Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Studijní program: Experimentální chirurgie

MDDr. Jitka Machoň Levorová

Preklinický výzkum vstřebatelnosti kovových osteosyntetických materiálů in vivo na zvířecích biomodelech

Preclinical research of degradation of metallic osteosynthetic alloys in vivo on animal biomodels

Disertační práce

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

Praha, 2022

Prohlášení:

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

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

V Praze, 2.2.2022

Podpis

Identifikační záznam:

MACHOŇ LEVOROVÁ, Jitka. Preklinický výzkum vstřebatelnosti kovových osteosyntetických materiálů in vivo na zvířecích biomodelech. [Preclinical research of degradation of metallic osteosynthetic alloys in vivo on animal biomodels]. Praha, 2022. 124 strany. Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Stomatologická klinika/ Maxilofaciální chirurgie 1. LF UK. Školitel prof. MUDr. et MUDr. Foltán René, Ph.D., FEBOMFS.

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli prof. MUDr. et MUDr. Renému Foltánovi, Ph.D., FEBOMFS za odborné vedení a otevřený mezilidský přístup v celém průběhu studia i při psaní disertační práce.

Děkuji také všem kolegyním a kolegům, kteří se na experimentu podíleli, za jejich ochotu a nezištnou pomoc, jmenovitě především prof. MUDr. Jaroslavě Duškové, CSc., FIAC, Ing. Radce Vrbové, MUDr. et MDDr. Martinu Bartošovi, Ph.D., MDDr. et Bc. Milanu Drahošovi, prof. Ing. Daliboru Vojtěchovi, Ph.D. a Ing. Jiřímu Kubáskovi, Ph.D.

Děkuji svým přátelům a milované rodině, Elišku nevyjímaje, za vytrvalé poskytování duševní opory, podporu a trpělivost.

Obsah

Seznam použitých zkratek
1 Úvod ... 12
1.1 Titan – historie a současnost použití v medicíně a maxilofaciální chirurgii ... 12
1.2 Biokompatibilita titanu, adsorpce proteinů na implantovaný materiál ... 13
1.3 Osteosyntéza a oseointegrace materiálu ... 14
1.4 Mechanické vlastnosti a požadavky na osteosyntetický materiál ... 15
1.5 Další kovové materiály používané v maxilofaciální chirurgii – korozivzdorná ocel 316SS, vitallium ... 16
1.6 Mechanické vlastnosti slitin titanu, korozivzdorné oceli 316SS a vitallia ... 17
1.7 Metalurgické vlastnosti slitin titanu, 316SS a vitallia ... 19
1.8 Biodegradovatelné materiály ... 20
1.9 Přírodní biodegradovatelné polymerní materiály ... 21
1.10 Syntetické polymerní biodegradovatelné sloučeniny, historie ... 21
1.11 Způsob degradace a degradační produkty polymerů PGA, PLA, biologické chování 23
1.12 Mechanické vlastnosti, rychlost degradace polymerů PGA, PLA a PLGA ... 24
1.13 Biodegradovatelné polymerní materiály jako nová éra v osteosyntéze, požadavky na materiál ... 25
1.14 Biodegradovatelné kovové slitiny ... 26
1.15 Biodegradovatelné slitiny na bázi železa ... 27
1.16 Biodegradovatelné slitiny na bázi magnesia ... 27
1.17 Biodegradovatelné slitiny na bázi zinku ... 28
1.18 Princip degradace kovových slitin v prostředí organismu, proces degradace magnesiových slitin ... 28
1.19 Mechanické vlastnosti biodegradovatelných slitin ... 30
1.20 Biologické chování korozních produktů degradovatelných magnesiových slitin ... 31
1.21 Charakteristika slitiny WE43 – složení, způsob degradace, vlastnosti ... 33
1.22 Charakteristika slitiny Zn-1,6Mg – složení, způsob degradace, vlastnosti ... 34
2 Cíle práce ... 36
3 Hypotézy ... 37
4 Materiál a metody práce ... 38
4.1 Soubor ... 38
4.2 Příprava kovových implantátů ... 40
4.3 Zavedení implantátů ... 43

4.4 Fixace vzorků, zpracování pro optické vyšetření 43
4.5 Histopatologické vyšetření 44
4.6 Zobrazovací metody 46
4.6.1 Cone Beam Computed Tomography (CBCT) 46
4.6.2 Microfocus computed tomograhy (mikro-CT) 47
4.6.3 Energetická disperzní spektrometrie, elektronová mikroskopie 49
4.7 Statistická analýza 49
4.7.1 Histologické parametry 49
4.7.2 Kontakt mezi povrchem implantátu a kosti – BIC 50
4.7.3 Objem a povrch implantátů 50
5 Výsledky 51
5.1 První fáze experimentu 51
5.1.1 Klinické vyšetření při odběru vzorku, CBCT 51
5.1.2 Histopatologické vyšetření 57
5.1.3 Nález u skupiny A (Zn-1,6Mg) 57
5.1.4 Nález u skupiny B (WE43) 59
5.1.5 Elektronová mikroskopie, energetická disperzní spektrometrie 59
5.2 Druhá fáze experimentu 64
5.2.1 Klinické vyšetření při odběru vzorku 64
5.2.2 Mikrotomografie 67
5.2.3 Změna povrchu a objemu 73
5.2.4 Elektronová mikroskopie a energetická disperzní spektrometrie 78
5.2.5 Histopatologické vyšetření 83
5.2.6 Nález u skupiny I (Ti) 83
5.2.7 Nález u skupiny II (WE43) 83
5.2.8 Statistické zhodnocení výsledků – histologické parametry 88
5.2.9 Statistické zhodnocení výsledků – kontakt mezi povrchem implantátu a kosti – BIC 89
5.2.10 Statistické zhodnocení výsledků – změna povrchu a objemu implantátů ze slitiny WE43 89
6 Diskuze 91
6.1 První fáze experimentu: Zn-1,6Mg a WE43 91
6.1.1 Rychlost degradace pelot a možné příčiny odchylky 91
6.2 Druhá fáze experimentu: WE43 a Ti 93
6.2.1 Změna objemu a povrchu vrutů 93
6.2.2 Bone-implant contact 95

6.2.3 Elektronová mikroskopie, energetická disperzní spektrometrie 95
6.2.4 Histopatologické vyšetření 96
6.3 Limity studie 102
7 Závěr 103
7.1 První fáze experimentu 103
7.2 Druhá fáze experimentu 103
7.3 Cíle práce 104
7.4 Hypotézy 105
7.5 Zhodnocení cílů a hypotéz 105
8 Souhrn 106
9 Summary 107
10 Seznam použité literatury 108

Seznam použitých zkratek

°C	stupeň Celsia
µA	mikroampér
µm	mikrometr
2D	dvoudimenzionální
3D	trojdimenzionální
316LSS	typ korozivzdorné oceli
316SS	typ korozivzdorné oceli
A	ampér
aj.	a jiné
AO/ASIF	Association for Osteosynthesis/Association for the Study of Internal Fixation
apod.	a podobně
AZ31	typ hořčíkové slitiny
AZ91	typ hořčíkové slitiny
BC	bone cavities, kostní kavity
bcl-2 protein	B-cell lymfoma 2 protein, název prookogenního proteinu
BIC	bone-interface contact (bone-implant contact), kontakt mezi povrchem implantátu, případně materiálu a kosti
BS	overall impression of bone structure, struktura kosti
CBCT	Cone-Beam Computed Tomography komputerová tomografie s kuželovým svazkem
cca	circa
cm	centimetr
Cr-Co slitina	chrom-kobaltová slitina
CT	komputerová tomografie

dif. dg.	diferenciální diagnóza, diferenciálně diagnosticky
D-izomer	pravotočivý izomer
e	Eulerovo číslo
EDS	energetická disperzní spektrometrie
ER	endosteal remodeling, endostální remodelace
exp	mocnina
Fe-10Mn	typ slitiny železa
Fe-10Mn-1Pd	typ slitiny železa
Fe-30Mn	typ slitiny železa
FOV	field of view, pole zájmu
g	gram
g/cm^3	gram na centimetr krychlový
g/kg	gram na kilogram
GC	giant cells, reakce z cizích těles
GPa	gigapascal
hm. %	hmotnostní procento
i.c.	intrakardiální, intrakardiálně
i.m.	intramuskulární, intramuskulárně
ISO	označení ISO normy z International Organization for Standardization, Mezinárodní organizace pro normalizaci
kV	kilovolt
kys.	kyselina
L-izomer	levotočivý izomer
LYM	lymfoplasmacellular reaction, lymfocytární reakce
mA	miliampér
MAO/PEO	micro-arch oxidation/plasma electrolytic oxidation
mbar	milibar
mg/kg	miligram na kilogram

mg/kg/den	miligram na kilogram za den
Mg-10Gd	typ hořčíkové slitiny
Mg-2Ag	typ hořčíkové slitiny
Mg-4Y-3RE	typ hořčíkové slitiny (viz WE43)
mikro-CT	Microfocus Computed Tomograhy, mikrotomografie
ml	mililitr
mm	milimetr
mm/min	milimetr za minutu
mm^{-1}	záporná první mocnina milimetru
mm^2	milimetr čtverečný
mm^3	milimetr krychlový
MMA	metylmetakrylát
MPa	megapascal
MPH	macrophages, makrofágy
MRI	magnetická rezonance
např.	například
nm	nanometr
NZW	New Zealand whey, typ laboratorního králíka
obr.	obraz
otáček/min	otáček za minutu
PA	periosteal aposition, apozice kosti
PDLA	pravotočivý stereoizomer kyseliny laktidové
PF	periimplant fibrosis, periimplantační fibróza
PGA	kyselina polyglykolidová
pH	potential of hydrogen, vodíkový potenciál
pI	izoelektrický bod
PIF	periimplant bone formation, tvorba kosti v okolí implantátu
PLA	kyselina polylaktidová
PLGA	kompolymer kyseliny glykolidové a kyseliny laktidové

PLLA	levotočivý stereoizomer kyseliny laktidové
PMMA	polymetylmetakrylát
PR	periosteal remodeling, periostální remodelace
resp.	respektive
RTG	rentgen, rentgenový
s.c.	subkutánní, subkutánně
SEM	elektronová mikroskopie
tbl.	tabulka
TGF-β	tumor growth factor beta
Ti-6Al-4V	slitina na bázi titanu, hliníku, vanadu
Ti-6Al-7Nb	slitina na bázi titanu, hliníku, niobu
tj.	to je
TNF-α	tumor necrosis factor alfa
tzn.	to znamená
tzv.	tak zvaný/á, tak zvaně
UV záření	ultrafialové záření
V	volt
WE43	typ hořčíkové slitiny (viz Mg-4Y-3RE)
Zn-1,6Mg	typ slitiny zinku
Zn-Ca	typ slitiny zinku
Zn-Li	typ slitiny zinku
Zn-Mg	typ slitiny zinku
Zn-Sr	typ slitiny zinku
σ	sigma, směrodatná odchylka

1 Úvod

1.1 Titan – historie a současnost použití v medicíně a maxilofaciální chirurgii

Titan se v Evropě pro biomedicínské účely používá od 40. let 20. století, přičemž v oboru maxilofaciální chirurgie se začal používat o zhruba 20 let později. Konkrétně první publikace o rekonstrukci skeletu v orofaciální oblasti titanovou dlahou je datována do roku 1967, kdy autoři Snell a Dott (1967) prezentují na 4. mezinárodním kongresu plastické a rekonstrukční chirurgie fixaci mandibuly titanovým platem určeným k fixaci zlomenin ruky. (Hanawa T., 2019, Pacifici L. et al., 2016, Snell J., Dott W., 1967 Weinzweig J., 2010) Už v roce 1940 byla publikována první studie srovnání biokompatibility titanu, korozivzdorné oceli a chrom-kobaltové slitiny. Studie zhodnocuje chování titanu ve vztahu ke kostní tkáni na zvířecím modelu s uspokojivým závěrem. (Bothe R.T. et al., 1940) Navazují pak další studie z 50. let. Ty zkoumají cytotoxicitu titanu a reakci kosti a měkkých tkání na přítomnost titanu, a to s dobrými výsledky ve prospěch titanu ve všech směrech. (Beder O.E. et al., 1957, Leventhal G. S., 1951) Běžné zavedení titanu do praxe humánní moderní medicíny se pak datuje do poloviny 60. let a trvá doposud. V celosvětovém měřítku bylo značně podpořeno předchozím založením Association for Osteosynthesis/Association for the Study of Internal Fixation, původně Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen, volně přeložena jako Společnost pro osteosyntéze/Společnost pro studium vnitřní fixace z Matter. P, 1998).

Titanové slitiny se pro účely medicíny začaly používat později. Slitina niklu a titanu od konce 50. let, konkrétně v ortopedii a jako materiál pro vaskulární stenty, později v ortodoncii (Buehler W.J. et. al, 1963, Wang F.E. et al., 1965) a od 70. let se datuje používání slitiny Ti-6Al-4V (neboli titan grade 5), do té doby používané v letectví. V polovině 80. let je pak ještě do praxe uvedena nově vytvořená slitina Ti-6Al-7Nb. Obě posledně jmenované slitiny jsou v současnosti spolu s titanem grade 4 (grading titanu je odstupňován na základě percentuálního zastoupení prvků jako dusík, uhlík, vodík, kyslík a železo přidaných k titanu, který tvoří 99 hmotnostních procent materiálu a je označován jako komerčně čistý titan) pro účely medicíny nejčastěji používanými titanovými materiály. (Ehrenfeld M. et al., 2012, Hanawa T., 2019, Klapková A., 2012, Pilliar R. M., Semlitsch M., Staub F. H. W., 1985, Šimůnek A. et al., 2001, Weatherly G. C., 1982, Williams D. F., 1982 a, b).

Mimo výroby chirurgického instrumentária nachází titan a jeho slitiny hlavní využití jako implantační materiál. Využívá se pro kloubní endoprotézy, osteosyntetický materiál pro vnitřní i vnější fixaci a implantovatelné zdravotnické prostředky (jako je např. pacemaker, vaskulární stenty nebo katetry). Velmi rozšířené je použití titanu a jeho slitin jako hlavního materiálu v dentální implantologii. V maxilofaciální chirurgii je použití identické. Hlavní využití titanové slitiny nachází právě jako osteosyntetický materiál pro vnitřní i vnější fixaci v traumatologii obličejového skeletu a jsou zlatým standardem v rekonstrukční chirurgii (titan je např. součást jamkové i hlavicové komponenty totální endoprotézy temporomandibulárního kloubu). Důvodem prioritního použití titanu a jeho slitin je jejich biokompatibilita a pro tyto účely vyhovující fyzikální vlastnosti. (Ehrenfeld M. et al., 2012, Mercuri L.G., 2015)

1.2 Biokompatibilita titanu, adsorpce proteinů na implantovaný materiál

V literatuře je někdy titan označován jako materiál, který nevyvolává reakci organismu. Je označován jako biokompatibilní. Biokompatibilita materiálu má ovšem zajistit jeho akceptování živými tkáněmi, úplné inertnosti cizorodého materiálu ale není možné z principu dosáhnout. (Pacifici L. et al., 2016, Šimůnek A. et al., 2001) Po implantaci cizorodého, tedy i biokompatibilního, materiálu vždy dochází k adsorpci proteinů na jeho povrch. Rychlost, míra i typ adsorbovaného proteinu závisí na několika faktorech. Těmi jsou primární struktura proteinu (tj. sekvence aminokyselin v řetězci), molekulová hmotnost proteinu (se vzrůstající molekulovou hmotností roste povrchová aktivita aminokyseliny díky většímu kontaktu s povrchem), polarita proteinu (nejvyšší reaktivity protein dosahuje, pokud se hodnota pH prostředí blíží hodnotě pI, tj. izoelektrickému bodu dané molekuly, kdy má molekula nulový náboj), stabilita proteinu (méně stabilní proteiny, které se rychleji rozkládají, mají větší povrchovou aktivitu díky expozici většího množství aminokyselin), koncentrace a velikost jeho molekuly. Který typ proteinu bude na povrch implantovaného materiálu adsorbovat jako první závisí i na vlastnostech materiálu. Ze strany materiálu mezi ovlivňující faktory patří obecně jeho geometrické, elektrické a chemické vlastnosti, především úprava jeho povrchu a s ní související porozita. K materiálu se proteiny dostávají prostou jednak difúzí, dále prouděním, jejich kombinací nebo aktivním transportem. Vazba proteinu k povrchu materiálu je podle typu proteinu buď kovalentní, iontová nebo hydrofobní. Vlastní adsorpce proteinů k povrchu pak probíhá na základě Vromanova efektu, tj. v závislosti na velikosti molekuly a jejich koncentraci: malé molekuly o vyšší koncentraci rychleji difundují prostředím, adsorbují se proto jako první bez toho, aby byly ovlivněny afinitou k povrchu. Vlivem periodické disociace

vazeb časem dochází k desorpci těchto primárně navázaných molekul. Změnou prostorové konformace proteinu se obnažují „původně skryté“ aminokyseliny, které nemohly být v kontaktu s povrchem a nyní dochází k jejich adsorpci na povrch materiálu. To znamená, že i přes to, že tyto aminokyseliny mohou mít vysokou afinitu k povrchu, navazují se teprve později. Takto se díky vysoké koncentraci v séru navazuje na povrchy primárně albumin a teprve s odstupem více afinní imunoglobulin G, fibrinogen a další, které zase díky vyšší afinitě už na povrchu zůstávají. Kompletní desorpce proteinů je velmi pomalá, pokud je vůbec možná. Příkladem takové situace je např. snížení pH, na podkladě kterého se mění náboj proteinu. Taková situace nastává v terénu zánětu nebo vlivem použití detergentů. Nicméně disociace vazeb i tak musí proběhnout u všech vazeb současně, v opačném případě je adsorpce ireverzibilní. A právě následnost dějů adsorpce a desorpce proteinů nebývá často zmiňována v souvislosti s biokompatibilitou materiálu. Jedná se nicméně o situaci, která negativně neovlivňuje snášenlivost materiálu organismem. I biokompatibilní materiál tak nevyhnutelně vyvolává jistou odpověď organismu, resp. komplex na sebe navazujících dějů, které nelze eliminovat. (Dee K.C. et al., 2002)

1.3 Osteosyntéza a oseointegrace materiálu

Stabilní osteosyntéza, tedy fixace fragmentů zlomeniny taková, kdy nedochází ke vzájemnému pohybu fragmentů, je nutná pro zhojení zlomeniny. Pokud není osteosyntéza stabilní, dochází ke vzájemnému pohybu fragmentů a narušuje se proces hojení. Důsledek je buď prodloužená doba hojení nebo ke zhojení vůbec nedojde. Takové situace s sebou nesou řadu klinických aspektů včetně bolesti, otoku a nefunkčnosti dané anatomické oblasti. Stabilní osteosyntéza v obličejovém skeletu i jinde může nastat pouze za podmínek, že je fixační materiál oseointegrován. Právě biokompatibilita materiálu, nikoli ale jeho úplná inertnost, je jednou z nutných podmínek pro dosažení stabilní osteosyntézy. (Ehrenfeld M. et al., 2012, Popkov A. V. et al., 2017)

Brånemark (1977) jako první v literatuře zavádí pojem oseointegrace a definuje ji jako vytvoření přímého kontaktu mezi kostí a povrchem implantátu bez mezivrstvy měkké tkáně (tou může být např. jizva, fibróza, chrupavka), která by byla pozorovatelná optickým mikroskopem. (Brånemark P.I. et al., 1977) Oseointegrace může proběhnout pouze pokud je implantovaný materiál právě plně biokompatibilní, takže je vůči tkáním netoxický, nemá karcinogenní, mutagenní a hemolytické účinky a nevyvolává imunitní reakce.

(Parithimarkalaignan S., Padmanabhan T.V., 2013, Šimůnek A. et al., 2001) I v procesu oseointegrace tvoří proteiny první mezivrstvu na povrchu materiálu. Nelze tedy hovořit o úplné inertnosti materiálu, přestože se materiál jako bioinertní označuje. (Dee K.C. et al., 2002) Četné studie in vitro i in vivo prokazují u titanu schopnost stimulovat adhezi a proliferaci osteoblastů a jejich aktivitu, tvorbu kalcium fosfátu a potencovat kalcifikaci tkáně. (Brunette D. M. et al., 2001, Shah F.A. et al., 2018, Shah F.A. et al., 2019, Rupp F. et al., 2018)

Aby osteosyntetický materiál byl ve správném časovém rámci po implantaci plně oseointegrován, je vhodné proces hojení kosti podpořit. Vhodnou vlastností materiálu je tak osteoindukce neboli schopnost materiálu iniciovat osteogenezi. (Šimůnek A. et al., 2001) Chování titanu je určeno jeho vlastnostmi, schopnost osteoindukce lze u titanu ovlivnit úpravou povrchu. Na vzduchu se titan pasivuje vrstvou oxidu titaničitého (TiO_2) řádově o síle nanometrů. Tato vrstva zabraňuje korozi povrchu, zajišťuje odolnost vůči vodnému prostředí organismu i odolnost materiálu v prostředí o rozsahu fyziologických hodnot pH. (Šimůnek A. et al., 2001, Weinzweig J., 2010) Záměrná úprava povrchu titanu pak zahrnuje především mechanickou úpravu (konkrétně ovlivnění porozity a drsnosti, které zvětšují povrch a umožňují adhezi většího množství osteoblastů) nebo povlakování (např. stronciem, hydroxyapatitem a jinými látkami s osteoindukčními, osteokondukčními (tj. schopnými vést oseogenezi určitým směre) nebo jinými bioaktivními vlastnostmi). Tyto úpravy jsou prováděny na povrchu titanu a jeho slitin ve všech odvětvích medicíny, kde jsou titan a jeho slitiny používány. (Hanawa T., 2019, Shah F.A. et al., 2019, Šimůnek A. et al., 2001)

1.4 Mechanické vlastnosti a požadavky na osteosyntetický materiál

Zásadní požadavky jsou kladeny i na mechanické vlastnosti materiálu. Osteosyntetický materiál musí z hlediska mechanických vlastností převyšovat hodnoty určitých fyzikálních veličin okolní kosti. Konkrétně jde o mez pevnosti v tahu, tj. maximální napětí, při kterém materiál zůstává celistvý a po jehož překročení dojde k přetržení materiálu. Vyjadřuje se v GPa nebo MPa. Dále je to Youngův modul neboli modul pružnosti v tahu. Jedná se o poměr napětí a relativního prodloužení materiálu, tedy hodnotu napětí, která ještě vyvolává pružnou deformaci materiálu. Vyjadřuje se ve stejných jednotkách jako mez pevnosti v tahu. (www.spszengrova.cz - a, www.spszengrova.cz - b) Na stranu druhou, pokud vznikne situace, kdy je rozdíl v hodnotách těchto veličin (obzvláště modulu pružnosti) mezi kostí a materiálem příliš velký, dochází k poruše oseointegrace implantovaného materiálu. Nově vytvářená kost je příliš

porézní, dochází k resorpci okolní stávající kosti a osteosyntetický materiál se uvolňuje z místa, kam byl implantován. (Hanawa T., 2019, Klapková A., 2012, Pacifici L. et al., 2016, Shi L. et al., 2013)

Podmínkou pro to, aby se zlomenina mohla hojit primárně, je imobilizace fragmentů kosti buď kompletní nebo maximálně taková, kdy relativní prodloužení mezi fragmenty nedosahuje 2 %. Pokud je relativní prodloužení vyšší, mezi fragmenty vzniká granulační a fibrózní tkáně a nastává sekundární hojení. Vytvořená vazivová tkáň může následně osifikovat nebo mezi fragmenty perzistuje. (Ehrenfeld M. et al., 2012) Pokud jsou modul pevnosti v tahu (Youngův modul) i mez pevnosti v tahu osteosyntetického materiálu odlišné od parametrů okolní kosti, resp. jsou vyšší, než jaké má okolní kost, je zajištěna odolnost kosti proti zátěži nebo stresu (volně přeloženo z anglického originálu „stress shielding“ ze Shi L. et al., 2013). Současně je zajištěn i homogenní přenos tlaku a tahu mezi kostí a materiálem a je tak zabráněno právě resorpci kosti a selhání osteosyntézy z důvodu uvolnění fixace. Load bearing osteosyntéza spojuje kostní fragmenty zcela stabilně a bez možnosti jejich vzájemného pohybu. Veškeré síly aplikované na kost jsou u tohoto typu osteosyntézy neseny pouze osteosyntetickým materiálem, nikoli kostními fragmenty (resp. zanedbatelné množství sil se přenáší z povrchu šroubu na kost v místě, kde je šroub zaveden). Osteosyntéza tak plní v podstatě funkci zevního fixátoru. Load sharing typ osteosyntézy přemosťuje kostní fragmenty tak, že síly aplikované na kost se rozkládají mezi osteosyntetický materiál a kost (kortikální kost fragmentů je v kontaktu a zároveň dochází k mikropohybům mezi fragmenty). Nezávisle na tom, zda je používána osteosyntéza typu load sharing nebo load bearing, dochází při nižších hodnotách Youngova modulu implantátu, než jaký má kost ke kostní resorpci a následně selhání osteosyntézy. (Ehrenfeld M. et al., 2012, Shi L. et al., 2013, www. surgeryreference.aofoundation.org)

1.5 Další kovové materiály používané v maxilofaciální chirurgii – korozivzdorná ocel 316SS, vitallium

Titan svým uvedením do praxe významnou měrou nahradil do té doby nejvíce používanou korozivzdornou ocel. Korozivzdorná ocel se v humánní medicíně používá od začátku 20. století, a to především pro ortopedické účely. V maxilofaciální chirurgii byla používána k výrobě instrumentaria, drátů (pro osteosuturu, dlahovací materiál aj.) a osteosyntetického materiálu. Konkrétně se jedná o slitiny dle ISO normy označované jako 316SS nebo 316LSS, které se vzájemně liší obsahem uhlíku. Dále je v této práci použita jen zkratka 316SS. Cílem

nahrazení korozivzdorné oceli bylo zavedení materiálu, který odstraňuje její nevýhody. Hlavní nevýhodou korozivzdorné oceli z pohledu implatovatelného materiálu jsou feromagnetické vlastnosti. Titan ani jeho slitiny feromagnetické nejsou, hlavní výhodou v tomto směru tedy je, že umožňují vyšetření pacienta magnetickou rezonancí bez toho, aby bylo nutné je před vyšetřením MRI odstraňovat. I artefakty při vyšetření RTG technikami jsou u titanu menší než u 316SS. Dalším požadavkem na používaný materiál jsou i požadavky na biokompatibilitu, který titan i jeho slitiny splňují. (Ehrenfeld M. et al., 2012)

V maxilofaciální chirurgii vytěsnil ocel nejen titan, ale i chrom-kobaltové (Cr-Co) slitiny. Stejně jako i v jiných oblastech medicíny, i zde nejvíce používanou Cr-Co slitinou bylo vitallium. (www.azom.com – a, www.azom.com - b) Vitallium se v biomedicíně používá od 30. let, hlavně v ortopedii. Největší rozmach od počátku svého uvedení do praxe zaznamenává ovšem jako stomatologický materiál. Vitallium je biokompatibilní materiál. Jeho nevýhodou je, že při zobrazení rentgenovými technikami způsobuje v obraze artefakty. Ty jsou vyvolány intra– i extracelulární akumulací iontů kovů, které se z něj ve tkáni přirozeně uvolňují. Právě uvolněné ionty také mohou být příčinou akutní či chronické zánětlivé lokální či systémové odpovědi organismu. Typicky taková situace nastává navíc v případě tření implantovaného materiálu o jiný stejně tvrdý či tvrdší materiál během žádoucího pohybu při funkci dané anatomické oblasti. Příkladem takové situace může být např. funkce celokovové kloubní endoprotézy, kdy je z kovu hlavice i jamka a během pohybu v kloubu dochází ke vzájemnému tření kovových ploch o sebe. Tření kovu o kov je příčinou vzniku materiálové debris. Vznikající allogenní partikule ve tkáni jsou příliš rozměrné na to, aby byly eliminovány tkáňovými makrofágy. Důsledkem toho je rozvoj reakce z cizích těles s lokálním klinickým dopadem. (Akbar M. et al., 2012, Bergsma J. E. et al, 1995, Mercuri L. G., 2015, Pacifici L. et al., 2016, Xue A. et al., 2014)

1.6 Mechanické vlastnosti slitin titanu, korozivzdorné oceli 316SS a vitallia

Korozivzdorná ocel 316SS má vyhovující mechanické vlastnosti vzhledem k použití jako nosného nebo fixačního materiálu v obličejovém skeletu. Při jejím nahrazení titanem a jeho slitinami nebo jinými materiály v praxi hraje zachování dostatečných mechanických vlastností jednu z hlavních rolí. Důležitými sledovanými parametry jsou modul pružnosti v tahu, který u korozivzdorné oceli 316SS dosahuje až 210 GPa. To jsou podobně vysoké hodnoty jako mají chrom-kobaltové slitiny (cca 218 GPa). Hodnoty modulu pružnosti pro titan a jeho slitiny jsou

zhruba poloviční ve srovnání s ocelí 316SS (tj. 103–105 GPa), nicméně jsou stále vyšší, než má kortikální kost (10-30 GPa). To znamená, že jsou dostačující potřebám osteosyntézy. (Ehrenfeld M. et al., 2012, Niinomi M., Nakai M., 2011) Tabulka 1 shrnuje složení a mechanické vlastnosti nejčastěji používaných kovových materiálů v maxilofaciální chirurgii.

kov	Složení	modul pružnosti v tahu	elongace	vlastnosti
Vitallium (Cr-Co)	60-65 % Co 30 % Cr 5 % Mo v destinách % Fe, Mn, C, Si	218 GPa	4,5 %	dobře odolné proti opotřebení, snadná manipulace, křehčí a méně pevné než 316SS
Ti-6Al-4V	> 90 % Ti 6 % Al 4 % V desetiny až setiny % O, C, H, N, Fe	105 GPa	14 %	pružný, odolný proti opotřebení i korozi, snadná manipulace
316SS	62,5 % Fe 18 % Cr 14 % Ni 2,5 % Mo, v desetinách hmotnostních % C, Mn, Si, P, S	210 GPa	40 %	feromagnetické vlastnosti, křehčí než Ti-6Al-4V, tvrdá, pevná

Tbl. 1 Základní kovové materiály používané v maxilofaciální chirurgii pro fixaci skeletu. Složení materiálu je uvedeno v hmotnostních procentech. Hodnoty uvedených veličin jsou průměrné. Čerpáno z Antunes L.H.M., de Lima C.R.P., 2018, Ehrenfeld M. et al., 2012, Hanawa T., 2019, Klapková A., 2012, Niinomi M., Nakai M., 2011, Pacifici L. et al., 2016, Shi L. et al., 2013, Sumita M. et al., 2003, Davis J.R., 2003; www.azom.com - a, www.azom.com – b, www.azom.com – c, www.matweb.com – a

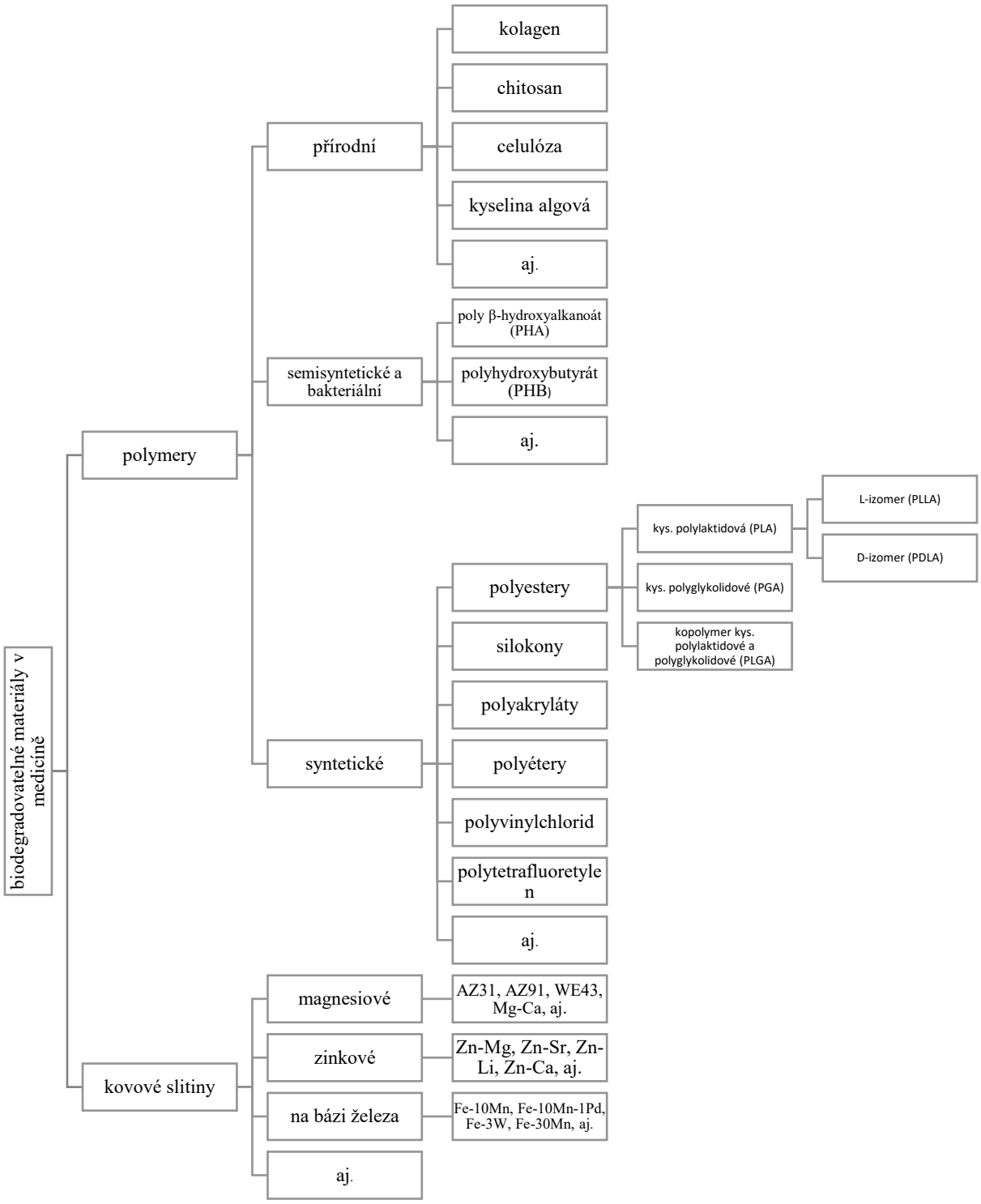
1.7 Metalurgické vlastnosti slitin titanu, 316SS a vitallia

Vlastnosti slitin titanu jsou ovlivněny přísadou legujících prvků. Legující prvky ovlivňují teplotu fázové přeměny, mikrostrukturu (alfa, beta, alfa-beta), tvrdost a křehkost. Nejčastěji používaná slitina Ti-6Al-4V je alfa-beta dvoufázová. Komerčně čistý titan obsahuje řádově setiny až desetiny procent nečistot (těmi jsou uhlík, kyslík, vodík, dusík a železo). Ty ovlivňují hlavně tvářitelnost kovu, čistota se podle typu titanu pohybuje v rozmezí 99,1-99,8 %. V majoritním zastoupení v korozivzdorné oceli 316SS je železo (62,5 hmotnostních %), legujícími prvky oceli jsou chrom (18 hm. %), nikl (14 hm. %) a molybden (2,5 hm. %), v minoritním zastoupení řádově v desetinách hmotnostních procent to jsou uhlík, mangan, křemík, fosfor a síra. (Košťál J., 2015, Pacifici L. et al, 2016, www.azom.com – b, www.azom.com - c) Výhodou titanu a jeho slitin oproti 316SS při zpracování je jeho vyšší kujnost a lepší svařitelnost, v klinické praxi je to vyšší pružnost. (Ehrenfeld M. et al., 2012, Niinomi M., Nakai M., 2011)

Další z fyzikálních vlastností, které musí implantovaný materiál splňovat, je nízká hmotnost. Ta je u titanu a jeho slitin zajištěna jejich nízkou hustotou (hustota titanu je 4,51g/cm^3, hustota slitiny Ti-6Al-7Nb je 4,52g/cm^3), která je ve srovnání s korozivzdornou ocelí zhruba 50-57 % (316SS 8 g/cm^3, podobně jako má vitallium 8,2-9,8g/ cm^3). (Klapková A., 2012, Ehrenfeld M. et al., 2012, www.azom.com - c, Thandapani G. et al., 2018, Adzali N. M. S. et al., 2013) Nízká hustota, resp. hmotnost dlahy, znamená lepší manipulovatelnost s dlahou pro operatéra i vyšší komfort pro pacienta. (Levorova J. et al., 2017)

Vitallium obsahuje 60-65 hmotnostních % kobaltu, kolem 30 hm. % chromu, 5 hm. % molybdenu, minoritně jsou zastoupeny železo, mangan, uhlík a křemík, maximálně do 1 % nikl. Vitallium je materiál odolný proti korozi ve vodném roztoku chloridů (tj. i ve vnitřním prostředí organismu), je dobře odolný proti opotřebení, oproti korozivzdorné oceli se s ním lépe manipuluje. Ve srovnání s 316SS má horší mechanické vlastnosti, je křehčí a méně pevné. (Antunes L.H.M., de Lima C.R.P., 2018, Sumita M. et al., 2003, Davis J.R., 2003)

1.8 Biodegradovatelné materiály



Obr.1 Schématické znázornění biodegradovatelných materiálů používaných v humánní medicíně. Pro účely osteosyntézy jsou určeny syntetické polymery (konkrétně PLA, PGA a jejich kopolymer PLGA) a kovové slitiny. V současné době se polymerní sloučeniny pro množství nežádoucích účinků nepoužívají, nejvíce prozkoumané pro

účely osteosyntézy a zároveň již v praxi používané jsou magnésiové slitiny. Vytvořeno podle Yang H. et al., 2020, Zheng Y., 2016

Biodegradovatelné materiály používané pro biomedicínské účely lze obecně rozdělit na materiály polymerní a slitiny kovů. Kovové slitiny lze obecně rozdělit v závislosti na majoritním zastoupení konkrétního prvku, polymerní materiály pak podle způsobu vzniku na přírodní, syntetické a semisyntetické. Přehled biodegradovatelných materiálů používaných pro biomedicínské účely je uveden na obr. 1.

1.9 Přírodní biodegradovatelné polymerní materiály

Přírodní biodegradovatelné polymerní materiály nachází v medicíně široké uplatnění, stejně tak i semisyntetické polymery a polymery vytvořené kulturami mikroorganismů, typicky bakteriemi. Zástupci přírodních polymerů jsou např. alginát, chitosan, kolagen nebo celulóza, z druhé skupiny je to pak polyhydroxybutyrát nebo poly β-hydroxyalkenoát. Hlavní využití tyto materiály nachází jako nosiče léků nebo jako podpůrné materiály pro hojení ran (hojně se využívá např. kolagen ve stomatologii jako bariérová membrána pro řízenou tkáňovou regeneraci). Pro účely osteosyntézy ovšem tyto materiály nedosahují dostatečných mechanických vlastností. (Prakasam M. et al., 2017, Vroman I., Tighzert L., 2009)

1.10 Syntetické polymerní biodegradovatelné sloučeniny, historie

Tabulka 2 uvádí přehled syntetických polymerních biodegradovatelných materiálů a kovových biodegradovatelných materiálů (ty jsou popsány samostatně dále v textu) včetně jejich základních biologických vlastností a způsobu degradace.

typ materiálu	mez pevnosti v tahu (průměrné hodnoty)	elongace	biologické chování	princip degradace
syntetické polymery				
PGA	890 MPa	30 %	rychlá degradace, vysoce hydrofilní	hydrolýza esterových vazeb
PLA	27,8 MPa	30 %	větší odolnost vůči hydrolýze	

PLGA	v závislosti na poměru PLA/PGA		při zvýšení poměru PLA/PGA se zpomaluje degradace	
kovy				
WE43	224–410 MPa	2-25 %	rychlá degradace, tvorba vodíku: 1 mol H_2 ~ 1 mol Mg	elektrochemická koroze
Zn-1,6Mg	250 MPa	4-12 %	pomalejší degradace, minimalizuje tvorbu vodíku	

Tbl. 2 Biodegradovatelné materiály určené k použití v osteosyntéze. Tabulka uvádí průměrné hodnoty. Vytvořeno podle 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., Tighzert L., 2009, www.-azom.com – d, www.matweb.com – b, www.matweb.com - c, Zheng Y., 2016

Syntetické polymerní biodegradovatelné materiály jsou v medicíně používány od 60. let 20. století, v maxilofaciální chirurgii od 80. let, a to jako šicí materiál. V průběhu doby se portfolio biodegradovatelných polymerů výrazně rozšířilo, v současné době využití nacházejí nejen jako šicí materiál, ale i jako nosiče léků, vaskulární stenty a svorky, filtrační systém sraženiny v krevním řečišti při léčbě tromboembolické choroby. Způsob degradace těchto materiálů je různý, liší se podle typu materiálu i podle cíle využití. Nejjednodušším způsobem je degradace na principu hydrolýzy a enzymatické degradace (lze je označit také jako „samo-resorbovatelné“ materiály). Jejich degradaci není třeba iniciovat arteficielně, protože je závislá na fyziologických pochodech organismu. Jindy je degradace řízena, např. zevně ultrazvukem, magnetickým nebo elektrickým polem, iniciována světelně, mechanickým namáháním anebo změnou pH nebo teploty vnitřního prostředí. (Keane T. J., Badylak S.F., 2014, Maitz M.F., 2015, Middleton J.C., Tipton A. J., 2000, Suuronen R. et al., 2004) Jako biodegradovatelné syntetické materiály jsou používány silikony, polyakryláty, polytetrafluoretylen, polyvinylchlorid, polyétery. Pro šicí, a právě pro osteosyntetické materiály to jsou pak nejvíce používané polyestery: kyselina polyglykolidová (PGA) a kyselina polylaktidová (PLA). U kyseliny polylaktidové se používají oba optické enantiomery, levotočivý i pravotočivý, tj. izomery poly L—laktid (PLLA) a poly D-laktid (PDLA). (Maitz M.F., 2015) PGA i PLA jsou

připravovány kopolymerací s ε-caprolactonem nebo 1,3 – propylenkarbonátem. Důvodem přidání těchto kopolymerů je navýšení pružnosti materiálů i rychlosti jejich degradace. (Pappalardo D. et al., 2019, Bezwada R. S. et al., 1995, Woodruff M. A., Hutmacher D. W., 2010) Největší slávy se tyto materiály v maxilofaciální chirurgii dočkaly celosvětově v 80. a 90. letech, kdy byly převratným krokem v osteosyntéze. (Suuronen R. et al., 2004, Zheng Y., 2016)

1.11 Způsob degradace a degradační produkty polymerů PGA, PLA, biologické chování

Princip degradace kyseliny polyglykolidové i obou izomerů kyseliny polylaktidové spočívá v hydrolytické degradaci esterových vazeb, vznikající degradační produkty pak ještě katalyzují následný rozklad vlastního materiálu. Konečným degradačním produktem PGA je kyselina glykolová, případně její oxidovaná forma, kyselina oxalová a glyoxalát, které jsou vylučovány ledvinami, kyselina glykolová se po vstupu do Krebsova cyklu přeměňuje na glycin a ve formě oxidu uhličitého je vyloučena plícemi. Degradačním produktem PLLA je laktát, který je fyziologickým metabolitem tělesných tkání. Ve formě kyseliny uhličité, resp. CO_2 je pak vylučován plícemi. Stejný proces podstupuje PDLA, přičemž je pravotočivý izomer nejprve konvertován na L-izomer v ledvinách. Ke kumulaci degradačních produktů tedy nedochází. Letální dávka kyseliny glykolové pro člověka je 1,6g/kg tělesné hmotnosti, při dávkách vyšších 500mg/kg/den vykazuje známky systémové toxicity a způsobuje vývojové poruchy. V použitém množství pro potřeby osteosyntézy lze považovat tyto materiály za bezpečné včetně otázky případné acidózy. (Klaassen C.D., 1996, Maitz M.F., 2015, Nair L. S., Laurencin C.T., 2007)

Výhodou těchto polymerních materiálů (PLA a PGA) by podle Hofmanna (1992) a Maitze (2015) měla být biokompatibilita jak jejich monomerů, tak i konečných degradačních produktů. (Maitz M.F., 2015, Hofmann G.O., 1992) Jiní autoři ale naopak zaznamenávají nespecifickou reakci z cizích těles právě na přítomnost PGA a PLLA, popisují nálezy fragmentů těchto materiálů v cytoplasmě buněk různých tkání v okolí místa implantace. Degradační produkty (laktát, kyselina glykolová) snižují pH tkání, pravděpodobně vlivem toho dochází ke vzniku buněčného exsudátu a jeho extracelulární akumulaci. Této situaci nahrává i snadné vyčerpání pufrovací kapacity krve, které navazuje na lokální poruchu vaskularizace způsobenou samotným traumatem tkání. Klinicky se situace manifestuje otokem měkkých tkání v okolí

implantátu, dermatitidou i ektopickou kostní tvorbou. Následuje nutnost explantace dlahy a s ní spojená peri – a postoperační zátěž pacienta. (Böstman O. et al., 1990) Další studie uvádí toxické působení polymerních degradovatelných sloučenin na osteoblasty, makrofágy a fibroblasty (Kolk A. et al., 2015) Pravděpodobně s tím je pak spojen i další vedlejší účinek, kterým je kavitace kosti s vyšší frekvencí výskytu u dospělého skeletu než u rostoucího dětského. Ani úpravou krystalinity materiálu kopolymerací s dalším typem laktidu, která by měla vést ke zmenšení krystalů a tím zabránit vzniku reakce z cizích těles, nebylo experimentálně dosaženo signifikantně lepších výsledků (zvýšila se pouze rychlost degradace). Nejlepších výsledků v tomto ohledu dosahuje použití kombinace PGA a PLA s amorfní strukturou. (Agrawal, C. M., Athanasiou, K. A. 1997, An Y.H. et al., 2000, Athanasiou K.A. et al., 1996, Bergsma E. J. et al., 1993, Bergsma J. E. et al., 1995, Hedelin H. et al., 2020, Kofron M.D. et al., 2009)

Jiní autoři uvádí dokonce jako jednu z nevýhod syntetických degradovatelných polymerů potenciální nemožnost jejich kompletní eliminace z organismu. Uvádí, že ve tkáni se mohou hromadit buď produkty degradace, častěji pak aditiva, např. změkčovadla. Ty by neměly být toxické ve smyslu buněčné smrti, mohou ale iritovat tkáně a vyvolávat rozvoj imunitních reakcí včetně reakcí z cizích těles. (Jenke D., 2007, Keane T. J., Badylak S.F., 2014, Maitz M.F., 2015)

1.12 Mechanické vlastnosti, rychlost degradace polymerů PGA, PLA a PLGA

Stejně jako jiný materiál musí i tyto splňovat požadavky na mechanickou pevnost a stabilitu, a to minimálně po dobu hojení zlomeniny, tj. 6-8 týdnů, případně déle a současně doba, za kterou se dojde k jejich kompletní degradaci by neměla být příliš dlouhá. Mechanické vlastnosti PLLA jsou lepší než vlastnosti PGA (mez pružnosti v tahu u PLLA se pohybuje kolem 66MPa, modul pružnosti v tahu kolem 4GPa, elongace je 4 %) a horší ve srovnání s titanem, Cr-Co slitinou i 316LSS. Jsou dostačující pro fixaci ve střední obličejové etáži, pro oblasti s větším zatížením dostačující být nemusí. (Levorova J. et al., 2018, Shady F. et al., 2016)

Osteosyntetické dlahy z PGA a PLA se vstřebávají řádově po dobu měsíců, přičemž dostatečnou pevnost zachovávají 1-2 měsíce. Doba rozpadu PLLA (častěji užívaná než PDLA) je delší než doba rozpadu PGA (PLLA více než 24 měsíce, PGA 6-12 měsíců). To ovlivňuje i degradaci kopolymeru PLGA v závislosti na poměru obou složek (při poměru 1:1 dochází ke kompletní degradaci během i 1-2 měsíců, při zvýšení poměru ve prospěch PLLA na 0,85 se doba degradace prodlužuje až na 5-6 měsíců). Rychlost degradace je ovlivněna vlastním typem

materiálu, strukturou (krystalinitou), porozitou nebo molekulární hmotností a dalšími chemickými vlastnostmi. (Brannigan R. P., Dove A. P., 2017, Gombotz W.R., Pettit D.K., 1995, Maitz M.F., 2015, Makadia H.K., Siegel S.J., 2011, Miller R. A. et al., 1977, Pappalardo D. et al., 2019, Zheng Y., 2016)

Norholt (2004) publikuje retrospektivně získaná data z fixace ostetomií v linii Le Fort I materiálem, který je kombinací PLLA/PGA. Prokazuje statisticky signifikantní posun fragmentů maxily fixovaných tímto materiálem během prvních 6 týdnů po implantaci, během dalšího sledování do 12 měsíců po implantaci už nikoli. Ukazuje tedy na nedostatečnou stabilitu materiálu. Nicméně materiál nevykazoval negativní biologické účinky na okolní tkáně. (Norholt S.E. et al., 2004)

1.13 Biodegradovatelné polymerní materiály jako nová éra v osteosyntéze, požadavky na materiál

Cílem nahrazení standardních kovových osteosyntetických materiálů plně degradovatelnými je odstranění nevýhod těchto konvenčních kovových materiálů. Současně praktické užití vyžaduje zachování dostatečné pevnosti dlahy po dobu hojení zlomeniny, a i splnění ostatních nároků, které jsou na dlahy kladeny. Těmi jsou biokompatibilita, absence cytotoxicity, kancerogenity, mutagenních vlastností, absene imunitních reakcí organismu včetně nároků na cenu, dobrou manipulovatelnost během operačního výkonu a sterilizovatelnost. Případná nutnost odstranění konvenčního materiálu nastává např. u dětského pacienta, kdy dlaha působí potenciální omezení růstu skeletu, a tím vznik deformit. (Cembranos J.L.L., 2004, Mühlbauer W. et al., 1987) Tento důvod je diskutabilní, nepřímo jej rozporuje např. Mercuri (2015) publikací o implantaci totální allogenní endoprotézy temporomandibulárního kloubu u dětského pacienta, kdy je růst čelisti vlivem funkční zátěže zachován). (Mercuri L.G., 2015) U rostoucího skeletu je významnější obtíží přerůstání dlahy kostní tkání a značné ztížení jejího vyjmutí z jiného důvodu v pozdější době. Dalšími důvody k vyjmutí dlahy jsou termosenzitivita (tepelná, ale především chladová), hmatatelnost dlahy pod kůží, pocit tíhy, artefakty při vyšetření zobrazovacími metodami, případně úplná nemožnost vyšetření (v případě feromagnetických vlastností dlahy z korozivzdorné oceli je nemožné vyšetření magnetickou rezonancí), nebo i selhání osteosyntézy a uvolnění dlahy. (Ehrenfeld M. et al., 2012, Kanno T. et al., 2018, Levorova J. et al., 2017, Suuronen R. et al., 2004)

Bazálním požadavkem na implantovatelný materiál je také jeho sterilizovatelnost. Některé materiály mohou podléhat degradaci nebo měnit vlastnosti při expozici vysokým teplotám při parní nebo horkovzdušné sterilizaci. Proto musí být odolné alespoň vůči etylenoxidu nebo ionizujícímu záření. (Maitz M.F., 2015)

1.14 Biodegradovatelné kovové slitiny

Pro množství nežádoucích biologických efektů bylo v praxi postupně od použití syntetických biopolymerů upuštěno. (Suuronen R. et al., 2004) Dalším krokem v hledání materiálu, který vyhovuje svými mechanickými a fyzikálními vlastnostmi tak, že odpovídají požadavkům kortikální kosti nebo se blíží některému ze standardních kovových materiálů v kombinaci s vyhovujícím biologickým chováním a plnou degradabilitou v prostředí chloridových iontů (to znamená ve vnitřním prostředí organismu) je vývoj biodegradovatelných kovových slitin. Předpokladem chování kovových slitin je jejich postupná koroze od povrchu, kdy tvořící se korozní produkty nevyvolávají nežádoucí reakce okolních tkání, a naopak mohou i podpořit jejich hojení. Cílem je, stejně jako u biopolymerů, kompletní degradace materiálu bez rezidua. Zásadním problémem u degradovatelných kovů, resp. jejich slitin, je jejich případná toxicita a ukládání prvků ve tkáních. Největší pozornost byla v tomto směru proto věnována vývoji slitin magnesia, železa a zinku. Všechny zmiňované prvky jsou mikronutrienty, primárně jsou proto v malých dávkách považovány za netoxické. V tabulce 3 jsou uvedeny základní mechanické vlastnosti, míra biokompatibility a hlavní nevýhody slitin na bázi magnesia, železa a zinku.

majoritní prvek ve slitině	biokompatibilita	mechanické vlastnosti	nevýhody	rychlost koroze	zástupci skupiny
Mg	+++	vyhovující pevnost v tahu i Youngův modul, vyšší křehkost	tvorba vodíku, vyšší únava materiálu	středně rychlá	WE43, AZ31, AZ91, Mg-Ca
Fe	+	dobrá pevnost v tahu, příliš vysoký Youngův modul	hromadění reziduí ve tkáních, kolaterální	pomalá	Fe-10Mn, Fe-10Mn-1Pd, Fe-3W, Fe-30Mn

			zánětlivá reakce		
Zn	++	nejvyšší mez pevnosti v tahu	nejméně studií	rychlá a středně rychlá	Zn-Mg, Zn-Sr, Zn-Li, Zn-Ca

Tbl. 3 Základní přehled biologických a mechanických vlastností biodegradovatelných slitin používaných v humánní medicíně. Tabulka uvádí hlavní nevýhody skupin materiálů a příklady konkrétních slitin. Míra biokompatibility je označena + (vyhovující, ve srovnání s dalšími slitinami nejméně), ++ (vyhovující, ve srovnání s dalšími slitinami středně), +++ (vyhovující, ve srovnání s dalšími slitinami nejvíce). Vytvořeno podle Dee K.C. et al., 2002, Dobatkin S. et al., 2019, Kubasek J. et al., 2016, Kubasek J. et al., 2019, Levorova J. et al., 2017, Li H.F. et al., 2015, Ott N. et al., 2013, Windhagen H. et al.,2013, Winzer N. et al., 2005, Yan J. et al., 2013, Zhang S.X. et al., 2010, Zheng Y., 2016, Zhou X. et al, 2014

1.15 Biodegradovatelné slitiny na bázi železa

Degradovatelné materiály na bázi železa vykazují dobrou biokompatibilitu, z mechanických vlastností vynikají pevností. Pro svůj, ve srovnání s kostní tkání, až příliš vysoký Youngův modul jsou vhodnější spíše pro méně zatěžované oblasti, např. jsou používány jako vaskulární stenty. Degradace železa i jeho slitin je pro použití v kostní tkáni navíc příliš pomalá (resp. žádoucí pevnost po dobu hojení zlomeniny je dostatečná, nevýhodná je dlouhá přítomnost ve tkáni např. z pohledu zobrazovacích vyšetření). Rychlost jejich koroze lze ovlivnit přidáním manganu, palladia, wolframu, cínu, boru, uhlíku, síry nebo křemíku. Rizikem použití těchto slitin je ale toxicita pro endoteliální buňky. Ve studiích in vivo (na zvířecích biomodelech králíků, myší a prasat) bylo jako nežádoucí nález prokázáno hromadění reziduí železa v buňkách s následným rozvojem kolaterální zánětlivé reakce, další vedlejší efekty jako cévní trombóza nebo nekróza tkáně prokázány nebyly. Mezi biodegradovatelné slitiny železa patří např. Fe-10Mn, Fe-10Mn-1Pd, Fe-3W, Fe-30Mn. (Kubasek J. et al., 2019, Zheng Y., 2016)

1.16 Biodegradovatelné slitiny na bázi magnesia

Nejvíce dosud prozkoumanými jsou magnéziové slitiny. Bylo publikováno množství studií jejich mechanických vlastností i biologického chování in vitro i in vivo. V humánní medicíně

byly použity jako vaskulární stenty nebo pro fixaci haluxu. Magnesiových slitin existuje široká řada. Vlastnosti jednotlivých se stejně jako u jiných slitin liší v závislosti na použitých legujících prvcích a jejich množství. Tyto prvky ovlivňují především vlastnosti fyzikální, mechanické, ale i rychlost a způsob koroze. Mechanické vlastnosti i způsob a rychlost koroze jsou ovlivněny strukturou slitin. Především biologické vlastnosti jsou pak ovlivněny porozitou materiálu a jeho povrchovou úpravou (používá se stejně jako u titanu např. povlakování stronciem, hydroxyapatitem, micro-arch oxidation apod.). Mezi biodegradovatelné slitiny na bázi magnezia patří AZ31, AZ91, WE43, Mg-Ca a další. (Dee K.C. et al., 2002, Kubasek J. et al., 2019, Levorova J. et al., 2017, Windhagen H. et al., 2013, Zheng Y., 2016)

1.17 Biodegradovatelné slitiny na bázi zinku

Výhodou slitin na bázi zinku oproti slitinám železa je jejich rychlejší degradace, navíc jsou dobře zpracovatelné při výrobě. Stejně jako slitiny železa vykazují dobrou biokompatibilitu, nicméně ve srovnání s používanými slitinami na bázi magnesia horší. Jejich mechanické vlastnosti jsou podobné těm na bázi magnesia. In vitro podléhají slitiny zinku korozi pomaleji něž slitiny magnesia, výhodou je ale způsob jejich degradace, kdy se jako vedlejší produkt netvoří vodík, resp. se tvoří v malém množství. Tato vlastnost zinku se využívá právě u magnesiových slitin, kdy se jeho přidáním snižuje nežádoucí tvorba plynu. Zinek je jedním z esenciálních prvků lidského organismu, přechodný příjem i vyšší denní dávky (až 100mg/den při běžné denní dávce 15 - 40mg) nenese riziko toxických účinků. Mezi kovovými biodegradovatelnými materiály jsou slitiny zinku nejnovější a dosud bylo provedeno nejméně studií stran jejich použití. I když právě použití pro fixaci kosti v traumatologii bylo již publikováno, a to s dobrými výsledky. Do skupiny biodegradovatelných slitin na bázi zinku patří Zn-Mg, Zn-Sr, Zn-Li, Zn-Ca a další. (Kubasek J. et al., 2019, Li H.F. et al., 2015, Yang H. et al., 2020, Zheng Y., 2016)

1.18 Princip degradace kovových slitin v prostředí organismu, proces degradace magnesiových slitin

Procesem degradace kovových slitin v prostředí organismu je jejich koroze, principem je elektrochemická reakce. Stejně jako některé polymery lze magnesiové slitiny označit také jako „samo-resorbovatelné“. To znamená, že začátek jejich degradace je iniciován vlastním prostředím, do kterého jsou umístěny, nikoli vnějším zásahem, např. ultrazvukově, změnou

teploty apod. Povrch kovu se chová ve vodném prostředí jako anoda. Na něm dochází k oxidaci molekul kovu, a to díky přesunu delokovaných elektronů kovové mřížky směrem k povrchu. To působí přitahování kationtů roztoku, ve kterém je kov umístěn. Takto „uvolněné“ elektrony z anody reagují s vodou za vzniku vodíku (H_2) jakožto vedlejšího a nežádoucího produktu koroze. Z molekuly vody (katodová reakce) vznikají také hydroxidové anionty (OH^-), které se usazují na povrchu materiálu a vytváří korozní ochrannou vrstvu o síle v řádu nanometrů. Korozní vrstva je tedy tvořena hydroxidem daného kovu, v případě magnesiových slitin je to hydroxid hořečnatý ($Mg(OH)_2$). Proces je relativně nezávislý na koncentraci kyslíku v prostředí. Současně ale vždy probíhá i tvorba oxidu hořečnatého (MgO). Ten také na povrchu kovu vytváří ochrannou pasivní vrstvu, která omezuje další uvolňování iontů kovu. K desintegraci této ochranné vrstvy dochází vlivem adsorpce chloridových iontů na její povrch. Chloridové ionty jsou přirozenou součástí vnitřního prostředí organismu stejně jako voda. Princip degradace slitin počítá s jejich přítomností a k procesu koroze je využívá. Vznikající chlorid hořečnatý ($MgCl_2$) je navíc v prostředí více rozpustný, takže jeho přítomnost zvyšuje aktivitu povrchu kovu.

Princip degradace vyjádřený rovnicemi:

$$Mg + 2\ H_2O \rightarrow Mg^{2+} + H_2 + 2\ OH^-$$

$$Mg(OH)_2 + 2\ Cl^- \rightarrow MgCl_2 + 2OH^-$$

Narušení hydroxidové ochranné vrstvy umožňuje pokračování koroze díky opětovné expozici povrchu kovu vodnému prostředí organismu. Narušení vrstvy $Mg(OH)_2$ způsobují i molekuly vznikajícího vodíku, takže se i vedlejší nežádoucí produkt koroze na žádoucí degradaci materiálu podílí (tak, že degradaci urychluje). Na povrchu materiálu dále dochází k precipitaci uhličitanů a fosforečnanů magnesia a kalcia. Fosforečnan hořečnatý a vápenatý mají osteoindukční vlastnosti. Ty nejsou primárním atributem těchto degradovatelných slitin, nicméně v praxi mohou znamenat výhodu v hojení okolní kostní tkáně. (Kubasek J. et al., 2019, Zheng Y. F. et al., 2014, Zheng Y., 2016)

Korozními produkty jsou tedy precipitáty uhličitanu hořečnatého a vápenatého a fosforečnanu hořečnatého a vápenatého ($MgCO_3$, $CaCO_3$, $Mg\ (PO_4)_2$, $Ca\ (PO_4)_2$) a hydroxid kovu ($Mg(OH)_2$), magnesiové ionty (Mg^{2+}), bubliny vodíku (H_2), odpadním produktem jsou legující prvky a rozpadlé části implantátu. Korozní produkty netvoří na slitině souvislou homogenní vrstvu. Z toho důvodu ani elektrochemická aktivita není uniformní a vlastní koroze zodpovědná za rozpad materiálu probíhá lokalizovaně. Pro magnesiové slitiny je typická koroze bodová,

případně nitková koroze a třecí koroze. (Mareš J., 2013, Yao H.B. et al., 2000, Zheng Y. F. et al., 2014, Zheng Y., 2016, www.edumos.eu)

Rychlost koroze magnesiových slitin ovlivňuje stran prostředí jak vodivost média, tak napětí mezi katodou a anodou. Ten je v případě prostředí organismu pro magnesiové ionty -1,5V (povrch magnesia má záporný potenciál -2,37V). Napětí mezi elektrodami ovlivňuje i případnou možnost použití jiných materiálů v blízkosti slitiny. Rychlost koroze, nikoli její princip, ovlivňují také adsorbované proteiny, chloridové anionty, kationty (draselné a sodné; dále hořečnaté a vápenaté, které podporují tkáňovou reakci ve smyslu produkce kosti), bikarbonáty a fosforečné ionty, které mohou korozi zpomalovat. Na stranu druhou právě posledně jeměnované mají, stejně jako kalciové ionty, také osteoindukční vlastnosti. (Dee K.C. et al., 2002, Zheng Y., 2016) Teplota prostředí také ovlivňuje rychlost koroze. Se zvyšující se teplotou se zvyšuje volná Gibbsova energie, která ovlivňuje právě adsorpci proteinů. (Sasha O., Roscoe S.G., 1999)

1.19 Mechanické vlastnosti biodegradovatelných slitin

Elongace slitin na bázi hořčíku je větší než 5 %, tedy je vyhovující pro potřeby kortikální kosti. Ve srovnání s 316SS a titanem a jeho slitinami vykazují magnesiové slitiny ale vyšší únavu materiálu po opakované zátěži. Ta se projevuje tendencí k praskání. Tato nežádoucí vlastnost se zhoršuje ve vlhkém prostředí, výrazně v prostředí fyziologického roztoku. Při degradaci uvolněný vodík ještě zvyšuje křehkost materiálu, v negativním smyslu ji ovlivňují i legující prvky jako např. hliník a zinek. Právě díky únavě materiálu jsou degradovatelné slitiny na bázi magnesia hraniční pro použití pro osteosyntézu v obličejovém skeletu. Nižší funkční zátěž je kladena na střední obličejovou etáž, kde lze předpokládat možné použití těchto slitin, pro dolní čelist z mechanických důvodů použitelné nejsou. (Zheng Y., 2016)

Působení korozního prostředí v kombinaci se zátěží jsou zodpovědné za zátěží iniciovanou korozi (volně přeloženo z anglického „stress corrosion cracking“ ze Zheng Y., 2016). To je situace, kdy vlastní koroze je urychlena právě zatížením materiálu. Příčina zátěží iniciované koroze není přesně známa, předpokládá se, že důvodem k ní jsou mikrostrukturální defekty materiálu. Degradace takového vzorku materiálu probíhá zhruba 2 - 3krát rychleji než vzorku bez mikrostrukturálních defektů. Asi největší riziko zátěží iniciované koroze představuje nepředvídatelnost chování implantátu. Makroskopicky je materiál totiž zdánlivě vhodný, není nijak deformován. Podobnou křehkost, jakou mají magnesiové slitiny, vykazuje i 316SS, ve

srovnání s degradovatelnými polymerními sloučeninami jsou magnesiové slitiny křehké méně, ve srovnání s titanem výrazně více. (Winzer N. et al., 2005, Zheng Y., 2016)

1.20 Biologické chování korozních produktů degradovatelných magnesiových slitin

Přehled korozních produktů biodegradovatelných magnesiových slitin a hlavních legujících prvků slitiny WE43 je uveden v tabulce 4.

produkt	výhody	rizika
hořčík	snížení produkce bcl-2 proonkogenního proteinu	zvyšuje produkci prozánětlivého interleukinu 8, hemolytické účinky
vodík	antiapoptogenní a neuroprotektivní účinek	poruchy hojení, zpomalení hojení
fosforečnany, uhličitany	osteoindukční vlastnosti	nejsou známa
neodymium	antikarcinogenní efekt	nejsou známa
yttrium	podpora proliferace endotelu	poruchy glomerulární filtrace

Tbl. 4 Biologické chování korozních produktů degradovatelných magnesiových slitin a hlavních legujících prvků magnesiové slitiny WE43. Jmenovaná rizika vždy souvisí s přijetím většího množství prvku nebo sloučeniny. Vytvořeno podle Zheng Y., 2016

Vedlejším efektem koroze magnesiových slitin je lokální zvýšení pH prostředí vlivem vzniku hydroxidových aniontů, resp. hydroxidu hořečnatého jako korozního produktu. Alkalizace prostředí pak v negativním smyslu ovlivňuje rychlost degradace slitiny. Urychlení degradace naopak způsobuje přítomnost chloridových iontů a síranů, méně hydrogenuhličitanů a dihydrogenfosforečnanů a vápníku, resp. poslední dva zmiňované ionty jsou v literatuře uváděny jako stabilizátory rychlosti rozpadu. Po přidání vápenatých iontů a fosforečnanů ve větším množství pak dochází k ovlivnění vlastního korozního procesu. Tím zaniká možnost

jejich cíleného arteficiálního přidání se záměrem regulovat korozní rychlost. (Ott N. et al., 2013, Zheng Y., 2016, Zhou X. et al, 2014)

Produkcí hydroxidových aniontů se snižuje lokálně pH, alkalické prostředí také podporuje tvorbu kosti a celkově urychluje kostní remodelaci. Výhodou je i antibakteriální efekt hydroxidových aniontů. In vitro negativně ovlivňují růst Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Staphylococcus aureus. Naopak rizikem zvýšení pH je možné negativní ovlivnění viability buněk, jak bylo in vitro prokázáno na kulturách fibroblastů, preosteoblastů, endoteliálních buněk a buněk hladké svaloviny a omezení tvorby osteoklastů (Gu X.N. et al., 2009, Robinson D.A. et al., 2010, Zhao Y. et al., 2014). Právě omezení tvorby osteoklastů především v prvních čtyřech týdnech po implantaci materiálu hraje jednu z hlavních rolí při podpoře hojení kosti. Současná podpora osteoblastické aktivity pak vede k usnadnění kostní tvorby. To publikuje na základě in vivo testů Janning (2010). Do hodnocení ovlivnění kostní tvorby zahrnuje i další korozní prodkut, kterým jsou magnesiové ionty, zároveň nevylučuje ovlivnění tvorby kosti zvýšením pH. (Janning C. et al., 2010)

Dalším korozním produktem jsou právě magnesiové ionty. Hořčík je prvek přirozeně se vyskytující v kostech. Jeho uvolnění v množství, v jakém je použit pro účely osteosyntézy, není toxické, naopak přínosem jeho uvolnění v takovém množství může být lokální stimulace růstu kostní tkáně nebo snížení bakteriální adherence na povrch implantátu. Mezi jeho negativní vlastnosti při uvolnění ve vyšších koncentracích patří zvýšení produkce prozánětlivého interleukinu 8, hemolytické účinky a omezení viability buněk. Apoptogenní účinek ani antiproteosyntetický účinek nebyl u čistého hořčíku prokázán. (Cheng J. et al., 2013, Gu X.N. et al., 2009, Williams D. 2006, Witte F. et al., 2005, Zheng Y., 2016) Paradoxně k tomu apoptogenní účinek slitiny WE43 byl prokázán na tumorózních buňkách, současně u nich byla snížena i exprese Bcl-2 proonkogenního proteinu. Zde má apoptóza pozitivní účinek. Daná studie poukazuje na potenciál použití WE43 v onkologické léčbě. (Anisimova N. et al., 2020)

Li (2008) v in vivo studii zjišťuje zvýšenou tvorbu jak osteoblastů, tak osteoklastů v okolí magnesiových implantátů. I tak je závěrem jeho studie pozitivní efekt magnesia na kostní remodelaci stimulací osteoblastické aktivity. Zatímco Janning (2010) hodnotí kostní remodelaci u hořečnatých iontů samotných (a do hodnocení kostní remodelace zahrnuje i vliv zvýšeného pH v okolí implantátů), Li (2008) hodnotí kostní remodelaci v okolí slitiny magnesia a vápníku a vyjadřuje se k účinku jen magnesiových iontů. (Janning C. et al., 2010, Li Z. et al., 2008) Další studie in vitro pak dokazují zvýšení počtu osteoblastů v přítomnosti magnesiových

iontů nebo naopak snížení počtu osteoblastů v okolí při snížení koncentrace hořčíku. (Abed E., Moreau R, 2007, Howlett C.R. et al., 1994, Yun Y. et al., 2010, Zreiqat H. et al., 1999)

Korozním produktem magnesiových slitin je i vodík. Vznikající vodík v množství 1 mol koresponduje s degradací 1 molu hořčíku. Menší část vytvořeného vodíku se rozpouští ve vlastním implantovaném materiálu, převážná část se ovšem uvolňuje do okolních tkání. Malá část takto uvolněného vodíku je z místa implantace odstraněna uvolněním do krevního řečiště. Pokud vzniká objem větší, dochází k retenci ve tkáních. V měkkých tkáních je retence vodíku příčinou napínání tkání a v důsledku zvýšeného tlaku může dojít k poruše cévního a nervového zásobení. Pokud se vodík hromadí v kosti, zpomaluje její hojení, a to může být příčinou dalších komplikací oseointegrace. Případný pozitivní efekt vytvořeného vodíku by pak spočíval v neuroprotektiním účinku na centrální nervový systém, antiapoptogenním účinku lokálně ve tkáních a likvidaci hydroxidových radikálů. Zmenšení objemu vytvářejícího se vodíku lze dosáhnout úpravou rychlosti degradace, resp. jejím zpomalením. (Dobatkin S. et al., 2019, Zheng Y., 2016)

1.21 Charakteristika slitiny WE43 – složení, způsob degradace, vlastnosti

Legujícími prvky slitiny WE43 jsou zirkonium a kovy vzácných zemin – yttrium a neodymium. Funkce, resp. působení prvků vzácných zemin včetně yttria, které je chemicky podobné lanthanoidům, není úplně jasné. Cílem jejich přidání k magnesiu je úprava mechanických vlastností, a to zvýšení tvrdosti a pevnosti v tahu, a naopak snížení percentuální elongace. Dalším efektem přidání kovů vzácných zemin je urychlení degradace, konkrétně do přidání až 2,5 hmotnostních procent yttria dochází ke zvýšení degradační rychlosti. Yttrium má stran degradace ambivalentní funkci: akceleruje degradaci na straně jedné díky mikrogalvanizaci, na straně druhé yttrium z povrchových vrstev implantátu se podílí na tvorbě ochranné antikorozní vrstvy a korozi zpomaluje. (Liu M. et al, 2010, Zheng Y., 2016)

Různé studie prokazují, že teprve vysoká koncentrace právě yttria způsobuje poruchy glomerulární filtrace, malé množství naopak podporuje růst cévního endotelu. (Di Mario C. et al., 2004, Hayashi S. et al., 2006, Waksman R. et al., 2006, Zheng Y., 2016)

Mez pevnosti v tahu dosahuje u slitiny WE43 v závislosti na mikrostruktuře a způsobu zpracování od 224 MPa po 410 MPa a elongace od 2 po 25 % (Kutniy K.V. et al., 2009, Pachla W. et al., 2012, Zheng Y., 2016)

Rychlost degradace in vitro se podle literatury pohybuje v poměrně širokém rozmezí od 2,05 mm/rok po 4,7 mm/rok (Dobatkin S. et al., 2019, Liu D. et al, 2014)

1.22 Charakteristika slitiny Zn-1,6Mg – složení, způsob degradace, vlastnosti

Zinek je pro člověka jedním z esenciálních mikronutritientů. Jeho zvýšený příjem je považován za netoxický, dočasně je tolerován až téměř desetinásobný než doporučený denní příjem, tj. 100mg/den, resp. 10 - 15mg/den). Ve slitinách na bázi magnesia je jedním z nejvíce používaných přidaných prvků. Cílem použití zinku v degradovatelných magnesiových slitinách je zlepšení jejich kujnosti, zvýšení tvrdosti a meze pevnosti slitiny. Současně přidání zinku umožňuje snížení množství železa a niklu jako prvků s méně žádoucími vlastnostmi. Tím zinek zlepšuje odolnost slitiny vůči korozi. (Jiang D.M. et al., 2013, Kubasek J., Vojtech D., 2013, Vojtech D. et al., 2011, Zhang X.B. et al., 2012, Zheng E.L. et al., 2009) Elektrochemický potenciál magnesia a zinku je poměrně rozdílný (-2,37V, resp. -0,76V), zinek je tak ve vnitřním prostředí organismu méně reaktivní. Navíc ovlivňuje tendenci ke tvorbě vodíku ve smyslu jejího snížení, což je žádoucí efekt. (Kubasek J. et al., Kubasek J. et al., 2016, 2012, Peng Q.M. et al., 2012) Z hlediska biokompatibility vykazují slitiny na bázi zinku v in vitro testech na buněčných kulturách velmi dobré vlastnosti. Zinek pozitivně ovlivňuje adhezi osteoblastů k implantátu, jako součást enzymů se podílí i na řízení funkce osteoblastů a zvyšuje hladinu alkalické fosfatázy, takže pozitivně ovlivňuje hojení kosti. (Chen D.Y. et al., 2011, Yamaguchi M. et al., 1987, Zhang S.X. et al., 2009, Zreiqat H. et al., 2002) In vivo testy těchto zinkových materiálů ukazují především na rychlé vstřebávání slitin. Zhang (2010) uvádí počátek rozpadu slitiny v prvních třech týdnech po implantaci, po 12 týdnech je v jeho studii již materiál ve tkáni nediferencovatelný. (Zhang S.X. et al., 2010) Ve studii Yan (2013) dochází ke kompletnímu rozpadu Mg-6Zn slitiny během 4 týdnů po implantaci (zde proběhla implantace do měkkých tkání, nikoli do kosti). (Yan J. et al., 2013) V obou studiích došlo vlivem přítomnosti slitiny k urychlení hojení tkání, prokazatelně se zvýšily hodnoty TGF-β a snížily hodnoty TNF-α.

Bubliny plynu v okolních měkkých tkáních se tři týdny po implantaci do kostní tkáně objevují ve studii He (2009), přičemž kompletní rozpad slitiny nastává až po 24 týdnech. I v této studii byla prokázána vyšší míra kostní remodelace. (He Y.H.et al., 2009) Rychlost degradace vyjádřená v mg/cm^2/den se pohybuje u slitiny Zn-1,6Mg kolem hodnot 0,0134 – 0,0165, přičemž rapidně probíhá degradace během prvních 6 měsíců po implantaci, v následujících měsících se její rychlost snižuje. Tvrdost slitiny Zn-1,6Mg je ve srovnání s magnesiovou

slitinou WE43 nižší, mez pevnosti v tahu je naopak vyšší (průměrné hodnoty) a elongace se pohybuje mezi 4 a 12 %, což je hodnota nižší ve srovnání s WE43. (Kubasek J. et al., 2016, Liu S. et al., 2019)

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

Dílčí 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

Dílčí 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

3 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, tj. materiál se v organismu vstřebává bez negativních biologických interakcí.

4 Materiál a metody práce

4.1 Soubor

V první fázi pokusu bylo použito celkem 10 zvířecích modelů, potkanů (samci, Wistar Unilever Albino, Velaz, Česká republika; věk 8 týdnů, hmotnost 282–366 g, průměrná hmotnost 308 g). Zvířata byla po přijetí aklimatizována po dobu jednoho týdne v samostatných klecích, voda a definovaná strava byly podávány ad libitum; byl použit 12hodinový světelný interval. Před výkonem byla zvířata zvážena a anestezována inhalačně 3 % isofluranem za pomoci obličejové masky. Po uložení do pronační polohy byl za aseptických podmínek proveden chirurgický přístup v dorsální části lebky – incize kůže, podkoží a tupá preparace svalu. Po odklopení periostu byl do kalvy ve střední čáře vyvrtán okrouhlý defekt o průměru 2,5 mm, hloubce 1 mm (použit byl chirurgický mikromotor NSK, Surgic XT, Německo, vrták z nerezavějící oceli; 800 otáček/min, konstantní chlazení 1/1 fyziologickým roztokem). Zvířata byla rozdělena do dvou skupin – skupina A (5 zvířat), skupina B (5 zvířat). Zvířatům ze skupiny A bylo do defektu v kalvě vloženo po jedné pelotě ze slitiny Zn-1,6Mg, skupině B ze slitiny WE43 (též je označována Mg-4Y-3RE). Vsazení peloty ukazuje obr. 2. Rány byly zašity po vrstvách vstřebatelným materiálem Safil 5/0, Safil 4/0 (B Braun, Česká republika). Následně byla zvířata umístěna do samostatných klecí a sledována do úplného zotavení z celkové anestezie. Ve dvoutýdenních intervalech byla zvířata po jednom euthanasována atestovaným veterinárním lékařem za užití Ketamin 35 mg/kg i.m., 2 % Xylazine 5 mg/kg i.m. a TG1 0.3 mg/kg i.c. Z každého zvířete byl vyjmut bloček kosti o velikosti 3x5mm v místě, kde byla původně pelota implantována. (Levorova J. et al., 2017, Levorova J. et al., 2018)

Obr. 2 Implantace kovové peloty do kalvy potkana. Horní část obrázku ukazuje vyhloubený defekt v kosti, v dolní části obrázku je vidět usazení peloty

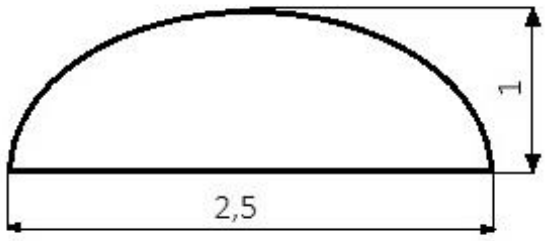
Druhá navazující fáze pokusu byla provedena na celkem 16 zvířecích modelech králíků (samci, NZW, AnLab; věk 9 týdnů, hmotnost 2220-2750 g, průměrná hmotnost 2379 g). Zvířata byla po přijetí aklimatizována po dobu 14 dnů v samostatných klecích, voda a potrava byly podávány ad libitum, byl použit 12hodinový světelný režim. Podle typu implantované slitiny byla zvířata rozdělena do dvou skupin (skupina I a II po osmi zvířatech), zvířata ze skupiny I obdržela implantáty z titanu (standardní srovnávací skupina), zvířata ze skupiny II obdržela implantáty ze slitiny WE43. Před začátkem výkonu byla zvířatům podána antibiotická profylaxe Enrofloxacin v dávce 5 mg/kg s.c., k úvodu do anestezie byly podány i.m. Diazepam a Ketamin v dávce 0,5 mg/kg a lokálně do místa operačního pole byla následně podána

infiltrační anestezie 1 % Mesocain 1ml. Zvířata byla uložena do supinní pozice. Po založení operačního pole byl za sterilních kautel proveden výkon – incize kůže a podkoží na pravé zadní končetině ventromediálně v proximální třetině. Po tupé preparaci svalu byl incidován periost a odhalena tibie. Do přední strany tibie byly pod sebou vyvrtány dva identické tunelové defekty o průměru 1,5 mm a hloubce 3 mm, od sebe byly vzdáleny 15-20 mm. Rozměr defektu, tj. i implantovaného šroubu, a vzdálenost mezi defekty byly zvoleny podle velikosti králičí tibie tak, aby kost nebyla ohrožena frakturou. K vytvoření defektů byl použit konvenční chirurgický mikromotor (NSK Surgic XT, Německo, rovný vrták z nerezavějící oceli, 800 otáček/min, za konstantního chlazení 1/1 fyziologickým roztokem). Do každého defektu bylo zavedeno po jednom implantátu z dané slitiny podle konkrétní skupiny, tzn. jedno konkrétní zvíře obdrželo dva implantáty ze stejné slitiny. Hlava vrutu přesahovala nad úroveň kosti. Rány byly zašity po vrstvách vstřebatelným monofilním materiálem Monosyn 4/0 (B Braun, Česká republika). Zvířata byla ponechána do zotavení z anestezie, a i nadále v samostatných klecích. Pooperačně byl zvířatům podán Ketoprofen v dávce 2 mg/kg. Voda a potrava byly podávány nadále ad libitum, rány byly denně kontrolovány. Zvířata byla euthanasována veterinárním lékařem podáním Ketaminu 35 mg/kg i.m., 2 % Xylazine 5 mg/kg i.m. a TG1 0.3 mg/kg i.c. ve 4týdenních intervalech, a to vždy jedno zvíře z každé skupiny. (Levorova J. et al., 2018)

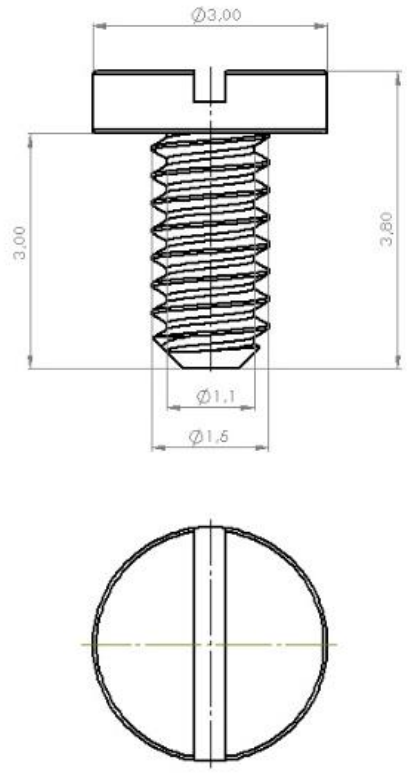
4.2 Příprava kovových implantátů

V první fázi experimentu byly použity dvě slitiny – Zn-1,6Mg a WE43 (neboli Mg-4Y-3RE). Slitina Zn-1,6Mg je složena z rovnoměrných krystalů čistého zinku jako základní složky, 1,6 hmotnostních % zaujímá magnesium, minoritní složku tvoří železo - 0,1 hmotnostních % (dále označeno jen jako hm.%). Hlavní složkou slitiny WE43 je magnesium, dále obsahuje 4,2 hm.% yttria, 2,8 hm.% neodymia a 0,4 hm.% zirkonia. 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). Teplota taveniny byla udržována pod 500 °C, aby bylo zabráněno odpařování zinku a oxidaci magnesia. Po dostatečné homogenizaci byla tavenina slita do válcových forem (20 mm v průměru, 200 mm délka). WE43 slitky o rozměrech 40 × 80 × 500 mm byly nakoupeny od průmyslového dodavatele, znovu 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, schéma

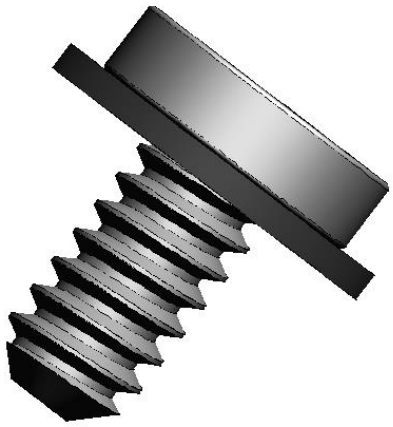
peloty ukazuje obr. 3 V druhé fázi experimentu byla použita slitina WE43, připravena byla stejným způsobem. Ze slitků, resp. vytvořených prutů o průměru 7,5mm byly vysoustruženy implantáty tvaru vrutu – válcovité, délky 3 mm, (šířka hlavy 3 mm, vnější šířka závitu 1,5 mm, šířka těla 1,1 mm), schéma vrutu je uvedeno na obr. 4 a 5. Podložka pod vrutem slouží k simulaci reálného osteosyntetického materiálu, simuluje plate pod vrutem, tedy pohyb mezi spodní plochou hlavice 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 (Ti typ 5), připravena metodou selektivního laserového tavení (Fousova M. et al., 2016). (Kubasek J. et al., 2019, Levorova J. et al., 2017, Levorova J. et al., 2018)



Obr. 3 Schéma peloty, rozměry jsou uvedeny v mm



Obr. 4 Schéma implantovaného vrutu, rozměry jsou uvedeny v mm



Obr. 5 3D model implantovaného vrutu

4.3 Zavedení implantátů

Studie na zvířecích modelech byly provedeny v souladu se Směrnicí Evropského parlamentu a rady 2010/63/EU o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely. Studie byla schválena místní etickou komisí, schválení No. 598/15.

4.4 Fixace vzorků, zpracování pro optické vyšetření

Z každého zvířete byla vyjmuta proximální část tibie s implantáty, cca 5cm kosti. Okamžitě po vyjmutí z těla byly vzorky očištěny od měkkých tkání a opláchnuty fyziologickým roztokem a vloženy do označených skleněných nádob s čerstvě připraveným fixačním roztokem 37 % formaldehydu a 80 % ethanolu v poměru 1:2, pH roztoku = 7,2 bylo modifikováno uhličitanem vápenatým a jedním molem hydroxidu sodného. Hodnota pH byla průběžně kontrolována pH metrem inoLab pH 730 (WTW, Německo). Na pracovišti Zkušební laboratoře pro dentální implantáty Všeobecné fakultní nemocnice v Praze byly tvrdé tkáně s implantovanými šrouby zkráceny na laboratorní pile Isomet TM (Buehler, Spojené státy americké) na délku 2-3 cm a umístěny do menších skleněných nádob s čerstvým fixačním roztokem stejného složení. Denní doba byla rozdělena na dva 12hodinové cykly – 12 hodin byly nádobky se vzorky umístěny na vibračním přístroji Rotamax 120 (Heliodolph Instruments GmbH & Co.KG, Německo) při teplotě místnosti, během následujících 12 hodin byly uloženy v chladničce. Doba fixace byla 1 týden, fixační roztok byl ve 24hodinových intervalech vyměňován za čerstvý. Tvrdé tkáně byly odvodňovány v řadě roztoků o vzrůstající koncentraci etanolu (70-100 %, v každém byly umístěny 72 hodiny) a poté byly vloženy na 24 hodiny do roztoku 100 % etanolu a acetonu v poměru 1:1. Fáze odvodnění byla ukončena opětovným vložením do 100 % etanolu. Následně byl etanol nahrazen čistým metylmetakrylátem (MMA) bez stabilizátoru a vzorky byly dvakrát po sobě s čerstvým MMA ve skleněných nádobách umístěny po dobu 48 hodin na vibračním přístroji při pokojové teplotě, přes noc v chladničce (dva dvanáctihodinové cykly). Pro zajištění lepší infiltrace do kosti bylo zalití provedeno ve vakuu po dobu 30 minut (800mbar membránová pumpa ILMVAC, ILMVAC GmbH, Německo). Poté byl MMA vyměněn za zalévací médium složené z MMA, dibutylftalátu a benzoylperoxidu (v poměru 100 g MMA, 12,5 ml dibutylftalát, 1,8 g benzoylperoxid). Homogenizace směsi byla provedena na magnetické míchačce Lavat MM-4 (Lavat, Česká republika) po dobu 1,5 hodiny. Nádobky se vzorky byly po zalití směsí vloženy do vodní lázně o teplotě 26 °C (termostat F25-HE, Julabo, Německo). Teplota byla postupně navyšována o 1 °C každých 48 hodin na konečných 36 °C. Po zpolymerizování byly bločky kostí s implantáty rozřezány na velikost potřebnou pro

uchycení do držáků laboratorní pily ISOMET TM (Buehler, Spojené státy americké), kterou byly následně za konstantního chlazení vodou (titan) a 96 % etanolem (WE43) zhotoveny příčné řezy diamantovaným kotoučem o síle 300µm. Řezná plocha byla opracována karborundovým abrazivním papírem o zrnitosti P1200 a P2500 a následně vyleštěna korundovou suspenzí o velikosti částic 1µm (obojí Buehler, Spojené státy americké), povrch poté očištěn 96 % etanolem. Řeznou plochou byl preparát přivrácen k polymetymetakrylátové destičce, k ní byl lepen 2-3 kapkami vteřinového lepidla, lepidlo zasychalo cca 4 hodiny po přiměřeném zatížení. Diamantovaným kotoučem byl pak preparát rozdělen na jednotlivé řezy o síle 250µm. Řezná plocha byla postupně strojově (MetaServ 250, Buehler, Spojené státy americké) zbrušována karborundovým abrazivním papírem o zrnitosti P1200 a P2500 na tloušťku 80 µm, k leštění byly použity korundové suspenze o velikosti zrna 1 µm a 0,3 µm. Výsledná tloušťka histologického preparátu byla cca 60 µm.

Barvení probíhalo ponořením do 1% roztoku toluidinové modři v 30 % etanolu při 60 °C po dobu 5 minut, následným opláchnutím destilovanou vodou a 96 % etanolem. Druhé barvení probíhalo v 0,2% roztoku toluidinové modři ve fosfátovém pufru, pH = 9,1 při 60 °C po dobu 12 minut. Poté byly preparáty znovu opláchnuty destilovanou vodou a osušeny.

Histologické preparáty byly zhotoveny z kosti vždy jen s jedním ze dvou implantovaných šroubů na původním jednom vzorku tibie. Snímky preparátů byly pořízeny ve Zkušební laboratoři pro dentální materiály Všeobecné fakultní nemocnice a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy za použití transmisního optického mikroskopu Nikon Eclipse E600 (Nikon, Japonsko). Identický postup byl použit v první fázi experimentu. Fixovány a opracovány byly kalvariální kostní bločky bez kovových pelot (ty byly v kosti volně, dislokovány mimo původní místo nebo nebyly nalezeny). Způsob odběru, fixace a zpracování vzorků byl publikován v pracích autorky (Levorova J. et al., 2017, Levorova J. et al., 2018)

4.5 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 kosti v okolí implantátu, periostální apozice kosti. Dále kvalita okolní kosti a kvantita parametrů: kostní kavity, periostální remodelace, endostální remodelace, periimplantační fibróza, lymfoplasmatickocelulární reakce, infiltrace makrofágy a tvorba reakce z cizích těles.

(Levorova J. et al., 2018) na podkladě publikace jiné autorky (Reifenrath J. et al., 2011). Způsob hodnocení vysvětluje tabulka 5, je ponechána v originálním anglickém znění.

Parameter	Score	Interpretation
Gas bubbles	0	No
	1	Yes
Overall impression of bone structure (BS)	0	Smooth
	1	Irregular
Bone cavities (BC)	0	≤3 osteonlike cavities
	1	4-6 osteonlike cavities or ≤10 smaller
	2	7-10 osteonlike cavities or 11-20 smaller
Periosteal remodeling (PR)	0	No
	1	≥¼ periosteal bone, 1 osteon thick
	2	≥ 1/4 periosteal bone, 2 osteon thick
	3	≥1/4 periosteal bone, 3 steon thick
Endosteal remodeling (ER)	0	No
	1	≥
	2	≥
	3	≥
Periosteal aposition (PA)	0	No
	1	Yes
Periimplant bone formation (PIF)	0	No
	1	Yes
Periimplant fibrosis (PF)	0	No
	1	≤25 % implant surface
	2	25-50 % implant surface
	3	≥51 % implant surface
Lymphoplasmacellular reaction (LYM)	0	<30 cells per section
	1	30-50 cells per section
	2	51-100 cells per section
	3	>100 cells per section
Macrophages	0	<3 cells per section

(MPH)	1	3-20 cells per section
	2	>20 cells per section
Giant cells (GC)	0	No
	1	1-10 cells per section
	2	>10 cells per section

Tabulka 5 Vlevo jsou uvedeny hodnocené parametry, prostřední sloupec označuje nabyté skóre, pravý sloupec interpretuje výsledek skóre. Tabulka převzata z Reifenrath J. et al., 2011

4.6 Zobrazovací metody

4.6.1 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.

Cone Beam Computed Tomography (CBCT) je zobrazovací metoda založená na principu průchodu a absorpci kuželového rentgenového paprsku tkání a následnou detekcí scintilační kamerou, která je na protilehlé straně vůči rentgence. Na rozdíl od klasického spirálního CT se během rotace rentgenky pořizuje i více než 600 sekvenčních obrazů rovinné projekce celého zorného pole. Velikost jednoho voxelu, tj. nejmenší jednotky, která definuje objem tkáně nebo hmoty na trojdimenzionální mřížce, se pohybuje v rozmezí 0,09 – 0,4mm. (Shelmerdine S.C. et al., 2018, Walker J. et al., 2014) CBCT tak poskytuje poměrně detailní informaci o stavu pelot a orientační informaci o stavu kostní tkáně a měkkých tkání v jejím okolí. (Scarfe W.C., Farman A.G., 2008) V první fázi experimentu tato zobrazovací metoda poskytla dostatečné množství informací o stavu a pozici pelot i o stavu okolní kosti. Detailnější informace byly získány histopatologickým vyšetřením. Jako pomocné metody k doplnění informací o mikrostruktuře slitin a způsobu jejich rozpadu byly použity energetická disperzní spektrometrie (EDS) v kombinaci s elektronovou mikroskopií (SEM). Výsledky a další využití těchto dvou metod přesahují rámec této práce. Uvádím je zde proto, že poskytují pomocná data k představě o průběhu degradace pelot a vrutů. I pro tento účel a pro zjištění stavu kosti v okolí implantátu je stále výhodnější z pohledu této práce použití CBCT. Detailnější informaci o stavu implantátu i okolní kosti než CBCT, poskytuje mikro-CT. Mikro-CT nebylo v době provedení první fáze experimentu na pracovišti dostupné.

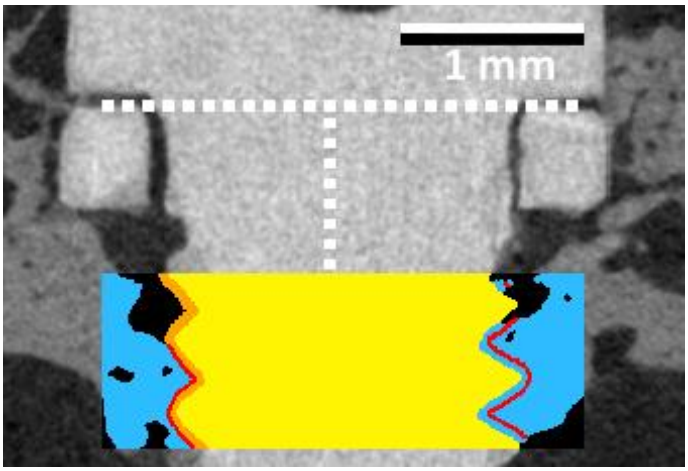
4.6.2 Microfocus computed tomograhy (mikro-CT)

Microfocus Computed Tomography neboli mikrotomografie (mikro-CT) je zobrazovací metoda založená na průniku a absorpci rentgenového záření ve tkáni a následnou detekcí scintilační kamerou. Poskytuje rozlišení řádově v mikrometrech. Velikost jednoho voxelu je menší než 1 μm (srovnání se standardním CT s velikostí 1 voxelu do 0,7mm). (Shelmerdine S.C. et al., 2018, Walker J. et al., 2014) Pro účely této práce byl ve druhé fázi experimentu použit přístroj SkyScan 1272 od firmy Bruker, Belgie s rozlišením 0,35μm. Poskytuje detailní informace o struktuře kosti v okolí implantátu i o místě největšího zájmu, tj. kontaktu mezi povrchem implantátu a kosti. Metoda tak umožňuje sledovat hojení kostní tkáně v okolí implantátu a novotvorbu kosti. (Levorova J. et al., 2017, Levorova J. et al., 2018, Shelmerdine S.C. et al., 2018, Walker J. et al., 2014, Zheng Y., 2016) Zobrazení u mikrotomografie probíhá buď v klasických tomografických řezech, které jsou zhotoveny ve třech volitelných rovinách, nebo pomocí softwaru konvertovanou třídimenzionální rekonstrukcí obrazu. Výhodou mikro-CT je neinvazivita vyšetření, a to i v případě ex vivo vyšetření, které bylo použito v této práci. Při skenování nedochází ke znehodnocení preparátu. Případnou další výhodou je možnost opakovaného vyšetření živých zvířat v průběhu experimentu bez nutnosti jejich usmrcení. I tak nicméně skenování vyžaduje uvedení zvířete do celkové anestezie. Vzhledem k předpokládané rychlosti degradace slitiny WE43 byla v tomto experimentu stanovena časová osa skenování vzorků v intervalu čtyř týdnů. Současně bylo provedeno bioptické vyšetření, které poskytuje informace o chování kostní tkáně v reakci na přítomnost kovu na celulární a subcelulární úrovni. Z toho důvodu možnost skenování živých zvířat nebyla v experimentu využita. (Levorova J. et al., 2018, Schambach S.J. et al, 2010, Walker J. et al., 2014, Zheng Y., 2016)

Skenování celkem 16 vzorků tibií pomocí mikrotomografie probíhalo ex vivo po zalití vzorku tibií do polymetylmetakrylátu. Skenovány tak byly vzorky o velikosti cca 10x10x15mm. Každý vzorek byl zvlášť umístěn na podstavec přístroje, fixaci na nosiči zajišťuje vlastní úprava vzorku. Použito bylo zorné pole (FOV) o velikosti 11 pixelů, napětí 100 kV, proudový zdroj 100 μA, 0,11mm Cu filtr, s průměrováním obrazu, 360° rotace. Skenovací doba byla průměrně 11 hodin pro jeden vzorek. Dlouhá osa implantátu byla při skenování orientována vertikálně, před každým skenováním proběhla úprava horizontální polohy podstavce. Řezy byly virtuálně rekonstruovány softwarově pomocí NRecon (Bruker, Belgie) za použití modifikovaného Feldcamp-Davis-Kressova algorytmu (Feldkamp L. et al., 1984) k redukci artefaktů při

zobrazení. Softwarově byla také upravena pozice implantátu při vychýlení od vertikální pozice (DataViewer, Bruker, Belgie). K vizualizaci obrazu byl použit software Dataviewer (2D řezy) a CTVox (3D řezy implantátu a okolí, Bruker, Belgie). 3D analýza struktury implantátu byla provedena softwarem CTAn (Bruker, Belgie). Jako oblast zájmu byla vymezena oblast mezi prvním a posledním závitem vrutu. Tím se eliminuje chyba při špatném postavení podložky vrutu. Data byla binarizována pomocí metody „global tresholding“ k dosažení struktury implantátu bez okolní kosti, ke snížení šumu byla využita funkce „despeckle“, to je zprůměrování dat z více skenů vzorku ve stejné pozici. (Stock S.R., 2009)

Bone-interface contact (nebo bone-impant contact, BIC), tj. kontakt mezi povrchem implantátu a kosti byl posuzován na dvojdimenzionálních řezech ve třech různých rovinách. Oblast zájmu byla vymezena v kortikální kosti a oblasti implantátu, 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 a tím lepšímu posouzení BIC. 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. Pole zájmu je vymezeno 1 mm pod dolním okrajem povrchu implantátu na oblast implantátu (viz obr. 6), (implantát je zobrazen žlutě), okolní kosti (modrá), měkké tkáně (černá). Oblast implantátu byla zvětšena o 6 pixelů pomocí CTan software (oranžová zobrazena na levé straně pole zájmu) a průsečíky zvětšeného implantátu a kosti (označeny červenou linkou). Pravá polovina pole zájmu ukazuje místo kontaktu implantátu a kosti (zde není implantát zvětšen), v levé polovině je toto označeno červenou linií. Měření BIC je založeno na délce červené linie v okolí celého implantátu, přitom 0,02-0,15 mm je považováno za zanedbatelné.



Obr. 6 Pole zájmu pro měření BIC, oblast implantáte je žlutá, zvětšený implantát oranžový, okolní kost modrá, měkké tkáně černé, červená linie označuje BIC

4.6.3 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 2-0,7µm, k leptání povrchu byl použit roztok 2 ml kyseliny dusičné ve 100 ml vody K určení fázového složení slitin byla užita rentgenová difrakce (X'Pert Philips, Velká Británie, 30 mA, 40 kV, RTG záření Cu Kα). Metodika práce byla publikována v práci Kubáska (2019). (Kubasek J. et al., 2019)

Energetická disperzní spektrometrie (EDS) je metoda umožňující kvantifikovat zastoupení jednotlivých prvků ve vzorku materiálu a jeho okolí. Principem je detekování emitovaných fotonů, které vznikají na základě ozáření povrchu vzorku, resp. konkrétního prvku, svazkem elektronů. Energetická disperzní spektrometrie dokáže detekovat prvky, které jsou zastoupeny ve zkoumaném vzorku v rozmezí 0,1 – 10 % hmotnostního obsahu. Spektrum prvků je pak zachyceno elektronovým mikroskopem a výstupem je tzv. prvková mapa. (Nasrazadani S., Hassani S., 2016)

4.7 Statistická analýza

4.7.1 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.

Analyzována byla data, která uvádí tabulka 6

název v originálním znění podle tabulky 5	**český ekvivalent**
overall impression of bone structure (BS)	struktura kosti
bone cavities (BC)	kostní kavity
periosteal remodeling (PR)	periostální remodelace
endostal remodeling (ER)	endostální remodelace

periosteal aposition (PA)	periostální apozice
periimplant bone formation (PIF)	tvorba kosti v okolí implantátu
periimplant fibrosis (PF)	periimplantační fibróza
lymfoplasmacellular reaction (LYM)	lymfocytární reakce
macrophages (MPH)	infiltrace makrofágy
giant cells (GC)	reakce z cizích těles

Tbl. 6 Přehled vyšetřovaných histopatologických parametrů

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)

4.7.2 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)

4.7.3 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. Nejlepší regresní model je popsán rovnicí [poměr]=44.291e+01 + 1.067e-05*exp([čas]).

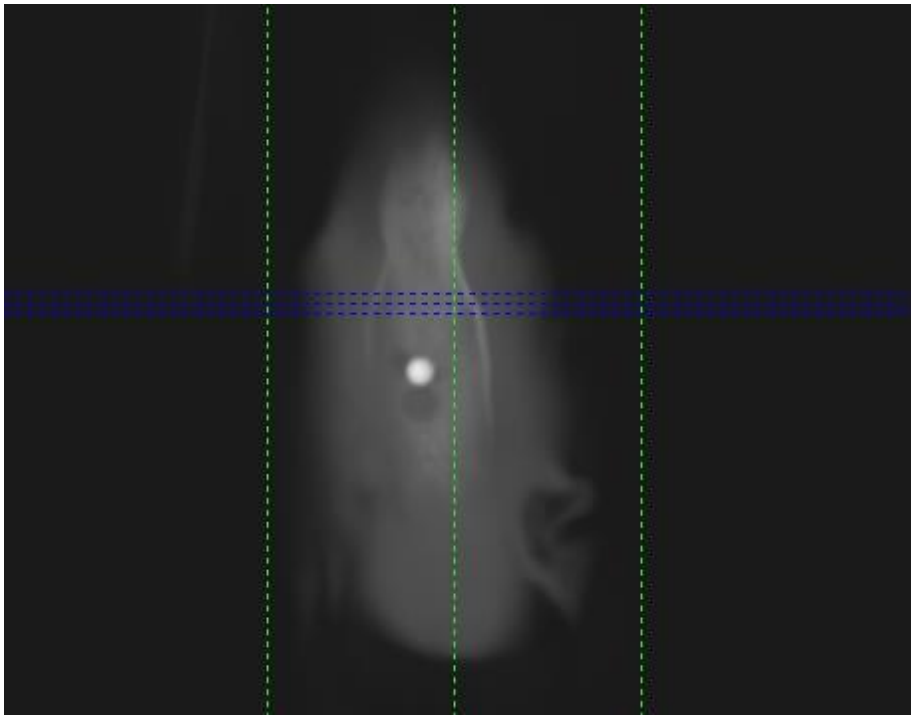
5 Výsledky

5.1 První fáze experimentu

5.1.1 Klinické vyšetření při odběru vzorku, CBCT

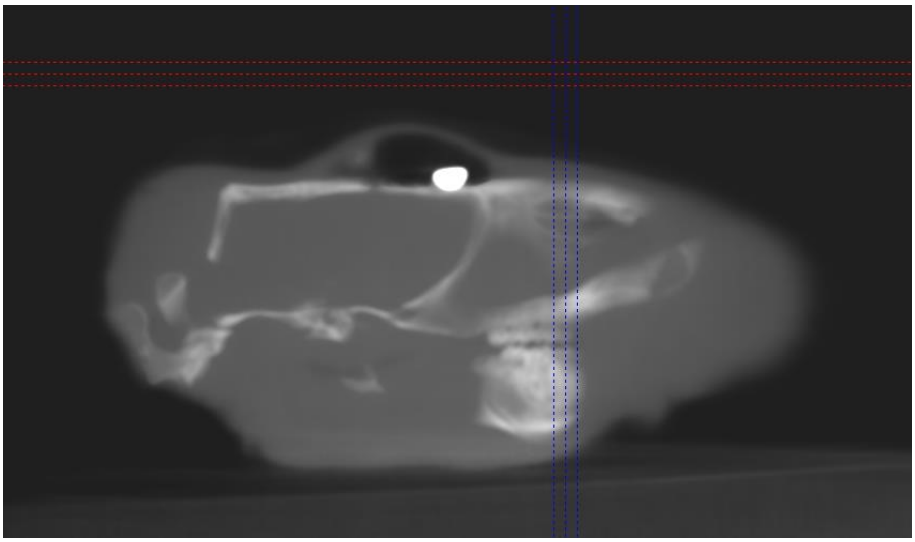
V první fázi experimentu nebyly shledány na zvířatech negativní systémové účinky, lokálně u žádného nebyl pozorován rozpad rány nebo zánětlivá reakce.

První odběr proběhl 2 týdny po implantaci. Měkké tkáně nad implantátem ze slitiny WE43 jsou vyklenuty v důsledku přítomnosti plynu, známky narušení hojení měkkých tkání nejsou pozorovány. Implantát je dislokován anteriorně od místa, do kterého byl zaveden (to je patrno makroskopicky i na CBCT). Makroskopicky je okolní kost bez známek patologie. Na CBCT je implantát bez strukturálních změn, k desintegraci materiálu nedochází. Patrný je původní defekt v kosti distálně od implantátu (viz obr. 7)



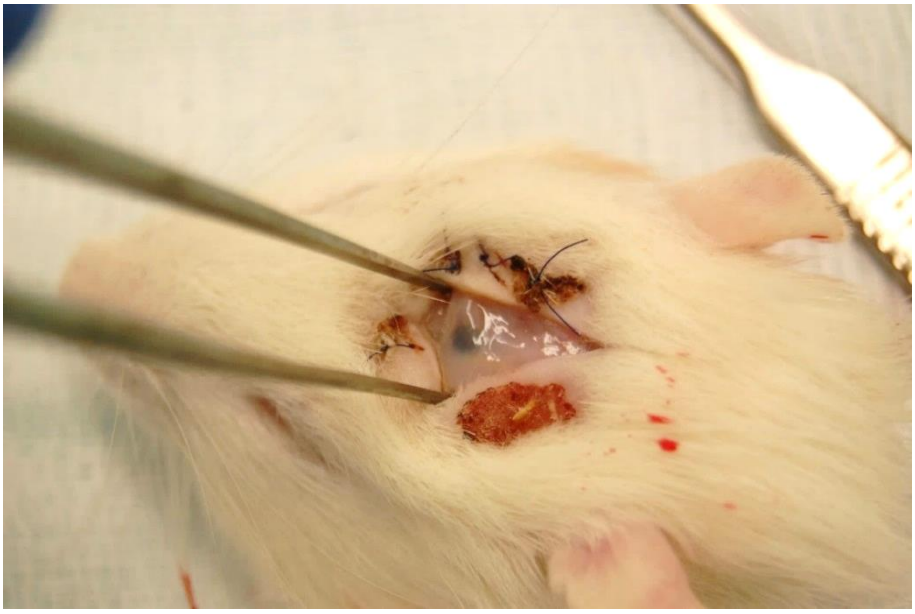
Obr. 7 Pelota ze slitiny WE43, první odběr, 2. týden. Pelota je posunuta anteriorně, distálně je patrný defekt kosti v místě původní implantace, pelota je bez strukturálních změn

Měkké tkáně nad implantátem ze slitiny Zn-1,6Mg jsou také vyklenuty v důsledku přítomnosti plynu. Kovová pelota je vhojena v periostu, resp. ji periost přerůstá z povrchu a mezi kostí a pelotou je tenká vazivová vrstva. V těsném okolí peloty se nachází hustý žlutý zánětlivý exsudát. Tvar peloty je zachován, k desintegraci peloty nedochází (viz obr. 8).



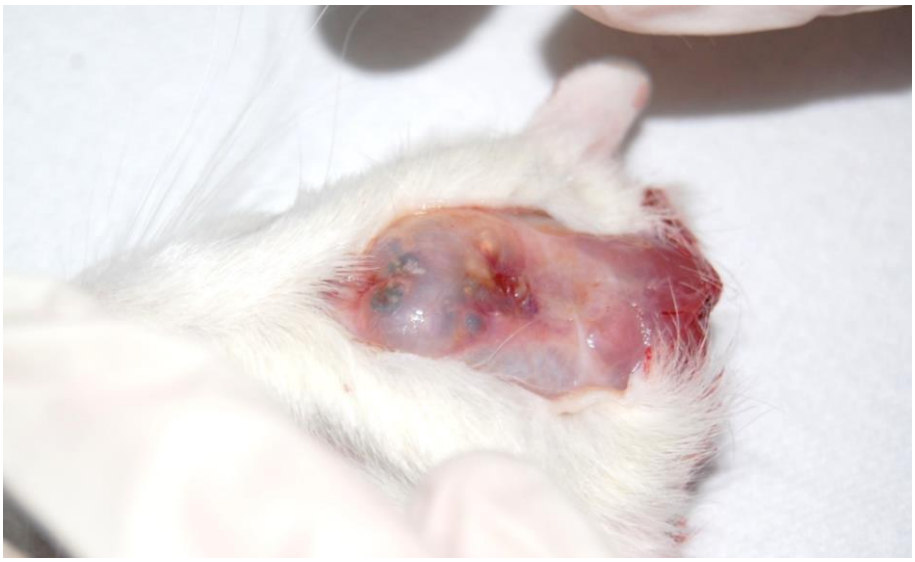
Obr. 8 Pelota ze slitiny Zn-1,6Mg, první odběr, 2. týden. Výrazné vyklenutí měkkých tkání je patrno nad pelotou, která je zachována beze změn

Druhý odběr proběhl 4 týdny po implantaci. Implantát ze slitiny WE43 je v kosti volně, pelota je posunuta z původního místa implantace anteriorně stejně jako v 1. odběru, nedošlo tedy k oseointegraci implantátu, makroskopicky ani ke vzniku vazivové mezivrstvy mezi kostí a povrchem implantátu. Kost v okolí peloty je makroskopicky normální, rána nejeví známky přítomnosti zánětu. Subperiostálně je přítomný plyn, ve srovnání se vzorkem ze slitiny Zn-1,6Mg ze stejného odběru je plyn přítomen v menším množství (viz obr. 9).



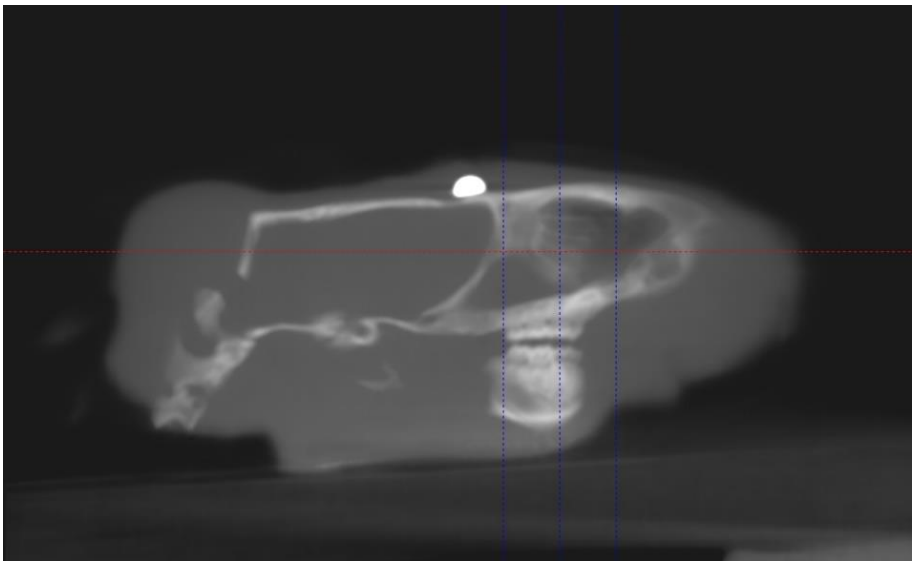
Obr. 9 Pelota ze slitiny WE43, druhý odběr, 4. týden. Subperiostálně se nachází malé množství plynu, pelota má zachovalý tvar a je posunuta mírně anteriorně

V okolí implantátu ze slitiny Zn-1,6Mg jsou měkké tkáně napnuty vlivem přítomného plynu (nachází se subperiostálně, ve větším množství ve srovnání se slitinou WE43 ve stejném odběru), měkké tkáně jsou zhojeny ad integrum. Došlo k fragmentaci materiálu. V okolí fragmentů je přítomen žlutý kašovitý exsudát. Viz obr. 10.



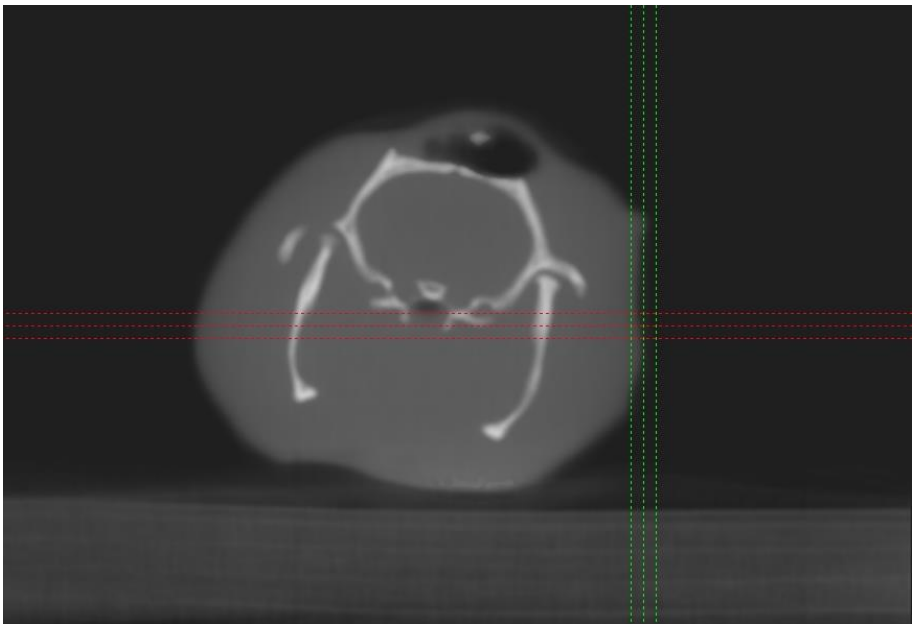
Obr. 10 Pelota ze slitiny Zn-1,6Mg, druhý odběr, 4. týden. Na fotografii je patrné výraznější vyklenutí periostu vlivem přítomnosti plynu, subperiostálně je přítomen žlutý exsudát, patrny jsou fragmenty materiálu

Třetí odběr proběhl 6 týdnů po implantaci. Pelota ze slitiny WE43 je zachována v původním tvaru, makroskopicky i dle CBCT je bez strukturálních změn. Plyn v měkkých tkáních není přítomen, měkké tkáně jsou zhojeny, kost v okolí peloty nejeví známky zánětu. Pelota je v ráně otočena o 180° kolem horziontály. Viz obr. 11.



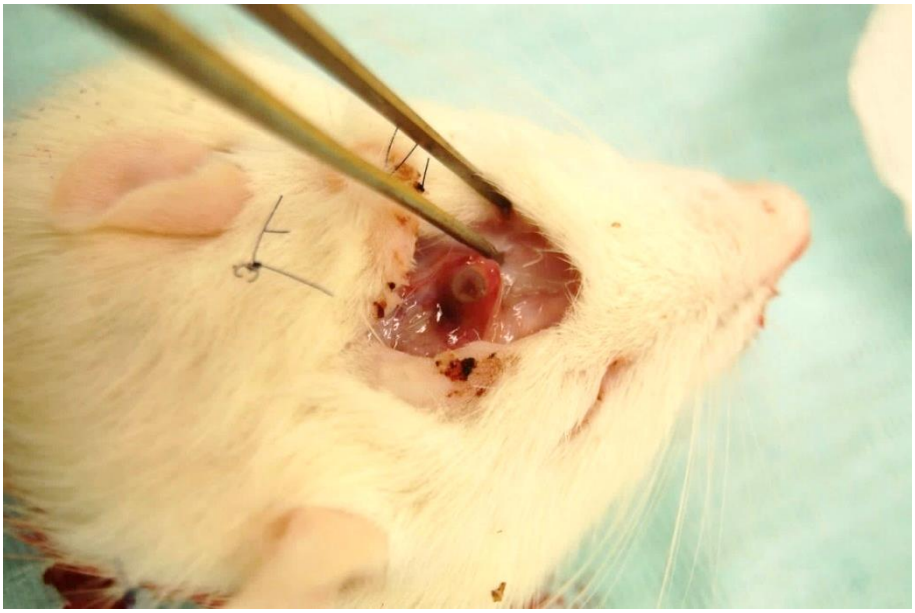
Obr. 11 Pelota ze slitiny WE43, třetí odběr, 6. týden po implantaci. Pelota je otočena o 180°kolem horizontály, je bez strukturálních změn. Evidentní je absence plynu v měkkých tkáních. Kost i měkké tkáně jsou bez známek patologie

V měkkých tkáních nad místem implantace peloty ze slitiny Zn-1,6Mg je stále přítomen plyn, ve srovnání s předchozím odběrem v menším množství. Je patrna již pokročilá degradace materiálu, nalezen je pouze drobnější fragment, resp. došlo ke změně tvaru peloty. Povrch peloty je nepravidelný. Ve srovnání s původní pelotou je průměr její základny poloviční. CBCT ukazuje, že fragment materiálu je dislokován mimo kost. V kosti je mělký defekt, dochází tedy k hojení kosti. Měkké tkáně i kost nejeví známky zánětu. Viz obr. 12.



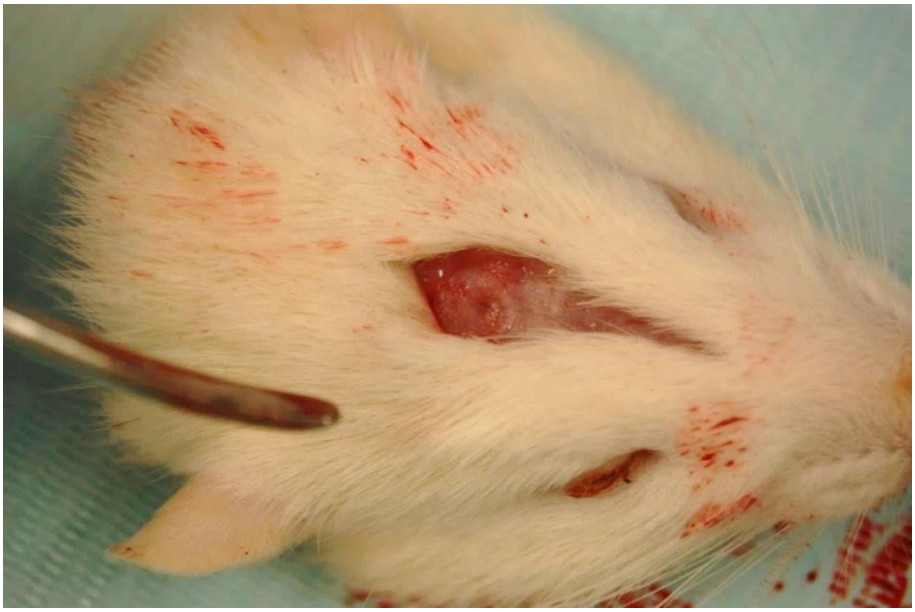
Obr. 12 Pelota ze slitiny Zn-1,6Mg, třetí odběr, 6. týden. Patrna je výrazná fragmentace materiálu, resp. pokročilá degradace, kdy pelota postrádá původní tvar. Množství plynu v měkkých tkáních nad implantátem je zde v menším množství ve srovnání s předchozím odběrem

Čtvrtý odběr proběhl 8 týdnů po implantaci. Měkké tkáně nad místem implantace peloty ze slitiny WE43 jsou zhojeny, již bez známek přítomnosti plynu. Pelota je kompletně přehojena vazivem z vnější strany i ze strany přivrácené ke kosti. Tkáně nejeví známky zánětu. Nález je prakticky identický s nálezem v pátém odběru. Viz obr. 13.



Obr. 13 Pelota ze slitiny WE43, čtvrtý odběr, 8. týden. Pelota je kompletně vhojena ve vazivové jizvě

Rána po implantaci peloty ze slitiny Zn-1,6Mg je zhojena, v kosti je mělký defekt, kov nebyl nenalezen. Na podkladě toho lze předpokládat, že došlo ke kompletní desintegraci materiálu. Plyn v měkkých tkáních nebyl přítomen. Viz obr. 14.



Obr. 14 Pelota ze slitiny Zn-1,6Mg, čtvrtý odběr, 8. týden. Je patrný defekt v kosti v místě po implantaci peloty, pelota nebyla nenalezena

Pátý odběr proběhl v 10. týdnu po implantaci. Pelota ze slitiny WE43 má nezměněný tvar vůči stavu při zavedení. Je vhojena ve vazivové jizvě, okolní kost je bez strukturálních změn. Defekt v kosti pod pelotou je stále patrný, mělčí, než jak byl vytvořen. Tkáně v okolí místa implantace nejeví známky zánětu či přítomnosti plynu a jsou dobře zhojeny. Nález u peloty ze slitiny Zn-1,6Mg je téměř identický s odběrem v 8. týdnu, tj. bez známek přítomnosti plynu v měkkých tkáních, kov v místě implantace nebyl nalezen. Kost je normálního vzhledu s mělkým defektem v místě implantace (mělčí ve srovnání s 4. odběrem v 8. týdnu). Viz obr. 15.

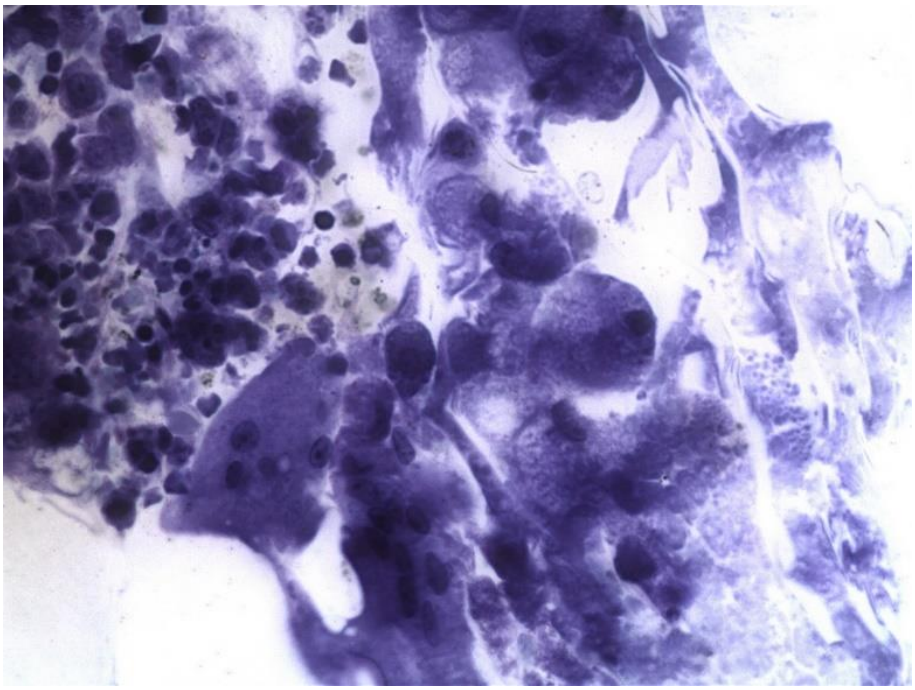
Obr. 15 Pelota ze slitiny Zn-1,6Mg, pátý odběr, 10. týden. Pelota nebyla nalezena, v místě implantace je vidět hojící se defekt kosti

5.1.2 Histopatologické vyšetření

5.1.3 Nález u skupiny A (Zn-1,6Mg)

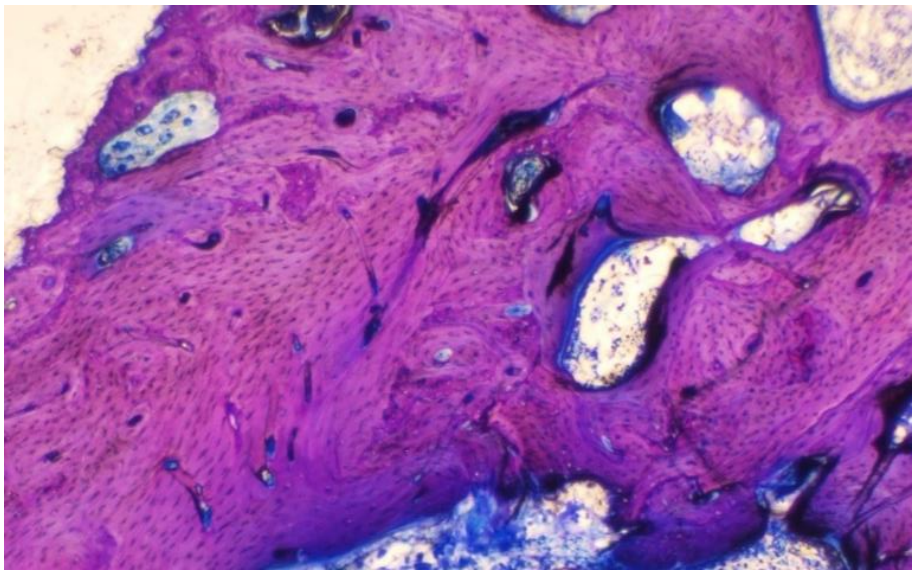
První odběr: patrné jsou v preparátu zbytky hemoragie, zánětlivá reakce je mírná s převahou lymfocytů, nemá destruktivní charakter. Přítomny jsou granulomy z cizích těles, místy fibroplasie.

Druhý odběr: místy je přítomna reakce z cizích těles (viz obr. 16), výrazněji je přítomna fibrózní reakce. Nalezené cévy jsou bez známek trombózy, nejedná se o novotvořené cévy. Jsou přítomny kostní kavity.



Obr. 16 Pelota ze slitiny Zn-1,6Mg, druhý odběr, 4. týden. Fotografie z optického mikroskopu, zvětšeno 20x, obraz ukazuje obrovskonuněčnou celulizaci v kosti po implantaci peloty Zn-1,5Mg

Třetí odběr: patrná je výraznější zánětlivá reakce, přítomna je granulační tkáň i granulomy z cizích těles. Výraznější je i složka fibroproliferace. Viz obr. 17.



Obr. 17 Preparát kosti po imlantaci peloty ze slitiny Zn-1,6Mg, třetí odběr, 6. týden. Nález obrovskobuněčných granulomů v kosti v okolí peloty. Zvětšeno 20x

Čtvrtý odběr: nález je podobný třetímu odběru, je přítomna zánětlivá kulatobuněčná infiltrace a fibrózní složka, která se vyskytuje ale v menší míře ve srovnání s třetím odběrem. Místy jsou přítomny granulomy z cizích těles, v okolí peloty se nachází i polymorfonukleáry.

Pátý odběr: je přítomna kulatobuněčná infiltrace, která je výraznější ve dřeni (dif. dg. připadá v úvahu hematopoetická tkáň kostní dřeně). Místy se vyskytuje reakce z cizích těles, ovšem méně ve srovnání se třetím a čtvrtým odběrem), ojediněle jsou přítomny i megakaryocyty.

5.1.4 Nález u skupiny B (WE43)

První odběr: v okolí defektu je v kosti malá zánětlivá reakce, je přítomen náznak granulomu, nikoli ale granulom z cizích těles. V jednom z preparátů jsou pravděpodobně i buňky z cizích těles, tento konkrétně je obtížně hodnotitelný pro svoji tloušťku.

Druhý odběr: je patrna fibrózní reakce, vazivo není vyzrálé, taktéž je zde granulom, nikoli granulom z cizích těles. Zánětlivá reakce je přítomna mírně.

Třetí odběr: zánětlivá reakce je minimální, je zde mírná fibrózní reakce, ta ale nemá granulomatózní charakter.

Čtvrtý odběr: je přítomna výrazná fibrózní komponenta, zánětlivá složka je minimální, jsou přítomny megakaryocyty.

Pátý odběr: zánětlivá složka je zcela minimální, výraznější je fibroplazie, granulomy nejsou přítomny.

5.1.5 Elektronová mikroskopie, energetická disperzní spektrometrie

Tabulka 7 zhodnocuje rozložení prvků dle analýzy energetickou disperzní spektrometrií (pomocná tabulka k obr. 18) v okolí peloty ze slitiny Zn-1,6Mg z 2. odběru, tj. 4 týdny po implantaci. Snímky z elektronové mikroskopie, obr. 18 a 19, ukazují degradaci peloty. Dochází k degradaci materiálu z povrchu, současně vzniká i vnitřní fraktura materiálu. Na obr. 18 jsou znázorněny konkrétní body, které odkazují na tabulku 7.

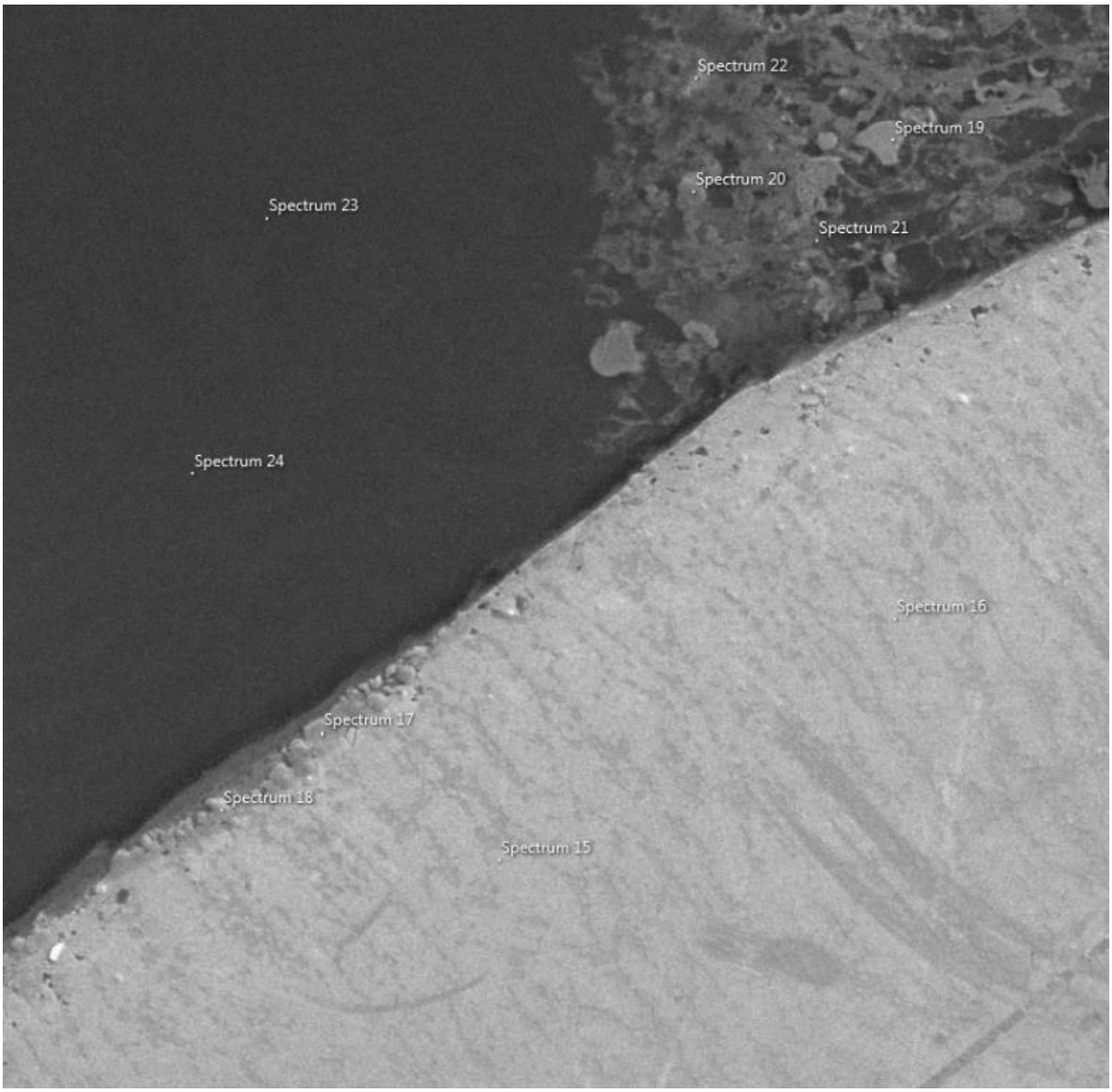
Obr. 20 je snímek z elektronového mikroskopu peloty ze slitiny Zn-1,6Mg z 2. odběru, tj. 4. týden, je patrné, že okraje jsou výrazně nepravidelné. Obr. 21 je snímek peloty ze slitiny WE43 ze 4. odběru, kdy mikroskopicky dochází již k patrné degradaci materiálu.

Limitem použití obou metod (SEM a EDS) v této práci byl příliš rychlý rozpad pelot Zn-1,6Mg. Z toho důvodu se podařilo analyzovat ze skupiny A v první fázi experimentu pouze pelotu z prvních dvou odběrů. Na snímku z elektronového mikroskopu je patrné výrazné zastoupení zinku v okolí peloty (obr. 18). Obr. 21 zachycuje okraje peloty ze slitiny WE43. Ve srovnání

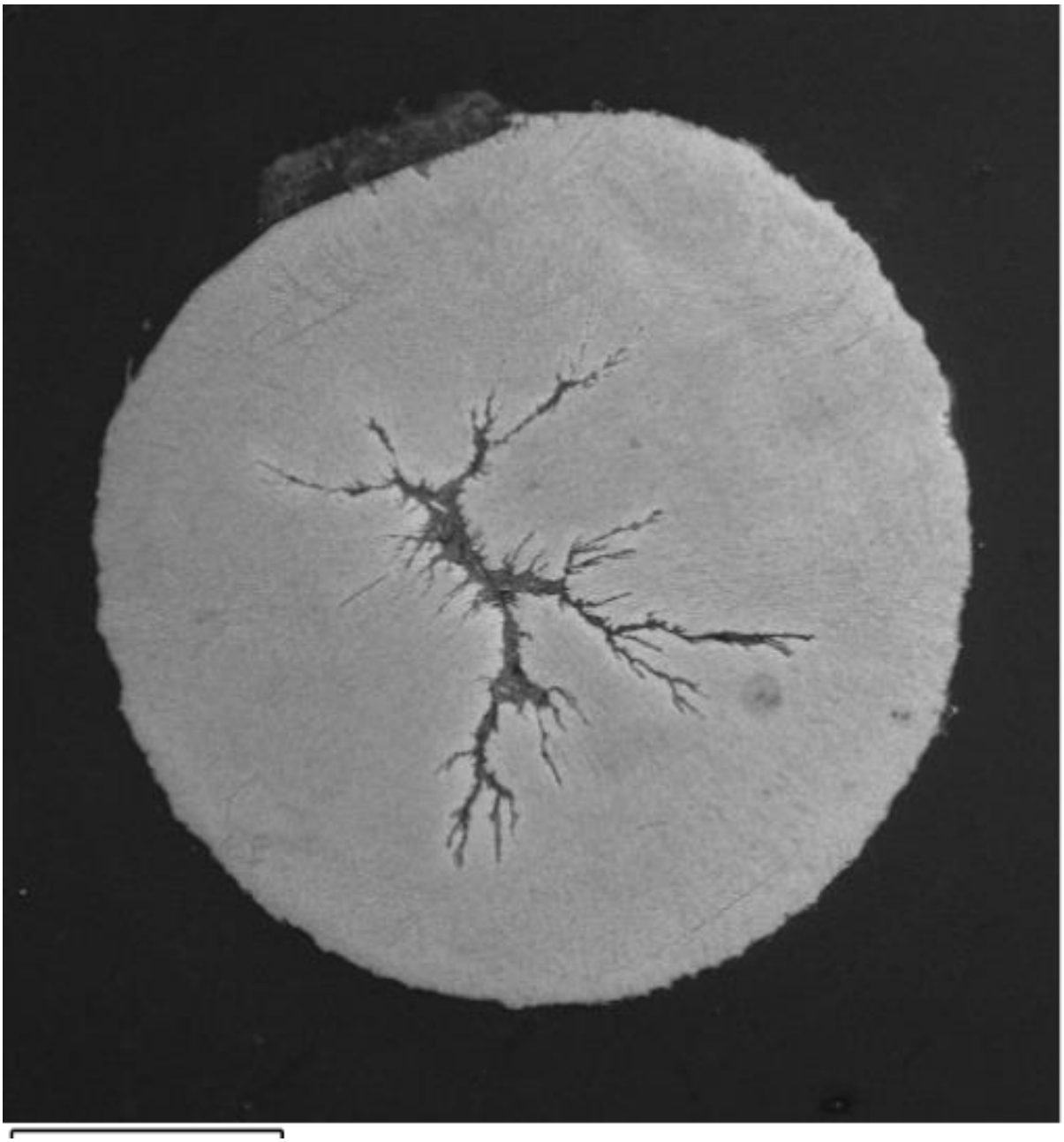
s tím obr. 20 ukazuje výraznější nerovnosti okrajů peloty ze slitiny Zn-1,6Mg z druhého odběru, tj. 4. týdne. To odpovídá pokročilejší degradaci vzorku slitiny Zn-1,6Mg. Metoda EDS v kombinaci se SEM byla v této práci použita okrajově. Důvodem pro jejich použití je další výzkum chování slitin během degradace, posouzení jejich mikrostruktury a rozložení reziduí v okolí.

Hmotnostní %	C	N	O	Na	Mg	Si	P	K	Ca	Zn
Spectrum 15					0	1				99
Spectrum 16										100
Spectrum 17	36									64
Spectrum 18	46									54
Spectrum 19			20	6			0		1	73
Spectrum 20	27	4	30	2	0		12	0	11	13
Spectrum 21	43		19	2			7	1	7	22
Spectrum 22	46		28	2			7		7	11
Spectrum 23	85		15							
Spectrum 24	83		17							

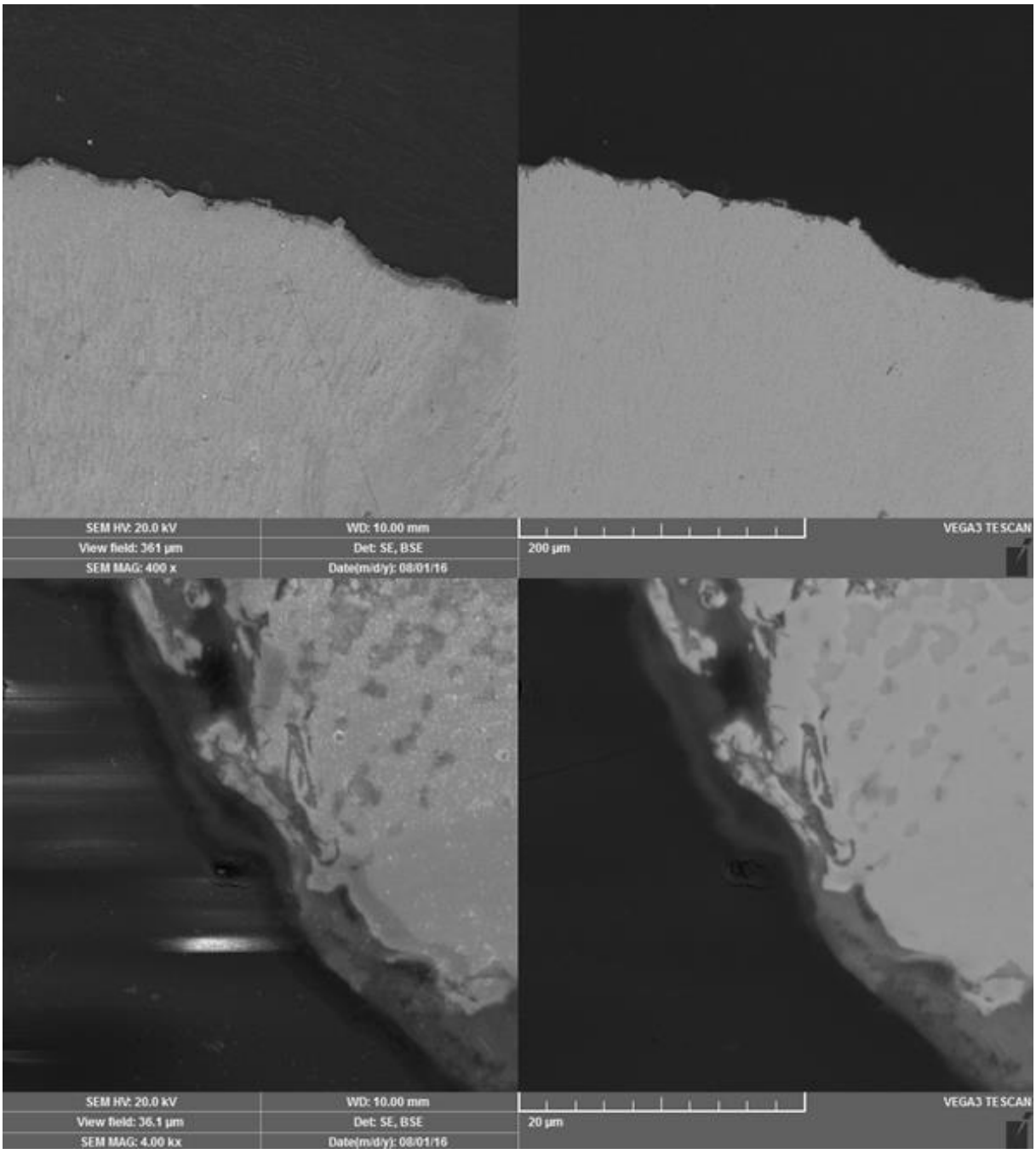
Tbl. 7 Přehled rozložení prvků v okolí peloty ze slitiny Zn-1,6Mg z druhého odběru, tj. 4 týdny po implantaci. Jednotlivé lokalizace vyznačené v tabulce odkazují na obr. 18, tj. na snímek z elektronového mikroskopu. Z tabulky a přiložené ilustrace je patrná probíhající degradace materiálu



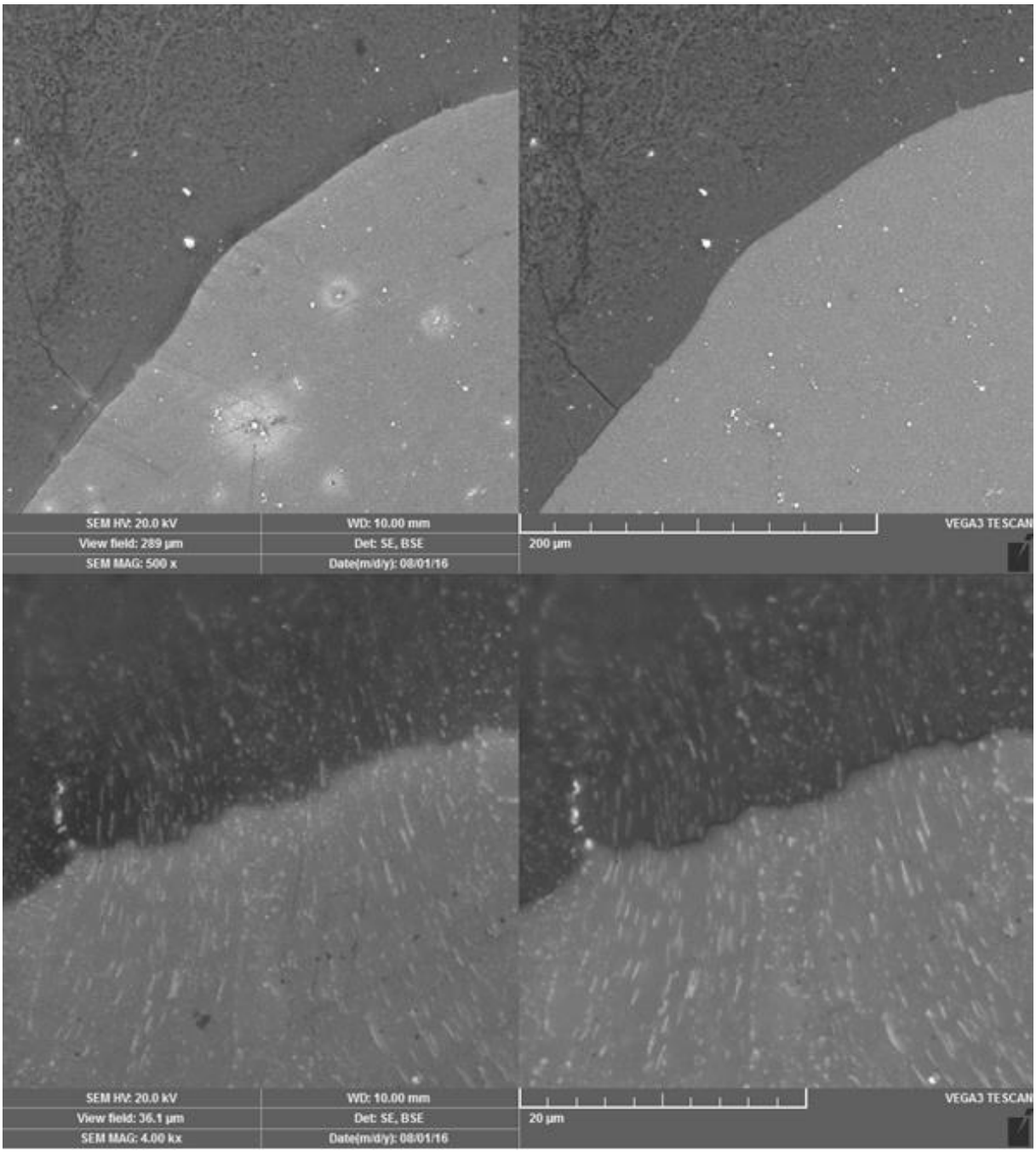
Obr. 18 Pelota ze slitiny Zn-1,6Mg, druhý odběr, 4. týden. Energetická disperzní spektrometrie, snímek z elektronového mikroskopu, snímek ukazuje degradaci peloty. Body označené jako „Spectrum" s číselnou hodnotou odkazují na související tabulku 7, která zaznamenává rozložení jednotlivých prvků v okolí degradujícího materiálu



Obr. 19 Pelota ze slitiny Zn-1,6Mg, druhý odběr, 4. týden. Energetická disperzní spektrometrie, snímek z elektronového mikroskopu, patrná je degradace peloty



obr. 20 Pelota ze slitiny Zn-1,6Mg, druhý odběr, 4. týden; degradace materiálu, nerovnost povrchu, snímek z elektronového mikroskopu



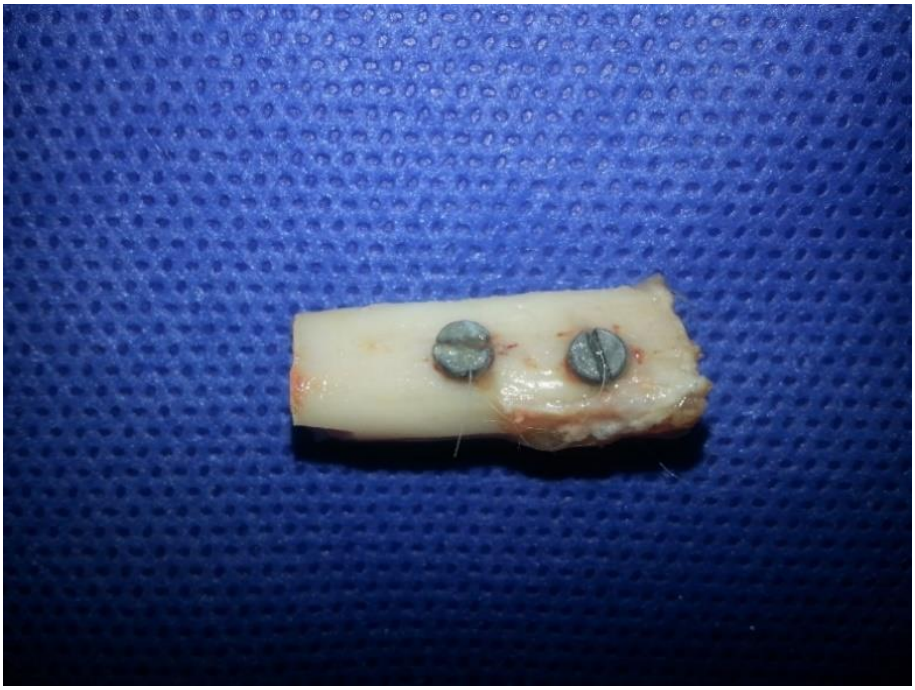
Obr. 21 Pelota ze slitiny WE43, čtvrtý odběr, 8. týden, snímek z elektronového mikroskopu ukazuje nerovnosti povrchu s pomalou degradaci materiálu

5.2 Druhá fáze experimentu

5.2.1 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.

První odběr proběhl 4 týdny po implantaci. Zvíře ze skupiny I, tj. s implantáty z titanu, má měkké tkáně v místě implantace zhojeny per primam intentionem, kostní tkáň v okolí vrutů je makroskopicky bez patologie. Oba vruty se nachází v místě, kam byly implantovány, v kosti jsou pevně, nevykazují pohyblivost. Nad vruty ze slitiny WE43 došlo ke zhojení měkkých tkání per primam intentionem, není patrna přítomnost plynu (nejsou vyklenuty měkké tkáně). Oba vruty jsou nalezeny v místě, kam byly implantovány, nevykazují známky pohyblivosti. Okolní kost nejeví makroskopicky známky patologie. Viz obr. 22.



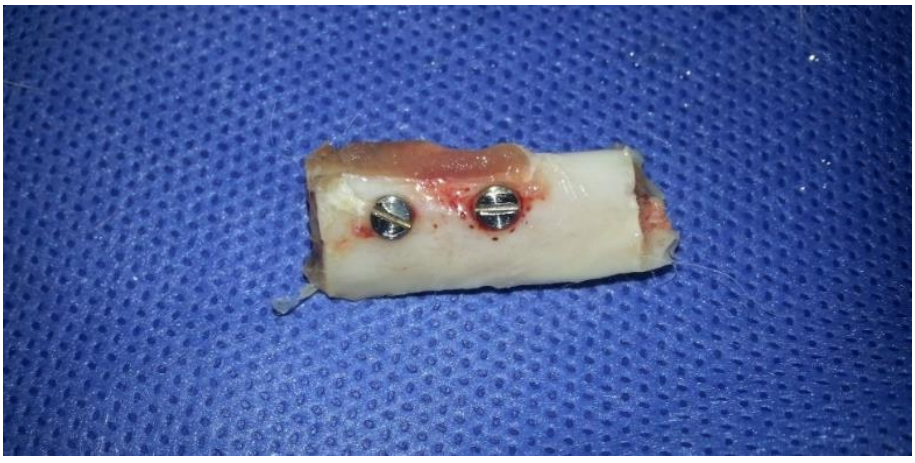
Obr. 22 První odběr, vruty ze slitiny WE43, 4 týdny po implantaci. Oba vruty jsou v místě, kam byly implantovány, pevně v kosti

Druhý odběr proběhl 8 týdnů po implantaci. Měkké tkáně nad implantáty z titanu jsou zhojeny bez známek proběhnuvšího zánětu, kost v okolí obou implantátů nejeví známky patologie. Oba vruty jsou přítomny v původním místě implantace. Oba implantáty ze slitiny WE43 jsou vhojeny v kosti bez známek pohyblivosti, resp. hlavici jednoho z vrutů přerůstá kost. Okolní kost i měkké tkáně jsou makroskopicky bez patologie. V průběhu hojení ani během odběru nebyla zaznamenána přítomnost plynu, resp. vyklenutí měkkých tkání vlivem jeho přítomnosti. Viz obr. 23.

Obr. 23 Vruty ze slitiny WE43, druhý odběr, 8. týden. Hlavice kaudálního vrutu je přehojena kostí

Třetí odběr proběhl 12 týdnů po implantaci. Měkké tkáně nad implantáty z titanu jsou zhojeny bez známek proběhnuvšího zánětu, kost v okolí obou implantátů nejeví známky patologie. Oba vruty jsou přítomny v původním místě implantace. Nad vruty ze slitiny WE43 jsou měkké tkáně dobře zhojeny, kost v okolí implantátů je makroskopicky bez patologie. Téměř kompletně jsou hlavy obou vrutů přehojeny kostí.

Čtvrtý odběr proběhl 16 týdnů po implantaci. Měkké tkáně nad implantáty z titanu jsou zhojeny bez známek zánětu, kost v okolí obou implantátů také nejeví známky patologie. Oba vruty jsou přítomny v původním místě implantace. Makroskopický nález je prakticky identický s předchozími odběry. Viz obr. 24.



Obr. 24 Implantáty z Ti, čtvrtý odběr, 16 týden. Oba implantáty jsou nalezeny v místě původní implantace, pevně v kostní štole. Okolní kost nejeví známky patologie. Nález je identický ve všech odběrech

Měkké tkáně nad vruty ze slitiny WE43 jsou zhojeny ad integrum. Během hojení i v době odběru nejeví známky přítomnosti plynu. Kraniální vrut byl implantován do blíže kolenního kloubu, než jak je tomu u předchozích odběrů. Místa zavedení obou implantátů jsou makroskopicky patrná, většina z hlav obou implanátů je přehojena kostí. Viz obr. 25.

Obr. 25 Vruty ze slitiny WE43, čtvrtý odběr, 16. týden. Jsou patrna místa, kde byly implantáty zavedeny, většina je přehojena kostní tkání

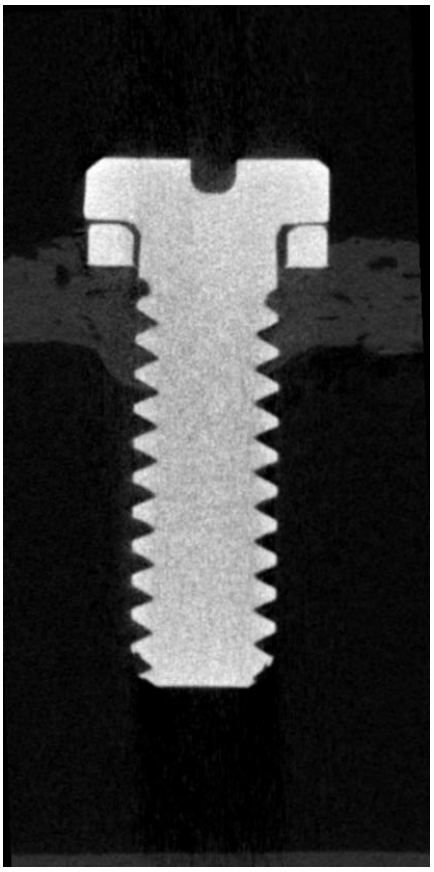
5.2.2 Mikrotomografie

Metoda hodnotí kvalitu a kvantitu kosti v okolí implantátu, stav implantátu a rozsah a způsob jeho degradace. Pomocí mikrotomografie jsou dále hodnoceny změny objemu a povrchu implantátu v jednotlivých časových bodech odběru. Zobrazení kostní tkáně v těsné blízkosti implantátu je rušeno artefakty z implantátu. Z toho důvodu bylo stanoveno jako nehodnotitelné okolí implantátu v šířce 50 μm a nebylo zahrnuto do hodnocení BIC.

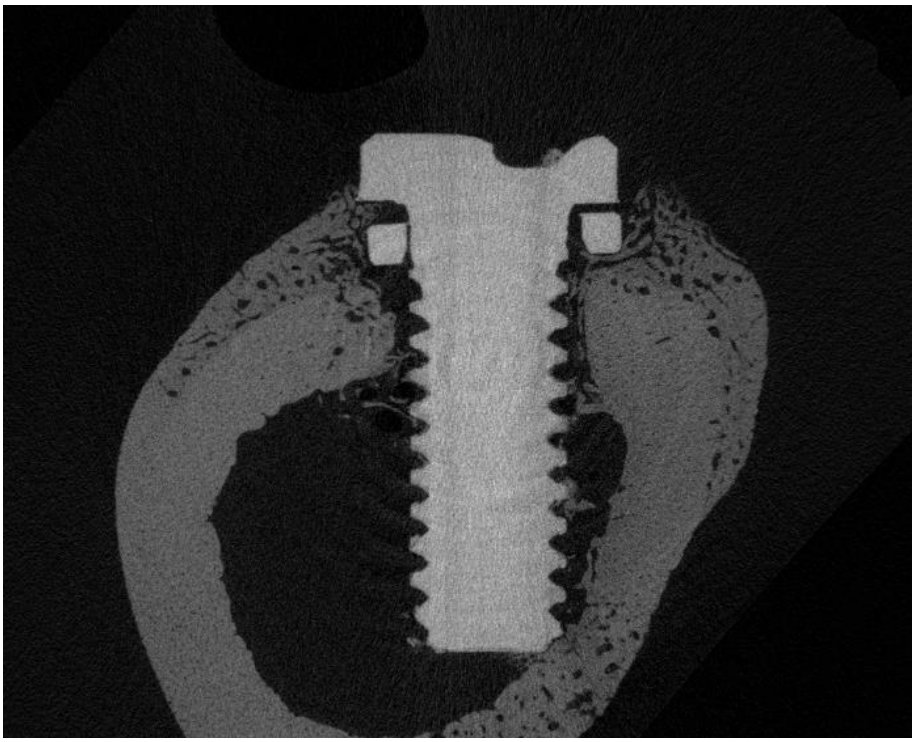
První odběr proběhl 4. týden po implantaci. Implantát ze skupiny I, tj. titanový, je v dobré pozici, tj. v místě, kde byl zaveden a nejeví známky patologie v okolní kosti. V okolní kosti není patrna kavitace. Nedochází ani ke změnám objemu a povrchu implantátu, to dále rozvádí výsledky statistické analýzy. Viz obr. 26. Změny objemu a povrchu titanových implantátů jsou

uvedeny v tabulce 8. Hodnotíme je jako zanedbatelné v průběhu celého experimentu. Bone-interface contact neboli BIC titanového implantátu dosahuje 51,35 %.

Vrut ze slitiny WE43 nejeví v prvním odběru známky degradace. Kostní tkáň se ve většině povrchu nedotýká stěn implantátu, je zde patrný volný prostor. Bone-interface contact, tj. kontakt novotvořené kosti s povrchem implantátu je ve 4. týdnu 36,05 %. Pokles objemu implantátu je zanedbatelný (z 9,22382 mm^3 na 9,21714 mm^3). Viz obr. 27. Statisticky nevýznamný je i nárůst povrchu z 41,23176 mm^2 na 42,73923 mm^2.



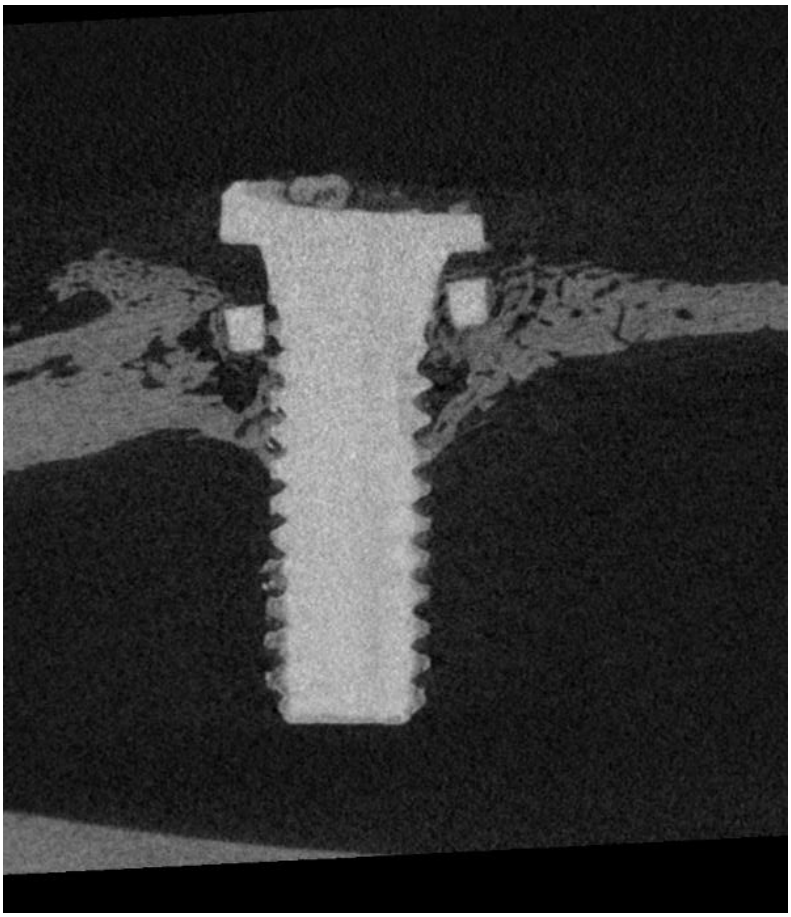
Obr. 26 Implantát z Ti, první odběr, 4. týden, patrna je dobrá pozice v kosti, implantát nejeví známky strukturálních změn. Snímek z mikrotomografie



Obr. 27 Implantát ze slitiny WE43, první odběr, 4 týdny po implantaci. Snímek z mikrotomografie. Implantát nepodléhá degradaci, závity i tělo vrutu jsou bez známek fraktury. Obraz byl publikován v práci autorky (Levorova J. et al., 2018)

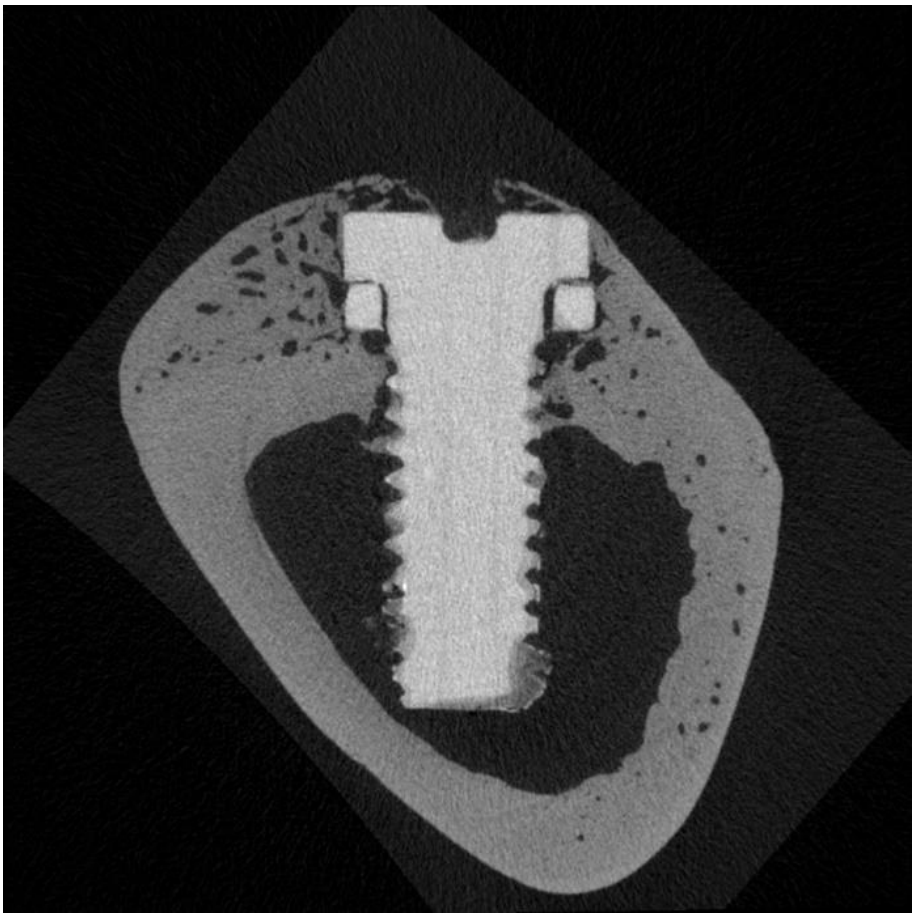
Druhý odběr proběhl v 8. týdnu po implantaci. U implantátů skupiny I nedochází ke změně oproti prvnímu odběru – oba implantáty jsou v dobré pozici. Hodnota BIC dosahuje 52,98 %.

U implantátu ze skupiny II je patrná částečná degradace závitů, k novotvorbě kosti v okolí implantátů dochází. Jeden z implantátů byl částečně kostí přehojen. Viz. Obr. 28 Pokles objemu i povrchu obou vrutů vůči výchozí hodnotě se pohybuje z původních 9,22382 mm^3 na 8,70481 mm^3, resp. 41,23176 mm^2 na 40,28379 mm^2. Tyto změny jsou statisticky nevýznamné. Hodnoty změn povrchu a objemu uvádí tabulka 9. BIC v 8. týdnu u WE43 dosahuje 44,76 %.



Obr. 28 Implantát ze slitiny WE43, 8. týden, druhý odběr. Implantát je částečně přehojen kostí. U některých závitů dochází k oslabení, degradaci. Snímek z mikrotomografie

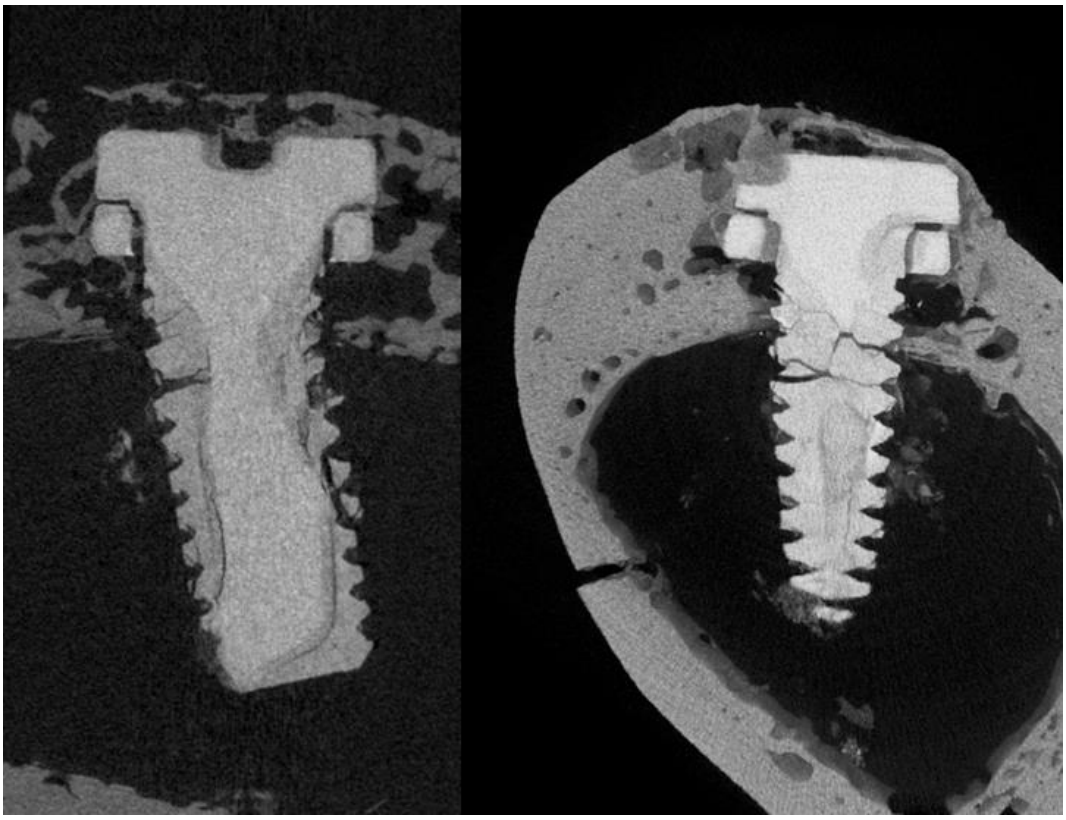
Třetí odběr proběhl 12 týdnů po implantaci. Kost v okolí implantátů ze skupiny I je bez patologie, průměrná hodnota BIC je 61,34 % (tzn. nárůst oproti předchozímu odběru). K degradaci implantátů ze skupiny II dochází v místě závitů, tj. v místě, kde je materiál nejtenčí. Na závitech v blízkosti apexu vrutu je patrný výraznější rozpad, zde dochází i k degradaci těla implantátu. Viz obr. 29. V okolí materiálu je patrná novotvorba kosti. BIC dosahuje 34,66 % (ve srovnání s přechozím odběrem klesá). Kavity v kosti vznikající přítomností plynu jsou obtížně odlišitelné od normální struktury kosti. Pokles objemu vrutů je zanedbatelný. Z původní hodnoty 9,22382 mm^3 klesá na 8,90217 mm^3. Nárůst povrchu z původních 41,23176 mm^2 na 49,23874 mm^2 je statisticky nevýznamný. Tyto hodnoty uvádí tabulka 9.



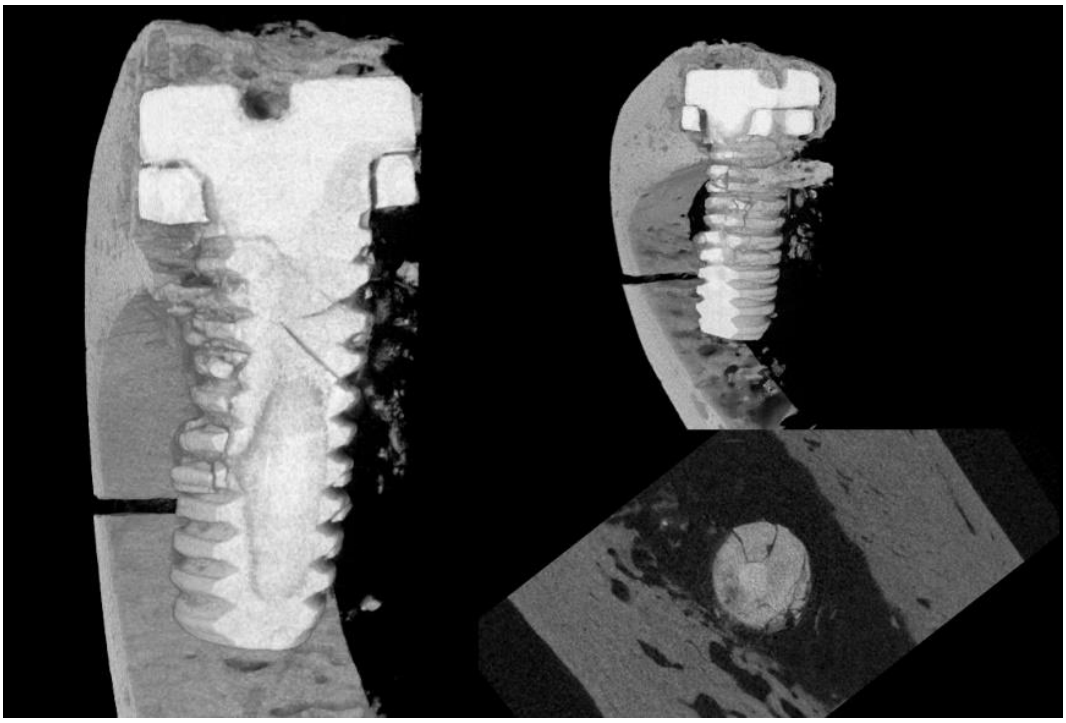
Obr. 29 Implantát ze slitiny WE43, 12. týden, třetí odběr. Implantát je přehojen kostí. Ve větší míře ve srovnání s druhým odběrem dochází k degradaci závitů. Snímek z mikrotomografie

Čtvrtý odběr proběhl 16 týdnů po implantaci. K vytvoření kosti došlo v okolí obou implantátů ze skupiny I. Jsou v dobré pozici stejně jako v ostatních odběrech a nejeví známky pohyblivosti. Stejně tak okolní kost nejeví známky patologie. BIC je nejvyšší ze všech odběrů, dosahuje 68,9 %.

U jednoho z vrutů ze skupiny II došlo k degradaci závitů a jejich odlomení. U stejného vrutu došlo i k fraktuře těla vrutu. Hlava vrutu je částečně přehojena kostí. Stav implantátů ukazují ilustrace - obr. 30, 31. U druhého implantátu dochází k fragmentaci bez možnosti rozeznání jednotlivých částí. Viz obr. 32 Pokles objemu je oproti výchozí hodnotě, tj. 9,22mm^3, signifikantní, a to o 55,1 %, tj. na 5,07mm^3. Signifikantní je i nárůst povrchu, z 41,23176 mm^2 na 137,6124 mm^2. Hodnoty uvádí tabulka 9. BIC dle mikrotomografie dosahuje 27,5 % (tzn., že má klesající tendenci).

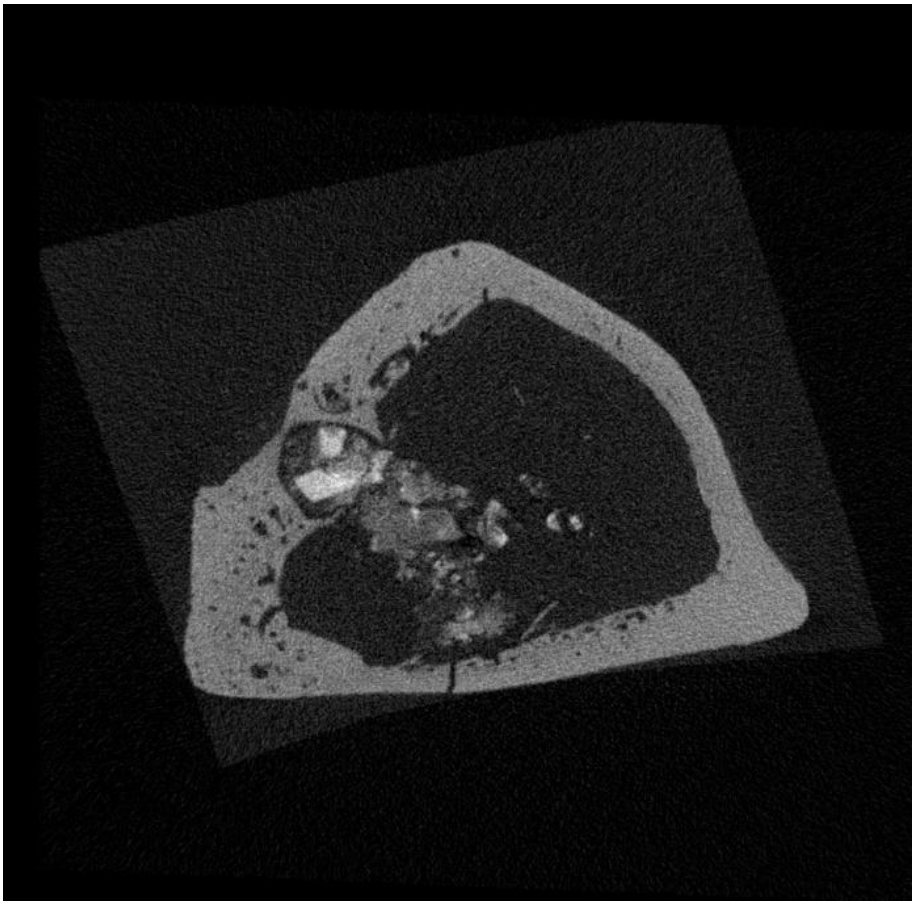


Obr. 30 Implantát ze slitiny WE43, čtvrtý odběr, 16. týden. Na snímku z mikrotomografie je vidět fraktura těla implantátu pod rozhraním horní a střední třetiny délky, odlomení závitů, místy jejich kompletní degradace. Obraz byl publikován v práci autorky (Levorova J. et al., 2018)



Obr. 31 Implantát ze slitiny WE43, čtvrtý odběr, 16. týden. Snímek z mikrotomografie. přitom vlevo a vpravo nahoře je 3D rekonstrukce obrazu, vpravo dole horizontální řez vrutem ve 2D zobrazení. Patrné jsou lomné linie

nepravidelně v téměř celém těle vrutu a odlomení závitů. Je patrná i fraktura kosti kolmá na dlouhou osu implantátu. Obraz byl publikován v práci autorky (Levorova J. et al., 2018)



Obr. 32 Implantát ze slitiny WE43, čtvrtý odběr, 16. týden. Snímek z mikrotomografie ukazuje kompletní fragmentaci vrutu bez možnosti diferenciace původního tvaru

5.2.3 Změna povrchu a objemu

Změnu objemu a povrchu u titanových implantátů shrnuje tabulka 8, dále zaznamenává změnu poměru povrch: objem. Tabulka 9 shrnuje změnu objemu a povrchu u implantátů ze slitiny WE43, zaznamenává také změnu poměru povrch: objem.

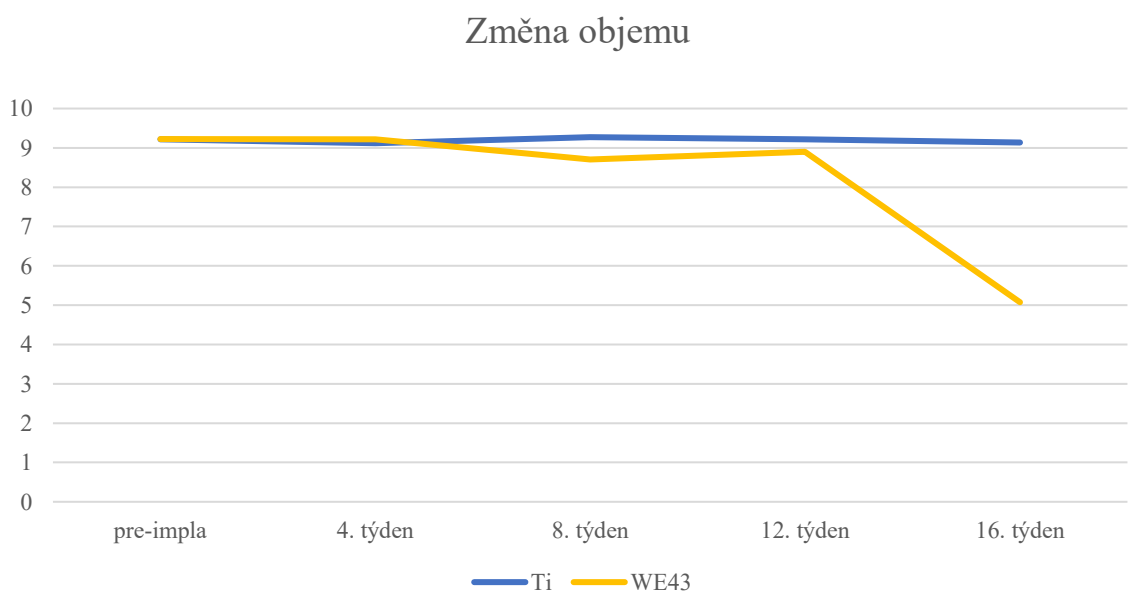
Ti	**pre-impla**	**4. týden**	**8. týden**	**12. týden**	**16. týden**
Objem [mm^3]	9,21569	9,11763	9,27201	9,21774	9,13967
Povrch [mm^2]	40,15187	39,61767	41,90119	40,95001	42,5589
Povrch/objem poměr [mm^{-1}]	4,35364	4,34517	4,51911	4,44252	4,6565

Tab. 8 Změna objemu a povrchu implantátů z Ti v jednotlivých týdnech v časech odběru. Pre-impla označuje stav před implantací.

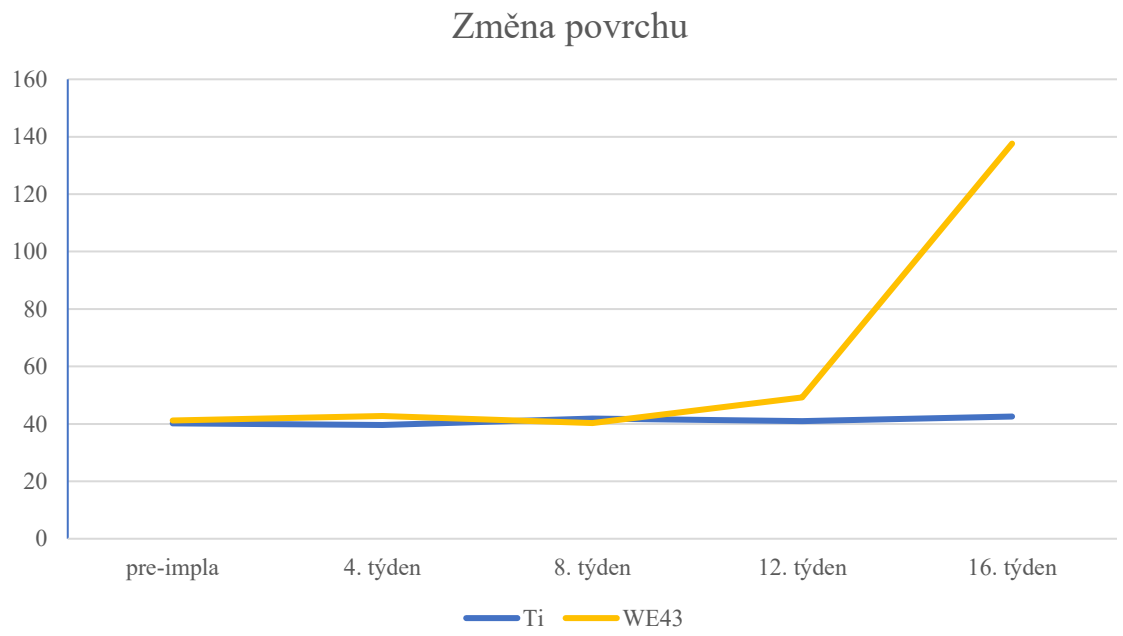
WE43	pre-impla	4. týden	8. týden	12. týden	16. týden
Objem [mm^3]	9,22382	9,21714	8,70481	8,90217	5,07448
Povrch [mm^2]	41,23176	42,73923	40,28379	49,23874	137,6124
Povrch/objem poměr [mm^{-1}]	4,46433	4,63693	4,62776	5,53109	27,11851

Tab. 9 Změna objemu a povrchu implantátů ze slitiny WE43 v jednotlivých týdnech v časech odběru. Pre-impla označuje stav před implantací.

Grafy 1 a 2 shrnují změny objemu a povrchu implantátů v čase. Výsledky z mikro-CT včetně naměřených hodnot objemů, povrchu a jejich poměru, včetně obrazové dokumentace a popis hodnocení výsledků je součástí publikované práce autorky. (Levorova J. et al., 2018)



Graf 1 Změna objemu implantátů ze slitiny WE43a z Ti v čase. Patrná je výrazná změna mezi 12. a 16. týdnem. Graf byl publikován v práci autorky (Levorova J. et al., 2018)



Graf 2 Změna povrchu implantátů WE43a Ti v čase. Patrná je výrazná změna mezi 12. a 16. týdnem. Graf byl publikován v práci autorky (Levorova J. et al., 2018)

Tabulka 10 ukazuje vývoj BIC u implantátů skupiny I a skupiny II v jednotlivých odběrech. Tabulka 11 ukazuje vývoj průměrné hodnoty BIC pro každou skupinu implantátů v jednotlivých odběrech.

BIC (%)	vzorek	týden	implantát
19,176	A	4	WE43
44,415	A	4	WE43
44,202	A	4	WE43
44,538	B	4	WE43
44,418	B	4	WE43
19,541	B	4	WE43

BIC (%)	vzorek	týden	implantát
48,86	A	4	Ti
51,96	A	4	Ti
46,68	A	4	Ti
50,04	B	4	Ti
52,83	B	4	Ti
57,72	B	4	Ti

44,43	A	8	WE43		49,43	A	8	Ti
50,82	A	8	WE43		54,25	A	8	Ti
46,59	A	8	WE43		55	A	8	Ti
39,73	B	8	WE43		52,22	B	8	Ti
40,8	B	8	WE43		51,9	B	8	Ti
46,18	B	8	WE43		55,05	B	8	Ti
35,66	A	12	WE43		61,11	A	12	Ti
31,41	A	12	WE43		69,19	A	12	Ti
30,91	A	12	WE43		65,18	A	12	Ti
35,37	B	12	WE43		55,42	B	12	Ti
36,84	B	12	WE43		58,95	B	12	Ti
37,77	B	12	WE43		58,21	B	12	Ti
12,966	A	16	WE43		68,33	A	16	Ti
30,895	A	16	WE43		72,75	A	16	Ti
23,712	A	16	WE43		62,03	A	16	Ti
44,298	B	16	WE43		75,54	B	16	Ti
19,96	B	16	WE43		66,86	B	16	Ti
33,39	B	16	WE43		67,86	B	16	Ti

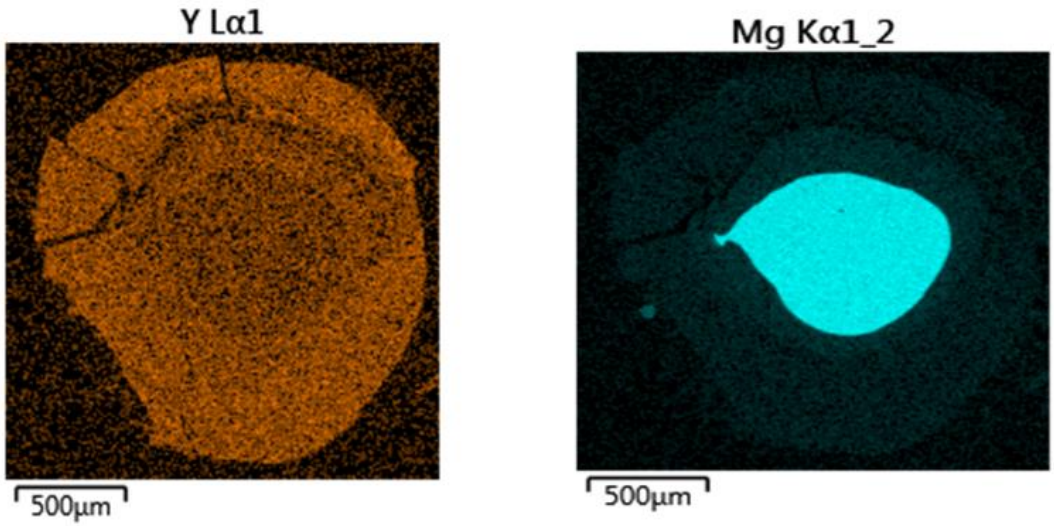
Tab. 10 Tabulka ukazuje BIC pro oba typy implantátů, tj. ze slitiny WE43 a z Ti v jednotlivých časových bodech. Jako A a B jsou označeny kraniální a kaudální implantát konkrétního jednoho zvířete

	BIC Ti	BIC WE43
4. týden	51,35	36,05
8. týden	52,98	44,76
12. týden	61,34	34,66
16. týden	68,9	27,54

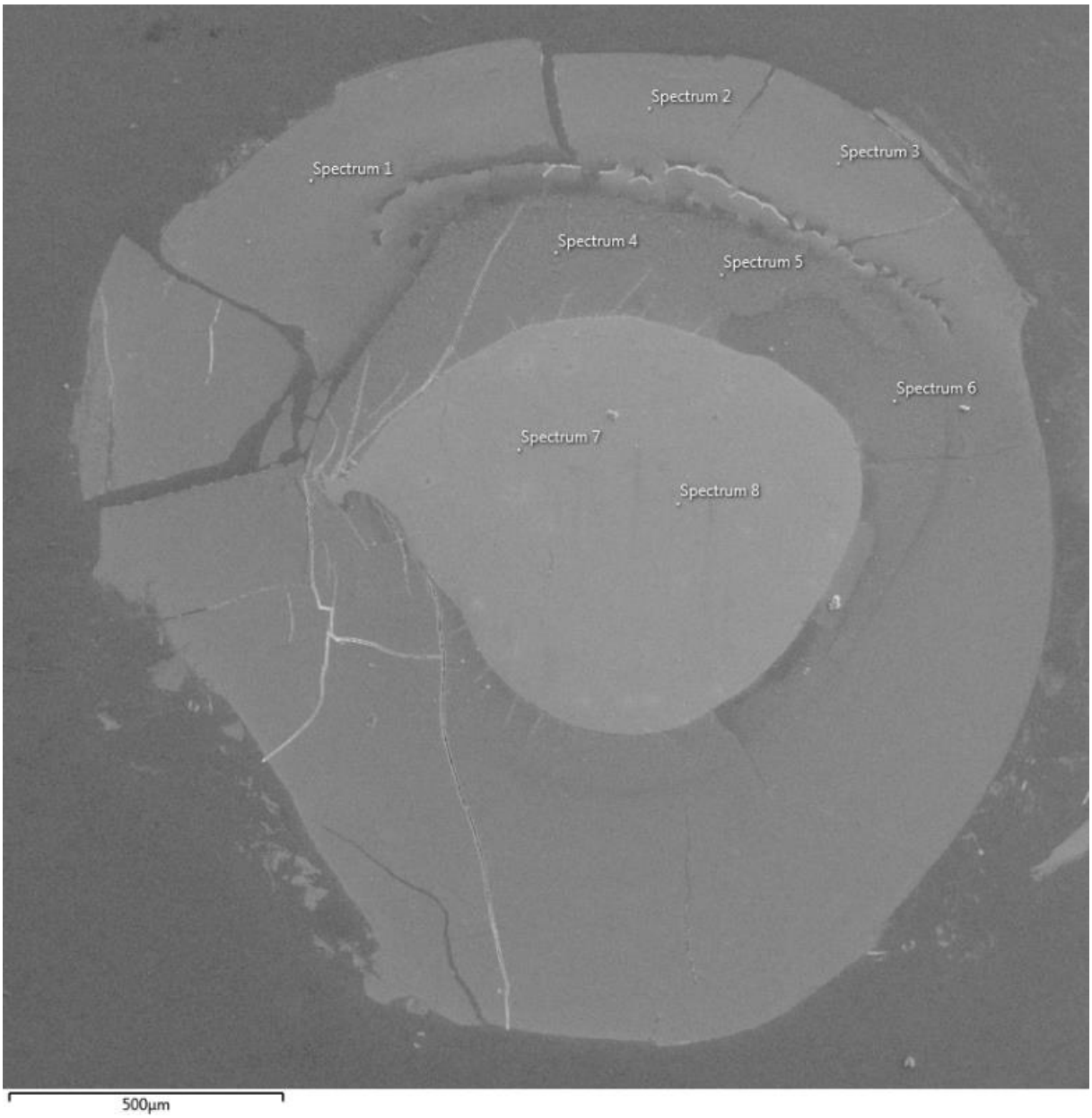
Tab. 11 BIC implantátů skupiny I a II (Ti a slitina WE43) v jednotlivých týdnech, vyjádřeno v %

5.2.4 Elektronová mikroskopie a energetická disperzní spektrometrie

Prvkové mapy yttria a magnesia a rozložení prvků v okolí vrutu ze slitiny WE43 jsou zobrazeny na Obr. 33. Prvkové mapy vyjadřují rozložení prvků v okolí vrutu ze slitiny WE43 ze 4. odběru. Byly pořízeny pomocí energetické disperzní spektrometrie, snímek je z elektronového mikroskopu. Obě zmiňované metody byly v práci použity jako pomocné. Obr. 34 pak s pomocnou tabulkou 12 ukazují rozložení dalších prvků v okolí degradujícího vrutu ze slitiny WE43 ve 4. odběru. Pro srovnání povrchu je uveden obr. 35, který ukazuje rovný povrch implantátu z titanu ve 4. odběru.



Obr. 33 Prvkové mapy – rozložení yttria a magnesia v okolí vrutu ze slitiny WE43, čtvrtý odběr, 16. týden. Snímek z elektronového mikroskopu, pořízeno pomocí energetické disperzní spektrometrie

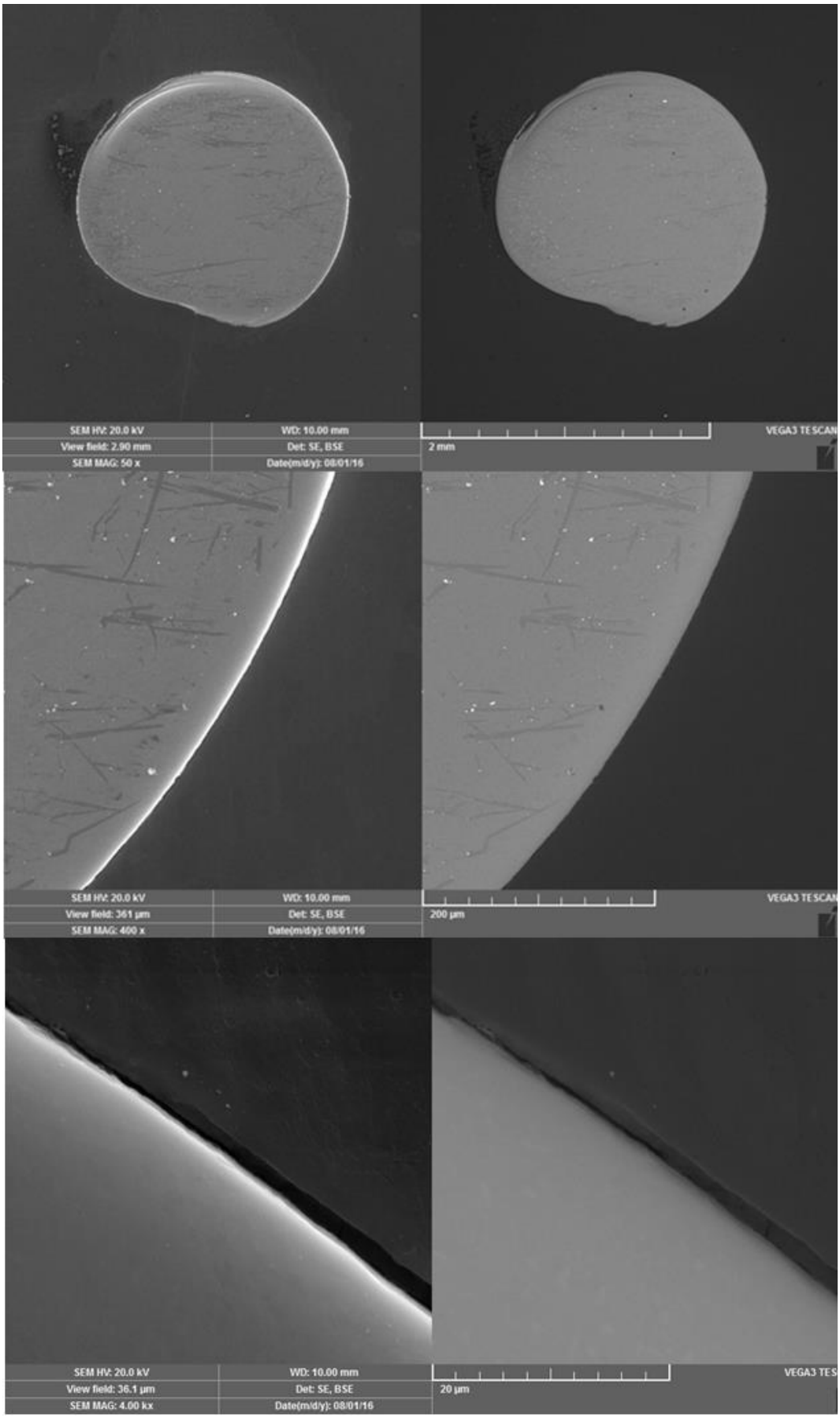


Obr. 34 Vrut ze slitiny WE43, čtvrtý odběr, 16. týden. Fotografie z elektronového mikroskopu ukazuje fragmentaci materiálu, je evidentní degradace vrutu. Zevní tmavší část je závit, světlejší část je tělo vrutu. Body označeny „Spectrum + číslo" jsou dále rozvedeny v tabulce 12

Hmotnostní %	**C**	**O**	**Mg**	**P**	**K**	**Ca**	**Zn**	**Y**	**Nd**
Spectrum 1	40	22	2	8	1	7		13	8
Spectrum 2	36	24	2	8	1	6	1	13	9
Spectrum 3	38	25	2	8	1	6	1	13	8

Spectrum 4	49	25	5	1	0	5	1	7	5
Spectrum 5	41	27	5	1	1	7		10	8
Spectrum 6	46	28	5		0	5		8	7
Spectrum 7			94					4	2
Spectrum 8	7	2	86					3	2

Tab. 12 Zastoupení a rozložení jednotlivých prvků v okolí vrutu ze slitiny WE43, čtvrtý odběr, 16. týden. Tabulka souvisí s obrazem 34. Body označené jako „Spectrum“ s číselnou hodnotou ukazují rozložení jednotlivých prvků v okolí degradujícího materiálu



Obr. 35 Vrut z Ti, čtvrtý odběr, 16. týden. Snímek z elektronového mikroskopu. Povrch implantátu je rovný, bez strukturálních změn

5.2.5 Histopatologické vyšetření

5.2.6 Nález u skupiny I (Ti)

První odběr: Na povrchu závitů jednoho vrutu se nachází černý pigment (je arteficielní – korundový písek), velmi tence se zde nachází fibrózní tkáň. U hrotu šroubu je náznak zánětlivé reakce – jen místně; kost není destruovaná, implantáty jsou vhojeny bez reakce. V malé míře jsou přítomny obrovské buňky.

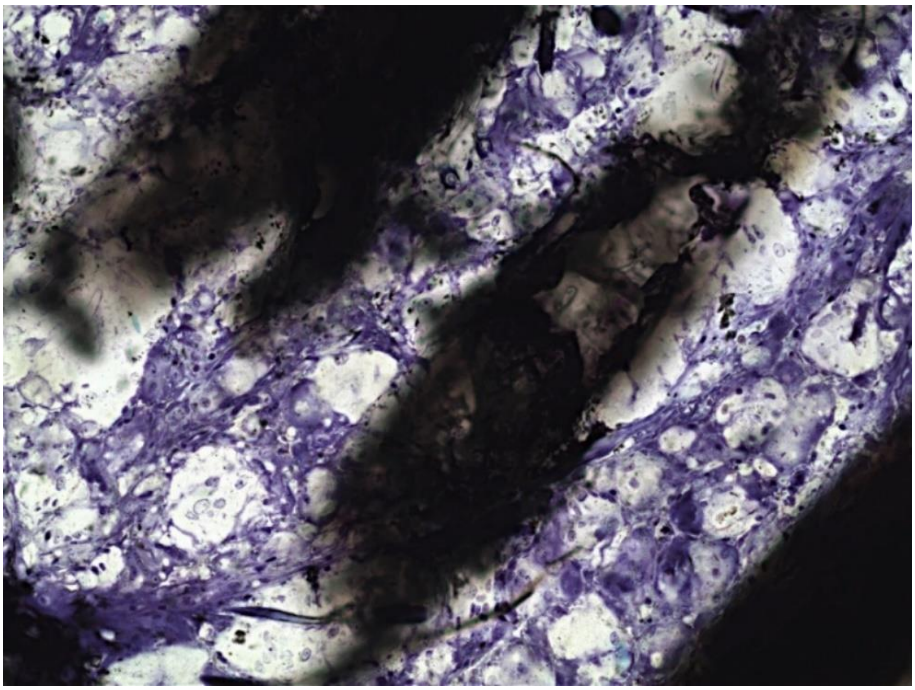
Druhý odběr: Na povrchu závitů je opět korundový písek. Dále je přítomna obliterující endarteriitis a v hloubce závitů jednoho vrutu je proliferující zánětlivá reakce. V malé míře jsou přítomny také makrofágy. Bez známek reakce z cizích těles. Je patrná periostální i endostální remodelace.

Třetí odběr: V okolí závitů je diskrétně přítomna fibrózní reakce, nemá granulomatózní charakter. Sporadicky je přítomna lymfocytární reakce. Okolí vrutu je bez osteoklastické resorpce, bez známek reakce z cizích těles. Periostální i endostální remodelace je výraznější.

Čtvrtý odběr: V okolí jednoho z vrutů je patrna velmi diskrétní zánětlivá reakce a fibrózní reakce, probíhá endostální remodelace, bohatá je tvorba kosti v okolí implantátů. Čtvrtý odběr je bez přítomnosti reakce z cizích těles.

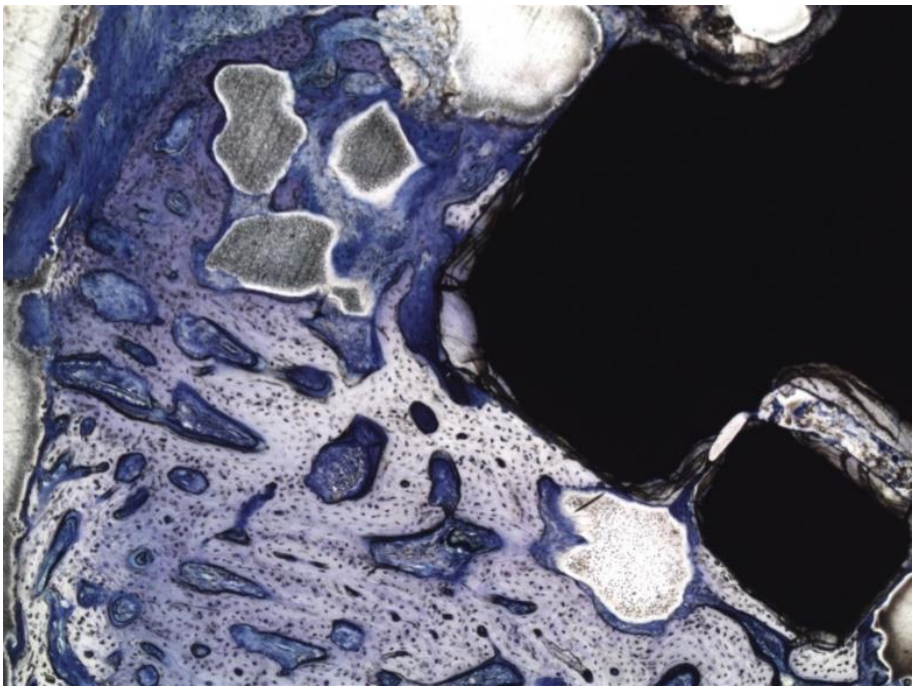
5.2.7 Nález u skupiny II (WE43)

První odběr: Je zastižena malá zánětlivá reakce v okolí vrutů. V okolní kosti jsou přítomny makrofágy a obrovské buňky (jsou i ve větší vzdálenosti od implantátu, může se jednat o reakci na šicí materiál), viz obr. 36. Je zachyceno malé množství lymfocytů v okolí. Kavitace kosti v okolí implantátu je přítomna. Fibroplazie není zastižena.

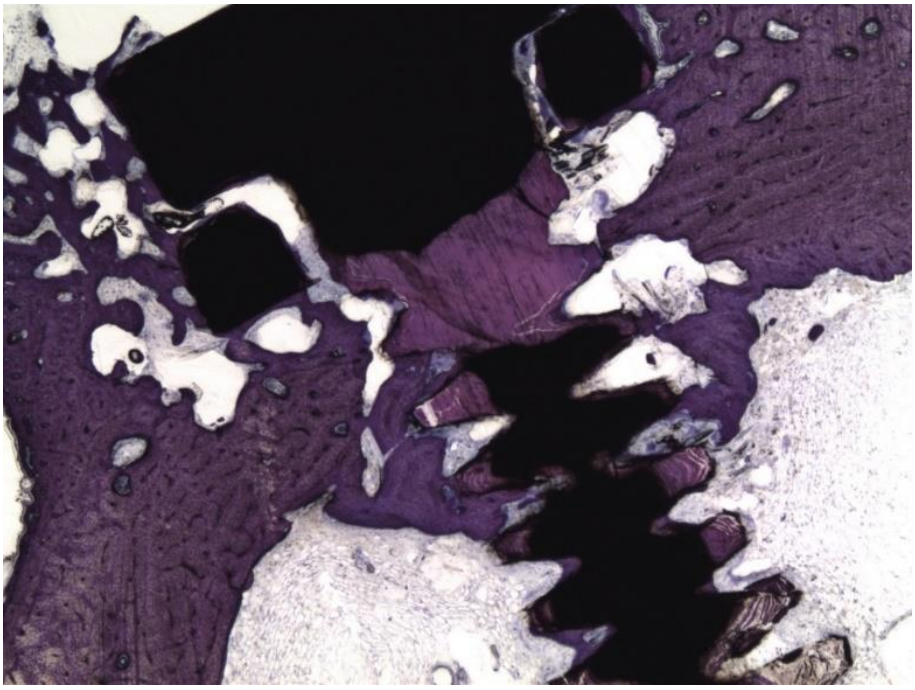


Obr. 36 Histopatologický preparát, zvětšeno 40x; vrut ze slitiny WE43, první odběr, 4. týden, mezi závity vrutu se v malé míře vyskytují obrovské buňky. (Levorova J. et al., 2018)

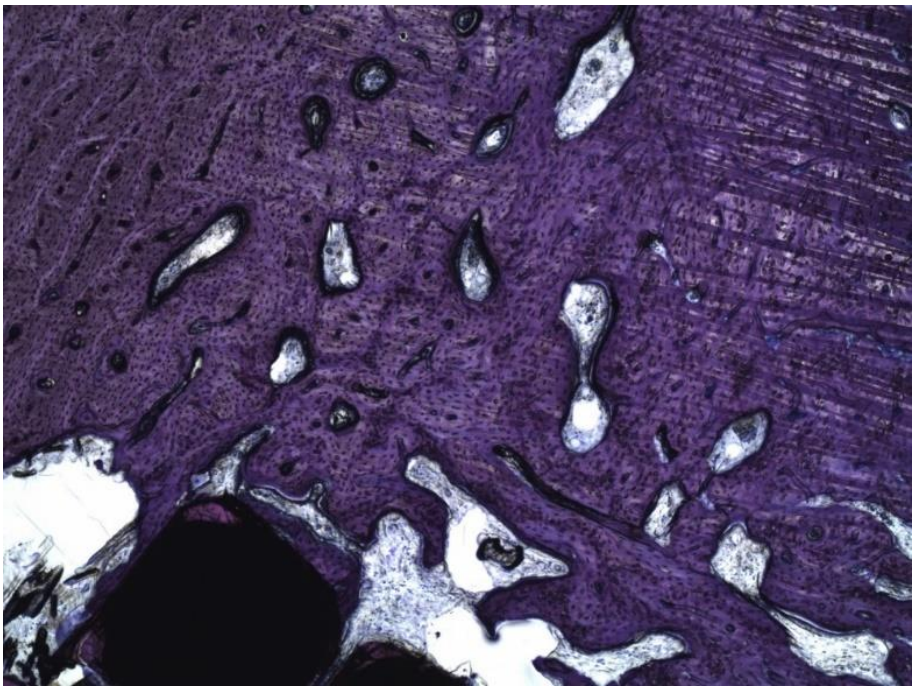
Druhý odběr: U jednoho vrutu více než 51 % povrchu zaujímá fibrózní tkáň, u druhého je jen mírná fibróza. Je patrná novotvorba kosti, endostální i periostální remodelace (to ukazují obr. 37, 38) Bez známek nekrózy, trombózy cév či osteoklastické resorpce. Nevýrazná je i lymfocytární infiltrace. Jsou zde přítomny kavity, pravděpodobně po vytvoření plynu (to ukazuje obr. 39), obrazová dokumentace – obr. 36–40 byla publikována v práci autorky. (Levorova J. et al., 2018)



Obr. 37 Histopatologický preparát, zvětšeno 40x; vrut ze slitiny WE43, druhý odběr, 8. týden, snímek ukazuje periostální apozici nad hlavou vrutu. (Levorova J. et al., 2018)

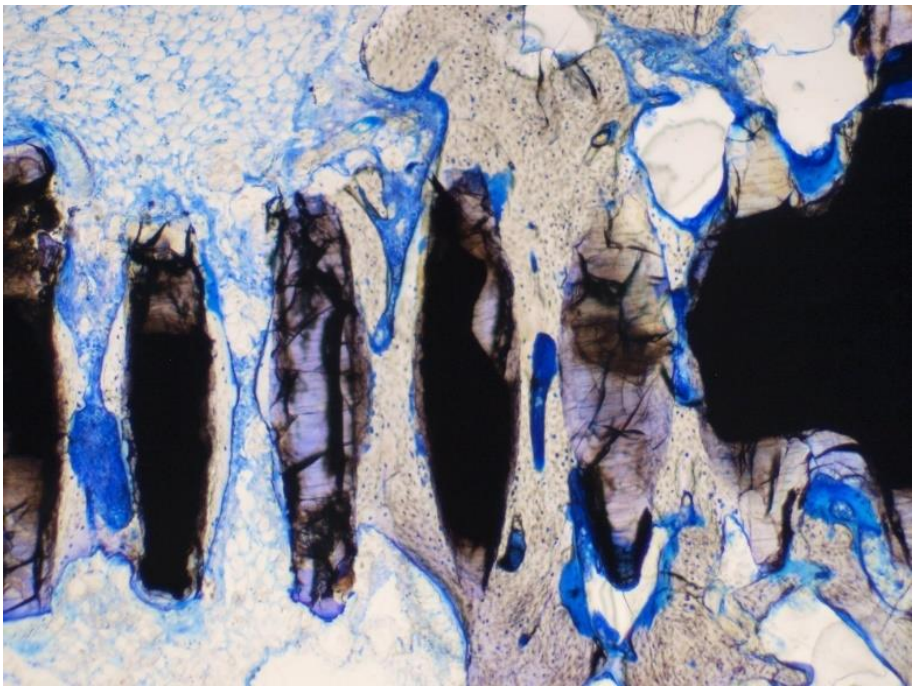


Obr. 38 Histopatologický preparát, vrut ze slitiny WE43, druhý odběr, 8. týden, zvětšeno 20x; endostální remodelace je přítomna v okolí závitů. (Levorova J. et al., 2018)



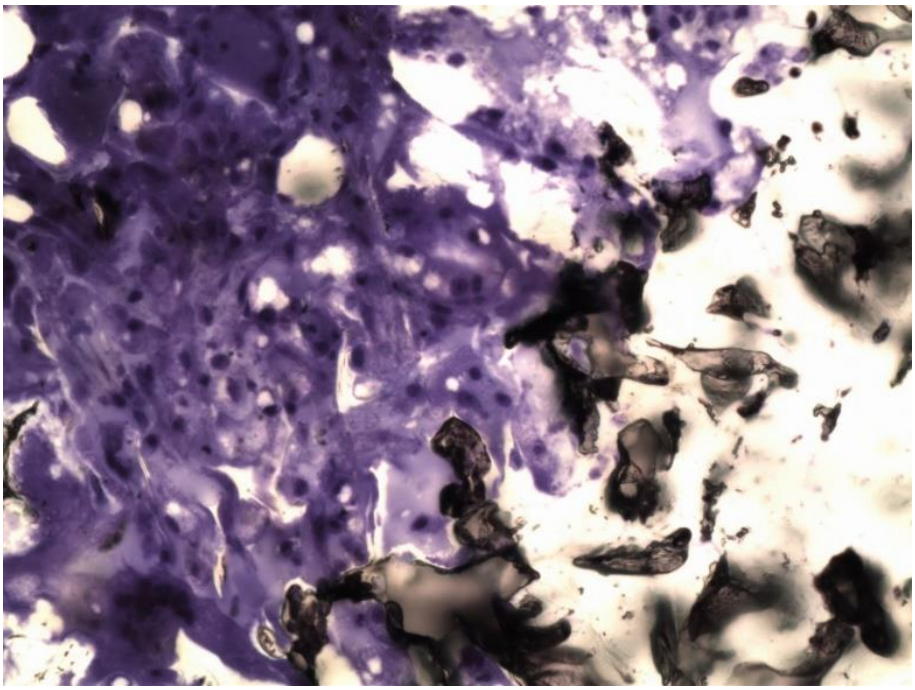
Obr. 39 Histopatologický preparát, vrut ze slitiny WE43, druhý odběr, 8. týden, zvětšeno 40x. Ilustrace ukazuje kavity po vytvoření plynu v okolí vrutu. (Levorova J. et al., 2018)

Třetí odběr: Je přítomna mírná fibrózní produkce v okolí obou implantátů (nicméně nepřesahuje 51 % povrchu), viz obr. 40. Probíhá zde periostální i endostální remodelace. Makrofágy jsou přítomny občasně, ovšem přítomnost granulomu z cizích těles zastižena nebyla. V malém množství se vyskytují kavity.



Obr. 40 Histopatologický preparát, vrut ze slitiny WE43, 12. týden, třetí odběr, zvětšeno 40x. Snímek ukazuje periimplantční fibrózu v okolí závitů. Obraz byl publikován v práci autorky (Levorova J. et al., 2018)

Čtvrtý odběr: Periimplantační fibróza v okolí závitů je mírná, v malém množství je zde i lymfoplasmocytární infiltrace. Je zde opět zaznamenán výskyt obrovských buněk. Viz obr. 41. Méně výrazná je v tomto odběru periostální i endostální remodelace. V malém množství jsou přítomny kostní kavity. Jeden implantát je fragmentovaný kompletně. V jeho okolí je místy zachycena přítomnost synovialocytů.



Obr. 41 Histopatologický preparát, zvětšeno 40x; vrut ze slitiny WE43, čtvrtý odběr, 16. týden; nález obrovských buněk v okolí implantátu.

5.2.8 Statistické zhodnocení výsledků – histologické parametry

Nejprve jsme analyzovali strukturu kosti (BS) v čase. Zjišťujeme, že existuje určitý vztah mezi BS a časovým postupem. BS má mírnou tendenci růst (s nárůstem času) a v čase roste i pravděpodobnost výskytu BS (p-value=0,02, Kendallovo tau=0,23). BS se častěji objevuje u skupiny II, tj. u implantátů ze slitiny WE43 (p-value=0,023).

U výskytu kostních kavit (BC) mezi množství jejich výskytu a časem odběru existuje statisticky významný vztah (p-value=0,007). Kostní kavity se vyskytují po celou dobu výzkumu a vyššího skóre je dosahováno u časnějších odběrů. Z pohledu skupin nelze říci, že by se vyskytovaly u jedné ze skupin více (p-value=0,12). Stupeň periostální remodelace závisí na čase, avšak tento vztah není statisticky významný (p-value=0,07). Je však statisticky významný rozdíl mezi oběma skupinami ve prospěch skupiny II, tj. slitiny WE43. (p-value=0,04).

Obdobných výsledků dosahujeme i pro endosteální modelaci. Z pohledu časové distribuce je jejich výskyt na hranici statistické významnosti (p-value=0,08), rozdíl mezi oběma skupinami je statisticky významný ve prospěch skupiny II, tj. slitiny WE43 (p-value=0,007).

Periostální apozice je v časových bodech distribuována nerovnoměrně (p-value=0,01), avšak neprokazujeme statisticky významný rozdíl mezi oběma skupinami.

Výskyt parametru tvorby kosti (PIF) v okolí implantátu v čase je na rozdíl od periostální apozice bez statisticky významné nerovnoměrnosti (p-value=0,60). Ani rozdíl mezi skupinami ve výskytu PIF, tedy tvorby kosti v okolí implantátu, není statisticky významný (p-value=0,13). PIF nevykazuje vyšší pravděpodobnost výskytu v některém z časových období, naopak se vyskytuje přibližně stejně ve všech (p-value=0,51). Z pohledu skupin můžeme říci, že se častěji vyskytuje u skupiny II (p-value=0,03).

Lymfocytární reakce ani makrofágová infiltrace 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).

Vzhledem k akumulaci vyšších skóre reakce z cizích těles (GC) spíše do počátku výzkumu je časová distribuce GC na hranici statistické významnosti (p-value=0,06). Z pohledu obou skupin neshledáváme statisticky významný rozdíl (p-value=0,44) ve výskytu parametru GC.

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

V prvním odběru, tj. ve 4. týdnu, shledáváme statisticky významný rozdíl v míře BIC mezi oběma skupinami implantátů (p-value = 5.767e-08). Ve druhém odběru, tj. v 8. týdnu, také shledáváme statisticky významný rozdíl v míře BIC mezi oběma skupinami implantátů (p-value = 0.002716), ve 3. odběru, tj. ve 12. týdnu, také shledáváme statisticky významný rozdíl v míře BIC mezi oběma skupinami implantátů (p-value = 3.703e-06). Statisticky významný rozdíl v míře BIC mezi oběma skupinami implantátů (p-value = 1.475e-09) byl shledán i ve 4. odběru, tj. v 16. týdnu. Ve všech odběrech identicky je tento rozdíl zaznamenán ve prospěch skupiny I, tj. titanových implantátů.

5.2.10 Statistické zhodnocení výsledků – změna povrchu a objemu implantátů ze slitiny WE43

Model je statisticky významný jako celek, i všechny jeho regresní koeficienty jsou statisticky různé od nuly. Vzhledem ke koeficientu determinace model přijímáme (viz. tbl. 13).

Coefficients	odhad	Směrodatná chyba	t – value	Pr(> |t|)
Intercept	4.291e+01	1.615e+00	26.57	0.000117 ***
exp(x)	1.067e-05	4.063e-07	26.25	0.000121 ***

Residual standard error: 3.215 on 3 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.9957, Adjusted R-squared: 0.9942

F-statistic: 689.1 on 1 and 3 DF, p-value: 0.0001213

Tbl. 13. Statistické zhodnocení změny povrchu a objemu v čase u implantátů ze slitiny WE43.

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

6 Diskuze

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

6.1.1 Rychlost degradace pelot a možné příčiny odchylky

Magnesium je ve srovnání se zinkem ve vnitřním prostředí lidského organismu více reaktivním prvkem. Z toho důvodu se koroze biodegradovatelné slitiny zrychluje současně se zvyšujícím se obsahem magnesia v ní. A naopak přidáním zinku do slitiny se její degradace zpomaluje. (Kubasek J. et al., 2016) Nicméně dosažené výsledky první fáze tohoto experimentu daným poznatkům odporují. Z výsledků první fáze experimentu je patrné, že došlo k výrazně rychlejšímu rozpadu pelot ze slitiny Zn-1,6Mg ve srovnání s pelotami ze slitiny WE43. Za zásadní otázku první fáze experimentu proto považuji důvod rychlé degradace slitiny Zn-1,6Mg. Při třetím odběru, tj. 6 týdnů po implantaci, dochází už k fragmentaci peloty ze slitiny Zn-1,6Mg. Pelota ztrácí původní tvar, vzniká jeden větší a více drobných fragmentů, povrch všech fragmentů je nerovný. Dále ve čtvrtém a v pátém odběru, tj. 8 a 10 týdnů po implantaci, už pelota nebyla v místě implantace ani v okolí nalezena. Předpokládáme, že došlo k její kompletní degradaci. V literatuře nalézám rozpor. Většinově výsledky tohoto experimentu nekorespondují s výsledky jiných in vivo ani in vitro studií. Jako příklad těchto studií uvádím Lee J.W. et al., 2016, Windhagen H. et al., 2013, Yang H. et al., 2020. Tyto publikace ukazují právě na pomalejší degradaci zinkových slitin nebo i magnesiových slitin s určitým obsahem zinku. Na stranu druhou jsou publikovány studie, které prokazují degradaci zinkových slitin včetně Zn-1,6Mg výrazně rychlejší, než jak je uvádí zmínění autoři. Z časového hlediska se pak degradace slitin zinku více podobá experimentu v této práci. Z této druhé skupiny publikací je to např. Zhang (2010). Ten popisuje na studii in vivo počátek degradace slitiny už tři týdny po implantaci. (Zhang S.X. et al., 2010) Podobně časně uvádí začátek degradace slitiny i Yan (2013). (Yan J. et al., 2013) Delší dobu degradace, přesto poměrně krátkou, tj. 24 týdny, i He (2009). (He Y.H. et al., 2009)

V prvním a druhém odběru první fáze experimentu v této práci, tj. 4 a 8 týdnů po implantaci, byl přítomen v okolí pelot žlutý exsudát. Jednou z možných příčin abnormálně rychlé degradace materiálu může být zánětlivý proces v ráně. Za předpokladu dodržení sterility implantovaného materiálu a instrumentaria mohla případná infekce rány nastat kontaminací během výkonu. Jako nejpravděpodobnější původce se jeví kožními patogeny. Klinicky se rány u skupiny A i B zhojily per primam intentionem, nebyly zjištěny známky probíhajícího infekčního zánětu. Ten se může případně manifestovat s latencí. Typicky tomu tak je, pokud

dochází ke kolonizaci implantovaného materiálu nízce virulentním patogenem (např. běžnou kožní mikroflórou) a následně se na povrchu implantátu vytvoří biofilm. V takovém případě je i jeho symptomatologie mírnější. (Mercuri L.G., 2015)

Důvodem k naopak neinfekčnímu zánětu pak může být chybná operační technika, jejímž důsledkem je omezení cévního zásobení rány a tvorba exsudátu. (Mercuri L.G., 2015)

Infekce nebo i neinfekční zánět by podle rychlosti degradace materiálu musely proběhnout u všech pěti zvířat ze skupiny A (slitina Zn-1,6Mg). Na to usuzujeme podle toho, že u zvířat z prvních dvou odběrů byl nalezen exsudát, u dalších tří zvířat došlo k abnormálně rychlé degradaci. To znamená, že u všech zvířat ze skupiny A došlo k odchylce od předpokládaného normálního průběhu z hlediska časového průběhu degradace pelot. U žádného ze zvířat ze skupiny B (slitina WE43) nedošlo ani k vytvoření exsudátu, ani k rychlejší degradaci materiálu, než jaká byla předpokládána (zhruba 2,16 mm/rok). (Dobatkin S. et al., 2019) U zvířat ze skupiny B nedošlo ani k rozpadu měkkotkáňové rány. Postup implantace byl u zvířat obou skupin identický. U skupiny zvířat s pelotami ze slitiny Zn-1,6Mg byla histopatologickým vyšetřením prokázána přítomnost reakce z cizích těles, byť v malé míře, nicméně ve všech odběrech. Na rozdíl od toho u zvířat s pelotami ze slitiny WE43 v první fázi experimentu v žádném odběru přítomnost reakce z cizích těles prokázána nebyla.

Přesný způsob biodegradace slitin zinku není objasněn. Pravděpodobně je za degradaci odpovědné lokální zvýšení pH a tvorba oxidu zinečnatého na povrchu implantátu. Ta, podobně jako vrstva hydroxidu hořečnatého v případě magnesiových slitin, chrání povrch implantátu před další korozí. Po zhruba 4,5-6 měsících po implantaci dochází ke obměně molekul, které ochrannou vrstvu tvoří (uhličitan zinečnatý, kalciové ionty, fosfáty aj.) a teprve poté dochází k vlastnímu rozpadu zinkové slitiny. (Zheng Y., 2016) Probíhající zánět v ráně a s ním spojené lokální snížení pH by tak mohl být vysvětlením pro zvýšenou rychlost degradace u skupiny A.

V závislosti na rychlosti degradace slitin se mění i množství vznikajícího vodíku. Se vzrůstající rychlostí koroze se objem plynu zvětšuje. (Zheng Y. F. et al., 2014, Zheng Y., 2016) Tzn., že rychleji korodující slitina produkuje větší množství plynu. Tento poznatek koreluje s průběhem tvorby plynu v první fázi experimentu. Produkce vodíku je zde vyšší u skupiny A (u slitiny Zn-1,6Mg), která degraduje rychleji, než u skupiny B (u slitiny WE43), která degraduje pomaleji. Zde je opět rozpor 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, jak zmiňuji v předchozím textu, a v závislosti na tom i vodík by se měl vytvářet v menším množství.

Při manipulaci s degradovatelnými slitinami je i jejich zacházení před implantací. Expozice vodnému prostředí např. při sterilizaci je nežádoucí, zapříčiňuje totiž vlastní rozpad. (Maitz M.F., 2015) Sterilizace pelot v první i druhé fázi tohoto experimentu probíhala expozicí etylenoxidu a následně UV záření. Další autoři užívají pro sterilizaci magnesiových a zinkových slitin včetně Zn-1,6Mg a WE43 sterilizaci isopropanolem, ethylenoxidem nebo gama zářením, přičemž předpokládají, že jmenované způsoby nemají negativní vliv na strukturu a chování materiálu. (Charyeva O. et al., 2015, Li M. et al., 2021, Liu C.L. et al, 2011) Na podkladě toho nepředpokládáme ani v této práci negativní vliv zvoleného způsobu sterilizace pelot a v druhé fázi experimentu vrutů na jejich korozní chování. Chlazení během výkonu je prováděno fyziologickým roztokem. Ten je aplikován během vyhloubení štoly do kosti, následně odsát, pak je vložen implantát. Ani chlazením během výkonu proto nepředpokládáme ovlivnění vlastností slitin a tím eliminujeme možnost případného urychlení degradace pelot ze slitiny Zn-1,6Mg tímto způsobem.

6.2 Druhá fáze experimentu: WE43 a Ti

6.2.1 Změna objemu a povrchu vrutů

Při průběhu koroze vrutu ze slitiny WE43 na jeho iniciální degradaci navazuje tvorba korozních produktů (hydroxid hořečnatý, uhličitan hořečnatý, uhličitan vápenatý, fosforečnan hořečnatý, fosforečnan uhličitý a magnesiové ionty). Korozní produkty pak potencují další průběh koroze a důsledkem toho je celkově rychlejší degradace. (Levorova J. et al., 2018, Schumacher S. et al., 2014, Witte F., et al., 2008) Z toho důvodu i změna objemu a povrchu vrutů bude výraznější s narůstajícím časem od implantace. Změna objemu a povrchu vrutů u slitiny WE43 je předpokládaným důsledkem jejich fragmentace. Výsledný povrch lze pak vnímat jako součet povrchu fragmentů. Rozpad vrutu a zvětšení povrchu doprovází postupné zmenšení jeho objemu. Oba tyto parametry, objem a povrch vrutů, byly v této práci měřeny pomocí 2D mikrotomografického zobrazení. Významný pokles objemu implantátů ze slitiny WE43 nastal v době mezi 12. a 16. týdnem, resp. pokles byl zaznamenán v posledním, tj. ve čtvrtém odběru v 16. týdnu. Oproti výchozí hodnotě, tj. 9,22mm^3 dochází k poklesu o 55,1 %, tj. na 5,07mm^3. Pokles objemu, který nastává v prvním, druhém a třetím odběru je statisticky zanedbatelný. V kontrolní skupině s titanovými implantáty dochází také k nepatrným změnám objemu, ty jsou

statisticky nevýznamné, směrodatná odchylka σ=0,056. Stejně je tomu u povrchu vrutů. Ten výrazněji narůstá u vrutů ze slitiny WE43 poprvé ve 12. týdnu (je měřen ve 12. týdnu, tzn. že narůstá v období mezi 8. a 12. týdnem), a to na 115,2% původní hodnoty (z 41,23mm^2 na 49,24mm^2). Další výrazný nárůst je pak pozorován v dalším odběru, tzn. že stoupá mezi 12. a 16. týdnem, a to na 321,9% původní hodnoty (z 4123mm^2 na 137,61mm^2). Je nutné brát v potaz, že percentuální vyjádření se týká aritmetického průměru hodnot z obou vrutů. Směrodatná odchylka σ= 37,825. Právě v posledním odběru je nárůst povrchu i pokles objemu většinově zapříčiněn fragmentací distálního implantátu. Limitem měření je právě rozpad vrutu na množství příliš malých fragmentů, které do měření ani nelze zahrnout. Výsledek je pak vlastně nepřesný. I přesto ale povrch implantátů v 16. týdnu narůstá výrazně, jak prokazuje statistická analýza. Např. Oshibe (2019) prezentuje ztrátu objemu šroubových implantátů v potkaních tibiích pouze 36,3 % z původní hodnoty za 12 měsíců, ve stejné studii u materiálu s úpravou povrchu je ztráta objemu ještě menší. (Oshibe N. et al., 2019) Degradace v této práci je výrazně rychlejší. Příčina rychlejší iniciální degradace není známa, jak je napsáno výše, může se na ní podílet chybná operační technika a neinfekční zánět, méně pravděpodobně zánět infekční. Jako další možná příčina se nabízí „stress corrosion cracking“. Nicméně ani jeden z jmenovaných důvodů jsme během experimentu neprokázali, ani je nemůžeme vyloučit. Důvodem pro změnu rychlosti degradace dále může být povrchová úprava materiálu. Experiment pracuje s nepovlakovaným materiálem bez jiné povrchové úpravy. In vitro byly v pracích jiných autorů testovány úpravy povrchu slitiny WE43 např. povrchovou oxidací MAO/PEO (micro-arc oxidation/plasma electrolytic oxidation), která vytváří na povrchu slitiny denzní keramickou vrstvu a zlepšuje tak korozní vlastnosti slitiny i výsledky testů cytotoxicity. (Hartjen P. et al., 2021) Dalším z často využívaných způsobů úpravy povrchu pro slitinu WE43 je elektroforetické povlakování nanovrstvou oxidu zinečnatého, který také zvyšuje odolnost povrchu slitiny proti korozi a stabilizuje tak průběh koroze. Mezi další způsoby úpravy povrchu pro degradovatelné slitiny patří povlakování oxidem hlinitým nebo fosfáty. (Qu J.E. et al., 2019) Tento experiment ovšem pracuje pouze s nepovlakovaným materiálem bez speciální povrchové úpravy. (Levorova J. et al., 2018)

Na obr. 32 výše v textu je patrna fraktura kortikální kosti paralelní s původní dlouhou osou vrutu. Bez klinických projevů zde došlo pravděpodobně k fraktuře oslabené kosti během zátěže. Abnormální zatížení implantátu pak mohlo být důvodem k jeho rychlejší degradaci. Nicméně na obr. 30 a 31 je patrna fraktura kortikální kosti kolmá na dlouhou osu vrutu. Jedná se o stejné zvíře, stejný odběr, proximální vrut. Degradace tohoto implantátu je také patrná, nicméně

probíhá podle předpokládaného schématu a mírou navazuje na předchozí odběr. Předpokládaným schématem je degradace od povrchu, tj. od nejtenčího místa, od závitů, pak následuje fraktura těla vrutu. Jednoznačně nelze proto jako důvod k rychlejší degradaci distálního vrutu označit právě frakturu kosti. Dalším důvodem může být „stress corrosion cracking“, jak uvádí Zheng (2016). (Zheng Y., 2016) Implantát je makroskopicky bez abnormalit, přitom je ale postižen mikrofrakturami způsobujícími urychlení degradace po vystavení koroznímu prostředí. Tak Zheng (2016) vysvětluje nejvíce pravděpodobnou příčinu „stress corrosion cracking“, která nicméně také jednoznačně objasněna není. (Zheng Y., 2016) Zda je důvodem rychlejší degradace v této práci „stress corrosion cracking“, nebylo zjištěno.

6.2.2 Bone-implant contact

Bone-implant contact (nebo 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 percentuálně 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 ze slitiny WE43 dosahuje nejvyšších hodnot v 8. týdnu (druhý odběr), kdy je téměř 45 %. Od 8. týdne 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 (čtvrtý odběr) je BIC hůře měřitelný pro značnou fragmentaci materiálu. Oseointegrace jednotlivých fragmentů neprobíhá, resp. degradace je příliš rychlá na vytvoření pevného spojení povrchu implantátu s kostí. I to se nejspíše podílí na nižší hodnotě BIC v 16. týdnu. BIC je celkově vyšší u titanových vrutů. Zde dochází od prvního odběru k jeho postupnému nárůstu (51 % v prvním odběru, 53 % ve druhém odběru, 61 % ve třetím odběru a 69 % dosahuje ve čtvrtém odběru). Tento nárůst BIC u standardního materiálu ve srovnání s poklesem u degradabilní slitiny podporuje předpoklad omezení tvorby kosti produkcí plynu.

6.2.3 Elektronová mikroskopie, energetická disperzní spektrometrie

Elektronová mikroskopie a energetická disperzní spektrometrie byly i ve druhé fázi experimentu použity pouze jako pomocné zobrazovací metody. Pravidelnost povrchu

implantátů z titanu ilustruje obr. 35 výše v textu, naproti tomu degradace jednoho z vrutů ze slitiny WE43 ve 4. týdnu je patrná na obr. 34. Tato situace je nicméně dostatečně dobře zobrazena i pomocí mikrotomografie. Právě obr. 34 a související tabulka 12 ukazují rozložení jednotlivých prvků v okolí vrutu ze slitiny WE43 ze čtvrtého odběru v 16. týdnu. Kovové ionty mohou být příčinou artefaktů při vyšetření RTG technikami (z původního „scattering" volně přeloženo jako rozptyl paprsků z Reifenrath J. et al., 2011) (Mercuri L. G., 2015, Reifenrath J. et al., 2011) V první ani ve druhé fázi experimentu tento jev není pro čtení zobrazovacích metod rušivý, pro mikro-CT byla stanovena „nečitelná" oblast 50µm v okolí implantátu, širší okolí zasaženo artefakty nebylo. Elektronová mikroskopie tak okrajově může poskytnout pro praxi srovnání slitiny WE43 s např. vitalliem nebo titanem a jeho slitinami stran zobrazovacích metod. Přítomnost kovových iontů pro zobrazení rentgenovými metodami rušivá není.

6.2.4 Histopatologické vyšetření

Kovy, jak WE43, tak Ti, byly v tomto experimentu celkově zvířaty dobře tolerovány, nebyly pozorovány známky systémové reakce na přítomnost kovu. Se stejným průběhem se setkáváme i v pracích jiných autorů. (Castellani C. et al., 2011, Oshibe N. et al., 2019, Reifenrath J. et al., 2011, Schaller B. et al., 2016)

Během hojení ran se u žádného zvířete nevyskytly komplikace v ráně. V průběhu hojení rány na sebe navazují čtyři fáze – koagulační, zánětlivá, proliferační a fáze remodelace. (Ehrenfeld M. et al., 2012) Průběh jednotlivých dějů zaznamenává histopatologické vyšetření tkání. Zánětlivá reakce začíná během prvních 24 hodin po poškození tkáně a přetrvává po dobu zhruba 2-3 týdnů. Zásadní roli během zánětlivé fáze hrají neutrofily, monocyty a makrofágy a jejich cytokinová produkce, produkce růstových faktorů a podpora angiogeneze a fibroblastické aktivity. (Gruber R., Bosshardt D.D., 2014) Hlavními sledovanými parametry ze zánětlivé fáze hojení rány jsou lymfoplasmocytární infiltrace, a právě přítomnost makrofágů**.**

Makrofágy jsou přítomny ve tkáni po delší dobu za patologické reakce tkáně – reakce z cizích těles. Ta vzniká v případě vstřebatelné slitiny z částic, na které se materiál rozpadá. Pokud jde o neresorbovatelnou slitinu, příčinou reakce z cizích těles je nejčastěji materiálová debris. Ta vzniká třením nebo nežádoucí korozí. Takto vzniklá tělesa (fragment materiálu nebo debris) jsou makrofágem pohlcena, nicméně k dokončení fagocytózy nikdy nedojde. Kovová partikule je příliš velká na to, aby byla enzymaticky rozložena a eliminována. Následujícím krokem reakce je obklopení partikule dalšími makrofágy, následuje jejich fúze, a tak vytvoření

mnohojaderné obrovské buňky a granulomatózního zánětu z cizích těles. Reakce z cizích těles může vznikat kdykoli v průběhu zánětlivé fáze od infiltrace rány makrofágy, tj. již od prvních dní po poškození tkáně. 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 u Ti statisticky signifikantně méně. Přitom obrovské buňky (GC podle tabulky 5) byly také přítomny ve větší míře v okolí slitiny WE43, konkrétně pouze ve 4. a v 16. týdnu, v menší míře v okolí Ti implantátů ve 4. a v 8. týdnu. Rozdíl mezi přítomností GC obou skupin nebyl statisticky signifikantní. Do statistické analýzy byly zahrnuty i GC, které se vyskytly ve větší vzdálenosti od vrutů ze slitiny WE43, i když pravděpodobnější příčinou jejich přítomnosti je reakce na šicí materiál. Konkrétně se jedná o odběr ze 4. týdne. U žádného ze zvířat nebyla klinicky patrná chronická zánětlivá reakce, na kterou by přítomnost GC ve tkáni ukazovala. Reifenrath (2011) nezaznamenává přítomnost obrovských buněk z cizích těles ani v jednom odběru (v publikaci uvádí 12 a 24 měsíců po implantaci). (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) Výsledky uvedených studií i tohoto experimentu tak korespondují s dalšími literárními zdroji, které naopak magnesiové vstřebatelné slitiny včetně slitiny WE43 označují jako novou éru resorbovatelných materiálů. Právě ty by měly nabídnout řešení problematiky vzniku zánětlivé reakce, a především reakce z cizích těles s nežádoucími klinickými dopady a nutností odstranění materiálu u dříve používaných syntetických biodegradovatelných polymerních implantátů z PGA a PLA. (Bergsma E.J. et al., 1993, Marukawa E. et al., 2016, Zheng Y., 2016)

Infiltrace tkáně lymfocyty a plazmatickými buňkami je také běžnou součástí zánětlivé fáze hojení rány. Při přetrvávání infiltrace delší než zhruba 2-3 týdny lze hovořit o chronické zánětlivé celulizaci. (Ehrenfeld M. et al., 2012) V této studii byla lymfocytární i plasmatická infiltrace nalezena u obou skupin kovů ve všech časových bodech. Při srovnání míry mezi oběma skupinami a v rámci každé skupiny mezi jednotlivými časovými body je lyfoplasmocytární infiltrace okolní tkáně bez statisticky signifikantního rozdílu. Klinicky se rány zhojily bez patologie do dvou týdnů u všech zvířat. Klinická manifestace zánětu v průřezu celé studie zcela chybí. A to u obou skupin zvířat. Jiné studie a publikace ukazují zánětlivé komplikace u slitiny WE43 také minimálně. V humánním použití při fixaci halux valgus jsou tkáně v okolí slitiny WE43 popsány jako zcela bez zánětu (Windhagen H. et al., 2013), ve zvířecí studii na psech se manifestuje zánět dvanáct týdnů po implantaci slitiny WE43, a to

vytvořením píštěle s aktivní exsudací spolu s vytvořením většího množství vodíku. Do 24 týdnů pak zánět odeznívá, přičemž odeznívá i tvorba vodíku. (Byun S.H. et al., 2020) Na modelech myší je prokázán zánět histopatologicky dva týdny po implantaci, důsledkem komplikace je zde nekróza tkáně. Dochází pak dokonce ke kompletní degradaci implantátů během šesti týdnů, manifestace zánětu klinicky v této studii proběhla také. (Dobatkin S. et al., 2019)

Jednou z komplikací hojení je periimplantační fibróza. Pokud nedochází k pevnému spojení kosti a implantátu, respektive je mezi kostí a implantátem vrstva vaziva, hovoříme o poruše oseointegrace, periimplantační fibróze. Riziko chyby v odečtení mikrotomografického skenu, respektive oblast zasažená artefakty, konkrétně rozptylem paprsků, v okolí kovového materiálu činí dle Reifenrath (2011) zhruba 50 μm. (Reifenrath J. et al., 2011) Analogicky byla stanovena i v tomto experimentu oblast, která nebyla v rámci čtení mikrotomografických skenů hodnocena ani pro přítomnost BIC ani vazivové vrstvy. Periimplantační fibróza přesahující 51 % povrchu implantátu se v okolí vrutů ze slitiny WE43 vyskytuje v 8. týdnu. V ostatních týdnech je nižší, nicméně se vyskytuje ve vyšší míře než v okolí titanu. Nález periimplantační fibrózy odpovídá i vyšší zánětlivé celulizaci v okolí materiálu v identitckých odběrech. Klinicky nebyly vruty dislokovány ani uvolněny, pevně adherovaly ke kosti. Limitem studie v tomto ohledu je, že vruty nebyly zatíženy, resp. nebyly součástí load sharing ani load bearing fixace končetiny. Předpokládáme, že síly, kterým byly tyto vruty v tibiích vystaveny, jsou ve srovnání s oběma zmíněnými typy fixace nižší. Při reálném zatížení při osteosyntéze jsou síly přenášeny právě přes materiál, ať už typem osteosyntézy load sharing, kdy materiál nese částečné zatížení nebo load bearing, kdy jsou dlahou neseny všechny síly působící na kost. V takovém případě i přes tuto „klinickou pevnost“ by byla slitina WE43 z ohledu stability a periimplantační fibrózy nejspíše zcela nevyhovující. Rizikem periimplantační fibrózy, a tudíž nedostatečné oseointegrace materiálu, je selhání osteosyntézy a následné poruchy hojení vlivem pohybu mezi fragmenty. Klinickým projevem toho je pak prodloužené hojení nebo zhojení pakloubem, infekční komplikace, rozpad rány nebo osteomyelitida.

Periimplantační fibróza v okolí implantátů ze slitiny WE43 v práci Reifenrath (2011) zjištěna nebyla. (Reifenrath J. et al., 2011) U jiných magnesiových slitin (Mg-Ca s různými koncentracemi od 0,4 % po 2,0 %) byla pozorována fibróza v práci Von der Höha. (Von der Höh N. et al., 2006) V práci Galli (2016) byla pozorována periimplantační fibróza u magnesiové slitiny Mg-2Ag, přičemž u slitiny WE43 a slitiny Mg-10Gd nikoli (Galli S., 2016). Tvorba fibrózní mezivrstvy souvisí s přítomností zánětu. Vlivem zánětu v okolí implantovaného materiálu nastává sekundární hojení kosti s tvorbou fibrózního svalku v místě

tahu. V místě tlaku dle Pauwelsova zákona nastává sekundární hojení s tvorbou chrupavky, která následně osifikuje. Fibrózní tkáň v závislosti na mechanickém namáhání, na trvání tahových sil, nebo v závislosti na přítomnosti zánětlivé celulizace může perzistovat ve tkáni jako jizva a k oseointegraci pak vůbec nedojde. Pokud taková situace nastává z důvodu zmíněné zánětlivé celulizace, není rozhodující, zda zánětlivá buněčná infiltrace proběhla jako reakce na přítomnost na přítomnost cizího tělesa nebo je původcem infekční agens. (Ehrenfeld M. et al., 2012) V této práci sice nebyl klinicky pozorován zánět, nicméně, jak je psáno výše, byla patrna delší dobu přetrvávající lymfoplazmocytární infiltrace. Jak je popsáno výše, předpokládáme, že výskyt periimplantační fibrózy v konkrétních odběrech souvisí právě se zvýšenou zánětlivou celulizací.

Na tvorbu fibrózní vrstvy navazuje kostní remodelace – periostální z povrchu a endostální z vnitřní strany kosti. Apozice kosti na povrchu, periostální remodelace, probíhala podle skórovacího systému tabulky 5 ve vyšší míře u vrutů ze slitiny WE43 než u titanových ve všech časových bodech, nicméně bez statisticky signifikantního rozdílu mezi jednotlivými odběry. Tento fenomén byl zaznamenán jak u slitiny WE43, tak u titanu. Nejvýraznější remodelace, o síle tří osteonů, byla u slitiny WE43 zaznamenána v 8. týdnu, u titanu se takto výrazná periostální remodelace nevyskytuje v žádném odběru. Postupně ve 12. a v 16. týdnu 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, jak je popsáno níže. Celkově byl mezi slitinou WE43 a titanem zaznamenán statisticky signifikantní rozdíl v míře periostální remodelace ve prospěch slitiny WE43. Výsledek může navazovat na potenciaci osteoblastické aktivity i diferenciace 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 v obou časových bodech, takže 12 a 24 měsíců 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. Tyto studie shodně zjišťují podporu osteoblastické aktivity

a útlum osteoklastické aktivity účinkem právě hydroxidu hořečnatého. Předpokládaným mechanismem tohoto procesu je podle autorů studií i dalších autorů pozitivní ovlivnění aktivity vitaminu D3 korozním produktem (hydroxid hořečnatý) a podpoření diferenciace 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., 2018, Torroni A. et al., 2021)

Ve větší míře se statistickou signifikancí probíhal růst kosti na endosteální straně kosti u slitiny WE43 než u titanových vrutů. Největších skóre dosahovala endostální remodelace v 8., 12. a 16. týdnu s postupným nárůstem v čase, tj. v tomto pořadí. Zvýšení remodelace z časového hlediska je na hranici statisticky signifikantního výsledku. Z hlediska hojení kostní tkáně a růstu kosti stran časové distribuce se jedná o očekávaný jev. (Ehrenfeld M. et al., 2012) Stejně jako tomu bylo u periostální remodelace, lze přisuzovat intenzivnější reakci kostní tkáně u slitiny WE43 ve srovnání s titanem, podpoření diferenciace osteoblastů a jejich funkce korozními produkty. Titan dosahuje hodnot maximálně 1 dle tabulky 5, přičemž slitina WE43 až skóre 2. 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 neboli overall impression of bone structure semikvantitativně hodnotí kvalitu kosti v okolí implantátu, a to jako pravidelnou či nepravidelnou (Reifenrath J. et al., 2011). Nově tvořená kost byla v práci Reifenrath (2011) hodnocena poprvé až po třech měsících, v případě slitiny WE43 jako pravidelná. V tomto experimentu byla hodnocena v každém týdnu odběru, výsledky ukazují zvýšení při narůstání času. To logicky odpovídá i době tvorby kosti, kdy konkrétně pro tento parametr, BS, je hodnocení přinejmenším ve 4. týdnu předčasné. Jako hodnota 1 v tabulce 5 je označen stav, kdy okolní kost je v okolí implantátu nestejnoměrně rozložena, chybí homogenita tkáně. Nelze říci, že nárůst tohoto parametru je přímo nežádoucí. Jiné literární zdroje nehodnotí homogenitu kostní tkáně jako zásadní parametr biologického chování implantátu, resp. nehodnotí ji 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 implantátu. Tento parametr tabulky 5 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)

V 16. týdnu byly nalezeny v preparátu synovialocyty. Příčinou jejich přítomnosti je chyba operační techniky, a to přílišná blízkost preparace štoly kolennímu kloubu (odtud ektopický výskyt synovialocytů). Předpokládám, že jejich výskyt nijak neovlivňuje další chování tkáně.

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 této slitiny v obličejovém skeletu je jeho použití jako osteosyntetického fixačního materiálu. Záměrem tedy je, aby degradace materiálu začala nejdříve 6-8 týdnů po implantaci, přitom ale po tuto dobu mají být zachovány původní mechanické vlastnosti, aby spojení kostních fragmentů bylo pevné a nedocházelo k jejich vzájemnému pohybu, a tak i poruše hojení. Doba 16 týdnů je dostatečná pro sledování průběhu hojení „zlomeniny“, resp. kostní tkáně v okolí implantátu i sledování začátku a rychlosti rozpadu implantátu. V této práci nebyla přímo vytvořena zlomenina, pozorováním hojení kostní tkáně ale simulujeme stav fraktury. Kompletní rozpad a chování okolní kosti z dlouhodobého hlediska (po dobu 12 měsíců) sleduje in vivo na králičích tibiích 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.

Kavity o velikosti jednoho osteonu anebo menší v kosti v okolí implantátu byly v tomto experimentu nalezeny v okolí vrutů ze slitiny WE43 v menším množství ve 12. a v 16. týdnu, ve větší míře ve 4. týdnu a nejvyšších skóre dosahují právě v 8. týdnu. Větší kavity, podle tabulky 5 dle Reifenrath (2011) o velikosti dvou osteonů se v kostní tkáni nevyskytly vůbec. (Reifenrath J. et al., 2011) Přítomnost samotného plynu ex vivo nelze prokázat. Při vzniku většího objemu plynu se plyn hromadí pod periostem, způsobuje jeho napnutí a může tak případně porušit cévní nebo nervové zásobení měkkých i tvrdých tkání a rušit tak hojení rány. Během tohoto experimentu nebyla zaznamenána tvorba takového množství, aby bylo patrné vyklenutí měkkých tkání. Jak je uvedeno výše, dochází v období od 8. týdne ke zpomalení periostální remodelace současně s poklesem BIC. To může ukazovat právě na zvýšenou tvorbu vodíku a útlak okolní kostní tkáně. Jiní autoři tuto komplikaci, tj.F tvorbu vodíku a jeho hromadění, uvádějí. Důvodem v těchto studiích nicméně 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 její hojení. Na míru tvorby plynu v jednotlivých časových bodech lze pouze usuzovat. Při srovnání s jinými studiemi časové hledisko této práce s nálezy koreluje, největší tvorba kavit v kosti připadá na začátek experimentu, postupně se snižuje. V práci dalších autorů in vivo je zjištěna nejvyšší produkce během prvních pěti až čtrnácti dnů, poté se snižuje, případně znovu epizodicky zvyšuje kolem třetího týdne a znovu pak v rozmezí 27. až 91. dne po implantaci. Vždy za tímto excesem stojí výraznější pokrok v korozi, rozpadu materiálu. Povrchově ošetřené slitiny podléhají korozi pomaleji, i tvorba vodíku je u nich v těchto studiích menší. (Byun S.H. et al., 2020, Marukawa E. et al., 2016, Kim Y.K. et al., 2018, Oshibe N. et al., 2019, Reifenrath J. et al., 2011)

6.3 Limity studie

Limitem experimentu je použití relativně malého množství zvířat. S výhodou by bylo i sledování BIC, změn objemu a povrchu implantátu pomocí mikrotomografie in vivo. Takový postup by ale neumožnil histopatologické vyšetření, které je zásadní pro zjištění hojení kosti a průběhu zánětlivé reakce. Součástí výzkumu nebylo testování vnitřních orgánů zvířat k detekci reziduí (ukládání korozních produktů) a testování mechanické odolnosti implantátů. To bylo znemožněno prokrájením vzorků k histopatologickému vyšetření. Výsledky experimentu mohly být zkresleny odlišností zatížení vrutů implantovaných do končetiny od reálného zatížení při osteosyntéze v obličejovém skeletu. V preklinickém experimentu nelze reálných podmínek dosáhnout. Delší doba sledování by pak přinesla informaci i o dalším chování slitin v čase, vzniku případného rezidua a případných nežádoucích účinků.

7 Závěr

7.1 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.

7.2 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.

7.3 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

Dílčí 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

Dílčí 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

7.4 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.

7.5 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.

8 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

9 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

10 Seznam použité literatury

Abed E., Moreau R. Importance of melastatin-like transient receptor potential 7 and cations (magnesium, calcium) in human osteoblast-like cell proliferation. Cell Prolif. 2007; 40(6): 849-65

Adzali N.M.S., Jamaludin S.B., Derman M.N. Effect of Sintering on the Physical and Mechanical Properties of o-Cr-Mo F-75) /HAP composites. Sains Malaysiana. 2013; 42 (12): 1763–1768

Agrawal C. M., Athanasiou K. A. Technique to Control PH inVicinity of Biodegrading PLA-PGA Implants.J. Biomed. Mater. Res.1997; 38 (2): 105−114

Akbar M., Frase A. R., Graham G. J., Brewer J.M., Grant M.H. Acute inflammatory response to cobalt chromium orthopaedic wear debris in a rodent air-pouch model. J R Soc Interface. 2012; 9 (74): 2109–2119

An Y. H., Woolf S. K., Friedman R. J. Pre-Clinical in Vivo Evaluation of Orthopaedic Bioabsorbable Devices. Biomaterials. 2000; 21(24): 2635−2652

Anisimova N., Kiselevskiy M., Martynenko N., Straumal B., Willumeit-Römer R., Dobatkin S., Estrin Y. Cytotoxicity of biodegradable magnesium alloy WE43 to tumor cells in vitro: Bioresorbable implants with antitumor activity? Journal of Beiomedical Material Research. 2020; 108(1): 167-173

Antunes L.H.M., de Lima C.R.P. Cobalt-Chromium Alloys – Properties and Applications. In: Reference Module Collection in Materials Science and Materials Engineering. 1. vyd. [Online]. Amsterdam: Elsevier Publisher. 2018

Athanasiou K. A., Niederauer G. G., Agrawal C. M. Sterilization, Toxicity, Biocompatibility and Clinical Applications ofPolylactic Acid/Polyglycolic Acid Copolymers. Biomaterials. 1996; 17 (2): 93−102

Beder O. E., Stevenson, J. K., Jones, T. W. A further investigation of the surgical application of titanium metal in dogs. Surgery. 1957; 41(6): 1012–1015

Bergsma E. J., Rozema F. R., Bos R. R., De Bruijn W. C. Foreign Body Reactions to Resorbable Poly(L-Lactide) Bone Platesand Screws Used for the Fixation of Unstable Zygomatic Fractures. J.Oral Maxillofacial Surg. 1993; 51 (6): 666−670

Bergsma J. E., de Bruijn W.C., Rozema F.R., Bos R. R. M., Boering G. Late Degradation Tissue Response to Poly(L-Lactide) Bone Plates and Screws.Biomaterials. 1995; 16 (1): 25−31

Bezwada R. S., Jamiolkowski D. D., Lee I. Y., Agarwal V., Persivale J., Trenka-Benthin S., Erneta M., Suryadevara J., Yang A., Liu S. Monocryl Suture, a New Ultra-Pliable Absorbable Monofila-ment Suture. Biomaterials. 1995; 16(15): 1141−1148

Böstman O., Hirvensalo E., Mäkinen J., Rokannen P. Foreign-body reactions to fracture fixation implants of biodegradable synthetic polymers. J Bone Joint Surg Br. 1990; 72 (4): 592-6

Bothe R. T., Beaton L. E., Davenport H. A. Reaction of bone to multiple metallic implants. Surg. Gynec. Obsbtet. 1940; 71: 598–602

Brånemark P.I., Hansson B. O., Adell R., Breine U., Lindström J., Hallén O., Ohman A. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. Scand. J. Plastic Reconstruct. Surg. Hand Surg. 1977; 11 (16): 1–132

Brannigan R. P., Dove A. P. Synthesis, Properties andBiomedical Applications of Hydrolytically Degradable Materials Basedon Aliphatic Polyesters and Polycarbonates.Biomater. Sci. 2017; 5(1): 9−21

Brunette D. M., Tenvall P., Textor M., Thomsen P. Titanium in Medicine. 1. vyd. Berlin: Springer, 2001. 1019 s

Buehler W. J., Gilfrich J. W., Wiley R. C. Effects of low-temperature phase changes on the mechanical properties of alloys near composition TiNi. J. Appl. Phys. 1963; 34 (5): 1475–1477

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 plateand 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 Cirug Oral y Maxilofac. 2004; 26(6): 369-383

Davis J.R. Handbook of Materials for Medical Devices. [sine loco]: ASM International, 2003. 341 s

Dee K.C., Puleo D.A., Bizios R. An Introsuction to Tissue-Biomaterial Interactions. 1, vyd. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2002. 228 s

Di Mario C., Griffiths H.U.W., Goktekin O., Peeters N., Verbist J., Boisers M., Deloose K. Heublein B., Rohde R., Kaese V., Ilsex C., Erbel R. Drug-eluting bioabsorbable magnesium stent. Journal of Interventional Cardiology. 2004; 17(6): 391-5

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 MagnesiumAlloy 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

Feldkamp L, Davis, LC, Kress, J. Practical Cone-Beam Algorithm. J. Opt. Soc. Am. 1984; 1: 612-619

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]

Gombotz W.R., Pettit D.K. Biodegradable polymers for protein and peptide drug delivery Bioconjug. Chem. 1995; 6(4): 332-351

Gruber R., Bosshardt, D. D. Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences. 1. vyd. Vishwakarma, A., Sharpe P., Songtao S., Ramalingam M. Amsterdam: Elsevier Inc., 2014. 932 s

Gu X. N., Zheng Y. F., Cheng Y., Zhong S.P., Xi T.F. In vitro corrosion and biokompatibility of Binary magnesium alloys. Biomaterials. 2009; 30(4): 484-98

Han J.M., Hong G., Lin H., Shimizu Y., Wu Y., Zheng G., Zhang H., Sasaki K. Biomechanical and histological evaluation of the osseointegration capacity of two types of zirconia implant. Int J Nanomedicine. 2016; 11: 6507-6516

Hanawa T. Titanium–Tissue Interface Reaction and Its Control With Surface Treatment. Front Bioeng Biotechnol. 2019; 7: 170

Hartjen P., Wegner N., Ahmadi P., Matthies L., Nada O., Fuest S., Yan M., Knipfer C., Gosau M., Walther F., Smeets R. Toward Tailoring the Degradation Rate of Magnesium-Based Biomaterials for Various Medical Applications: Assessing Corrosion, Cytocompatibility and Immunological Effects. Int J Mol Sci. 2021; 22(2): 97

Hayashi S., Usuda K., Mitsui G., Shibutani T., Dote E., Adachi K., Fujihara M., Shimbo Y., Sun W., Kono R. Urinary yttrium excretion and effects of yttrium chloride on renal function in rats. Biological Trace Element Research. 2006; 144(1-3): 225-36

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

Hedelin, H., Hebelka, H., Brisby, H., Laine T. MRI evaluation of resorbable poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) screws used in pelvic osteotomies in children—a retrospective case series. J Orthop Surg Res. 2020; 15 (1): 329

Hofmann G.O. Biodegradable implants in orthopaedic surgery – a review on the state-of-the-art. Clin. Mater. 1992; 10 (1-2): 75-80

Howlett C.R., Zreiqat H., O´Dell R., Noorman J., Evans P., Dalton B.A., McFarland C., Steele J.G. The effect of magnesium ion implantation into alumina upon the adhesion of human bone derived cells. Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 1994; 5: 715–722

www. surgeryreference.aofoundation.org (https://www. surgeryreference.aofoundation.org/cmf/basic-technique/load-bearing-vs-load-sharing) [online]. c2021, cit. [1.10.2021]

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

Chen D.Y., He Y.H., Tao H.R., Zhang Y., Jiang Y., Zhang X.N., Zhang S.X. Biocompatibility of magnesium-zinc alloy in biodegradable orthopaedic implants. International Journal of Molecular Medicine. 2011; 28(3): 343-8

Cheng J., Liu B., Wu Y.H., Zheng Y.F. Comparative un vitro study on pure metals (Fe, Mn, Mg, Zn and W) as biodegradable metals. Journal of Materials Science and Technology. 2013; 29 (7): 619-27

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

Jenke D. Evaluation of the chemical compatibility of plastic contact materials and pharmaceutical products; safety considerations related to extractables and leachables. J. Pharm. Sci. 2007; 96 (10): 2566-2581

Jiang D.M., Cao Z.Y., Sun X., Guo L., Liu J.G. Effect of yttrium addition on microstructure and mechanical properties of Mg-Zn-Ca alloy. Materials Research Innovations. 2013; 17 (1): 33-8

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

Keane T. J., Badylak S.F. Biomaterials for tissue engineering applications. Semin. Pediatr. Surg. 2014; 23 (3): 112-118

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

Klaassen, C. D. Casarett&Doull's Toxicology: The Basic Scienceof Poisons. 5. vyd. New York: McGraw-Hill, 1996. 1056 s

Klapková, A. Mechanické vlastnosti titanových slitin [online]. [2012]. (https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=52258). [cit. 13.2.2021]

Kofron M. D., Griswold A., Kumbar S. G., Martin K., Wen X., Laurencin C. T. The Implications of Polymer Selection inRegenerative Medicine: A Comparison of Amorphous and Semi-Crystalline Polymer for Tissue Regeneration.Adv. Funct. Mater. 2009; 19(9): 1351−1359

Kolk. A., Köhnke R., Saely C.H., Ploder O. Are Biodegradable Osteosyntheses Still an Option for Midface Trauma? Longitudinal Evaluation of Three Different PLA-Based Materials. Biomed Res Int. 2015; 2015: 621481

Košťál J. Použití slitin titanu. [online]. [2015]. (https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=101927). [cit. 6.4.2021]

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. Structural characteristics and corrosion behavior of biodegradable Mg-Zn, Mg-Zn-Gd alloys. Journal of Materials Science. Materials in Medicine. 2013; 24(7): 1615-26

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

Kubasek J., Vojtech D., Pospisilova I. Structural and corrosion characterization of biodegradable Mg-Zn alloy castings. Kovove Material-Metallic Materials. 2012; 50(6): 415-24

Kutniy K. V., Papirov I. I., Tikhonovsky M. A., Pikalov A.I., Sivtzov 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

Leventhal G. S. Titanium, a metal for surgery. J. Bone Joint Surg. Am. 1951; 33-A(2): 473–474

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 H.F., Xie X.H., Zheng Y.F., Cong Y., Zhou F.Y., Qiu K.J., Wang, X., Chen, S.H., Huang L., Tian L., Qin L. Development of biodegradable Zn-1X binary alloys with nutrient alloying elements Mg, Ca and Sr. Sci. Rep. 2015; 5: 10719

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

Li Z., Gu X., Lou S., Zheng Y. The development of binary Mg-Ca alloys for use asbiodegradable materials within bone. Biomaterials. 2008; 29 (10): 1329-44

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 D., Ding Y., Guo T., Qin X., Guo C., Yu S., Lin S. Influence of fine.grain and solid-solution strenghtening on mechanical properties and in vitro degradation of WE43 alloy. Biomedical Materials. 2014; 9(1): 015014

Liu M., Schmutz P., Ugoggowitzer P.J., Song G.L., Atrens A. The influence of yttrium (Y) on the corrosion of Mg-Y Binary alloys. Corrosion Science. 2010; 52(11): 3687-701

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

Maitz M.F. Applications of synthetic polymers in clinical medicine. Biosurface and Biotribology. 2015; 1 (3): 161-176

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., Frassineti C. Magnesium is a key regulator of the balance between osteoclast and osteoblast differentiation in the presence of Vitamin D_3. 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

Mareš J. Ochrana ocelových konstrukcí proti korozi. (https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=66862). [online]. [2013] [cit. 5.3.2021]

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

Matter P. History of the AO and its global effect on operative fracture treatment. Clin Orthop Relat Res. 1998; 347: 11-8

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

Middleton J.C., Tipton A. J. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. Biomaterials. 2000; 21(23): 2335-2346

Miller R. A., Brady J. M., Cutright D. E. Degradation Rates of Oral Resorbable Implants (Polylactates and Polyglycolates): RateModification with Changes in PLA/PGA Copolymer Ratios. J.Biomed. Mater. Res. 1977; 11(5): 711−719

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

Nair L.S., Laurencin C.T. Biodegradable polymers as biomaterials. Prog. Polym. Sci. 2007; 32 (8-9): 762-798

Nasrazadani S., Hassani S. Handbook of Materials Failure Analysis with Case Studies from the Oil and Gas Industry. 1. vyd. [online]. Amsterdam: Elsevier, 2016. 430 s

Niinomi M., Nakai M. Titanium-Based Biomaterials for Preventing Stress Shielding between Implant Devices and Bone. Int. J. Biomater. 2011: 836587

Norholt S.E., Pedersen T. K., Jensen J. Le Fort I miniplate osteosynthesis: a randomized, prospective study comparing resorbable PLLA/PGA with titanium. Int J Oral Maxillofac Surg. 2004; 33 (3): 245-52

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

Ott N., Schmutz P., Ludwig C., Ulrich A. Local, element-specific and time-resolved dissolution processes on Mg-Y-RE alloy – influence of inorganic species and buffering systems. Corrosion Science. 2013; 75: 201-11

Pacifici L., De Angelis F., Orefici A., Cielo A. Metals used in maxillofacial surgery. Oral Implantol. 2016; 9 (Suppl 1/2016 to N 4/2016): 107-111

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

Pappalardo D., Mathisen T., Finne-Wistrand A. Biocompatibility of Resorbable Polymers: A Historical Perspective and Framework for the Future. Biomacromolecules 2019; 20 (4): 1465-1477

Parithimarkalaignan S., Padmanabhan T.V. Osseointegration: An Update. J Indian Prosthodont Soc. 2013; 13(1): 2–6

Peng Q.M., Li X.J., Ma N., Liu R.P., Zhang H.J. Effects of backward extrsion on mechanical and degradation properties of Mg-Zn biomaterial. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials. 2012; 10: 128-37

Pilliar R. M., Weatherly, G. C. Development in implant alloys. CRC Critical Reviews in Biocompatibility. 1986; 1 (4): 371–473

Popkov A. V., Popkov D. A., Kononovich N. A., Gorbach E. N. Osseointegration of A Bioactive Implant in Extramedullary Osteosynthesis. Biomed Pharmacol J. 2017; 10 (1): 37-44

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

Qu J.E., Ascencio M., Jiang L.M., Omanovic S., Yang L.X. Improvement in corrosion resistance of WE43 magnesium alloy by the electrophoretic formation of a ZnO surface coating. Journal of Coatings Technology and Research. 2019; 16 (6): 1559–1570

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

Robinson D.A., Griffith R.W., Shechtman D., Evans R.B., Conzemius M.G. In vitro antibacterial properties of magnesium metal against Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus. Acta Biomaterialia. 2010; 6(5): 1869-77

Rupp F., Liang L., Geis-Gerstorfer J., Scheideler, L., Hüttig F. Surface characteristics of dental implants: a review. Dent. Mater. 2018; 34: 40–57

Sasha O., Roscoe S.G. Electrochemical studies of the adsorption behavior of bovine serum albumin on stainless steel. Langmuir. 1999; 15(23): 8315-21

Scarfe W.C., Farman A.G. What is Cone-Beam CTand How Does it Work? Dent Clin N Am. 2008; 52 (4): 707–730

Semlitsch M., Staub F. H. W. Titanium-aluminium-niobium alloy development for biocompatible, high strength surgical implants. Biomed. Tech. 1985; 30 (12): 334–339

Shady F., Anderson D.G., Langer R. Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications — A comprehensive review. Advanced Drug Delivery Reviews. 2016; 107: 367-392

Shah, F. A., Thomsen, P., Palmquist, A. A review of the impact of implant biomaterials on osteocytes. J. Dent. Res. 2018; 97 (9): 977–986

Shah, F. A., Thomsen, P., Palmquist, A. Osseointegration and current interpretations of bone-implant interface. Acta Biomater. 2019; 84: 1–15

Shelmerdine S.C., Simcock I.C., Hutchinson J.C., Aughwane R., Melbourne A., Nikitichev D.I., Ong J.L., Borghi A., Cole G., Kingham E., Calder A.D., Capelli C., Akhtar A., Cook A.C., Schievano S., David A., Ourselin S., Sebire N.J., Arthurs O.J. 3D printing from microfocus

computed tomography (micro-CT) in human specimens: education and future implications. British Journal of Radiology. 2018; 91(1088): 20180306

Shi L., Shi L., Wang L., Duan Y., Lei Q., Wang Z., Li J., Fan X., Li X., Li S., Guo Z. The Improved Biological Performance of a Novel Low Elastic Modulus Implant. PLoS One. 2013; 8 (2): e55015

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

Schambach S.J., Bag S., Schilling L., Groden Ch., Brockmann M.A.: Application of micro-CT in small animal imaging. 2010; 50 (1): 2-13

Schumacher S., Roth J., Stahl J., Bäumer W., Kietzmann M. Biodegradation of metallic magnesium elicits an inflammatory response in primary nasal epithelial cells. Acta Biomater. 2014; 10(2): 996-1004

Snell J., Dott W. The use of metallic plates in surgery of the facial skeleton. Řím, 1967, prezentováno na 4th International Congress of Plastic and Reconstructive Surgery.

Stock S.R. MicroComputed Tomography: Methodology and Applications. 1. vyd. Boca Raton: CRC Press, 2009. 364 s

Sumita M., Hanawa T., Ohnishi I., Yoneyama T. Comprehensive Structural Integrity. 1. Vyd. Milne I., Ritchie R. O., Karihaloo B. [Online] Amsterdam: Elsevier Publisher, 2003. 5232 s

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

Šimůnek A. Dentální implantologie. Šimůnek A. a kol. Hradec Králové: Nucleus, 2001. 192 s

Thandapani G., Radha E., Jayashri J., Kamala Florence J. A., Sudha P.N. Fundamental Biomaterials: Metals. 1. vyd. Sabu T., Balakrishnan P., Sreekala M. S. [sine loco]: Woodhead Publishing, 2018. 450 s

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

Torroni A., Xiang C., Witek L., Rodriguez E.D., Flores R.L., Gupta N., Coelho P.G. Histo-morphologic characteristics of intra-osseous implants of WE43Mg alloys with and without heat treatment in anin vivocranial bonesheep model. J Craniomaxillofac Surg. 2018; 46(3): 473-478

Vojtech D., Kubasek J., Serak J., Novak P. Mechanical and corrosion properties of newly developer biodegradable Zn-based alloys for bone fixation. Acta Biomaterialia. 2011; 7(9): 3515-22

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

Waksman R., Palala R., Kuchulakanti P.K., Baffour R., Helling D., Seabron R., Tio F.O., Wittchow E., Hartwig S., Harder C., Rohde R.Heubleim B., Andreae A.Waldman K.Haverich A. Safety and efficacy of bioabsorbable magnesium alloy stent in porcine coronary arteries. Catheterization and Cardiovascular Interventions. 2006; 68(4): 607-17

Walker J., Shadanbaz S., Kirkland N.T., Stace E., Woodfield T., Staiger M.P., Dias G.J. Magnesium alloys: Predicting in vivo corrosion with in vitro immersion testing. Journal of Biomedical Materials Research Part B Applied Biomaterials. 2014; 100(4): 1134-41

Wang F. E., Buehler W. J., Pickart S. J. Crystal structure and a unique martensitic transition of TiNi. J. Appl. Phys. 1965; 36 (10): 3232–3239

Weinzweig J. Plastic Surgery Secrets Plus. 2. Vyd. Chicago: Mosby, 2010. 1047s. ISBN: 978-0-323-03470-8

Williams D. New interests in Magnesium. Mediaca Device Technology. 2006; 17 (3): 9-10

Williams D.F. Biocompatibility of clinical implant materials. 1. vyd. Boca Raton: CRC Press, 1982 a. 173 s

Williams D.F. Systemic aspects of biokompatibility. 1. vyd. Boca Raton: CRC Press. 1982 b. 273 s

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

Winzer N., Atrens A., Song G, A critical review of the stress corrosion cracking (SCC) of magnesium alloys. Advanced Engineering Materials. 2005; 7(8): 659-93

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

Witte F., Kaese V., Haferkamp H. In vivo corrosion of four magnesium alloys and the associated bone response. Biomaterials. 2005; 26(17): 3557-63

Woodruff M. A., Hutmacher D. W. The Return of a ForgottenPolymer – Polycaprolactone in the 21st Century. Prog. Polym. Sci. 2010; 35(10): 1217−1256

www.azom.com – a. (https://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=8307). [online] [17.5.2013], [cit. 5.2.2021]

www.azom.com – b. (https://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=863). [online] [13.9.2001], [cit. 5.2.2021]

www.azom.com – c. (https://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=1341). [online] [2.4.2002], [cit. 6.2.2021]

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 – a. (http://www.matweb.com/search/DataSheet.aspx?MatGUID=66a15d609a3f4c829cb6ad08f0dafc01&ckck=1). [online] c1996-2021, [cit. 6.4.2021]

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]

www.spszengrova.cz – a. (https://www.spszengrova.cz/wp-content/uploads/2020/04/ZAV1-Vlastnosti_materialu_GEI.pdf). [online] [4/2020] [cit. 20.5.2021]

www.spszengrova.cz – b. (https://www.spszengrova.cz/wp-content/uploads/2020/04/10_MEC_NAMAHANI_NA_TAH_2_ROCNIK_1_CAST-UT.pdf). [online] [4/2020] [cit. 20.5.2021]

Xue A., Koshy J. C., Weathers W. M., Wolfswinkel E. M., Kaufman Y., Sharabi S. E., Brown R. H., Hicks M. J., Hollier L. H. Local foreign-body reaction to commercial biodegradable implants: an in vivo animal study. Craniomaxillofac Trauma Reconstr. 2014; 7 (1): 27–34

Yamaguchi M., Oishi H., Suketa Y. Stimulatory effect of zinc on bone-formation in tissue-culture. Biochemical Pharmacology. 1987; 36(22): 4007-12

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

Yao H.B., Li Y., Wee S.T.S. An XPS investigation of the oxidation/corrosion of melt-spung Mg. Applied Surface Science. 2000; 158 (1-2): 112-119

Yun Y., Dong Z., Tan Z., Schulz M.J. Development of an electrode cell impedance method to measure osteoblast cell activity in magnesium-conditioned media. Anal Bioanal Chem. 2010; 396(8): 3009-15

Zhang S.X., Li J.A., Song Y. In vitro degradation, hemolysis and MC3T3-E1 cell adhesion of biodegradable Mg-Zn alloy. Materials Science and Engeneering C-Materials for Biomedical application. 2009; 29(6): 1907-12

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

Zhang X.B., Yuan G.Y., Mao L., Niu J.L., Fing W.J. Biocorrosion properties of as-extruded Mg-Nd-Zn-Zr alloy compared with commercial AZ31 and WE43 alloys. Materials Letters. 2012; 66(1): 209-11

Zhao Y., Jamesh M.I., Li W.K., Wu G., Wang C., Zheng Y., Yeung K.W., Chu P.K. Enhanced antimicrobial properties, cytocompatibility, and corrosion resistence of plasma-modified biodegradable magnesium alloys. Acta Biomaterialia. 2014; 10(1): 544-56

Zheng E.L., Yin D.S., Xu L.P., Yang L., Yang K. Microstructure, mechanical and corrosion properties and biokompatibility of Mg-Zn-Mn alloys for biomedical application. Materials Science and Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems. 2009; 29(3): 987-93

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

Zhou X., Jiang L, Wu P., Sun Y., Yu Y., Wei G., Ge H. Effect of agressive ions on degradation of WE43 magnesium alloyn in physiological environment. International Journal of Electrochemical Science. 2014; 9(1): 304-14

Zreiqat H., Evans P., Howlett C.R. Effect of surface chemical modification of bioceramic on phenotype of human bone-derived cells. J Biomed Mater Res. 1999; 44 (4): 389-96

Zreiqat H., Howlett C.R., Zannettino A., Evans P., Schulze-Tanzil G., Knabe C., Shakibaei M. Mechanism of magnesium-stimulated adhesion of osteoblastic cells to commonly used orthopaedic implants. Journal of Biomedical Materials Research. 2002; 62(2): 175-84