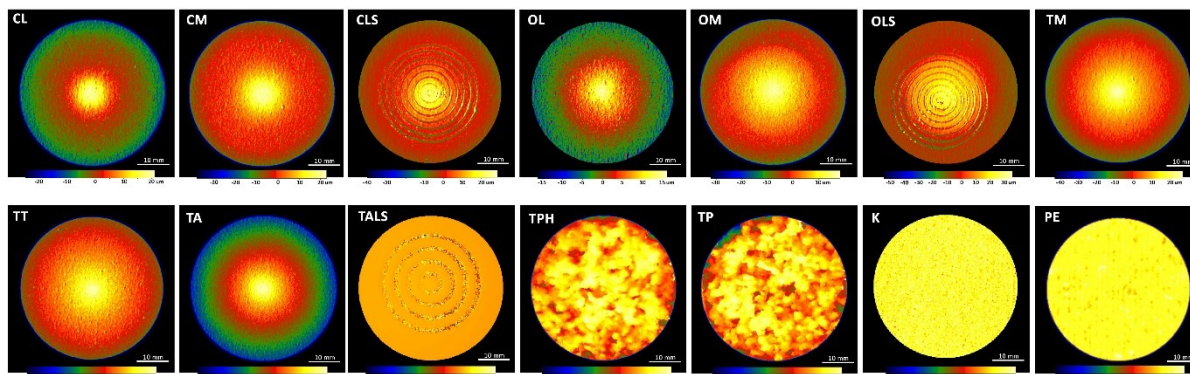
3.3.1. Charakterizace povrchu aoplastických materiálů

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. 3 je uveden příklad této analýzy: fotografie povrchů a dále topografie jejich povrchů v 2D a 3D módu.



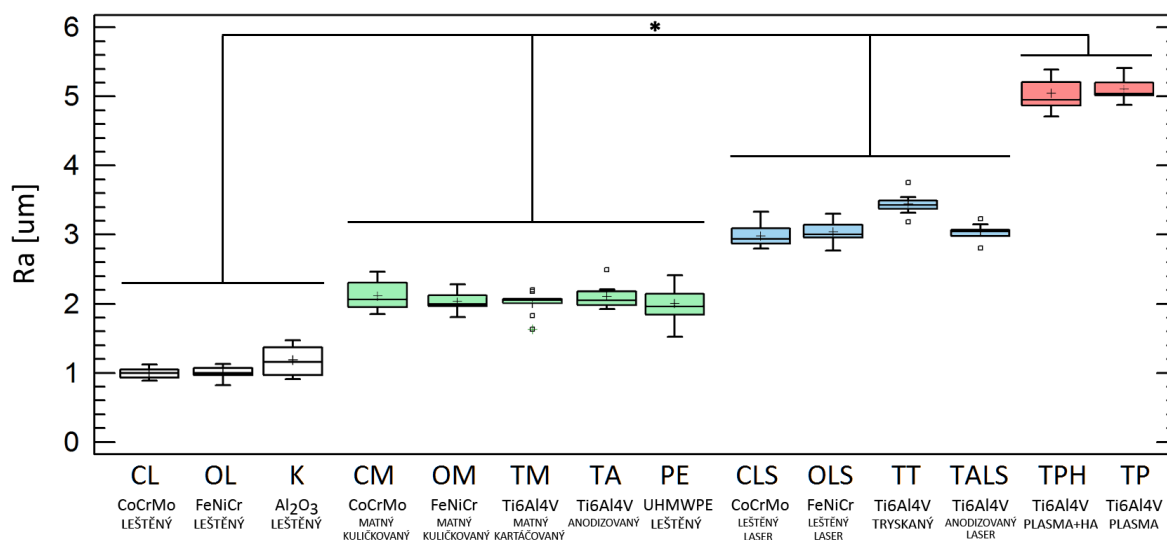
Obr. 3. Ukázka vzorků připravených ze slitiny CoCrMo (Vitalium) s leštěným povrchem (CL), kuličkovaným povrchem (CM) a leštěným povrchem značeným laserem (CLS). Fotografie a vyobrazení jejich topografie v 2D a 3D módu. Barevně kódovaný výškový profil: tmavá barva = nízká hodnota, světlá barva = vysoká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

Obr. 4 uvádí přehled a srovnání povrchů v 2D všech testovaných materiálů.



Obr. 4. Srovnání naskenovaných povrchů (2D) všech testovaných materiálů.

Tabulka 2 shrnuje naměřené parametry povrchové drsnosti Ra. 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. 4). Statisticky významné rozdíly se vyskytují pouze mezi jednotlivými skupinami.



Obr. 4. Srovnání parametru drsnosti Ra všech testovaných vzorků. *značí statisticky významné rozdíly (Mann-Whitneyův test s Bonferroniho korekcí, 0,05, n = 30).

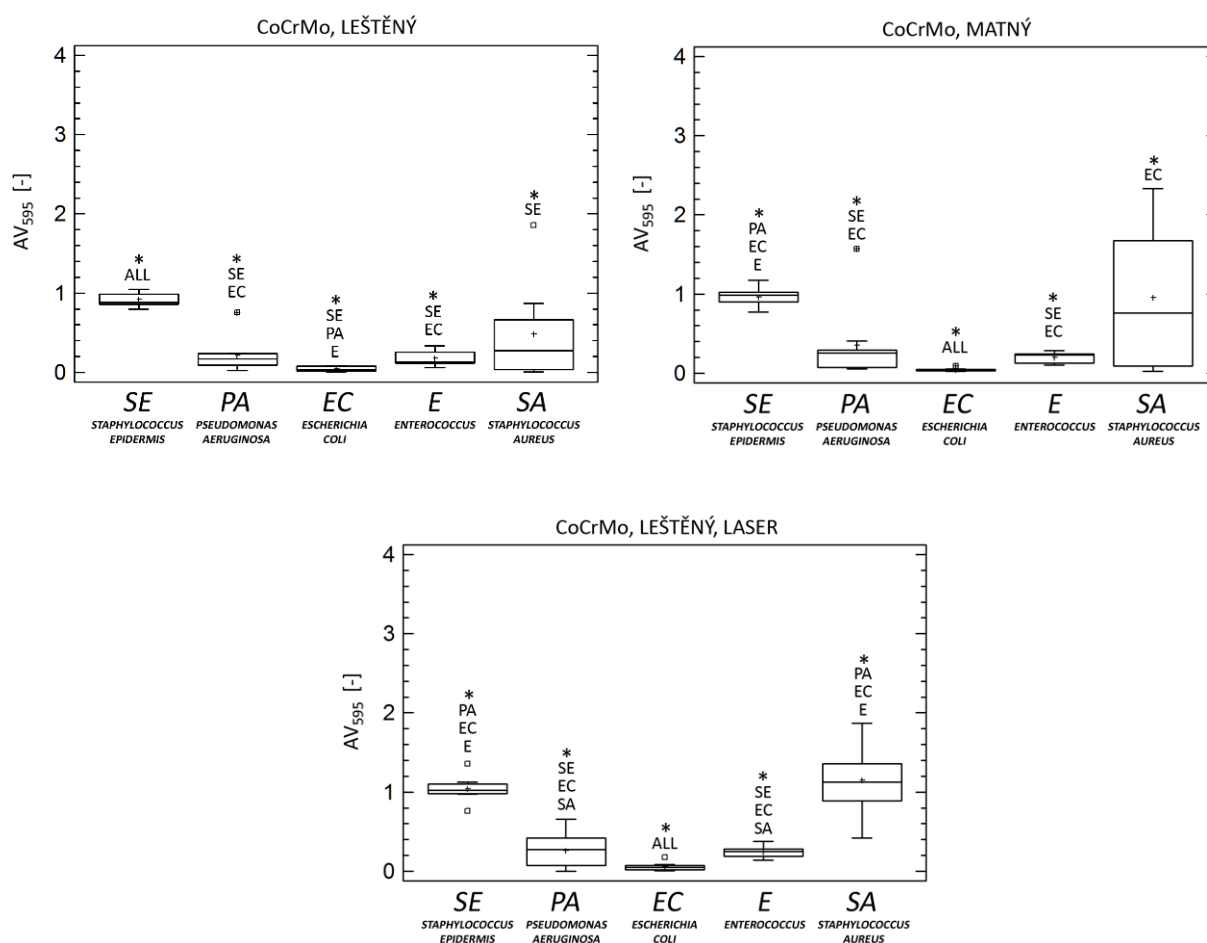
Tabulka 2. Přehled testovaných materiálů a jejich povrchových úprav s teoretickou a změřenou hodnotou povrchové drsnosti Ra [μm], aritmetický průměr, směrodatná odchylka, počet měření u každého typu materiálu (n) = 30.

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	$2,0 \pm 0,3$

3.3.2. Odolnost aloplastických materiálů vůči různým bakteriálním agens

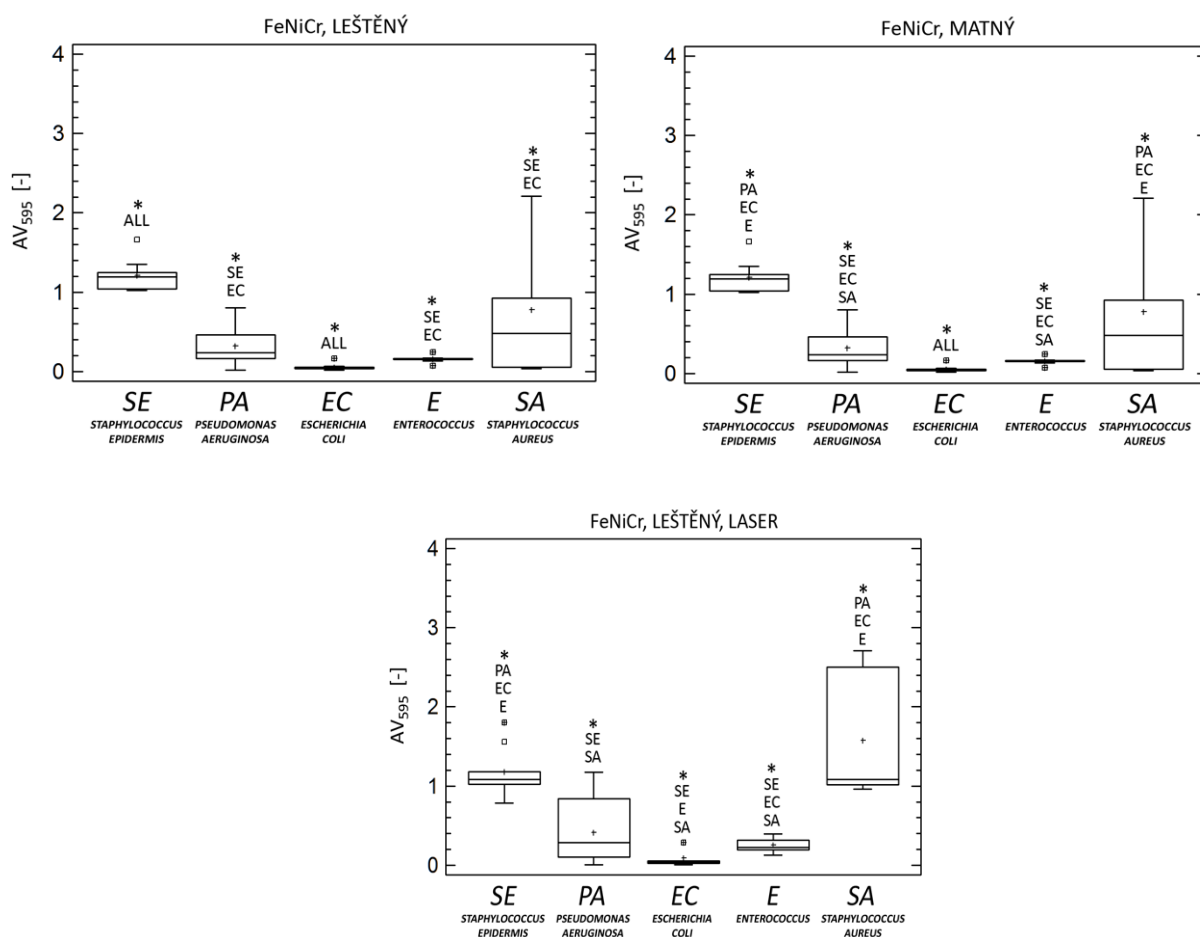
Výsledky sledování odolnosti jednotlivých materiálů s různou povrchovou úpravou, která se odráží v jejich povrchové drsnosti, vůči různým bakteriálním kmenům jsou uvedeny na Obr. 5-8. Data jsou zpracována jako výsledná absorbance výluhů po kolonizaci (AV_{595}), stanovená dle vztahu (1) v kapitole 3.2.2. v závislosti na jednotlivých bakteriálních agens.

Jak je patrné z Obr. 5, 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. 5. 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, $n=9$).

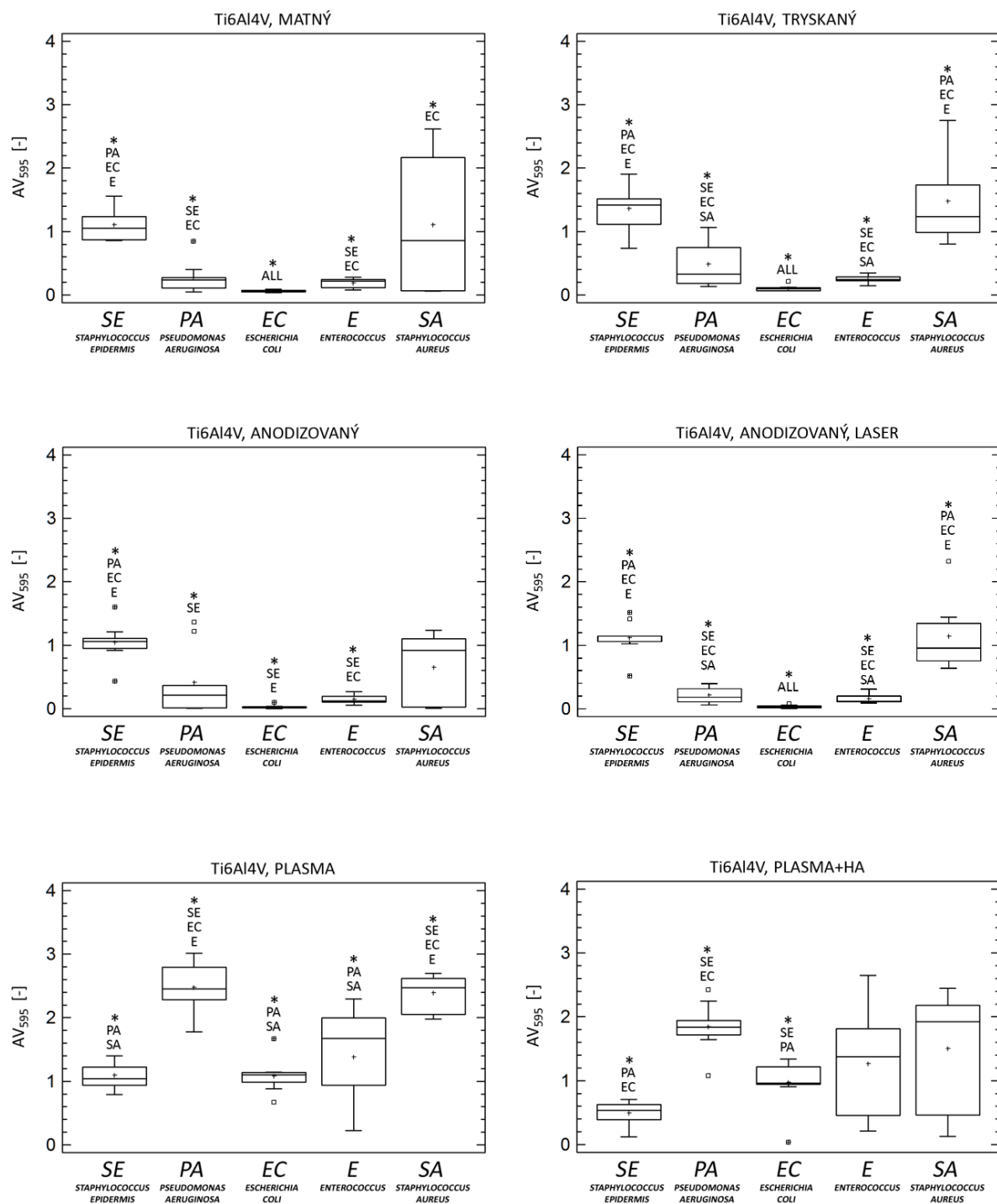
Obdobný trend je možné vypočítat i u slitin FeNiCr (Obr. 6), kde nejnižší adherence a tedy nejvyšší odolnost se projevuje v případě *E.coli*, naopak nejvyšší citlivost ke kolonizaci vykazují povrchy slitiny FeNiCr v případech *S. epidermidis* a *S. aureus*. S dosažením hodnoty povrchové drsnosti ($Ra\ 3,0 \pm 0,2$) 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 AV_{595} 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.



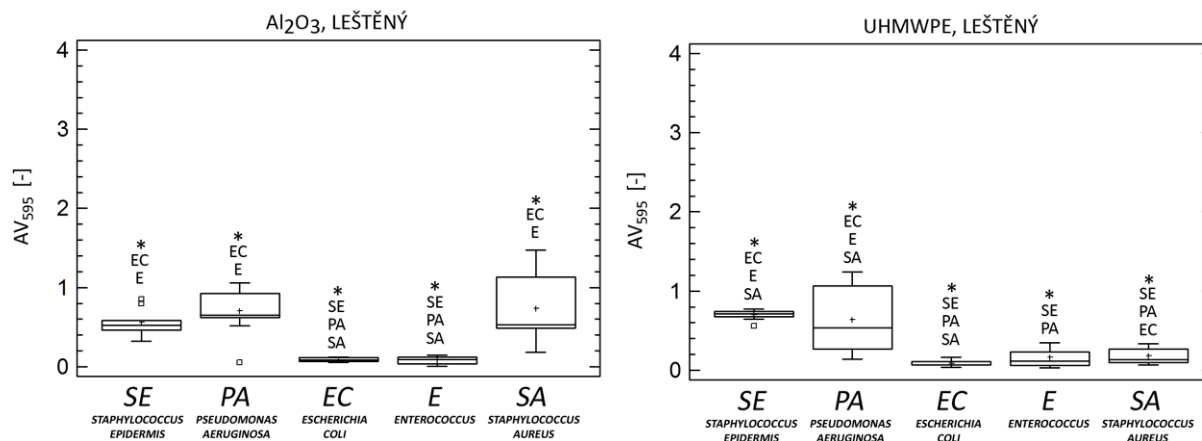
Obr. 6. Výsledná absorbance vyluhů po kolonizaci jednotlivých bakteriálních agens na vzorcích ze slitiny FeNiCr s leštěným povrchem (OL; $Ra\ 1,0 \pm 0,1$), kuličkováným matným povrchem (OM; $Ra\ 2,0 \pm 0,1$) a povrchem leštěným a značeným laserem (OLS; $Ra\ 3,0 \pm 0,2$). *značí statisticky významné rozdíly (Mann-Whitneyův test s Bonferroniho korekcí, 0,05, $n=9$).

Velmi zajímavá je situace v případě povrchů titanové slitiny Ti6Al4V (Obr. 7). 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 povrchích hůře než na povrchu matném či tryskaném. S aplikací plazmatického nástřiku, kdy se povrchová drsnost zvýší až na $R_a \sim 5 \mu\text{m}$, 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 adhezi 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. aureus* 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 povrchích keramického (Al_2O_3) a polymerního (UHMWPE) materiálu jsou uvedeny na Obr. 8. 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. aureus*.



Obr. 7. Výsledná absorbance vyluhů 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, $n=93$).



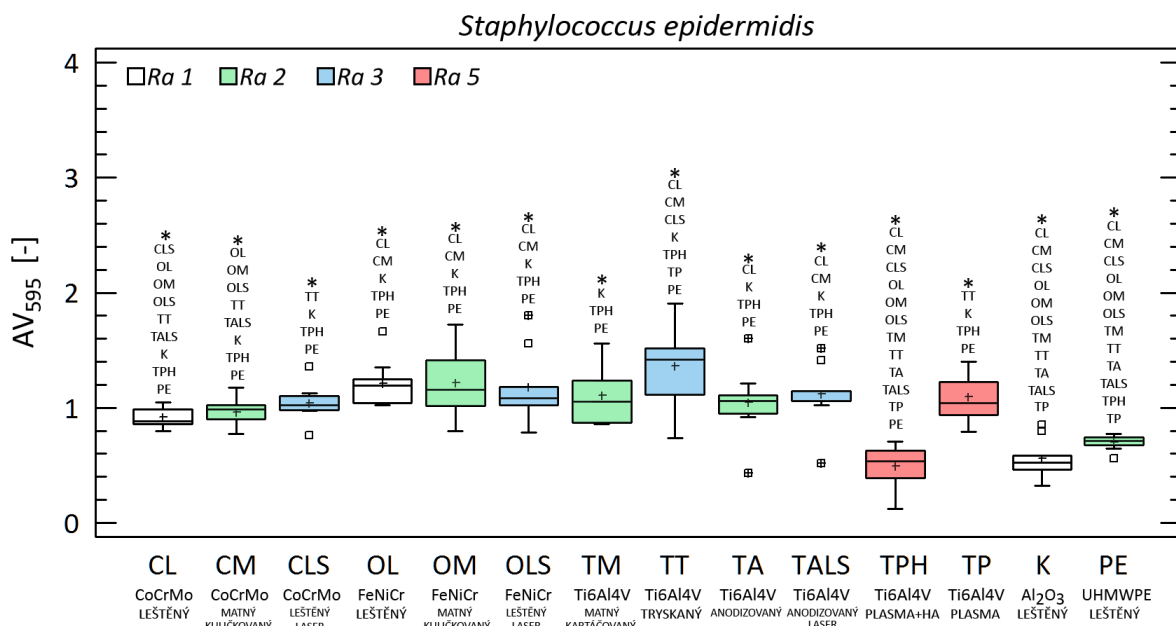
Obr. 8. Výsledná absorbance výluhů po kolonizaci jednotlivých bakteriálních agens na vzorcích z Al₂O₃ keramiky (Ra 1,2 ± 0,2) a UHMWPE (Ra 2,0 ± 0,3) s leštěnými povrchy. *značí statisticky významné rozdíly (Mann-Whitneyův test s Bonferroniho korekcí, 0,05, n=9).

3.3.3. Chování bakteriálních agens na různých površích aloplastických materiálů

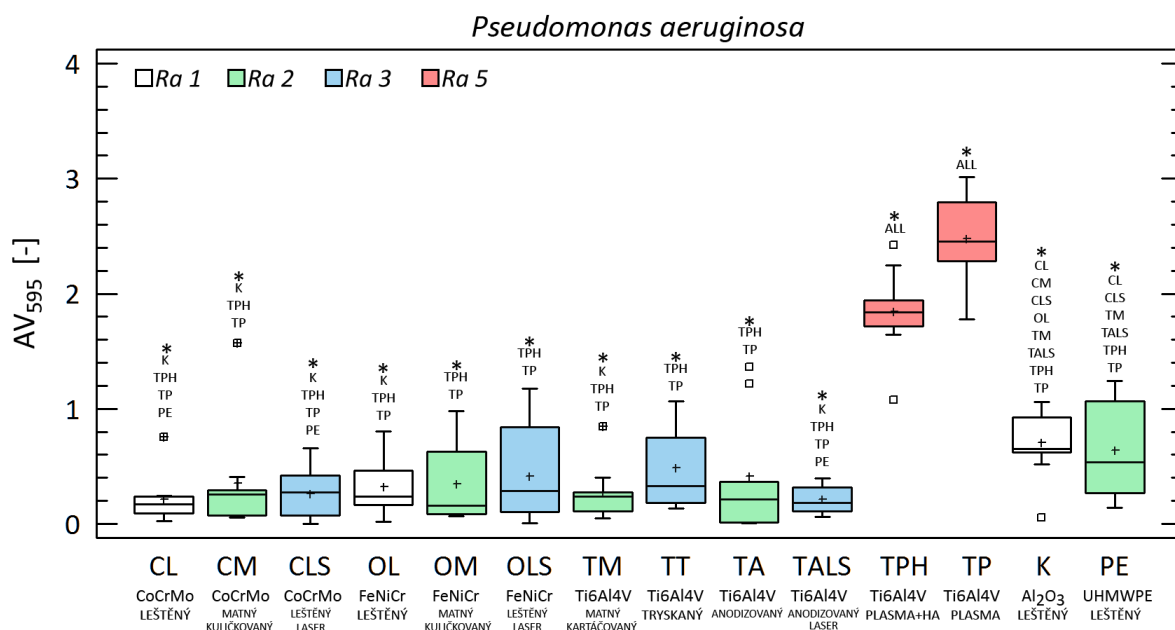
Pro shrnutí chování jednotlivých bakteriálních kmenů na různých površích materiálů byla data sestavena do grafů jako závislost výsledné absorbance výluhů po kolonizaci (AV₅₉₅), stanovené dle vztahu (1) v kapitole 3.2.2., na jednotlivých materiálech (Obr. 9-13). Boxploty jsou barevně rozlišeny na základě povrchové drsnosti.

Graf shrnující výsledky pro *S. epidermidis* je uveden na Obr. 9. Statisticky významně nižší absorbanci, a tudíž nižší adheenci, 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).

Jiná situace nastává při kolonizaci povrchů bakteriálními kmeny *P. aeruginosa* (Obr. 10), *E. coli* (Obr. 11) a kmenem *Enterococcus* (Obr. 12). 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. 10). Hodnoty výsledné absorbance, v případě *Enterococcus* (Obr. 12), mají velký rozptyl dat, a to v rozmezí hodnot od 0,2 do 2,5.

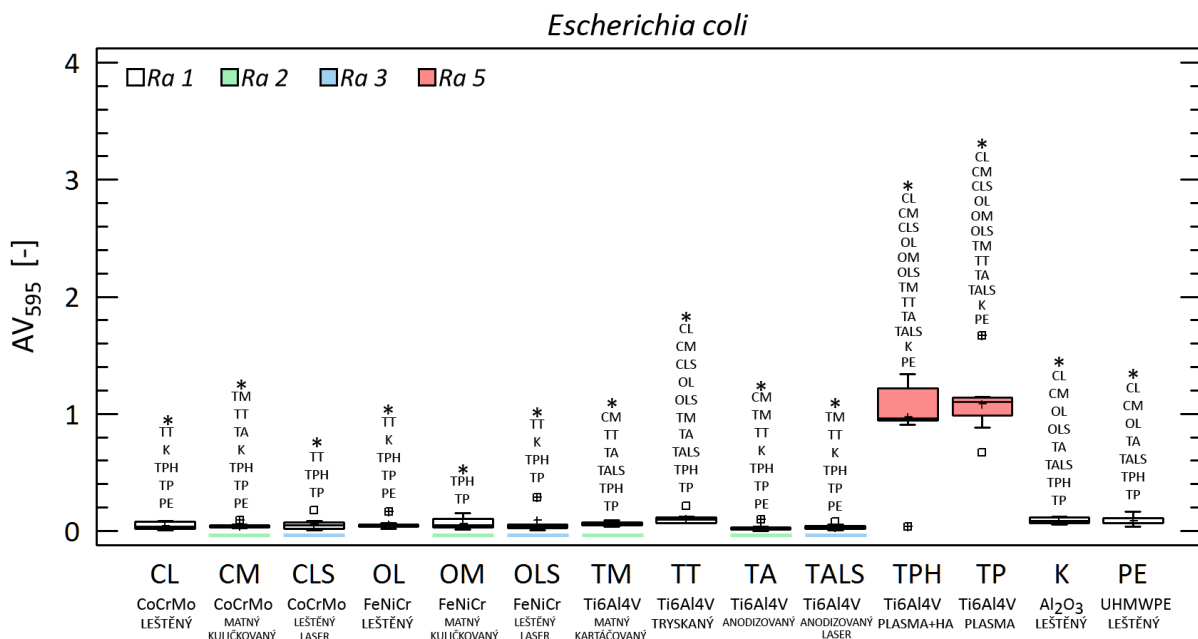


Obr. 9. Výsledná absorbance vyluhů po kolonizaci *Staphylococcus epidermidis* na jednotlivých studovaných vzorcích. *značí statisticky významné rozdíly (Mann-Whitneyův test s Bonferroniho korekcí, 0,05, n=9).

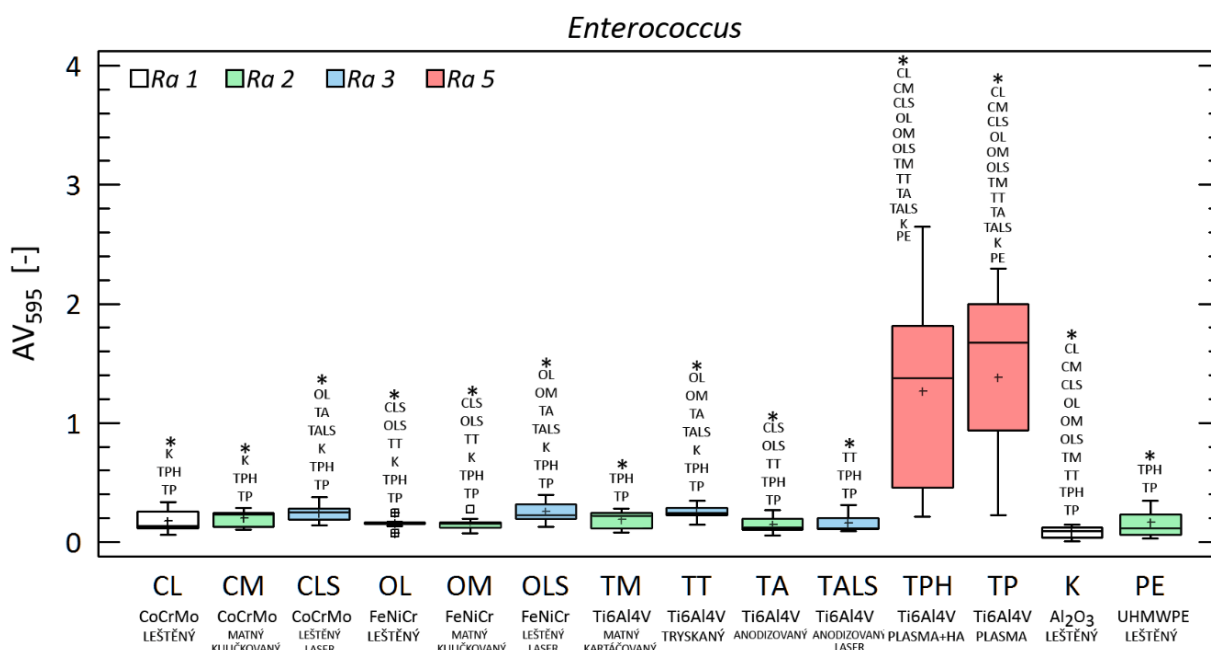


Obr. 10. Výsledná absorbance vyluhů po kolonizaci *Pseudomonas aeruginosa* na jednotlivých studovaných vzorcích. *značí statisticky významné rozdíly (Mann-Whitneyův test s Bonferroniho korekcí, 0,05, n=9).

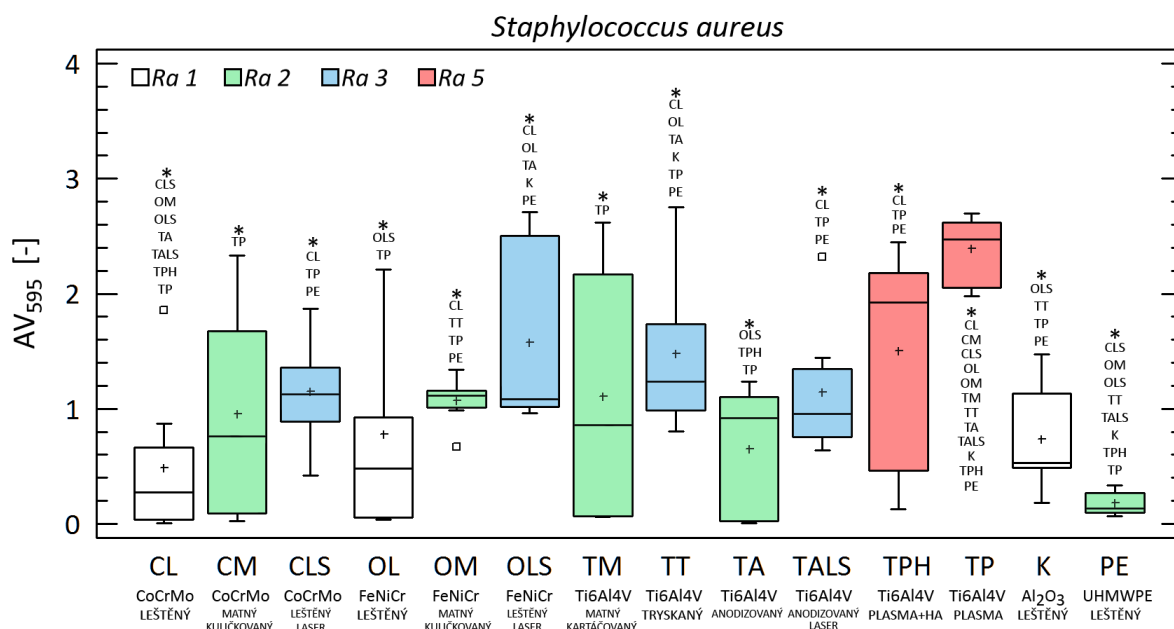
S. aureus (Obr. 13) nejméně ochotně kolonizuje leštěný povrch UHMWPE ($Ra\ 2,0 \pm 0,3$), jehož hodnota výsledné absorbance se statisticky významně neliší od leštěných povrchů slitin CoCrMo a FeNiCr, kde hodnoty Ra dosahují $\sim 1\ \mu\text{m}$, matných povrchů slitin CoCrMo a Ti6Al4V a anodizovaného povrchu Ti6Al4V, kde hodnoty Ra dosahují $\sim 2\ \mu\text{m}$. Nejvyšší citlivost ke kolonizaci *S. aureus* se projevuje u titanového plazmatického nástřiku ($Ra\ 5,1 \pm 0,2$), jehož hodnoty výsledné absorbance se statisticky shodují s povrchem slitiny FeNiCr značené laserem ($Ra\ 3,0 \pm 0,2$).



Obr. 11. 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. 12. Výsledná absorbance výluhů po kolonizaci *Enterococcus* na jednotlivých studovaných vzorcích. *značí statisticky významné rozdíly (Mann-Whitneyův test s Bonferroniho korekcí, 0,05, n=9).

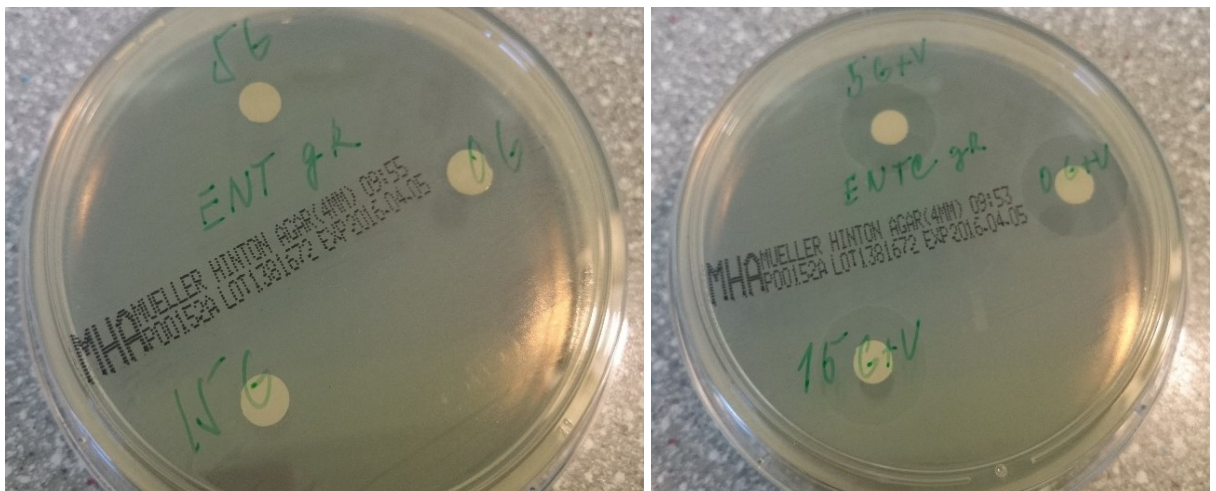


Obr. 13. Výsledná absorbance výluhů po kolonizaci *Staphylococcus aureus* na jednotlivých studovaných vzorcích. *značí statisticky významné rozdíly (Mann-Whitneyův test s Bonferroniho korekcí, 0,05, n=9).

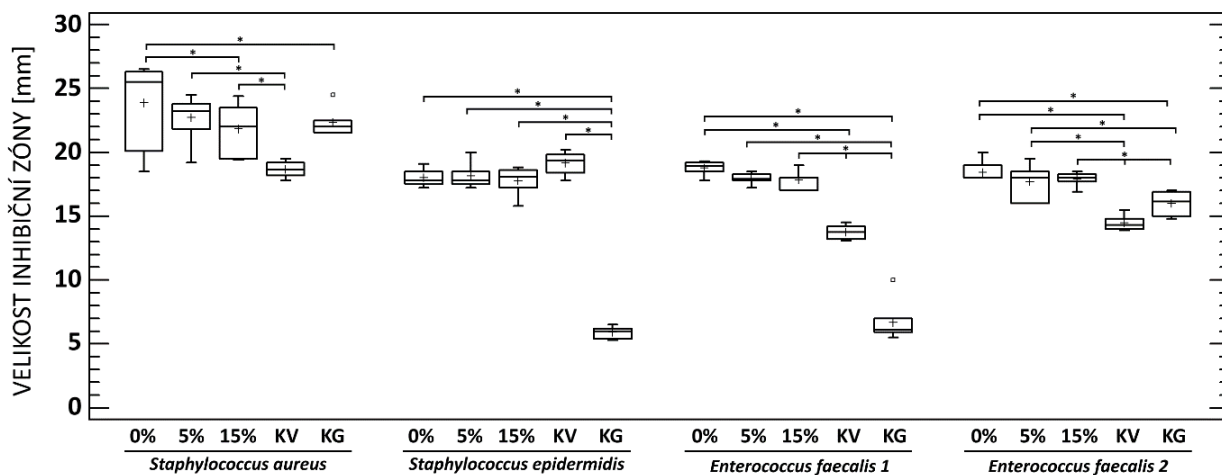
3.3.4. Testování citlivosti na ATB farmakologicky aktivních vrstvách

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. 14). Velikost inhibičních zón obklopující vzorky je srovnávána s velikostí inhibičních zón kolem standardních kontrolních disků obsahující vankomycin (KV) a gentamicin (KG).

Jak je patrné z Obr. 15, 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. 14. 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. 10–13). 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. 10-13). 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. 9). V tomto případě se může jednat o vliv dalších fyzikálně-chemických faktorů vrstvy. Důležitou roli při tvorbě

biofilmu hraje rovněž chemické složení substrátu, ke kterému bakterie adherují. Anodizované povrchy titanové slitiny, jejichž Ra se pohybuje od 2 do 3 μm , jsou pokryty oxidy TiO_2 stejně jako je tomu v případě povrchu s plazmatickým nástřikem TiO_2 ($R_a \sim 5,1$). Jak je patrné z Obr. 10, 11 a 12 pro kmeny *P. aeruginosa*, *E. coli* a *Enterococcus* je rozhodujícím faktorem drsnost, ne chemické složení povrchu. V případech *S. epidermidis* (Obr. 9) a *S. aureus* (Obr. 13) 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 TiO_2) podle stupně porozity (Obr. 9, 10, 12, 13). V případě *E. coli* (Obr. 11) 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.

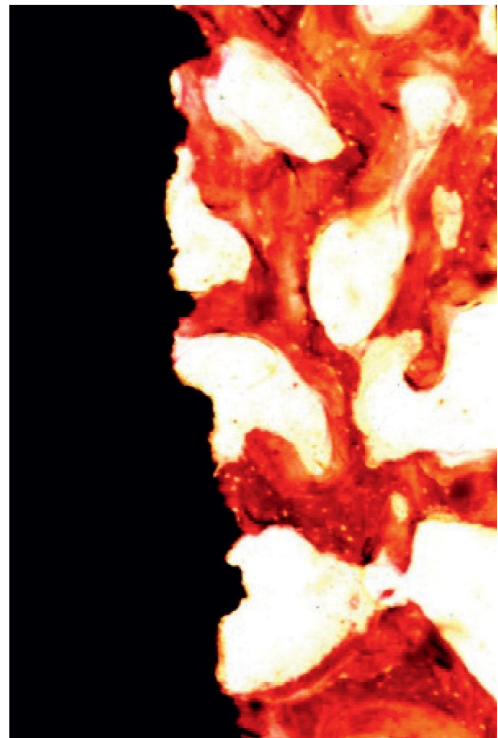
Při porovnání materiálů podle jejich průměrné afinity v jejich nejhladší povrchové úpravě vykazoval nejnižší afinitu UHMWPE v porovnání s ostatními materiály vůči *S. aureus* (Obr. 13), spíše nižší vůči *S. epidermidis* (Obr. 9), srovnatelná s ostatními je v případě *Enterococcus* (Obr. 12), spíše vyšší vůči *E. coli* (Obr. 11) a v případě *P. aeruginosa* patří UHMWPE k povrchům s vyšší afinitou v porovnání s ostatními povrchy (Obr. 10). 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 nálezný 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. 9). Rovněž Kinnari et al. 2009 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. 9) a *S. aureus* (Obr. 13) poměrně velmi dobře adherují na všech typech materiálů, nepreferují významně povrchovou drsnost

v porovnání s ostatními testovanými kmeny (Obr. 10, 11, 12). Vyšší hodnoty absorbance v porovnání se *S. epidermidis* (Obr. 9) vykazoval *S. aureus* (Obr. 13), což potvrzuje jeho snadnou tvorbu biofilmu a adhezenci 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 adhezenci 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, 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. 16).

Obr. 16. 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 nástríku v porovnání s povrchem hladkého titanu, nicméně v tomto případě se jednalo o povrch s minimální porozitou. HA nástrík, 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. 9, 10, 12, 13).

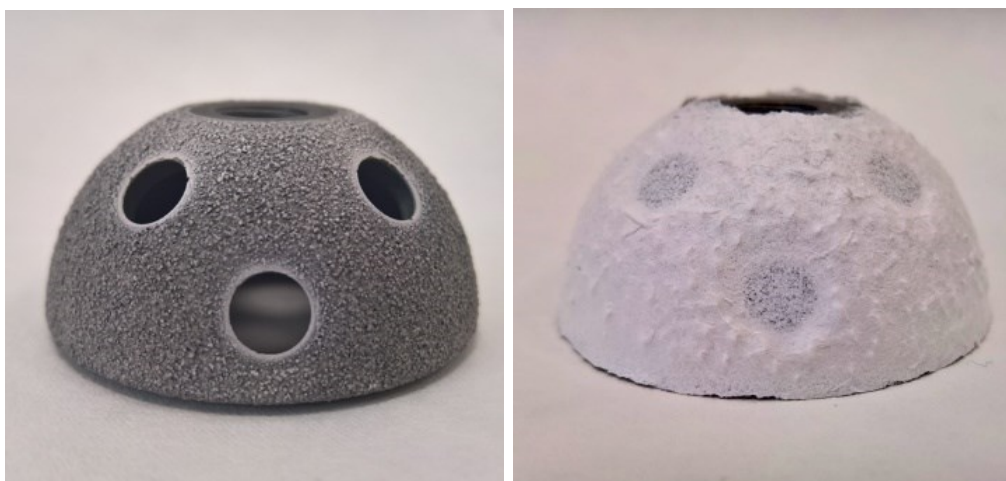
Materiálem volby pro konstrukci cementovaných endoprotéz je Vitalium, které má zejména v leštěné úpravě vynikající odolnost proti kolonizaci. Horší integrační možnosti materiálu nahrazuje fixace do kostního lůžka zprostředkovaná kostním cementem (polymetylmetakrylát). Výhodou užití kostního cementu je 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).

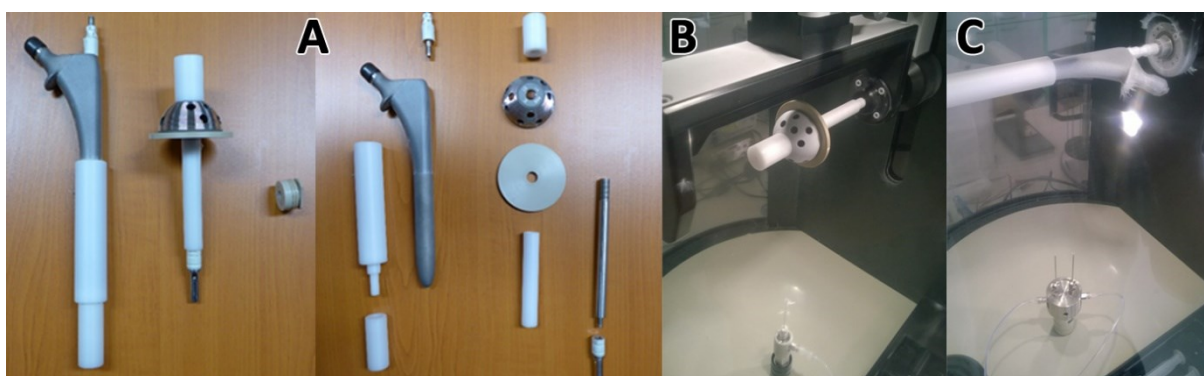
V současné době již existují různé druhy antimikrobiálních povrchů, založené na iontech nebo na nanočásticích kovů, které vedou ke zvýšení antibakteriální aktivity (Lemire et al. 2013). Otázkou zůstává jejich cytotoxicita (Mijnendonckx et al. 2013). Stále více se do popředí vědeckého zájmu dostávají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

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. 17), 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. 18).



Obr. 17. Detailní ukázka jamek před a po pokryvu a zesílení KOL/HA/ATB vrstvy (Suchý et al. 2017a).



Obr. 18 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 alopplastických 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

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- JAHODA, D., et al. Řešení infekce náhrady kolenního kloubu u pacientů s revmatoidní artritidou. *Čes Revmatol*, 2000, 8: 83-90.
- JIRANEK, William. Antibiotic-loaded cement in total hip replacement: current indications, efficacy, and complications. *Orthopedics*, 2005, 28.8: S873-S877.
- 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.
- 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.
- 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.
- MIJNENDONCKX, Kristel, et al. Antimicrobial silver: uses, toxicity and potential for resistance. *Biometals*, 2013, 26.4: 609-621.

- OGA, Masayoshi; ARIZONO, Takeshi; SUGIOKA, Yoichi. Bacterial adherence to bioinert and bioactive materials studied in vitro. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 1993, 64.3: 273-276.
- 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.
- RŮŽIČKA, F., et al. Biofilm detection and the clinical significance of *Staphylococcus epidermidis* isolates. *Folia microbiologica*, 2004, 49.5: 596.
- 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. 2017a. Funkční vzorek, USMH/2017/220/108.
- SUCHÝ, Tomáš, et al. Závěrečná odborná zpráva o postupu prací a dosažených výsledcích projektu TA04010330, 2018, 42 s.
- Zpráva OECD, Health at a Glance 2013, OECD INDICATORS.