

Streszczenie w języku polskim i angielskim

Zapalenie kości i szpiku o etiologii bakteryjnej, określane łacińskim mianem *osteomyelitis*, to narastający proces zapalny w obrębie tkanki kostnej. Odpowiedź organizmu na obecność drobnoustrojów oraz uszkodzenia tkanki kostnej będące efektem rozwoju biofilmu prowadzi do destrukcji macierzy kostnej oraz układu naczyniowego. Nieleczone lub nieprawidłowo leczone zapalenie kości i szpiku prowadzić może do poważnych powikłań zdrowotnych, a nawet śmierci pacjenta.

Staphylococcus aureus (gronkowiec złocisty) należy do jednych z najczęstszych czynników etiologicznych zakażeń kości. Wyniki międzynarodowych, wielośrodkowych analiz epidemiologicznych wykazały jego obecność w około 40% wszystkich infekcji kości. Gronkowiec złocisty jest w stanie wnikać pod powierzchnię kości i rozwijać się w tym obszarze unikając odpowiedzi immunologicznej. Wykazano również zdolność biofilmu gronkowca do rozkładu i żywienia się różnego rodzaju komórkami pacjenta (w tym osteoblastami). Dodatkowo wysoka oporność gronkowców złocistych na antybiotyki, szczególnie szczepów metycyliny-opornych, MRSA, znacznie ogranicza możliwe opcje terapeutyczne w leczeniu infekcji kości przez nie wywołanych. Istotną procedurą, przyspieszającą proces odbudowy kości oraz zmniejszającą ryzyko infekcji jest wprowadzenie w obręb miejsca operowanego różnego rodzaju biokompatybilnych nośników, często zawierających dodatek substancji o działaniu przeciwdrobnoustrojowym. W swojej pracy podjąłem się sprawdzenia w badaniu *in vitro* potencjalnej przydatności nośnika z bakteryjnej celulozy, poddawanego różnego typu modyfikacjom, w charakterze okładziny na powierzchnie kostne, hamującej penetrację gronkowców złocistych i tworzenie struktury biofilmu. Za pomocą zróżnicowanych technik obejmujących mikrobiologiczne metody ilościowe, półilościowe oraz wizualizację z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej oceniłem zdolność 50 szczepów gronkowca

złocistego MRSA do tworzenia biofilmu na powierzchniach płaskich i porowatych zawierających hydroksyapatyt oraz na kościach długich szczurów. Dokonałem też oceny wrażliwości tych szczepów na antybiotyki: gentamycynę, lewofloksacynę, oritawancynę (w charakterze rozbudowanych doświadczeń kontrolnych) oraz alkaloidu roślinnego chelerytryny. Uzyskane dane wskazywały na istotny wpływ zmienności wewnątrzgatunkowej oraz zastosowanych układów badawczych na analizowane parametry. Następnie podjąłem się wytworzenia nośników z bakteryjnej celulozy, ich oczyszczenia i modyfikacji polegającej na wytworzeniu w ich strukturze hydroksyapatytu i wprowadzenia wyżej wymienionych substancji przeciwdrobnoustrojowych. Uzyskane nośniki scharakteryzowałem pod kątem właściwości fizycznych, wykazując wysoką zdolność bakteryjnej celulozy do pochłaniania płynów, która częściowo zmniejszona była w nośnikach zawierających hydroksyapatyt; z kolei nośniki hydroksyapatytowe uwalniały płyn w czasie dłuższym niż nośniki niemodyfikowane. Ocena cytotoksyczności i tempa zasiedlania nośników przez komórki kościotwórcze wykazała ich wysoką biokompatybilność, przy czym najwyższą wartością tego parametru cechowały się nośniki zawierające hydroksyapatyt. Badania nad sekwestracją gronkowców w strukturze nośników, hamującą proces ich przenoszenia się na powierzchnie hydroksyapatytowe, wykazały umiarkowaną przydatność do tego celu natywnego nośnika z bakteryjnej celulozy, a najwyższą – nośnika modyfikowanego hydroksyapatytem oraz zawierającego chelerytrynę. Nośniki zawierające antybiotyk również wykazywały tę pożądaną cechę, której poziom był różny w zależności od aktywności specyficznej substancji przeciwdrobnoustrojowej. Uzyskane w mojej pracy doktorskiej wyniki wskazują na potencjalnie istotny i przydatny kierunek w rozwoju badań nad nowymi nośnikami stosowanymi w ortopedii, jakkolwiek z całą pewnością wymagają one przeprowadzenia kolejnych badań, na modelach zwierzęcych, przed pierwszymi próbami wykonanymi na pacjentach.

Osteomyelitis of bacterial etiology, referred to in Latin as *osteomyelitis*, is an increasing inflammatory process within the bone tissue. The body's response to the presence of microorganisms and damage to bone tissue resulting from the development of biofilm leads to the destruction of the bone matrix and the vascular system. Untreated or improperly treated osteomyelitis can lead to serious health complications and even death of the patient. *Staphylococcus aureus* is one of the most common etiological factors of bone infections. The results of international, multicenter epidemiological analyzes showed its presence in approximately 40% of all bone infections. *S. aureus* is able to penetrate under the surface of the bone and develop in this area, avoiding the immune response. The ability of the staphylococcal biofilm to decompose and feed on various types of patient cells (including osteoblasts) has also been demonstrated in experimental studies. In addition, the high antibiotic resistance of *S. aureus*, especially MRSA-resistant strains, significantly limits possible therapeutic options in the treatment of bone infections caused by them. An important procedure that speeds up the process of bone reconstruction and reduces the risk of infection is the introduction of various types of biocompatible carriers into the surgical site, often containing antimicrobial substances. In my experimental study, I verified the potential usefulness of a bacterial cellulose carrier subjected to various types of modifications as a lining for bone surfaces, inhibiting the penetration of staphylococci and the formation of a biofilm structure in an *in vitro* study. Using various techniques including quantitative and semi-quantitative microbiological methods and visualization using electron microscopy, I assessed the ability of 50 MRSA strains to form biofilm on flat and porous surfaces containing hydroxyapatite and on long bones of rats. I also assessed the sensitivity of these antibiotic strains: gentamicin, levofloxacin, oritavancin (as extended control experiments) and the plant alkaloid chelerythrin. The obtained data indicated a significant influence of the intra-species variability and the applied research systems on the analyzed parameters. Then I undertook the production of

bacterial cellulose carriers, their purification and modification consisting in the production of hydroxyapatite in their structure and the introduction of the previously-mentioned antimicrobial substances. I characterized the obtained carriers in terms of physical properties, demonstrating the high capacity of bacterial cellulose to absorb fluids, which was partially reduced in the carriers containing hydroxyapatite; in turn, hydroxyapatite carriers released fluid over a longer period of time than unmodified carriers. The assessment of cytotoxicity and the rate of colonization of carriers by osteogenic cells showed their high biocompatibility, with the highest value of this parameter characterized by carriers containing hydroxyapatite. Research on the sequestration of staphylococci in the structure of carriers, which inhibits the process of their transfer to hydroxyapatite surfaces, showed moderate suitability for this purpose of the native carrier made of bacterial cellulose, and the highest - the carrier modified with hydroxyapatite and containing chelerythrine. The carriers containing the antibiotic also showed the desired trait, the level of which varied depending on the activity of the specific antimicrobial substance. The results obtained in my doctoral dissertation indicate a potentially significant and useful direction in the development of research on new carriers used in orthopedics, although they certainly require further studies on animal models, before the first trials on patients.