

**Univerzita Karlova**

**1. lékařská fakulta**

Studijní program: Experimentální chirurgie

Studijní obor: Experimentální chirurgie



**UNIVERZITA KARLOVA**  
**1. lékařská fakulta**

**MUDr. Roman Štícha**

**Vliv polymerních materiálů na rozvoj septických  
i aseptických komplikací v ortopedii**

**The influence of polymeric materials on the development of  
septic and aseptic complications in orthopedics**

Disertační práce

Školitel: doc. MUDr. Petr Fulín, Ph.D.

Praha, 2024

## **Prohlášení**

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

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

V Praze, dne 30.05.2024

MUDr. Roman Štícha

Podpis:

## Identifikační záznam:

ŠTÍCHA, Roman. Vliv polymerních materiálů na rozvoj septických i aseptických komplikací v ortopedii. [*The influence of polymer materials on the development of septic and aseptic complications in orthopedics*]. Praha, 2024. Počet stran: 86, počet příloh: 0. Disertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, I. ortopedická klinika 1. LF UK a FN Motol. Školitel Fulín, Petr.

## Abstrakt

**Úvod a teoretická část:** Disertační práce se zaměřuje na vliv polymerních materiálů na rozvoj septických a aseptických komplikací v ortopedii. Podrobně jsou uvedeny vlastnosti polymerů, zejména vysokomolekulárního polyethylenu (UHMWPE), a jejich opotřebení a degradace, která může vést k aseptickému uvolnění kloubních náhrad. Dále jsou rozebrány infekce v ortopedii, kam spadají osteomyelitidy, septické artritidy a infekce kloubních náhrad. Vedle standardních léčebných postupů je diskutována a v experimentální části i testována možnost využití lokálních nosičů antibiotik v prevenci a léčbě zmíněných infekcí.

**Materiál a metody:** Pro hodnocení účinnosti nosičů antibiotik byly použity standardní mikrobiologické metody – diluční bujónová metoda testovala bakteriostatický účinek nosičů antibiotik a agarová metoda hodnotila baktericidní účinek. Byly testovány komerční vzorky polymethylmethakrylátu (Palacos®, Palacos R+G® a Vancogenx®) a síranu vápenatého (Stimulan®) a jejich srovnání s experimentálním systémem TPS/PCL. Do nosičů bylo přimícháno glykopeptidové antibiotikum vankomycin. Účinek nosiče s antibiotikem byl testován vůči referenčnímu kmeni CCM 4223 *Staphylococcus aureus*. Bylo provedeno i statistické zhodnocení výsledků.

**Výsledky:** Výsledky ukázaly, že všechny testované nosiče antibiotik vykazovaly spolehlivé bakteriostatické vlastnosti. Baktericidní účinky měly omezenou výpovědní hodnotu, pravděpodobně vlivem více faktorů. U části výsledků byl pozorován statisticky významný rozdíl, a to zejména v nižších koncentracích antibiotika. To svědčí o tom, že s rostoucí koncentrací antibiotika se nosiče stávají podobně účinnými. Nejlepší baktericidní účinek byl zaznamenán u systému Vancogenx®.

**Diskuse:** Byly identifikovány důležité trendy související s vlastnostmi nosičů antibiotik, které mohou ovlivnit jejich účinnost. Rozptyl výsledků byl pravděpodobně způsoben homogenitou disperze antibiotik v systémech a horší reprodukovatelností agarové metody.

**Závěr:** Studie potvrzuje účinnost komerčních nosičů antibiotik i experimentální kompozice TPS/PCL v inhibici růstu bakterií, přičemž zdůrazňuje potřebu dalšího výzkumu pro optimalizaci materiálů a metod léčby.

**Klíčová slova:** polymerní materiály, UHMWPE, otěr, oxidativní degradace, tribologie, komplikace kloubních náhrad, aseptické uvolnění, infekce v ortopedii, infekce kloubních náhrad, systémy pro lokální uvolňování antibiotik, lokální nosiče antibiotik, kostní cement, síran vápenatý, kalcium sulfát, antimikrobiální účinnost, *Staphylococcus aureus*, bakteriostatický účinek, baktericidní účinek, diluční metoda, agarová metoda, vankomycin, MIC, minimální inhibiční koncentrace, MBC, minimální baktericidní koncentrace.

## Abstract

**Introduction and theoretical part:** The thesis focuses on the influence of polymeric materials on the development of septic and aseptic complications in orthopaedics. The properties of polymers, particularly high molecular weight polyethylene (UHMWPE), and their wear and degradation that can lead to aseptic loosening of joint replacements are detailed. Infections in orthopaedic patients, which include osteomyelitis, septic arthritis and prosthetic joint infections, are also discussed. In addition to standard therapeutic procedures, the possibility of using local antibiotic carriers in the prevention and treatment of these infections is discussed and tested in an experimental part of the thesis.

**Material and methods:** Commercial samples of polymethyl methacrylate (Palacos®, Palacos R+G® and Vancogenx®) and calcium sulfate (Stimulan®) were tested and compared with the experimental TPS/PCL system. The glycopeptide antibiotic vancomycin was mixed into the carriers. The effect of the carrier with the antibiotic was tested against the reference strain CCM 4223 *Staphylococcus aureus*. Statistical evaluation of the results was also performed.

**Results:** The results showed that all the local antibiotic carriers tested showed reliable bacteriostatic properties. The bactericidal effects were of limited significance, probably due to multiple factors. A statistically significant difference was observed for some of the results, especially at lower antibiotic concentrations. This suggests that the carriers become similarly effective with increasing antibiotic concentration. The best bactericidal effect was observed with the Vancogenx® system.

**Discussion:** Important trends related to the properties of antibiotic carriers that may affect their efficacy have been identified. The diversity of results was probably due to the homogeneity of antibiotic dispersion in the systems and the poorer reproducibility of the agar method.

**Conclusions:** This study confirms the efficacy of commercial local antibiotic carriers and the experimental TPS/PCL in inhibiting bacterial growth, highlighting the need for further research to optimize materials and treatment methods.

**Keywords:** polymers, UHMWPE, wear, oxidative degradation, tribology, complications of joint replacements, aseptic loosening, infections in orthopedics, prosthetic joint infections, local antibiotic delivery, local release of antibiotic, antibiotic carriers, bone cement, calcium sulfate, antimicrobial susceptibility, *Staphylococcus aureus*, bacteriostatic effect, bactericidal effect, dilution method, agar method, vancomycin, MIC, minimum inhibitory concentration, MBC, minimum bactericidal concentration.

## Poděkování

Rád bych vyjádřil své upřímné poděkování všem, kteří mi pomohli při tvorbě této disertační práce. V první řadě děkuji svému školiteli, doc. MUDr. Petru Fulínovi, Ph.D., za jeho skvělé vedení při studiu, přátelskou povahu, ochotu pomoci a velkou trpělivost. Jeho systematické vedení, podpora a rady byly klíčové pro úspěšné dokončení této práce. Nesmírně si toho vážím.

Mé poděkování patří také týmu z Ústavu makromolekulární chemie Akademie věd České republiky (ÚMCH). Jejich pozoruhodné znalosti a předchozí vědecká práce byly nepostradatelné pro uskutečnění všech experimentů. Příprava nosičů antibiotik proběhla právě na půdě ÚMCH. Obrovské díky patří vedoucímu týmu, doc. RNDr. Miroslavu Šloufovi, Ph.D., a dalším členům jeho týmu. Zejména chci poděkovat za spolupráci, ochotu i pozitivní náladu RNDr. Veronice Gajdošové, Ph.D., a laborantu Pavlu Němečkovi.

Dále bych chtěl poděkovat primáři MUDr. Otakaru Nyčovi z Ústavu lékařské mikrobiologie 2. LF UK a FN Motol za jeho cenné rady a odbornou mikrobiologickou pomoc, které byly velmi důležité pro realizaci této studie.

Poděkování patří i kolegyním a kolegům z I. Ortopedické kliniky 1. LF UK a FN Motol, kteří mě podporovali během mého výzkumu a nejednou podali pomocnou ruku. Velmi si vážím jejich přátelství a profesionálního přístupu.

V neposlední řadě bych chtěl vyjádřit hlubokou vděčnost celé své rodině za jejich neustálou podporu. Zejména děkuji své manželce Marušce, mamce Alence i bratrovi Honzovi za pomoc, upřímné povzbuzení a trpělivost během mého studia. Jejich porozumění a náklonnost pro mě byly nepostradatelné a nezměrně si vážím jejich lásky.

Děkuji vám všem za vaši pomoc a podporu,  
Roman Štícha.

## Seznam nejčastěji použitých zkratk

ATB – antibiotikum

CCEP – cervikokapitální endoprotéza

IKN – infekce kloubních náhrad

NRKN – Národní registr kloubních náhrad

MIC – minimální inhibiční koncentrace

MBC – minimální baktericidní koncentraci

MSSA – meticilin senzitivní *S. aureus*

MRSA – meticilin rezistentní *S. aureus*

PE – polyethylen

PCL – polykaprolakton

PMMA – polymethylmethakrylát (kostní cement)

TEP – totální endoprotéza

TCP – fosforečnan vápenatý

TPS/PCL – termoplastický kompozit obsahující polysacharidovou složku ve směsi s poly- $\epsilon$ -kaprolaktonem

UHMWPE – ultra high molecular weight polyethylene (vysokomolekulární polyethylen)

VRE – vankomycin rezistentní enterokoky

VRSA – vankomycin rezistentní *S. aureus*

# Obsah

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>10</b>
2.1	ASEPTICKÉ SELHÁNÍ KLOUBNÍCH NÁHRAD .....	10
2.1.1	<i>Otěr artikulačních povrchů</i> .....	13
	UHMWPE.....	13
	Druhy otěru .....	14
	Polyethylenová choroba.....	16
	Párování artikulačních povrchů .....	17
2.1.2	<i>Oxidativní degradace</i> .....	19
2.2	INFEKCE V ORTOPEDII.....	20
2.2.1	<i>Osteomyelitidy</i> .....	20
2.2.2	<i>Septické artritidy</i> .....	25
2.2.3	<i>Septické komplikace kloubních náhrad</i> .....	26
2.2.4	<i>Antibiotika užívaná v ortopedii pro celkovou a lokální terapii</i> .....	32
	Beta-laktamová antibiotika.....	33
	Linkosamidy – klindamycin .....	34
	Fluorochinolony – ciprofloxacin a levofloxacin .....	34
	Glykopeptidy – vankomycin.....	35
	Aminoglykosidy – gentamicin a další .....	35
	Kotrimoxazol.....	36
	Metronidazol .....	36
	Oxazolidinony – linezolid .....	36
	Daptomycin .....	37
	Polypeptidy – kolistin (polymyxin E) .....	37
	Účinek proti biofilmu – rifampicin a ciprofloxacin.....	37
2.2.5	<i>Lokální nosiče antibiotik</i> .....	38
	Nebiodegradabilní nosiče ATB .....	39
	Biodegradabilní nosiče ATB .....	42
	Moderní nosiče ATB na bázi polymerů.....	44
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>45</b>
3.1	ÚVOD, CÍLE A HYPOTÉZY .....	45
3.2	MATERIÁL A METODIKA.....	46
3.2.1	<i>Materiál</i> .....	46
	Kostní cement (PMMA) .....	46
	Síran vápenatý (Stimulan®).....	48
	Termoplastický kompozit TPS/PCL.....	48
3.2.2	<i>Metodika</i> .....	49
	Příprava vzorků .....	49
	Příprava vzorků pro testování antimikrobiální aktivity.....	51
	Metody ke stanovení citlivosti mikroorganismu k ATB .....	51



Využití diluční a agarové metody v testování nosičů ATB.....	52
Metody použité k hodnocení výsledků v kontextu hypotéz a statistická analýza.....	54
3.3    VÝSLEDKY .....	56
3.3.1 <i>Statistické zhodnocení rozdílů mezi nosiči</i> .....	59
3.4    DISKUSE .....	60
3.4.1 <i>Lokální nosiče</i> .....	60
PMMA (kostní cement) .....	60
Síran vápenatý (Stimulan®) .....	62
TPS/PCL/ATB.....	63
3.4.2 <i>Výsledky diluční bujónové metody</i> .....	63
1) Účinnost při různých koncentracích: .....	63
2) Srovnání nosičů: .....	64
3.4.3 <i>Výsledky agarové metody</i> .....	64
1) Účinnost při různých koncentracích: .....	65
2) Srovnání nosičů: .....	65
3.4.4 <i>Omezení studie a jiné vlivy</i> .....	66
Vliv vlastností nosiče na výsledky experimentu .....	66
3.4.5 <i>Hodnocení a porovnávání nosičů ATB</i> .....	68
3.4.6 <i>Doporučení pro budoucí výzkum</i> .....	69
3.4.7 <i>Zhodnocení hypotéz</i> .....	69
<b>4    ZÁVĚR .....</b>	<b>71</b>
4.1    DOPORUČENÍ PRO KLINICKOU PRAXI.....	72
<b>5    LITERATURA .....</b>	<b>73</b>

# 1 ÚVOD

Polymerní materiály, zejména vysokomolekulární polyethylen (UHMWPE), jsou klíčové v ortopedii v oblasti aseptických komplikací. Degradace UHMWPE může vést k aseptickému uvolnění kloubních komponent a nutnosti revizních operací. Dalším významným problémem jsou infekce kloubních náhrad a jiné infekce kostí a kloubů, které mohou způsobit závažné zdravotní komplikace. Tato disertační práce se zaměřuje na hodnocení antimikrobiální účinnosti systémů pro lokální uvolňování antibiotik (nosiče antibiotik) včetně nového polymerního kompozitu TPS/PCL. Cílem je ověřit spolehlivost mikrobiologických metod a kvantifikovat antimikrobiální účinnost těchto nosičů, což poskytne ucelený pohled na jejich využití v ortopedii.

Disertační práce je rozdělena na teoretickou a praktickou (experimentální) část.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Aseptické selhání kloubních náhrad

V ortopedii, zejména v endoprotetice, se široce užívá polymerní materiál. Celosvětově nejužívanější polymerní materiál je vysokomolekulární polyethylen (UHMWPE – ultra high molecular weight polyethylene). Jde o nejužívanější materiál v rámci artikulačních povrchů v aloplastice. Definice aseptického uvolnění kloubní náhrady se liší. Obecně se jedná o selhání kloubní náhrady bez prokazatelné infekce (např. lze zahrnout mechanické selhání komponent, instabilitu, periprotetické zlomeniny apod.). Častěji se uvádí jako příčina selhání v důsledku polyethylenového granulomu a opotřebení artikulační komponenty čili uvolnění komponent v důsledku selhání artikulačních povrchů (zejména UHMWPE). Aseptické uvolnění je hlavní příčinou revize kloubní náhrady. Podle registru kloubních náhrad je tato příčina zaznamenána u 63,62 % revizí náhrad kyčelních kloubů (za roky 2003-2024) a u 35 % revizí náhrad kolenních kloubů (viz tab. 1 a 2)(NRKN 2024).

Aseptické uvolnění kloubní náhrady je ovlivněno širokou škálou faktorů, které lze rozdělit do tří skupin (Fulín 2020).

První skupinu faktorů tvoří aspekty spojené s pacientem. Klíčovou roli v ovlivňování funkce a životnosti kloubní náhrady hraje spolupráce pacienta, která zahrnuje dodržování léčebného plánu, například prevenci vykloubení náhrady a dodržování pooperační rehabilitace. Pravidelné kontroly prováděné lékařem mají za cíl minimalizovat riziko vzniku kostních defektů a periprotetických zlomenin v důsledku osteolýzy. Je důležité si uvědomit, že kloubní náhrada by měla být vystavena vhodné úrovni fyzické aktivity. Při nadměrném sportovním zatížení může dojít k zvýšenému riziku úrazu, jako je luxace náhrady nebo periprotetické zlomeniny. Imunitní reakce hrají významnou roli v rozvoji polyethylenového granulomu, ačkoli mechanismy těchto reakcí nejsou úplně objasněny. Polymorbidita také

představuje rizikový faktor selhání kloubní náhrady, s obezitou spojené vyšší tlaky na náhradu mohou zvyšovat riziko jejího selhání. Navíc u obézních pacientů může dojít ke zvýšenému riziku chyb při implantaci, což může vést k časným selháním. Možné riziko představují také imunitní poruchy nebo imunosupresivní terapie a jejich vliv na reakce na otěrové částice. Existuje rovněž možnost, že porucha kostního metabolismu může být rizikovým faktorem v rámci polymorbidity, avšak tyto skutečnosti nebyly dosud jednoznačně prokázány v dostupné literatuře.

<b>Rok 2003–2024</b>	<b>Celkem</b>	
<b>Příčina revize náhrady kyčelního kloubu</b>	<b>Počet</b>	<b>%</b>
Bolest a omezení rozsahu pohybu	153	0,41 %
Bolest bez zřetelného uvolnění	258	0,68 %
Bolest nejasné etiologie nebo lokalizace	33	0,09 %
Cévní komplikace	4	0,01 %
Dehiscence či nekróza rány	99	0,26 %
Hematom v ráně	258	0,68 %
Hluboká infekce	3 453	9,14 %
Jiná příčina	699	1,85 %
Mechanické selhání implantátu	1 252	3,31 %
Nelze zjistit	10	0,03 %
Opotřebení PE jamky	2 261	5,99 %
Osteolýza acetabula	1 274	3,37 %
Osteolýza proximálního femoru	921	2,44 %
Pakloub velkého trochanteru	21	0,06 %
Paraartikulární osifikace	677	1,79 %
Periprotetická zlomenina	2 524	6,68 %
Periprotetická zlomenina femuru	1	0,00 %
Poškození nebo iritace nervu	4	0,01 %
Pouhé omezení rozsahu pohybu	3	0,01 %
Recidivující hydroks bez zjištěné příčiny	8	0,02 %
Recidivující luxace	2 757	7,30 %
Reimplantace – druhá doba	1 152	3,05 %
Repozice nereponibilní luxace	380	1,01 %
Uvolnění acetabulární komp. aseptické	11 866	31,41 %
Uvolnění femorální komp. aseptické	7 709	20,41 %
<b>Celkem</b>	<b>37 777</b>	<b>100 %</b>

Tabulka 1: Příčiny revizních operací náhrady kyčelního kloubu v letech 2003-2024. Červeně vyznačeny příčiny revize v důsledku polyethylenového granulomu nebo opotřebení polyethylenové artikulární komponenty (NRKN 2024).

Rok 2015–2024	Celkem	
	Příčina revize náhrady kolenního kloubu	Počet
Clunk syndrom	10	0,12 %
Anterior knee pain	392	4,77 %
Artrofibróza nebo osifikace	74	0,90 %
Bolest a omezení rozsahu pohybu	239	2,91 %
Bolest bez zřetelného uvolnění	294	3,58 %
Bolest nejasné etiologie	65	0,79 %
Cévní komplikace	4	0,05 %
Dehiscence či nekróza rány	90	1,10 %
Desaxace extenčního aparátu	34	0,41 %
Desaxace FT	46	0,56 %
Hematom v ráně	63	0,77 %
Hluboká infekce	1 700	20,70 %
Instabilita	545	6,64 %
Jiná příčina	217	2,64 %
Luxace FT	58	0,71 %
Luxace pately	77	0,94 %
Mechanické selhání implantátu	529	6,44 %
Nelze zjistit	21	0,26 %
Opotřebení a polyethylenový otěr FT	257	3,13 %
Opotřebení a polyethylenový otěr	18	0,22 %
Opotřebení PE vložky	147	1,79 %
Paraartikulární osifikace	11	0,13 %
Periprotetická zlomenina femuru	182	2,22 %
Periprotetická zlomenina náhrady	4	0,05 %
Periprotetická zlomenina tibie	48	0,58 %
Pouhé omezení rozsahu pohybu	69	0,84 %
Recidivující hydroks bez zjištěné příčiny	54	0,66 %
Reimplantace – druhá doba	445	5,42 %
Repozice nereponibilní luxace	16	0,19 %
Ruptura lig. patellae	23	0,28 %
Ruptura m. quadriceps	16	0,19 %
Uvolnění femorální komponenty aseptické	1 055	12,85 %
Uvolnění patelární komponenty	20	0,24 %
Uvolnění tibiální komponenty aseptické	1 377	16,77 %
Zlomenina pately bez implantátu	11	0,13 %
<b>Celkem</b>	<b>8211</b>	<b>100 %</b>

Tabulka 2: Příčiny revizních operací náhrady kolenního kloubu v letech 2015-2024. Červeně vyznačeny příčiny revize v důsledku polyethylenového granulomu nebo opotřebení polyethylenové artikulární komponenty (NRKN 2024).

Druhá skupina faktorů, která ovlivňuje riziko aseptického selhání, jsou faktory spojené s chirurgem. Nejdůležitějším z nich je samozřejmě technika implantace. Chyby v orientaci jednotlivých komponent mohou mít zásadní dopad na funkci a životnost náhrady. Při implantaci náhrady kyčelního kloubu může nadměrná abdukce (inklinace) jamky způsobit nerovnoměrné zvýšení tlaku na okraj implantátu, což vede k rychlejšímu opotřebení nebo dokonce k jeho zlomení. Experimentálně bylo prokázáno, že při sklonu acetabulární komponenty nad 50° se výrazně zvyšuje tlak na náhradu, a to i při použití hlavic různého průměru (Daniel et al. 2016). Nesprávná rotace tibiální a femorální komponenty může změnit biomechaniku a přetížít kloubní plochy, což může zvýšit riziko rychlého opotřebení a selhání implantátů (Vavřík et al. 2019). Chirurg by měl pravidelně monitorovat pacienty a včas

indikovat revizní operaci, aby předešel rozsáhlejšími kostními ztrátám a souvisejícím komplikacím.

Třetí skupinu faktorů tvoří aspekty týkající se kvality samotného implantátu. Kvalita použitého polymeru je klíčovým faktorem pro správnou funkci a dlouhodobou životnost kloubní náhrady. Proces výroby, modifikace a sterilizace mají rozhodující vliv na kvalitu použitého materiálu. Způsob skladování a distribuce může také ovlivnit kvalitu implantátu. Design implantátu hraje rovněž důležitou roli, pokud je konstrukce nesprávná a způsobuje přetížení určitých částí, může dojít k únavovému selhání. U některých implantátů je častěji poškozována okrajová část vložky, což se nazývá rim fracture (Kurtz 2015). Protilehlý artikulární povrch také hraje významnou roli v rychlosti opotřebení a poškození implantátu. Pokud je tento povrch poškozen, například poškrábáním, může docházet k urychlenému opotřebení. V následujících částech práce budou podrobněji zkoumány jednotlivé faktory, které ovlivňují opotřebení a oxidaci implantátu.

### 2.1.1 Otěr artikulárních povrchů

#### UHMWPE

Ultravysokomolekulární polyethylen (UHMWPE) je typ termoplastického polymeru, který má semikrystalickou strukturu a je pevnou bílou látkou. Vytváří se polymerací ethylenu ( $C_2H_4$ ) za vzniku extrémně dlouhých molekul. Jedna molekula polyethylenu obvykle obsahuje kolem 200 000 monomerů ethylenu. Relativní molekulová hmotnost tohoto polyethylenu je obvykle přibližně 0,2 miliónu g/mol. Polyethylen s vysokou hustotou (UHMWPE) je klasifikován jako vysokomolekulární, a jeho relativní molekulová hmotnost se obvykle pohybuje v rozmezí od 2 do 9 miliónů g/mol (Fulín 2015). Jeho strukturu lze představit jako uspořádané lamely v amorfní fázi. Tato specifická struktura poskytuje klíčové vlastnosti UHMWPE pro ortopedické použití, jako je vysoká odolnost vůči otěru, nízký koeficient tření, značná pevnost, houževnatost a odolnost proti únavě polymeru (Kurtz 2015). Další výhodou je dobrá biokompatibilita, což je klíčový faktor pro jeho použití v implantacích do živých tkání (Kurtz 2015).

Z hlediska modifikací a úprav lze rozlišit tři generace vysokomolekulárního polyethylenu. V českém kontextu se tyto generace označují jako první, druhá a třetí, na rozdíl od anglosaské literatury, kde se používají pojmy "panenský" polyethylen a UHMWPE první a druhé generace (Kurtz 2015).

První generace je charakterizována absencí jakýchkoli modifikací, jako je ozáření nebo tepelné úpravy. Často se také označuje jako "panenský" polyethylen. Součástí výrobního procesu je sterilizace, která je nezbytným krokem pro aseptickou implantaci komponent. Tento typ materiálu byl široce používán od 70. do 90. let 20. století. V posledních letech jeho použití postupně klesá (Fulín 2015).

Druhá generace vznikla jako reakce na komplikace spojené s otěrem a oxidativní degradací, které se postupně objevovaly u první generace při kloubních náhradách. Cílem druhé generace UHMWPE bylo vylepšit tyto klíčové vlastnosti a zároveň zachovat stávající mechanické vlastnosti. Modifikace struktury je založena zejména na síťování polymeru a následných tepelných úpravách.

Třetí generace UHMWPE vznikla v důsledku snížení mechanických vlastností, které se objevily u předchozích generací. Hlavním cílem této generace je provádět modifikace s minimálním nebo žádným zhoršením mechanických vlastností UHMWPE. Obecně lze říci, že třetí generace vychází z procesů používaných při výrobě výrobků z UHMWPE druhé generace, ale zavádí také nové postupy, které se začaly používat v prvních dekádách 21. století. V současné době jsou k výrobě používány technologie jako je sekvenční ozařování nebo přidání stabilizátoru, přičemž nejběžnější je vitamín E.

## **Druhy otěru**

Obor tribologie se zaměřuje na výzkum otěru materiálů a souvisejících jevů, jako je tření a lubrikace povrchů. Tření je definováno jako odpor vznikající při pohybu povrchů. Lubrikace se pak zabývá metodami snižování tohoto tření (Landor 2012).

Z mikroskopického hlediska se otěr projevuje uvolňováním mikroskopických částic z povrchů, přičemž často dochází k otěru měkčího povrchu v místě kontaktu dvou materiálů. Tento proces může vést k nežádoucím aktivacím, jako je osteolýza kostního lůžka endoprotézy. Z makroskopického pohledu se projevuje otěr jako postupné opotřebení materiálu, což může vést k selhání implantátu. Otěr je klíčovým faktorem ovlivňujícím funkci a životnost kloubní náhrady.

Tribologie rozlišuje 5 různých mechanismů otěru (Wright a Goodman 2001):

### **1) Adhezivní otěr (adhesive wear)**

Adhezivní otěr je charakterizován jako proces přenosu částic materiálu mezi primárními povrchy při těsném pohybu mezi nimi. Typicky se jedná o uvolňování mikroskopických částic, obvykle z měkčího povrchu, jako je UHMWPE, při jejich vzájemném klouzání s jinými povrchy, například kovovými nebo keramickými. Tento proces je komplexní, kde dochází k převaze třecí síly nad silami udržujícími integritu materiálu (Wright a Goodman 2001).

### **2) Abrazivní otěr (abrasive wear)**

Abrazivní otěr je charakterizován jako opotřebení měkčího povrchu v důsledku nerovnosti povrchu tvrdšího materiálu. Tribologové rozlišují dva hlavní typy abrazivního otěru:

- a) Poškrábání (scratching): tento jev nastává, kdy je na povrchu tvrdšího materiálu, například na hlavičce femorální komponenty, vytvořena nerovnost, která následně "vyryje" částice z měkčího povrchu, jako je UHMWPE.
- b) Vtlačování (embedding): v tomto případě dochází k vtlačení fragmentu kosti, PMMA, keramiky nebo kovu do povrchu UHMWPE, což může způsobit poškrábání, například kovové hlavičky, a urychlit tak otěr (Vavřík et al. 2019).

### 3) Únavový otěr (fatigue wear)

Únavový otěr nastává v důsledku opakovaného namáhání artikulačního povrchu. Pod povrchem UHMWPE se vytváří napětí, což vede ke vzniku mikrotrhlin (povrchová únava). Tyto strukturální změny pak vedou k uvolňování částic z povrchu UHMWPE (fretting wear). Tento typ otěru lze rozdělit do tří základních kategorií:

- a) Důlkování (pitting)
 

Při důlkování dochází k vzniku malých důlků o průměru přibližně 1-3 mm a hloubce 1-2 mm. Většinou se zde uvolňují větší částice, které však nejsou tak biologicky aktivní, protože jsou příliš velké na pohlcení makrofágem.
- b) Delaminace (delamination)
 

Delaminace nastává, když dochází k tvorbě a odlučování jemných povrchových lamel UHMWPE v důsledku přetížení povrchu komponenty.
- c) Povrchová deformace (creep)
 

Při povrchové deformaci dochází k plastické deformaci povrchu UHMWPE v důsledku deformace typu "toku za studena".

### 4) Otěr způsobený třetím tělesem (third body wear)

Tento typ opotřebení je charakterizován tím, že mezi dva hlavní artikulační povrchy je vloženo cizí těleso, obvykle fragment kosti, polymethylmethakrylát (PMMA) nebo částice z povrchu implantátu. Tento proces často způsobuje urychlení abrazivního otěru a následné opotřebení artikulační komponenty z UHMWPE.

### 5) Korozivní otěr (corrosive wear)

Korozivní otěr je definován jako proces opotřebení způsobený uvolněnými otěrovými částicemi třetího tělesa, které pronikají mezi dva hlavní artikulační povrchy (Vavřík et al. 2019).

Kromě mechanismů otěru se v oboru tribologie také rozlišují různé stavy, ve kterých k otěru dochází, nazývané jako módy otěru. Běžně se uvádí 4 základní módy otěru (Fulín 2020):

- 1) **Mód 1** nastává při otěru mezi hlavními artikulačními povrchy, které jsou určeny k tomuto účelu.
- 2) **Mód 2** je charakterizován otěrem mezi povrchem určeným k artikulaci a povrchem, který pro tento účel není určen. Například kontakt hlavičky TEP kyčelního kloubu, která penetrovala UHMWPE vložku a přichází do kontaktu s kovovou acetabulární

komponentou. U kolenního kloubu může dojít k otěru při kontaktu kondylárních částí kovové femorální komponenty s povrchem tibiální kovové komponenty.

- 3) **Mód 3**, často označovaný jako otěr způsobený třetím tělesem, spočívá v interpozici cizího tělesa mezi dva hlavní artikulární povrchy. Častými příklady jsou fragment kosti, polymethylmethakrylátu (PMMA) nebo částice z povrchu implantátu. Tento jev může také poškodit primární povrch, což vede k urychlení otěru mezi hlavními povrchy (mód 1).
- 4) **Mód 4** zahrnuje otěr mezi dvěma sekundárními povrchy, které nejsou určeny k artikulaci. Příkladem je tzv. „back side wear“, kdy se vzájemně pohybují opačné strany UHMWPE vložky s vnitřním povrchem acetabulární nebo tibiální komponenty. Dalším příkladem může být kontakt krčku femorální komponenty s hranou acetabulární komponenty při jejich vzájemném střetu.

### **Polyethylenová choroba**

Vzájemný pohyb mezi artikulárními povrchy způsobuje vznik otěrových částic z materiálu UHMWPE (Kurtz 2015). Tyto částice se uvolňují do okolních tkání kolem implantátu, nazývaných periprotetické tkáně (Sosna et al. 2003). Hydraulické a hydrodynamické síly, vyvolávané pohybem kloubu, dále vtlačují tyto částice do měkkých tkání a do rozhraní mezi implantátem a kostním lůžkem. Biologická reakce organismu na otěrové částice polyethylenu je známa jako polyethylenová choroba (Sosna et al. 2003). Když makrofágy fagocytují tyto částice, dochází k makroskopické odpovědi tkání, která se projevuje jako vznik polyethylenového granulomu. Základní princip polyethylenové nemoci spočívá v interakci otěrových částic s makrofágy, které je pohlcují. Organismus reaguje na tyto částice jako na cizí tělesa, což způsobuje imunitní reakci (Goodman et al. 1998). Otěrové částice v periprotetických tkáních aktivují fagocytózu prostřednictvím stimulace monocytů, makrofágů a trombocytů. Tyto buňky jsou aktivovány vazbou receptorů na povrchu částic, což zahrnuje faktory komplementu, koagulační faktory a další. Aktivované makrofágy produkují zejména interleukiny (IL-1, IL-6), TNF- $\alpha$  (tumor necrosis faktor alfa) a M-CSF (macrophage colony stimulating factor), což vyvolává lokální nebo systémovou imunitní reakci. M-CSF reguluje proliferaci prekurzorů osteoklastů, což indukuje tvorbu osteoklastů. Důležitým faktorem v patogenezi polyethylenové choroby je RANKL (receptor aktivátoru nukleárního faktoru – kappa B ligand), který spolu s M-CSF způsobuje maturaci prekurzorových buněk na zralé osteoklasty. Regulační mechanismy polyethylenové nemoci jsou složité a dosud nejsou úplně objasněny (Gallo et al. 2010; 2013).

Z klinického hlediska může polyethylenová choroba dlouho probíhat bez příznaků. Jakmile se implantát začne postupně uvolňovat v důsledku osteolytických procesů, začne pacient pociťovat bolesti. Tyto bolesti obvykle nejsou klidové a často se zhoršují při pohybu, zejména při zatížení postižené končetiny. Místo největší bolesti závisí na umístění náhrady. U



kyčelní náhrady se nejčastěji vyskytují bolesti v hlubokých partiích třísla nebo ve stehně (pokud dojde k uvolnění dřívku). U kolenní endoprotézy je bolest nejčastěji lokalizována do oblasti proximální části tibie nebo distálního femuru a je zesílena při zatížení. V pokročilých stádiích může dojít k nestabilitě (například u decentrace hlavice kvůli opotřebením polyetylenové vložky u kyčelní náhrady) nebo k poruchám osy (například u migrace tibiální nebo femorální komponenty u kolenní náhrady). Pravidelné kontroly pacientů s velkými kloubními náhradami jsou důležité pro diagnostiku polyetylenové choroby v raných stádiích a prevenci vzniku rozsáhlých kostních defektů, které mohou dlouho probíhat bez příznaků. Na rentgenových snímcích se polyetylenová choroba typicky projevuje osteolýzou (translucentními zónami) kolem endoprotézy (Pokorný et al. 2010).

### **Párování artikulačních povrchů**

V oblasti tribologie existují dva hlavní typy párování artikulačních povrchů v endoprotetice. První typ je nazýván "hard-on-hard" a spočívá v kontaktu mezi dvěma tvrdými materiály. V praxi se toto párování často provádí s kombinací keramika-keramika a kov-kov. Tato konfigurace se používá především při nahrazování kyčelních kloubů. Nicméně, kombinace kovu s kovem je nyní kontroverzní kvůli riziku uvolňování chromových a kobaltových iontů do krevního oběhu, což může vést k různým rizikům a komplikacím (Fulín 2020). Párování "hard-on-hard" se experimentálně testuje v endoprotetice jiných kloubů, ale převážně se uplatňuje při nahrazování kyčelních kloubů (AOANJRR 2019). Na druhou stranu, většina náhrad velkých kloubů, s výjimkou kyčelních kloubů, využívá párování "hard-on-soft". Tento druh párování kombinuje tvrdý povrch (kov nebo keramika) s měkkým povrchem (UHMWPE).

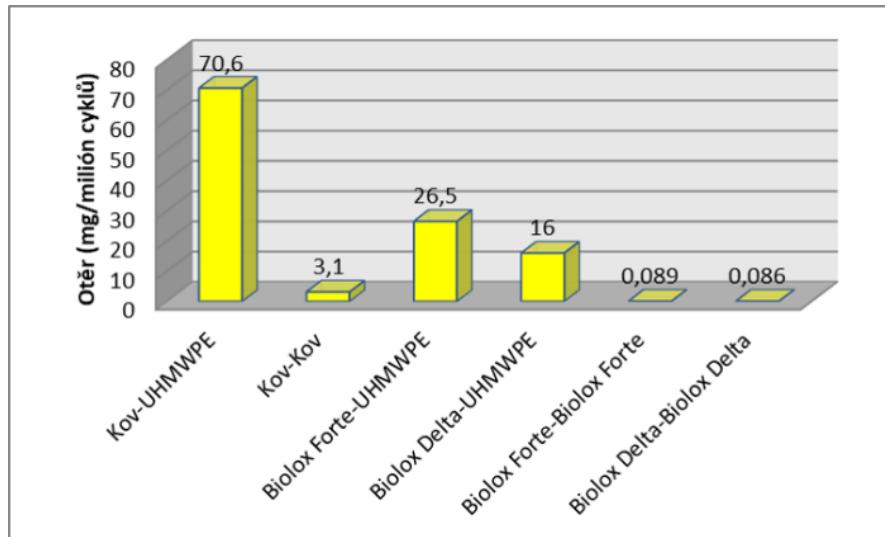
#### **a) Párování kov-UHMWPE**

Párování kov-UHMWPE je nejběžnější kombinací materiálů pro umělé klouby, zejména při náhradě kyčelního kloub (obr. 1). Tato kombinace se téměř výhradně používá i při náhradě kolenního, ramenního, hlezenního a loketního kloubu. Nevýhodou kovových implantátů je jejich náchylnost k poškrábání při manipulaci, implantaci nebo při styku s kostními fragmenty nebo PMMA. I malé škrábance na artikulačním povrchu mohou vést k nerovnostem, které výrazně zvyšují abrazivní opotřebením UHMWPE.

#### **b) Párování keramika-UHMWPE**

V roce 1977 poprvé kombinoval keramický a UHMWPE povrch Shikata v Japonsku. Díky klesající ceně keramiky se párování keramika-UHMWPE stále více a více používá, zejména při náhradě kyčelního kloubu. Keramika vykazuje výrazně větší odolnost proti poškrábání třetím tělesem. Keramický povrch má oproti kovu lepší smáčivost (hydrofilitu), což vede ke zlepšení tribologických podmínek. Vyšší hydrofilita snižuje třecí síly, zlepšuje lubrikaci a také zvyšuje odolnost proti opotřebením (obr. 1).

Využití párování keramika-UHMWPE při náhradě kolenního, ramenního, loketního a hlezenního kloubu je spíše ojedinělé. Typicky se používá pouze v případech, kdy má pacient alergii na kovy obsažené v kovových částech endoprotézy.



Obrázek 1: Přehled množství otěru u jednotlivých párování artikulárních povrchů. Převzato z práce (Fulín 2020), volně podle Kaddicka (Kaddick a Pfaff 2002).

### c) Párování keramika-keramika

V současné době se užívá pouze v případě náhrady kyčelního kloubu. Toto párování vykazuje výrazně lepší otěrové vlastnosti (obr. 1). Nevýhodou může být riziko prasknutí materiálu. V současné době vzhledem ke zlepšení technologie výroby tohoto materiálu je toto riziko však velmi malé. Mezi další nevýhody můžeme řadit nepříjemné zvuky označované jako „squeezing“ a rovněž i vyšší cenu implantátů.

### d) Párování kov-kov

Jak již bylo zmíněno výše, párování kov-kov je v současné době poměrně kontroverzní téma. Je předpokládáno, že zvýšený počet revizí endoprotéz kyčelního kloubu typu kov-kov souvisí s nepříznivými reakcemi na kovové částice uvolňované z nosných ploch během pohybu implantátů. Tyto reakce způsobují změny v měkkých tkáních kolem kloubu a jsou shrnuty pod termínem nežádoucí účinky kovových částic (ARMD – adverse reaction to metal debris) (Fulín 2020). Rozsah těchto nežádoucích účinků je široký, sahá od malých asymptomatických cyst po rozsáhlé hmoty měkkých tkání, označované jako pseudotumory (European Commission a Directorate-General for Health and Consumers 2014). Léze spojené s aseptickou lymfocytární vaskulitidou jsou známy jako ALVAL (aseptic lymphocyte-dominant vasculitis associated lesion). ALVAL je histologickým diagnózou, která popisuje specifické buněčné změny, jež se objevují kolem endoprotézy v reakci na kovové částice. Tento

mechanismus je pravděpodobně zprostředkován hypersenzitivní reakcí typu IV prostřednictvím T lymfocytů, což vede k poškození tkání prostřednictvím cytotoxických T buněk a aktivovaných monocytů nebo makrofágů (Watters et al. 2010).

Kontroverzní je riziko zvýšené sérové hladiny iontů chromu a kobaltu s jejich možnými nežádoucími účinky, zejména kardiotoxickými (Hach et al. 2020).

### 2.1.2 Oxidativní degradace

Aseptické uvolňování způsobené oxidativní degradací představuje jednu z hlavních příčin selhání polymerních materiálů, kdy dochází ke strukturálním změnám. Tyto změny vedou nejen k degradaci kvality polyethylenu, ale také k urychlení otěru.

Problematika oxidace UHMWPE a její role při aseptickém selhání se stala vědeckým zájmem až v posledních dvaceti letech, především kvůli nečekanému selhání kloubních náhrad.

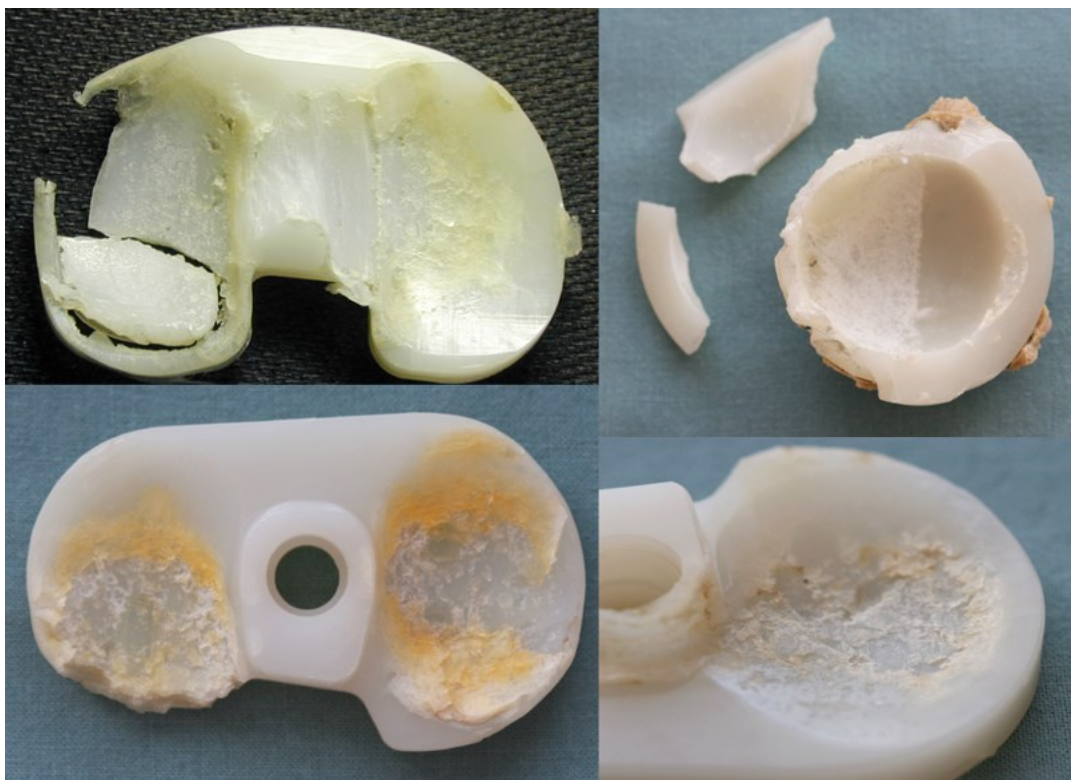
Oxidace je proces, při kterém dlouhé molekuly polyethylenu reagují s kyslíkem. Tato reakce zpravidla vede k rozštěpení molekul polyethylenu, což má za následek snížení klíčových vlastností materiálu, zejména jeho odolnosti vůči otěru. Proto se pro tento proces často používá termín oxidativní (oxidační) degradace (Slouf et al. 2009; 2008; Fulín 2015; 2020).

Z časového hlediska rozlišujeme dvě formy oxidace: okamžitou a dlouhodobou.

Okamžitá oxidace vychází z reakce kyslíku z okolní atmosféry s volnými radikály, které vznikají při ozáření polyethylenu ionizujícím zářením během modifikačních nebo sterilizačních procesů. Tato reakce vede k rozštěpení dlouhých molekul na kratší.

Dlouhodobá oxidace pracuje na stejném principu, avšak s tím rozdílem, že určitá část radikálů vzniklých při modifikaci nebo sterilizaci zůstává v materiálu. Tyto radikály postupně reagují s kyslíkem, který difunduje do materiálu před implantací, během skladování nebo po implantaci *in vivo*. Oxidativní poškození může zásadně ovlivnit strukturu UHMWPE a tím i životnost kloubní náhrady (obr. 2).

Oxidační reakce jsou cyklické. Z důsledků cyklických reakcí plyne, že jeden jediný volný radikál může potenciálně poškodit mnoho molekul polymeru, než se zničí nějakou náhodnou vedlejší reakcí. Rozštěpením dlouhých řetězců UHMWPE na kratší se zhoršují mechanické vlastnosti, což může vést ke snížení odolnosti vůči opotřebení, urychlení opotřebení nebo dokonce k mechanickému poškození samotné komponenty (obr. 2).



Obrázek 2: Oxidační poškození jednotlivých explantovaných UHMWPE komponent náhrady kyčelního (vpravo nahoře) a kolenního (ostatní) kloubu po 5-8 letech *in vivo*. Převzato z práce (Fulín 2020).

## 2.2 Infekce v ortopedii

### 2.2.1 Osteomyelitidy

Osteomyelitida je infekční zánět kosti postihující v různém rozsahu její části – kortikální kost, kostní dřeň, spongiózní kost, periost a okolní tkáň (Lew a Waldvogel 2004).

**Podle časového průběhu infekce** dělíme osteomyelitidu na akutní, subakutní nebo chronickou. Akutní osteomyelitida se rozvíjí náhle a projevuje se v rámci dnů, naopak chronická osteomyelitida představuje perzistující infekci trvající více než 6 měsíců. Chronická osteomyelitida obvykle navazuje na neadekvátně léčenou akutní osteomyelitidu, existují však vzácné formy primárně chronické osteomyelitidy, kam řadíme osteomyelitis albuminosa (Ollierova-Poncetova choroba) a osteomyelitis sclerotisans neboli morbus Garré (Sosna et al. 2024). Průběh závisí na etiologickém agens, proběhlé léčbě a na imunitním i celkovém stavu pacienta (Lew a Waldvogel 2004).

Chronická osteomyelitida je charakteristická setrvalým infekčním zánětlivým procesem, který vede k destrukci kosti a tvorbě sekvstru. Průběh je variabilní, střídají se klidová období s akutními exacerbacemi. Léčba je komplikovaná, individuální a vyžaduje většinou multioborovou spolupráci ortopeda, radiologa, mikrobiologa a vzhledem k nutnosti řešení defektů i plastického chirurga (Panteli a Giannoudis 2016).

Subakutní osteomyelitida je vzácný typ osteomyelitidy, který je charakteristický pomalejším nástupem příznaků (obvykle více jak 2 týdny) a obtížnou diagnostikou, která je dána mírnými příznaky a chybějící systémovou odpovědí. Průběh onemocnění je připisován kombinaci nízké virulence patogenního agens a dobré imunitní odpovědi pacienta (Shih et al. 2005). Nejčastěji se u pacientů setkáváme s bolestí lokalizovanou do postižené oblasti, v některých případech je přítomno i lokální zduření a palpační bolestivost (Hayes et al. 1990). Subakutní osteomyelitida může svými projevy a radiologickým nálezem imitovat nádorové procesy. Brodieho absces je nejčastější formou subakutní osteomyelitidy (Shih et al. 2005), může být však zařazen i mezi primární chronické osteomyelitidy (Sosna et al. 2024). Na rentgenu nalézáme cystické osteolytické projasnění v oblasti metafýzy, někdy ohraničené zónou osteosklerózy, avšak radiologický nález může být atypický, což ztěžuje diagnostiku (Shih et al. 2005).

**Podle místa vstupu infekce** může osteomyelitida vznikat hematogenně nebo exogenně. Hematogenní osteomyelitida vzniká průnikem bakteriálního agens do kosti při bakteriémii. Exogenní osteomyelitida vzniká buď přímým průnikem mikroorganismu do kosti, nebo průnikem per continuitatem z ložiska v blízkosti kosti (Hurych a Štícha 2021).

- Hematogenní etiologie je typická u dětí, u kterých v oblasti metafýzy (před růstovou ploténkou) přechází kapiláry v žilní sinusy a dochází ke zpomalení krevního toku. Oblast metafýz (zejména distální femur, proximální tibia a proximální femur) je tedy nejnáchylnější k uchycení bakterií a rozvoji osteomyelitidy (Gigante et al. 2019; Sosna et al. 2024). Hematogenní infekce je u dospělých vzácná, ale nejčastěji postihuje obratlová těla (Lew a Waldvogel 2004).
- K přímému průniku a rozvoji exogenní osteomyelitidy může dojít při poranění kůže a měkkých tkání, při otevřené zlomenině, v místě chirurgického výkonu (např. implantace endoprotézy či zavedení osteosyntetického materiálu) nebo při jiných invazivních zdravotních výkonech (punkce, biopsie a další).
- Ložisko, ze kterého se může dostat infekce do kosti, může být infekce měkkých tkání jakou jsou abscesy, infekce podkoží, kožní vředy a dekubity (Hurych a Štícha 2021). Důležitou klinickou jednotkou je osteomyelitida při vaskulární insuficienci dolních končetin – typickou jednotkou je např. syndrom diabetické nohy (Sosna et al. 2024). Zvláštní pozornosti si zaslouží diabetici se známkami zánětu měkkých tkání nohy nebo s defektem, protože pacienti obvykle nemají horečku a jiné celkové příznaky infekce (Lew a Waldvogel 2004).

**Patogeneze** osteomyelitidy zahrnuje vznik purulentního ložiska (typicky uloženého v metafýze), které expanduje postupně skrze kortikální kost a proniká pod periost – vzniká subperiostální absces. V kosti je porušena endostální i periostální výživa a dochází k nekróze a tvorbě sekvestru. Periost tvoří kolem sekvestru novou kost, čímž vzniká involukrum (tzv. zarakvení sekvestru). Při průniku hnisavého procesu skrze periost, měkké tkáně a kůži dojde

ke vzniku píštěle. Na devitalizované a nekrotické kosti mohou bakterie dlouhodobě přežívat v biofilmu a odolávat systémově podávané antibiotické terapii (Sosna et al. 2024; Lew a Waldvogel 2004).

Komplikace osteomyelitidy u dospělých může být šíření infekce z metafýzy na epifýzu a následně do kloubu s rozvojem septické artritidy. U dětí je přítomna růstová ploténka, která představuje bariéru pro postup infekce. Pokud však na metafýzu dosahuje kloubní pouzdro (proximální femur, proximální radius, distální tibie a fibula, proximální humerus), může se infekce rozšířit i do kloubu (Sosna et al. 2024).

Pro **diagnostiku** osteomyelitidy je prvním krokem klinické vyšetření pacienta a důkladně odebraná anamnéza. Důležité jsou informace o poranění kožního krytu, anamnéza úrazu, otevřená zlomenina, přítomnost cizorodého materiálu (např. osteosyntetický materiál nebo implantát) a komorbidit jako jsou ischemická choroba dolních končetin, metabolické onemocnění v anamnéze (nejčastěji diabetes mellitus), stavy kompromitující imunitní systém (kortikoterapie, hematologická onemocnění, HIV apod.) a u novorozenců průběh porodu a poporodní adaptace, předchozí hospitalizace a případně invazivní zákroky. U akutní hematogenní infekce dochází často k rychlé alteraci celkového stavu pacienta doprovázené bolestí, otokem a zarudnutím postižené oblasti. Pokud dojde k rozvoji osteomyelitidy po otevřené zlomenině nebo operačním řešení zavřené zlomeniny, pak pozorujeme zhoršení lokálního nálezu (zarudnutí, zvýšená bolestivost, hnisavá sekrece z rány a někdy až její dehiscence) a eventuálně i zhoršení celkového stavu doprovázeného subfebrilií až febrilií (Lew a Waldvogel 2004). Chronická osteomyelitida mívá nespecifické projevy a může být zaměněna za infekci měkkých tkání, zejména u diabetiků. Symptomy chronické osteomyelitidy mohou zahrnovat chronickou nebo cyklickou bolest, erytém v postižené oblasti, otok a palpační citlivost, může být přítomný kožní defekt, píštěl a sekrece. Období klidu můžou střídát exacerbace doprovázené únavou, zimnicí, horečkou nebo jen subfebrilií (Panteli a Giannoudis 2016).

V diagnostice je zlatým standardem **mikrobiologické vyšetření** (kultivace a PCR), které pomůže z odebraných vzorků zjistit etiologické agens a cílit terapii. Vzorky můžeme získat z ložiska infekce kosti punkcí, biopsií nebo při otevřeném chirurgickém výkonu. Histopatologické vyšetření odebraných vzorků se zjištěním přítomnosti neutrofilů může přispět k potvrzení infekce. Na druhou stranu stěr z píštěle nebo povrchových kožních defektů může vést k nepřesným výsledkům z důvodu kolonizace nepatogenními mikroorganismy (Lew a Waldvogel 2004). Při celkových příznacích odebíráme hemokultury a při podezření na jiný fokus infekce v těle odebíráme i vzorek např. moči nebo sputa (Hurych a Štícha 2021).

**Etiologické agens** je závislé na anamnéze, stavu a věku pacienta. Osteomyelitidy dělíme na nespecifické a specifické (méně časté). Vůbec nejčastějším původcem nespecifických infekcí kostí je *Staphylococcus aureus*. U dětí do 1 roku věku je dále typický *Streptococcus agalactiae* (tzv. GBS, streptokok skupiny B) a *E. coli*. U starších dětí je často

identifikován *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae* typ b a enterobakterie (vč. salmonely). U nozokomiálních infekcí se často setkáváme s pseudomonádami a anaerobními bakteriemi. U dospělých jednoznačně převažuje *S. aureus*. Vzácněji se setkáváme s koaguláza negativními stafylokoky (*S. epidermidis*), streptokoky a enterobakteriemi. U syndromu diabetické nohy bývá přítomna polymikrobiální infekce. *Candida* spp. a další houby mohou být původci osteomyelitid (častěji u imunokompromitovaných). Specifické osteomyelitidy jsou způsobeny nejčastěji *Mycobacterium tuberculosis* (Hurych a Štícha 2021).

Dále se uplatňují **zobrazovací metody**. Rentgenové vyšetření (RTG) ukáže destrukci kosti (osteolýzu) a periostální reakci. Změny na RTG jsou však patrné až po 10–21 dnech (obr. 3). Sonografie může ukázat hnisavou kolekci v měkkých tkáních. CT a MR vyšetření nabízejí detailnější zobrazení a změny struktury jsou patrné dříve než na RTG. MR dokáže odhalit kostní edém velice brzy, a tak může pomoci v brzké diagnostice osteomyelitidy. CT je užitečné zejména k zjištění přítomnosti sekvestru. Velmi nápomocné jsou metody nukleární medicíny, jako je scintigrafie a scintigrafie se značenými leukocyty (Lew a Waldvogel 2004).

V laboratorní vyšetření krve pacienta nalézáme zvýšenou sedimentaci erytrocytů a elevaci CRP, které je velmi nápomocné pro sledování účinku terapie. Leukocytóza není spolehlivým ukazatelem, protože leukocyty mohou být u osteomyelitidy v normálním rozmezí (Lew a Waldvogel 2004).



Obrázek 3: Osteomyelitida V. metatarzu. Na snímku je patrná osteolýza v oblasti V. metarozofalangeálního kloubu nohy.

**Léčba** osteomyelitidy je většinou multimodální a zahrnuje různou kombinaci chirurgické a antibiotické léčby. Infekce kostí jsou mnohdy obtížně léčitelné vzhledem k odlišnostem kostní tkáně. Akutní osteomyelitida může být zvládnuta pomocí samotné antibiotické léčby.

Chirurgická léčba však bývá nezbytná u akutní osteomyelitidy, která nereaguje na parenterální léčbu antibiotiky, v přítomnosti abscesu a u subakutní i chronické osteomyelitidy (Lew a Waldvogel 2004).

Antibiotická terapie osteomyelitid zahrnuje systémové podávání ATB s dobrým průnikem do kosti. Mezi nejčastěji užívaná ATB patří protistafylokokové peniciliny (oxacilin, flukloxacilin), klindamycin, vankomycin, cefalosporiny III. generace, fluorchinolony (ciprofloxacin a levofloxacin) a linezolid (Hurych a Štícha 2021). Délka léčby je obvykle 6 týdnů, u akutní osteomyelitidy zpravidla 2 týdny intravenózně a 4 týdny perorálně (Sosna et al. 2024). Existují studie a systematická review, které doporučují u dětí s nekomplikovanou akutní osteomyelitidou i kratší podávání ATB (Gigante et al. 2019). Délka ATB terapie se upravuje dle efektu léčby a stavu pacienta. Průnik ATB z krevního oběhu do místa infekce může být omezený (např. do špatně vaskularizovaných nebo infekcí změněných tkání, nekrotických oblastí, kostních sekvestrů a u bakterií tvořících biofilm). ATB terapie se upravuje na základě identifikace mikroorganismu z odebraných vzorků a zjištění citlivosti vůči ATB (Hurych a Štícha 2021). Problémem je rostoucí rezistence k antibiotikům s nutností volit k léčbě více toxická antibiotika. ATB léčba může mít nežádoucí účinky, časté jsou gastrointestinální obtíže jako nauzea, zvracení a dyspepsie. Při podávání gentamicinu nebo vankomycinu je třeba mít na paměti jejich nefrotoxický účinek (Hurych a Štícha 2021).

Úspěšná chirurgická sanace ložiska infekce zahrnuje důkladný debridement nekrotických a infikovaných tkání, odstranění sekvestru a případnou extrakci implantátu nebo jiného cizorodého materiálu (Sanders a Mauffrey 2013). Po radikálním odstranění všech postižených tkání často vzniká mrtvý prostor (kostní a měkkotkáňový defekt), který je možný řešit různými technikami (Panteli a Giannoudis 2016). Papineau využíval spongiózní štěpy, rána se primárně neuzavírá a nechá se přerůst granulační tkání. Další metody využívají kostního cementu (PMMA) s obsahem ATB, který dočasně vyplní mrtvý prostor před finálním rekonstrukčním výkonem, např. technika indukční membrány dle Masqueleta (Sosna et al. 2024). Dále se využívá svalových a kožních laloků (Panteli a Giannoudis 2016). U pacientů se zhoršeným prokrvením končetin nebo s diabetes mellitus může být osteomyelitida indikací k amputaci končetiny (Lew a Waldvogel 2004; Nizamani et al. 2020).

Při chirurgickém výkonu lze aplikovat systémy obsahující antibiotika (nosiče ATB), které dovolí lokálně uvolňovat ATB, která dosahují vysokých koncentrací přímo v místě infekce. Existují lokální nosiče ATB, které dovolují uvolňovat ATB s nastavitelnou rychlostí a po různě dlouhou dobu. Běžně používanými nosiči jsou zmíněný PMMA, síran vápenatý a syntetické polymery jako polylaktid (Gogia et al. 2009). Popisovány jsou techniky s využitím cementových korálek (kuliček), cementové dočasné kloubní náhrady (spacery) a dočasné výplně mrtvého prostoru (Gogia et al. 2009; Panteli a Giannoudis 2016).

Jinou možností je aplikace průplachové laváže s antibiotikem nebo s roztokem betadine. Podtlakové krytí je jednou z novějších metod, která se v praxi již běžně využívá u větších



defektů měkkých tkání a kůže. Díky podtlakové metodě lze z rány odvádět sekret a zároveň podpořit postupné uzavírání rány, která je sterilně překryta folií (Sosna et al. 2024).

### 2.2.2 Septické artritidy

Septická artritida je infekční zánět postihující kloub. Jedná se o urgentní stav vyžadující včasnou léčbu. Závažnou komplikací vyžadující intenzivní péči je infekce kloubu provázená septickým šokem (Mathews et al. 2010). Mortalita se liší v různých studiích, udává se 11 %, což ukazuje na vážnost této diagnózy (Mathews et al. 2010).

Septická artritida vzniká hematogenně, průnikem infekce z okolí, přímou inokulací mikrobiálního agens při poranění, chirurgickém výkonu nebo po aplikaci léčiva do kloubu. Nejčastějším původcem infekce je *Staphylococcus aureus*, mezi další agens patří *Staphylococcus epidermidis*, u mladších dospělých a sexuálně aktivních pacientů je častým nálezem *Neisseria gonorrhoeae*, méně častými původci jsou enterobakterie (*E. coli*, *Proteus sp.*, *Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.*) a *Pseudomonas aeruginosa*. U novorozenců nejčastěji identifikujeme *Streptococcus agalactiae* (streptokok skupiny B), u starších dětí *Haemophilus influenzae* (Hurych a Štícha 2021). Studie v posledních letech často hovoří o špatně kultivovatelné gramnegativní bakterii *Kingella kingae* (Porsch et al. 2022; Khattak et al. 2021).

Symptomy zahrnují otok, náplň a značnou bolestivost kloubu s omezenou aktivní i pasivní hybností. Pacient drží končetinu a kloub v úlevové poloze, může se bránit změně polohy kvůli bolesti. Kůže v oblasti kloubu bývá zarudlá a teplejší, může mít až charakter flegmóny. Při vyšetření si všímáme přítomnosti odřenin, ran, vpichů nebo jizev po operacích, které by mohly být branou vstupu infekce. U septické artritidy často pozorujeme celkové příznaky s febrilií a schváceností (Ifeanyi I. Momodu a Vipul Savaliya 2023).

Z laboratorních vyšetření krve hraje důležitou roli elevace CRP a hodnocení jeho vývoje v průběhu léčby. Další markery zánětu jsou zvýšená sedimentace erytrocytů a hladina prokalcitoninu. Nutné podotknout, že nízké zánětlivé parametry nevylučují septickou artritidu (Mathews et al. 2010). Za nejužitečnější diagnostickou metodu je považována punkce kloubu a odběr validního vzorku kloubního výpotku, který odešleme k další analýze – zejména k mikrobiologickému vyšetření (Mathews et al. 2010). Kultivace a PCR může nejen určit etiologické agens, ale také zacílit antibiotickou terapii. Dále lze v kloubní tekutině detekovat jiné markery zánětu, např. na našem pracovišti využíváme antimikrobiální peptidy jako je alfa-defenzin. Punktát je vhodné vyšetřit cytologicky, v takovém případě je přítomna záplava leukocytů s majoritním zastoupením polymorfonukleárů. V punktátu je možné detekovat i krystaly při podezření na krystalovou artropatii (Sosna et al. 2024).

Z radiologických metod provádíme vždy RTG, které může ukázat změněné postavení v postiženém kloubu v důsledku zvýšené náplně, později i změny na subchondrální kosti (snížená denzita). Sonografické vyšetření potvrdí náplň kloubu a může pomoci při navigaci

punkce kloubu. Na MR můžeme pozorovat zvýšenou náplň v kloubu a někdy i známky osteomyelitidy v přilehlé kosti (Mathews et al. 2010; Ifeanyi I. Momodu a Vipul Savaliya 2023).

Jak bylo uvedeno výše, léčba tohoto urgentního stavu musí začít bez prodlevy. Po provedení punkce a odeslání vzorků k mikrobiologickému vyšetření nasazujeme empiricky intravenózní širokospektrá antibiotika a pacienta připravujeme k chirurgickému výkonu s laváží a drenáží kloubu (artroskopie nebo otevřená artrotomie). ATB za hospitalizace upravujeme dle citlivosti a pokračujeme 4-6 týdnů, terapii měníme v závislosti na vývoji stavu (Mathews et al. 2010). Při pokročilých degenerativních nebo destruktivních změnách kolenního a kyčelního kloubu se často volí v první době resekce a implantace dočasné kloubní náhrady (spacer), s odstupem v druhé době se implantuje totální endoprotéza (Sosna et al. 2024).

### 2.2.3 Septické komplikace kloubních náhrad

Septické komplikace jsou jednou z nejzávažnějších problematik současné ortopedie. Infekce kloubních náhrad (zkratka IKN, v anglické literatuře pod pojmem prosthetic joint infection, zkr. PJI) jsou vážnou komplikací a dochází k nim u 1–2 % primárních implantací (Abosala a Ali 2020). Jiné zdroje uvádí podobné zastoupení infekčních komplikací kloubních náhrad, a to 0,5–2 % v závislosti na kloubu, kde je endoprotéza implantována (Lew a Waldvogel 2004). Obdobná data jsou udávána i v USA, kde se uvádí kolem 2 % (Abad a Haleem 2018). Tyto komplikace jsou velmi zatěžující pro systém zdravotní péče i pro pacienty, kteří potřebují náročnou invazivní léčbu a jsou zatíženi nežádoucími účinky terapeutického postupu (McNally et al. 2020). Mortalita pacientů s IKN je v prvním roce až 10 %, pětileté přežití se pohybuje okolo 70 % (Sosna et al. 2024). Dle údajů Národního registru kloubních náhrad je u revizních operací indikací právě septická komplikaci („hluboká infekce“) v 20 % u endoprotézy kyčle a 9,4 % u endoprotézy kolene (NRKN 2024).

Osmdesát procent pacientů indikovaných k implantaci endoprotézy má ovlivnitelné **rizikové faktory**. Mezi hlavní ovlivnitelné rizikové faktory pro infekce kloubních náhrad patří obezita (zejména BMI >35), anémie, malnutrice a diabetes mellitus (Abad a Haleem 2018). Dobrou kompenzací stavu pacienta před operací snížíme riziko komplikací včetně IKN. Dále riziko rozvoje IKN zvyšuje prodloužený operační čas, to může být vysvětleno potenciálně delší dobou pro kontaminaci nebo přítomností jiných faktorů, které mohou prodloužit operaci, např. obezita (Abad a Haleem 2018). Přítomnost infekce jiného orgánu v době operace zvyšuje riziko IKN, tato problematika zahrnuje zejména infekce dýchacího a močového systému. Avšak v případě asymptomatické bakteriurie není riziko IKN zvýšeno, její zjištění není důvodem k indikaci ATB léčby ani k odkládání operace (Abad a Haleem 2018).

**Diagnostika (a definice)** infekce kloubní náhrady není často jednoduchá. Některé případy aseptického uvolnění může identifikovat jako IKN, pokud se ponoříme do podrobnějšího zkoumání nebo při použití jiného diagnostického přístupu. Diagnostická kritéria

prodělala v poslední dekádě řadu změn a stále se vyvíjí. Obsahují řadu kritérií a faktorů k hodnocení, která nejsou obecně ustálená a jednotná. Problematikou a definicí IKN se zabývají tyto odborné skupiny:

- European Bone and Joint Infection Society (EBJIS),
- Infectious Diseases Society of America (IDSA),
- International Consensus on Musculoskeletal Infection (ICM),
- Musculoskeletal Infection Society (MSIS).

Tabulka 3 poskytuje přehled vývoje definice IKN v čase. Dále bude vysvětlena definice a kritéria dle EBJIS.

MSIS	IDSA	ICM/MSIS	2. ICM	EBJIS
2011	2012	2013	2018	2021
2 hlavní kritéria	1 z 5 kritérií	2 hlavní kritéria	2 hlavní kritéria	1 z 6 potvrzujících kritérií („potvrzená infekce“)
Píštěl Mikrobiologie: 2 kultury	Píštěl Purulentní obsah Histologie Mikrobiologie: 2 kultury, 1 virulentní	Píštěl Mikrobiologie: 2 kultury	Píštěl Mikrobiologie: 2 kultury	Píštěl Leukocyty v synoviální tekutině >3000 (PMN >80 %) Alfa-defensin Mikrobiologie: 2 kultury Sonifikace: >50 CFU/ml Histologie
4 z 6 malých kritérií		3 z 5 malých kritérií	10 malých kritérií (vážené skóre ≥ 6 = IKN)	Podpůrná kritéria („pravděpodobná infekce“)*
CRP a FW Leukocyty v synoviální tekutině Zastoupení PMN (%) v synoviální tekutině Purulentní obsah 1 kultura Histologie		CRP a FW Leukocyty v synoviální tekutině nebo LE Zastoupení PMN (%) v synoviální tekutině 1 kultura Histologie	CRP, D-dimer a FW Leukocyty v synoviální tekutině, zastoupení PMN (%) a CRP Alfa-defensin Histologie Purulentní obsah 1 kultura	<i>Časné uvolnění &lt;5 let</i> <i>Komplikované hojení rány</i> <i>Horečka</i> <i>Purulentní obsah</i> Leukocyty v synoviální tekutině >1500 (PMN >65 %) 1 kultura Metody nukleární medicíny

Tabulka 3: Přehled kritérií a vývoje Definice infekce kloubních náhrad (IKN) v čase – volně podle (McNally et al. 2023). Vysvětlivky: zkratky odborných organizací v prvním řádku jsou vysvětleny v textu; PMN = neutrofilů (polymorfonukleáry); FW = Sedimentace erytrocytů (Fahraeus Westergren); histologie – přítomnost leukocytů (PMN) a bakterií ve tkáňovém vzorku; LE = Leukocytová esteráza; CFU = colony forming unit – určuje kolik je v tekutém vzorku přítomných životaschopných buněk, které jsou schopné tvořit malé kolonie na agaru. \* Infekce je pravděpodobná v případě pozitivního klinického kritéria (znázorněny *kurzívou*) nebo elevace CRP spolu s dalším pozitivním nálezem (analýza synoviální tekutiny, mikrobiologický nebo histologický nález, metody nukleární medicíny) (McNally et al. 2020).

Evropská skupina z EBJS představila tříúrovňový systém v diagnostice IKN (McNally et al. 2020). Podle přítomnosti různých klinických příznaků a laboratorních či radiologických známek infektu rozlišujeme tyto úrovně:

- a) infekce nepravděpodobná,
- b) infekce pravděpodobná,
- c) potvrzená infekce.

Mezi hlavní klinické známky IKN patří píštěl s prokázanou komunikací s kloubem nebo odhalená a viditelná endoprotéza (obr. 4). Pomocnými klinickými kritérii jsou známky uvolnění do 5 let po implantaci, anamnéza špatného hojení rány po operaci, nebo recentní horečka či bakteriémie. Dále se hodnotí CRP, cytologický rozbor synoviální tekutiny (přítomnost leukocytů a procentuální zastoupení neutrofilů), biomarkery v synoviální tekutině (pozitivní nález alfa-defensinu). Velmi důležité je mikrobiologické vyšetření jednak punktátu, jednak perioperační odebraných vzorků. Na některých pracovištích se využívá i sonifikace explantovaného implantátu a zjištění přítomnosti mikroorganismů. Svou roli má i histologické vyšetření, kde se zjišťuje přítomnost neutrofilů nebo bakterií. Metody nukleární medicíny jako scintigrafie se značenými leukocyty patří mezi pomocné metody (McNally et al. 2020).



Obrázek 4: Fotografie dehiscece operační rány s píštělí v proximálním pólu rány levé kyčle, podezření na časnou IKN u pacientky 4 týdny po endoprotéze kyčelního kloubu.

IKN můžeme podle časového odstupu od implantace rozdělit následovně (Zimmerli et al. 2004):

- 1) **Časná IKN** – vzniklá do 3 měsíců od implantace. Jsou zpravidla způsobeny virulentnějšími mikroorganismy. Většinou se projevuje akutním průběhem

spojeným s bolestí kloubu, vznikem kloubní náplně, zarudnutí a zvýšenou teplotou kůže v místě infekce a někdy i vznikem píštěle s hnisavou sekrecí.

- 2) **Mitigovaná IKN** – vzniká v rozmezí 3–24 měsíců od implantace. Nemá tak bouřlivý průběh a probíhá spíše s mírnějšími symptomy, zejména bolestivost kloubu a na RTG často nalézáme uvolnění implantátu, které může být těžko rozeznatelné od aseptického uvolnění.
- 3) **Pozdní IKN** – po více jak 24 měsících od implantace, nejčastěji hematogenního původu.

Etiologickými agens způsobující IKN jsou nejčastěji grampozitivní koky, z toho 50–60 % představují stafylokoky, 10 % enterokoky a streptokoky. Gramnegativní aerobní nebo fakultativně anaerobní tyčinky jsou příčinou infekce v méně než 10 % případů (Musil et al. 2017). Nejčastější izolované agens je *Staphylococcus aureus*, který se spolu s gramnegativními tyčinkami nejvíce podílí na vzniku časných IKN. Mitigované IKN bývají způsobeny méně virulentními kmeny, typicky koaguláza-negativní stafylokoky nebo *Cutibacterium acnes* (dříve *Propionibacterium acnes*). Časná a mitigovaná IKN mají typický původ v průniku mikroorganismů k implantátu již v průběhu operace, častým zdrojem může být kůže, fokus v ústní dutině (např. kariézní chrup) nebo urogenitální či respirační infekce (Zimmerli et al. 2004). Pozdní infekce jsou nejčastěji hematogenního původu. Rozvoj IKN ovlivňují faktory na straně pacienta (jak jsou popsány výše u rizikových faktorů) a mikroorganismu, kam řadíme virulenci a rezistenci vůči ATB u daného kmene. Mezi důležité faktory virulence patří schopnost tvorby biofilmu.

Nejen pro diagnostiku, ale i pro následnou terapii je klíčová izolace etiologického agens pomocí **kultivace a určení citlivosti na ATB**. Literatura udává, že 7-39 % vzorků je kultivačně negativních, při podání ATB před operací dokonce > 50 % (Abad a Haleem 2018). Dalšími faktory jsou přítomnost kultivačně náročných bakterií, kmeny produkující biofilm nebo vzácní a netypičtí původci jako jsou mykobakterie nebo houby. Negativně může výsledek ovlivnit i opožděný transport, nevhodné kultivační médium či nedostatečně dlouhá kultivační doba (pro větší senzitivitu volíme prodlouženou kultivaci). Proto by se měla vysadit ATB 2–4 týdny před odběrem vzorku (synoviální tekutiny nebo tkáně), který lze získat:

- A) při diagnostické punkci kloubu,
- B) při biopsii,
- C) peroperačním odběrem.

V průběhu operace se doporučuje odebrat minimálně 3 tkáňové vzorky na aerobní i anaerobní kultivaci. Tkáňové vzorky volíme z různých míst – kloubní pouzdro, rozhraní kost/cement, fragmenty kosti, purulentní a nekrotické vzorky a tkáně, případně exkochleovaná tkáň z dřeňové dutiny. Na mykobakteria a houby myslíme v případě opakovaně kultivačně negativních vzorků, u atypických, mitigovaných a symptomaticky chudých případů, a to

zejména u imunokompromitovaných pacientů. Stěry z píštěle se nedoporučují kvůli vysoké pravděpodobnosti záchytu mikroorganismů, které nezpůsobili infekci. PCR techniky zatím nejsou standardně zakomponovány v diagnostických kritériích a některé zdroje uvádí nejednotnou senzitivitu a specifitu pro diagnózu IKN. Avšak senzitivita PCR se oproti kultivaci zvýší v případě, že byl pacient vystaven ATB terapii (Abad a Haleem 2018). Molekulárně-biologické metody jako PCR a sekvenování nové generace nabírají na významu a předpokládá se jejich ještě větší zapojení do diagnostiky IKN (Esteban a Gómez-Barrena 2021).

**Biofilm** umožňuje přežití bakterií v méně příznivých podmínkách, zlepšuje adhezenci k cizorodému povrchu a poskytuje ochranu vůči imunitnímu systému i antibiotické léčbě. Toto společenství bakterií je spojeno jejich extracelulárními produkty. Zahájení tvorby biofilmu je dáno hustotou bakteriální populace, která vysílá signální molekuly (quorum sensing). Bakterie v biofilmu mezi sebou komunikují a připomínají vícebuněčný organismus. Uvnitř biofilmu se bakteriální buňky tak rychle nedělí, zřejmě kvůli menšímu množství metabolických substrátů vstupují do stacionární růstové fáze, což může mít podíl na menším efektu ATB. Biofilm může být monobakteriální i polymikrobiální (Hurych a Štícha 2021; Zimmerli et al. 2004).

Terapie IKN je prakticky vždy kombinací antibiotické a chirurgické léčby. Paliativní ATB terapie je velmi sporná a volí se jen u neoperabilních (často geriatrických) pacientů (Prendki et al. 2017). V dalším textu jsou uvedeny používané chirurgické metody při řešení IKN.

- **DAIR** (z anglického debridement, antibiotics, and implant retention) představuje endoprotézu zachovávající výkon, při kterém je zásadní včasná indikace a cíleně volená antibiotická léčba. Součástí výkonu je důkladný debridement, opakované výplachy nebo laváž. Zachovávají se pevně adherované komponenty kloubní náhrady a vyměňují se všechny volně explantovatelné části. U endoprotézy kyčle se ponechává dřík a acetabulární komponenta a vyměňuje se pouze polyethylenový insert a hlavička. V případě endoprotézy kolene se ponechává femorální i tibiální komponenta a vyměňuje se polyethylenová artikulační vložka (Sosna et al. 2024). Časová hranice, kdy je možné ještě provést DAIR se udává nejpozději 4 týdny od začátku symptomů, avšak nejvyšší šance na úspěch dle klinických zkušeností je do jednoho týdne od začátku příznaků (Sosna et al. 2024). Operaci je možné indikovat u časně IKN nebo i u akutního vzplanutí pozdní hematogenní IKN, pokud je dodrženo zmíněné časové kritérium (<4 týdny). Tento výkon může být indikován v případech, kdy nejsou kotvící části endoprotézy uvolněné, je dostatečná kvalita měkkých tkání, při dobrém imunitním stavu pacienta a pokud byl identifikován patogen s dobrou citlivostí vůči ATB (Karachalios a Komnos 2021). Při dodržení zmíněných indikačních kritérií udávají studie úspěch léčby až u 80 % pacientů (Karachalios a Komnos 2021).
- **Jednodobá reimplantace** (one-stage revision surgery) představuje výkon, při kterém se provede důkladný debridement a proplach rány, explantuje se původní

endoprotéza a při stejné operaci se po výměně nástrojů a přerouškování implantuje nová finální endoprotéza. Podmínkou indikace k operaci je znalost etiologického agens a jeho citlivost na ATB, která jsou dostupná v perorální formě. Důležité je i schopnost primárně uzavřít ránu, tedy adekvátní kožní kryt (Larry M Baddour et al. 2024). Z časového hlediska bývá jednodobá reimplantace indikovaná u IKN, které probíhají více jak 4 týdny. Podmínkou je znalost patogena, jeho dobrá citlivost na antibiotickou léčbu a možnost primárního uzávěru rány (Sosna et al. 2024). Součástí terapie je lokální a systémové podávání ATB (Karachalios a Komnos 2021). Doporučováno bývá systémové podávání ATB dle citlivosti 6–12 týdnů po operaci (Sosna et al. 2024). Úspěšnost metody je dle různých zdrojů a studií uváděna v rozmezí 77–100 % (Karachalios a Komnos 2021).

- **Dvoudobá reimplantace** (two-stage revision surgery) rozděluje proces reimplantace na dvě doby (dvě operace). V první době se explantuje původní endoprotéza, implantuje se dočasná kloubní náhrada (spacer), která je zpravidla z PMMA (polymethylmethakrylátu – kostního cementu) s příměsí ATB. V současnosti lze použít prefabrikované artikulované spacers, které jsou dodávány v různých variantách. V druhé době (po 6–12 týdnech) se explantuje spacer a implantuje se finální náhrada kloubu (Sosna et al. 2024). V kostním cementu může být jedno ATB nebo kombinace, nejčastěji se setkáváme s užitím kombinace vankomycin a gentamicin. Literatura uvádí i beta-laktam, daptomycin a amfotericin (Abad a Haleem 2018). Nezbytná součást terapie je i systémové a cílené podávání ATB. Tato metoda je indikována v situacích, kdy nejsou naplněny podmínky pro jednodobou reimplantaci (Sosna et al. 2024). Bývá stále považována za zlatý standard pro terapii IKN, které probíhají více jak 4 týdny od začátku symptomů. Úspěšnost dvoudobé reimplantace se dle různých studií uvádí 80-95 %, navíc artikulované spacers umožňují lepší funkční výsledky (Karachalios a Komnos 2021).
- Poslední kategorií jsou tzv. **záchranné výkony**. Ty jsou indikovány v případě, že již není možná reimplantace. Patří mezi ně resekční artroplastika, artrodéza, funkční déza, amputace a permanentní spacer.

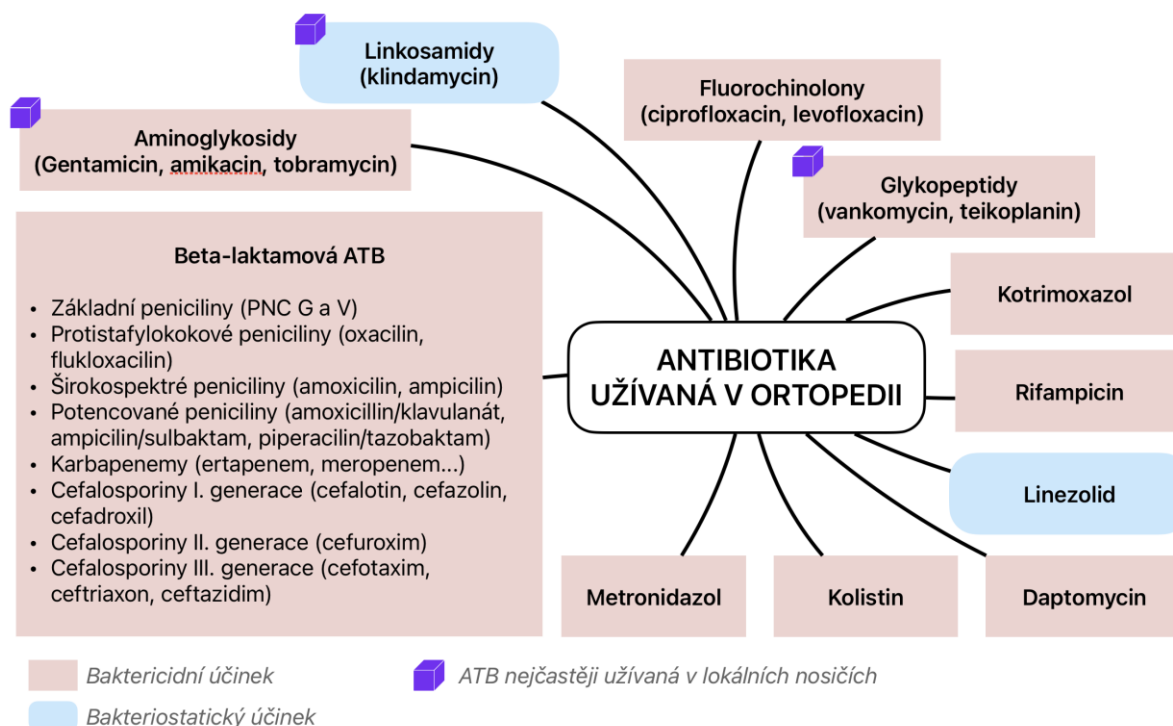
DAIR, jednodobá a dvoudobá reimplantace jsou nejběžněji používané metody v terapii IKN. Výsledky a účinnost těchto přístupů jsou zatím k dispozici ve studiích nižší kvality a střednědobém časovém horizontu (Karachalios a Komnos 2021). Obávanou komplikací terapie IKN jsou recidivy infekce, které zvyšují mortalitu i riziko reinfekce (Lum et al. 2018; Leta et al. 2019). Úspěšnost hodnotíme na základě recidivy a doby bez aktivní prokázané infekce, zatím nejsou dostupné dlouhodobé výsledky. Navíc dostupné studie se těžko srovnávají, protože jsou často použita různá indikační kritéria. Nedávná data však ukazují, že ve správně indikovaných případech může DAIR a jednodobá reimplantace mít lepší výsledky než dvoudobá reimplantace (Karachalios a Komnos 2021).

Antibiotická léčba se řídí předpokládaným nebo již identifikovaným mikrobiálním agens. V ČR vzniklo v roce 2017 společné doporučení České společnosti pro ortopedii a traumatologii a Společnosti infekčního lékařství České lékařské společnosti J. E. Purkyně (Musil et al. 2017). ATB se podávají ve dvoustupňovém schématu, nejprve zahajujeme úvodní intravenózní ATB léčbu, následuje (většinou po 2 týdnech) pokračovací perorální léčba na další 4–6 týdnů (Musil et al. 2017). Délka antibiotické terapie IKN zůstává kontroverzní otázkou a obvykle se setkáváme s doporučením 6–12 týdnů (Le Vasseur a Zeller 2022). Ve světě se názory na délku ATB terapie různí. V Evropě se častěji volí kratší ATB terapie, jejíž výsledky nejsou horší než u prolongované 4–6měsíční terapie (Abad a Haleem 2018).

Volba ATB se může lišit i podle stavu pacienta, komorbidit, alergií a dle renálních a jaterních funkcí. ATB upravujeme na základě výsledků citlivosti. Je vhodné vždy konzultovat antibiotické středisko a klinického farmaceuta. U meticilin senzitivních kmenů stafylokoka se volí oxacilin, u meticilin-rezistentních kmenů se volí vankomycin. V přítomnosti implantátu se s výhodou přidává do kombinace rifampicin. Pro pokračovací léčbu stafylokokových infekcí je doporučeno zvolit kotrimoxazol. V případě jiného původce, příliš vysoké toxicity nebo intolerance ATB je nutné terapii upravit, řídíme se při tom antibiogramem (Musil et al. 2017).

## 2.2.4 Antibiotika užívaná v ortopedii pro celkovou a lokální terapii

V následujícím textu budou popsány jednotlivé skupiny a zástupci ATB ve vztahu k infekcím kostí, kloubů a kloubních náhrad (obr. 5). Cílem není popisovat všechny indikace užití uvedených ATB, což by bylo nad rámec této disertační práce. Pro experimentální část této práce jsou důležitá ATB, která se používají v lokální ATB terapii.



Obrázek 5: Nejčastěji užívaná ATB v ortopedii (přehled)



## Beta-laktamová antibiotika

Beta-laktamy jsou skupinou velmi často používaných baktericidních ATB, které inhibují syntézu buněčné stěny. Skupina zahrnuje peniciliny, cefalosporiny, karbapenemy a monobaktamy. Inhibitory beta-laktamázy (bakteriální enzymy rozkládající ATB) se využívají v kombinaci s ostatními beta-laktamy, vznikají tak potencované beta-laktamy. Zástupci inhibitorů beta-laktamázy jsou klavulanát, sulbaktam a tazobaktam (Hurych a Štícha 2021).

Velkou výhodou je, že beta-laktamová ATB jsou málo toxická, ale relativně často se setkáváme s alergií, obzvláště na penicilin. Reakce na ATB však nejsou vždy alergií, jen malá část pacientů má opravdovou alergii (imunitně zprostředkovanou reakci na látku). Některé práce udávají, že při alergologickém vyšetření je jen v 5–15 % případů alergie správně určena. Navíc se ukazuje, že u pacientů s alergií může s časem senzitivizace vůči beta-laktamům odeznít – jen 10 % pacientů je citlivých na ATB po 10 letech, kdy nebyli vystaveni této skupině ATB (Mak et al. 2022). Nevýhodou alergické anamnézy na penicilin nebo jiná beta-laktamová ATB je, že často musíme volit ATB druhé volby, které jsou zatíženy více nežádoucími účinky nebo nemusí být stejně dobře účinná (Mak et al. 2022). Širokospektré peniciliny mohou způsobit postantibiotickou klostridiovou kolitidu.

**Základní peniciliny** (penicilin G a V) mají úzké spektrum účinku, v ortopedii se s nimi setkáváme zejména při léčbě streptokokových a anaerobních infekcí (*Actinomyces israelii*, *Fusobacterium* spp., *Clostridium* spp. mimo *C. difficile*).

**Protistafylokokové peniciliny** jsou velmi často indikované, protože jsou výborně účinné na meticilin senzitivní kmeny *Staphylococcus aureus* (MSSA), v ČR se užívá oxacilin (pouze parenterální podání) a flukloxacilin (lze i perorálně).

**Širokospektré peniciliny** (zejména aminopeniciliny – amoxicilin a ampicilin) používáme v případě infekcí způsobených streptokoky, enterokoky a v některých případech infekce enterobakteriemi, které neprodukují beta-laktamázu (Hurych a Štícha 2021).

**Potencované peniciliny** jsou širokospektré a odolné vůči beta-laktamáze. Amoxicilin/klavulanát se používá u infekcí měkkých tkání, kloubů a kostí, také jej lze užít k profylaktickému podání u chirurgických výkonů a u dlouhodobě nemocných pacientů. Ampicilin/sulbaktam lze použít v podobných indikacích, a navíc i u infekcí způsobených *Acinetobacter baumannii*, pokud je ověřena citlivost. Piperacilin/tazobaktam má mimořádně široké spektrum účinku, působí i proti *Pseudomonas aeruginosa* (Hurych a Štícha 2021).

**Karbapenemy** (ertapenem, meropenem, imipenem a doripenem) a monobaktamy (aztreonam) patří k rezervním širokospektrým antibiotikům, jejichž užití by mělo vždy být konzultováno s antibiotickým centrem. V ortopedii jsou využívány zpravidla karbapenemy, které se podávají pouze parenterálně.

**Cefalosporiny** jsou často používanými ATB, které rozdělujeme do I.–IV. generace. Mají podobné spektrum účinku jako peniciliny, ale jsou účinnější na gramnegativní bakterie a méně

účinné na grampozitivní bakterie. Spektrum se liší podle generace. Při alergii na peniciliny může dojít ke zkřížené reakci. I. a II. generace cefalosporinů se často používá pro profylaktické podávání před operací (Siddiqi et al. 2019). I. generace (cefalotin, cefazolin, cefadroxil) působí zejména na grampozitivní bakterie (streptokoky a stafylokoky). II. generace (cefuroxim) má rozšířené spektrum o některé gramnegativní bakterie (Hurych a Štícha 2021). III. generace cefalosporinů (cefotaxim, ceftriaxon, ceftazidim) má zesílený účinek na gramnegativní bakterie a slabší na grampozitivní bakterie. Ceftazidim účinkuje i na pseudomonády, ale již nepůsobí na stafylokoky. Potencované cefalosporiny III. generace (sulperazon neboli cefoperazon/sulbaktam a ceftazidim/avibaktam by měli být použity až po konzultaci s antibiotickým centrem (Hurych a Štícha 2021). Cefepim je širokospektré ATB a je zástupcem IV. generace cefalosporinů, indikuje se u závažných infekcí gramnegativními bakteriemi s produkcí beta-laktamázy, u závažných nozokomiálních infekcích a při léčbě sepse u imunokompromitovaných pacientů (Hurych a Štícha 2021).

### **Linkosamidy – klindamycin**

Linkosamidy jsou bakteriostatická ATB s dobrým průnikem do kostí i do buněk. Inhibují proteosyntézu. Volíme je jako druhou volbu při alergii na beta-laktamy. Hlavní zástupce je klindamycin, který se používá v profylaxi i v léčbě. Cesta podání může být parenterálně i perorálně. Díky svému průniku do kosti se často uplatňují u léčby osteomyelitidy. Dále se využívají u infekcí měkkých tkání, nitrobřišních a pánevních infekcí. Mají poměrně úzké spektrum, jsou účinné u infekcí grampozitivními koky (kromě enterokoků) a anerobními bakteriemi. Nepůsobí ani na gramnegativní bakterie, proto se v některých případech kombinují s jinými ATB, např. při infekci diabetické nohy. Mezi významné nežádoucí účinky léčby patří narušení střevního mikrobiomu a riziko rozvoje klostridiové kolitidy, proto je potřeba je používat obezřetně. Další nežádoucí účinky jsou gastrointestinální obtíže a alergie. Toxicita je však malá a lze je volit i v graviditě (Hurych a Štícha 2021).

### **Fluorochinolony – ciprofloxacin a levofloxacin**

Fluorochinolony jsou baktericidní ATB, které inhibují syntézu bakteriální DNA. Mají výhodné farmakokinetické vlastnosti – dobře se absorbují ze zažívacího traktu a pronikají do buněk, tkání, na povrch sliznic i do sekretů. Nežádoucí účinky u dospělých jsou poměrně vzácné, ale mohou být závažné a trvalé, postihují svaly, šlachy, vazy a centrální nervový systém. Mezi projevy patří bolesti pohybového aparátu při tendinopatii, parestézie při neuropatii, ztráta chuti a čichu, únava, deprese či poruchy spánku. Důležité je, že fluorochinolony mohou poškodit růstovou chrupavku, a tak je jejich podávání kontraindikováno u dětí a mladistvých do 18 let. Fluorochinolony díky svým jinak výhodným vlastnostem byly řadu let hojně využívány, ale velkým problémem je ATB rezistence, která se u této skupiny rozvíjí rychle a může se rozvinout i během terapie daného pacienta. Tato ATB by měla být

volena jen v závažných situacích a pokud není možné použít jiné ATB. Lze je použít při infekci kostí, kloubů a IKN (Hurych a Štícha 2021).

Hlavními zástupci, které se užívají v ortopedii v ČR, jsou **ciprofloxacin** a **levofloxacin**, které patří do II. generace fluorochinolonů. Spektrum účinku zahrnuje z gramnegativních bakterií enterobakterie a pseudomonády, naproti tomu z grampozitivních bakterií působí nejvíce na stafylokoky a jen omezeně na streptokoky. Působí také na intracelulární patogeny a lze je použít v terapii tuberkulózy (Hurych a Štícha 2021).

### **Glykopeptidy – vankomycin**

Glykopeptidy jsou baktericidní ATB s extracelulárním účinkem. Mechanismus účinku je inhibice syntézy buněčné stěny bakterií. Kvůli podobnému mechanismu účinku by se neměly glykopeptidy kombinovat s beta-laktamy. Hlavní zástupcem je **vankomycin**, který je používán k léčbě infekcí způsobených grampozitivními koky (koaguláza negativní stafylokoky, *S. aureus*, enterokoky, streptokoky, *Corynebacterium* sp.). Mezi nejčastější indikace patří infekce meticilin (oxacilin) rezistentních kmenů *Staphylococcus aureus* (MRSA). K celkové léčbě infekcí kostí, kloubů a IKN se podává pouze intravenózně, a to pomalou infúzí, jinak hrozí anafylaktoidní reakce nazývaná „red man syndrom“. Velkou nevýhodou jsou nežádoucí účinky, zejména nefrotoxicita. Při léčbě vankomycinem je třeba sledovat renální funkce a monitorovat sérové hladiny ATB, případně upravit dávkování. Ideální je možnost konzultovat klinického farmaceuta. Perorálně se vankomycin používá k léčbě klostridiové kolitidy (infekce *Clostridioides difficile*), při této cestě podání se ATB nevstřebává z trávicího traktu. Novějším zástupcem glykopeptidových ATB je **teikoplanin**, který má lepší účinek proti enterokokům. Bohužel i na vankomycin může vzniknout rezistence, kmeny stafylokoků a enterokoků pak označujeme jako VRSA a VRE (Hurych a Štícha 2021).

Glykopeptidová ATB se užívají i v **lokální terapii**, přidávají se do kostního cementu a do dalších lokálních nosičů ATB, jak bude popsáno v dalších částech této práce.

### **Aminoglykosidy – gentamicin a další**

Aminoglykosidy jsou baktericidní ATB s rychlým nástupem účinku. Inhibují proteosyntézu a funkce buněčné membrány bakterií. Tato ATB působí extracelulárně, ale pronikají i do tkání a buněk. Aminoglykosidy mají dlouhý postantibiotický efekt a jejich účinek je závislý na maximální koncentraci, a ne na čase (oproti penicilinům), většinou se podávají jednou denně. Podobně jako glykopeptidové ATB se nevstřebávají z gastrointestinálního traktu, a tak se podávají pouze parenterálně, ale také lze používat v lokálních nosičích ATB. Další podobnost s glykopeptidy jsou nežádoucí účinky – zejména nefrotoxicita, dále také ototoxicita, a proto i v tomto případě je nutná monitorace sérových koncentrací ATB a sledování renálních funkcí. Nefrotoxicita se vyskytuje v 10 % pacientů a je reverzibilní, avšak ototoxicita je většinou ireverzibilní (Musil et al. 2017).

Základním aminoglykosidem je **gentamicin**. Podobný účinek mají i tobramycin a netilmicin. Aminoglykosidy působí zejména na gramnegativní bakterie, avšak ne na anaerobní bakterie. Mají omezený účinek na grampozitivní bakterie – zejména stafylokoky. Mezi indikace patří sepse způsobená gramnegativními bakteriemi a rezistentní nozokomiální infekce. Gentamicin se využívá v léčbě infekcí měkkých tkání, kloubů a ve vybraných případech IKN (Musil et al. 2017; Hurych a Štícha 2021). Pro systémy s lokálním uvolňováním ATB se často využívá gentamicin nebo tobramycin (Bistolfi et al. 2011).

Při rezistenci na gentamicin se volí **amikacin**. Streptomycin je starší aminoglykosid, který je užíván v léčbě tuberkulózy. Neomycin se užívá v lokální léčbě v podobě krémů, mastí nebo očních kapek (Hurych a Štícha 2021).

### **Kotrimoxazol**

Kotrimoxazol je kombinace chemoterapeutik sulfamethoxazolu a trimethoprimu. Má baktericidní účinek, mechanismem je inhibice syntézy kyseliny listové. Dobře se vstřebává ze zažívacího traktu a proniká do buněk i tkání. Má široké spektrum účinku, do kterého spadají stafylokoky, pneumokoky, enterobakterie, hemofily, nokardie a *Pneumocystis jiroveci*. Kotrimoxazol lze podávat v perorální i parenterální formě. Pokud ověříme citlivost, pak můžeme u ortopedických pacientů s infekcí MRSA použít v perorální formě kotrimoxazol místo vankomycinu, který je více toxický a omezuje pacienty kvůli nutnosti intravenózní cesty podání (Hurych a Štícha 2021). Svě místo má kotrimoxazol i při léčbě IKN, kdy se nasazuje v pokračovací terapii v kombinaci s rifampicinem (Musil et al. 2017). Mezi nežádoucí účinky patří fotosenzibilizace, zažívací obtíže, exantém a poruchy krvetvorby. Toto ATB je kontraindikováno u těhotných a kojících žen a u dětí do 2 měsíců věku. Nevýhodou jsou i četné lékové interakce, které je dobré ověřit zejména u polymorbidních pacientů (Hurych a Štícha 2021).

### **Metronidazol**

Metronidazol (patří mezi nitroimidazoly) je baktericidní ATB inhibující tvorbu bakteriální DNA. Využívá se při léčbě anaerobních infekcí, zejména *Fusobacterium* spp. a *Bacteroides* spp. Nežádoucí účinky jsou poměrně vzácné, může vedle zažívacích a kožních obtíží způsobit i leukopenii a polyneuropatii (Hurych a Štícha 2021; Musil et al. 2017).

### **Oxazolidinony – linezolid**

Linezolid je bakteriostatické ATB, které působí na úrovni proteosyntézy u bakterií. Patří mezi rezervní ATB při léčbě grampozitivních infekcí (stafylokoky, streptokoky, enterokoky a grampozitivní anaeroby), a to zejména při rezistenci na beta-laktamy a glykopeptidy (vankomycin). Linezolid lze tedy použít u infekcí MRSA, VRSA a VRE. Rezistence vůči linezolid existuje, ale není častá. Mezi nežádoucí účinky patří zažívací obtíže, zvýšení hladiny

serotoninu a inhibice monoaminooxidázy (interaguje s některými léky) a riziko poruchy krvetvorby, což je důvod omezení délky léčby většinou na maximálně 28 dní a nutnosti kontroly krevního obrazu (Hurych a Štícha 2021). V posledních letech se také objevilo doporučení k monitoraci sérových hladin linezolidu u značné části pacientů (Lin et al. 2022).

## **Daptomycin**

Daptomycin je baktericidní cyklické lipopeptidové antibiotikum používané k léčbě gram pozitivních bakterií, a to včetně MRSA a VRE. Nejčastěji je používán pro infekce *S. aureus*, ale je možné ho použít i pro léčbu osteomyelitidy a septické artritidy při prokázání MRSA, u IKN způsobených stafylokoky nebo enterokoky a při infekcích VRE (Shivali Patel a Stephen Saw 2022; Musil et al. 2017).

## **Polypeptidy – kolistin (polymyxin E)**

Kolistin je polypeptidové ATB s baktericidním účinkem na gramnegativní bakterie. Narušuje funkci buněčné membrány. Pro svou nefrotoxicitu, neurotoxicitu a ototoxicitu se užívá jen u multirezistentních gramnegativních infekcí, zejména způsobených enterobakteriemi a pseudomonádami. ATB se nevstřebává z GIT, a tak se podává jen parenterálně nebo lokálně (masti, roztoky, inhalačně) (Hurych a Štícha 2021). Své využití má však i v nosičích ATB, např. je dostupný v antibiotickém kostním cementu (Wang et al. 2013).

## **Účinek proti biofilmu – rifampicin a ciprofloxacin**

**Rifampicin** je významné baktericidní ATB, které blokuje proteosyntézu a má prokázaný efekt proti gram pozitivním bakteriím rostoucím v biofilmu (stafylokoky a částečně i enterokoky). Výhodné je, že ATB lze podávat nejen parenterálně, ale i perorálně, a je tedy možné ho užívat i po propuštění pacienta z nemocnice. Nevýhodou je rychlý nástup rezistence, což je důvod, proč by rifampicin neměl nikdy být používán v monoterapii. Mezi nežádoucí účinky patří hepatotoxicita a zbarvení tělesných tekutin do červenooranžové barvy (např. moč a stolice), na což je třeba pacienta upozornit. Rifampicin je poměrně často špatně tolerován kvůli gastrointestinálním obtížím (20–30 % pacientů), nejčastěji v prvním týdnu terapie. Rifampicin má značný význam v pokračovací fázi ATB terapie u IKN (Le Vavasasseur a Zeller 2022; Musil et al. 2017; Hurych a Štícha 2021). Linezolid, daptomycin a vankomycin mají také účinek proti biofilmu, ale zatím chybí velké studie, které by přesněji určili jejich význam (Le Vavasasseur a Zeller 2022).

U gramnegativních bakterií je popisován účinek proti biofilmu u ciprofloxacinu (Musil et al. 2017).

## 2.2.5 Lokální nosiče antibiotik

Infekce v ortopedii jsou často spojeny s horším účinkem antibiotik v místě infekce, mezi důležité faktory patří zhoršený průnik ATB do místa s nekrotickou kostní tkání při chronické osteomyelitidě, tvorba biofilmu a snížený metabolický obrat mikroorganismů (Gogia et al. 2009). Obzvláště problematická je tvorba biofilmu, který může až 10.000krát zvýšit odolnost vůči ATB ve srovnání s planktonickým růstem bakterií. Biofilm se tvoří na implantátu i na tkáních v místě infekce (Steadman et al. 2023). K vyjádření koncentrace ATB potřebného k usmrcení všech bakterií v biofilmu se v literatuře setkáváme s pojmem „minimální koncentrace pro eradikaci biofilmu“ (angl. minimum biofilm eradication concentration, zkr. MBEC). MBEC může být o několik řádů vyšší než minimální inhibiční koncentrace (MIC) u planktonického růstu bakterií (Steadman et al. 2023).

Při léčbě IKN je standardem chirurgická léčba, většinou v kombinaci s dlouhodobou systémovou antibiotickou léčbou. K ovlivnění bakterií v biofilmu by bylo nutné používat extrémně vysoké a toxické dávky ATB, což je při systémovém podávání nereálné. Lokální podání ATB má za cíl dosáhnout vysoké koncentrace ATB v místě infekce, a tím zlepšit úspěšnost léčby, snížit množství nežádoucích účinků ATB terapie, snížit riziko vzniku ATB rezistence a celkového užívání ATB (Steadman et al. 2023).

Systémy s lokálním uvolňováním antibiotik („lokální nosiče“) lze rozdělit do několika skupin podle jejich povahy nebo původu: syntetické polymery, přírodní polymery (biopolymery), anorganické materiály, kompozitní materiály nebo speciální materiály, jako jsou kostní štěpy (Melicherčík 2011). Přehled nosičů ATB, které umožňují lokální uvolňování antibiotik, je uveden v tabulkách 4, 5 a 6. Základní klasifikace různých typů nosičů vychází z předchozích studií našeho pracoviště (Melicherčík 2011; Melicherčík et al. 2012), ale tabulka byla aktualizována na základě nejnovější literatury (viz odkazy přímo v tabulce).

Klíčová vlastnost nosiče ATB je **biodegradabilita (biologická rozložitelnost)**, protože má vliv na následnou chirurgickou léčbu pacienta. Nebiodegradabilní nosiče ATB vyžadují následné odstranění, a tedy další operaci, zatímco biodegradabilní nosiče se v těle samy rozloží (Kanellakopoulou a Giamarellos-Bourboulis 2000). Vývoj a používání ATB nosičů, zejména biodegradabilních, se ukazuje jako účinné a výhodné pro léčbu chronické osteomyelitidy (Kanellakopoulou a Giamarellos-Bourboulis 2000), ale uplatňují se i v léčbě IKN (Steadman et al. 2023).

Jednotlivé nosiče se liší svou interakcí s tkáněmi v místě implantace, v ortopedii je důležitá interakce s kostní tkání. Klíčové vlastnosti uvádíme v tabulkách. **Bioaktivita** – bioaktivní materiály mohou tvořit přímý kontakt s živou tkání bez tvorby mezivrstvy pojivové tkáně. **Osteokondukce** je tvorba kosti migrujícími osteogenními buňkami. **Osteoindukce** označuje tvorbu kosti v místě, kde nejsou primárně přítomny osteogenní buňky, je ovlivněná růstovými faktory, které ovlivňují diferenciaci buněk. Vlastnosti a *in vivo* interakce uvedených materiálů jsou ovlivněny nejen jejich chemickým složením (které je popsáno v tabulce), ale

také jejich vnitřní strukturou a morfologií povrchu, např. resorbovatelnost klesá s rostoucí krystalinitou (tj. podíl polymeru, který se nachází v relativně uspořádaném stavu), roste s pórovitostí (porézností) materiálu a závisí také na prokrvení okolní tkáně (Sheikh et al. 2015; Niemelä a Kellomäki 2011; Shekhawat et al. 2021; Wu a Chang 2012; Schumacher et al. 2021).

Jako nosič ATB lze použít i **kostní štěpy**, které mohou být autologní (získané od stejného pacienta), nebo alogenní (od dárce). Kostní štěpy mají osteokonduktivní vlastnosti (Melicherčík et al. 2012; Kluin et al. 2013).

### **Nebiodegradabilní nosiče ATB**

Mezi hlavní představitele nebiodegradabilních ATB nosičů, které se v současné ortopedii používají, patří různé formy syntetického polymeru **polymethylmethakrylátu** (PMMA; tzv. "kostní cement", např. Palacos®, Vacogenx® aj.). PMMA (obr. 6) je stále nejčastěji používaným nosičem antibiotik, který se používá k prevenci nebo léčbě infekcí kostí, kloubů a kloubních náhrad (např. při dvoudobé reimplantaci ve formě dočasných náhrad, tzv. spacerů), jak dokládá řada studií (Kühn et al. 2017) a statistiky z klinické praxe ve Fakultní nemocnici v Motole. PMMA bude detailně rozebrán v experimentální části práce.

Dalšími zástupci nebiodegradabilních nosičů jsou hydroxyapatit, apatit-wollastonitové keramické sklo, fosforečnan vápenatý (trikalciumpfosfát) a kompozitní materiály (např. síran vápenatý s uhličitanem vápenatým, hydrogenovaným triglyceridem a gentamicinem sulfátem).

Významným a velmi používaným nebiodegradabilním nosičem je **hydroxyapatit** (HA, chemicky  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ). Jedná se o osteokonduktivní materiál, který se používá na povrchy implantátů díky své schopnosti vytvářet silnou chemickou vazbu s kostí. Může se však používat také jako nosič antibiotik, např. při léčbě infekcí kolenních náhrad (Hasegawa et al. 2021; Melicherčík 2011). Experimentálně se používá také v různých **kompozitních materiálech**, např. kompozit HA s kolagenem a přísadkou ATB byl testován pro léčbu osteomyelitidy na zvířecích modelech. Řada studií ukazuje, že vhodné kompozitní materiály mohou nabízet lepší vlastnosti a možnost ovlivnění uvolňování antibiotika *in vivo* (Egawa et al. 2020).

Polymery	Název nosiče, příklady	Vlastnosti, interakce s tkáněmi
Syntetické polymery	<b>Polymethylmethakrylát</b> (PMMA, kostní cement, např. Palacos®, Vancogenx®) (Daniël M C Janssen et al. 2016; McConoughey et al. 2015a; Wahlig 1982)	Nebiodegradabilní (Ene et al. 2021; McConoughey et al. 2015a)
	<b>Polyanhydrid</b> (El-Husseiny et al. 2011)	Biodegradabilní (El-Husseiny et al. 2011)
	<b>Polyhydroxyalkanoát</b> (Melicherčík 2011)	Biodegradabilní (Melicherčík 2011)
	<b>Polyhydroxybutyrát-ko-hydroxyvalerát</b> (Melicherčík 2011)	Biodegradabilní, osteoinduktivní (Melicherčík 2011)
	<b>Polykaprolakton</b> (PCL) (Šlouf et al. 2017; Sheikh et al. 2015)	Biodegradabilní (Šlouf et al. 2017; Gajdosova et al. 2022)
	<b>Polylaktid</b> (Kluin et al. 2013)	Biodegradabilní (Kluin et al. 2013)
Přírodní polymery	<b>Fibrin</b> (Melicherčík 2011)	Biodegradabilní (Melicherčík 2011)
	<b>Kolagen, želatinová houba</b> (např. Garamycin®, Septocoll®) (El-Husseiny et al. 2011; Mendel et al. 2005; Sheikh et al. 2015)	Biodegradabilní (El-Husseiny et al. 2011; Sheikh et al. 2015)
	<b>Demineralizovaná kostní matrix</b> (DBM): lidská (Accell Connexus®) nebo hovězí (Colloss®E) (Melicherčík 2011)	Biodegradabilní, osteokonduktivní, osteoinduktivní
	<b>Krevní koagulum</b>	Biodegradabilní

Tabulka 4: Přehled nosičů ATB (1. část) – polymery

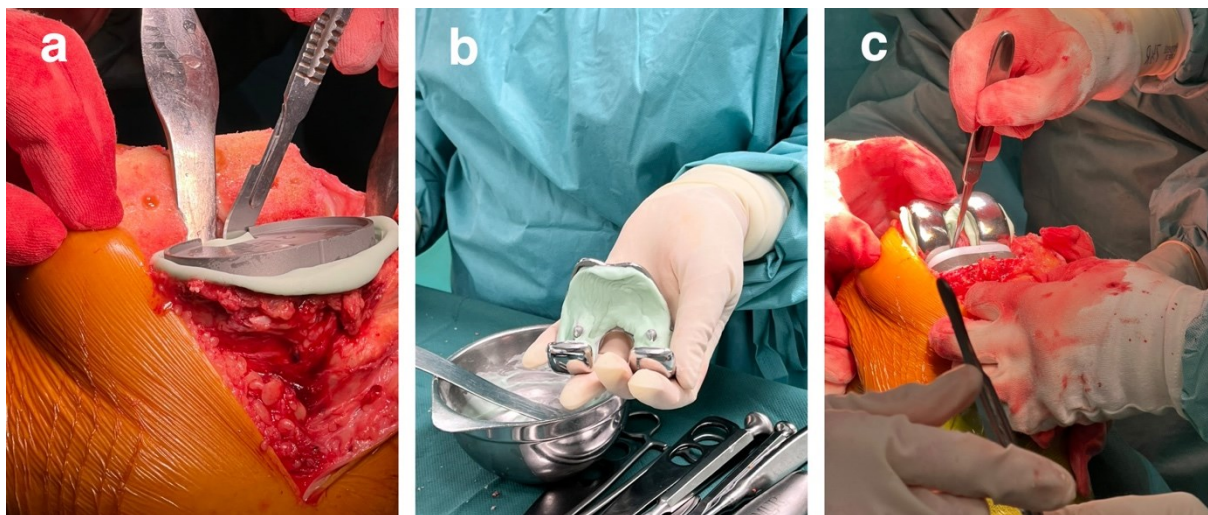
Anorganické a keramické materiály	Vlastnosti, interakce s tkáněmi
<b>Bioaktivní sklo</b> ( $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{SiO}_2\text{P}_2\text{O}_5$ ) (Niemelä a Kellomäki 2011; Sheikh et al. 2015)	Nebiodegradabilní, osteokonduktivní (Gajdosova et al. 2022; Niemelä a Kellomäki 2011)
<b>Apatit-wollastonitové keramické sklo</b> (A-W GC, bioaktivní keramika) (Duminis et al. 2017)	Nebiodegradabilní, osteokonduktivní (Duminis et al. 2017; Goto et al. 2019; Fujita et al. 2000; Ismail a Mohamad 2021)
<b>Hydroxyapatit</b> (HA, např. Endobon®) (Hasegawa et al. 2021; Sheikh et al. 2015)	Biodegradabilní (ve formě malých částic), osteokonduktivní (Sheikh et al. 2015)
<b>Fosforečnan vápenatý</b> (TCP, např. Poresorb®) (Melicherčík 2011; Jiang et al. 2021; Sheikh et al. 2015)	Biodegradabilní (ve formě malých částic), osteokonduktivní a osteoinduktivní (El-Husseiny et al. 2011; Tay Vikas et al. 1999; Kluin et al. 2013; Sheikh et al. 2015)
<b>Síran vápenatý</b> (např. Stimulan®, Osteoset T®) (El-Husseiny et al. 2011; Ene et al. 2021; Tay Vikas et al. 1999)	Biodegradabilní (Abosala a Ali 2020; El-Husseiny et al. 2011; Tay Vikas et al. 1999)

Tabulka 5: Přehled nosičů ATB (2. část) – anorganické a keramické materiály



<b>Kompozitní materiály</b>	<b>Vlastnosti, interakce s tělesnými tkáněmi</b>
<b>Hydroxyapatit s kolagenem</b> (např. Collapat® II, Healos®) (Egawa et al. 2020)	Biodegradabilní, osteokonduktivní (Egawa et al. 2020)
<b>Hydroxyapatit s fosforečnanem vápenatým a fibrilárním kolagenem</b> (Sheikh et al. 2015)	Biodegradabilní, osteoinduktivní (Sheikh et al. 2015)
<b>Hydroxyapatit s fosforečnanem vápenatým a poly(DL-laktidem)</b>	Biodegradabilní, osteoinduktivní (Sheikh et al. 2015)
<b>Nano-HA s poly(3-hydroxybutyrát-hydroxyvalerátem)-polyethylenglykolem (PHBV-PEG)</b> (Melicherčík 2011)	Biodegradabilní
<b>Bioaktivní sklo s polymethylmethakrylátem</b> (Melicherčík 2011)	Nebiodegradabilní (Niemelä a Kellomäki 2011)
<b>Mezoporózní biosklo s poly(D,L-laktid-ko-glykolidem) (PLGA)</b> (Niemelä a Kellomäki 2011)	Biodegradabilní (Niemelä a Kellomäki 2011)
<b>Bioaktivní kostní cement</b> (BABC; apatit-bisfenol-alfa-glycidyl-methakrylát plněný částicemi wolastonitového skla) (Goto et al. 2019)	Nebiodegradabilní, částečně osteoinduktivní (Goto et al. 2019)
<b>Fosforečnan vápenatý</b> (např. Poresorb®) <b>s autologní krví nebo aspirátem kostní dřevě</b>	Biodegradabilní, osteokonduktivní, osteoinduktivní (Sheikh et al. 2015)
<b>Fosforečnan vápenatý lysin</b> (TCPL)	Biodegradabilní, osteoinduktivní (Sheikh et al. 2015)
<b>Fosforečnan vápenatý s poly(laktid-co-glykolidem) (PLGA)</b>	Biodegradabilní (Sheikh et al. 2015)
<b>Fosforečnan vápenatý s hovězím kolagenem</b>	Biodegradabilní (Sheikh et al. 2015)
<b>Síran vápenatý s kostním cementem</b> (Melicherčík 2011)	Nebiodegradabilní
<b>Síran vápenatý s autologním kostním štěpem</b> (Melicherčík 2011)	Biodegradabilní
<b>Síran vápenatý s demineralizovanou kostní matricí</b> (Melicherčík 2011)	Biodegradabilní
<b>Síran vápenatý a hydroxyapatit</b> (Ene et al. 2021)	Biodegradabilní (ve formě malých částic), osteokonduktivní, osteoinduktivní (Ene et al. 2021)
<b>Síran vápenatý s uhličitanem vápenatým a hydrogenovaným triglyceridem</b> (např. Herafill®beads G) (Ene et al. 2021)	Biodegradabilní

Tabulka 6: Přehled nosičů ATB (3. část) – kompozitní materiály



Obrázek 6: Fotografie s aplikací kostního cementu při implantaci endoprotézy kolenního kloubu, a) tibiální komponenta po implantaci, skalpelem je odstraňován přebytečný cement po obvodu; b) femorální komponenta před implantací (cement je nanesený na kontaktní ploše implantátu), c) stav po implantaci femorální komponenty, odstraňování přebytečného cementu.

**Apatit-wollastonitová sklokeramika (AW-GC)** je nebiodegradabilní bioaktivní materiál s vysokou pevností, který je schopen vytvořit pevnou vazbu s kostí bez tvorby vazivových jizev. Uváděné složení AW-CG je 28 % oxidu křemičitého ( $\text{SiO}_2$ ), 38 % apatitu [ $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6 (\text{O}, \text{F}_2)$ ] a 34 % wollastonitu ( $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ ) (Fujita et al. 2000). AW-GC byl použit jako nosič ATB při testech na zvířatech *in vivo* a u pacientů již v 90. letech 20. století, a to s dobrým účinkem při léčbě osteomyelitidy (Kawanabe et al. 1998).

### Biodegradabilní nosiče ATB

Mezi nejpoužívanější biodegradabilní nosiče ATB patří síran vápenatý, polylaktid a kolagen (Kanellakopoulou a Giamarellos-Bourboulis 2000).

V praxi se často používají pelety síranu vápenatého (angl. calcium sulphate, zkratka CS, chemicky  $\text{CaSO}_4$ ) známé pod komerčním názvem Stimulan® (obr. 7), do kterých lze během přípravy přidávat termostabilní a termolabilní antibiotika (El-Husseiny et al. 2011; Melicherčík 2011). Detailní popis CS bude uveden v experimentální části práce.

Mezi alternativní biodegradabilní nosiče patří fosforečnan vápenatý, kolagenové nosiče a polylaktidy.



Obrázek 7: Aplikace lokálního nosiče Stimulan® (síran vápenatý) s vankomycinem při revizní operaci endoprotézy kolenního kloubu (metoda DAIR). Pelety Stimulanu® vyplňují mrtvý prostor po odstranění sekvestru. Anamnéza pacienta zahrnuje reimplantaci z důvodu periprotetické zlomeniny, následně se rozvinula časná infekce kloubní náhrady.

**Fosforečnan vápenatý** (trikalcium fosfát, zkratka TCP, chemický vzorec  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) je jedním z biodegradabilních anorganických materiálů používaných k náhradě kostních defektů. Vykazuje osteoindukční a osteokondukční vlastnosti (Melicherčík 2011). Jak TCP, tak CS (síran vápenatý, který byl popsán v předchozí podkapitole) se k výplni kostních defektů používají již desítky let (Pietrzak a Ronk 2000). Kombinace TCP a CS spolu s antibiotiky (kombinace vankomycinu a tobramycinu; kombinace vankomycinu a gentamicinu) vykazovala dobrou ochranu proti *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus* a blokovala tvorbu biofilmu (Tay Vikas et al. 1999; Jiang et al. 2021).

Dalším široce používaným nosičem ATB jsou různé **kolagenové preparáty**. Kolagen je přirozeně se vyskytující složkou lidské pojivové tkáně a s výhodou se používá jako nosič léčiv pro svou dokonalou biokompatibilitu. Výhodou použití kolagenu jako nosiče je možnost modifikace jeho struktury (změnou vnitromolekulárních a mezimolekulárních vazeb), a tím i jeho vlastností, zejména z hlediska farmakokinetiky (Rapetto et al. 2016; Ruszczak a Friess 2003). V klinické praxi se používají nosiče na bázi kolagenu (např. želatinová houba; želatina je částečně degradovaná forma kolagenu) s gentamicinem (např. Garamycin®, Septocoll®)(El-Husseiny et al. 2011; Melicherčík 2011). Vynikající účinek vykazuje želatinová houba s gentamicinem např. v prevenci infekcí operační rány na hrudní kosti; její aplikace do rány snižuje riziko infekce o 40 % (Kowalewski et al. 2015; Mavros et al. 2012).

**Kompozit síranu vápenatého a uhličitanu vápenatého** (např. kuličky Herafill® G) obsahuje gentamicin a představuje další biodegradabilní nosič ATB používaný v oblasti kostních a kloubních infekcí. Používá se také k vyplňování kostních defektů; v této aplikační

oblasti bylo prokázáno, že uvolňuje vysoké koncentrace gentamicinu při zachování bezpečnosti a minimalizaci rizika celkové toxicity antibiotika. Kromě toho je obecně pacienty dobře snášen, jak ukázala studie na pacientech s osteomyelitidou (Fleiter et al. 2014).

### **Moderní nosiče ATB na bázi polymerů**

Moderním přístupem v současné ortopedii jsou nosiče ATB na bázi polymerů. Tyto materiály umožňují díky své chemické variabilitě řízenou rychlost uvolňování ATB. Navíc lze jejich biokompatibilitu a mechanické vlastnosti optimalizovat pro konkrétní aplikace. Mezi typické lékařské biopolymery patří kyselina polymléčná (polylaktid, PLA), kyselina polyglykolová (PGA), polykaprolakton (PCL) nebo termoplastický škrob (TPS) (Ostafińska et al. 2017; Krejčíková et al. 2018). Na zvířecích modelech bylo prokázáno, že systémy na bázi polymerů lze použít k léčbě osteomyelitidy u psů a králíků (Birk et al. 2021; Garvin a Feschuk 2005; Kluin et al. 2013). Všechny výše uvedené polymery jsou biodegradabilní. Často se kombinují do kompozitních materiálů, které zlepšují jejich mechanické a/nebo antimikrobiální vlastnosti (Kilinç et al. 2020). Také náš vlastní patentovaný vícesložkový systém na bázi polymerů TPS/PCL/ATB, který je směsí dvou biopolymerů s různou rychlostí biodegradace, vykazuje podle předběžných experimentů *in vitro* velmi slibné bakteriostatické vlastnosti a uvolňování ATB lze řídit jeho složením a strukturou (Gajdosova et al. 2022; Šlouf et al. 2017; Ujcic et al. 2020).

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Úvod, cíle a hypotézy

Ve spolupráci I. ortopedické kliniky 1. LF UK a FN Motol s Ústavem makromolekulární chemie AV ČR byl vyvinut zcela nový originální lokální nosič antibiotik – termoplastický kompozit obsahující polysacharidovou složku ve směsi s poly- $\epsilon$ -kaprolaktonem (TPS/PCL). TPS/PCL je potencionálně využitelný pro léčbu septických komplikací v ortopedii s tím, že umožňuje řízené uvolňování antibiotika a optimální dobu biodegradability nosiče. Cílem práce je zhodnocení účinnosti v praxi běžně užívaných lokálních nosičů antibiotik a TPS/PCL. V rámci disertační práce byly určeny tyto konkrétní cíle:

- (i) Ověřit spolehlivost a reprodukovatelnost standardních mikrobiologických metod při hodnocení antimikrobiálních účinků komerčně dostupných nosičů antibiotik a TPS/PCL.
- (ii) Kvantifikovat antimikrobiální účinnost dvou v praxi nejčastěji používaných nosičů antibiotik, a to kostního cementu (PMMA s přidaným ATB) a porézního síranu vápenatého ( $\text{CaSO}_4$  s přidaným ATB).
- (iii) Porovnat vlastnosti a antimikrobiální účinnost komerčních vzorků PMMA a síranu vápenatého s originálním systémem TPS/PCL.

V souvislosti s cíli disertační práce byly stanoveny tyto hypotézy:

1. **Všechny použité systémy pro lokální uvolňování ATB jsou schopné uvolňovat přidané ATB, a proto by měly vykazovat antimikrobiální účinky (bakteriostatické a/nebo baktericidní).**
2. **Jiné vědecké studie již prokázaly, že všechny druhy nosičů ATB, které jsou použity v experimentální části této disertační práce, mají schopnost inhibovat růst bakterií, měly by proto mít stejný nebo velmi podobný bakteriostatický efekt na růst referenčního kmene *S. aureus*. Toto tvrzení představuje nulovou hypotézu ( $H_0$ ). Alternativní hypotéza ( $H_1$ ) zní: existuje významný rozdíl v bakteriostatické účinnosti mezi různými použitými druhy nosičů ATB?**
3. **Všechny použité nosiče ATB jsou schopné spolehlivě eliminovat (zahubit) bakterie při použití baktericidního ATB (vankomycin).**
4. **Koncentrace ATB, která je potřebná pro zahubení bakterií, je vyšší ve srovnání s koncentrací k pouhé inhibici růstu bakterií – to znamená, že z výsledků by měla být zjištěna hodnota minimální baktericidní koncentrace (MBC) vyšší než minimální inhibiční koncentrace (MIC).**

5. **Nový originální nosič TPS/PCL má stejný nebo velmi podobný antimikrobiální účinek jako komerčně dostupné a v praxi užívané nosiče ATB (kostní cementy a síran vápenatý).**

## 3.2 Materiál a metodika

### 3.2.1 Materiál

Systémy s lokálním uvolňováním antibiotik nazýváme zkráceně „nosiče antibiotik“. Testovali jsme reprezentativní vzorky ze dvou nejběžnějších skupin komerčně dostupných nosičů ATB, které se používají v ortopedii. Testované nosiče ATB byly zakoupeny od jejich výrobců a smíchány s definovanými hodnotami vankomycinu (glykopeptidové antibiotikum), jak je popsáno dále v metodice. Jako třetí skupinu jsme zvolili termoplastický kompozit, který připravila naše výzkumná skupina. V *in vitro* studii jsme použili kostní cement (PMMA), síran vápenatý a nový originální polymerní nosič (TPS/PCL).

Konkrétně jsme testovali tyto nosiče ATB:

- 1) Palacos® (PMMA).
- 2) Palacos® R+G (PMMA s továrně přimíchaným gentamycinem).
- 3) Vancogenx® (PMMA s továrně přimíchaným vankomycinem a gentamicinem).
- 4) Stimulan® (porózní síran vápenatý).
- 5) TPS/PCL (termoplastický kompozit obsahující polysacharidovou složku ve směsi s poly- $\epsilon$ -kaprolaktonem).

#### Kostní cement (PMMA)

První skupinou nosičů ATB používaných v ortopedii jsou akrylátové kostní cementy (tj. polymethylmethakrylát, PMMA). V této práci jsme použili tři široce používané komerční kostní cementy (**Palacos®**, **Palacos® R+G** a **Vancogenx®**).

Za zmínku stojí, že dva ze zkoumaných ATB nosičů byly dodávány s předem namíchanými antibiotiky, která do systémů zapracovali jejich výrobci: (i) kostní cement Palacos® R+G byl dodáván s 0,5 % gentamicinu a (ii) kostní cement Vancogenx® byl dodáván s 4,2 % gentamicinu a 2,5 % vankomycinu. V této studii bylo další antibiotikum v systémech Palacos® R+G a Vancogenx® (tj. gentamicin) bráno jako nedílná součást komerčního systému, zatímco koncentrace zkoumaného antibiotika (tj. vankomycinu) byla stanovena na stejnou celkovou koncentraci ve všech zkoumaných nosičích (Palacos®, Palacos® R+G, Vancogenx®, Stimulan® a TPS/PCL/ATB), jak je popsáno v následující podkapitole.

PMMA se používá jako fixační prvek v cementovaných endoprotézách a jako nebiodegradabilní nosič ATB k léčbě a prevenci infekcí v ortopedické chirurgii od 70. let 20. století (Wahlig 1982; Buchholz a Engelbrecht 1970). PMMA s antibiotikem se používá při léčbě infekcí kostí a kloubů ve formě kuliček nebo pelet (někdy spojených chirurgickým drátem nebo

vlákna do řetězce pro usnadnění následného odstranění) a pro přípravu dočasné kloubní náhrady (spacer) při dvoudobé reimplantaci při řešení IKN (Daniël M C Janssen et al. 2016; Melicherčík 2011).

Při přípravě se smíchají **dvě složky**: práškový polymer (prepolymerizovaný MMA) a tekutý monomer (MMA). Krátce po smíchání dojde k exotermické reakci, kdy tekutý monomer začne polymerizovat na prepolymerizovaných práškových částicích. Postupně dochází ke změně konzistence, cement tuhne, a nakonec vzniká tvrdý PMMA. Míchání může probíhat ručně v misce, centrifugací nebo vakuovým mícháním. Teplota při polymerizaci dosahuje hodnoty 82–86 °C (Vaishya et al. 2013).

Aditiva v kostním cementu slouží k úpravě fyzikálních a chemických vlastností. Hydrochinon je použit v tekutém monomeru jako stabilizátor k zabránění předčasné polymerizace. Iniciátor dibenzoylperoxid je součástí práškové složky a akcelerátor (N,N-dimethyl-p-toluidin) je součástí tekuté složky, společně usnadňují polymerizaci za pokojové teploty. Radiokontrastní látka umožňuje zobrazení kostního cementu při rentgenovém vyšetření, k tomuto účelu se užívá buď síran barnatý (barium sulfát, BaSO<sub>4</sub>), nebo oxid zirkoničitý (zirkonium dioxid, ZrO<sub>2</sub>) (Vaishya et al. 2013). Existují studie, které ukazují, že BaSO<sub>4</sub> snižuje pevnost cementu v tahu. Na druhou stranu přidání ZrO<sub>2</sub> může prostřednictvím částic uvolněných v místě kloubní náhrady zvyšovat polyethylenový otěr (Ginebra et al. 2002). Kostní cementy od různých výrobců se liší svým chemickým složením a vlastnostmi, to může ovlivnit i rozhodnutí o konkrétním využití v klinické praxi (Vaishya et al. 2013).

**Vlastnosti PMMA** jsou důvodem jeho širokého využití v ortopedii. Kostní cement je tvarovatelný a po skončení polymerizace je pevný a tvrdý (Svoboda et al. 2017). Samotný PMMA nemá schopnost adherovat ke kosti, funguje spíše jako výplň, která se mechanicky uzamkne v nerovnostech na povrchu kosti a protézy (Vaishya et al. 2013). Porozita (pórovitost) cementu ovlivňuje jeho mechanickou odolnost a životnost, porozitu lze zmenšit působením tlaku při jeho tvrdnutí nebo pomocí vakuového míchání (Vaishya et al. 2013).

Velmi výhodnou vlastností je možnost **přidat do kostního cementu antibiotikum**, které může být po implantaci lokálně uvolňováno. Antibiotika jsou buď předem smíchána s práškem kostního cementu jeho výrobcem, nebo jsou přidána do prášku kostního cementu během přípravy materiálu těsně před implantací (Vaishya et al. 2013). V průmyslově vyráběných antibiotických cementech jsou používány gentamicin, tobramycin, klindamycin, vankomycin, erytromycin a kolistin (Wang et al. 2013). Lze však podle citlivosti užít i jiná ATB, eventuálně i antimykotika (Svoboda et al. 2017). Podle množství ATB v cementu rozlišujeme nízkodávkové a vysokodávkové cementy s ATB. K profylaktickému užití se užívají nízkodávkové cementy s dávkou do 2 g na 40 g cementu. K terapii infekcí se využívají vysokodávkové cementy s vyšší dávkou cementu – obvykle 4 g na 40 g cementu (Svoboda et al. 2017). Literatura uvádí, že při přidání méně než 2 g antibiotika na jeden standardní sáček (40 g) kostního cementu nedojde k nepříznivému ovlivnění mechanických vlastností PMMA (Vaishya et al. 2013). Jiné zdroje

uvádí, že negativní vliv na pevnost má až dávka ATB vyšší než 4,5 g na 40 g cementu a podíl ATB by neměl překročit 10 % (Svoboda et al. 2017).

### **Síran vápenatý (Stimulan®)**

Druhou skupinou nosičů ATB používaných v ortopedii je porézní síran vápenatý (zkratka CS, z anglického calcium sulfate). CS je anorganická látka s chemickým vzorcem  $\text{CaSO}_4$ . V této práci jsme použili CS s obchodním názvem **Stimulan®**. CS se využívá v léčbě chronické osteomyelitidy (Zhou et al. 2020; Ferrando et al. 2017; Gogia et al. 2009) a jeho využití je zkoumáno i v léčbě IKN (Steadman et al. 2023).

K přípravě pelet CS je Stimulan® dostupný v různých velikých baleních: 3, 5, 10 a 20 ml. Balení obsahuje např. 10 ml (20 g) hemihydrátu síranu vápenatého ( $\text{CaSO}_4 \cdot \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$ ). Tuto formu známe dobře z běžného života jako sádru, která po kontaktu s vodou ztvrdne (vznikne dihydrát síranu vápenatého,  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). V balení Stimulan® je obsažena tuba s roztokem, který se smíchá v nádobce s práškem CS a s ATB, následně vzniklá hmota se nanáší do formy, kde ztuhne v podobě pelet. Velikost pelet může být v závislosti na zvolené formě 3, 4, 8 a 6 mm (Biocomposites.com [b.r.]). Pelety CS s obsaženým ATB se implantují hluboko do rány v místě infekce. Resorpce CS trvá podle různých zdrojů v časovém rozmezí 3–12 týdnů (Abosala a Ali 2020). I další zdroje uvádí, že resorpce CS tvá v řádu několika týdnů (Steadman et al. 2023).

### **Termoplastický kompozit TPS/PCL**

Třetí skupinu nosičů ATB v provedených experimentech představuje termoplastický kompozit obsahující polysacharidovou složku ve směsi s poly- $\epsilon$ -kaprolaktonem (TPS/PCL).

V rámci společného projektu I. ortopedické kliniky 1. LF UK a FN Motol a Ústavu makromolekulární chemie Akademie věd ČR je vyvíjen zcela nový typ biodegradabilního a tvarovatelného polymerního nosiče antibiotik o složení **TPS/PCL/ATB**, kde **TPS** = vysoce homogenní termoplastifikovaný škrob (polysacharidová složka) (Ostafińska et al. 2017; Ujcic et al. 2020), **PCL** = poly- $\epsilon$ -kaprolakton (polyesterová složka) a **ATB** = přidané antibiotikum. Polysacharidová složka může být škrob a/nebo maltodextrin, případně jejich esterifikované formy. Polyesterová složka (PCL) obsahuje nejméně 10 % krystalické fáze s teplotou tání  $<65$  °C, což je důležité pro tvarování materiálu dle potřeby (Šlouf et al. 2017).

Škrob je biodegradabilní přírodní polymer, polysacharid. Termoplastifikovaný škrob (TPS) vzniká při smíchání škrobu s nízkomolekulární látkou (voda, glycerol, kyselinou citrónovou aj.) za zvýšené teploty (60–120 °C). To je proces plastifikace práškového škrobu, který se také nazývá želatinizace = gelatinization. Při něm dochází ke změně struktury a vlastností škrobu. Další modifikace škrobu je možná pomocí esterifikace, která snižuje rychlost odbourávání (Krejčíková et al. 2018).



PCL je syntetický polyester, který je biodegradabilní a biokompatibilní. Aplikace PCL je známa již z tkáňového inženýrství jako scaffoldu (Gunatillake et al. 2003) nebo jako nosiče léčiv, např. ve formě mikro a nanočástic (Šlouf et al. 2017; Teo et al. 2011).

Systém TPS/PCL/ATB má několik zásadních vlastností:

- Heterogenní směs plastifikovaného škrobu a PCL je schopná uvolňovat ATB, které je obsaženo ve škrobové složce (Šlouf et al. 2017).
- Poměr složek ve směsi, její morfologie a esterifikace škrobu ovlivňují rychlost uvolňování ATB (Šlouf et al. 2017).
- Dále je možné do kompozice přidat nanočástice TiO<sub>2</sub> nebo titanové nanotrubky, které ovlivňují mechanické vlastnosti a rychlost uvolňování ATB (Šlouf et al. 2017).

TPS/PCL/ATB je biodegradabilní nosič, který by bylo potencionálně možné implantovat do místa infekce k zajištění lokálního uvolňování ATB ve vysoké koncentraci za cílem zlepšit výsledky léčby. Podobně se využívají již popsané nosiče PMMA a CS (Šlouf et al. 2017). Podle předběžných experimentů vykazuje velmi slibné bakteriostatické účinky (Gajdosova et al. 2022).

### 3.2.2 Metodika

#### Příprava vzorků

##### a) Kostní cementy a síran vápenatý:

PMMA a CaSO<sub>4</sub> jsou dodávány jako dvousložkové směsi (kapalná složka a pevná/prášková složka). Jak bylo uvedeno výše, některé systémy mohly obsahovat již předem namíchaný ATB, přidaný výrobcem). Příprava základních systémů s lokálním uvolňováním ATB probíhala přesně podle návodů výrobců, které byly součástí komerčních balení. Obecný postup byl u všech systémů stejný: pevná (prášková) složka se smíchala s kapalnou složkou a ATB v čisté nerezové misce a poté se směs důkladně promíchala, dokud nevznikla homogenní hmota (obr. 8).

Každý nosič ATB (Palacos®, Palacos® R+G, Vancogenx® a Stimulan®) byl připraven vždy se známou konečnou koncentrací vankomycinu. Množství ATB přidaného do nosiče při přípravě (tj. při míchání cementu) bylo upraveno tak, aby mohla vzniknout řada vzorků nosiče, které po přidání do bujónu v další fázi experimentu dají vzniknout řadě vzorků s rostoucí koncentrací ATB ve zkumavce. Např. jeden ze vzorků antibiotického cementu vážil 12,8 mg, bylo v něm obsaženo 2,5 % antibiotika, což je 0,32 mg.

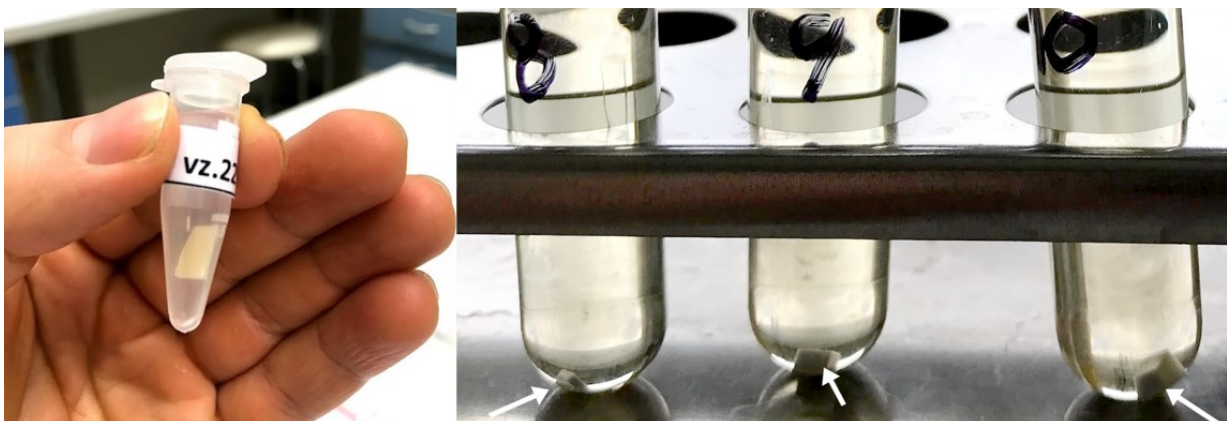


Obrázek 8: Fotografie s jednotlivými kroky přípravy kostního cementu na operačním sále. Ve sterilní misce se smíchá tekutá a prášková složka, míchání probíhá tak dlouho, než má kostní cement požadovanou konzistenci pro aplikaci. Prášková složka již může obsahovat ATB, případně je možné ATB přidat ručně během míchání.

### b) Systém TPS/PCL/ATB:

Systém TPS/PCL/ATB se připravuje v několika krocích. Prvním krokem je příprava škrobu pomocí plastifikace, která zahrnuje míchání a zahřátí nad 60 °C (zpravidla 85 °C). V tomto kroku se přimíchá i ATB (v našem případě vankomycin), vznikne tak TPS/ATB. Dalším krokem je spojení s PCL, a to pomocí strojového míchání zahřáté taveniny. Výsledná kompozice je TPS/PCL/ATB systém (Šlouf et al. 2017).

Při použití kompozice o hmotnostních poměrech složek TPS/PCL/ATB = 63/27/10 bylo experimentálně zjištěno, že dojde k uvolnění 50 % vankomycinu za 6,3 h a 95 % vankomycinu po 5 dnech. Pokud se zvýší poměr PCL na úkor TPS, pak se uvolňování zpomalí (Šlouf et al. 2017). V našem experimentu jsme využili TPS/PCL/ATB systém v hmotnostním poměru 63/27/10. Množství ATB v každém jednotlivém vzorku TPS/PCL/ATB (který měl podobu krychličky) bylo přizpůsobeno tak, aby po přidání tohoto nosiče do bujónu bylo uvolněno ATB a vznikla řada s rostoucí koncentrací (obr. 9).



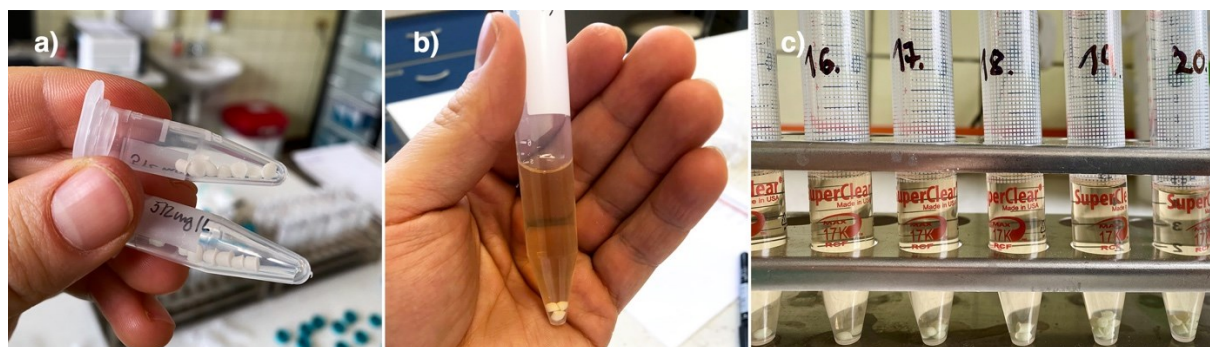
Obrázek 9: Ukázka kompozice TPS/PCL/ATB připravené ve formě krychličky (a), která je následně vložena do bujónu během experimentu (b).

## Příprava vzorků pro testování antimikrobiální aktivity

Všechny připravené vzorky byly přesně nařezány na testovací vzorky tak, aby se do 1 litru bujónu vždy uvolnilo definované množství antibiotika. Konkrétně pro účely naší studie byly testovací vzorky připraveny tak, aby se do 1 litru roztoku uvolnilo **0, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 a 512 mg** vankomycinu.

Takto byla připravena série testovacích vzorků pro každý z nosičů. Jak bylo popsáno, testoval jsem **5 nosičů ATB** (3 komerčně dostupné kostní cementy, síran vápenatý a TPS/PCL). Celkově bylo připraveno **10 sérií** testovacích vzorků pro každý nosič a testováno bylo 11 koncentrací (0–512 mg/l). Jak bude vysvětleno dále, experimenty probíhali ve dvou krocích: (1) testování bakteriostatické aktivity pomocí diluční bujónové metody a (2) testování baktericidní aktivity pomocí agarové metody. Dohromady bylo provedeno 550 experimentů v každém kroku, v souhrnu tedy 1100 experimentů.

Obrázek 10 znázorňuje připravené vzorky a jejich použití v mikrobiologických pokusech.



Obrázek 10: Příklad připravených vzorků Stimulan®/vankomycin a Palacos®/vankomycin (a), zkumavka se Stimulanem®/vankomycinem v kultivačním bujónu s naočkovaným referenčním kmenem *Staphylococcus aureus* (b), řada zkumavek s cementem Palacos® R+G/vankomycin v bujónu (c). Fotografie z článku autora této disertační práce (Štícha et al. 2023).

## Metody ke stanovení citlivosti mikroorganismu k ATB

V klinické mikrobiologické praxi jsou pojmy **bakteriostatické vlastnosti** a **minimální inhibiční koncentrace (MIC)** spojovány s kvantitativní citlivostí mikroorganismu na antibiotikum. MIC (v mg/l) je nejnižší koncentrace antibiotika, která zabrání růstu bakterií ve vzorku. Pro testování MIC jsme použili **diluční bujónovou metodu**, která je nejběžnější mikrobiologickou metodou ve výzkumu (Kowalska-Krochmal a Dudek-Wicher 2021), a kterou doporučuje také EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing 2020). Její podstatou je naočkování bakteriální kultury do řady zkumavek nebo jamek mikrotitrační destičky, které jsou naplněny kultivačním médiem (bujónem) a zvyšující se koncentrací antibiotika. Schopnost antibiotika o dané koncentraci inhibovat růst bakterií se hodnotí podle zákalu bujónu. Zákal bujónu ukazuje na růst bakterií a neúčinnost antibiotika (Hurych a Štícha 2021).

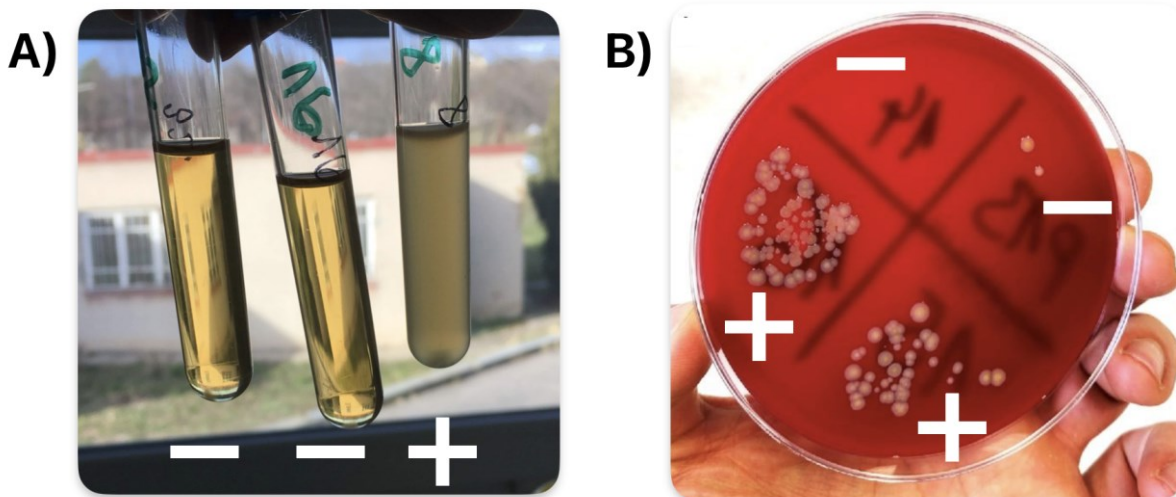
Pojmy **baktericidní vlastnosti** a **minimální baktericidní koncentrace (MBC)** jsou spojeny s úplnou eliminací bakterií v daném prostředí. MBC je nejnižší koncentrace antibiotika, která je schopna eliminovat 99,9 % mikroorganismů ve vzorku a zabránit tak jejich množení. Bakteriostatické a baktericidní vlastnosti se obvykle testují společně: inokulum ze zkumavky s bujónem obsahujícím nosič ATB (tj. inokulum z bujónové ředící metody) se přenese na krevní agarovou ploténku (pro každou zkumavku s danou koncentrací antibiotika zvlášť) - proto se postup nazývá **agarová ploténková metoda**. Destičky s agarem, na kterých po 24 hodinách kultivace nerostou žádné bakteriální kolonie, jsou negativní, tj. ATB dokázalo bakterie usmrtit, vykazuje baktericidní účinek (Hurych a Štícha 2021; Balouiri et al. 2016). Je třeba poznamenat, že s testováním MBC se v klinické praxi běžně nesetkáváme kvůli větší časové náročnosti a určitým obtížím s reprodukovatelností (ačkoli byly popsány standardizované postupy). V klinické praxi se za baktericidní považuje koncentrace antibiotika čtyřikrát vyšší než bakteriostatická koncentrace (MIC)(French 2006).

### **Využití diluční a agarové metody v testování nosičů ATB**

U každého vzorku se testovaly bakteriostatické i baktericidní vlastnosti. V prvním kroku byla využita **diluční bujónová metoda (test minimální inhibiční koncentrace)**. Každý vzorek lokálního nosiče s ATB byl umístěn do samostatné zkumavky obsahující 5 ml Mueller-Hintonova bujónu naočkovaného suspenzí (0,1 ml, McFarland 1) referenčního kmene CCM 4223 *Staphylococcus aureus* (jak bylo znázorněno na obrázku 10). Následovala inkubace po dobu 24 hodin za kontrolovaných podmínek v biologickém inkubátoru při 37 °C. Po 24 hodinách byl vyhodnocen výsledek. Zakalený bujón indikoval růst bakterií, zatímco čirý bujón dokumentoval dostatečnou inhibici růstu bakterií (obr. 11 A). Tímto způsobem byly testovány bakteriostatické vlastnosti a byla určena MIC.

V druhém kroku experimentu byla použita **agarová metoda (test minimální baktericidní koncentrace, MBC)**. Po úvodní inkubaci a vyhodnocení diluční bujónové metody, bylo inokulum z těchto zkumavek naočkováno na destičky krevního agaru a po další 24hodinové inkubaci při 37 °C byla zhodnocena možná přítomnost bakteriálních kolonií. Přítomnost kolonií na povrchu agaru naznačovala, že některé bakterie přežily, zatímco jejich nepřítomnost dokazovala úplnou eliminaci bakterií (obr. 11 B). Tímto způsobem byly charakterizovány baktericidní vlastnosti a určena MBC.

Přehled průběhu celého experimentu znázorňuje obrázek 12.



Obrázek 11: Hodnocení schopnosti nosiče s ATB inhibovat růst bakterií ve zkumavce, případně eliminovat životaschopné bakterie. A) Hodnocení zákalu: jako pozitivní (+) je označena přítomnost zákalu ve zkumavce, což znamená pokračování dělení bakterií v Mueller-Hintonově bujónu i v přítomnosti ATB. Jako negativní (-) je označena čirá průhledná zkumavka bez vzniku zákalu. B) Hodnocení růstu bakteriálních kolonií na plotně s krevním agarem. Pokud nebyly zničeny všechny bakterie, jsou přítomny kolonie bakterií a vzorek je označen jako pozitivní (+). Pokud nejsou kolonie přítomny, pak je vzorek negativní (-), životaschopné bakterie byly eliminovány. V některých případech mohly být přítomny 1-2 kolonie, takový případ je označen jako negativní (-), růst tak malého počtu kolonií jsme po konzultaci prim. Otakara Nyče z ÚLM 2. LF UK a FN Motol nepovažovali za signifikantní.

1) Přípraveny vzorky (nosič + bujón + *S. aureus*)

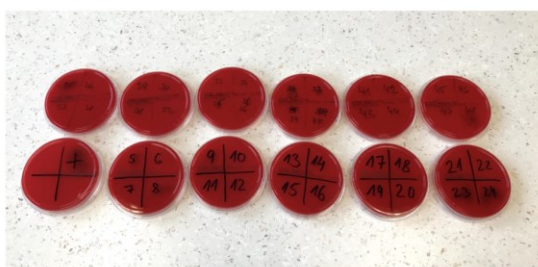


Kultivace  
24h

2) Vyhodnocení zákalu

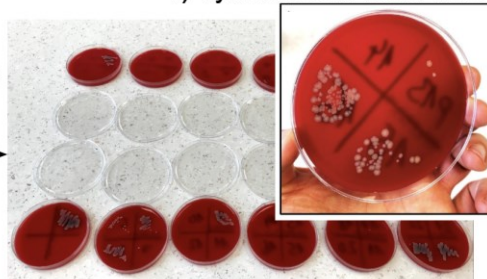


3) Naočkování na agar



Kultivace  
24h

4) Vyhodnocení růstu kolonií



Obrázek 12: Schéma testování antimikrobiální účinnosti u jedné série vzorků. Každá série vzorků byla testována 3 dny: 1. den příprava vzorků, vložení nosiče do bujónu a naočkování *S. aureus* do zkumavek, 24 h kultivace; 2. den vyhodnocení zákalu, naočkování na krevní agar, kultivace 24 hodin; 3. den vyhodnocení růstu kolonií na krevním agaru.

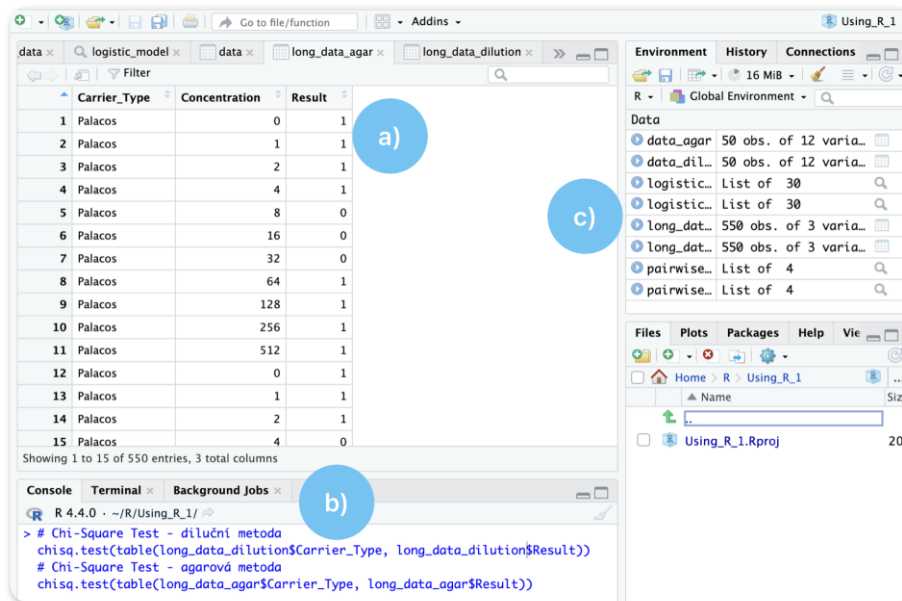
## Metody použité k hodnocení výsledků v kontextu hypotéz a statistická analýza

V tabulce 7 je pro každou hypotézu uveden způsob hodnocení.

<p><b>1</b> Všechny použité systémy pro lokální uvolňování ATB jsou schopné uvolňovat přidané ATB, a proto by měly vykazovat antimikrobiální účinky (bakteriostatické a/nebo baktericidní).</p>
<p>A) Bude proveden slovní popis a interpretace výsledků všech experimentů v kontextu informací uvedených v této disertační práci s přihlédnutím k běžné laboratorní a klinické praxi.</p> <p>B) Bude provedena analýza bakteriostatického a baktericidního účinku každého nosiče ATB, a to na základě vypočtení procentuálního zastoupení negativních (-) výsledků napříč všemi koncentracemi.</p>
<p><b>2</b> Jiné vědecké studie již prokázaly, že všechny druhy nosičů ATB, které jsou použity v experimentální části této disertační práce, mají schopnost inhibovat růst bakterií, měly by proto mít stejný nebo velmi podobný bakteriostatický efekt na růst referenčního kmene <i>S. aureus</i>. Toto tvrzení představuje nulovou hypotézu (H0). Alternativní hypotéza (H1) zní: existuje významný rozdíl v bakteriostatické účinnosti mezi různými použitými druhy nosičů ATB.</p>
<p>Bude porovnána hodnota zjištěných MIC všech zkoumaných nosičů ATB a aplikován chí kvadrátový test (<math>\chi^2</math> test), který určí, jestli jsou rozdíly v bakteriostatickém účinku mezi jednotlivými nosiči statisticky významné. Pokud bude p-hodnota <math>&lt;0,05</math>, pak nulovou hypotézu (H0) vyvrátíme. Hodnota <math>p &lt; 0,05</math> zároveň potvrdí, že pozorované rozdíly mezi nosiči ATB jsou statisticky významné a nejsou způsobeny náhodou.</p>
<p><b>3</b> Všechny použité nosiče ATB jsou schopné spolehlivě eliminovat (zahubit) bakterie při použití baktericidního ATB (vankomycin).</p>
<p>Bude zhodnocena baktericidní účinnost každého použitého nosiče ATB a pomocí chí kvadrátového testu (<math>\chi^2</math> test) bude určeno, jsou-li výsledky statisticky významné.</p>
<p><b>4</b> Koncentrace ATB, která je potřebná pro zahubení bakterií, je vyšší ve srovnání s koncentrací k pouhé inhibici růstu bakterií – to znamená, že z výsledků by měla být zjištěna hodnota minimální baktericidní koncentrace (MBC) vyšší než minimální inhibiční koncentrace (MIC).</p>
<p>Bude porovnána minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC) pro jednotlivé nosiče a za pomoci statistických metod potvrdíme tato zjištění.</p>
<p><b>5</b> Nový originální nosič TPS/PCL má stejný nebo velmi podobný antimikrobiální účinek jako komerčně dostupné a v praxi užívané nosiče ATB (kostní cementy a síran vápenatý).</p>
<p>Bude porovnána účinnost nosiče TPS/PCL s ostatními nosiči, a to jak prostřednictvím přímého srovnání hodnot MIC a MBC (komparativní analýza), tak pomocí chí kvadrátového testu (<math>\chi^2</math> test) k vyhodnocení statistické významnosti rozdílů.</p>

Tabulka 7: Metody hodnocení výsledků v kontextu hypotéz pro experimentální část práce

Ke statistické analýze dat byl využit programovací jazyk R (R Core Team 2024). Pro umožnění analýzy dat byla tabulka 8 a 9 převedena do dlouhého formátu tak, aby každá řádka představovala jeden experiment, který má 3 proměnné: typ nosiče, koncentrace a výsledek. Výsledek každého jednotlivého experimentu byl převeden z „+“ a „-“ na „1“ a „0“. Následně byl využit kód k uskutečnění požadovaného statistického testu, který čerpal data z provedených experimentů (obr. 13). Výsledky a interpretace jsou uvedeny v další podkapitole této disertační práce.



Obrázek 13: Ukázka použití programu RStudio (RStudio Team 2024), jedná se o prostředí k usnadnění statistické analýzy v programovacím jazyku R. Znárodněny jsou data převedená do dlouhého formátu (a), konzole s kódem k analýze diluční a agarové metody (b) a ostatní importovaná nebo vzniklá data v tomto programu (c).

### 3.3 Výsledky

Výsledky všech mikrobiologických experimentů provedených v této studii jsou shrnuty v tabulkách 8 a 9. V obou tabulkách jsou uvedeny výsledky experimentů se všemi 5 zkoušenými nosiči ATB, tj. tři typy kostních cementů, porézní síran vápenatý a TPS/PCL. Každá řádka tabulky představuje jednu sérii testů s 11 vzorky seřazenými podle množství ATB v nosiči – sloupce pak odpovídají koncentraci uvolněného ATB ve zkumavce s bujónem. V tabulce 8 jsou zobrazeny výsledky diluční bujónové metody (1. krok experimentu), zatímco v tabulce 9 jsou zobrazeny výsledky testů na krevním agaru (2. krok experimentu).

Jak je vysvětleno výše, bujónové diluční testy se zabývají bakteriostatickými vlastnostmi (inhibice růstu bakterií a stanovení MIC) a agarové testy se zabývají baktericidními vlastnostmi (úplná eliminace bakterií a stanovení MBC). Rozdíl mezi bakteriostatickými a baktericidními pokusy a hodnocení výsledků ilustruje obrázek 14: při diluční bujónové metody (obrázek 14 a) pozorujeme zákal, pokud nebyl inhibován růst bakterií, zatímco při agarové metodě (obrázek 14 b) pozorujeme bakteriální kolonie, pokud nebyly eliminovány všechny životaschopné bakterie.



Obrázek 14: Názorné fotografie výsledků (a) diluční bujónové metody a (b) agarové metody. U diluční metody (a) se očekává, že zvyšující se koncentrace ATB povede k inhibici růstu bakterií: vzorky ve zkumavkách č. 1–2 uvolnily 1 mg/l, ve zkumavkách č. 3–4 uvolnily 2 mg/l ATB – tato koncentrace nebyla u vzorků 1–3 dostatečná k inhibici růstu bakterií a roztoky byly zakalené, ve vzorku 4 už došlo k inhibici. Vzorky č. 5–6 (uvolnily 4 mg/ml ATB), 7–8 (8 mg/ml), 9–10 (16 mg/ml) inhibovaly růst a roztoky byly průhledné. Druhým krokem byla metoda na krevním agaru (b). Na fotografii je plotna s agarem, do každé čtvrtiny plotny bylo po diluční bujónové metodě nanášeno inokulum ze zkumavky č. 3, 4, 5 a 6. Pravá horní a dolní čtvrtina (inokulum z č. 3 a 4) vykazuje růst bakterií, což znamená, že některé bakterie v roztoku přežily (i když byl růst ve zkumavce č. 4 inhibován) a nebyl prokázán baktericidní efekt. Naproti tomu levá horní a dolní čtvrtina (inokulum z č. 5 a 6) nevykazuje žádný růst bakterií (žádné bakterie nepřežily), což prokazuje baktericidní účinek.



**1. krok – DILUČNÍ METODA**

Koncentrace ATB v systému (mg/l):

Nosič ATB:	0	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512
Palacos 1	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
Palacos 2	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Palacos 3	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Palacos 4	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Palacos 5	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Palacos 6	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Palacos 7	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Palacos 8	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Palacos 9	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Palacos 10	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Palacos R+G 1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Palacos R+G 2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Palacos R+G 3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Palacos R+G 4	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Palacos R+G 5	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Palacos R+G 6	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Palacos R+G 7	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Palacos R+G 8	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Palacos R+G 9	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Palacos R+G 10	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vancogenx 1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vancogenx 2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vancogenx 3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vancogenx 4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vancogenx 5	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vancogenx 6	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vancogenx 7	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vancogenx 8	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vancogenx 9	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vancogenx 10	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Stimulan 1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Stimulan 2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Stimulan 3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Stimulan 4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Stimulan 5	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Stimulan 6	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Stimulan 7	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Stimulan 8	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Stimulan 9	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Stimulan 10	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TPS/PCL 1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TPS/PCL 2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TPS/PCL 3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TPS/PCL 4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TPS/PCL 5	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TPS/PCL 6	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TPS/PCL 7	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TPS/PCL 8	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TPS/PCL 9	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TPS/PCL 10	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Tabulka 8:** Výsledky diluční bujovací metody pro všechny zkoumané vzorky. Pro přípravu vzorků byly použity Palacos®, Palacos R+G®, Vancogenx®, Stimulan® a TPS/PCL, které uvolnily 0, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 a 512 mg ATB na 1 litr roztoku. Znaménko plus (+) označuje pozitivní výsledek (neinhibovaný růst bakterií), znaménko minus (-) označuje negativní výsledek (úplná inhibice růstu bakterií).

## 2. krok – AGAROVÝ TEST

Koncentrace ATB v systému (mg/l):

Nosič ATB:	0	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512
Palacos 1	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
Palacos 2	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
Palacos 3	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+
Palacos 4	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
Palacos 5	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+
Palacos 6	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-
Palacos 7	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
Palacos 8	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+
Palacos 9	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+
Palacos 10	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Palacos R+G 1	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-
Palacos R+G 2	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
Palacos R+G 3	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
Palacos R+G 4	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Palacos R+G 5	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-
Palacos R+G 6	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
Palacos R+G 7	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
Palacos R+G 8	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Palacos R+G 9	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
Palacos R+G 10	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-
Vancogenx 1	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
Vancogenx 2	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
Vancogenx 3	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
Vancogenx 4	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Vancogenx 5	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Vancogenx 6	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vancogenx 7	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
Vancogenx 8	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
Vancogenx 9	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Vancogenx 10	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
Stimulan 1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Stimulan 2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Stimulan 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Stimulan 4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Stimulan 5	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-
Stimulan 6	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
Stimulan 7	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-
Stimulan 8	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-
Stimulan 9	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-
Stimulan 10	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
TPS/PCL 1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
TPS/PCL 2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
TPS/PCL 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TPS/PCL 4	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
TPS/PCL 5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
TPS/PCL 6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
TPS/PCL 7	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
TPS/PCL 8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
TPS/PCL 9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TPS/PCL 10	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+

**Tabulka 9.** Výsledky testů na agarových plotnách pro všechny zkoumané vzorky. Pro přípravu vzorků byly použity Palacos®, Palacos R+G®, Vancogenx®, Stimulan® a TPS/PCL), které uvolnily 0, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 a 512 mg ATB na 1 litr roztoku. Znaménko plus (+) označuje pozitivní výsledek (bakteriální růst pozorován), znaménko minus (-) označuje negativní výsledek (bakteriální růst nebyl pozorován).

### 3.3.1 Statistické zhodnocení rozdílů mezi nosiči

Pro zvýšení robustnosti analýzy jsem využil chí-kvadrát test, který potvrzuje, že pozorované rozdíly v účinnosti nosičů jsou statisticky významné při specifických koncentracích antibiotik.

Výsledkem chí-kvadrátového testu ( $\chi^2$  test) aplikovaného na souhrn všech výsledků diluční metody je p-hodnota 0,003053, což znamená, že byla prokázána signifikantní rozdílnost v bakteriostatické (inhibiční) účinnosti různých testovaných nosičů v těchto experimentech. Jinými slovy, existuje nízká pravděpodobnost (0,3 %), že pozorované rozdíly jsou způsobeny náhodou. To odpovídá i výše popsanému pozorování při hodnocení výsledků v tabulce 8.

Pokud chí-kvadrátový test ( $\chi^2$  test) použijeme stejným způsobem na agarovou metodu, pak vyjde p-hodnota  $1,236 \times 10^{-13}$ , což je velice výrazně pod 0,05 a ukazuje na významný rozdíl mezi nosiči ATB.

Tato analýza pomocí chí-kvadrátového testu ukazuje, že při zohlednění všech výsledků diluční nebo agarové metody dohromady **existuje významný rozdíl v účinnosti různých nosičů antibiotik**. Tato statistická analýza poskytuje obecný přehled o rozdílech mezi nosiči, ale neumožňuje přesně určit, u kterých konkrétních koncentrací jsou tyto rozdíly významné.

Dále byla provedena podrobnější analýza, ve které byl chí-kvadrát test aplikován zvlášť ke každé koncentraci (souhrnně pro všechny nosiče ke každé hodnotě z testované koncentrační řady). Tím lze určit, u kterých konkrétních koncentrací jsou statisticky významné rozdíly v účinnosti nosičů ATB (tab. 10).

Zjistili jsme statisticky významné rozdíly ( $p < 0,05$ ) v bakteriostatické účinnosti zkoumaných nosičů pro koncentrace 1 a 2 mg/l. Baktericidní účinnost se statisticky významně lišila u koncentrací 1, 2, 4, 8 a 16 mg/l. Při vyšších koncentracích nejsou rozdíly v účinnosti mezi nosiči statisticky významné.

Nesignifikantní p-hodnoty při vyšších koncentracích naznačují, že s rostoucí koncentrací antibiotika se všechny nosiče stávají podobně účinnými. Důvodem je pravděpodobně to, že vyšší koncentrace lépe inhibují růst bakterií, resp. je eliminují.

Tyto výsledky ukazují, že při nižších koncentracích ATB jsou rozdíly mezi nosiči výraznější, zatímco při vyšších koncentracích se účinnost jednotlivých nosičů vyrovnává.

Výsledky chí-kvadrát testu pro diluční metodu:				Výsledky chí-kvadrát testu pro agarovou metodu:			
Metoda	$\chi^2$	p-hodnota	Signifikantní?	Metoda	$\chi^2$	p-hodnota	Signifikantní?
Diluční	15,98	0,003053	Ano	Agarová	66,51	$1,236 \times 10^{-13}$	Ano
c (mg/l)	$\chi^2$	p-hodnota	Signifikantní?	c (mg/l)	$\chi^2$	p-hodnota	Signifikantní?
0	0,00	1,000000	Ne	0	0,00	1,000000	Ne
1	28,44	0,000010	Ano	1	28,30	0,000011	Ano
2	22,22	0,000181	Ano	2	17,15	0,001810	Ano
4	8,33	0,080103	Ne	4	17,39	0,001622	Ano
8	0,00	1,000000	Ne	8	20,78	0,000350	Ano
16	0,00	1,000000	Ne	16	12,32	0,015149	Ano
32	0,00	1,000000	Ne	32	8,33	0,080103	Ne
64	4,08	0,395071	Ne	64	8,60	0,071800	Ne
128	0,00	1,000000	Ne	128	3,99	0,406946	Ne
256	0,00	1,000000	Ne	256	5,25	0,262165	Ne
512	0,00	1,000000	Ne	512	6,77	0,148346	Ne

Tabulka 10: Chí-kvadrát test jednak pro diluční a agarovou metodu, jednak zvlášť pro každou koncentraci.  $\chi^2$  udává, do jaké míry se pozorované počty odchylují od očekávaných počtů při nulové hypotéze. Vyšší hodnota naznačuje větší rozdíl mezi pozorovanými a očekávanými počty. Hodnota p a signifikantnost výsledku byla vysvětlena v textu.

## 3.4 Diskuse

### 3.4.1 Lokální nosiče

Je nutné si uvědomit, že v experimentu použité lokální nosiče se výrazně liší svým složením a vlastnostmi.

#### PMMA (kostní cement)

Uvolňování (eluce, „vymývání“) ATB z PMMA je dáno následujícími faktory: porozita, homogenita a viskozita cementu, velikost povrchu (resp. poměr povrchu k objemu), způsobem míchání a samozřejmě typem a množstvím použitého ATB (Svoboda et al. 2017; Bistolfi et al. 2011). Jak bylo již zmíněno výše, způsob míchání ovlivňuje porozitu, ruční míchání cementu způsobí začlenění vzduchových bublinek do struktury cementu, zvětší porozitu, a tím usnadní uvolňování ATB z cementu. Při pokusech *in vitro* byla zjištěna až pětikrát větší koncentrace uvolněného ATB oproti vakuovému míchání (Steadman et al. 2023). Přímícháním více ATB v kostním cementu může působit synergisticky nejen ve smyslu zlepšení spektra účinku, ale i zvýšením porozity cementu a zlepšením uvolňování obou ATB (Steadman et al. 2023). Vhodnou kombinací je kombinace aminoglykosidu s glykopeptidem, literatura uvádí zlepšení eluce ATB při kombinaci tobramycinu s vankomycinem nebo teikoplaninu s gentamicinem (Bistolfi et al. 2011; Svoboda et al. 2017). V eluční studii kombinace gentamicinu

s vankomycinem zvýšila eluci vankomycinu o 103 % ve srovnání s kontrolou (Penner et al. 1996). Celkově se z PMMA antibiotikum uvolňuje poměrně špatně a jen menšinová část obsaženého ATB se opravdu uvolní (Steadman et al. 2023). Některé zdroje uvádí, že se z cementu uvolní méně než 10 % ATB (Bistolfi et al. 2011). V jiných pracích je uváděno, že z cementových kuliček užívaných při terapii osteomyelitidy se uvolní 25–50 % ATB (ačkoliv u „mini kuliček“ o rozměrech 3×5 mm to může být díky lepší eluci a většímu povrchu až 93 %)(Steadman et al. 2023).

**Volba antibiotika** – ATB přidaná do cementu by měla splňovat několik podmínek:

- Doporučuje se přidávat ATB pouze v práškové formě, tekutá ATB nejsou vhodná kvůli zhoršení mechanických vlastností (Bistolfi et al. 2011).
- Vzhledem k exotermické reakci a zvýšení teploty by mělo ATB být teplotně i chemicky stabilní (Svoboda et al. 2017).
- Pro zajištění účinnosti proti potencionálním grampozitivním i gramnegativním patogenním agens volíme širokospektré a nejlépe baktericidní ATB. Jak uvádí literatura i naše praxe, tak nejčastěji jsou používané aminoglykosidy (gentamicin a tobramycin) a glykopeptidy (vankomycin) (Bistolfi et al. 2011).
- Nevhodná jsou ATB, která mají toxický účinek na kostní buňky – patří mezi ně fluorochinolony, tetracykliny a rifampicin (Steadman et al. 2023).
- Je nutné mít na paměti i možnost nežádoucích účinků. Oproti celkovému podávání je při lokálním použití ATB dosahováno mnohem menší hladiny ATB v krvi, i přes to může dojít k systémovým nežádoucím účinkům jako např. k nefrotoxicitě (Steadman et al. 2023).
- Volená ATB by měla vykazovat vysokou míru eluce z kostního cementu po dlouhou dobu a také rychlé zvýšení koncentrace po implantaci cementu (Svoboda et al. 2017).
- PMMA je hydrofobní a pro lepší uvolňování je potřeba hydrofilní ATB, které se vylučuje skrze trhliny a dutiny ve struktuře cementu do okolních tkání a tekutiny (Bistolfi et al. 2011).

Největší množství ATB je z cementu s ATB uvolněno v prvních dnech po implantaci. Při dlouhodobém ponechání v těle pokračuje pomalé uvolňování ATB z cementu, koncentrace ATB klesá a od určité chvíle je na subterapeutické úrovni. Proto jsou obavy, že taková situace může naopak vést k selekci rezistentních kmenů bakterií nebo k rozvoji rezistence (Steadman et al. 2023). Review z roku 2023 uvádí, že studie maximálních koncentrací a doby uvolňování se dost liší kvůli variabilitě faktorů, které již byly zmíněny v textu výše. V případě použití antibiotického spaceru u IKN bylo popsáno uvolňování ATB po řadu měsíců, jiné práce však popisují, že koncentrace ATB klesla pod MIC již po 7–14 dnech (Steadman et al. 2023). To je další důvod, proč se nebiodegradabilní nosič často v druhé době extrahuje (např. při použití řetězce cementových kuliček nebo spaceru s ATB). I proto se v posledních desetiletích

intenzivně zkoumají alternativní biodegradabilní nosiče, které jsou i předmětem zkoumání této disertační práce.

### **Síran vápenatý (Stimulan®)**

Pelety CS s ATB mají lepší eluční vlastnosti oproti PMMA, díky vstřebatelnosti CS se uvolní 100 % obsaženého ATB a lokálně se může udržet stabilnější a vyšší koncentrace ATB ve srovnání s PMMA, jak uvádí review (Abosala a Ali 2020), ve kterém se autoři odkazují na *in vitro* studii elučních profilů vankomycinu a tobramicinu z CS (Cooper et al. 2016). I další studie uvádí rovnocenné nebo lepší uvolňování vankomycinu z CS ve srovnání s PMMA (McConoughey et al. 2015).

Další výhodou CS je, že při použití v léčbě IKN je menší riziko vzniku otěru třetím tělesem ve srovnání s PMMA nebo keramickými částicemi (Steadman et al. 2023).

Systematické review (Abosala a Ali 2020) hodnotilo účinnost CS použitého při revizních operacích náhrad kolenního a kyčelního kloubu. Bylo vybráno 5 studií v časovém rozmezí 2013–2018 (McPherson et al. 2013; Kallala a Haddad 2015; Kallala et al. 2018; Lum et al. 2018; Flierl et al. 2017). Úspěšnost se lišila v závislosti na designu studie a podle indikaci k revizní operaci. Nižší míra reinfekce (6 z 250 pacientů, tj. 2,4 %) byla zaznamenána ve studii (McPherson et al. 2013), která zahrnovala nejen pacienty s IKN (polovina pacientů ve studii), ale i ty, kteří nesplňovali kritéria pro infekci kloubní náhrady (např. revize pro aseptické uvolnění). Naproti tomu ve studii (Flierl et al. 2017) zahrnující pouze revizní operace při IKN metodou DAIR s použitím CS byla reinfekce zjištěna u 48 % pacientů; v této studii dokonce autoři nedoporučují rutinní používání CS při řešení IKN (Flierl et al. 2017; Abosala a Ali 2020). Další klinická studie zaznamenala reinfekci pouze u jednoho pacienta z 15 (6,7 %) s diagnostikovanou IKN, v této kohortě pacientů však všichni podstoupily jednodobou nebo dvoudobou reimplantaci, žádný z pacientů nepodstoupil DAIR (Kallala a Haddad 2015).

Ačkoliv existují důkazy o inhibici a eradikaci biofilmu *in vitro* pomocí CS s ATB, klinické důkazy a studie zatím nejsou jednoznačné. Převážně jsou dostupné série kazuistik a studie případů a kontrol použití CS, řada z nich neprokázala zlepšení úspěšnosti u pacientů operovaných metodou DAIR (Steadman et al. 2023). Na druhou stranu, zlepšení výsledků DAIR byla nedávno popsána v retrospektivní studii zahrnující 41 revizí infekce TEP kyčle při použití CS s vankomycinem, ceftriaxonem nebo tobramycinem (Reinisch et al. 2022).

Je nutné zdůraznit, že jsou známy i potencionální **komplikace** při implantaci CS. Jejich výčet a četnost výskytu je popsána v následujících bodech, přičemž zdrojem jsou studie sledující komplikace při použití u revizních operací při IKN:

- Hyperkalcemie byla v souboru 770 pacientů pozorována u 44 (5,7 %), ale pouze ve 2 případy byly symptomatické pouze (Kallala et al. 2018; Kallala a Haddad 2015). Autoři doporučují používat maximálně 40 ml Stimulanu® během jedné operace (Kallala et al.

2018). Jiné zdroje uvádí výskyt hyperkalcemie v 4,2 % případů, přičemž jen 0,28 % vyžaduje léčbu (Steadman et al. 2023).

- Perzistující sekrece z rány byla popsána v 3,8 % případů (Abosala a Ali 2020).
- Heterotopické osifikace byly popsány u 1,7 % v hodnoceném souboru (Abosala a Ali 2020).

## TPS/PCL/ATB

PCL je syntetický polyester, který je biodegradabilní a biokompatibilní. Aplikace PCL je známa již z tkáňového inženýrství jako scaffoldu (Gunatillake et al. 2003) nebo jako nosiče léčiv, např. ve formě mikro a nanočástic (Šlouf et al. 2017; Teo et al. 2011).

Systém TPS/PCL/ATB má několik zásadních vlastností:

- Heterogenní směs plastifikovaného škrobu a PCL je schopná uvolňovat ATB, které je obsaženo ve škrobové složce (Šlouf et al. 2017).
- Poměr složek ve směsi, její morfologie a esterifikace škrobu ovlivňují rychlost uvolňování ATB (Šlouf et al. 2017).
- Dále je možné do kompozice přidat nanočástice TiO<sub>2</sub> nebo titanové nanotrubky, které ovlivňují mechanické vlastnosti a rychlost uvolňování ATB (Šlouf et al. 2017).

Celkově lze říci, že nový nosič TPS/PCL vykazuje slibné bakteriostatické vlastnosti srovnatelné s komerčně dostupnými nosiči Vancogenx® a Stimulan®. Nicméně, pro dosažení konzistentního baktericidního účinku je zapotřebí další optimalizace jeho složení nebo způsobu uvolňování ATB. Výsledky této studie poskytují důležité informace pro další výzkum a vývoj efektivních nosičů antibiotik pro klinické použití.

### 3.4.2 Výsledky diluční bujónové metody

Bakteriostatická aktivita zkoumaných nosičů ATB byla hodnocena na základě výsledků diluční bujónové metody v 1. kroku experimentu. Z tabulky s vizuálním znázorněním výsledků (tab. 8) je zřejmé, že je k dispozici podrobný soubor dat, který ukazuje účinnou inhibici růstu bakterií různými nosiči antibiotik v různých koncentracích.

#### 1) Účinnost při různých koncentracích:

- Každý typ ATB nosiče vykazuje určitý vzorec bakteriostatické aktivity ve vztahu k rostoucí koncentraci ATB ve zkumavce. Některé nosiče mohou začít inhibovat množení *S. aureus* při nižších koncentracích (Vancogenx®, Stimulan® a TPS/PCL), zatímco jiné vyžadují vyšší koncentrace (Palacos® a Palacos R+G®).
- Většina kostních cementů nedokázala inhibovat růst bakterií při velmi nízkých koncentracích (0, 1, 2 mg/l). To naznačuje, že tyto koncentrace jsou při použití kostního cementu nedostatečné pro zabránění množení *S. aureus*.

- S růstem koncentrace ATB uvolněného z nosiče do bujónu ve zkumavce můžeme pozorovat zlepšení antimikrobiální účinnosti. Tento trend je nejvýraznější u vyšších koncentrací (8 mg/l a více), což ukazuje na důležitost dostatečné dávky ATB v nosiči.
- Procento negativních (-) výsledků (nedošlo k růstu bakterií a zákalu) je pro každý nosič v prvním kroku je následující: Palacos: 76 %, Palacos R+G: 88 %, Vancogenx: 91 %, Stimulan: 91 %, TPS/PCL: 91 %.
- Všechny použité nosiče vykazují vysoké procento negativních výsledků, přičemž TPS/PCL má stejné nebo lepší výsledky než komerčně dostupné nosiče.
- Minimální inhibiční koncentrace (MIC) pro každý nosič je dle získaných výsledků následující: Palacos: 8 mg/l, Palacos R+G: 2 mg/l, Vancogenx: 1 mg/l, Stimulan: 1 mg/l, TPS/PCL: 1 mg/l. Nový nosič TPS/PCL vykazuje podobné inhibiční účinky jako Vancogenx a Stimulan a je účinnější než Palacos a Palacos R+G.

## 2) Srovnání nosičů:

- Vysoce konzistentní výsledky pozorujeme jen u části použitých nosičů: Vancogenx®, Stimulan® a TPS/PCL. Tyto systémy pro lokální uvolňování ATB vykazují stabilní a spolehlivou inhibici množení bakterií již od koncentrace 1 mg/l. Tím byl prokázán výborný bakteriostatický účinek těchto 3 nosičů.
- U zbylých nosičů ATB (Palacos® a Palacos R+G®) byl inhibiční účinek více variabilní, obzvláště při nízkých koncentracích (1, 2 a 4 mg/l). U Palacos® byl dokonce jeden z 10 vzorků pozitivní (tj. byl přítomen růst bakterií) při koncentraci 64 mg/l.
- Je nutné si uvědomit zásadní fakt, že nosiče Vancogenx® a Palacos R+G® obsahují navíc příměs druhého antibiotika (gentamicinu), což může zvyšovat účinnost nosiče.

Výsledky diluční metody ukazují, že jednotlivé nosiče antibiotik vykazují odlišnou bakteriostatickou aktivitu při různých koncentracích ATB. Nosiče Vancogenx®, Stimulan® a TPS/PCL byly schopny inhibovat růst *S. aureus* již při koncentraci 1 mg/l, což naznačuje jejich vysokou účinnost při nízkých koncentracích ATB. Naopak nosiče Palacos® a Palacos R+G vyžadovaly vyšší koncentrace ATB k dosažení podobné inhibice, přičemž minimální inhibiční koncentrace (MIC) byla 8 mg/l pro Palacos® a 2 mg/l pro Palacos® R+G. Tento rozdíl může být způsoben rozdílnou schopností nosičů uvolňovat ATB.

### 3.4.3 Výsledky agarové metody

Baktericidní aktivita byla testována v 2. kroku experimentu pomocí agarové metody. Z tabulky 9 je patrné, že pozitivní (růst bakteriálních kolonií) a negativní (eliminace bakterie) výsledky jsou mnohem více heterogenně rozloženy oproti 1. kroku experimentu.



## 1) Účinnost při různých koncentracích:

- Pozitivní výsledky jsou u velké části pokusů rozprostřeny po celé koncentrační řadě. Paradoxně, v některých experimentech byly nižší koncentrace antibiotik schopny účinně eliminovat bakterie a zabránit růstu kolonií, zatímco vyšší koncentrace ne. V takovém případě není možné validně určit MBC, a proto je hodnocení baktericidního účinku z dat získaných v 2. kroku experimentu problematické.
- Na základě výsledků agarové metody určíme MBC (nejnižší koncentraci, při které nebyl pozorován žádný růst bakterií), to ale bylo možné jen v jednom případě:
  - Palacos: žádná MBC.
  - Palacos R+G: žádná MBC.
  - **Vancogenx: MBC = 1 mg/l.**
  - Stimulan: žádná MBC.
  - TPS/PCL: žádná MBC.
- Vzhledem k heterogennímu rozložení pozitivních a negativních výsledků napříč koncentracemi bylo nutné provést další analýzu dat, a tím srovnat testované nosiče ATB. Počet a podíl negativních i pozitivních výsledků pro každý nosič je uveden v tabulce 11.

	Nedošlo k růstu bakteriálních kolonií		Bakteriální kolonie byly přítomné	
	Počet negativních výsledků	Podíl negativních výsledků (%)	Počet pozitivních výsledků	Podíl pozitivních výsledků (%)
Palacos®	53	48 %	57	52 %
Palacos R+G®	54	49 %	56	51 %
Vancogenx®	81	74 %	29	26 %
Stimulan®	48	44 %	62	56 %
TPS/PCL®	21	19 %	89	81 %

Tabulka 11: Počet a podíl negativních i pozitivních výsledků pro každý nosič

## 2) Srovnání nosičů:

- Vancogenx® vykazuje nejvyšší baktericidní účinnost, zatímco TPS/PCL nejnižší. Při testování Vancogenx® bylo 74 % vzorků negativních, tedy jen u 26 % vzorků došlo k růstu bakteriálních kolonií na krevním agaru. TPS/PCL měl jen 19 % vzorků negativních, bakteriální kolonie rostly v 81 % vzorků. Palacos®, Palacos R+G® a Stimulan® vykazují velmi podobné výsledky při agarové metodě.
- U většiny nosičů (Palacos®, Palacos R+G®, Stimulan®, TPS/PCL) nebyla v testovaném koncentračním rozmezí zjištěna žádná MBC, což naznačuje, že tyto nosiče nedosahují při testovaných koncentracích dostatečné baktericidní aktivity. Vancogenx® však měl MIC i MBC 1 mg/l, což prokazuje jeho silný baktericidní

účinek. Je však nutné upozornit na to, že i u Vancogenx® byl v některých pokusech s vyššími koncentracemi pozorován růst kolonií.

- Opět je nutné zdůraznit, že nosič Vancogenx® a Palacos R+G® obsahuje kromě vancomycinu i gentamicin, který ostatní nosiče neobsahují. Palacos R+G® obsahuje 0,5 % gentamicinu oproti Vancogenxu®, který obsahuje 4,2% gentamicinu.

Výsledky agarové metody byly více heterogenní. Pozitivní (růst bakteriálních kolonií) a negativní (absence růstu) výsledky byly rozprostřeny napříč celou koncentrační řadou. I když nosič Vancogenx® vykazoval nejvyšší baktericidní účinnost s MBC (minimální baktericidní koncentrace) 1 mg/l, ostatní nosiče, včetně TPS/PCL, nevykazovaly konzistentní baktericidní účinek při testovaných koncentracích. Tento jev může být způsoben řadou faktorů, včetně rozdílů v reálné koncentraci ATB, potencionální degradací ATB při přípravě, rozdíly v eluci ATB a fyzikálně-chemickými vlastnostmi jednotlivých nosičů.

### 3.4.4 Omezení studie a jiné vlivy

#### Vliv vlastností nosiče na výsledky experimentu

Výsledky agarové metody nevykazují tak jasné trendy jako výsledky bujónové metody. V minulé studii (Štícha et al. 2023) naší skupiny zkoumající nosiče ATB byly baktericidní vlastnosti v pozoruhodné shodě s parametry souvisejícími s přípravou vzorku, které jsou shrnuty v tabulce 12. Po zohlednění nových výsledků a zvětšení počtu experimentů již není tato shoda dobře rozeznatelná.

Palacos® vykazoval v předchozí studii nejhorší výsledky (žádná baktericidita do koncentrace 2 mg/ml a nejednoznačné výsledky pro všechny koncentrace  $\geq 4$  mg/ml koncentračního rozmezí). Předpokládali jsme, že důvodem mohlo být to, že vzorek bylo možné míchat jen krátkou dobu před ztuhnutím, ATB bylo nutné přidávat během míchání ručně a viskozita směsi během přípravy byla poměrně vysoká (tab. 12, horní řádek).

Druhý vzorek (Palacos R+G®) byl v původní studii o něco účinnější než Palacos®, podle výsledků uvedených v této práci se rozdíly zmenšily. Potencionálně lepší účinek Palacos R+G® můžeme přičíst skutečnosti, že ATB bylo v systému předem namíchano (materiál obsahoval 4,5 % hm. gentamicinu a 2,5 % hm. vankomycinu). Podotýkáme, že každý vzorek byl připraven tak, aby uvolnil definované množství vankomycinu. Uvolňování gentamicinu z přípravku Palacos R+G® mohlo přispět k baktericiditě vzorku. Předem namíchané ATB ve vzorku by navíc mělo vést k homogennějšímu rozložení ATB, což by mělo eliminovat případy, kdy malý testovací vzorek obsahuje nižší nebo dokonce nulovou koncentraci ATB. Ostatní parametry související se zpracováním vzorků Palacos® a Palacos R+G® byly stejné (tab. 12, horní dva řádky), což je dáno tím, že oba vzorky jsou založeny na stejné prepolymerizační matici.

Nejlepších baktericidních vlastností bylo dosaženo u vzorků Vancogenx®, v tom je předchozí studie i tato disertační práce ve shodě. Vzorky byly baktericidní v celém koncentračním rozsahu, i když se vyskytly určité výkyvy, které lze přičíst experimentálním chybám a/nebo nehomogennímu rozložení ATB v systému. Důvodem úspěšnosti tohoto nosiče by mohl být fakt, že vzorky s Vancogenx® tvrdly nejpomaleji, mohly být před ztuhnutím delší dobu míchány, ATB bylo ve vzorku předem rozmícháno a nejnižší viskozita systému umožňovala účinné míchání (tab. 12, třetí řádek shora). Navíc i v tomto případě byl přítomný gentamicin.

Stimulan® i nadále vykazuje poněkud rozporuplné výsledky v souvislosti s baktericidním účinkem. První dvě série vzorků mají MBC 2 mg/l (tedy jen o málo horší než Vancogenx®), ale hned další dvě série vzorků jsou pozitivní v celé řadě koncentrací. Další série mají rozptýlené výsledky. Toto lze vysvětlit nehomogenním rozložení ATB ve vzorcích. Doba míchání byla sice nejvyšší, ale ATB se muselo přimíchávat ručně a viskozita materiálu při míchání byla jen průměrná.

Kompozice TPS/PCL má specifický a unikátní způsob přípravy, a proto není možné srovnat všechny parametry přípravy s kostními cementy a síranem vápenatým. Při přípravě vzniká nejprve TPS/ATB, následně po přimíchání PCL vznikne kompletní systém TPS/PCL/ATB. Během přípravy se složky nosiče opakovaně zahřívají, nejprve dojde ke smíchání škrobu s ATB, následně probíhá plastifikace škrobu při teplotě 85 °C. Finalizace kompozice probíhá strojovým míšením taveniny TPS/ATB a PCL při teplotách přesahující 100 °C (Šlouf et al. 2017). Vliv teploty je spíše nepravděpodobný, jelikož literatura uvádí, že vankomycin je tepelně stabilní (Carli et al. 2018).

Bylo upozorováno, že baktericidní vlastnosti úzce souvisely s vlastnostmi materiálu a přípravou. Nejlepší baktericidní aktivita byla dosažena u přípravku Vancogenx®, který se snadno připravoval (díky nízké viskozitě směsi při přípravě a dostatečnému času na promíchání před ztuhnutím) a obsahoval předmíchaná ATB (tj. výrobce dodával originální prášek obsahující homogenně rozptýlená ATB). Nejhorší baktericidní aktivita byla zjištěna u přípravků Palacos® (vysoká viskozita, krátký čas na promíchání a v systému nepředmíchané ATB), Stimulan® (nízká viskozita, ale v systému nepředmíchané ATB) a TPS/PCL (v systému nepředmíchané ATB).

Oba systémy s předem namíchanými ATB (Palacos R+G® a Vancogenx®) vykazovaly lepší baktericidní účinek než další systémy bez předem namíchaných ATB (Palacos®, Stimulan® a TPS/PCL). Zdá se, že **homogenita disperze** ATB v systému může ovlivňovat baktericidní účinnost při testování *in vitro* v takto zvoleném designu experimentu. Nutné podotknout, že v klinické praxi se používá mnohem větší množství nosiče. Vkládá se celé balení nosiče s přimíchaným ATB, a tak je zaručeno, že bude ATB přítomno a bude se uvolňovat v místě infekce.

Další vliv má samotná použitá agarová metoda, jejíž **reprodukovatelnost** je ve srovnání s diluční bujonovou metodou pravděpodobně nižší v kontextu našeho experimentu. To odpovídá dostupné literatuře, protože většina studií dává přednost diluční bujonové metodě, zatímco agarová metoda se v posledních výzkumných pracích vyskytuje jen zřídka. Testování MBC může být náchylné na změnu techniky nebo podmínek testování v různých situacích (French 2006).

Materiál	Maximální doba míchání (před ztuhnutím)	Předmíchané ATB v systému	Viskozita materiálu a obtížnost míchání
Palacos®	2–3 min	Ne	Vysoká viskozita, obtížné míchání
Palacos R+G®	2–3 min	Ano	Vysoká viskozita, obtížné míchání
Vancogenx®	3–5 min	Ano	Nejnižší viskozita, nejsnazší míchání
Stimulan	> 5 min	Ne	Střední viskozita, středně obtížné míchání
TPS/PCL	–	Ne	(Strojové míchání taveniny)

Tabulka 12: Vlastnosti zkoumaných vzorků související se zpracováním, které souvisejí se snadností přípravy, homogenitou ATB ve vzorcích a konečnou kvalitou vzorku. Systém TPS/PCL má specifickou metodu přípravy, a proto nebyla určena doba míchání a viskozita/obtížnost míchání.

### 3.4.5 Hodnocení a porovnávání nosičů ATB

Spolehlivé a reprodukovatelné porovnání nosičů ATB je obtížný úkol. V zásadě existují tři možnosti: a) klinické studie, b) studie na zvířatech a c) studie *in vitro*.

U **klinických studií** je problematické porovnávat účinnost různých terapeutických přístupů v různých klinických studiích kvůli variabilitě výběru pacientů, chirurgických metod a adjuvantní antibiotické terapie (Abosala a Ali 2020; Steadman et al. 2023).

**Studie na zvířatech** nebo mikrobiologické metody *in vitro* nabízejí vyšší stupeň standardizace. Příkladem studie na zvířatech je práce Mendela a kol. (Mendel et al. 2005), která porovnávala účinek dvou systémů uvolňujících ATB (gentamicin-PMMA kuličky a gentamicin-kolagenová houba) při léčbě chronické osteomyelitidy způsobené *zlatým stafylokokem* u potkanů. Oba systémy uvolňující ATB a systémová léčba cefazolinem (cefalosporinové antibiotikum první generace) byly testovány v rámci jedné studie, aby se předešlo problémům s reprodukovatelností. Autoři dospěli k závěru, že každá z léčebných modalit vykazovala významný terapeutický účinek. Lepších výsledků bylo dosaženo u flexibilní gentamicinové houby obsahující kolagen než u rigidního gentamicin-PMMA systému. Nicméně nejlepších výsledků bylo dosaženo při kombinaci gentamicin-PMMA kuliček se systémovou léčbou cefazolinem.

**Studie *in vitro*** využívající standardizované mikrobiologické experimenty (např. diluční bujonová metoda a/nebo destičkové testy) jsou nejběžnějšími metodami pro testování nově vyvinutých nosičů ATB (Jorgensen a Ferraro 2009). Mohou pouze simulovat podmínky *in vivo*,

ale ve srovnání se studii na zvířatech nebo klinickými studii nabízejí vyšší reprodukovatelnost a nižší náklady. Díky tomu jsou vhodné pro pilotní testy. V této práci jsme zvolili dva standardní mikrobiologické testy *in vitro*: diluční bujnovou metodu a agarovou metodu, které nám umožnily charakterizovat bakteriostatické a baktericidní vlastnosti všech zkoumaných vzorků.

### 3.4.6 Doporučení pro budoucí výzkum

Porovnání homogenity disperze ATB ve zkoumaných materiálech pomocí infračervené mikrospektroskopie by mohlo poskytnout více informací pro zjištění důvodů nekonstantních výsledků agarové metody.

Dalším ověřením správnosti experimentů by mohlo být zjištění koncentrace ATB v bujónu po 24 hodinách kultivace, tedy v době, kdy se převádí inkulum z bujónu na krevní agar. Tím bychom zjistili, jaká je reální koncentrace ATB v roztoku po rozpuštění malého vzorku nosiče (peletky nebo krychličky). Vhodnou metodou by mohla být např. kapalinová chromatografie (High-Performance Liquid Chromatography, HPLC) (Slane et al. 2018).

Vhodné by bylo otestovat i vyšší koncentrace ATB, aby bylo ověřeno, jestli by větší koncentrace ATB nezvládla lépe a spolehlivě eliminovat bakterie.

### 3.4.7 Zhodnocení hypotéz

1. **Všechny použité systémy pro lokální uvolňování ATB jsou schopné uvolňovat přidané ATB, a proto by měly vykazovat antimikrobiální účinky (bakteriostatické a/nebo baktericidní).**
  - a. Všechny nosiče prokázaly významnou schopnost inhibovat růst bakterií (bakteriostatický efekt). Účinnost se lišila podle nosiče ATB, rozdíly mezi nosiči jsou závislé na koncentraci. Kromě nosiče Vancogenx® se nepodařilo prokázat spolehlivý bakteriostatický efekt.
2. **Jiné vědecké studie již prokázaly, že všechny druhy nosičů ATB, které jsou použity v experimentální části této disertační práce, mají schopnost inhibovat růst bakterií, měly by proto mít stejný nebo velmi podobný bakteriostatický efekt na růst referenčního kmene *S. aureus*. Toto tvrzení představuje nulovou hypotézu (H0). Alternativní hypotéza (H1) zní: existuje významný rozdíl v bakteriostatické účinnosti mezi různými použitými druhy nosičů ATB.**
  - a. Bakteriostatická účinnost byla prokázána u všech nosičů ATB. TPS/PCL vykazoval srovnatelnou účinnost s Vancogenx® a Stimulan®, a to už i při nižších koncentracích (1 a 2 mg/l). MIC pro TPS/PCL (1 mg/l) byla stejná jako u Vancogenx® a Stimulan®, což ukazuje na účinnou inhibici při nízkých koncentracích.

- b. Statistickou analýzou byla  $H_0$  vyvrácena a  $H_1$  byla potvrzena – testované nosiče nemají stejný bakteriostatický efekt, existuje rozdíl v inhibiční schopnosti, a to zejména v nižších koncentracích ATB. To naznačuje, že vyšší koncentrace ATB spolehlivě inhibují bakteriální růst, a proto není rozdíl tak významný.
  - c. Jeden vzorek Palacos® vykazoval nedostatečnou účinnost v experimentu i při koncentraci 64 mg/ml, to mohla být buď experimentální chyba, nebo existuje souvislost s nehomogenním promícháním ATB do PMMA během přípravy vzorku, jak bude dále diskutováno.
- 3. Všechny použité nosiče ATB jsou schopné spolehlivě eliminovat (zahubit) bakterie při použití baktericidního ATB (vankomycin).**
- a. Baktericidní účinnost nebyla spolehlivě prokázána u všech nosičů ATB. Vancogenx® vykazoval nejvyšší baktericidní aktivitu. To bylo potvrzeno statistickou analýzou pomocí chí-kvadrát testu se signifikantní p-hodnotou při několika koncentracích. Naopak TPS/PCL měl nejnižší baktericidní účinnost.
- 4. Koncentrace ATB, která je potřebná pro zahubení bakterií, je vyšší ve srovnání s koncentrací k pouhé inhibici růstu bakterií – to znamená, že z výsledků by měla být zjištěna hodnota MBC vyšší než MIC.**
- a. U většiny nosičů nebylo možné zjistit MBC, tudíž nemohlo být provedeno srovnání s MIC. Pro Vancogenx® platí, že  $MIC = MBC$  (1 mg/l). Signifikantní výsledky při nižších koncentracích naznačují, že se jedná o kritické body pro rozlišení účinnosti nosičů. Vyšší koncentrace neukázaly významné rozdíly, což naznačuje, že vysoká koncentrace ATB je nutná ke spolehlivé eliminaci bakterií.
- 5. Nový originální nosič TPS/PCL má stejný nebo velmi podobný antimikrobiální účinek jako komerčně dostupné a v praxi užívané nosiče ATB (kostní cementy a síran vápenatý).**
- a. TPS/PCL, i když účinný při inhibici růstu, vykazoval omezené baktericidní vlastnosti ve srovnání s ostatními nosiči. Chí-kvadrát test potvrdil, že jeho inhibiční účinky jsou statisticky podobné ostatním nosičům při kritických nízkých koncentracích. Tyto poznatky podporují zjištění studie a ukazují na potřebu další optimalizace nosiče TPS/PCL pro zlepšení jeho baktericidní účinnosti.

## 4 ZÁVĚR

Tato disertační práce zdůrazňuje důležitost pochopení mechanických a biologických faktorů ovlivňujících selhání kloubních náhrad. Teoretická část podrobně rozebrala problematiku aseptického selhání kloubních náhrad, které je často způsobeno opotřebením a degradací UHMWPE, a problematiku infekcí a septických komplikací, kam patří infekce kloubních náhrad. Aseptické selhání způsobené opotřebením UHMWPE a septické komplikace představují důležité výzvy v ortopedii. Zlepšení kvality polymerních materiálů a vývoj nových terapeutických přístupů, včetně použití lokálních nosičů antibiotik, jsou klíčové pro zvýšení životnosti a bezpečnosti kloubních náhrad. Další výzkum je nezbytný pro optimalizaci materiálů a metod léčby, aby bylo možné minimalizovat rizika spojená s kloubními náhradami a zlepšit kvalitu života pacientů.

Aseptické selhání kloubních náhrad je hlavní příčinou revizních operací kloubních náhrad. Tento typ selhání je způsoben opotřebením artikulačních povrchů, polyethylenovým granulomem nebo oxidativní degradací UHMWPE. Mechanické selhání může být dále ovlivněno faktory spojenými s pacientem, jako je nadměrná fyzická aktivita, obezita, imunitní reakce a polymorbidita. Technika implantace a kvalita samotného implantátu jsou také klíčovými faktory. Nesprávná orientace komponent při implantaci a nízká kvalita použitého polymeru mohou vést k předčasnému opotřebení a uvolnění náhrady.

Infekce v ortopedii, zejména infekce kloubních náhrad (IKN), představují vážnou komplikaci v ortopedické praxi. IKN jsou spojeny s vysokou morbiditou a mortalitou a vyžadují náročnou a invazivní léčbu. Rizikové faktory pro rozvoj IKN zahrnují prodloužený operační čas, přítomnost infekce v jiném orgánu během operace (infekční fokus), obezitu a diabetes mellitus. Diagnostika IKN je složitá a vyžaduje kombinaci klinických, laboratorních a zobrazovacích metod.

Biofilm, který tvoří bakterie na povrchu implantátů nebo tkání, představuje významnou překážku pro léčbu infekcí. Biofilm chrání bakterie před imunitním systémem a antibiotiky, což činí eradikaci infekce obtížnou. Terapie IKN zahrnuje kombinaci antibiotické a chirurgické léčby, přičemž chirurgické metody zahrnují debridement, výměnu komponent implantátu a někdy i odstranění celé endoprotézy. Použití lokálních nosičů antibiotik, jako je polymethylmethakrylát (PMMA) a porézní síran vápenatý, umožňuje dosažení vysokých koncentrací antibiotik přímo v místě infekce, což zvyšuje šance na úspěšnou eradikaci infekce.

Systémy pro lokální uvolňování antibiotik („nosiče ATB“) používané v ortopedii lze rozdělit podle jejich rozložitelnosti v těle na biodegradabilní a nebiodegradabilní. Nosiče ATB můžeme rozdělit do tří skupin: (i) nejběžnější nosiče ATB, kterými jsou polymethylmethakryláty (PMMA) a porézní síran vápenatý ( $\text{CaSO}_4$ ), (ii) alternativní nosiče ATB, které se používají příležitostně, a (iii) nové, biodegradabilní materiály na bázi polymerů s optimalizovanými vlastnostmi a rychlostí uvolňování ATB, které jsou předmětem současného výzkumu. Nosiče

ATB byly zkoumány v experimentální části práce. Srovnání různých nosičů ATB není jednoduché, jak bylo vysvětleno v diskusi. Proto byly v této práci použity nejvíce reprodukovatelné mikrobiologické experimenty *in vitro*.

## 4.1 Doporučení pro klinickou praxi

Experimentálně jsme porovnali bakteriostatické a baktericidní vlastnosti dvou nejběžnějších systémů uvolňujících ATB používaných v ortopedické chirurgii: (i) kostních cementů obsahujících ATB (Palacos®, Palacos R+G® a Vancogenx®) a (ii) porézního síranu vápenatého obsahujícího ATB (Stimulan®), spolu s (iii) termoplastickým kompozitem TPS/PCL, který jsme vyvinuli jako originální nosič ATB ve spolupráci s Ústavem makromolekulární chemie AV ČR. Testování bylo provedeno *in vitro* diluční bujonovou metodou a agarovou metodou pro hodnocení bakteriostatické, resp. baktericidní aktivity. Testovací vzorky z každého vzorku byly připraveny tak, aby mohly do roztoku uvolnit 11 různých koncentrací stejného ATB, tj. vankomycinu (0, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 a 512 mg/ml).

Hlavní závěry lze shrnout následovně:

1. **Všechny zkoumané nosiče ATB, tj. všechny nebiodegradabilní kostní cementy, biodegradabilní porézní síran vápenatý i TPS/PCL, vykazovaly spolehlivé bakteriostatické vlastnosti. Jedinou výjimkou byl kostní cement Palacos®, který vykazoval horší účinnost v nízkých koncentracích.**
2. **Hodnocení baktericidních vlastností přineslo výsledky rozptýlené napříč koncentrační řadou přidaného antibiotika. S přihlédnutím k limitované výpovědní hodnotě výsledků lze prohlásit, že nejlepší baktericidní účinek měl Vancogenx®.**
3. **Při hodnocení výsledků se ukázalo několik důležitých trendů, které souvisejí s vlastnostmi nosičů ATB a mohou mít potencionálně dopad na jejich účinnost. Rozptyl výsledků v případě baktericidních testů zřejmě souvisí s homogenitou disperze ATB v systémech a pravděpodobně také s nižší reprodukovatelností agarové metody.**
4. **Celá studie potvrdila, že jak dva nejběžnější komerční systémy používané v ortopedické chirurgii (kostní cementy a porézní síran vápenatý), tak experimentální systém TPS/PCL spolehlivě inhibují růst bakterií (mají bakteriostatický účinek), ale nemusí být 100% účinné při úplné eliminaci bakterií (baktericidní účinek).**



## 5 LITERATURA

ABAD, C. L. a A. HALEEM, 2018. Prosthetic Joint Infections: an Update. *Current Infectious Disease Reports* 2018 20:7 [online]. **20**(7), 1–13 [vid. 2021-10-31]. ISSN 1534-3146. Dostupné z: doi:10.1007/S11908-018-0622-0

ABOSALA, Abdulbaset a Mohammed ALI, 2020. The Use of Calcium Sulphate beads in Periprosthetic Joint Infection, a systematic review. *Journal of Bone and Joint Infection* [online]. **5**(1), 43–49 [vid. 2021-04-21]. ISSN 2206-3552. Dostupné z: doi:10.7150/jbji.41743

AOANJRR, 2019. *Australian Orthopaedic Association National Joint Replacement Registry* [online]. [vid. 2024-04-28]. Dostupné z: <https://aoanjrr.sahmri.com/annual-reports-2019>

BALOUIRI, Mounyr, Moulay SADIKI a Saad Koraichi IBNSOUDA, 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* [online]. **6**(2), 71 [vid. 2021-12-18]. ISSN 20951779. Dostupné z: doi:10.1016/J.JPHA.2015.11.005

BIOCOMPOSITES.COM, [b.r.]. *STIMULAN® Rapid Cure Beads For Bone & Joint Infection | Biocomposites* [online] [vid. 2024-05-12]. Dostupné z: <https://biocomposites.com/our-products/stimulan/>

BIRK, Stine Egebro, Anja BOISEN a Line Hagner NIELSEN, 2021. Polymeric nano- and microparticulate drug delivery systems for treatment of biofilms. *Advanced drug delivery reviews* [online]. **174**, 30–52 [vid. 2022-05-27]. ISSN 1872-8294. Dostupné z: doi:10.1016/J.ADDR.2021.04.005

BISTOLFI, Alessandro, Giuseppe MASSAZZA, Enrica VERNÉ, Alessandro MASSÈ, Davide DELEDDA, Sara FERRARIS, Marta MIOLA, Fabrizio GALETTO a Maurizio CROVA, 2011. Antibiotic-Loaded Cement in Orthopedic Surgery: A Review. *ISRN Orthopedics* [online]. **2011**, 1–8 [vid. 2024-05-11]. ISSN 2090-6161. Dostupné z: doi:10.5402/2011/290851

BUCHHOLZ, H.W. a E. ENGELBRECHT, 1970. Über die Depotwirkung einiger Antibiotika bei Vermischung mit dem Kunstharz Palacos. *Chirurgie* **41**. 511–513.

CARLI, Alberto V., Arvinth S. SETHURAMAN, Samrath J. BHIMANI, Frederick P. ROSS a Mathias P.G. BOSTROM, 2018. Selected Heat-Sensitive Antibiotics Are Not Inactivated During Polymethylmethacrylate Curing and Can Be Used in Cement Spacers for Periprosthetic Joint Infection. *Journal of Arthroplasty* [online]. **33**(6), 1930–1935 [vid. 2024-05-19]. ISSN 15328406. Dostupné z: doi:10.1016/j.arth.2018.01.034

COOPER, J. J., H. FLORANCE, J. L. MCKINNON, P. A. LAYCOCK a S. S. AIKEN, 2016. Elution profiles of tobramycin and vancomycin from high-purity calcium sulphate beads incubated in a range of simulated body fluids. *Journal of biomaterials applications* [online]. **31**(3), 357–365 [vid. 2024-05-12]. ISSN 1530-8022. Dostupné z: doi:10.1177/0885328216663392

DANIËL M C JANSSEN, JAN A P GEURTS, LIESBETH M C JÜTTEN a GEERT H I M WALENKAMP, 2016. 2-stage revision of 120 deep infected hip and knee prostheses using gentamicin-PMMA beads. *Acta orthopaedica* [online]. **87**(4), 324–332 [vid. 2021-10-31]. ISSN 1745-3682. Dostupné z: doi:10.3109/17453674.2016.1142305

DANIEL, Matej, Boris RIJAVEC, Drago DOLINAR, David POKORNÝ, Aleš IGLIČ a Veronika KRALJ-IGLIČ, 2016. Patient-specific hip geometry has greater effect on THA wear than femoral head size. *Journal of biomechanics* [online]. **49**(16), 3996–4001 [vid. 2024-04-28]. ISSN 1873-2380. Dostupné z: doi:10.1016/J.JBIOMECH.2016.10.030

DUMINIS, Tomas, Saroash SHAHID a Robert Graham HILL, 2017. Apatite glass-ceramics: A review. *Frontiers in Materials* [online]. **3**, 59 [vid. 2021-12-05]. ISSN 22968016. Dostupné z: doi:10.3389/FMATS.2016.00059/BIBTEX

EGAWA, Satoru, Keigo HIRAI, Rempei MATSUMOTO, Toshitaka YOSHII, Masato YUASA, Atsushi OKAWA, Ken SUGO a Shinichi SOTOME, 2020. Efficacy of Antibiotic-Loaded Hydroxyapatite/Collagen Composites Is Dependent on Adsorbability for Treating Staphylococcus aureus Osteomyelitis in Rats. *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society* [online]. **38**(4), 843–851 [vid. 2021-12-19]. ISSN 1554-527X. Dostupné z: doi:10.1002/JOR.24507

EL-HUSSEINY, M., S. PATEL, R. J. MACFARLANE a F. S. HADDAD, 2011. *Biodegradable antibiotic delivery systems* [online]. únor 2011. B.m.: J Bone Joint Surg Br. [vid. 2021-04-21]. ISSN 0301620X. Dostupné z: doi:10.1302/0301-620X.93B2.24933

ENE, Razvan, Mihai NICA, Dragos ENE, Adrian CURSARU a Catalin CIRSTOIU, 2021. Review of calcium-sulphate-based ceramics and synthetic bone substitutes used for antibiotic delivery in PJI and osteomyelitis treatment. *EFORT open reviews* [online]. **6**(5), 297–304 [vid. 2022-05-27]. ISSN 2058-5241. Dostupné z: doi:10.1302/2058-5241.6.200083

ESTEBAN, Jaime a Enrique GÓMEZ-BARRENA, 2021. An update about molecular biology techniques to detect orthopaedic implant-related infections. *EFORT Open Reviews* [online]. **6**(2), 93–100 [vid. 2024-04-22]. ISSN 2058-5241. Dostupné z: doi:10.1302/2058-5241.6.200118

EUROPEAN COMMISSION a DIRECTORATE-GENERAL FOR HEALTH AND CONSUMERS, 2014. *Opinion on the safety of metal-on-metal joint replacements with a particular focus on hip implants* [online]. B.m.: European Commission. ISBN 978-92-79-30135-3. Dostupné z: doi:doi/10.2772/76284

FERRANDO, Albert, Joan PART a Jose BAEZA, 2017. Treatment of Cavitary Bone Defects in Chronic Osteomyelitis: Bioactive glass S53P4 vs. Calcium Sulphate Antibiotic Beads. *Journal of Bone and Joint Infection* [online]. **2**(4), 194 [vid. 2024-05-12]. ISSN 22063552. Dostupné z: doi:10.7150/JBJI.20404

FLEITER, N., G. WALTER, H. BÖSEBECK, S. VOGT, H. BÜCHNER, W. HIRSCHBERGER a R. HOFFMANN, 2014. Clinical use and safety of a novel gentamicin-releasing resorbable bone graft substitute in the treatment of osteomyelitis/osteitis. *Bone & Joint Research* [online]. **3**(7), 223 [vid. 2021-12-19]. ISSN 20463758. Dostupné z: doi:10.1302/2046-3758.37.2000301

FLIERL, Michael A., Brian M. CULP, Kamil T. OKROJ, Bryan D. SPRINGER, Brett R. LEVINE a Craig J. DELLA VALLE, 2017. Poor Outcomes of Irrigation and Debridement in Acute Periprosthetic Joint Infection With Antibiotic-Impregnated Calcium Sulfate Beads. *The Journal of arthroplasty* [online]. **32**(8), 2505–2507 [vid. 2022-05-27]. ISSN 1532-8406. Dostupné z: doi:10.1016/J.ARTH.2017.03.051

FRENCH, Gary L., 2006. Bactericidal agents in the treatment of MRSA infections—the potential role of daptomycin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [online]. **58**(6), 1107–1117 [vid. 2021-12-18]. ISSN 0305-7453. Dostupné z: doi:10.1093/JAC/DKL393

FUJITA, Hiroshi, Hirokazu IIDA, Kazuhiro IDO, Yasutaka MATSUDA, Masanori OKA a Takashi NAKAMURA, 2000. Porous apatite-wollastonite glass-ceramic as an intramedullary plug. *Journal of Bone and Joint Surgery - Series B* [online]. **82**(4), 614–618 [vid. 2021-12-05]. ISSN 0301620X. Dostupné z: doi:10.1302/0301-620X.82B4.9739

FULÍN, Petr, 2015. *Vliv kvality artikulačních UHMWPE vložek na životnost kloubních náhrad*. Praha. I. ortopedická klinika 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Motol.

FULÍN, Petr, 2020. *Kvalita artikulačních povrchů a její vliv na proces časného selhání kloubních náhrad*. Praha. I. ortopedická klinika 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Motol.

GAJDOSOVA, Veronika, Beata STRACHOTA, Adam STRACHOTA, Danuse MICHALKOVA, Sabina KREJCIKOVA, Petr FULIN, Otakar NYC, Adam BRINEK, Marek ZEMEK a Miroslav SLOUF, 2022. Biodegradable Thermoplastic Starch/Polycaprolactone Blends with Co-Continuous Morphology Suitable for Local Release of Antibiotics. *Materials* 2022, Vol. 15, Page 1101 [online]. **15**(3), 1101 [vid. 2022-08-01]. ISSN 1996-1944. Dostupné z: doi:10.3390/MA15031101

GALLO, Jiri, Stuart B. GOODMAN, Yrjö T. KONTTINEN a Milan RASKA, 2013. Particle disease: biologic mechanisms of periprosthetic osteolysis in total hip arthroplasty. *Innate immunity* [online]. **19**(2), 213–224 [vid. 2024-04-28]. ISSN 1753-4267. Dostupné z: doi:10.1177/1753425912451779

GALLO, Jiri, Vitezslav HAVRANEK a Jana ZAPLETALOVA, 2010. Risk factors for accelerated polyethylene wear and osteolysis in ABG I total hip arthroplasty. *International Orthopaedics* [online]. **34**(1), 19 [vid. 2024-04-28]. ISSN 03412695. Dostupné z: doi:10.1007/S00264-009-0731-3

GARVIN, Kevin a Connie FESCHUK, 2005. Polylactide-polyglycolide antibiotic implants. *Clinical orthopaedics and related research* [online]. **437**(437), 105–110 [vid. 2022-05-27]. ISSN 0009-921X. Dostupné z: doi:10.1097/01.BLO.0000175720.99118.FE

GIGANTE, A., V. COPPA, M. MARINELLI, N. GIAMPAOLINI, D. FALCIONI a N. SPECCHIA, 2019. Acute osteomyelitis and septic arthritis in children: a systematic review of systematic reviews. *European review for medical and pharmacological sciences* [online]. **23**(2 Suppl), 145–158 [vid. 2024-04-28]. ISSN 2284-0729. Dostupné z: doi:10.26355/EURREV\_201904\_17484

GINEBRA, M. P., L. ALBUIXECH, E. FERNÁNDEZ-BARRAGÁN, C. APARICIO, F. J. GIL, J. SAN ROMÁN, B. VÁZQUEZ a J. A. PLANELL, 2002. Mechanical performance of acrylic bone cements containing different radiopacifying agents. *Biomaterials* [online]. **23**(8), 1873–1882 [vid. 2024-05-11]. ISSN 0142-9612. Dostupné z: doi:10.1016/S0142-9612(01)00314-3

GOGIA, Jaspaul S., John P. MEEHAN, Paul E. DI CESARE a Amir. A. JAMALI, 2009. Local antibiotic therapy in osteomyelitis. *Seminars in plastic surgery* [online]. **23**(2), 100–107 [vid. 2021-10-31]. ISSN 1536-0067. Dostupné z: doi:10.1055/S-0029-1214162

GOODMAN, S. B., P. HUIE, Y. SONG, D. SCHURMAN, W. MALONEY, S. WOOLSON a R. SIBLEY, 1998. Cellular profile and cytokine production at prosthetic interfaces. Study of tissues retrieved from revised hip and knee replacements. *The Journal of bone and joint surgery. British volume* [online]. **80**(3), 531–539 [vid. 2024-04-28]. ISSN 0301-620X. Dostupné z: doi:10.1302/0301-620X.80B3.8158

GOTO, K., Y. KURODA, T. KAWAI, S. MATSUDA a K. KAWANABE, 2019. The use of a bioactive bone cement containing apatite-wollastonite glass-ceramic filler and bisphenol-a-glycidyl methacrylate resin for acetabular fixation in total hip arthroplasty: Long-term follow-up results of a clinical trial. *Bone and Joint Journal* [online]. **101 B**(7), 787–792 [vid. 2022-08-02]. ISSN 20494408. Dostupné z: doi:10.1302/0301-620X.101B7.BJJ-2018-1391.R2

GUNATILLAKE, Pathiraja A., Raju ADHIKARI a N. GADEGAARD, 2003. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *European cells & materials* [online]. **5**, 1–16 [vid. 2024-05-12]. ISSN 1473-2262. Dostupné z: doi:10.22203/ECM.V005A01

HACH, J., M. KUBÁNEK, D. PELCLOVÁ, K. LACH a P. FULÍN, 2020. Kovový ořez s otravou kobaltem a poškozením srdce jako komplikace TEP kyčelního kloubu. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech* [online]. **87**(6), 447–451 [vid. 2024-04-28]. ISSN 00015415. Dostupné z: doi:10.55095/achot2020/069

HASEGAWA, Masahiro, Shine TONE, Yohei NAITO, Hiroki WAKABAYASHI a Akihiro SUDO, 2021. Use of antibiotic-impregnated hydroxyapatite for infection following total knee arthroplasty. *Modern rheumatology* [online]. **31**(5), 1073–1077 [vid. 2021-12-19]. ISSN 1439-7609. Dostupné z: doi:10.1080/14397595.2020.1868663

HAYES, C. S., S. D. HEINRICH, R. CRAVER a G. D. MACEWEN, 1990. Subacute osteomyelitis. *Orthopedics* [online]. **13**(3), 363–366 [vid. 2024-05-03]. ISSN 0147-7447. Dostupné z: doi:10.3928/0147-7447-19900301-18

HURYCH, Jakub a Roman ŠTÍCHA, 2021. *Lékařská mikrobiologie: repetitorium*. 2. vydání. Praha: Stanislav Juhaňák - Triton. ISBN 978-80-7553-900-7.

IFEANYI I. MOMODU a VIPUL SAVALIYA, 2023. Septic Arthritis - StatPearls - NCBI Bookshelf. *StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing* [online] [vid. 2024-04-27]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538176/>

ISMAIL, Hamisah a Hasmaliza MOHAMAD, 2021. Bioactivity and Biocompatibility Properties of Sustainable Wollastonite Bioceramics from Rice Husk Ash/Rice Straw Ash: A Review. *Materials* [online]. **14**(18) [vid. 2022-06-22]. ISSN 19961944. Dostupné z: doi:10.3390/MA14185193

JIANG, Nan, Devendra H. DUSANE, Jacob R. BROOKS, Craig P. DELURY, Sean S. AIKEN, Phillip A. LAYCOCK a Paul STOODLEY, 2021. Antibiotic loaded  $\beta$ -tricalcium phosphate/calcium sulfate for antimicrobial potency, prevention and killing efficacy of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* biofilms. *Scientific Reports* [online]. **11**(1), 1446 [vid. 2022-05-26]. ISSN 20452322. Dostupné z: doi:10.1038/S41598-020-80764-6

JORGENSEN, James H. a Mary Jane FERRARO, 2009. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* [online]. **49**(11), 1749–1755 [vid. 2022-08-01]. ISSN 1537-6591. Dostupné z: doi:10.1086/647952

KADDICK, C a H G PFAFF, 2002. Results of hip simulator testing with various wear couples. In: *Bioceramics in Joint Arthroplasty: Proceedings of the 7th International BIOLOX Symposium*. B.m.: Thieme Stuttgart, Germany, s. 20.

KALLALA, R., W. EDWIN HARRIS, M. IBRAHIM, M. DIPANE a E. MCPHERSON, 2018. Use of Stimulan absorbable calcium sulphate beads in revision lower limb arthroplasty: Safety profile and complication rates. *Bone & Joint Research* [online]. **7**(10), 570 [vid. 2022-05-27]. ISSN 20463758. Dostupné z: doi:10.1302/2046-3758.710.BJR-2017-0319.R1

KALLALA, R. a F. S. HADDAD, 2015. Hypercalcaemia following the use of antibiotic-eluting absorbable calcium sulphate beads in revision arthroplasty for infection. *The bone & joint journal* [online]. **97-B**(9), 1237–1241 [vid. 2022-05-27]. ISSN 2049-4408. Dostupné z: doi:10.1302/0301-620X.97B9.34532

KANELLAKOPOULOU, Kyriaki a Evangelos J. GIAMARELLOS-BOURBOULIS, 2000. *Carrier systems for the local delivery of antibiotics in bone infections* [online]. 2000. B.m.: Adis

International Ltd. [vid. 2021-04-21]. ISSN 00126667. Dostupné z: doi:10.2165/00003495-200059060-00003

KARACHALIOS, Theofilos a George A. KOMNOS, 2021. Management strategies for prosthetic joint infection: long-term infection control rates, overall survival rates, functional and quality of life outcomes. *EFORT Open Reviews* [online]. **6**(9), 727–734 [vid. 2024-04-22]. ISSN 2058-5241. Dostupné z: doi:10.1302/2058-5241.6.210008

KAWANABE, K., Y. OKADA, Y. MATSUSUE, H. IIDA a T. NAKAMURA, 1998. Treatment of osteomyelitis with antibiotic-soaked porous glass ceramic. *The Journal of bone and joint surgery. British volume* [online]. **80**(3), 527–530 [vid. 2022-05-27]. ISSN 0301-620X. Dostupné z: doi:10.1302/0301-620X.80B3.8576

KHATTAK, M., S. VELLATHUSSERY CHAKKALAKUMBIL, R. A. STEVENSON, D. J. BRYSON, M. J. REIDY, C. L. TALBOT a H. GEORGE, 2021. Kingella kingae septic arthritis. *The bone & joint journal* [online]. **103-B**(3), 584–588 [vid. 2024-04-20]. ISSN 2049-4408. Dostupné z: doi:10.1302/0301-620X.103B3.BJJ-2020-0800.R1

KILINÇ, Seyran, Özhan PAZARCI, Neşe KEKLIKCIOĞLU ÇAKMAK a Ayça TAŞ, 2020. Does the Addition of Poly(glycolide-co-lactide) to Teicoplanin-Containing Poly(methyl methacrylate) Beads Change the Elution Characteristics? *Indian journal of orthopaedics* [online]. **54**(Suppl 1), 71–75 [vid. 2022-05-27]. ISSN 0019-5413. Dostupné z: doi:10.1007/S43465-020-00116-4

KLUIN, Otto S., Henny C. VAN DER MEI, Henk J. BUSSCHER a Daniëlle NEUT, 2013. Biodegradable vs non-biodegradable antibiotic delivery devices in the treatment of osteomyelitis. <http://dx.doi.org/10.1517/17425247.2013.751371> [online]. **10**(3), 341–351 [vid. 2022-08-02]. ISSN 17425247. Dostupné z: doi:10.1517/17425247.2013.751371

KOWALEWSKI, Mariusz, Wojciech PAWLISZAK, Katarzyna ZABOROWSKA, Eliano Pio NAVARESE, Krzysztof Aleksander SZWED, Magdalena Ewa KOWALKOWSKA, Janusz KOWALEWSKI, Alina BORKOWSKA a Lech ANISIMOWICZ, 2015. Gentamicin-collagen sponge reduces the risk of sternal wound infections after heart surgery: Meta-analysis. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* [online]. **149**(6), 1631-1640.e6 [vid. 2022-05-27]. ISSN 1097-685X. Dostupné z: doi:10.1016/J.JTCVS.2015.01.034

KOWALSKA-KROCHMAL, Beata a Ruth DUDEK-WICHER, 2021. The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance. *Pathogens* 2021, Vol. 10, Page 165 [online]. **10**(2), 165 [vid. 2022-07-11]. ISSN 2076-0817. Dostupné z: doi:10.3390/PATHOGENS10020165

KREJČÍKOVÁ, S., A. OSTAFINSKA a M. ŠLOUF, 2018. Termoplastifikovaný škrob a jeho aplikace. *Chemické listy* [online]. **112**(8), 531–537. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/3153>

KÜHN, Klaus Dieter, Nora RENZ a Andrej TRAMPUZ, 2017. [Local antibiotic therapy]. *Der Unfallchirurg* [online]. **120**(7), 561–572 [vid. 2021-11-11]. ISSN 1433-044X. Dostupné z: doi:10.1007/S00113-017-0372-8

KURTZ, Steven M., 2015. *UHMWPE Biomaterials Handbook*. 3rd edition. London: Elsevier, William Andrew. ISBN 978-0-323-35401-1.

LANDOR, Ivan, 2012. *Revizní operace totálních náhrad kyčelního kloubu*. Praha: Maxdorf. ISBN 978-80-7345-254-4.

LARRY M BADDOUR, MD, MD ANTONIA F CHEN, MD SECTION EDITOR: SANDRA NELSON a DEPUTY EDITOR: KERI K HALL, 2024. Prosthetic joint infection: Treatment. *UpToDate* [online] [vid. 2024-04-26]. Dostupné z: [https://www.uptodate-com.ezproxy.is.cuni.cz/contents/prosthetic-joint-infection-treatment?search=Prosthetic%20joint%20infection%3A%20Treatment&source=search\\_result&selectedTitle=1%7E118&usage\\_type=default&display\\_rank=1#H30](https://www.uptodate-com.ezproxy.is.cuni.cz/contents/prosthetic-joint-infection-treatment?search=Prosthetic%20joint%20infection%3A%20Treatment&source=search_result&selectedTitle=1%7E118&usage_type=default&display_rank=1#H30)

LE VAVASSEUR, Benjamin a Valérie ZELLER, 2022. Antibiotic Therapy for Prosthetic Joint Infections: An Overview. *Antibiotics* [online]. **11**(4) [vid. 2024-04-26]. ISSN 20796382. Dostupné z: doi:10.3390/ANTIBIOTICS11040486

LETA, Tesfaye H., Stein Håkon L. LYGRE, Jan C. SCHRAMA, Geir HALLAN, Jan Erik GJERTSEN, Håvard DALE a Ove FURNES, 2019. Outcome of Revision Surgery for Infection After Total Knee Arthroplasty: Results of 3 Surgical Strategies. *JBJS reviews* [online]. **7**(6) [vid. 2021-12-18]. ISSN 2329-9185. Dostupné z: doi:10.2106/JBJS.RVW.18.00084

LEW, Prof Daniel P. a Prof Francis A. WALDVOGEL, 2004. Osteomyelitis. *Lancet (London, England)* [online]. **364**(9431), 369–379 [vid. 2022-07-11]. ISSN 1474-547X. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(04)16727-5

LIN, Bin, Yangmin HU, Ping XU, Tao XU, Chunyan CHEN, Le HE, Mi ZHOU, Zhangzhang CHEN, Chunhong ZHANG, Xuben YU, Luo FANG, Junfeng ZHU, Yanlan JI, Qun LIN, Hengbin CAO, Youqin DAI, Xiaoyan LU, Changcheng SHI, Li LI, Changjiang WANG, Xumei LI, Qiongyan FANG, Jing MIAO, Zhengyi ZHU, Guangyong LIN, Haichao ZHAN, Shiwen LV, Yalan ZHU, Xinjun CAI, Yin YING, Meng CHEN, Qiong XU, Yiwen ZHANG, Yubin XU, Pea FEDERICO, Saiping JIANG a Haibin DAI, 2022. Expert consensus statement on therapeutic drug monitoring and individualization of linezolid. *Frontiers in Public Health* [online]. **10** [vid. 2024-04-27]. ISSN 22962565. Dostupné z: doi:10.3389/FPUBH.2022.967311

LUM, Zachary C., Kyle M. NATSUHARA, Trevor J. SHELTON, Mauro GIORDANI, Gavin C. PEREIRA a John P. MEEHAN, 2018. Mortality During Total Knee Periprosthetic Joint Infection. *The Journal of arthroplasty* [online]. **33**(12), 3783–3788 [vid. 2021-12-18]. ISSN 1532-8406. Dostupné z: doi:10.1016/J.ARTH.2018.08.021

MAK, Hugo W.F., Maegan H.Y. YEUNG, Jane C.Y. WONG, Valerie CHIANG a Philip H. LI, 2022. Differences in beta-lactam and penicillin allergy: Beyond the West and focusing on Asia-Pacific. *Frontiers in Allergy* [online]. **3**, 1059321 [vid. 2024-04-26]. Dostupné z: doi:10.3389/FALGY.2022.1059321

MATHEWS, Catherine J., Vivienne C. WESTON, Adrian JONES, Max FIELD a Gerald COAKLEY, 2010. Bacterial septic arthritis in adults. *Lancet (London, England)* [online]. **375**(9717), 846–855 [vid. 2022-07-11]. ISSN 1474-547X. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(09)61595-6

MAVROS, Michael N., Pantelis K. MITSIKOSTAS, Vangelis G. ALEXIOU, George PEPPAS a Matthew E. FALAGAS, 2012. Gentamicin collagen sponges for the prevention of sternal wound infection: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* [online]. **144**(5), 1235–1240 [vid. 2022-05-27]. ISSN 1097685X. Dostupné z: doi:10.1016/j.jtcvs.2012.06.040

MCCONOUGHNEY, Stephen J., Robert P. HOWLIN, Jessica WISEMAN, Paul STOODLEY a Jason H. CALHOUN, 2015. Comparing PMMA and calcium sulfate as carriers for the local delivery of antibiotics to infected surgical sites. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials* [online]. **103**(4), 870–877 [vid. 2021-04-21]. ISSN 15524981. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.b.33247

MCNALLY, Martin, Irene SIGMUND, Andrew HOTCHEN a Ricardo SOUSA, 2023. Making the diagnosis in prosthetic joint infection: a European view. *EFORT Open Reviews* [online]. **8**(5), 253–263 [vid. 2024-04-22]. ISSN 20585241. Dostupné z: doi:10.1530/EOR-23-0044

MCNALLY, Martin, Ricardo SOUSA, Marjan WOUTHUYZEN-BAKKER, Antonia F. CHEN, Alex SORIANO, H. Charles VOGELY, Martin CLAUSS, Carlos A. HIGUERA a Rihard TREBŠE, 2020. The EBJIS definition of periprosthetic joint infection. <https://doi.org/10.1302/0301-620X.103B1.BJJ-2020-1381.R1> [online]. **103-B**(1), 18–25 [vid. 2021-10-31]. Dostupné z: doi:10.1302/0301-620X.103B1.BJJ-2020-1381.R1

MCPHERSON, E, M DIPANE, S Sherif - Reconstructive REVIEW a undefined 2013, 2013. Dissolvable antibiotic beads in treatment of periprosthetic joint infection and revision arthroplasty-the use of synthetic pure calcium sulfate (Stimulan®) impregnated. *reconstructivereview.org* [online]. [vid. 2022-05-27]. Dostupné z: <http://www.reconstructivereview.org/ojs/index.php/rr/article/view/27>

MELICHERČÍK, P., D. JAHODA, O. NYČ, E. KLAPKOVÁ, V. BARTÁK, I. LANDOR, D. POKORNÝ, T. JUDL a A. SOSNA, 2012. Bone grafts as vancomycin carriers in local therapy of resistant infections. *Folia Microbiologica* [online]. **57**(5), 459–462. ISSN 0015-5632. Dostupné z: doi:10.1007/s12223-011-0093-2



MELICHERČÍK, Pavel, 2011. *Využití lokálních nosičů antibiotik při léčbě infekcí pohybového aparátu*. 2011.

MENDEL, V., H. J. SIMANOWSKI, H. C. SCHOLZ a H. HEYMANN, 2005. Therapy with gentamicin-PMMA beads, gentamicin-collagen sponge, and cefazolin for experimental osteomyelitis due to *Staphylococcus aureus* in rats. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery* [online]. **125**(6), 363–368 [vid. 2021-04-21]. ISSN 09368051. Dostupné z: doi:10.1007/s00402-004-0774-2

MUSIL, D, M BALEJOVÁ, M HORNÍKOVÁ, A CHRDLÉ, N MALLÁTOVÁ, O NYČ, V CHMELÍK, J GALLO, D JAHODA a J STEHLÍK, 2017. Infekce endoprotéz – doporučení antibiotické léčby, Společné doporučení České společnosti pro ortopedii a traumatologii a Společnosti infekčního lékařství České lékařské společnosti J. E. Purkyně. *ACHOT* [online]. **84**(3), 219–230. ISSN 00015415. Dostupné z: <https://achot.cz/artkey/ach-201703-0012.php>

NIEMELÄ, T. a M. KELLOMÄKI, 2011. Bioactive glass and biodegradable polymer composites. *Bioactive Glasses: Materials, Properties and Applications* [online]. 227–245 [vid. 2022-08-02]. Dostupné z: doi:10.1533/9780857093318.2.227

NIZAMANI, Rabia, Stephen HEISLER, Lori CHRISCO, Harold CAMPBELL, Samuel W. JONES a Felicia N. WILLIAMS, 2020. Osteomyelitis Increases the Rate of Amputation in Patients With Type 2 Diabetes and Lower Extremity Burns. *Journal of burn care & research : official publication of the American Burn Association* [online]. **41**(5), 981–985 [vid. 2022-07-10]. ISSN 1559-0488. Dostupné z: doi:10.1093/JBCR/IRAA106

NRKN, 2024. *Národní registr kloubních náhrad*. 2024. Praha: Ministerstvo zdravotnictví České republiky.

OSTAFIŇSKA, A., J. MIKEŠOVÁ, S. KREJČÍKOVÁ, M. NEVORALOVÁ, A. ŠTURCOVÁ, A. ZHIGUNOV, D. MICHÁLKOVÁ a M. ŠLOUF, 2017. Thermoplastic starch composites with TiO<sub>2</sub> particles: Preparation, morphology, rheology and mechanical properties. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. **101**, 273–282 [vid. 2022-08-01]. ISSN 0141-8130. Dostupné z: doi:10.1016/J.IJBIOMAC.2017.03.104

PANTELI, Michalis a Peter V. GIANNOUDIS, 2016. Chronic osteomyelitis: what the surgeon needs to know. *EFORT Open Reviews* [online]. **1**(5), 128–135 [vid. 2024-04-26]. ISSN 2058-5241. Dostupné z: doi:10.1302/2058-5241.1.000017

PENNER, Murray J., Bassam A. MASRI a Clive P. DUNCAN, 1996. Elution characteristics of vancomycin and tobramycin combined in acrylic bone-cement. *The Journal of arthroplasty* [online]. **11**(8), 939–944 [vid. 2022-08-01]. ISSN 0883-5403. Dostupné z: doi:10.1016/S0883-5403(96)80135-5

PIETRZAK, William S. a Robert RONK, 2000. Calcium sulfate bone void filler: a review and a look ahead. *The Journal of craniofacial surgery* [online]. **11**(4), 327–333 [vid. 2022-05-27]. ISSN 1049-2275. Dostupné z: doi:10.1097/00001665-200011040-00009

POKORNÝ, D., M. ŠLOUF, F. VESELÝ, P. FULÍN, D. JAHODA, A. SOSNA, J. BĚLÁČEK, I. LANDOR, E. ZOLOTAREVOVÁ a S. POPELKA, 2010. Distribuce otěrových částic UHMWPE v periprotetických tkáních u TEP kyčelního kloubu. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech* [online]. **77**(2), 87–92 [vid. 2024-04-28]. ISSN 0001-5415. Dostupné z: doi:10.55095/ACHOT2010/017

PORSCH, Eric A., Kevin A. HERNANDEZ, Daniel P. MORREALE, Nina R. MONTOYA, Taylor A. YOUNT a Joseph W. ST. GEME, 2022. Pathogenic determinants of Kingella kingae disease. *Frontiers in pediatrics* [online]. **10** [vid. 2024-04-20]. ISSN 2296-2360. Dostupné z: doi:10.3389/FPED.2022.1018054

PRENDKI, V, P SERGENT, A BARRELET, E OZIOL, E BERETTI, M BERLIOZ-THIBAL, F BOUCHAND, F A DAUCHY, E FORESTIER, G GAVAZZI, C RONDE-OUSTAU, J STIRNEMANN a A DINH, 2017. Efficacy of indefinite chronic oral antimicrobial suppression for prosthetic joint infection in the elderly: a comparative study [online]. [vid. 2024-04-22]. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijid.2017.05.008

R CORE TEAM, 2024. *R: A Language and Environment for Statistical Computing* [online]. 2024. Vídeň: R Foundation for Statistical Computing. [vid. 2024-05-15]. Dostupné z: <https://www.R-project.org/>

RAPETTO, Filippo, Vito D. BRUNO, Gustavo GUIDA, Roberto MARSICO, Pierpaolo CHIVASSO a Carlo ZEBELE, 2016. Gentamicin-Impregnated Collagen Sponge: Effectiveness in Preventing Sternal Wound Infection in High-Risk Cardiac Surgery. *Drug Target Insights* [online]. **10**(Suppl 1), 9 [vid. 2021-11-14]. ISSN 11773928. Dostupné z: doi:10.4137/DTI.S39077

REINISCH, Katharina, Michel SCHLÄPPI, Christoph MEIER a Peter WAHL, 2022. Local antibiotic treatment with calcium sulfate as carrier material improves the outcome of debridement, antibiotics, and implant retention procedures for periprosthetic joint infections after hip arthroplasty - A retrospective study. *Journal of Bone and Joint Infection* [online]. **7**(1), 11–21 [vid. 2024-05-12]. ISSN 22063552. Dostupné z: doi:10.5194/JBJI-7-11-2022

RSTUDIO TEAM, 2024. *RStudio: Integrované vývojové prostředí pro R* [online]. 11. květen 2024. Boston, MA: RStudio, PBC. [vid. 2024-05-15]. Dostupné z: <https://www.rstudio.com/>

RUSZCZAK, Zbigniew a Wolfgang FRIESS, 2003. Collagen as a carrier for on-site delivery of antibacterial drugs. *Advanced drug delivery reviews* [online]. **55**(12), 1679–1698 [vid. 2021-11-14]. ISSN 0169-409X. Dostupné z: doi:10.1016/J.ADDR.2003.08.007

SANDERS, Julia a Cyril MAUFFREY, 2013. Long bone osteomyelitis in adults: Fundamental concepts and current techniques. *Orthopedics* [online]. **36**(5), 368–375 [vid. 2021-04-21]. ISSN 01477447. Dostupné z: doi:10.3928/01477447-20130426-07

SHEIKH, Zeeshan, Shariq NAJEEB, Zohaib KHURSHID, Vivek VERMA, Haroon RASHID a Michael GLOGAUER, 2015. Biodegradable Materials for Bone Repair and Tissue Engineering Applications. *Materials 2015, Vol. 8, Pages 5744-5794* [online]. **8**(9), 5744–5794 [vid. 2022-08-02]. ISSN 1996-1944. Dostupné z: doi:10.3390/MA8095273

SHEKHAWAT, Deepika, Amit SINGH, M. K. BANERJEE, Tej SINGH a Amar PATNAIK, 2021. Bioceramic composites for orthopaedic applications: A comprehensive review of mechanical, biological, and microstructural properties. *Ceramics International* [online]. **47**(3), 3013–3030 [vid. 2022-08-02]. ISSN 0272-8842. Dostupné z: doi:10.1016/J.CERAMINT.2020.09.214

SHIH, Hsin Nung, Lih Yuann SHIH a Yon Cheong WONG, 2005. Diagnosis and treatment of subacute osteomyelitis. *Journal of Trauma* [online]. **58**(1), 83–87 [vid. 2024-05-03]. ISSN 00225282. Dostupné z: doi:10.1097/01.TA.0000114065.25023.85

SHIVALI PATEL a STEPHEN SAW, 2022. Daptomycin - StatPearls - NCBI Bookshelf. *StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing* [online] [vid. 2024-04-27]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470407/>

SCHUMACHER, M., P. HABIBOVIC a S. VAN RIJT, 2021. Mesoporous bioactive glass composition effects on degradation and bioactivity. *Bioactive Materials* [online]. **6**(7), 1921–1931 [vid. 2022-08-02]. ISSN 2452-199X. Dostupné z: doi:10.1016/J.BIOACTMAT.2020.12.007

SIDDIQI, Ahmed, Salvador A. FORTE, Shgufta DOCTER, Dianne BRYANT, Neil P. SHETH a Antonia F. CHEN, 2019. Perioperative antibiotic prophylaxis in total joint arthroplasty: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Bone and Joint Surgery - American Volume* [online]. **101**(9), 828–842 [vid. 2024-04-27]. ISSN 15351386. Dostupné z: doi:10.2106/JBJS.18.00990

SLANE, Joshua, Bradley GIETMAN a Matthew SQUIRE, 2018. Antibiotic elution from acrylic bone cement loaded with high doses of tobramycin and vancomycin. *Journal of Orthopaedic Research®* [online]. **36**(4), 1078–1085 [vid. 2024-05-19]. ISSN 1554-527X. Dostupné z: doi:10.1002/JOR.23722

SLOUF, Miroslav, Jana MIKESOVA, Jaroslav FENCL, Hana STARA, Josef BALDRIAN a Zdenek HORAK, 2009. Impact of Dose-Rate on Rheology, Structure and Wear of Irradiated UHMWPE. *Journal of Macromolecular Science®* [online]. **48**(3), 587–603 [vid. 2024-04-28]. ISSN 00222348. Dostupné z: doi:10.1080/00222340902837824

SLOUF, Miroslav, Hana SYNKOVA, Josef BALDRIAN, Antonin MAREK, Jana KOVAROVA, Pavel SCHMIDT, Helmut DORSCHNER, Michael STEPHAN a Uwe GOHS, 2008. Structural changes of UHMWPE after e-beam irradiation and thermal treatment. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* [online]. **85**(1), 240–251 [vid. 2024-04-28]. ISSN 1552-4981. Dostupné z: doi:10.1002/JBM.B.30942

SOSNA, A., T. RADONSKÝ, D. POKORNÝ, D. VEIGL, Z. HORÁK a D. JAHODA, 2003. Polyetylenová choroba. *Acta Chir. Orthop. Traum. Cech* [online]. **70**(1), 6–16 [vid. 2024-04-28]. ISSN 0001-5415. Dostupné z: [http://achot.cz/artkey/ach-200301-0001\\_polyethylene-disease.php](http://achot.cz/artkey/ach-200301-0001_polyethylene-disease.php)

SOSNA, Antonín, Petr FULÍN, David POKORNÝ, Martin KRBEC a Martin VLČEK, 2024. *Základy ortopedie a traumatologie pohybového aparátu*. Praha: Triton. ISBN 978-80-7684-290-8.

STEADMAN, William, Paul R. CHAPMAN, Michael SCHUETZ, Beat SCHMUTZ, Andrej TRAMPUZ a Kevin TETSWORTH, 2023. Local Antibiotic Delivery Options in Prosthetic Joint Infection. *Antibiotics 2023, Vol. 12, Page 752* [online]. **12**(4), 752 [vid. 2024-04-26]. ISSN 2079-6382. Dostupné z: doi:10.3390/ANTIBIOTICS12040752

SVOBODA, Michal, Jiří GALLO a Miroslava MRŇKOVÁ, 2017. Antibiotika v kostním cementu. *Klinická farmakologie a farmacie* [online]. **31**(4), 18–24 [vid. 2024-05-10]. Dostupné z: [www.klinickafarmakologie.cz](http://www.klinickafarmakologie.cz)

ŠLOUF, Miroslav, Zdeněk KRULIŠ, Aleksandra OSTAFINSKA, Martina NEVORALOVÁ, Sabina KREJČÍKOVÁ, Pavel HORÁK, David POKORNÝ, David JAHODA a Petr FULÍN, 2017. Polymerní termoplastická biodegradovatelná kompozice pro výrobu vložek k léčení a prevenci lokálních infekcí a způsob její přípravy. Česká republika, CZ 307056 B6. 8. listopad 2017.

ŠTÍCHA, R., P. FULÍN, O. NYČ, V. GAJDOŠOVÁ, D. POKORNÝ a M. ŠLOUF, 2023. Antimicrobial Activity of the Most Common Antibiotic-Releasing Systems Employed in Current Orthopedic Surgery: in vitro Study. *Acta Chirurgiae Orthopaedicae et Traumatologiae Cechoslovaca* [online]. **90**(3), 188–197 [vid. 2024-05-10]. ISSN 00015415. Dostupné z: doi:10.55095/achot2023/027

TAY VIKAS, B. K.B., V. PATEL a D. S. BRADFORD, 1999. Calcium sulfate- and calcium phosphate-based bone substitutes. Mimicry of the mineral phase of bone. *The Orthopedic clinics of North America* [online]. **30**(4), 615–623 [vid. 2022-05-26]. ISSN 0030-5898. Dostupné z: doi:10.1016/S0030-5898(05)70114-0

TEO, Erin Yiling, Shin-Yeu ONG, Mark Seow KHOON CHONG, Zhiyong ZHANG, Jia LU, Shabbir MOOCHHALA, Bow HO a Swee-Hin TEOH, 2011. Polycaprolactone-based fused deposition modeled mesh for delivery of antibacterial agents to infected wounds. *Biomaterials* [online]. **32**(1), 279–287. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2010.08.089

THE EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING, 2020. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. *Version 10.0, 2020*. [online] [vid. 2022-08-02]. Dostupné z: [https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_10.0\\_\\_Breakpoint\\_Tables.pdf](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_10.0__Breakpoint_Tables.pdf)

UJCIC, Aleksandra, Sabina KREJCIKOVA, Martina NEVORALOVA, Alexander ZHIGUNOV, Jiri DYBAL, Zdenek KRULIS, Petr FULIN, Otakar NYC a Miroslav SLOUF, 2020. Thermoplastic Starch Composites With Titanium Dioxide and Vancomycin Antibiotic: Preparation, Morphology, Thermomechanical Properties, and Antimicrobial Susceptibility Testing. *Frontiers in Materials* [online]. **7**, 9 [vid. 2022-08-01]. ISSN 22968016. Dostupné z: doi:10.3389/FMATS.2020.00009/BIBTEX

VAISHYA, Raju, Mayank CHAUHAN a Abhishek VAISH, 2013. Bone cement. *Journal of Clinical Orthopaedics & Trauma* [online]. **4**(4), 157–163 [vid. 2022-08-01]. ISSN 0976-5662. Dostupné z: doi:10.1016/J.JCOT.2013.11.005

VAVŘÍK, Pavel, Ivan LANDOR, Jiří GALLO a Karel KOUDELA, 2019. *Revizní operace totálních náhrad kolenního kloubu*. Praha: Maxdorf. ISBN 978-80-7345-602-3.

WAHLIG, Helmut, 1982. Gentamicin-PMMA beads: a drug delivery system in the treatment of chronic bone and soft tissue infections. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* [online]. **10**(5), 463–465 [vid. 2021-11-14]. ISSN 0305-7453. Dostupné z: doi:10.1093/JAC/10.5.463

WANG, Jiaxing, Chen ZHU, Tao CHENG, Xiaochun PENG, Wen ZHANG, Hui QIN a Xianlong ZHANG, 2013. A systematic review and meta-analysis of antibiotic-impregnated bone cement use in primary total hip or knee arthroplasty. *PloS one* [online]. **8**(12) [vid. 2024-05-12]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0082745

WATTERS, Tyler Steven, Diana M. CARDONA, K. Sunil MENON, Emily N. VINSON, Michael P. BOLOGNESI a Leslie G. DODD, 2010. Aseptic lymphocyte-dominated vasculitis-associated lesion: a clinicopathologic review of an underrecognized cause of prosthetic failure. *American journal of clinical pathology* [online]. **134**(6), 886–893 [vid. 2024-04-28]. ISSN 1943-7722. Dostupné z: doi:10.1309/AJCPLTNEUAH8XI4W

WRIGHT, Timothy M a Stuart B GOODMAN, 2001. *Implant wear in total joint replacement: clinical and biologic issues, material and design considerations: Symposium, Oakbrook, Illinois, October 2000*. B.m.: American Academy of Orthopaedic Surgeons. ISBN 0892032618.

WU, Chengtie a Jiang CHANG, 2012. Mesoporous bioactive glasses: structure characteristics, drug/growth factor delivery and bone regeneration application. *Interface Focus* [online]. **2**(3), 292 [vid. 2022-08-02]. ISSN 20428901. Dostupné z: doi:10.1098/RSFS.2011.0121

ZHOU, Chun Hao, Ying REN, Abdalnassir ALI, Xiang Qing MENG, Hong An ZHANG, Jia FANG a Cheng He QIN, 2020. Single-stage treatment of chronic localized tibial osteomyelitis with local debridement and antibiotic-loaded calcium sulfate implantation: a retrospective study of 42 patients. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research* [online]. **15**(1) [vid. 2024-05-12]. ISSN 1749799X. Dostupné z: doi:10.1186/S13018-020-01721-7

ZIMMERLI, Werner, Andrej TRAMPUZ a Peter E. OCHSNER, 2004. Prosthetic-Joint Infections. *New England Journal of Medicine* [online]. **351**(16), 351 [vid. 2024-04-22]. ISSN 00284793. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMRA040181