



UNIwersytet Medyczny
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Wydział Lekarski

ROZPRAWA DOKTORSKA

Ocena przydatności matrycy biocelulozowej do
nieantybiotykowej profilaktyki zakażeń kości w
badaniach *in vitro*

Arkadiusz Janusz

Pracę wykonano w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii
Farmaceutycznej i Parazytologii

Promotor

Profesor dr hab. n. med. Marzenna Bartoszewicz

Promotor pomocniczy

dr n. med. Elżbieta Piątkowska

Wrocław 2022

Spis treści

1. Wstęp	1
1.1. Zapalenie kości i szpiku.....	1
1.2. Podział zapaleń kości i szpiku.....	2
1.3. Patogeneza zapaleń kości i szpiku.....	3
1.4. Mikrobiologia zakażeń kości ze szczególnym uwzględnieniem biofilmu gronkowca złocistego jako czynnika etiologicznego.....	6
1.5. Profilaktyka i leczenie zakażeń kości z wykorzystaniem antybiotyków oraz ich nośników.....	9
1.6. Bioceluloza bakteryjna.....	12
2. Cel pracy	15
3. Materiały i Metody	16
3.1. Wybór i charakterystyka oporności na antybiotyki szczepów gronkowca złocistego.....	16
3.2. Zastosowane substancje przeciwdrobnoustrojowe wprowadzane do nośników.....	18
3.3. Ocena zdolności szczepów gronkowca złocistego do produkcji biomasy biofilmowej na powierzchni polistyrenowej	18
3.4. Ocena zdolności szczepów gronkowca złocistego do tworzenia biofilmu oceniana metodą pomiaru aktywności metabolicznej na powierzchni polistyrenowej	20
3.5. Ocena zdolności szczepów gronkowca złocistego do tworzenia biofilmu na hydroksyapatycie i kościach udowych szczurów	21
3.6. Ocena Minimalnego Stężenia Hamującego i Minimalnego Stężenia Eradykującego Biofilm wybranych związków przeciwdrobnoustrojowych względem szczepów gronkowca złocistego	25
3.7. Wytworzenie i oczyszczenie nośnika biocelulozowego	26
3.8. Charakterystyka nośnika biocelulozowego.....	28

3.9. Synteza kompozytu biocelulozowo - hydroksyapatytowego	29
3.10. Nasączenie nośników BC wybranymi substancjami przeciwdrobnoustrojowymi i określenie wielkości stref zahamowania wzrostu gronkowca złocistego.....	30
3.11. Ocena poziomu cytotoksyczności kompozytu biocelulozowo-hydroksyapatytowego względem linii komórkowej osteoblastów in vitro.....	31
3.12. Ocena zdolności osteoblastów do zasiedlania nośników BC.....	32
3.13. Ocena zdolności nośników biocelulozowych do sekwestracji szczepów gronkowca złocistego.....	33
3.14. Wizualizacja biofilmu gronkowcowego oraz nośników z wykorzystaniem skaningowej mikroskopii elektronowej.....	34
3.15. Obliczenia statystyczne.....	36
4. Wyniki.....	36
5. Dyskusja.....	88
6. Wnioski.....	103
7. Spis tabel, zdjęć i wykresów.....	105
8. Oświadczenie dotyczące zgody Komisji Bioetycznej na przeprowadzenie badań.....	108
9. Streszczenie w języku polskim i angielskim.....	109
10. Piśmiennictwo.....	113

Podziękowania

Rodzinie - za cierpliwość i wyrozumiałość;

Pani Profesor dr hab. n. med. Marzennie Bartoszewicz – za nieocenioną pomoc, motywację i optymizm;

Pani Profesor dr hab. n. med. Annie Przondo-Mordarskiej – za obecność, mądrość i inspirujące rozmowy;

Pani Dr n. med. Elżbiecie Piątkowskiej – za pomoc, gdy jest najbardziej potrzebna;

Panu Profesorowi dr hab. n. med. Adamowi Feliksowi Junce – za nadzwyczajny wysiłek, pomoc, inspiracje;

Koleżankom i Kolegom z Oddziału Chirurgii Urazowo-Ortopedycznej Szpitala im T. Marciniaka we Wrocławiu, w szczególności Panu dr Bogusławowi Romanowiczowi – za to, że jesteśmy lekarzami i tworzymy Zespół.

1. Wstęp

1.1. Zapalenie kości i szpiku

Polskiej nazwie „zapalenie kości” odpowiada łaciński termin „ostitis” [1]. Najczęściej używana w piśmiennictwie nazwa „osteomyelitis” pojawiła się w połowie XIX wieku – w pracy Édouarda P. M. Chassaignaca z 1852 (*De l'osteomyelite*) i oznacza zapalenie kości i szpiku. Wydaje się ona właściwsza, jako że proces zapalny obejmuje wszystkie elementy tworzące kość – w tym jej warstwę korową i gąbczastą, szpik kostny i okostną. Zapalenie to wynika z zakażenia drobnoustrojami – zwykle bakteriami, znacznie rzadziej grzybami.

Zapalenie kości jest nadal jednym z najtrudniejszych problemów, z którym borykają się ortopedzi [2]. Obecnie zachorowalność i umieralność na zapalenie kości i szpiku są względnie niskie, jakkolwiek konsekwencje wystąpienia tego typu infekcji są poważne i prowadzić mogą do trwałej utraty zdrowia, a nawet śmierci pacjenta. Dzieje się tak przede wszystkim dzięki nowoczesnym metodom leczenia, w tym zastosowaniu agresywnego podejścia chirurgicznego i antybiotykoterapii. Przełom nastąpił w latach czterdziestych ubiegłego wieku i związany był z wprowadzeniem do leczenia sulfonamidów (badania Gerharda Domagka i Jacquesa Tréfouëla) oraz penicyliny (odkrycia Alexandra Fleminga, Howarda W. Florey'a oraz Ernsta B. Chaina). W jednym z przeglądów, dotyczących krwiopochodnego zapalenia kości u dzieci podano, że w ciągu 10 lat wskaźnik śmiertelności spadł z ponad 30% (w latach 1936 – 1940) do około 13% (w latach 1941 - 1945) [3]. W kolejnych dekadach obserwowano zmniejszanie się zarówno śmiertelności jak i zapadalności na krwiopochodne zapalenie kości i szpiku. Zestawienie danych za lata 1970 – 1997 z jednego ze szkockich szpitali wykazało podobny trend, to jest prawie trzykrotne zmniejszenie się zapadalności od 1970 do 1997 roku, do wartości 2,9 na 100 000 rocznie. Jest to wskaźnik porównywalny do zapadalności na bakteryjne zapalenie wsierdzia [4].

1.2 Podział zapaleń kości i szpiku

Zapalenie kości i szpiku jest jednostką chorobową o różnym obrazie klinicznym i zmiennej dynamice podczas swego przebiegu. Zaproponowano co najmniej kilkanaście klasyfikacji tego schorzenia [5], natomiast w powszechnym użyciu klinicznym są dwie:

1. Zaproponowana w 1970 roku przez Francisa A. Waldvogela uwzględnia:

- czas trwania choroby (ostre / podostre / przewlekłe);
- mechanizm powstania zakażenia (krwiopochodne / przez ciągłość);
- nieobecność / obecność niewydolności naczyniowej.

2. Najczęściej używana w praktyce klinicznej jest klasyfikacja według Geoga Cierny'ego i Jona T. Madera z 1985 roku, która bierze pod uwagę:

a) morfologię zmiany zapalnej w tkance kostnej:

- typ I – wewnątrzszpikowy (typowy dla zakażenia krwiopochodnego lub jatrogennego w wyniku zastosowania implantu wewnątrzszpikowego);
- typ II – powierzchniowy (typowy dla złamania otwartego, z raną);
- typ III – ograniczony (z pojedynczym martwakiem korowym, którego obecność lub wycięcie nie powoduje złamania kości);
- typ IV – rozlany (z zajęciem całego segmentu kości i wieloma martwakami; obecność zmian zapalnych wiąże się z powstaniem złamania lub powstają one w związku z ich chirurgicznym wycięciem).

b) stan organizmu gospodarza, co skutkuje skutecznością odpowiedzi odpornościowej gospodarza na wywołujące chorobę drobnoustroje:

- typ A – prawidłowa odporność i unaczynienie, brak schorzeń współistniejących;
- typ B – schorzenia dodatkowe, wpływające na przebieg zakażenia:

- Typ BS (ang. *systemic*) – czynniki ogólne, takie jak cukrzyca, niedożywienie, niewydolność nerek, niewydolność wątroby, upośledzenie odporności, podeszły wiek,
- Typ BL (ang. *local*) – czynniki miejscowe, takie jak: przewlekły obrzęk limfatyczny lub żylny, angiopatia, niedokrwienie, rozległe blizny, zmiany po naświetlaniach, neuropatia, nikotynizm,
- Typ C – kiedy rozważane leczenie operacyjne jest bardziej ryzykowne i okaleczające niż sama infekcja.

1.2. Patogeneza zapaleń kości i szpiku

Kość może ulec zakażeniu przez drobnoustroje na dwa podstawowe sposoby:

- drogą krwiopochodną (z innego miejsca w organizmie);
- drogą zewnątrzpochodną - przez ciągłość (z otaczających tkanek) lub drogą bezpośredniego wnikania drobnoustrojów (z zewnątrz organizmu).

Sposób powstania zakażenia ma wpływ na jego dalszy rozwój i jest zależny od predyspozycji osobniczych, związanych choćby z wiekiem czy schorzeniami współistniejącymi.

Krwiopochodne zapalenie kości jest typowe dla dzieci. Istotną rolę w jego patogenezie odgrywa specyficzne dla wieku unaczynienie kości. Mechanizm powstania choroby opisany został w klasycznej pracy Josepha Truety z 1959 roku [6]. Końcowe odgałęzienia tętnicy odżywczej to naczynia włosowate, dochodzące od strony części przynasadowej do chrząstki wzrostowej kości. Kapilary te, po zmianie kierunku, przechodzą w szersze naczynia żyłne, w których przepływ krwi jest wolniejszy. Sprzyja to osadzeniu się tam kolonii drobnoustrojów, krążących we krwi. Ognisko zakażenia umiejscawia się typowo w przynasadzie kości długiej; budowa kości i stosunkowo słabe mechanizmy obronne powodują, że w pierwszym okresie zapalenia dominują procesy martwicze.

Narastanie wysięku powoduje wzrost ciśnienia śródkostnego i nasila niedokrwienie, sprzyja także rozprzestrzenianiu się zakażenia wewnątrz kości kanałami Haversa, a w końcu również na zewnątrz - przez kanały Volkmana. Odwarstwienie okostnej wiąże się z uszkodzeniem naczyń wnikaających do kości, co nasila jej niedokrwienie. Rozwijający się ropień podokostnowy penetruje nad okostną do tkanek miękkich, tworząc z biegiem czasu przetokę. W naturalnej historii tej choroby, procesy naprawcze doprowadzają do powstania wokół ognisk zakażenia warstwy sklerotycznej i słabo ukrwionej kości, która oddziela patogenne drobnoustroje od zdrowych tkanek - co trwa zwykle kilka tygodni. Powstaje tak zwany martwak (łac. *sequestrum*). Jeśli przeważać będą procesy naprawcze – to od strony żywej kości do martwaka wniknie unaczyniona tkanka ziarninowa, spowoduje jego przebudowę i wyleczenie. Częściej jednak, przy nasilonym stanie zapalnym i przewadze procesów sklerotycznych, nie dochodzi do rewaskularyzacji martwaka, który staje się rezerwuarem drobnoustrojów i podtrzymuje zakażenie.

Trueta [6] wyróżnił trzy typy krwiopochodnego zapalenia kości, związane z wiekiem chorego i kierunkiem szerzenia się choroby – co wynika ze zmieniającego się z wiekiem unaczynienia:

- Typ I – u noworodków i niemowląt, gdzie naczynia krwionośne przechodzą z przynasady do nasady. Zapalenie może przejść na nasadę i przebić się do stawu;
- Typ II – najczęstszy, u dzieci do zakończenia wzrostu. Obecność chrząstki wzrostowej oddziela układy naczyń przynasadowych i nasadowych; zapalenie z reguły nie przechodzi na nasadę, penetrując do trzonu kości długiej;
- Typ III – występuje u dorosłych. Ze względu na połączenie układu naczyń nasadowych z przynasadowymi, zakażenie może się rozprzestrzeniać zarówno w kierunku trzonu i nasady. Typową lokalizacją krwiopochodnego zapalenia kości u dorosłych jest kręgosłup.

Nadal prowadzone są badania, które rozwijają, a równocześnie kontestują podane przez Truetę koncepcje [7].

Zewnątrzpochodne zapalenie kości spowodowane jest wnikaniem drobnoustrojów do kości przez ciągłość (z otaczających tkanek) lub bezpośrednio ze środowiska zewnętrznego. Aby mogło dojść do zakażenia, konieczne jest uszkodzenie okostnej lub chrząstki stawowej, które stanowią barierę chroniącą tkankę kostną. Jest wiele mechanizmów powstania takiej infekcji, najbardziej typowe polegają na wniknięciu drobnoustrojów ze:

- **stawu**, w którym toczy się zapalenie;
- nacieku zapalnego **tkanek miękkich** / ropnia;
- **rany urazowej** - w przypadku złamania otwartego;
- najczęstsza przyczyna jest jednak jatrogenna i związana z **zabiegami chirurgicznymi**.

Zakażenie miejsca operowanego ZMO (ang. *Surgical Site Infection, SSI*) - według definicji Centers for Disease Control and Prevention – CDC z 2017 r. [8], to zakażenie w miejscu wykonanego cięcia chirurgicznego, operowanego narządu lub jego okolicy.

Dostępna w języku polskim definicja pochodzi z 2016 r, jest to tłumaczenie dokumentu European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC)) i została opublikowana w ramach "Narodowego Programu Ochrony Antybiotyków na lata 2011-2015" [9] i dzieli ZMO na:

- Powierzchnowe zakażenie w miejscu nacięcia (SSI-S);
- Głębokie zakażenie miejsca nacięcia (SSI-D);
- Zakażenie narządu/przestrzeni (SSI-O).

1.3. Mikrobiologia zakażeń kości, ze szczególnym uwzględnieniem biofilmu gronkowca złocistego jako czynnika etiologicznego

Za infekcje kości odpowiedzialne mogą być zróżnicowane pod względem gatunkowym drobnoustroje, w tym ziarniaki Gram-dodatnie, takie jak gronkowiec złocisty *Staphylococcus aureus*, koagulazo-ujemne gronkowce (ang. CNS, coagulase-negative staphylococci) oraz paciorkowce (rodzaj *Streptococcus*), Gram-ujemne pałeczki należące do rodzajów *Pseudomonas*, *Haemophilus* i *Salmonella*, a także grzyby drożdżopodobne należące do rodzaju *Candida*. Częstość pojawiania się określonego czynnika etiologicznego zakażenia zależy od wieku pacjenta – u niemowląt najczęściej stwierdzane są infekcje wywołane przez Gram-dodatnie ziarniaki *S. aureus* oraz *S. agalactiae* oraz przez Gram-ujemną pałeczkę okrężnicy, podczas gdy u dzieci starszych głównymi czynnikami zakażeń kości jest paciorkowiec ropotwórczy i *Haemophilus influenzae* oraz ponownie – gronkowiec złocisty. Wraz z wiekiem pacjentów rośnie częstotliwość izolacji z poszczególnych typów zakażeń kości gronkowca złocistego, paciorkowca ropotwórczego, dwoinki zapalenia płuc, pałeczki okrężnicy, pałeczki ropy błękitnej czy pałeczki krwawej (*Serratia marcescens*). Rzadszymi, lecz także występującymi u osób dorosłych czynnikami zapaleń kości są również bakterie należące do rodzaju *Salmonella*, *Neisseria* oraz beztlenowych *Bacteroides* [11]. Jak można zauważyć, gronkowiec złocisty jest bakterią zdolną do wywoływania zakażeń kości, niezależnie od wieku pacjentów oraz drogi transmisji ze środowiska zewnętrznego bądź z innych obszarów ciała (pacjenta czy personelu medycznego) do kości. Wykazano między innymi, że gronkowiec złocisty odpowiedzialny jest za około 30% - 60% wszystkich przypadków septycznego zapalenia stawów i blisko 50% przypadków zakażenia endoprotezy stawu biodrowego, infekcji po złamaniu otwartym kości i zakażeń określanych mianem infekcji związanych z obecnością biomateriału (ang. Material-Related Infection) [11].

Obecność gronkowca złocistego opornego na metycylinę (ang. methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA), jako czynnika etiologicznego zapalenia kości i szpiku, przekłada się dodatkowo na podwyższone ryzyko porażki terapeutycznej. Obecnie częstotliwość występowania szczepów MRSA (w porównaniu do metycylino-wrażliwych szczepów MSSA, ang. methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*), określa się na poziomie pomiędzy 25%-50%. Jest to przede wszystkim skutek stosowania nieracjonalnej i nadmiernej antybiotykoterapii, wartość ta rośnie z każdym kolejnym rokiem [12]. Za oporność gronkowców na metycylinę (a w zasadzie na wszystkie antybiotyki β -laktamowe z wyjątkiem ceftaroliny i ceftobiprolu) odpowiedzialny jest gen *mecA*, wchodzący w skład kasety chromosomalnej (SCCmec), kodujący zmienione białko wiążące penicylinę 2a (ang. Penicillin Binding Protein 2a, PBP). Natywne białko PBP jest kluczowym enzymem, biorącym udział w procesie syntezy ściany komórkowej bakterii. Antybiotyki β -laktamowe posiadają zdolność do wiązania i inaktywacji białka PBP. Ten mechanizm nie działa w przypadku zmienionego białka, występującego u szczepów MRSA - czyli PBP 2a. Niskie powinowactwo antybiotyków β -laktamowych do białka PBP 2a przekłada się na brak hamowania jego aktywności enzymatycznej, a w związku z tym na niezakłócony przebieg procesu syntezy ściany komórkowej i utrzymanie integralności komórkowej [13]. Gronkowce złociste, wywołujące infekcje kości, różnią się pod względem profilu genetycznego od gronkowców złocistych izolowanych z innych miejsc zakażeń.

Staphylococcus aureus jest patogenem oportunistycznym, zdolnym do kontaminacji, kolonizacji oraz infekcji każdej niszy ludzkiego organizmu, mimo to u gronkowców wywołujących *osteomyelitis* zaobserwowano częstsze występowanie i wyższą ekspresję genów wchodzących w skład operonów funkcjonalnych związanych z tworzeniem biofilmu . Są to między innymi *fnbA*, *cna*, *plv* oraz przede wszystkim *icaA* [14, 15].

Wykazano również, że szczepy gronkowca złocistego MRSA, izolowane z zakażeń kości, cechują się statystycznie wyższym poziomem ekspresji genów kodujących białka związane z adhezją komórek do określonych powierzchni biotycznych, zawierających fibronektynę B, lamininę, kolagen, sialoproteinę czy elastynę [16]. Białka te wchodzi w skład szerokiego kompleksu białek powierzchniowych, odpowiedzialnych za adhezję drobnoustroju do tkanek gospodarza (ang. MSCRAMM (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules)). W innych badaniach wykazano wysoką zdolność gronkowca złocistego do adhezji do powierzchni hydroksyapatytu, mineralnego składnika kości [17, 18]. Po zajęciu procesu adhezji gronkowca do powierzchni kości następuje jej kolonizacja, która dotyczy zarówno macierzy zewnątrzkomórkowej tej tkanki, jak i komórek ją tworzących. Gronkowiec złocisty charakteryzuje się wykazaną zdolnością do wnikania zarówno w głąb struktury kostnej (poprzez zjawisko określane mianem re-modelingu) oraz do inwazji do wnętrza komórek kostnych i kościotwórczych [19, 20]. Proces ten zapewnia bakteriom ochronę przed aktywnością układu immunologicznego, jak i ogranicza możliwość penetracji antybiotyków. Należy zauważyć, że internalizacja komórek gronkowców w głębi struktury kości prowadzi do zmniejszenia ich aktywności metabolicznej i przejścia w stan tzw. „metabolicznego uśpienia”. W stanie tym obecność gronkowców przez długi czas nie prowadzi do indukcji stanu zapalnego i może być przyczyną błędnej diagnozy, stwierdzającej jałowość mikrobiologiczną w obrębie kości [21]. Po procesie adhezji i wniknięcia w głąb struktury kostnej, gronkowce złociste zaczynają tworzyć osiadłe, wielokomórkowe społeczności, określane mianem biofilmów. Zgodnie z danymi z piśmiennictwa mogą być one okryte zewnątrzkomórkową macierzą tworzoną, w zależności od warunków środowiskowych, przez wielocukry, zewnątrzkomórkowe DNA, białka, elementy komórkowe pochodzące od gospodarza, przez ich kombinację lub wszystkie te składowe jednocześnie.

Zewnątrzkomórkowa macierz jest jedną z przyczyn wysokiej tolerancji biofilmu na środki przeciwdrobnoustrojowe, szczególnie na antybiotyki, z których większość cechuje się ograniczoną zdolnością przenikania przez macierz i docierania do znajdujących się pod nią komórek patogenu [22].

1.4. Profilaktyka i leczenie zakażeń kości z wykorzystaniem antybiotyków oraz ich nośników

Dane zawarte w rekomendacjach dla ortopedów, dotyczące profilaktyki i zakażeń kości, wskazują na wysoki odsetek porażek terapeutycznych, do których dochodzi w leczeniu tego typu infekcji. Jedną z przyczyn tego stanu rzeczy są farmakokinetyczne i farmakodynamiczne ograniczenia, które sprawiają, że istotna część antybiotyków podawanych układowo nie dociera do miejsca infekcji w stężeniach zdolnych do eradykacji bakterii lub / oraz charakteryzuje się zbyt krótkim czasem półtrwania [23]. Antybiotyki podane pozajelitowo, które cechują się korzystnymi parametrami farmakokinetycznymi/farmakodynamicznymi (PK/PD) oraz pożądanym, w aspekcie leczenia czy profilaktyki zakażeń kości, spektrum aktywności, to między innymi cefalosporyny, penicyliny oraz karbapenemy. Należy zwrócić uwagę na ograniczenie możliwości wykorzystania beta-laktamów w tym celu, na skutek wzmiankowanej, narastającej częstości izolacji szczepów gronkowca złocistego opornego na metycylinę. Wciąż utrzymuje się względnie wysoka wrażliwość szczepów izolowanych z zakażeń kości na wankomycynę oraz daptomycynę. W przypadku antybiotyków podawanych drogą doustną, pożądaną skutecznością i parametrami PK/PD, względem szczepów wrażliwych, wykazują się fluorochinolony, linezolid i klindamycyna a w eradykacji pałeczek Gram-ujemnych również fosfomycyna. W przypadku szczepów gronkowca opornego na metycylinę, należy rozważyć stosowanie takich antybiotyków jak klindamycyna, wankomycyna, czy fluorochinolony: ciprofloksacyna lub lewofloksacyna.

Na skutek obserwowanego obecnie narastania oporności gronkowca na kolejne grupy antybiotyków, coraz większą uwagę poświęca się obecnie innym (nie antybiotykowym) środkom przeciwdrobnoustrojowym, mogącym znaleźć zastosowanie w walce przeciwko gronkowcowi złocistemu, a szczególnie przeciwko biofilmowi tworzonemu przez ten drobnoustrój. Przykładem takiej substancji może być chelerytryna, alkaloid z grupy benzofenantrydyny, obecna między innymi w roślinie *Chelidonium majus* (glistnik większy). Jakkolwiek obiecujące właściwości chelerytryny, jako środka przeciwdrobnoustrojowego, znane były od dziesięcioleci, to dopiero w roku 2019 wykazano, z wykorzystaniem normatywnych technik badań *in vitro*, wysoką skuteczność tego alkaloidu względem komórek gronkowca [24] i to w stężeniach niecytotoksycznych dla komórek eukariotycznych. Chelerytryna, jako inhibitor kinazy białkowej C, wykazuje szczególne właściwości bójcze względem komórek nowotworowych [25]). W badaniach przedstawiono mechanizm działania przeciwbakteryjnego chelerytryny, który opierać się ma na zdolności tego alkaloidu do uszkodzania ciągłości ścian i błon komórkowych drobnoustrojów [26].

W ostatnich latach zaobserwować można wzrost liczby badań oraz dostępnych komercyjnie nośników (ang. carriers), umożliwiających miejscowe dostarczenie wysokiego stężenia antybiotyków, bądź innych środków przeciwdrobnoustrojowych, do obszarów kości zmienionych stanem zapalnym. Idealny nośnik powinien być zdolny do inkorporacji (niezależnie od procesu chemicznego czy fizycznego za tym stojącego) jak najszerszego spektrum różnych związków przeciwdrobnoustrojowych oraz powinien charakteryzować się brakiem cytotoksyczności i wysoką biokompatybilnością. Przykładem mogą być powszechnie używane nośniki stworzone z organicznego polimeru - polimetakrylanu metylu - skoniugowanego najczęściej z antybiotykami takimi jak gentamycyna, tobramycyna, wankomycyna, klindamycyna, cefuroksym.

Zastosowanie takich kompozytów - ang. Antibiotic-loaded bone cement (ALBC) – choć powszechne – nie ma udowodnionego korzystnego działania w zmniejszaniu ryzyka infekcji przy zabiegach endoprotezoplastyki stawów [27]. Należy również zwrócić uwagę na fakt, że polimetakrylan metylu cechuje się zdolnością do koniugacji jedynie z określonymi antybiotykami i nie jest w pełni biokompatybilny.

Inny, powszechnie stosowany nośnik to gąbka kolagenowa, zawierająca antybiotyk aminoglikozydowy – gentamycynę. Produkt ten spełnia podane wyżej założenia w sposób szerszy niż nośnik z polimetakrylanu metylu, szczególnie w aspekcie braku potencjalnych oddziaływań niepożądanych względem tkanki kostnej i organizmu pacjenta. Jego wadą jest natomiast ograniczenie, polegające na możliwości zastosowania tylko jednego antybiotyku - gentamycyny [28].

Kolejnym istotnym typem nośników dla antybiotyków są hydroksyapatyty (HA), wykorzystywane najczęściej w postaci kulek lub krążków. Hydroksyapatyt jest mineralną składową kości, stąd zastosowanie jako implantu tego właśnie biomateriału, pozwala na uniknięcie reakcji niepożądanych, związanych z brakiem biozgodności oraz cytotoksycznością. Ponadto, hydroksyapatyty posiadają wysoką zdolność absorpcyjną, co umożliwia inkorporowanie do nich szerokiego spektrum antybiotyków. Ich wadą jest natomiast względnie wysoka kruchość, sypliwość oraz nieelastyczność [29]. Szczegółowy przegląd pozostałych dopuszczonych do użytku bądź badanych nośników, w tym nanożeli, polimerów syntetycznych i półsyntetycznych czy dwufazowych ceramicznych substytutów kości [30, 31] jest zadaniem zbyt obszernym i przekraczającym zakres tematyczny niniejszej pracy doktorskiej.

Można natomiast stwierdzić, że wszystkie ze stosowanych bądź znajdujących się w fazie tworzenia nośników (w zakresie przedstawionych wyników badań) cechują się określonymi niedoskonałościami - czy to w aspekcie właściwości fizycznych i chemicznych materiału, biokompatybilności bądź cytotoksyczności, czy też możliwości wysycenia ich szerokim spektrum substancji przeciwdrobnoustrojowych, albo wspomagających gojenie kości.

Dlatego też, w swojej pracy doktorskiej, zwróciłem uwagę na jeden z najbardziej obiecujących polimerów ostatnich lat – czyli bakteryjną celulozę, która, jak wynikało z piśmiennictwa przedstawiającego jej parametry funkcjonalne [32], zdawała się spełniać zdecydowaną większość wymogów stawianych „nośnikowi idealnemu”.

1.5. Bioceluloza bakteryjna

Bioceluloza bakteryjna (ang. BC, bacterial cellulose), określana także mianem bio-nano-celulozy (ang. bio-nano-cellulose, BNC), jest składnikiem macierzy biofilmowej, tworzonej przez liczne rodzaje bakterii środowiskowych, należących między innymi do rodzajów *Escherichia*, *Salmonella* czy *Klebsiella* i pełni funkcję ochronną przed takimi czynnikami zewnętrznymi jak promieniowanie UV oraz wysychanie [33]. Do aplikacji przemysłowych (w tym do wytwarzania prototypowych nośników celulozowych do celów farmaceutycznych oraz medycznych) wykorzystywana jest niemal wyłącznie celuloza produkowana przez ściśle tlenową, niepatogenną, Gram-ujemną bakterię należącą do gatunku *Komagataeibacter xylinus*, wchodzącą w skład szerokiej grupy funkcjonalnej określanej mianem bakterii kwasu octowego [34]. Przyczyną tego stanu jest skład macierzy biofilmowej *K. xylinus*, tworzonej wyłącznie z polimeru celulozowego i, w odróżnieniu od celulozy pochodzenia roślinnego, nie zawierającej również poli- oraz oligomerów, określanych w procesach przemysłowych jako „zanieczyszczenia” - czyli lignin, hemilignin, pektyn oraz hemipektyn [35].

BC jest polimerem nierozgałęzionym, zawierającym monomery β -D-glukopiranozowe, łączące się ze sobą wiązaniami β -1,4-glikozydowymi. Podstawowa jednostka celulozowa wynikła z takiego połączenia nosi nazwę celobiozy. Celulozę BC w literaturze przedmiotu często określa się mianem „nośnika” z racji jej wysokiej zdolności do absorpcji, a nawet chemisorpcji różnego rodzaju związków o charakterze odżywczym czy leczniczym [36]. Nośniki BC wytwarzane przez *K. xylinus*, w zależności od typu hodowli (statycznej bądź wykorzystującej układy mieszalnicze i aeracyjne), czasu oraz warunków hodowli, mogą przyjmować zróżnicowane postacie, począwszy od grubych, sprężystych mat, poprzez kulki celulozowe, aż po galaretowaty hydrożel. Każda z tych postaci polimeru znaleźć może i znajduje zastosowanie w różnych gałęziach przemysłu [37]. Niezależnie od formy, nośnik BC cechuje się wysoką elastycznością, wysoką odpornością na rozrywanie oraz wyjątkowo wysoką (sięgającą kilkuset procent swojej suchej masy) zdolnością do pobierania wody (lub roztworów wodnych) oraz jej stopniowego (zależnego od stopnia usieciowania i porowatości) oddawania. Struktura nośników BC określana jest mianem trójwymiarowej, fibrylarniej oraz porowatej [38]. W aspekcie zastosowań farmaceutycznych oraz medycznych nośników BC należy zwrócić uwagę na ich brak cytotoksyczności względem komórek eukariotycznych oraz bardzo wysoką biokompatybilność, a także brak działania prowadzącego do indukcji potencjału mutagennego w komórkach eukariotycznych. Natomiast w aspekcie możliwej utylizacji już wykorzystanych nośników – na fakt, że w środowisku naturalnym ulegają one całkowitej biodegradacji przez drobnoustroje (głównie grzyby, ale także bakterie wytwarzające enzym – celulazę). Także koszt uzyskania jałowych nośników BC jest relatywnie niski, ponieważ opiera się na prostym procesie usuwania komórek *K.xylinus* w procesie lizy alkalicznej i następującym po nim przemywaniu nośników BC do czasu stabilizacji pH.

W medycynie nośniki BC, w postaci mat uzyskanych w hodowli statycznej i poddanych wzmiankowanemu oczyszczeniu, znalazły zastosowanie między innymi jako opatrunki proste na rany przewlekłe [39]. Zaletą nośników BC jako opatrunków (poza elastycznością i zdolnością do kontroli poziomu wysięku) jest ich przejrzystość, a także możliwość bezbolesnej aplikacji oraz usuwania (które nie prowadzi także do pozostawiania pozostałości opatrunków w ranie).

Badania ostatnich lat wykazały możliwość wysycenia nośników BC antyseptykami i użycia ich (jako opatrunków aktywnych) do zwalczania drobnoustrojów wywołujących przede wszystkim zakażenia skóry, ran czy jamy ustnej [40, 41, 42]. Istnieją również doniesienia wskazujące na przydatność nośników BC, wysyconych substancjami o działaniu przeciwostrzajowym, w eradykacji biofilmu tworzonego przez różnego rodzaju patogeny [43]. Z kolei badania *in vitro* nad zastosowaniem nośników BC jako okładzin, służących do eradykacji drobnoustrojów z kości, bądź sekwestracji drobnoustrojów w obrębie nośnika BC, przed ich transmisją na powierzchnię tej tkanki prowadzone były do tej pory, według mojej najlepszej wiedzy, jedynie przez zespół badawczy Katedry i Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej i Parazytologii, w której przeprowadzałem doświadczenia opisane w niniejszej pracy, i miały charakter analiz wstępnych [44, 45]. Dlatego też, jako aktywny lekarz ortopeda, podjąłem się wzbogacenia wiedzy naukowej o dodatkowe informacje, związane z wyżej przedstawionym zastosowaniem nośników BC, w ramach prowadzonych przeze mnie badań *in vitro*, które posłużyć mają jako przyczynek do wykonania analiz na modelu zwierzęcym, a ostatecznie zastosowane będą (przy spełnieniu koniecznych warunków) w leczeniu pacjentów z zapaleniami kości i szpiku o różnej etiologii.

2. Cel pracy

Celem pracy jest ocena skuteczności prototypowych nośników biocelulozowych w profilaktyce zakażeń kości.

Działanie nośników opiera się na oddzielaniu (sekwestracji) drobnoustrojów i utrudnianiu ich adhezji - co ma uniemożliwić formowanie się agregatów komórek bakteryjnych i w konsekwencji może zmniejszać ryzyko powstania biofilmu oraz rozprzestrzenienia się infekcji.

Taki mechanizm działania jest odmienny od stosowanej powszechnie profilaktyki antybiotykowej. Jest to tym istotniejsze, że w związku z rozwijającą się opornością drobnoustrojów na antybiotyki, konieczne jest poszukiwanie nowych metod zapobiegania i leczenia zakażeń.

3. Materiały i Metody

3.1. Wybór i charakterystyka oporności na antybiotyki szczepów gronkowca złocistego

Do celów badawczych wybrano 49 szczepów gronkowca złocistego MRSA (ang. *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, gronkowiec złocisty oporny na metycylinę). Drobnoustroje te były czynnikami etiologicznymi potwierdzonych klinicznie infekcji kości piszczelowej, strzałkowej oraz udowej. Szczepy pochodziły z Kolekcji Szczepów Katedry i Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej i Parazytologii Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Analityki Medycznej Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. Kolejnym szczepem włączonym do badania był *Staphylococcus aureus* pochodzący z Amerykańskiej Kolekcji Szczepów Wzorcowych (ATCC 33591). Wykonanie analiz, z wykorzystaniem wyżej wzmiankowanego szczepu, miało na celu potencjalne umożliwienie porównania wyników badań uzyskanych w trakcie realizacji niniejszej pracy doktorskiej przez inne zespoły zajmujące się zblizoną tematyką badawczą.

Profil antybiotykooporności badanych szczepów określony został z wykorzystaniem:

- a) Metody Kirby-Bauera, określanej mianem **metody dyfuzyjno-krażkowej**. Do jej przeprowadzenia wykorzystano, zgodnie z zaleceniami EUCAST (Europejski Komitet Do Spraw Określania Wrażliwości Drobnoustrojów), dziewięć antybiotyków (Becton Dickinson, Niemcy):
- cefoksytyna 30 µg/ml,
 - erytromycyna 15 µg/ml,
 - gentamycyna 10 µg/ml,

- klindamycyna 2 $\mu\text{g/ml}$,
- kotrimoksazol (trimetoprim 1,25 $\mu\text{g/ml}$ + sulfametoksazol 23,75 $\mu\text{g/ml}$),
- lewofloksacyna 5 $\mu\text{g/ml}$,
- linezolid 10 $\mu\text{g/ml}$,
- tetracyklina 30 $\mu\text{g/ml}$,
- tigecyklina 15 $\mu\text{g/ml}$.

Na podłoże agarowe Mueller-Hinton nanoszono zawiesinę drobnoustrojów o uprzednio oznaczonej gęstości, wynoszącej 0,5 w skali McFarlanda. (zawiesinę rozprowadzano z wykorzystaniem jałowej wymazówki w trzech kierunkach (na trzy płytki) a następnie nakładano krążki zawierające antybiotyki: gentamycynę, erytromycynę, klindamycynę, linezolid oraz tigecyklinę; pomiędzy erytromycyną a klindamycyną zachowano odległość wynoszącą 20 mm. Na drugą płytkę z podłożem Mueller-Hinton nanoszono krążki zawierające cefoksytynę, kotrimoksazol, lewofloksacynę oraz tetracyklinę. Płytki wraz z antybiotykami poddawano 18-godzinnej inkubacji w temperaturze 35°C. Po zakończeniu inkubacji, z wykorzystaniem linijki, odczytywano średnicę strefy zahamowania wzrostu wokół krążków zawierających antybiotyki i za pomocą tabeli EUCAST, wskazującej oporność/wrażliwość drobnoustrojów na dany antybiotyk, określano przynależność badanych szczepów do grupy „wrażliwych” bądź „opornych”.

b) **metody gradientowo-dyfuzyjnej**, z użyciem pasków zawierających antybiotyków o zmieniającym się stężeniu, z wykorzystaniem:

- teikoplaniny (Liofilchem) w zakresach stężeń: 0,016-256 $\mu\text{g/ml}$,
- wankomycyny (Biomerieux) w zakresach stężeń: 0,016-256 $\mu\text{g/ml}$,

Na podłoże agarowe Mueller-Hinton наносzono zawiesinę drobnoustrojów o uprzednio oznaczonej gęstości wynoszącej 0,5 w skali McFarlanda. Zawiesinę rozprowadzano z wykorzystaniem jałowej wymazówki, w trzech kierunkach (na trzy płytki) a następnie paski nitrocelulozowe, zawierające gradientowo rosnące stężenie antybiotyku (wankomycyny lub teikoplaniny). Paski gradientowe наносzono na płytkę równolegle; cały układ badawczy poddawano inkubacji w temperaturze 35°C przez 24 godziny. Z wykorzystaniem oznaczeń stężeń antybiotyków na pasku gradientowym odczytywano wartość Minimalnego Stężenia Hamującego (ang. MIC, Minimum Inhibitory Concentration) analizowanych antybiotyków względem badanych szczepów. Następnie, za pomocą tabeli EUCAST wskazującej oporność/wrażliwość drobnoustrojów na dany antybiotyk, określano przynależność badanych szczepów do grupy „wrażliwych” bądź „opornych”.

3.2. Zastosowane substancje przeciwdrobnoustrojowe wprowadzane do nośników

Związkami przeciwdrobnoustrojowymi, wprowadzanymi do nośników BC, były: siarczan gentamycyny (Pol-Aura, Polska); lewofloksacyna - roztwór do infuzji 5 mg/ml (Fresenius Kabi, Polska), dwuchlorek oritawancyny (Sigma, Niemcy), chlorek chelerytryny (Sigma, Niemcy).

3.3. Ocena zdolności szczepów gronkowca złocistego do produkcji biomasy biofilmowej na powierzchni polistyrenowej

Analizę przeprowadzono z wykorzystaniem płytek polistyrenowych z 96 sudzienkami. Z 24-godzinnej hodowli szczepów gronkowca w podłożu płynnym Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM (Gibco, USA), w atmosferze zawierającej 5% CO₂ (inkubator Binder VWR, Polska), sporządzano odpowiednie zawiesiny bakterii o gęstości 0,5 w skali McFarlanda (MF), które następnie poddawano 1000-krotnemu rozcieńczeniu w DMEM.

Tak uzyskane zawiesiny wprowadzano do sześciu studzienek płytki (co stanowiło 6 powtórzeń technicznych, ang. „technical repeats”). Płytkę z zawiesinami poddawano 24-godzinnej inkubacji w temperaturze 37°C; następnie zawiesinę odciągano z wykorzystaniem pipety automatycznej, a studzienki trzykrotnie płukano roztworem jałowej soli fizjologicznej. Po przepłukaniu studzienki poddawano 10-minutowemu suszeniu w temperaturze 37°C. W celu wybarwienia biomasy biofilmowej do studzienek wprowadzano po 100 µl fioletu krystalicznego (POCH, Polska) i inkubowano kolejne 10 minut w temperaturze pokojowej. Po tym czasie roztwór fioletu krystalicznego usuwano z wykorzystaniem pipety automatycznej, a studzienki dwukrotnie płukano 0,9% roztworem chlorku sodu i poddawano suszeniu (10 minut/ 37°C). W celu ekstrakcji fioletu krystalicznego, do studzienek wprowadzano po 100 µl 99% etanolu (POCH, Polska), a całą płytkę poddawano wytrząsaniu na wytrząsarce IKA (Schuttler MTS-4, Niemcy) z częstością 450 rpm w czasie 15 minut. Roztwór przenoszono do nowej płytki 96-studzienkowej i z wykorzystaniem aparatu spektrofotometrycznego (MultiScan Go, Thermo Scientific) odczytywano poziom absorbancji roztworów przy długości fali 580 nm. Wyniki absorbancji, uzyskane dla układu badawczego, w którym nie hodowano biofilmu, a wykonano wszystkie procedury barwienia, płukania i ekstrakcji, przyjęto jako odniesienie kontrolne. Badanie przeprowadzono w 3 niezależnych eksperymentach, z których każdy składał się z 6 powtórzeń technicznych).

3.4. Ocena zdolności szczepów gronkowca złocistego do tworzenia biofilmu, oceniana metodą pomiaru aktywności metabolicznej na powierzchni polistyrenowej

Analizę przeprowadzono z wykorzystaniem 96-studzienkowych płytek polistyrenowych. Z 24-godzinnej hodowli szczepów gronkowca w podłożu płynnym DMEM, w atmosferze zawierającej 5% CO₂ (inkubator Binder VWR, Polska) sporządzano odpowiednie zawiesiny bakterii o gęstości 0,5 MF w DMEM, które następnie poddawano 1000-krotnemu rozcieńczeniu w DMEM. Tak uzyskane zawiesiny wprowadzano do sześciu studzienek płytki (6 powtórzeń technicznych „technical repeats”). Płytkę z zawiesinami poddawano 24-godzinnej inkubacji w temperaturze 37°C. Następnie zawiesinę odciągano z wykorzystaniem pipety automatycznej, a studzienki trzykrotnie płukano roztworem jałowej soli fizjologicznej. Następnie do każdej ze studzienek wprowadzano po 100 µl 0,1% wodnego roztworu chlorku tetrazoliowego (TTC, Sigma-Aldrich, Niemcy) i poddawano inkubacji przez 2 godziny w temperaturze 37°C. Roztwór TTC usuwano z wykorzystaniem pipety automatycznej, a następnie studzienki przemywano trzykrotnie roztworem jałowej soli fizjologicznej. W kolejnym etapie do studzienek wprowadzano 100 µl metanolu (POCH, Polska). Płytkę poddawano wytrząsaniu mechanicznemu z wykorzystaniem urządzenia IKA (Schuttler MTS-4, Niemcy) przy częstotliwości wytrząsania 400 rpm, przez czas wynoszący 5 minut, w temperaturze pokojowej. Roztwór przeniesiono do nowej płytki 96-dołkowej i z wykorzystaniem aparatu spektrofotometrycznego (MultiScan Go, Thermo Scientific) odczytywano poziom absorbancji roztworów przy długości fali 490 nm. Wyniki absorbancji uzyskane dla układu badawczego, w którym nie hodowano biofilmu, a wykonano wszystkie procedury barwienia, płukania i ekstrakcji, przyjęto jako odniesienie kontrolne. Badanie przeprowadzono w 3 niezależnych eksperymentach, z których każdy składał się z 6 powtórzeń technicznych.

3.5. Ocena zdolności szczepów gronkowca złocistego do tworzenia biofilmu na hydroksyapatycie i kościach udowych szczurów

W celu określenia zdolności szczepów gronkowca złocistego do utworzenia biofilmu na hydroksyapatycie zastosowano dwie postaci tego związku mineralnego:

a) proszek hydroksyapatytowy [HAp, ang. „HA powder”] o oznaczeniu MT3300 dostępny komercyjnie (Low-Wet; Tomita Pharmaceutical, Tokyo, Japan), którego średnica cząstek wahała się między 50 a 200 μm . Do próbki zawierającej 0,5 g HAp wprowadzono 5 ml zawiesiny badanego szczepu *Staphylococcus aureus*, uzyskując końcowe stężenie bakterii wynoszące 10^5 CFU/ml oraz stężenie HAp wynoszące 10 mg/ml. Do próbki zawierającej zawiesinę drobnoustroju oraz HAp wprowadzono mieszadło magnetyczne i umieszczono na mieszalniku o ustawionej prędkości wynoszącej 100 obrotów na minutę. Układ badawczy inkubowano w temperaturze 37°C przez 24h w atmosferze wzbogaconej 5% CO_2 . Po upływie 24 godzin, mieszadło usuwano z próbki w komorze laminarnej z zachowaniem zasad antyseptyki a materiał HAp, w celu jego oddzielenia od supernatantu, poddano wirowaniu przy prędkości obrotowej wynoszącej 3500 rpm, przez 5 minut (wirówka Zettigen 32, Niemcy). Do uzyskanego osadu HAp wprowadzono 5 ml 0,1% saponiny (POCH, Polska) i poddawano wytrząsaniu na mechanicznej wytrząsarce przez okres 2 minut w celu oddzielenia biofilmu od powierzchni hydroksyapatytu i rozbicia agregatów komórkowych. Po zakończeniu wytrząsania próbkę pozostawiono w temperaturze pokojowej przez okres wynoszący 1 minutę w celu sedymentacji cząsteczek HAp i oddzielenia ich od komórek gronkowca złocistego, które pozostały w supernatancie. Po upływie wyżej wzmiankowanego czasu, w celu oszacowania liczby komórek gronkowca złocistego, wykonywano seryjne rozcieńczenia supernatantu w soli fizjologicznej, a następnie 100 μl każdego rozcieńczenia wysiewano ilościowo na płytki agarowe Columbia Agar, które poddawano inkubacji przez okres 24 godzin w temperaturze 37°C .

Następnie zliczano wyrosłe kolonie, ich liczbę pomnożono przez wartość rozcieńczenia, określając liczbę komórek gronkowca złocistego tworzących kolonie. Badanie przeprowadzono w 3 niezależnych czasowo eksperymentach.

b) krążki hydroksyapatytowe (HAd, ang. Hydroxyapatite disks) zostały wytłoczone z proszku hydroksyapatytowego HAp przez Panią Doktor Habilitowaną Patrycję Szymczyk z Wydziału Mechanicznego Politechniki Wrocławskiej. Krążki zostały wytłoczone w kształcie walca, którego średnica oraz wysokość wynosiły 5 mm. Krążki cechowały się czystością ponad 95%; wzory rozkładów dyfrakcji rentgenowskiej spełniały wymagania stawiane tego typu materiałom zgodnie ze standardem 0-432 opracowanym przez Joint Committee on Powder Diffraction (International Centre for Diffraction Data, Newtown Square, PA); zawartość śladowa metali ciężkich wynosiła mniej niż 40 ppm, spełniając wymogi standardu F1185-88 ASTM (ASTM International, West Conshohocken, PA).

Z wykorzystaniem densytometru przygotowywano zawiesinę gronkowców o gęstości 0,5 MF w pożywce DMEM (bez antybiotyków), którą poddawano 1000-krotnemu rozcieńczeniu, również w pożywce DMEM. Następnie, 1 ml tak przygotowanej zawiesiny wprowadzono do studzienek płytki 24-dółkowej, zawierającej HAd. Układ badawczy poddawano inkubacji przez 24h, w temperaturze 37°C, w atmosferze wzbogaconej dodatkiem 5% CO₂. Następnie, w celu usunięcia komórek niezwiązanych (planktonicznych), krążki zawierające biofilm płukano ostrożnie solą fizjologiczną i wprowadzono do 1 ml 0,1% detergentu saponiny (Sigma, Niemcy). Próbkę poddawano wytrząsaniu mechanicznemu przez 1 minutę z wykorzystaniem wytrząsarki Schuttler (Niemcy) w celu oderwania biofilmu od krążka oraz rozbicia agregatów wielokomórkowych gronkowca. W kolejnym etapie procedury, 0,1 ml supernatantu, zawierającego uwolnione z biofilmu komórki gronkowca, wprowadzono do 0,9 ml jałowej soli fizjologicznej i wykonywano szereg rozcieńczeń, z których wykonywano posiewy ilościowe na podłoża stałe Columbia Agar.

Płytki z rozproszoną zawiesiną zawierającą gronkowca poddawano inkubacji przez kolejne 24h, w temperaturze 37°C, w warunkach tlenowych. Następnie zliczano wyrosłe kolonie, ich liczbę mnożono przez wartość rozcieńczenia, w celu oszacowania liczby komórek gronkowca złocistego tworzących kolonie. Kontrolę ujemną doświadczenia (brak wzrostu) stanowiły wysterylizowane kości inkubowane w jałowej pożywce. Badanie przeprowadzono w 3 niezależnych czasowo eksperymentach.

c) kości udowe szczurów. Materiał ten uzyskany został *post mortem* z 3 miesięcznych szczurzyk, należących do rasy Wistar, które służyły jako zwierzęta doświadczalne w innym projekcie, realizowanym przez Panią Profesor Bil-Lulę z Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Analityki Medycznej Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. Projekt ten uzyskał zgodę Komitetu Etyki, Komisji do spraw Badań nad Zwierzętami przy Instytucie Immunologii i Terapii Eksperymentalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu na wykonanie badań (protokół zgody #34/2014). W celu oddzielenia skóry i tkanek miękkich od kości udowych, wykorzystano metodę mechaniczną i techniki chirurgiczne. Tak uzyskane kości poddawano sterylizacji powierzchniowej, wykorzystując znajdujący się w komorze laminarnej generator światła UV. Przed sterylizacją waga kości została zmierzona na wadze analitycznej; obliczono jej średnią oraz medianę. W badaniach wykorzystano ten materiał, którego waga znajdowała się w przedziale około 110% do 90% uzyskanej mediany. W celu określenia jałowości materiału i efektywności sterylizacji powierzchniowej, 15% kości poddano badaniu jałowości mikrobiologicznej według metody farmakopealnej. Materiał wprowadzono do jałowych pożywek płynnych BHI (ang. Brain-Heart Infusion media, Pol-Aura, Polska) lub TG (tioglikolan, Pol-Aura, Polska) i poddano inkubacji przez okres 168 godzin w atmosferze tlenowej oraz beztlenowej. Brak zmętnienia pożywki płynnej potwierdzał brak czynnika kontaminującego.

Określenie zdolności drobnoustrojów do tworzenia biofilmu na kościach udowych szczurów, opierało się na wprowadzeniu do poszczególnych 6 studzienek płytki (VWR, Polska) materiału badanego oraz 5 ml zawiesiny gronkowca złocistego o gęstości 10^5 CFU/ml w pożywce DMEM. Układ badawczy poddawano inkubacji przez 24 godziny, w temperaturze 37°C i w atmosferze wzbogaconej dodatkiem 5% CO_2 . Następnie krążki zawierające biofilm płukano ostrożnie solą fizjologiczną, w celu usunięcia komórek niezwiązanych (planktonicznych) i wprowadzano do 1 ml 0,1% detergentu saponiny (Sigma-Aldrich, Niemcy). Próbkę poddano 1-minutowemu wytrząsaniu mechanicznemu z wykorzystaniem wytrząsarki Schuttler (Niemcy) w celu oderwania biofilmu od krążka oraz rozbicia agregatów wielokomórkowych gronkowca. W kolejnym etapie procedury, 0,1 ml supernatantu, zawierającego uwolnione z biofilmu komórki gronkowca, wprowadzano do 0,9 ml jałowej soli fizjologicznej i wykonywano szereg rozcieńczeń, które wysiewano ilościowo na podłoża stałe Columbia Agar. Płytki z rozprowadzoną zawiesiną zawierającą gronkowca poddawano inkubacji przez kolejne 24h, w temperaturze 37°C , w warunkach tlenowych. Następnie zliczano wyrosłe kolonie, ich liczbę mnożono przez wartość rozcieńczenia w celu oszacowania liczby komórek gronkowca złocistego tworzących kolonie. Kontrolę ujemną doświadczenia (brak wzrostu) stanowiły wysterylizowane kości inkubowane w jałowej pożywce. Badanie przeprowadzono w 3 niezależnych czasowo eksperymentach.

3.6. Ocena Minimalnego Stężenia Hamującego i Minimalnego Stężenia Eradykującego Biofilm wybranych związków przeciwdrobnoustrojowych względem szczepów gronkowca złocistego

Do celów badania wykorzystano 96-studzienkowe płytki polistyrenowe. W przypadku oceny wartości MIC (względem form planktonicznych bakterii) z 24-godzinnej hodowli w podłożu płynnym przygotowano zawiesinę gronkowca złocistego o gęstości densytometrycznej wynoszącej 0,5 w skali McFarlanda, którą poddano następnie 1000-krotnemu rozcieńczeniu w pożywce DMEM bez dodatku antybiotyków. W przypadku oceny wartości MBEC (względem biofilmu bakterii), zawiesinę przygotowaną w sposób analogiczny do zawiesiny zawierającej plankton, poddawano 24-godzinnej inkubacji w studzienkach płytki 96-dołkowej. Następnie medium usuwano, pozostawiając przylegający do dna studzienek biofilm bakteryjny. Do wszystkich dołków wprowadzano po 100 μ l jałowej pożywki DMEM. Badane środki przeciwdrobnoustrojowe o stężeniu wyjściowym 1 mg/L wprowadzono do studzienek płytki i wykonywano ich seryjne rozcieńczenia, uzyskując finalnie stężenia w zakresie od 250 μ g/ml do 0.5 μ g/ml. Studzienka nr 11 płytki stanowiła kontrolę jałowości badania i zawierała jedynie jałową pożywkę DMEM, natomiast studzienka nr 12 służyła jako kontrola zdolności drobnoustrojów do wzrostu w zastosowanym układzie eksperymentalnym. Studzienka 12 zawierała drobnoustroje (w formie planktonicznej bądź biofilm) oraz pożywkę płynną DMEM nie zawierającą badanych środków przeciwdrobnoustrojowych. Układ badawczy poddano inkubacji przez 24 godzin w temperaturze 37°C i w atmosferze wzbogaconej 5% CO₂. Następnie, dodawano do dołków 50 μ l 0,5% chlorku 2,3,5-trifenylo-tetrazoliowego (TTC) i poddawano kolejnej, 2-godzinnej inkubacji w temperaturze 37°C, w warunkach tlenowych. Redukcja bezbarwnego TTC do czerwonego formazanu oznaczała obecność żywych oraz aktywnych metabolicznie komórek bakterii.

Stężenie substancji przeciwdrobnoustrojowej w pierwszej bezbarwnej studziencie, sąsiadującej ze studzienką, w której doszło do zmiany zabarwienia na czerwone, przyjmowano jako MIC/MBEC, w zależności od typu analizy. Jeżeli nie wykryto zmiany zabarwienia w dołku płytki (przy zachowaniu prawidłowych odczytów kontrolnych – obecność koloru czerwonego w kontroli zdolności do wzrostu i brak zmiany zabarwienia w studziencie zawierającej jałowe medium) badanie powtarzano tworząc kolejny szereg rozcieńczeń aż do wykrycia wartości MIC/MBEC. Badanie wykonano w 3 niezależnych czasowo eksperymentach.

3.7. Wytworzenie i oczyszczenie nośnika biocelulozowego

W celu hodowli szczepu *Komagateibacter xylinus* z kolekcji ATCC o numerze 53524 wykorzystano płynną pożywkę Hestrina-Shramma [H-S], zawierającą w swoim składzie:

- 2 % glukozę (POCH, Polska),
- 0,5% baktopenonu (Graso Biotech, Polska),
- 0,5% ekstraktu drożdżowego (Graso Biotech, Polska),
- 0,27% wodorofosforanu sodu (Chempur, Polska),
- 0,115% kwasu cytrynowego (Pol-Aura),
- 0,05% heptahydratu siarczanu magnezu (Stanlab),
- 1% etanolu (POCH Polska).

Szczep *K. xylinus* wprowadzano do podłoża płynnego HS z głębokiego zamrożenia wynoszącego -80°C i poddawano inkubacji w temperaturze 28°C przez 7 dni, do czasu wytworzenia stabilnej maty celulozowej (BC, ang. bacterial cellulose). Następnie, w celu uzyskania świeżego inoculum o wyższej gęstości BC, zawierające komórki *K. xylinus* wprowadzano do jałowej zlewki wypełnionej 0,1 M buforem cytrynianowym o pH wynoszącym 4,8 oraz enzymem celulazę.

Nośniki BC poddawano następnie inkubacji w temperaturze optymalnej dla aktywności enzymu wynoszącej 37°C w łaźni wodnej do czasu pełnego rozpuszczenia nośnika BC. Otrzymaną, rozpuszczoną zawiesinę zawierającą komórki drobnoustroju oraz glukozę, poddawano wirowaniu przez okres 15 minut przy prędkości wynoszącej 5000 rpm z wykorzystaniem wirówki Schuttigen 96 (Schuttigen, Niemcy). Po zakończeniu wirowania supernatant usuwano a uzyskany na dnie naczynia osad przepłukiwano dwukrotnie 0,9 % NaCl, uprzednio poddając mieszaninę wytrząsaniu mechanicznemu. Uzyskany osad bakteryjny wprowadzano do jałowego medium HS, poddawano wytrząsaniu przez 1 minutę, a 2 ml mieszaniny wprowadzano do polistyrenowych płytek 24-dołkowych o średnicy studzienek wynoszącej 15 mm. Następnie, mieszaninę zawierającą komórki *K. xylinus* poddawano inkubacji w temperaturze 28°C przez 7 dni aż do wytworzenia stabilnego nośnika BC. W celu usunięcia komórek, nośnik BC wprowadzano do 0,1 M roztworu NaOH i poddawano inkubacji w łaźni wodnej, w temperaturze 80°C. Następnie, nośniki BC oczyszczano poprzez wielokrotne przemywanie jałową wodą aż do ustabilizowania się pH na poziomie 7.0. Wartość pH oznaczano za pomocą indykatora paskowego.

3.8. Charakterystyka nośnika biocelulozowego

- a) **waga celulozy.** Po oczyszczeniu wagę celulozy mokrej i suchej po mierzono z wykorzystaniem wagi analitycznej PA Pioneer OHAUS PA114C/1. Proces suszenia celulozy polegał na umieszczeniu celulozy mokrej w suszarce Binder AP o ustalonej temperaturze 60°C. Badania wykonano w 6 powtórzeniach technicznych, w 3 niezależnych pomiarach eksperymentalnych.
- b) **procentowy poziom szybkości pochłaniania wody przez celulozę.** Fragment nośnika BC wprowadzono w sposób aseptyczny do wody destylowanej, w temperaturze pokojowej na czas wynoszący 1 minutę. Następnie nośnik wyjmowano, delikatnie zebierano nadmiar wody z wykorzystaniem bibuły filtracyjnej oraz poddawano zważeniu. Następnie nośnik wprowadzano ponownie do wody destylowanej i poddawano ważeniu. Czynności te kontynuowano do momentu braku przyrostu wagi. Proces nasączenia nośnika BC wodą oraz ważenia przeprowadzono w 6 powtórzeniach. Uzyskane wyniki przedstawiono z wykorzystaniem wzoru na procentowy poziom szybkości pochłaniania wody przez celulozę [% SR, ang. Swelling Rate]: **$\% \text{ SR} = \frac{(\text{mokra masa próbki celulozy} - \text{sucha masa próbki celulozy})}{\text{sucha masa próbki celulozy}} \times 100\%$** .
- c) **zdolność do utrzymania wody przez nośnik celulozowy BC**

Jałowe (poddane uprzedniemu procesowi oczyszczania z komórek) nośniki celulozowe zanurzano w wodzie destylowanej na okres wynoszący 24h. Celem tego działania było uzyskanie maksymalnej absorpcji cieczy przez nośnik BC. Następnie BC wyjęto z naczynia, poddawano ostrożnemu osuszeniu z nadmiaru cieczy i ważono na wadze analitycznej PA Pioneer OHAUS PA114C/1.

Po wstępnym osuszeniu, nośnik BC pozostawiano na okres 300 min. w temperaturze wynoszącej 60°C i poddawano ponownemu zważeniu. W celu określenia zdolności utrzymania wody przez nośnik BC wykorzystano następujący wzór:

Zdolność do utrzymania wody przez nośnik [% WHC, ang. water-holding capacity] = $(W_m - W_p) / W_s * 100\%$;

Gdzie:

W_m - waga mokrej celulozy;

W_p – waga celulozy suszonej przez 300 minut / 60°C;

W_s – waga całkowicie wysuszonej celulozy.

3.9. Synteza kompozytu biocelulozowo- hydroksyapatytowego [BC-HA]

Kompozyt HA-BC stworzono poprzez wprowadzenie do natywnego nośnika BC 20 ml 0,05 mol/L CaCl₂ (pH 5,8) (POCH, Polska) oraz 0.1 mol/L Na₂HPO₄ (pH 9,1) w temperaturze 25°C. HA-BC poddano powolnemu suszeniu przez 5 dni w temperaturze 21°C. Syntezę wykonano w warunkach jałowych w komorze laminarnej. Następnie 10% uzyskanych zmodyfikowanych nośników wprowadzono do 20 ml płynnej pożywki TG lub BC i inkubowano przez 7 dni w celu określenia ich jałowości mikrobiologicznej, którą potwierdzano poprzez obserwację braku zmętnienia (brak rozwoju drobnoustrojów); dodatkowo 2 ml podłoża płynnego TG lub BC, do których uprzednio wprowadzono nośniki, rozprowadzono po agarowych podłożach wzrostowych (Mc Conkey, Sabouraud, Columbia, Schaedler) i inkubowano przez 24h/37°C w warunkach tlenowych (Mc Conkey, Sabouraud, Columbia) bądź beztlenowych (Schaedler).

3.10. Nasączenie nośników BC wybranymi substancjami przeciwdrobnoustrojowymi i określenie wielkości stref zahamowania wzrostu gronkowca złocistego

Do kompozytów HA-BC wprowadzono wodne roztwory badanych związków przeciwdrobnoustrojowych (gentamycyny, lewofloksacyny, oritawancyny chelerytryny) w stężeniach 1 mg/ml i inkubowano w temperaturze 4°C/24h w szczelnie zamkniętym, uniemożliwiającym parowanie, pojemniku. Przed wykonaniem właściwych badań nad zdolnością nośników do sekwestracji patogenów, przeprowadzono ocenę aktywności bójczej związków uwalniających się z nośników z wykorzystaniem metody dyfuzyjno-krażkowej.

Nośniki BC zawierające badane związki przeciwdrobnoustrojowe nanoszono centralnie na płytki zawierające agar Mueller-Hinton (M-H) (BioMaxima, Polska), na których wcześniej rozprowadzono zawiesinę gronkowca złocistego o gęstości 0,5 McFarlanda, metodą posiewu na murawę (wykorzystując metodykę stosowaną przy nastawianiu antybiogramu). Hodowlę prowadzono przez 24 godziny w temperaturze wynoszącej 37°C. Po tym czasie obliczano średnie strefy zahamowania wzrostu (w mm) z uwzględnieniem średnicy nośnika celulozowego. Badanie wykonano w trzech powtórzeniach.

3.11. Ocena poziomu cytotoksyczności kompozytu biocelulozowo-hydroksyapatytowego względem linii komórkowej osteoblastów *in vitro*

100 µl komórek immortalizowanych osteoblastów o oznaczeniu U2-OS, pochodzących z hodowli referencyjnej ATCC, o gęstości 1×10^6 komórek/1 ml medium F12 Dulbecco's Modified Eagle's Medium z 2.5 mM L-glutaminą (DMEM) wprowadzano do studzienek płytki 96-dołkowej. Komórki poddawano inkubacji w temperaturze w 37°C w atmosferze wzbogaconej 5% CO_2 przez 24h; poziom kofluencji fibroblastów oceniano z wykorzystaniem mikroskopu odwróconego LumaScope 600 (EtaLuma, USA). Po upływie czasu inkubacji, ze studzienek usuwano medium (DMEM), a wprowadzono do nich 100 µl ekstraktów, pochodzących z opatrunków BC, wysyconych substancjami przeciwdrobnoustrojowymi w stężeniach określonych w badaniu pomiaru wielkości stref zahamowania. Ekstrakty uzyskano zgodnie z procedurami zawartymi w normie ISO 10993: *Biological evaluation of medical devices; Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity; Part 12: Biological evaluation of medical devices, sample preparation and reference materials* (ISO 10993-5:2009 and ISO/IEC 17025:2005).

Przeprowadzano 24-godziną inkubację. Następnie medium usuwano i zastępowano je świeżym. Test żywotności komórek przeprowadzono wykorzystując 0,2 ml MTT w stężeniu wynoszącym 0,5 mg/ml. Płytkę zawierającą komórki oraz medium poddawano kolejnej inkubacji trwającej 3 godziny. Następnie, ze studzienek usuwano medium zawierające MTT, a wprowadzono 0,1 ml dimetylosulfotlenku (DMSO), w celu rozbicia integralności komórek i uwolnienia oraz rozpuszczenia kryształów czerwonego formazanu, utworzonego na skutek inkorporacji żółtego MTT do systemu dehydrogenazy bursztynianowej. Po rozpuszczeniu formazanu, wykonywano odczyt wartości absorbancji w czytniku płytek (Infinite, Tecan), przy długości fali wynoszącej 540 nm

oraz użyciu filtra referencyjnego 690 nm. Jako maksymalną (100%) wartość absorbancji przyjęto odczyty pochodzące z układu doświadczalnego, w którym komórki osteoblastów hodowano w medium niezawierającym badanych substancji przeciwdrobnoustrojowych. Pomiary wykonano w 6 powtórzeniach.

3.12. Ocena zdolności osteoblastów do zasiedlania nośników BC

1,5 ml zawiesiny komórek o gęstości $1,5 \times 10^5$ CFU/ml wprowadzano do studzienek w 24-dołkowej płytce (VWR, Randor, Pa, USA) z wstawką na dole. Płytki inkubowano przez 24 h, 48 h i 72 h w temperaturze 37°C i atmosferze zawierającej 5% CO₂ (inkubator C150UL-CO₂, Binder, Tuttlingen Niemcy). Medium odżywcze wymieniano co 24h. Test żywotności komórek przeprowadzano wykorzystując 0,2 ml MTT w stężeniu wynoszącym 0,5 mg/ml. Płytkę zawierającą komórki oraz medium poddawano kolejnej inkubacji trwającej 3 godziny. Następnie, ze studzienek usuwano medium zawierające MTT, a wprowadzano 0,1 ml dimetylosulfotlenku (DMSO), w celu rozbicia integralności komórek i uwolnienia oraz rozpuszczenia kryształów czerwonego formazanu utworzonego na skutek inkorporacji żółtego MTT do systemu dehydrogenazy bursztynianowej. Po rozpuszczeniu formazanu, wykonywano odczyt wartości absorbancji w czytniku płytek (Infinite, Tecan), przy długości fali wynoszącej 540nm oraz użyciu filtra referencyjnego 690nm. Jako maksymalną (100%) wartość absorbancji przyjęto odczyty pochodzące z układu doświadczalnego, w którym komórki osteoblastów hodowano w medium niezawierającym badanych substancji przeciwdrobnoustrojowych. Pomiary wykonano w 6 powtórzeniach.

3.13. Ocena zdolności nośników biocelulozowych do sekwestracji szczepów gronkowca złocistego

Z 24-godzinnej hodowli szczepów gronkowca w podłożu płynnym (DMEM) w atmosferze zawierającej 5% CO₂ (inkubator Binder VWR, Polska) sporządzono odpowiednie zawiesiny bakterii o gęstości 0,5 MF) w DMEM, które następnie poddawano 1000-krotnemu rozcieńczeniu (w DMEM). Uzyskano w ten sposób zawiesinę o gęstości 10⁵ CFU/ml drobnoustrojów. Równolegle przygotowano nośniki BC (zawierające badane substancje przeciwdrobnoustrojowe oraz ich pozbawione (natywne, kontrolne), które umieszczano na powierzchniach badanych (krążkach hydroksyapatytowych lub kościach udowych szczurów). Tak przygotowany układ badawczy przenoszono do cieplarki VWR Binder, w której zapewniono warunki komory wilgotnej. Następnie, z zachowaniem zasad aseptyki na nośniki BC nakładano 100 µl uprzednio przygotowanej zawiesiny bakterii i poddawano inkubacji w czasie 24, 48 lub 72h. Po zakończeniu inkubacji nośniki celulozowe poddawano rozpuszczaniu w celulazie (SemSoft, Polska), wirowaniu (35000 rpm/15 min.). Supernatant usuwano, a pellet rozpuszczono w 5 ml soli fizjologicznej i poddawano seryjnym posiewom na płytki Columbia Agar. Krążki hydroksyapatytowe oraz kości długie szczurów potencjalnie pokryte biofilmem wprowadzano do 0,5% saponiny i poddawano mechanicznemu wytrząsaniu przez minutę, a następnie wykonywano posiewy ilościowe na podłożu Columbia agar. Po 24 godzinach obliczano liczbę kolonii gronkowca złocistego wyrosłego na podłożach. Pomiar wykonano w 3 powtórzeniach.

3.14. Wizualizacja biofilmu gronkowcowego oraz nośników z wykorzystaniem skaningowej mikroskopii elektronowej

Próbki (inserty, nośniki BC zawierające drobnoustroje, hydroksyapatyt, kości szczura) umieszczono w 2% glutaraldehydzie i poddano inkubacji przez okres 4h w temperaturze 4°C. Po upływie czasu inkubacji próbki poddano przepłukiwaniu wodą 3 x przez okres 2 minut i wprowadzono do rosnących stężeń etanolu (szereg alkoholowy) w sekwencji: (2 x 10 min w 10%; 1 x 10 min w stężeniach: 25%, 50%, 70%, 80%, 90% i finalnie 2 x 15 min w 100% w celu dehydratacji. Odwodnione próbki poddano suszeniu w temperaturze pokojowej.

3.15. Obliczenia statystyczne

Oszacowania istotności statystycznej uzyskanych wyników dokonano z wykorzystaniem oprogramowania GraphPad Prism version 8. Normalność rozkładu oszacowano z wykorzystaniem testu D'Agostino-Pearson. Ponieważ uzyskane wartości nie wykazywały cech rozkładu normalnego, w obliczeniach wykorzystano test Kruskala-Walisa z analizą post-hoc Dunneta. Wyniki uznawano za istotne przy wartości $p < 0,5$.

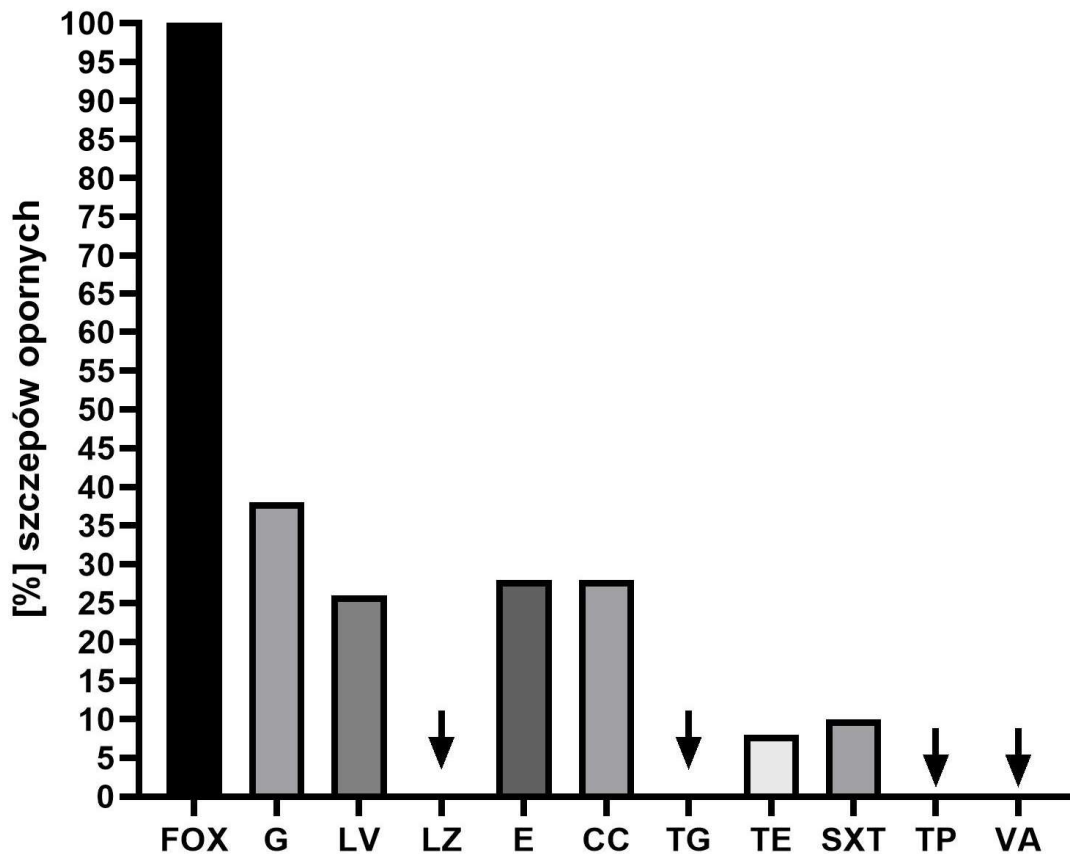
4. Wyniki

Uzyskane wyniki przedstawione w **Tabeli 1** oraz na **Wykresie 1** wskazują na wysokie zróżnicowanie wrażliwości/oporności metycylineoopornych gronkowców (MRSA) na zastosowane antybiotyki, z oczywistym wyjątkiem cefoksytiny, względem której wszystkie szczepy gronkowca złocistego MRSA cechują się opornością.

Szczep MRSA nr:	Oporność/wrażliwość na zastosowany antybiotyk										
	FOX	G	LV	LZ	E	CC	TG	TE	SXT	TP	VA
ATCC 33591	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
MR 2	R	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S
MR 3	R	S	S	S	R	R	S	R	S	S	S
MR 4	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
MR 5	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
MR 6	R	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S
MR 7	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
MR 8	R	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S
MR 9	R	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S
MR 10	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
MR 11	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
MR 12	R	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S
MR 13	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S
MR 14	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
MR 15	R	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S
MR 16	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
MR 17	R	R	S	S	R	S	S	S	R	S	S
MR 18	R	R	R	S	R	S	S	R	S	S	S
MR 19	R	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S
MR 20	R	S	R	S	I	R	S	S	S	S	S
MR 21	R	S	S	S	I	R	S	S	S	S	S
MR 22	R	R	S	S	I	S	S	S	S	S	S
MR 23	R	S	S	S	I	R	S	S	S	S	S
MR 24	R	S	R	S	I	S	S	S	R	S	S
MR 25	R	S	S	S	I	S	S	S	R	S	S
MR 26	R	R	S	S	I	S	S	S	S	S	S

MR 27	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
MR 28	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
MR 29	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
MR 30	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S
MR 31	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
MR 32	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
MR 33	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S
MR 34	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
MR 35	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
MR 36	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
MR 37	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
MR 38	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
MR 39	R	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S
MR 40	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
MR 41	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
MR 42	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
MR 43	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
MR 44	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
MR 45	R	S	S	S	R	R	S	R	S	S	S
MR 46	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
MR 47	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
MR 48	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
MR 49	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
MR 50	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

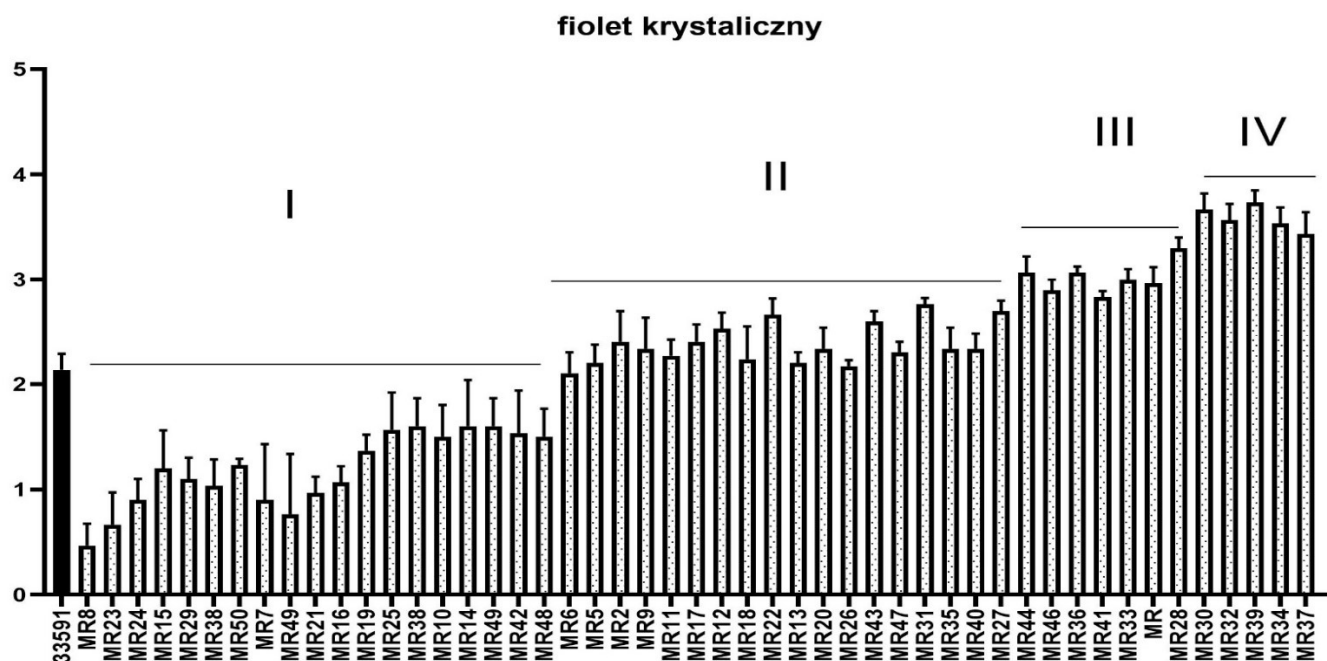
Tabela 1. Profil antybiotykooporności badanych szczepów gronkowca złocistego. S – szczepy wrażliwe według danych EUCAST; R – szczepy odporne według danych EUCAST. MS - szczepy *S. aureus* wrażliwe na metycylinę; MR - szczepy *S. aureus* odporne na metycylinę; FOX-cefoksytyna; G-gentamycyna; LV-lewofloksacyna; LZ -linezolid; E-erytromycyna; CC-klindamycyna; TG-tygecyklina; TE-tetracyklina; SXT-kotrimoksazol.



Wykres 1. Oporność [%] szczepów gronkowca złocistego MRSA (n=50) na antybiotyki wykorzystane w antybiogramie. Czarnymi strzałkami zaznaczone są te antybiotyki, względem których badane szczepy gronkowca złocistego charakteryzowały się wrażliwością.

Gentamycyna była antybiotykiem, względem którego (z wyłączeniem cefoksytyny) badane szczepy MRSA cechowały się najwyższą (38%) opornością. Brak wrażliwości na linezolid, erytromycynę oraz klindamycynę był niższy i wynosił 26%, 28% oraz 28%, odpowiednio. Przedstawione, równe co do wartości, dane procentowe dotyczące oporności na erytromycynę oraz klindamycynę oraz wygląd stref zahamowania wzrostu, zaobserwowany między krążkami z erytromycyną a klindamycyną, sugeruje mechanizm oporności MLS_B (ang. macrolide-linkozamide-streptogramin B).

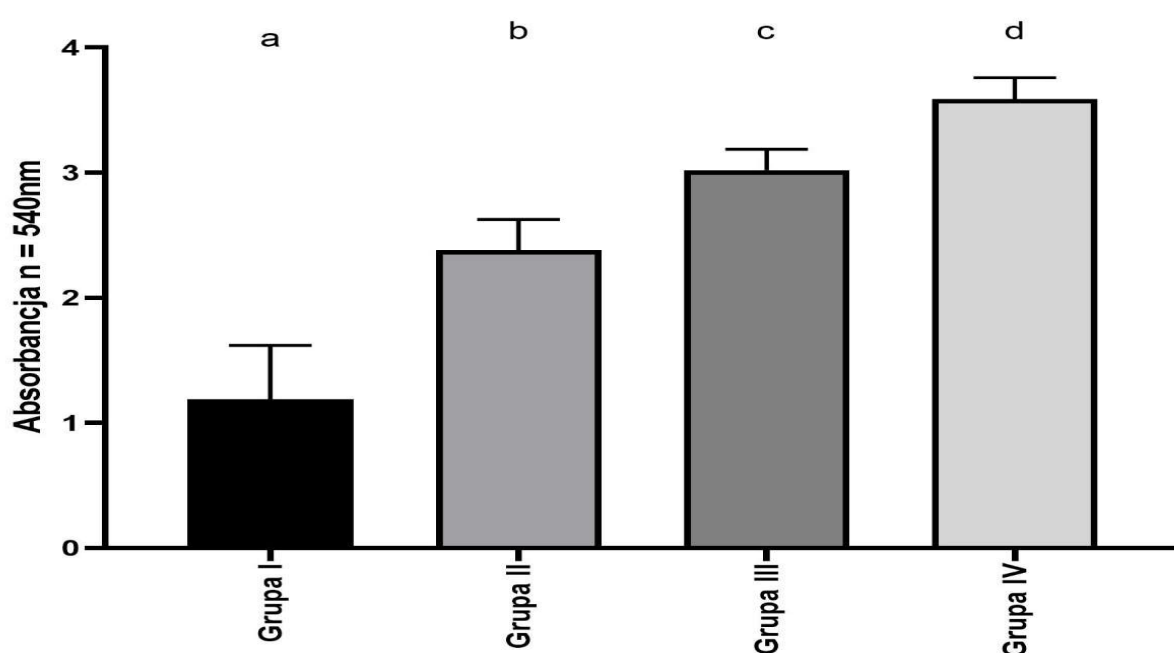
Badane szczepy gronkowca złocistego MRSA cechowały się nie tylko zróżnicowaną wrażliwością/opornością na zastosowane antybiotyki, ale także zróżnicowaniem w zdolności do tworzenia biofilmu, jak wykazano to na Wykresie 2.



Wykres 2. Zdolność badanych szczepów MRSA (n=50) do tworzenia biomasy biofilmowej, oceniana za pomocą barwienia fioletem krystalicznym. MR- szczep metycylinooporny gronkowca złocistego. I – arbitralnie przyjęta niska zdolność do tworzenia biomasy biofilmowej; II – arbitralnie przyjęta umiarkowana zdolność do tworzenia biomasy biofilmowej; III – arbitralnie przyjęta wysoka zdolność do tworzenia biomasy biofilmowej.; IV – arbitralnie przyjęta bardzo wysoka zdolność do tworzenia biomasy biofilmowej

Zastosowana metoda (wykorzystująca fiolet krystaliczny) wybarwia zarówno komórki, jak i macierz biofilmową, jest więc powszechnie stosowaną techniką przesiewową, odróżniającą szczepy zdolne do tworzenia silnych struktur biofilmu od szczepów tworzących biofilm w sposób umiarkowany/słaby lub nie tworzących biofilmu.

Na potrzeby analiz przeprowadzonych w niniejszej pracy dokonano arbitralnego (opierającego się na rozróżnieniu wewnątrz grupy badanej) rozróżnienia między szczepami tworzącymi biofilm słabo (grupa I, którą tworzyło 38% izolatów); w sposób umiarkowany (18 szczepów klinicznych oraz 1 szczep wzorcowy – 38% izolatów); w sposób silny (14% szczepów) oraz bardzo silny (10% szczepów). Różnice między poszczególnymi grupami cechowały się istotnością statystyczną



Wykres 3. Różnice pomiędzy grupami w zdolności badanych szczepów MRSA (n=50) do tworzenia biomasy biofilmowej, ocenianej za pomocą barwienia fioletem krystalicznym. Grupa I – arbitralnie przyjęta niska zdolność do tworzenia biomasy biofilmowej; grupa II – arbitralnie przyjęta umiarkowana zdolność do tworzenia biomasy biofilmowej; grupa III – arbitralnie przyjęta wysoka zdolność do tworzenia biomasy biofilmowej. a,b,c,d – różne litery przypisane wartościom poszczególnych grup oznaczają istotne różnice statystyczne między nimi ($p < 0.5$), test Kruskal-Wallis z analizą post-hoc Dunnetta.

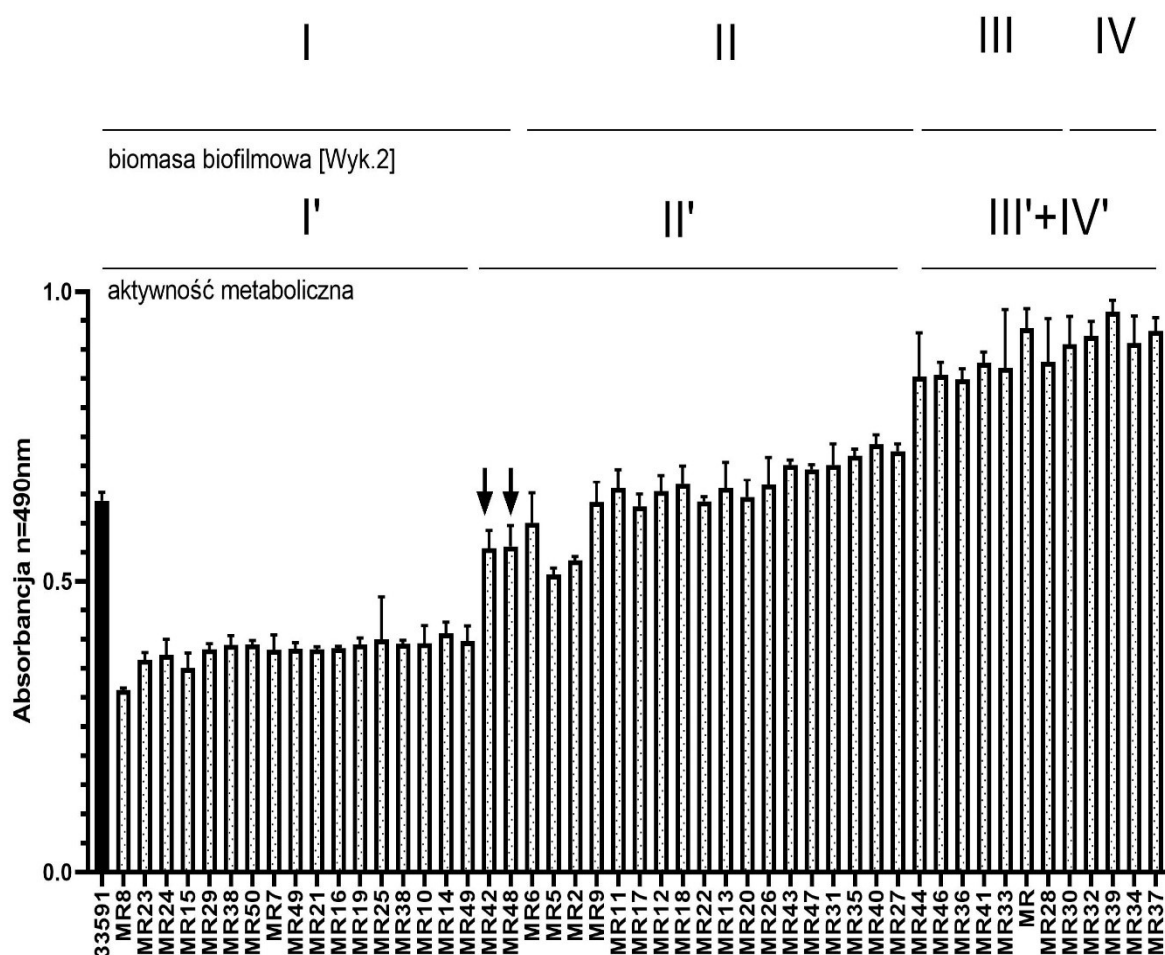
Średnie różnice procentowe w zdolności do tworzenia biofilmu ocenianą metodą wykorzystującą fiolet krystaliczny między arbitralnie ustanowionymi grupami przedstawione są w **Tabeli 2**.

	Grupa I	Grupa II	Grupa III	Grupa IV
Grupa I	-	200%	254%	301%
Grupa II	-	-	126%	150%
Grupa III	-	-	-	118%

Tabela 2. Średnie różnice [%] w zdolności do tworzenia biomasy biofilmowej między poszczególnymi arbitralnie ustanowionymi grupami. Grupa I – arbitralnie przyjęta niska zdolność do tworzenia biomasy biofilmowej; **grupa II** – arbitralnie przyjęta umiarkowana zdolność do tworzenia biomasy biofilmowej; **grupa III** – arbitralnie przyjęta wysoka zdolność do tworzenia biomasy biofilmowej

Jak wykazano, w obrębie grupy badanej aż 68% szczepów (grupa I + grupa II) charakteryzowało się zdolnością do słabego lub umiarkowanego tworzenia biofilmu. Liczba szczepów tworzących biofilm silnie lub bardzo silnie (grupa III + grupa IV) była istotnie niższa i wynosiła 24%. Z kolei zdolność szczepów do tworzenia silnego biofilmu (ocenionego poziomem biomasy biofilmowej) była 3-krotnie wyższa (**Tabela 2**) od szczepów tworzących biofilm słabo w obrębie grupy badanej i odpowiednio 1,5-1,2 razy wyższa od szczepów tworzących biofilm w sposób umiarkowany bądź silny (grupa II oraz grupa III, odpowiednio).

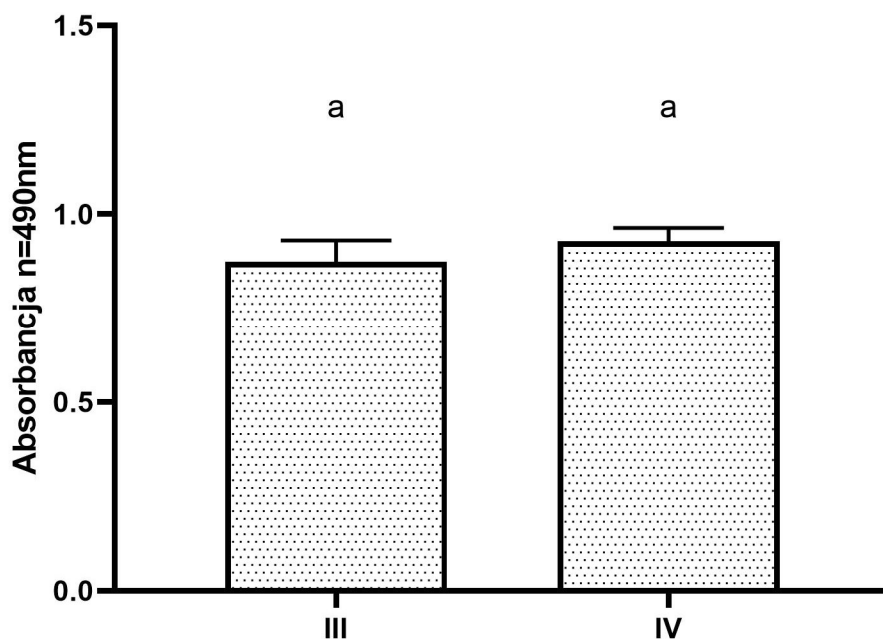
W kolejnym etapie doświadczeń podjęto się oceny poziomu aktywności metabolicznej badanych szczepów tworzących biofilm, która koreluje (jakkolwiek w sposób niebezpośredni) z liczbą komórek tworzących tę formę bytowania bakterii.



Wykres 4. Ocena poziomu aktywności metabolicznej badanych szczepów MRSA (n=50) wykonana z wykorzystaniem techniki Richardsa. MR- szczep metycylinooporny gronkowca złocistego. I' – arbitralnie przyjęta niska aktywność metaboliczna; II' – arbitralnie przyjęta umiarkowana aktywność metaboliczna; III'+IV – arbitralnie przyjęta wysoka oraz bardzo aktywność metaboliczna komórek gronkowca złocistego MRSA tworzących biofilm.

I,II,III,IV - szczepy wytwarzające niski, umiarkowany, wysoki oraz bardzo wysoki poziom biomasy biofilmowej (przedstawione na **Wykresie 2**); strzałkami zaznaczono szczepy, które wykazywały niską zdolność do tworzenia biomasy biofilmowej, a w badaniu poziomu aktywności metabolicznej zaliczone zostały do grupy szczepów o umiarkowanie wysokim poziomie aktywności metabolicznej.

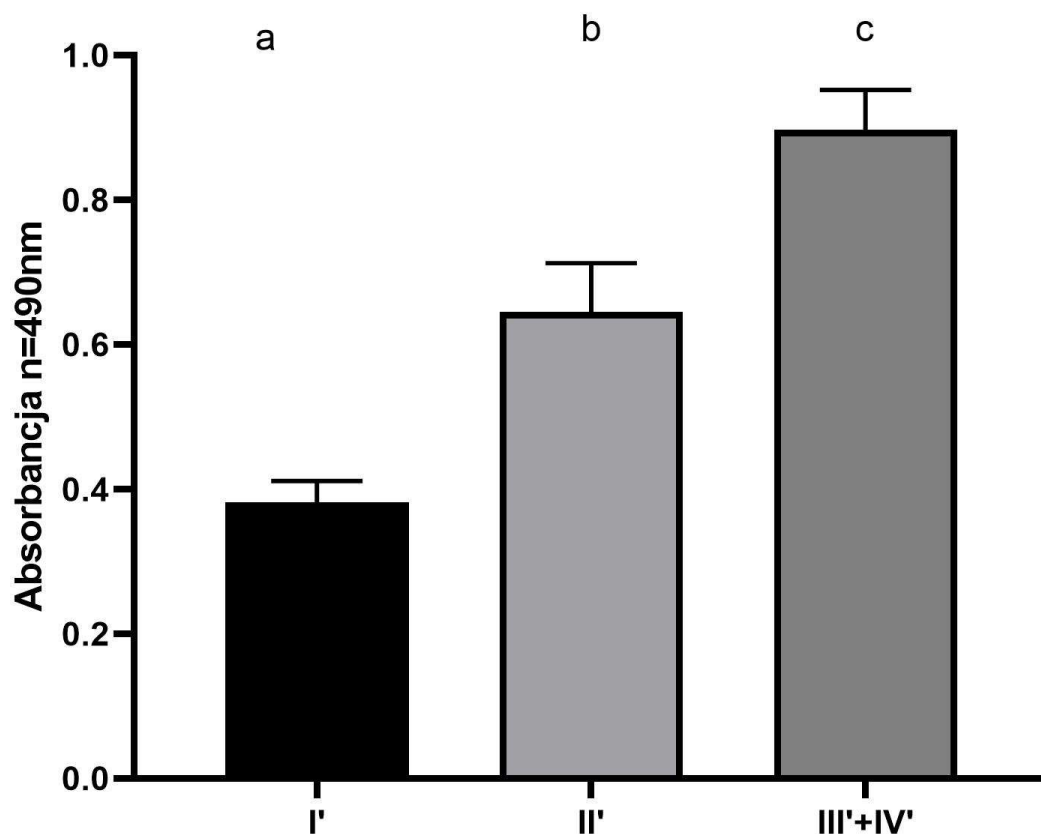
Podobnie jak w przypadku oceny poziomu tworzenia biomasy biofilmowej, również poziom aktywności metabolicznej szczepów MRSA tworzących biofilm w zastosowanym układzie doświadczalnym różniły się między sobą (zmienność wewnątrzgatunkowa). Najwyższa różnica w poziomie aktywności metabolicznej (ponad 3-krotna) została zaobserwowana między szczepem MR8 a szczepem MR39. W odróżnieniu od grup stworzonych w oparciu o wyniki płynące z analizy poziomu biomasy biofilmowej, w przypadku oceny poziomu aktywności metabolicznej (korelującego z liczbą komórek tworzących biofilm), wyróżniono arbitralnie trzy, a nie cztery grupy szczepów: grupę I' w skład której wchodziły szczepy o niskim poziomie aktywności metabolicznej; grupę II', w skład której wchodziły szczepy o umiarkowanym poziomie aktywności metabolicznej oraz grupę III'+IV' w skład której wchodziły szczepy o wysokim poziomie aktywności metabolicznej. Do grupy I' zaliczono 34% szczepów; do grupy II' 42% szczepów, a do grupy III'+IV' 24% szczepów. Przyczyną nierozróżnienia grupy III'+IV' na szczepy o wysokim i bardzo wysokim poziomie aktywności metabolicznej był brak istotnych różnic między szczepami w aspekcie wartości analizowanego parametru (**Wykres 5**).



Wykres 5. Brak istotnych różnic statystycznych w poziomie aktywności metabolicznej ocenianej metodą Richardsa między grupami szczepów zaliczanych w pomiarze poziomu tworzenia biomasy biofilmowej do grup III i IV. a- brak różnic istotnych statystycznie między grupami ($p>0.5$).

Zaobserwowano wysoki poziom korelacji między wynikami przedstawionymi na **Wykresie 2** oraz **Wykresie 4**. 89% szczepów tworzących biomasę biofilmową na niskim poziomie została skategoryzowana również jako szczepy o niskim poziomie aktywności metabolicznej (a zatem o niskiej liczbie komórek tworzących biofilm); pozostałe 11% na podstawie uzyskanych wyników zostało przesuniętych do grupy o średnim poziomie aktywności metabolicznej; wszystkie (100%) szczepów, które w badaniu poziomu biomasy biofilmowej zostały włączone do grupy III lub IV, w oparciu o wyniki oceny poziomu aktywności metabolicznej zostały włączone do grupy III'+IV'.

Istotność różnic w poziomie aktywności metabolicznej badanych biofilmów została przedstawiona na **Wykresie 6**, podczas gdy w **Tabeli 3** wykazano różnice procentowe [%] między wartościami poziomu aktywności metabolicznej/liczby komórek pomiędzy poszczególnymi grupami.

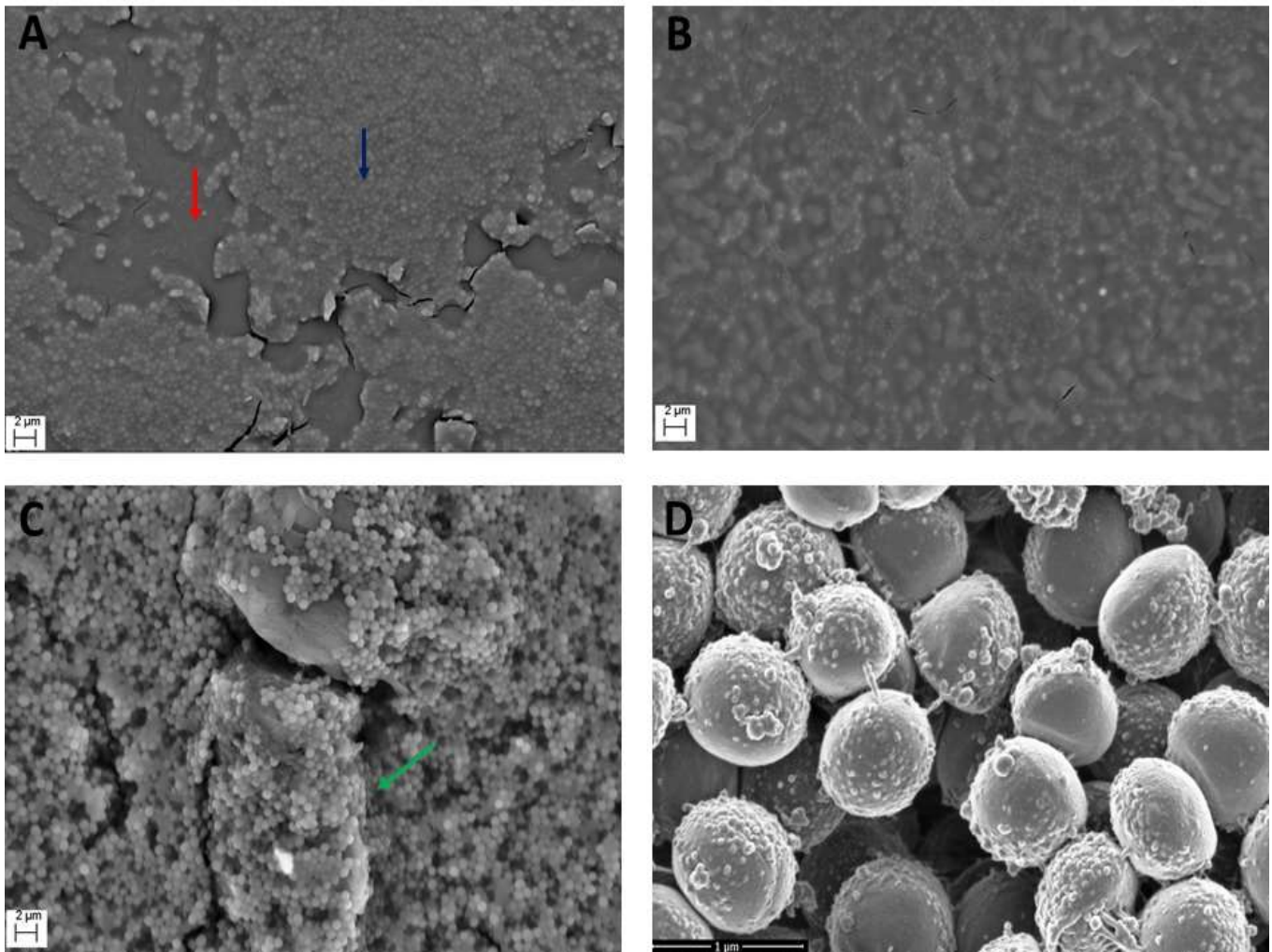


Wykres 6. Różnice pomiędzy grupami w poziomie aktywności metabolicznej badanych szczepów MRSA (n=50) oceniana za pomocą barwienia z chlorkiem tetrazoliowym. I' – grupa, w skład której wchodzi szczepy o niskim poziomie aktywności metabolicznej; II' – grupa, w skład której wchodzi szczepy o umiarkowanym poziomie aktywności metabolicznej; III'+IV' – grupa, w skład której wchodzi szczepy o wysokim poziomie aktywności metabolicznej. Litery a,b,c oznaczają istotne statystycznie różnice między grupami ($p>0,5$).

	Grupa I'	Grupa II'	Grupa III'+IV'
Grupa I	-	168%	234%
Grupa II'	-	-	139%

Tabela 3. Średnie różnice [%] w zdolności do tworzenia biomasy biofilmowej między poszczególnymi arbitralnie ustanowionymi grupami. Grupa I' – arbitralnie przyjęty niski poziom aktywności metabolicznej szczepów MR tworzących biofilm; **grupa II''** – arbitralnie przyjęty umiarkowany poziom aktywności metabolicznej szczepów MR tworzących biofilm; **grupa III'+IV'** – arbitralnie przyjęty wysoki poziom aktywności metabolicznej szczepów MR tworzących biofilm

Ponieważ wyniki oceny poziomu biomasy biofilmowej (**Wykres 2, Wykres 3, Tabela 2**) charakteryzowały się podobnymi zależnościami w obrębie analizowanych biofilmów tworzonych przez gronkowce MRSA do wyników poziomu aktywności metabolicznej (**Wykres 4, Wykres 5, Wykres 6, Tabela 3**) założono, że uzyskane biofilmy (w zastosowanym układzie badawczym) cechują się wysokim komponentem komórkowym, a niskim udziałem komponentu macierzy zewnątrzkomórkowej. W celu weryfikacji tej hipotezy wykonano obrazowanie wybranych biofilmów z wykorzystaniem skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM). Wyniki obrazowania przedstawiono na **Zdjęcie 1**.

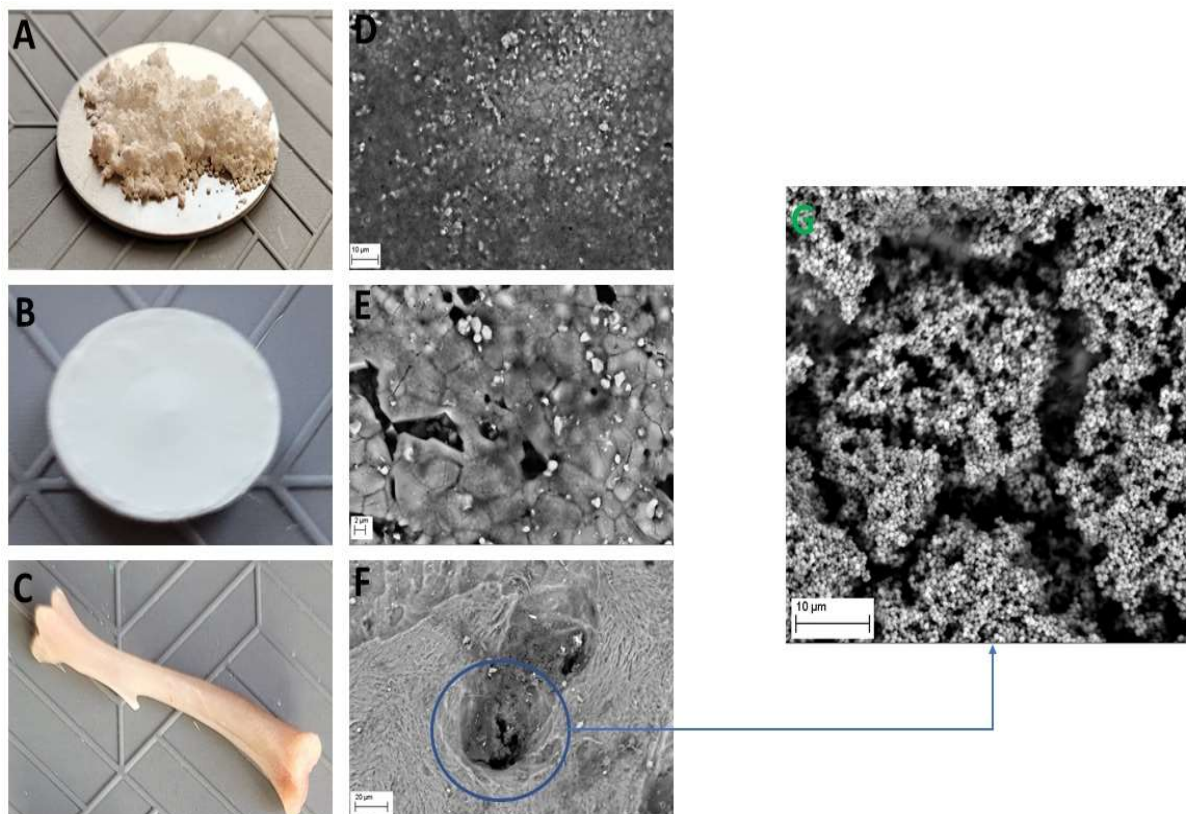


Zdjęcie 1. Obrazowanie biofilmu tworzego przez gronkowce złociste MRSA z wykorzystaniem Skaningowej Mikroskopii Elektronowej. A – szczep należący do grupy I/I’; B – szczep należący do grupy II/II’; C - szczep należący do grupy IV/ III’+IV’. Strzałka czerwona – obszar niepokryty biofilmem; strzałka niebieska – biofilm; strzałka zielona – wielowarstwowa struktura biofilmu; D – brak widocznej macierzy zewnątrzkomórkowej. Zdjęcia A,B,C: powiększenie 20000x, mikroskop Zeiss EVO MA 25; zdjęcie D – mikroskop Zeiss Auriga 60, powiększenie 50000x.

Wyniki uzyskane z wykorzystaniem Skaningowej Mikroskopii Elektronowej przedstawione na reprezentatywnych zdjęciach wchodzących w skład **Ryciny 1** wykazały, że biofilm gronkowcowy, w zastosowanym układzie badawczym, tworzony jest przez liczne warstwy komórek gronkowca, które jednak nie są pokryte zewnątrzkomórkową macierzą.

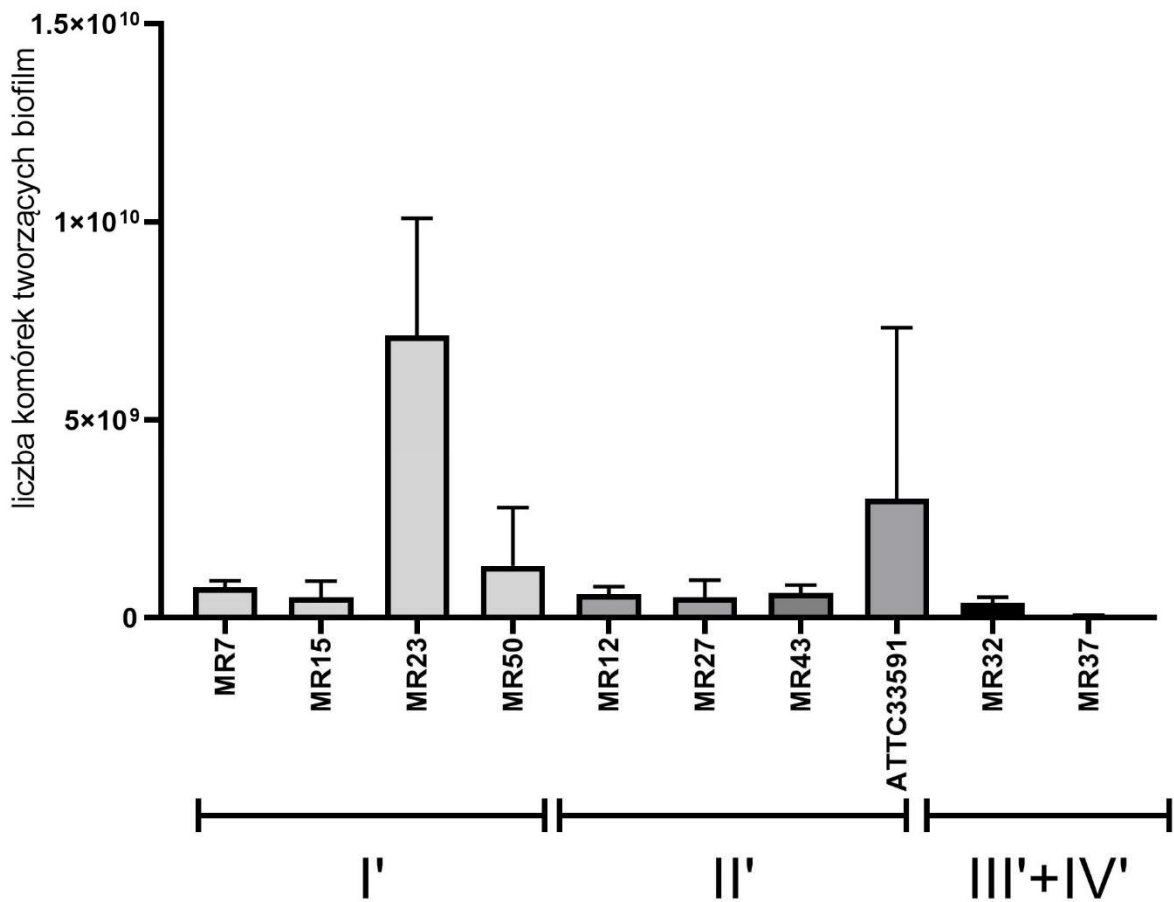
Powyżej przeprowadzone analizy miały na celu określenie zdolności gronkowców do tworzenia biofilmu *in vitro* w podstawowym układzie badawczym (wykorzystującym powierzchnię polistyrenową oraz podłoże DMEM) i ewentualne odrzucenie tych szczepów, które zdolność do tworzenia biofilmu *in vitro* wykazywały w sposób nikły lub niepowtarzalny, co uniemożliwiłoby uzyskanie danych, mogących zostać poddanych analizie statystycznej. Jednak jak wykazano, wszystkie badane szczepy tworzyły biofilm *in vitro* (co wykazano za pomocą dwóch technik doświadczalnych), a uzyskane wyniki cechowały się względnie niskimi wartościami odchyłeń standardowych. Jednakże dane przedstawione w powyższej części manuskryptu wymusiły uwzględnienie zaobserwowanego wysokiego zróżnicowania wewnątrzgatunkowego w aspekcie zdolności do tworzenia biofilmu *in vitro*. Dlatego do celów kolejnych analiz, w których jako podłoże wzrostowe wykorzystano proszek hydroksyapatytowy, krążki hydroksyapatytowe oraz kości długie szczurów, wybrano łącznie 10 szczepów, z których 4 należały do grupy o słabej zdolności do tworzenia biofilmu (szczepy 7, 15, 23, 50); cztery cechowały się umiarkowaną zdolnością do tworzenia biofilmu (szczepy 12, 27, 43, ATCC 33591) oraz 2 silną zdolnością do tworzenia biofilmu (szczepy 32 oraz 37). Ponieważ jak zaobserwowano w badaniach wstępnych, metoda wykorzystująca fiolet krystaliczny nie nadaje się do analiz, w których jako podłoże do wzrostu biofilmu stosowany jest hydroksyapatyt (na skutek w dużej mierze nieodwracalnego łączenia się fioletu krystalicznego z tym związkiem), w kolejnych badaniach wykorzystano techniki posiewów ilościowych oraz posiłkowano się skaningową mikroskopią elektronową.

Na **Zdjęciu 2** przedstawiono poszczególne postacie powierzchni wzrostowych zawierających hydroksyapatyt oraz zobrazowany na tych powierzchniach biofilm gronkowcowy.

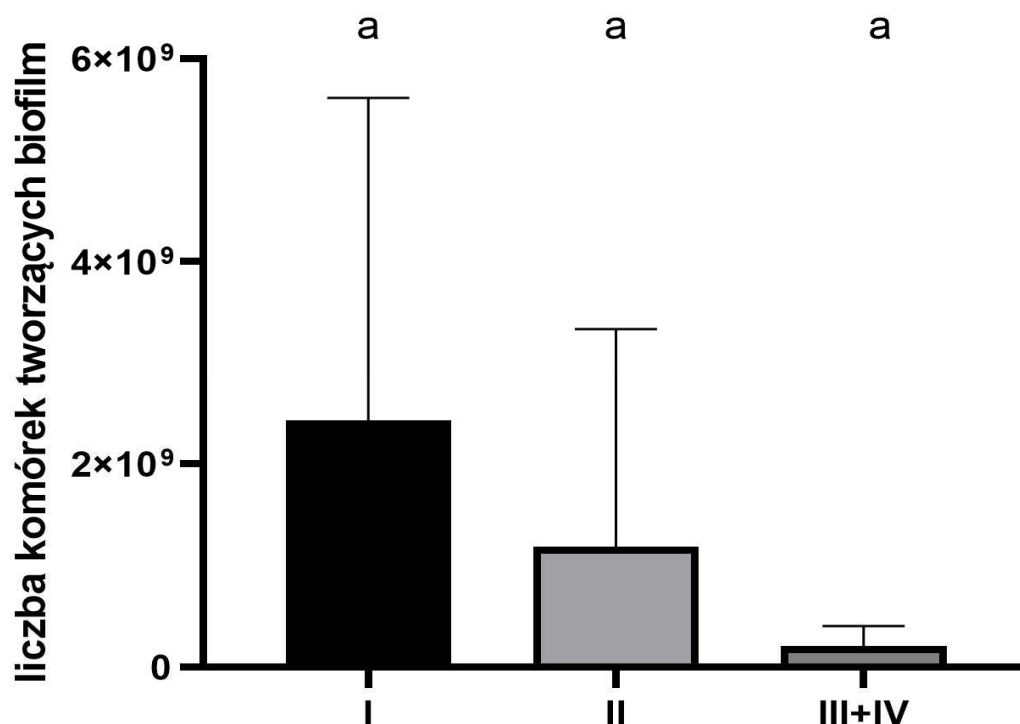


Zdjęcie 2. Powierzchnie wzrostowe do rozwoju biofilmu. A - Proszek hydroksyapatytowy; B – dysk hydroksyapatytowy, C – kość długa szczura. D,E,F – biofilm gronkowca ATCC 33591 utworzony na proszku hydroksyapatytowym, dysku hydroksyapatytowym oraz kości długiej, odpowiednio. Zdjęcie G stanowi powiększenie biofilmu z obrazu F, ukazujące wielokomórkową strukturę biofilmu. Mikroskop Zeiss EVO MA 25, powiększenie 10000x (zdjęcia D,E), 2500x (zdjęcie F), 19000 x (zdjęcie G).

Jak wykazano na **Wykresie 7**, wszystkie szczepy gronkowca złocistego MRSA cechowały się zdolnością do tworzenia biofilmu na cząsteczkach proszku hydroksyapatytowego, jednakże cecha ta nie korelowała z określonymi uprzednio poziomami tworzenia biofilmu na powierzchni polistyrenowej, oszacowanym z wykorzystaniem techniki barwienia fioletem krystalicznym oraz metodą Richardsa. Jakkolwiek zwrócić należy także uwagę na relatywnie wysokie wartości odchyleń standardowych od średniej, zaobserwowane dla poszczególnych szczepów (MR23, MR27, MR50, ATTC 33591), których liczba stanowi 60% analizowanej grupy (**Wykres 8**). Wyjaśnienie przyczyn tego zjawiska znajduje się w sekcji „Dyskusja” niniejszego manuskryptu.



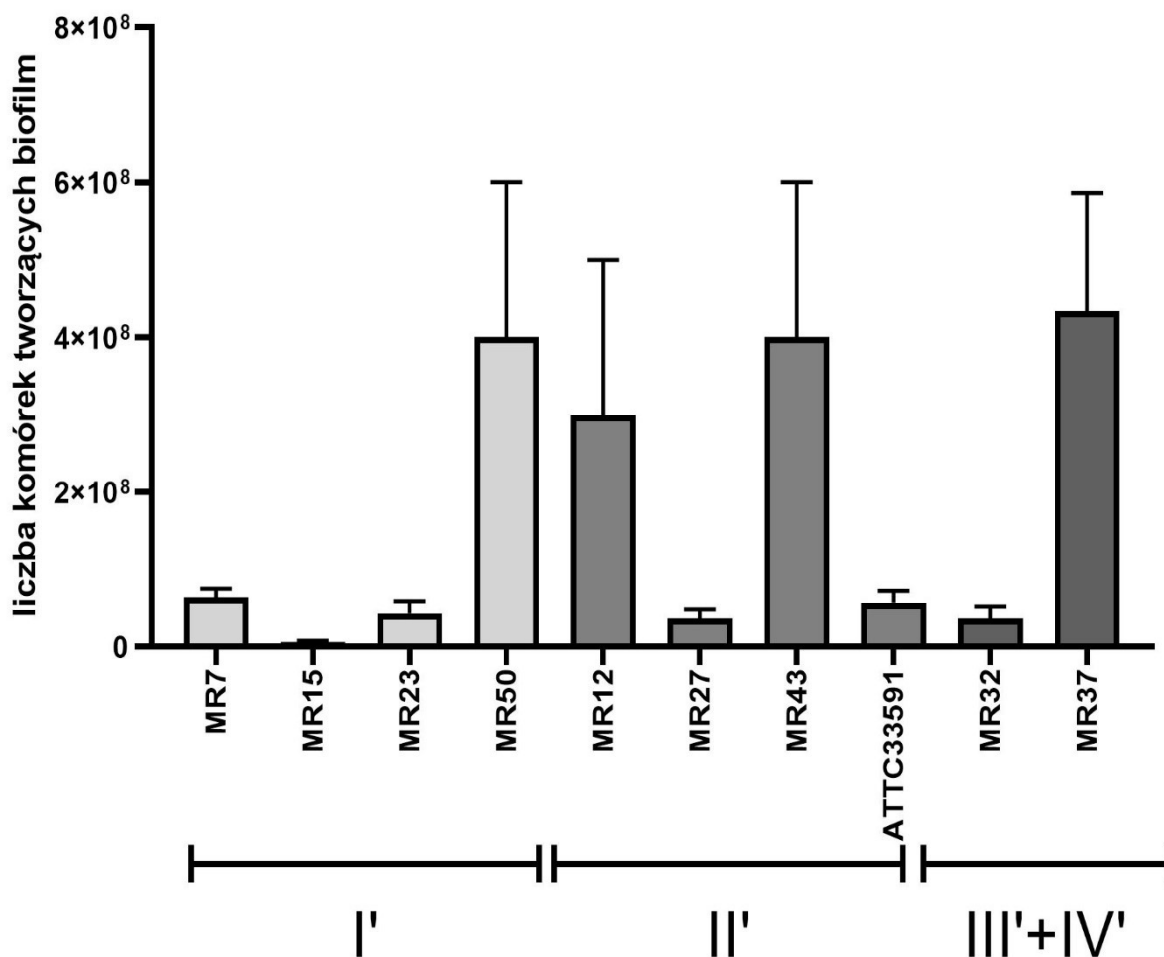
Wykres 7. Porównanie liczby komórek szczepów gronkowca złocistego MRSA tworzącego biofilm na proszkach hydroksyapatytowych. I', II', III'+IV': szczepy należące do grup słabo, umiarkowanie i silnie tworzących biofilm na podłożu polistyrenowym.



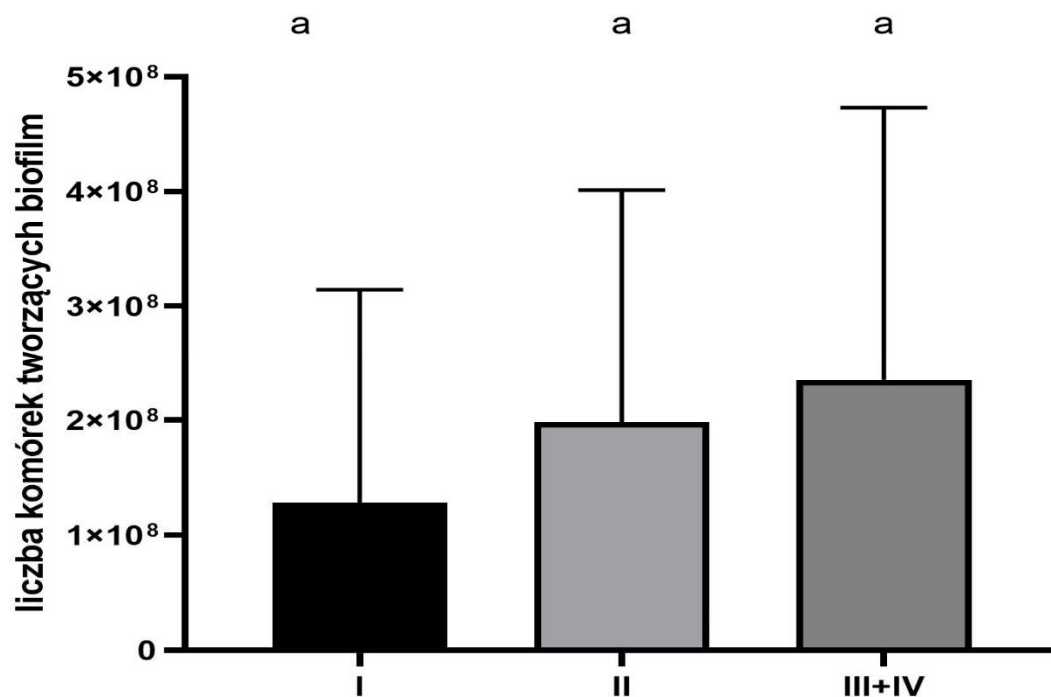
Wykres 8. Porównanie różnic w zdolności badanych szczepów do tworzenia biofilmu na cząsteczkach proszku hydroksyapatytowego. I', II', III'+IV': szczepy należące do grup słabo, umiarkowanie i silnie tworzących biofilm na podłożu polistyrenowym. a – brak istotności statystycznej w zaobserwowanych różnicach w tworzeniu biofilmu na cząsteczkach proszku hydroksyapatytowego.

Następnie oszacowano zdolność wybranej grupy szczepów (n=10) do tworzenia biofilmu na powierzchni krążków hydroksyapatytowych. Podobnie jak w przypadku danych przedstawionych na **Wykresie 7** oraz **Wykresie 8**, również w przypadku wykorzystania tej powierzchni (**Wykres 9**), wyniki uzyskane dla badanych szczepów nie korelowały z danymi uzyskanymi dla biofilmu rosnącego na powierzchni polistyrenowej. Zaobserwowano natomiast (**Wykres 10**) niższe wartości odchyłeń standardowych dla powtórzeń uzyskanych dla poszczególnych szczepów niż w przypadku, gdy zastosowaną powierzchnią wzrostową były cząsteczki proszku hydroksyapatytowego.

Jednakże, średnie wartości liczby komórek tworzących biofilm w poszczególnych grupach różniły się między sobą na tyle, że różnice obserwowane w porównaniach międzygrupowych nie cechowały się istotnością statystyczną ($p>0.5$).

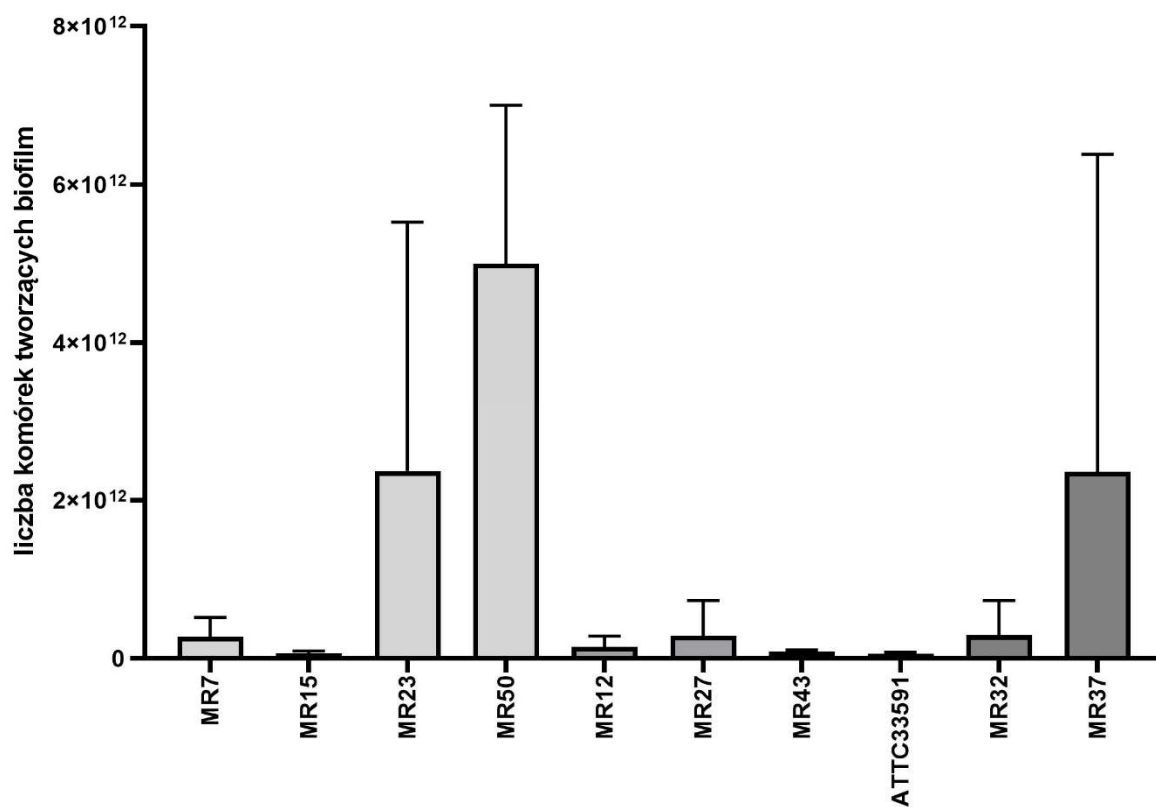


Wykres 9. Porównanie liczby komórek szczepów gronkowca złocistego MRSA tworzącego biofilm na krążkach hydroksyapatytowych. I', II', III'+IV': szczepy należące do grup słabo, umiarkowanie i silnie tworzących biofilm na podłożu polistyrenowym.

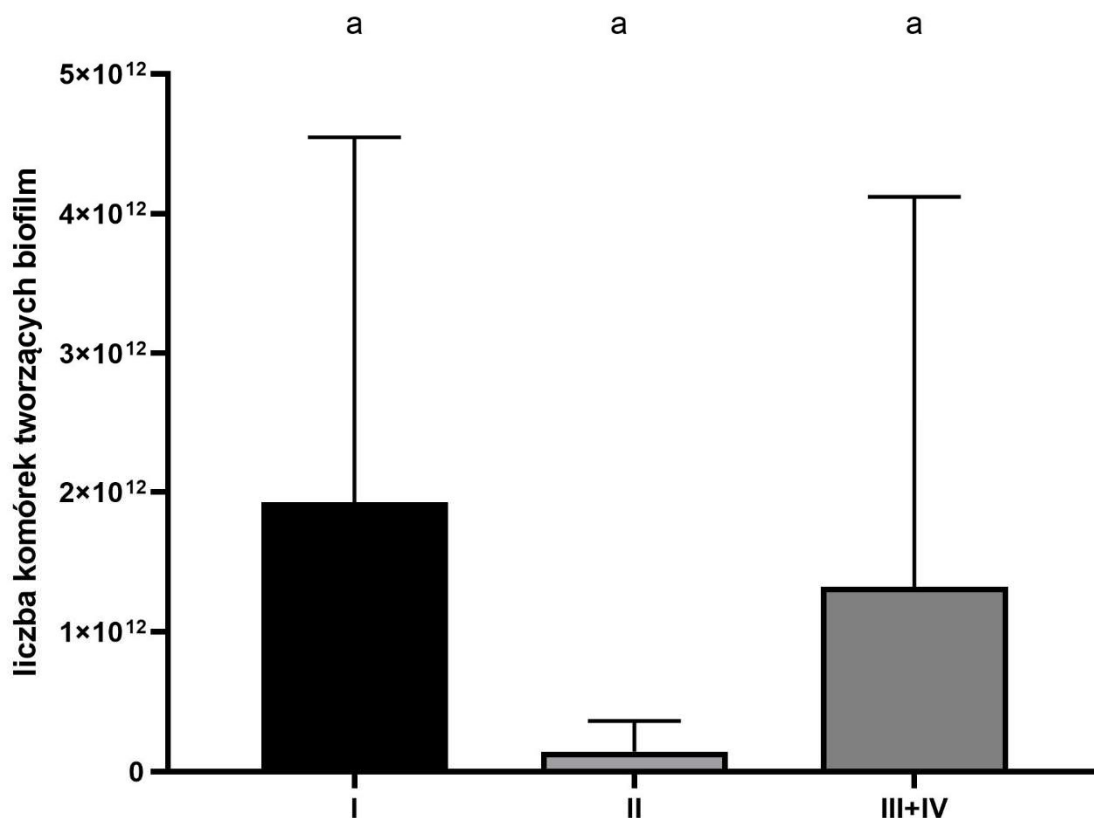


Wykres 10. Porównanie różnic w zdolności badanych szczepów do tworzenia biofilmu na krążkach hydroksyapatytowych. I', II', III'+IV': szczepy należące do grup słabo, umiarkowanie i silnie tworzących biofilm na podłożu polistyrenowym. **a** – brak istotności statystycznej w zaobserwowanych różnicach w tworzeniu biofilmu na dyskach hydroksyapatytowych.

W kolejnym etapie badań oceniono zdolność wybranych szczepów gronkowca złocistego MRSA (n=10) do tworzenia biofilmu *in vitro* na kościach udowych szczurów (materiał uzyskany *post mortem*). Jak można zaobserwować na **Wykresie 11** oraz **Wykresie 12**, uzyskane wyniki cechowały się wyższymi wartościami odchyłeń standardowych niż w przypadku zastosowania dysków hydroksyapatytowych jako powierzchni wzrostowej i były porównywalne do tych, które otrzymane były przy zastosowaniu proszku hydroksyapatytowego.



Wykres 11. Porównanie liczby komórek szczepów gronkowca złocistego MRSA tworzącego biofilm na kościach długich. I', II', III'+IV': szczepy należące do grup słabo, umiarkowanie i silnie tworzących biofilm na podłożu polistyrenowym.



Wykres 12. Porównanie różnic w zdolności badanych szczepów do tworzenia biofilmu na kościach długich szczurów. I', II', III'+IV': szczepy należące do grup słabo, umiarkowanie i silnie tworzących biofilm na podłożu polistyrenowym. a – brak istotności statystycznej w zaobserwowanych różnicach w tworzeniu biofilmu na dyskach hydroksyapatytowych.

Porównanie zdolności poszczególnych szczepów wchodzących w skład grupy badanej (n=10) do tworzenia biofilmu na poszczególnych powierzchniach zawierających hydroksyapatyt (proszkach, krążkach, kościach długich szczurów) przedstawiono w **Tabeli 4**.

powierzchnia	szczepy gronkowca złocistego MRSA o zdolności tworzenia biofilmu od najwyższej do najniższej na określonej powierzchni wzorcowej									
proszek hydroksyapatytowy	23	33591	50	7	43	15	12	27	32	37
krążki hydroksyapatytowe	37	43	50	12	33591	7	23	27	32	15
kości długie	50	37	23	27	32	7	12	15	43	33591

Tabela 4. Siła tworzenia biofilmu przez poszczególne szczepy gronkowców złocistych MRSA w zależności od zastosowanej powierzchni wzorcowej. Pogrubioną czcionką zaznaczono szczepy, które w porównywalny sposób tworzyły biofilm dla powierzchni wzorcowej w postaci proszku hydroksyapatytowego oraz krążków hydroksyapatytowych.

Dane przedstawione na **Wykresie 8**, **Wykresie 10** i **Wykresie 12** oraz w **Tabeli 4** wskazują zróżnicowaną zdolność poszczególnych szczepów do tworzenia biofilmu na różnych zastosowanych powierzchniach zawierających hydroksyapatyt. W żadnym przypadku nie wykazano, że specyficzny szczep jest w stanie w określony, zawsze taki sam, sposób (niski, umiarkowany, lub silny) tworzyć biofilm na każdych z trzech powierzchni wzorcowych. W przypadku 40% szczepów (o numerach 27, 32, 50) wykazano porównywalną siłę tworzenia biofilmu w układzie badawczym, w którym zastosowano cząsteczki proszku hydroksyapatytowego lub krążków hydroksyapatytowych, ale nie kości długie, jako powierzchnie wzorcowe.

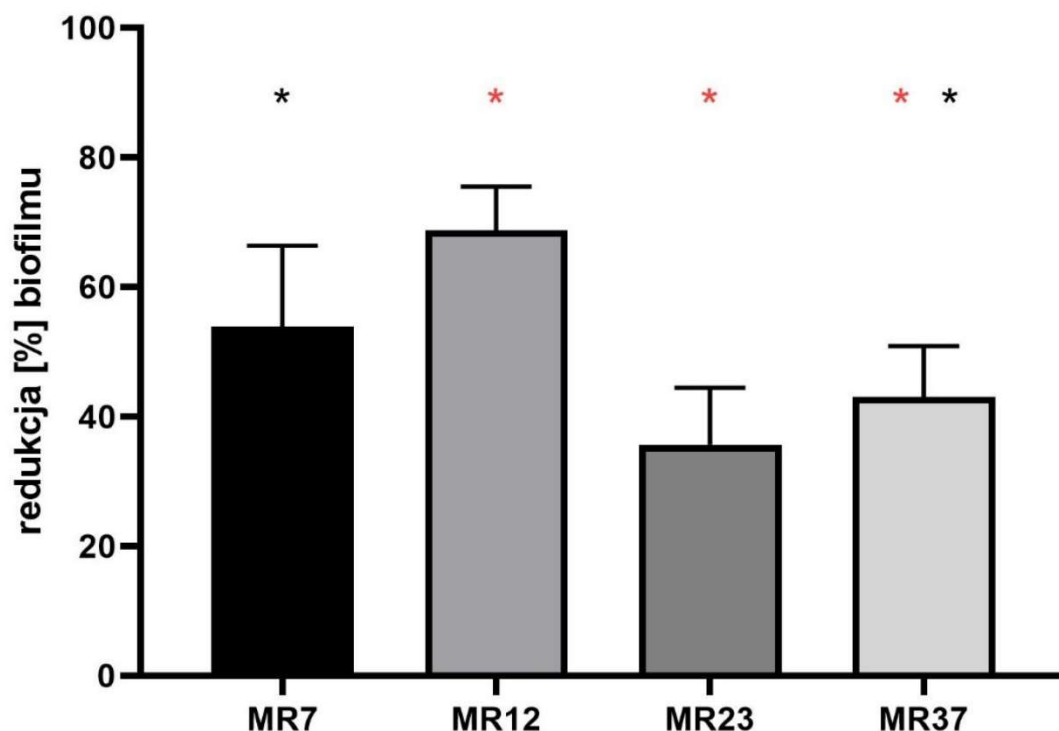
Następnie podjęto się oceny zdolności bójczych wybranych związków przeciwdrobnoustrojowych – gentamycyny, lewofloksacyny, oritawancyny oraz chelerytryny względem form planktonicznych (**Tabela 5**) oraz biofilmu (**Tabela 6, Wykres 13**) tworzonego przez szczepy gronkowca złocistego MRSA (n=10).

szczep MRSA nr	Minimalne stężenie środków przeciwdrobnoustrojowych hamujące wzrost bakterii [MIC, mg/L]			
	gentamycyna	lewofloksacyna	oritawancyna	chelerytryna
33591	0.5	0.0005	0.062	62
7	1	0.0005	0.062	62
12	0.25	0.0005	0.125	62
15	0.125	0.0005	0.031	31
23	0.5	0.001	0.62	128
27	0.5	0.001	0.031	31
32	1	0.0005	0.125	62
37	1	0.001	0.125	62
43	1	0.0005	0.125	31
50	0.5	0.001	0.062	31

Tabela 5. Wartości Minimalnego Stężenia Hamującego wyznaczone dla badanych związków przeciwdrobnoustrojowych.

szczep MRSA nr	Minimalne Stężenie Hamujące Eradykujące Biofilm [MBEC, mg/L] środków przeciwdrobnoustrojowych			
	gentamycyna	lewofloksacyna	oritawancyna	chelerytryna
33591	8	0.008	0.125	250
7	16	0.004	0.125	n.m.
12	2	0.0004	0.5	n.m
15	4	0.0008	0.125	125
23	8	0.004	0.62	n.m.
27	2	0.008	0.125	125
32	2	0.004	0.250	125
37	4	0.004	0.250	n.m.
43	2	0.001	0.125	62
50	4	0.004	0.250	62

Tabela 6. Wartości Minimalnego Stężenia Eradykującego Biofilm wyznaczonych dla badanych związków przeciwdrobnoustrojowych. n.m. – niemierzalne w zakresie zastosowanych stężeń



Wykres 13. Redukcja [%] biofilmu przez chelerytrynę. * - różnice istotne statystyczne pomiędzy wartością redukcji biofilmów tworzonych przez poszczególne szczepy, przetrwałych traktowanie chelerytryną ($p < 0,5$).

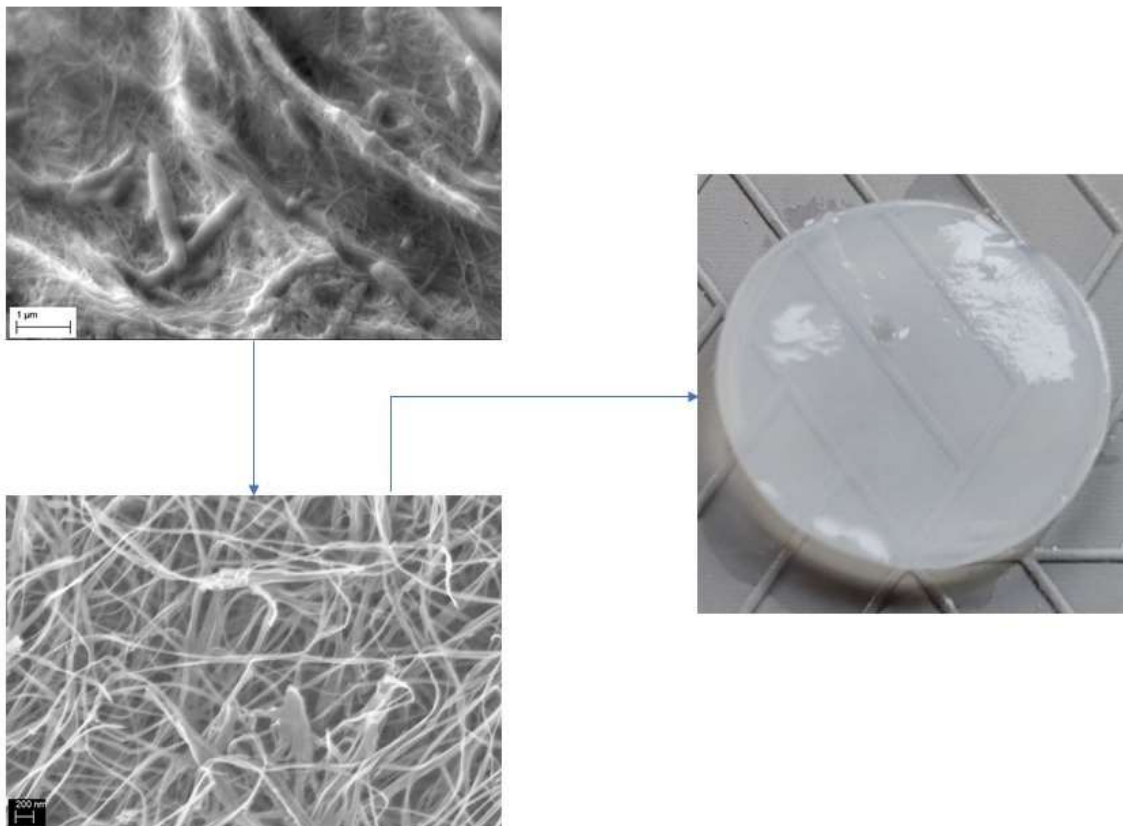
Wszystkie badane szczepy gronkowca złocistego MRSA cechowały się wrażliwością na gentamycynę, lewofloksacynę oraz oritawancynę oznaczoną metodą mikroplótkową (Tabela 5). Wyniki te zgodne są (dla gentamycyny i lewofloksacyny) z danymi przedstawionymi w Tabeli 1 niniejszego manuskryptu, przedstawiającymi wrażliwość/oporność badanych szczepów, oznaczoną metodą dyfuzyjno-krażkową lub gradientowo-dyfuzyjną. Wszystkie szczepy włączone do analizy wykazywały także wrażliwość na oritawancynę, nie przekraczając wartości granicznej (0,125 mg/L) podanej w EUCAST. Również w przypadku alkaloidu roślinnego chelerytryny, możliwe było oznaczenie dla wszystkich szczepów wartości MIC, w zakresie od 31 mg/L do 128 mg/L (dla szczepu 23).

Wartości MBEC dla każdego szczepu przyjęły wartość wyższą niż wartości MIC oznaczone dla tego samego szczepu (**Tabela 6**), niezależnie od wykorzystanego środka przeciwdrobnoustrojowego. W przypadku gentamycyny najwyższa zaobserwowana różnica między MIC a MBEC wynosiła 8x, a w przypadku lewofloksacyny i oritawancyny 16x i 4x, odpowiednio. Najwyższa różnica w wartościach MIC, a MBEC dla chelerytryny również wynosiła 4x. Dla biofilmów tworzonych przez 4 szczepy gronkowca złocistego MRSA (nr 7, 12, 23, 37) nie określono wartości MBEC w możliwym do uzyskania zakresie stężeń. Zaobserwowano natomiast wyraźnie mniej intensywne czerwone zabarwienie studzienek, do których wprowadzono najwyższe stężenie chelerytryny (250mg/L) w porównaniu do studzienek, w których rósł biofilm nietraktowany chelerytryną (kontrola zdolności do wzrostu w zastosowanym układzie badawczym). Dlatego też dla biofilmów traktowanych najwyższymi możliwymi do osiągnięcia stężeniami chelerytryny wykonano analizę porównawczą mającą ocenić poziom redukcji biofilmu (nie przekładający się na osiągnięcie parametru MBEC). Uzyskane wyniki (**Wykres 13**) wykazały 30%-70% redukcję poziomu biofilmu.

Dane przedstawione na **Wykresach 3 -12** pozwoliły potwierdzić zdolność badanych szczepów (n=50) do tworzenia biofilmów na zróżnicowanych powierzchniach wzrostowych, natomiast dane przedstawione w **Tabeli 5-6** i na **Wykresie 13** pozwoliły potwierdzić skuteczność (jakkolwiek różnego stopnia) wybranych związków przeciwdrobnoustrojowych (3 antybiotyków oraz 1 alkaloidu roślinnego) względem tych szczepów.

W kolejnej części manuskryptu przedstawiono proces wytworzenia nośnika z BC, jego charakterystyki oraz modyfikacji polegającej między innymi na wprowadzeniu do niego hydroksyapatytu oraz wyżej wymienionych związków przeciwdrobnoustrojowych, a następnie cech fizycznych i właściwości biologicznych tak zmodyfikowanych nośników.

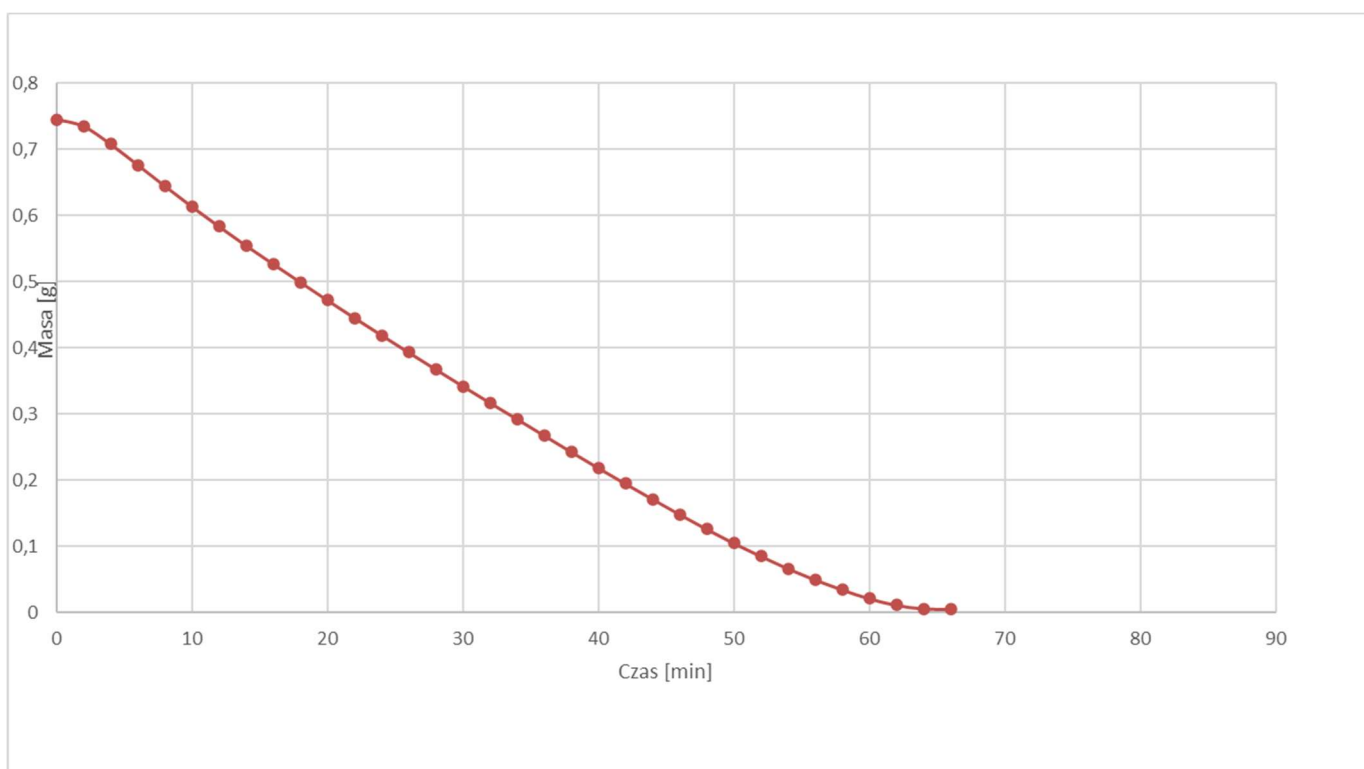
Wytworzony nośnik BC oraz jego mikrostrukturę przedstawiono na **Zdjęciu 3**.



Zdjęcie 3. Makro- oraz mikro-struktura nośnika BC. Zdjęcie górne – mikrostruktura nieoczyszczonego nośnika BC zawierającego komórki *Komagataeibacter xylinus* oraz pozostałości pożywki hodowlanej. Zdjęcie dolne – mikrostruktura nośnika BC po procesie oczyszczenia z wykorzystaniem lizy alkalicznej, prowadzącym do usunięcia komórek oraz pozostałości hodowlanej. Zdjęcie z prawej strony – makrostruktura nośnika BC po oczyszczeniu, charakteryzująca się wysokim stopniem jednorodności oraz przeziernością.

Waga celulozy suchej i mokrej po oczyszczeniu została zmierzona z wykorzystaniem wagi analitycznej; wynosiła ona dla mokrego nośnika BC $0.8 \pm 0,019$ g, a dla suchego nośnika $0,0018 \pm 0,0014$, z kolei średni poziom pochłaniania wody [%] SR wynosił 452%.

Nośnik BC charakteryzował się również zdolnością do stopniowego, a nie skokowego oddawania płynu ze swojej struktury, co wykazano na **Wykresie 14**, w okresie do 65 minut, w którym nastąpiło całkowite oddanie (pełne wysuszenie nośnika BC).



Wykres 14. Proces oddawania wody przez nośnik BC w czasie.

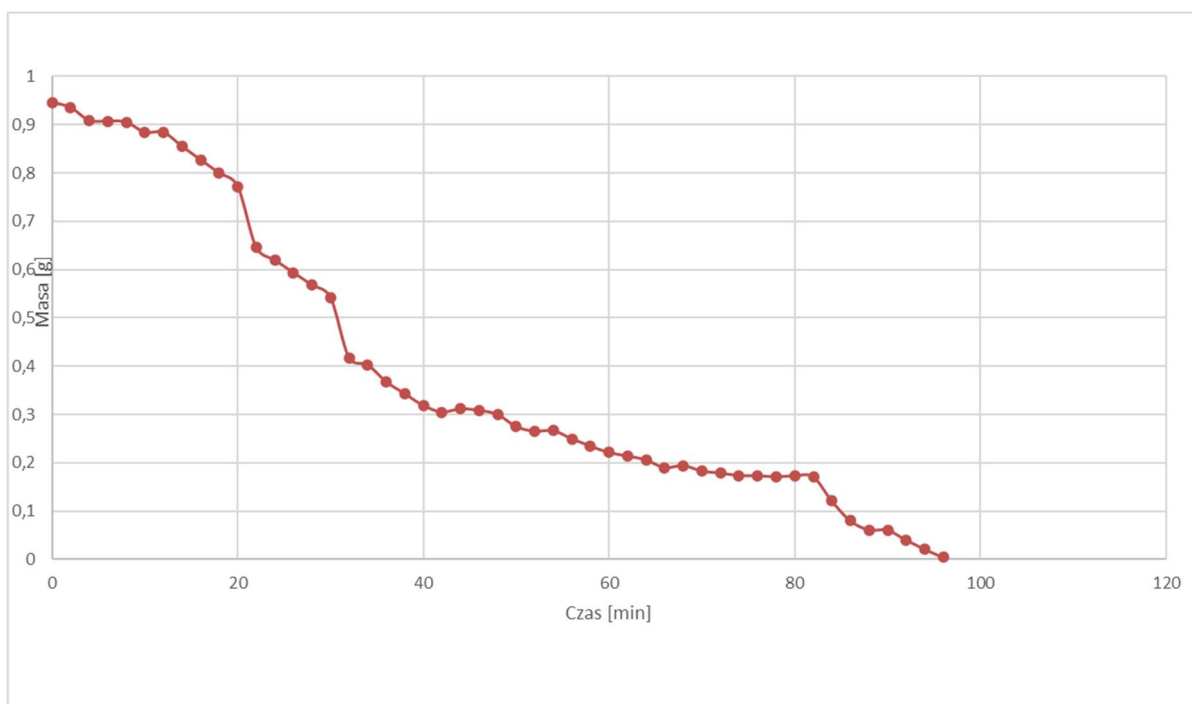
W kolejnym etapie przeprowadzono analogiczne badania dla wytworzonego kompozytu BC zawierającego hydroksyapatyt (HA-BC) (**Zdjęcie 4**).



Zdjęcie 4. Modyfikowany kompozyt HA-BC (część lewa zdjęcia) oraz natywny nośnik BC (część prawa zdjęcia).

Waga HA-BC wynosiła dla mokrego nośnika BC $0.91 \pm 0,013$ g, a dla suchego nośnika $0,012 \pm 0,011$, z kolei średni poziom pochłaniania wody [%] SR wynosił 75%.

Nośnik HA-BC wykazywał zdolność do stopniowego oddawania płynu ze swojej struktury, natomiast czas konieczny do pełnego wysuszenia nośnika wynosił 98 minut, czyli o 31% dłuższy niż w przypadku natywnego nośnika BC (**Wykres 15**).



Wykres 15. Proces oddawania wody przez nośnik HA-BC w czasie.

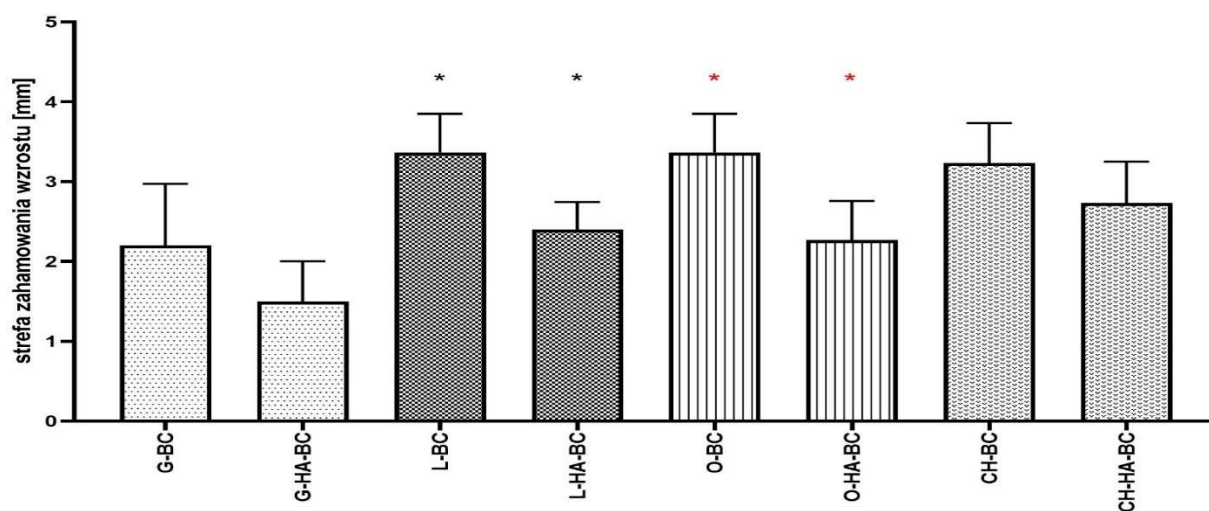
Następnie, do nośników BC oraz HA-BC wprowadzono badane substancje przeciwdrobnoustrojowe uzyskując nośniki zawierające gentamycynę, lewofloksacynę, oritawancynę oraz chelerytrynę. W dalszej części manuskryptu nośniki te, „ufortyfikowane” środkami przeciwdrobnoustrojowymi o uprzednio wykazanymi właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi względem gronkowców MRSA (**Tabela 5 – 6**) określane są mianem G-BC, L-BC, O-BC, CH-BC, a w przypadku kompozytu zawierającego hydroksyapatyt: G-HA-BC, L-HA-BC, O-HA-BC, CH-HA-BC.

Wyniki stref zahamowań uzyskanych po zastosowaniu wyżej wymienionych nośników przedstawione są w **Tabeli 7**.

	Typ nośnika									
	BC	HA- BC	G-BC	G-HA- BC	L-BC	L-HA- BC	O-BC	O-HA- BC	CH- BC	CH- HA- BC
nr szczepu	Strefa zahamowania wzrostu [mm]									
7	0	0	3±1	2±1	3,6±0,5	2	3±1	2,3±0,5	1,2±0,5	1±0,3
12	0	0	2±0	1	2,6±0,5	3±1	3	2±0,3	1,1±0,2	1±0,3
15	0	0	3±0	1,6±0,5	3,3±1,1	2,3±0,5	3	2	2±0,2	1,6±0,5
23	0	0	2,6±1,5	2±1	2,6±0,5	2	4	3	1	1
27	0	0	3±1	2,3±1,1	4	2,6±0,5	4	2,6±0,5	2±1	2,3±1,1
32	0	0	1,3±0,5	1	3,3±0,5	2,3±0,5	3	1,6±0,5	3±1	3±1
37	0	0	1,3±0,5	1	3	2	3	1,6±0,5	2±1	2±1
43	0	0	1±0	1	3,6±0,5	2,6±0,5	3,6±0,5	2,3±0,5	1	1
50	0	0	2,6±1,1	1,6±1,1	4	2,3±0,5	3	1,6±0,5	3,3±1,1	3±0,3
33591	0	0	2±1	1,3±0,5	3,3±0,5	2,6±0,5	4	2,6±0,5	2,6±0,5	2,3±1,1

Tabela 7. Średnica stref zahamowania wzrostu gronkowca złocistego na skutek aktywności związków przeciwdrobnoustrojowych wydobywających się z nośników celulozowych. BC – celuloza natywna; HA-BC – celuloza zawierająca hydroksyapatyt; G, L, O, CH – gentamycyna, lewofloksacyna, oritawancyna, chelerytryna, odpowiednio.

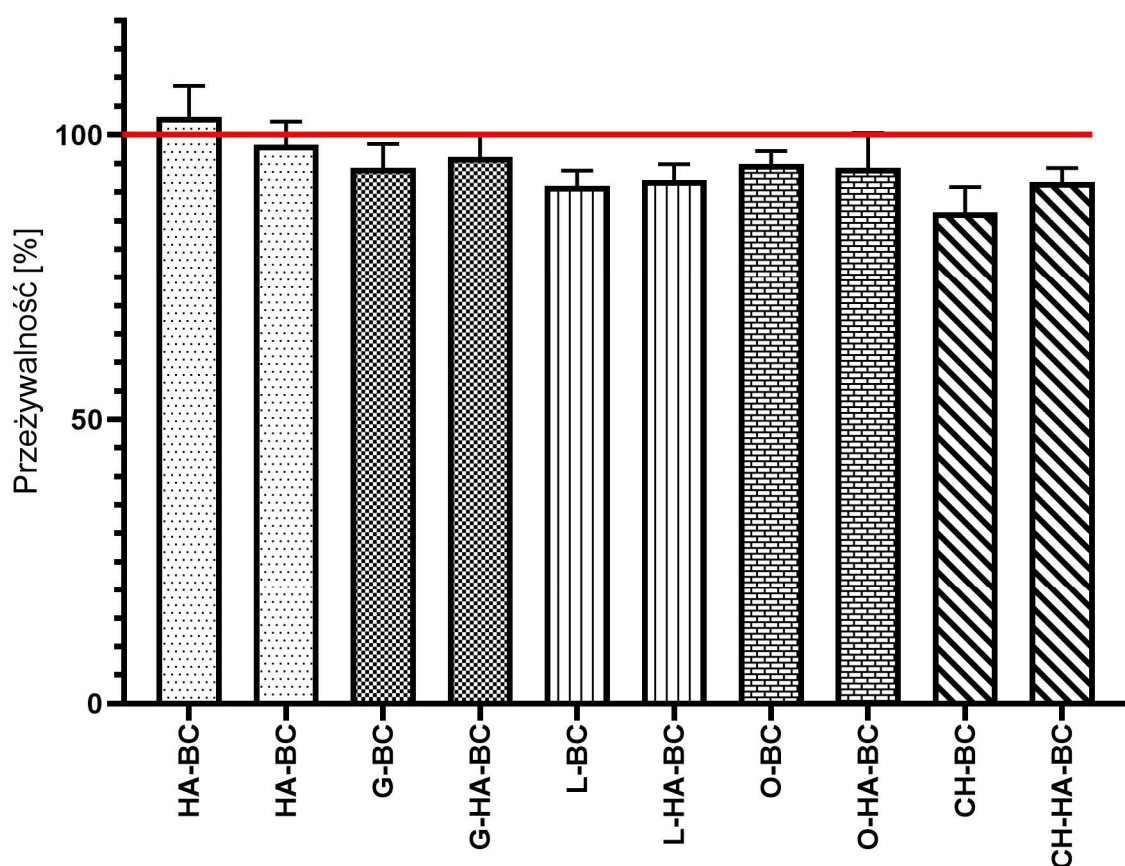
Różnice między średnimi wartościami średnic stref zahamowań wzrostu badanych szczepów gronkowca MRSA przedstawione są na **Wykresie 16**.



Wykres 16. Średnie wartości średnicy stref zahamowania wzrostu gronkowca na skutek aktywności związków przeciwdrobnoustrojowych uwalniających się z nośników BC i kompozytów BC zawierających hydroksyapatyt. BC – celuloza natywna; HA-BC – celuloza zawierająca hydroksyapatyt; G, L, O, CH – gentamycyna, lewofloksacyna, oritawancyna, chelerytryna, odpowiednio. * - różnice istotne statystycznie zaobserwowane między nośnikami zawierającymi lub nie dodatek hydroksyapatytu i określony związek przeciwdrobnoustrojowy.

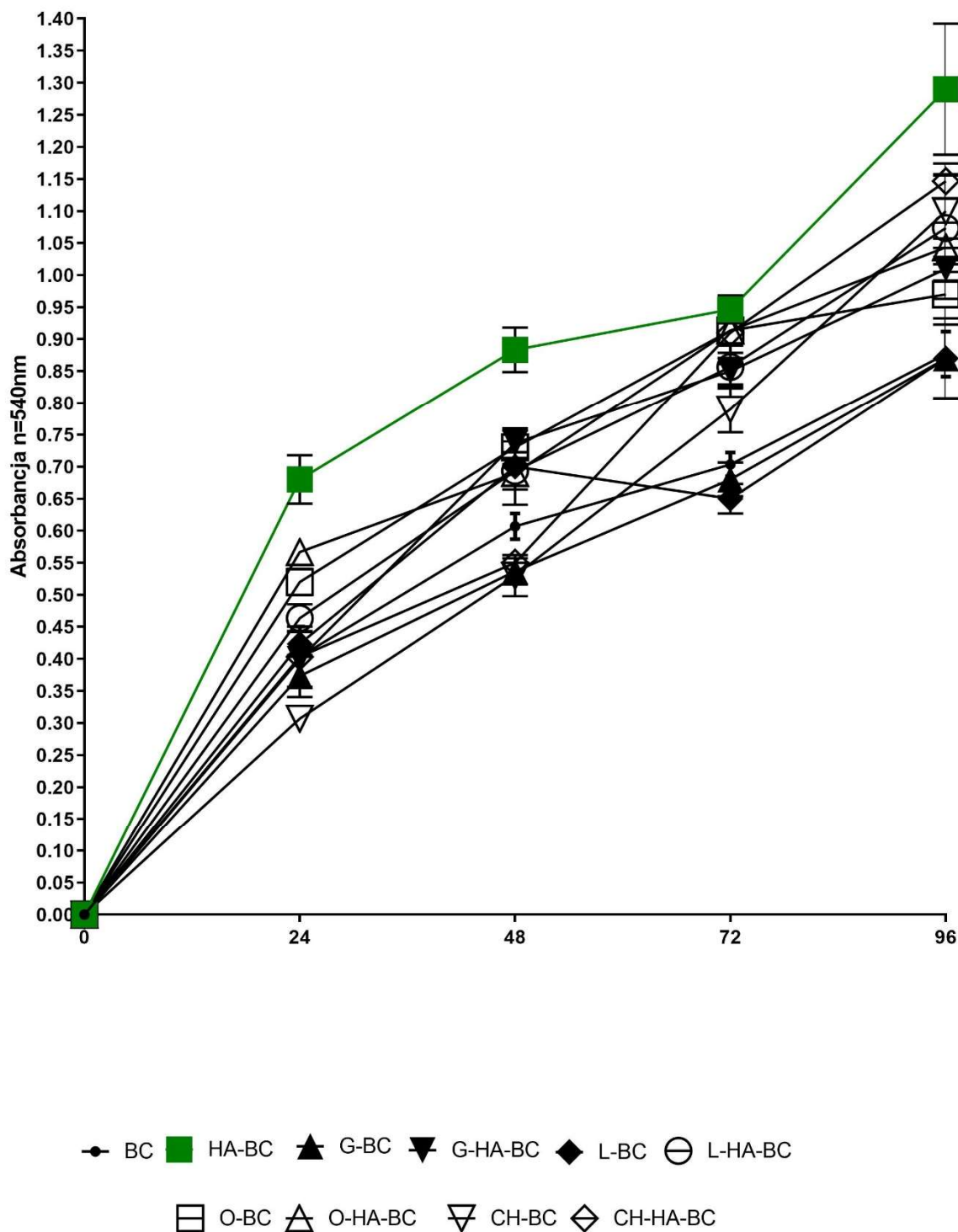
Wyniki przedstawione na **Wykresie 16** wskazują na istotne statystycznie zmniejszenie średnic stref zahamowania wzrostu ($p < 0.5$) na skutek uwalniania się związków przeciwdrobnoustrojowych (lewofloksacyny, oritawancyny) z nośników BC zawierających hydroksyapatyt, w porównaniu do nośników niezawierających hydroksyapatytu. W przypadku nośników modyfikowanych hydroksyapatytem i impregnowanych w roztworze gentamycyny lub chelerytryny również zaobserwowano zmniejszenie się stref zahamowania wzrostu w porównaniu do stref będących efektem aktywności tych związków przeciwdrobnoustrojowych wydzielanych z nośnika BC nie zawierającego HA, natomiast zaobserwowane różnice nie cechowały się istotnością statystyczną ($p < 0.5$).

Następnie ocenie poddano potencjalny wpływ cytotoksyczny kompozytów celulozowo-hydroksyapatytowych, jak i nośników BC (zawierających lub nie substancje przeciwdrobnoustrojowe (G, L, O, CH), względem linii osteoblastów U2-OS. Wyniki z badania normatywnego służącego określeniu cytotoksyczności przedstawione są na **Wykresie 17**.

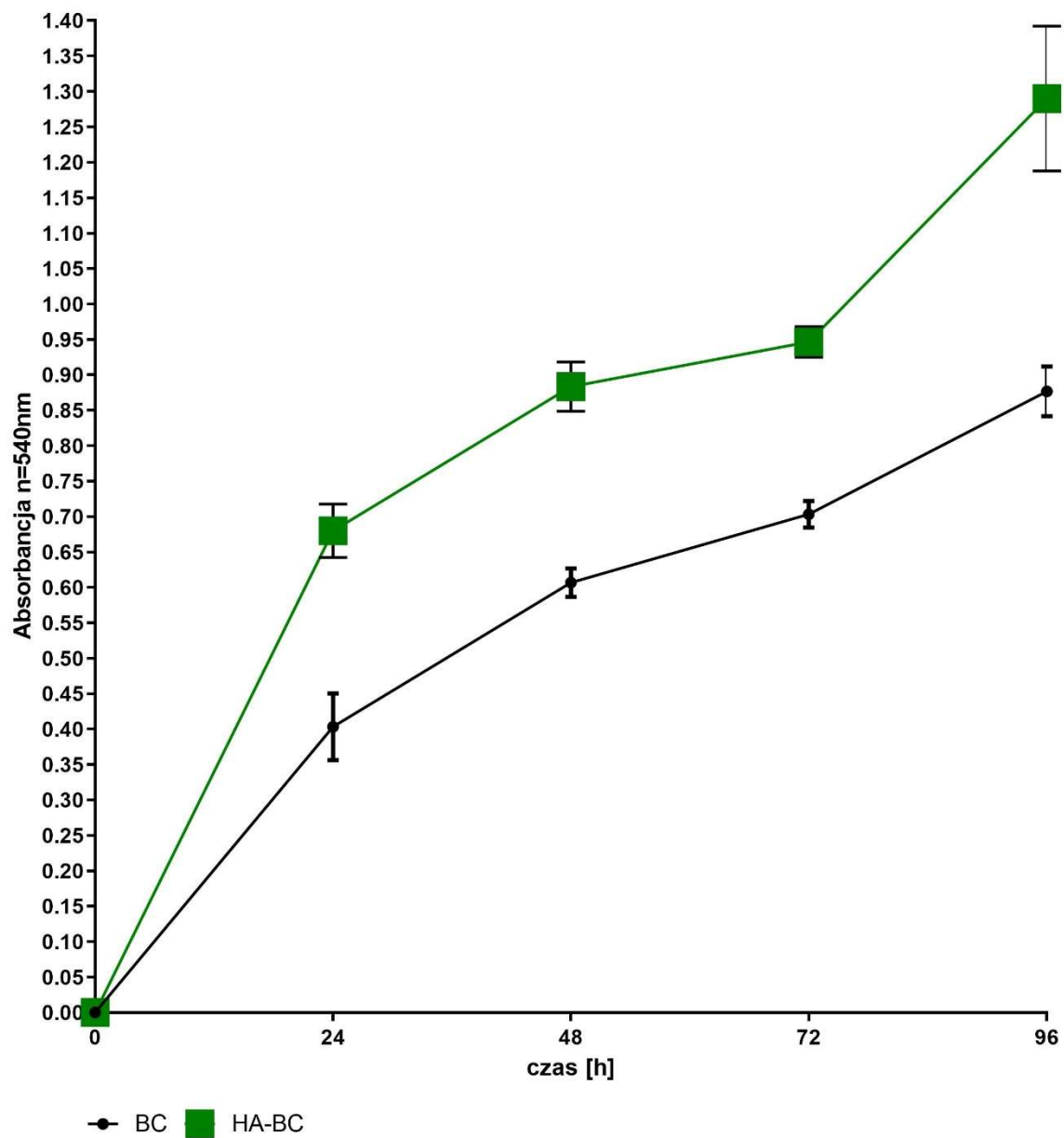


Wykres 17. Przeżywalność linii komórkowej osteoblastów po kontakcie z pożywką, w której uprzednio inkubowano nośniki BC. BC – celuloza natywna; HA-BC – celuloza zawierająca hydroksyapatyt; G, L, O, CH – gentamycyna, lewofloksacyna, oritawancyna, chelerytryna, odpowiednio.

Ponieważ wyniki przedstawione na **Wykresie 17** umożliwiły zakategoryzowanie wszystkich badanych nośników do kategorii nietoksyczne (w podstawowym badaniu normatywnym) przystąpiono do oceny możliwości zasiedlania nośników (ta analiza jest modyfikacją testu kontaktu bezpośredniego) w czasie 24 h, 48 h, 72h oraz 96h (**Wykresy 18-21**).

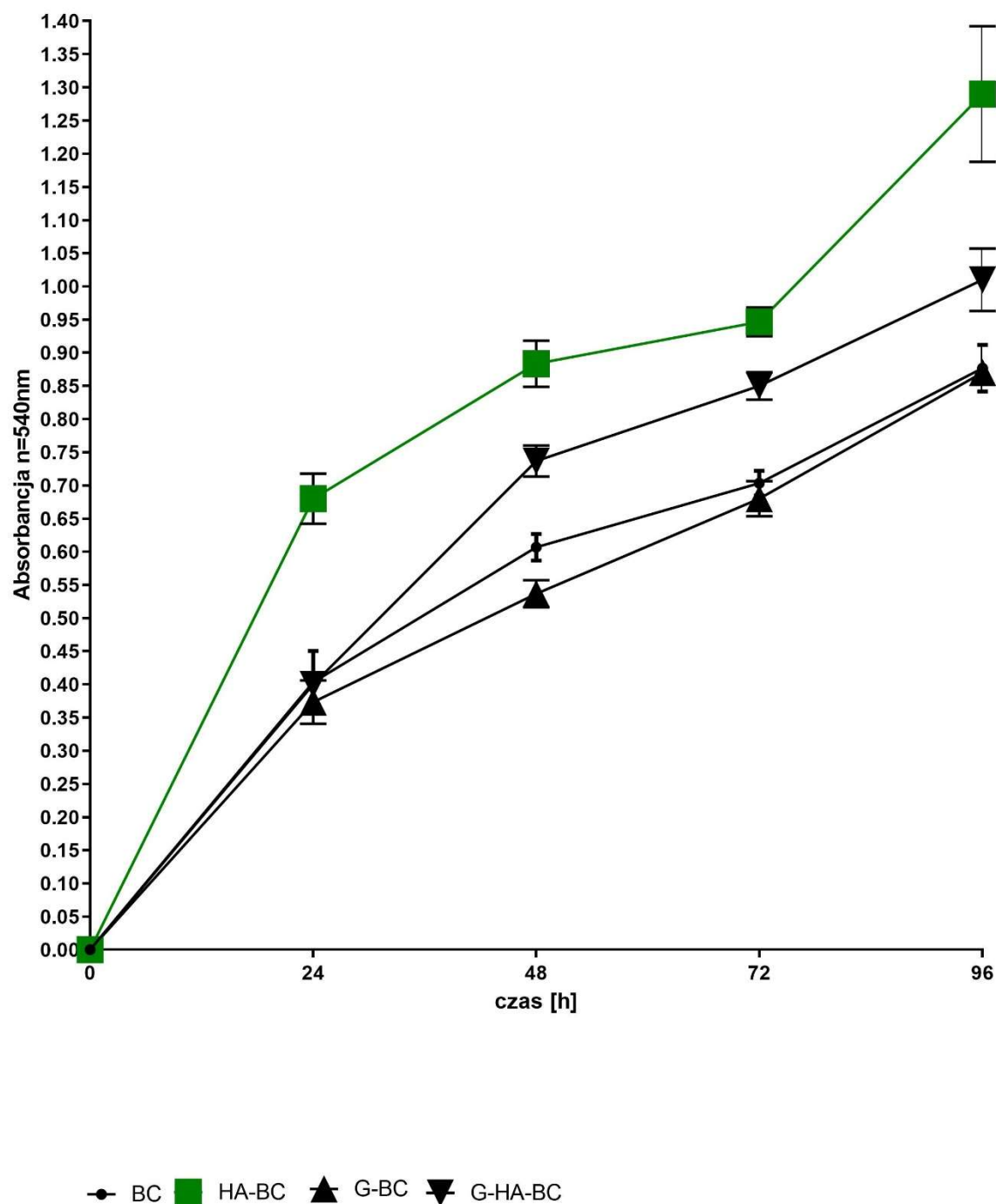


Wykres 18. Porównanie tempa zasiedlania osteoblastami wszystkich badanych nośników celulozowych. BC – celuloza natywna; HA-BC – celuloza zawierająca hydroksyapatyt; G, L, O, CH – gentamycyna, lewofloksacyna, oritawancyna, chelerytryna, odpowiednio.

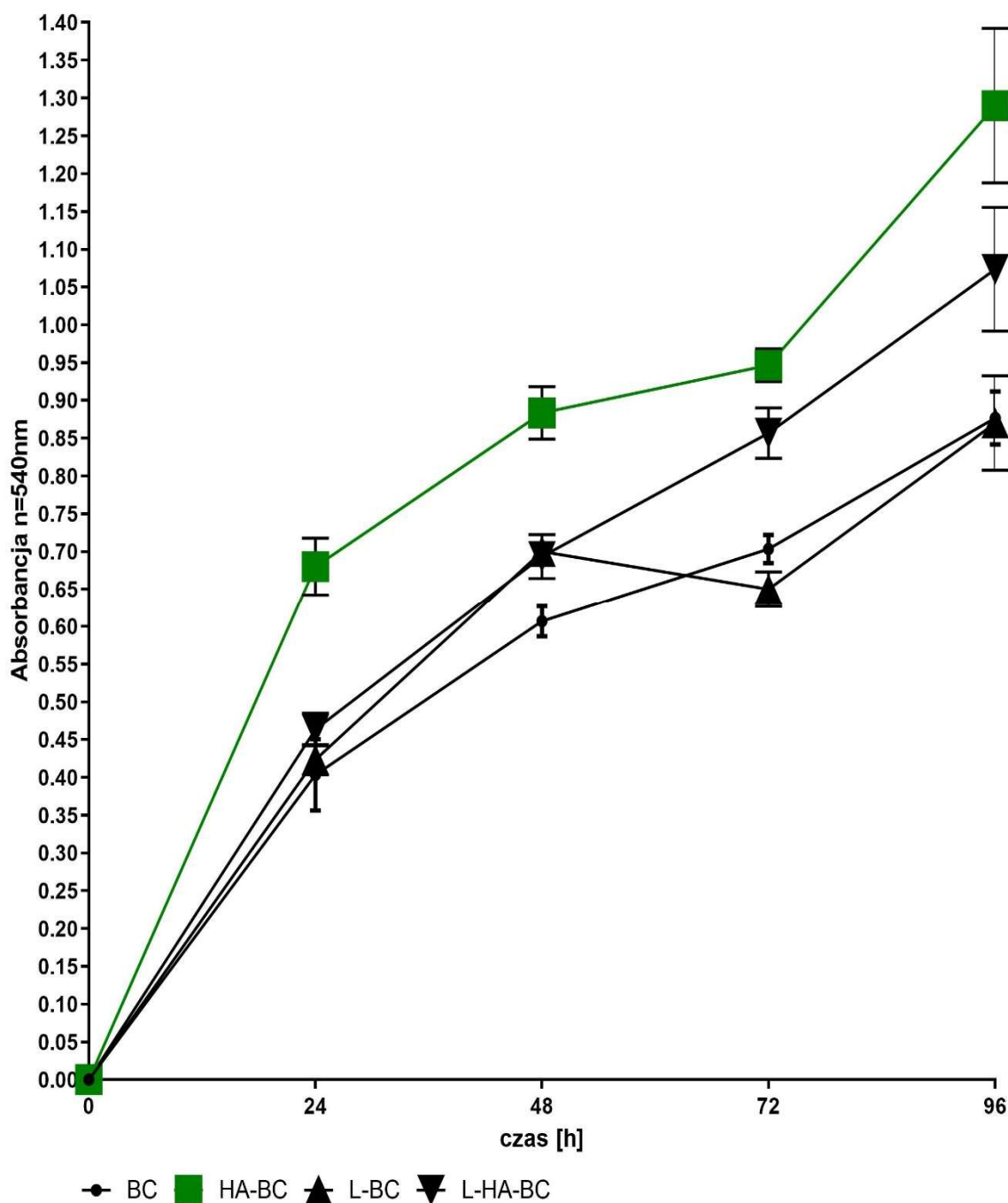


Wykres 19. Porównanie tempa zasiedlania osteoblastami nośników celulozowych BC i HA-BC.

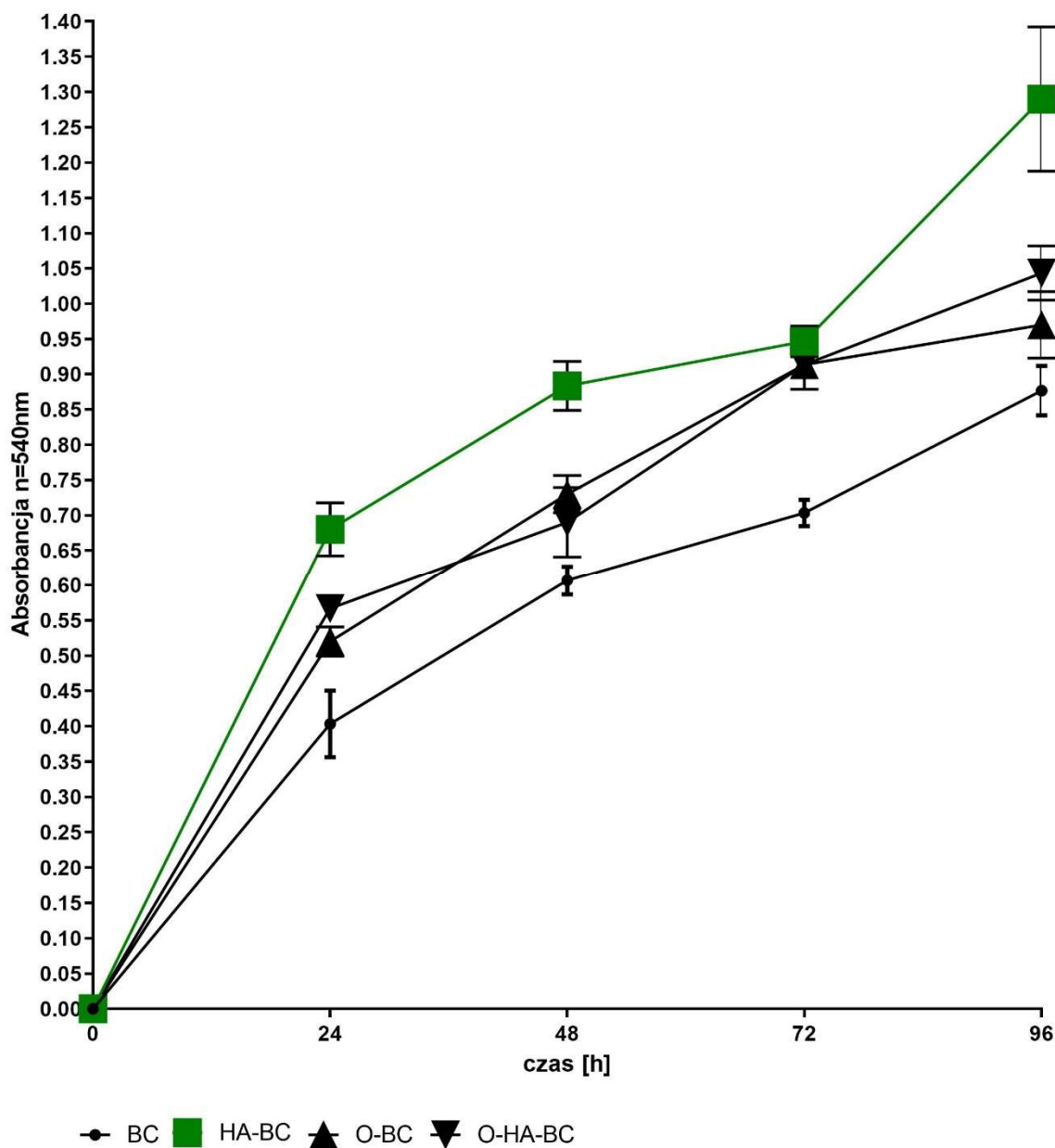
BC – celuloza natywna; **HA-BC** – celuloza zawierająca hydroksyapatyt.



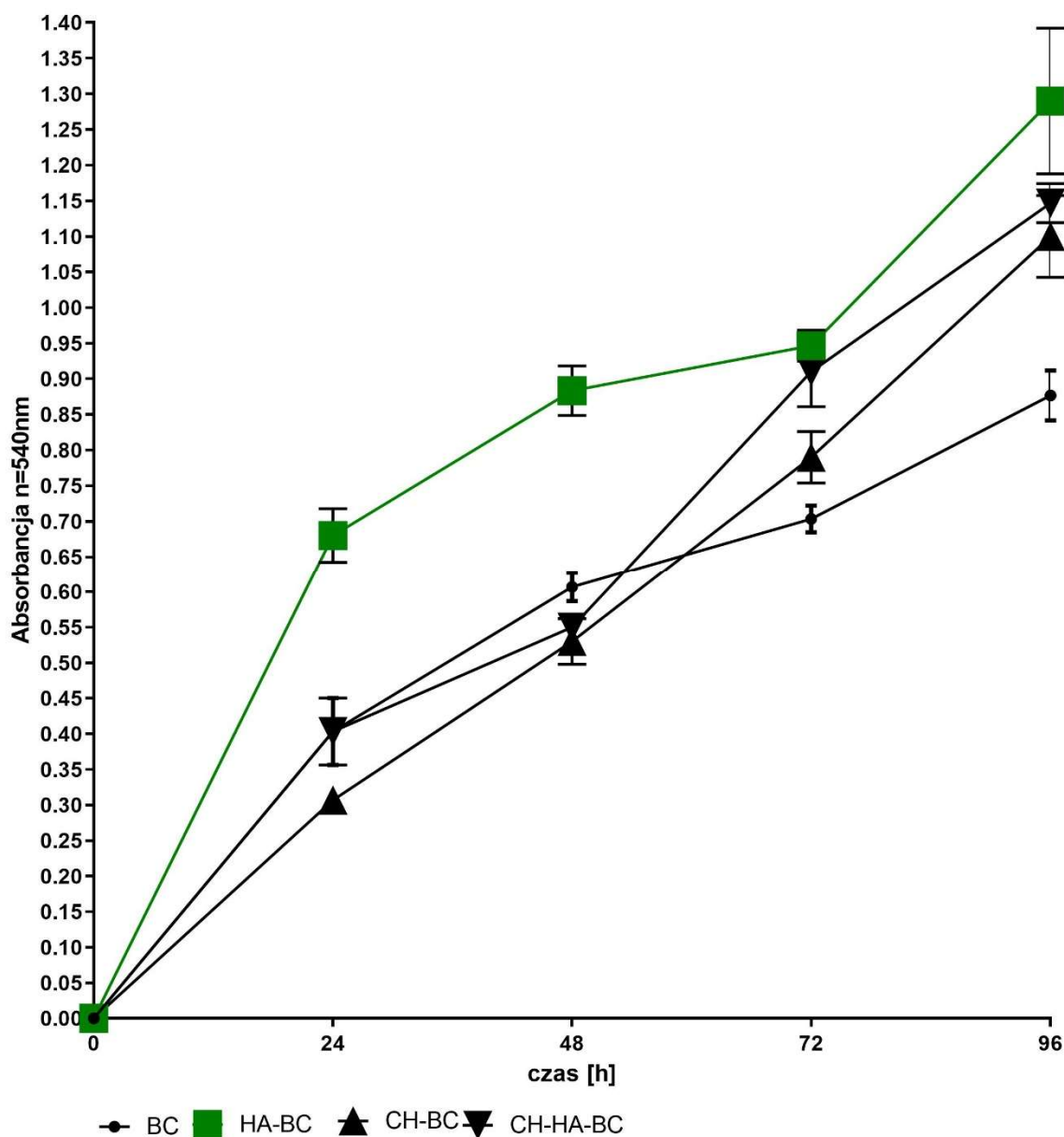
Wykres 20. Porównanie tempa zasiedlania osteoblastami nośników celulozowych BC i HA-BC vs G-BC i G-HA-BC. BC – celuloza natywna; HA-BC – celuloza zawierająca hydroksyapatyt; G-BC - celuloza zawierająca gentamycyny; G-HA-BC – celuloza zawierająca gentamycynę i hydroksyapatyt.



Wykres 21. Porównanie tempa zasiedlania osteoblastami nośników celulozowych BC i HA-BC vs L-BC i L-HA-BC. BC – celuloza natywna; HA-BC – celuloza zawierająca hydroksyapatyt; L-BC - celuloza zawierająca lewofloksacynę; L-HA-BC – celuloza zawierająca lewofloksacynę i hydroksyapatyt.



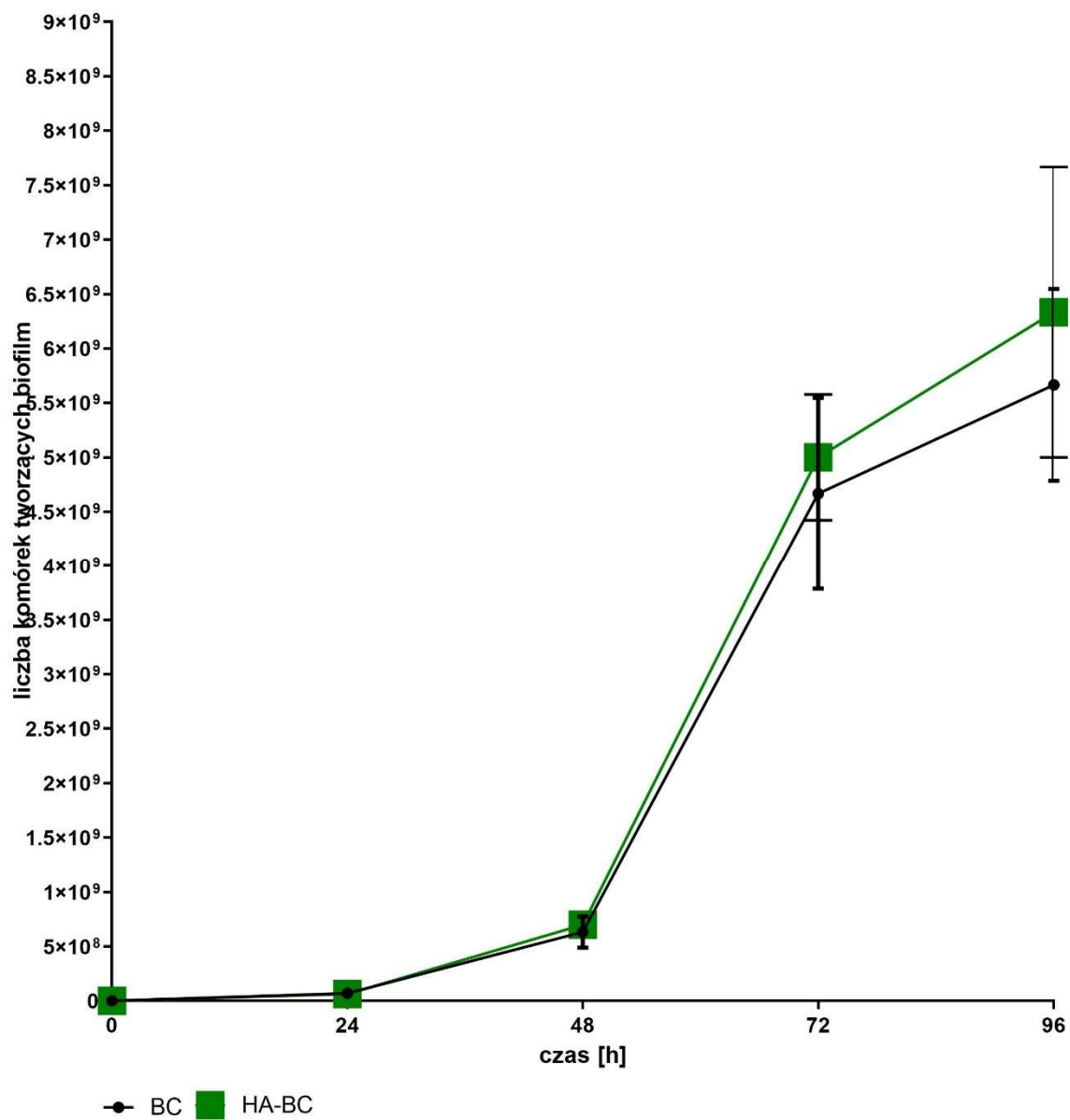
Wykres 22. Porównanie tempa zasiedlania osteoblastami nośników celulozowych BC i HA-BC vs O-BC i O-HA-BC. BC – celuloza natywna; HA-BC – celuloza zawierająca hydroksyapatyt; O-BC - celuloza zawierająca oritawancyne; O-HA-BC – celuloza zawierająca oritawancyne i hydroksyapatyt.



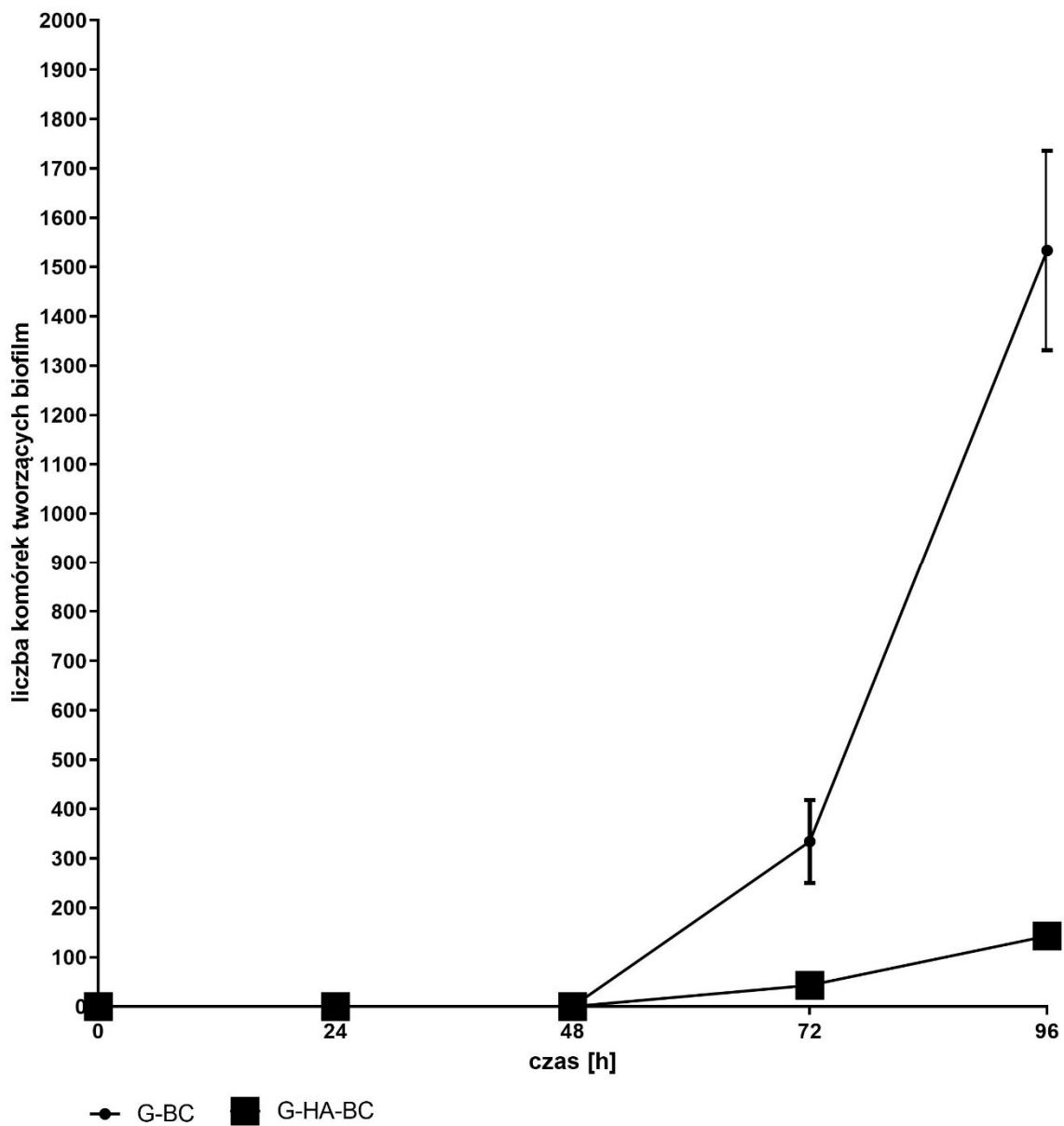
Wykres 23. Porównanie tempa zasiedlania osteoblastami nośników celulozowych BC i HA-BC vs CH-BC i CH-HA-BC. BC – celuloza natywna; HA-BC – celuloza zawierająca hydroksyapatyt; CH-BC - celuloza zawierająca chelerytrynę; CH-HA-BC – celuloza zawierająca chelerytrynę i hydroksyapatyt.

Wyniki przedstawione na **Wykresach 18-23** wykazały obecność trendu przejawiającego się, niezależnie od dodanej substancji przeciwdrobnoustrojowej, w wyższym stopniu i poziomie kolonizacji przez osteoblasty nośników zawierających hydroksyapatyt w porównaniu do nośników BC nie zawierających tego minerału. Dodatek antybiotyków nie wpływał istotnie na zmniejszenie poziomu kolonizacji osteoblastami, również wprowadzenie do nośnika BC lub HA-BC chelerytryny nie przekładało się na istotny spadek poziomu kolonizacji, jakkolwiek można było zaobserwować spowolnienie tego procesu pomiędzy 24 a 48 godziną inkubacji dla nośnika zawierającego hydroksyapatyt.

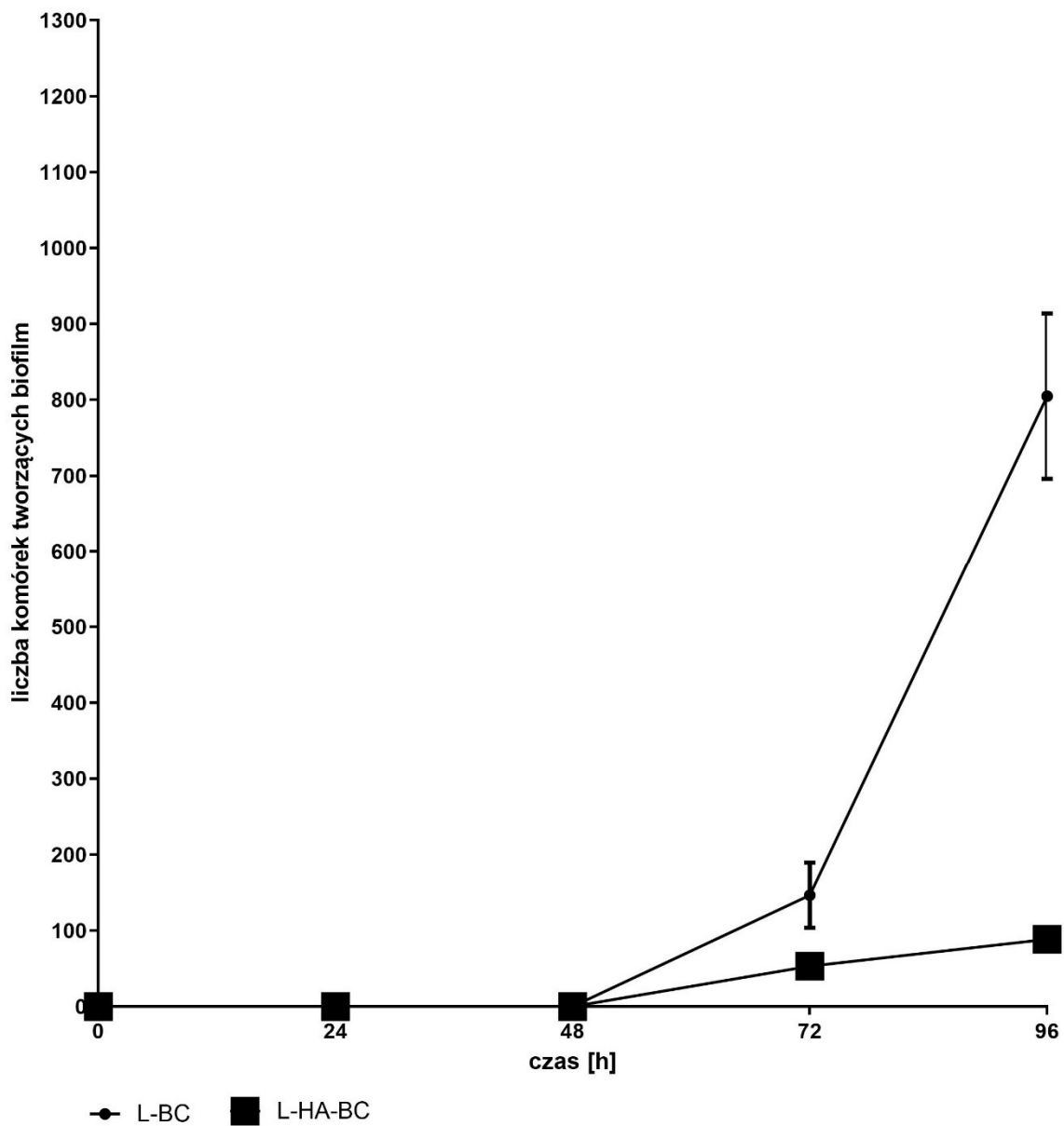
Kolejno, przystąpiono do ostatniej głównej części badania mającej na celu ocenić zdolność niemodyfikowanych i modyfikowanych nośników BC do sekwestracji komórek gronkowców złocistych i do powstrzymywania ich przed zasiedleniem powierzchni zawierających hydroksyapatyt (krążków HA i kości szczurów). Na **Wykresach 24-28** przedstawiono liczbę komórek gronkowca, które zostały zabsorbowane do nośników i rozwijały się w nich w czasie 0-96 h, z kolei w **Tabeli 8** oraz **Tabeli 9**, liczby komórek, które przeniknęły w czasie 0-96 h na chronione nośnikami BC powierzchnie krążków hydroksyapatytowych i, odpowiednio, kości długich szczurów.



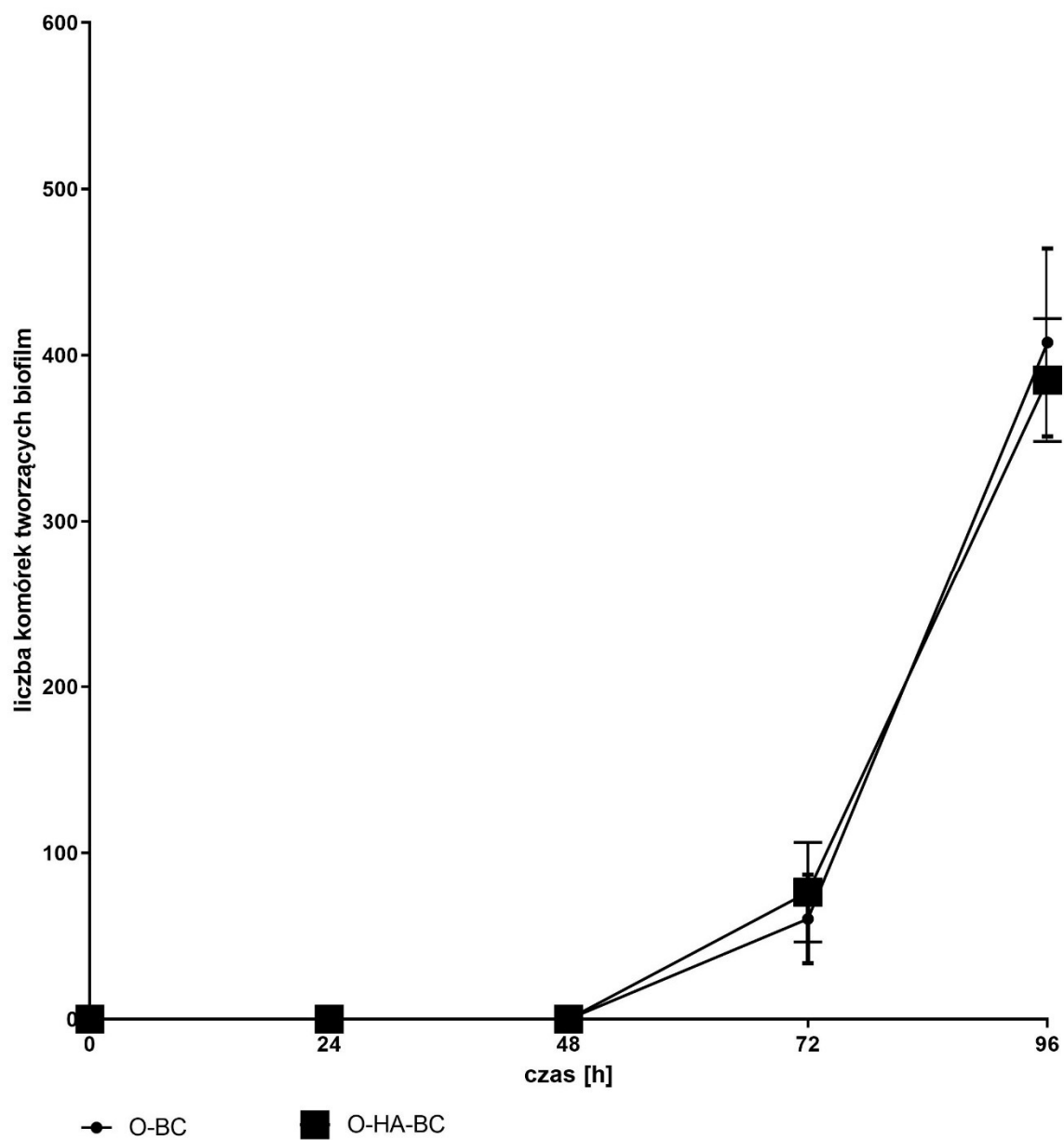
Wykres 24. Porównanie liczby komórek gronkowca złocistego w nośniku BC i HA-BC w ciągu 24-96h.



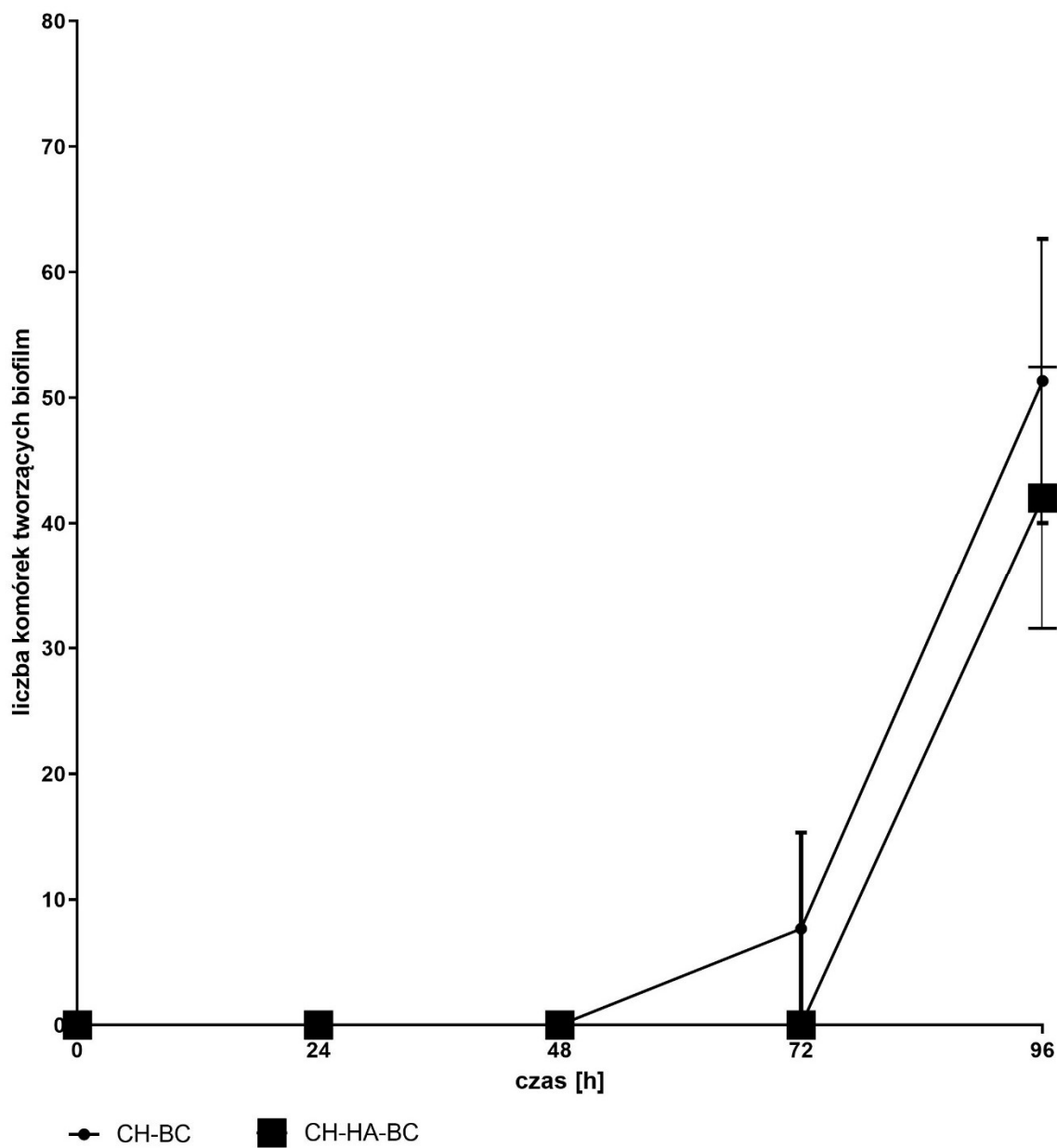
Wykres 25. Porównanie liczby komórek gronkowca złocistego w nośniku G-BC i G-HA-BC w ciągu 24-96h.



Wykres 26. Porównanie liczby komórek gronkowca złocistego w nośniku L-BC i L-HA-BC w ciągu 24-96h.



Wykres 27. Porównanie liczby komórek gronkowca złocistego w nośniku O-BC i O-HA-BC w ciągu 24-96h.



Wykres 28. Porównanie liczby komórek gronkowca złocistego w nośniku CH-BC i CH-HA-BC w ciągu 24-96h.

	czas kontaktowy (h)			
nośnik	24	48	72	96
krażek HA	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸
BC	n.w.	29±19	211±87	324±49
HA-BC	n.w.	n.w.	87±39	219±62
G-BC	n.w.	n.w.	37±25	72±33
G-HA-BC	n.w.	n.w.	9±8	62±28
L-BC	n.w.	n.w.	23±17	62±29
L-HA-BC	n.w.	n.w.	n.w.	47±18
O-BC	n.w.	11±7	16±3	49±12
O-HA-BC	n.w.	n.w.	7±4	18±9
CH-BC	n.w.	n.w.	n.w.	12±7
CH-HA-BC	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.

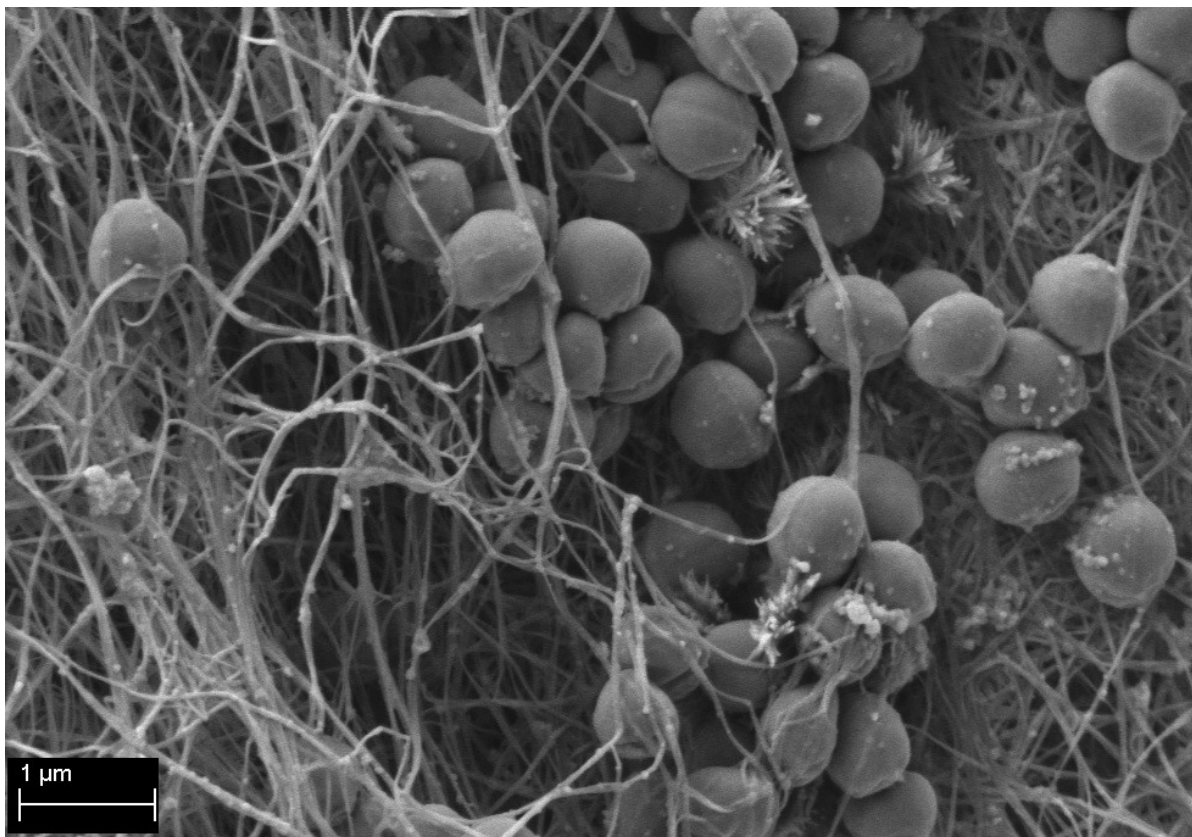
Tabela 8. Porównanie liczby komórek gronkowca na powierzchni krążków HA uprzednio osłoniętych nośnikami z celulozy. BC – celuloza natywna; HA-BC – celuloza zawierająca hydroksyapatyt; CH-BC - celuloza zawierająca chelerytrynę; CH-HA-BC – celuloza zawierająca chelerytrynę i hydroksyapatyt; n.w. – nie wykryto. Krążek HA – powierzchnia nieosłonięta nośnikiem BC modyfikowanym lub niemodyfikowanym.

	czas kontaktowy (h)			
nośnik	24	48	72	96
kość długa	10 ⁸	10 ⁹	10 ¹⁰	10 ¹⁰
BC	n.w.	93±24	463±111	893±143
HA-BC	n.w.	n.w.	172±56	724±187
G-BC	n.w.	n.w.	47±11	110±32
G-HA-BC	n.w.	n.w.	18±6	44±14
L-BC	n.w.	n.w.	54±14	178±71
L-HA-BC	n.w.	n.w.	29±8	43±7
O-BC	n.w.	33±13	77±47	42±11
O-HA-BC	n.w.	n.w.	16±9	87±31
CH-BC	n.w.	n.w.	n.w.	39±9
CH-HA-BC	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.

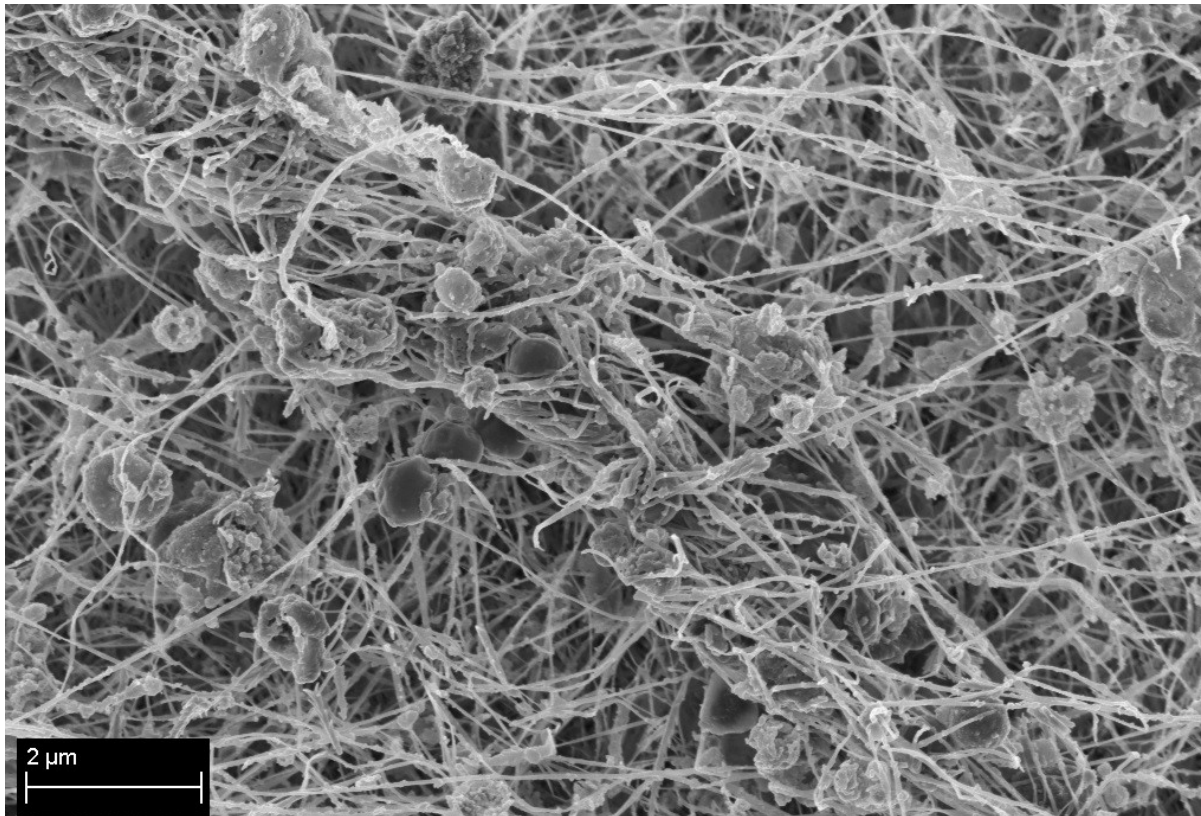
Tabela 9. Porównanie liczby komórek gronkowca na powierzchni kości uprzednio osłoniętych nośnikami z celulozy. BC – celuloza natywna; HA-BC – celuloza zawierająca hydroksyapatyt; CH-BC - celuloza zawierająca chelerytrynę; CH-HA-BC – celuloza zawierająca chelerytrynę i hydroksyapatyt; n.w. – nie wykryto. Kość długa – powierzchnia nieosłonięta nośnikiem BC modyfikowanym lub niemodyfikowanym.

Uzyskane wyniki, przedstawione na **Wykresie 24** wskazują na porównywalną liczbę komórek gronkowca złocistego zatrzymanego przez nośniki celulozowe: natywne (BC) oraz zawierające hydroksyapatyt (HA-BC). Obserwowana różnica między liczbą komórek gronkowców zasiedlających te nośniki nie cechowała się istotnością statystyczną ($p > 0.5$) na skutek względnie wysokiego odchylenia standardowego od uzyskanych średnich wyników. Z kolei liczba komórek gronkowca wykryta na nośnikach zawierających hydroksyapatyt oraz gentamycynę lub lewofloksacynę, bądź chelerytrynę była w 72-96 godzinie trwania eksperymentu istotnie niższa ($p < 0.5$) w porównaniu do nośników BC zawierających wyżej wymienione związki przeciwdrobnoustrojowe, ale niezawierających hydroksyapatytu (**Wykres 25, 26, 28**). Podobnej zależności nie zaobserwowano, gdy związkiem przeciwdrobnoustrojowym inkorporowanym do nośnika BC była oritawancyna (**Wykres 27**). Proces przenikania i rozwoju gronkowca złocistego przez nośniki BC cechował się zróżnicowaną dynamiką, w zależności od tego, czy powierzchnią chronioną przez nośnik był krążek hydroksyapatytowy, czy kość długa. W przypadku tej pierwszej powierzchni, liczba komórek gronkowca uzyskiwała plateau od 48 h, a w przypadku kości długiej od 72 h od rozpoczęcia inkubacji (**Tabela 8 i Tabela 9**). Trendem obserwowanym dla wszystkich układów badawczych, niezależnie od zastosowanej substancji przeciwdrobnoustrojowej i powierzchni wzrostowej była niższa przenikalność gronkowców przez te nośniki BC, które w swoim składzie zawierały substancję przeciwdrobnoustrojową oraz hydroksyapatyt w porównaniu do nośnika natywnego BC oraz nośników zawierających substancje przeciwdrobnoustrojowe, a nie zawierające hydroksyapatytu. Zaobserwowano również wyższą przenikalność gronkowców w układzie, w której powierzchnią chronioną przez nośniki była kość długa, w porównaniu do układu, w której powierzchnią chronioną był krążek hydroksyapatytowy.

Porównując skuteczność substancji przeciwdrobnoustrojowych w nośnikach BC zawierających hydroksyapatyt, należy zauważyć, że najwyższą zdolnością do hamowania przenikania gronkowców do powierzchni wzrostowych cechowała się chelerytryna - w przypadku nośnika CH-HA-BC, niezależnie od zastosowanej powierzchni wzrostowej, mieralne namnażanie się komórek gronkowców obserwowane było dopiero w 96 godzinie inkubacji. Wśród zastosowanych antybiotyków najwyższą skutecznością cechowała się z kolei oritawancyna. Jakkolwiek komórki gronkowców, przenikały przez nośnik O-HA-BC o 24 godziny wcześniej niż w przypadku CH-HA-BC (w 72 godzinie), to ich liczba była niższa, niezależnie od tego czy nośnik osłaniał krążki hydroksyapatytowe czy kości długie, od liczby gronkowców zdolnych do przeniknięcia przez nośniki G-HA-BC i L-HA-BC. Ponieważ analizy ilościowe wykazały, że nośnik zawierający chelerytrynę cechuje się najwyższą skutecznością do sekwestracji i eradykacji gronkowców złocistych MRSA, na **Zdjęciach 5** oraz **6** przedstawiono komórki tego patogenu na nośniku pozbawionym i zawierającym tę substancję przeciwdrobnoustrojową po 48h inkubacji. Jak można zaobserwować na **Zdjęciu 5**, komórki gronkowca niepoddane ekspozycji na chelerytrynę (w nośniku natywnym) cechują się wysokim turgorem oraz niezmienną morfologią, podczas gdy komórki gronkowca poddane ekspozycji na chelerytrynę (**Zdjęcie 6**) wykazują obniżony turgor oraz zmienioną morfologię, co związane jest z prawdopodobnym mechanizmem działania chelerytryny polegającym między innymi na uszkodzeniu ciągłości ścian komórkowych drobnoustroju.



Zdjęcie 5. Komórki gronkowca złocistego w nośniku celulozowym po 48 godzinach inkubacji. Brak zmian morfologicznych i zmian w turgorze komórek.



Zdjęcie 6. Komórki gronkowca złocistego w nośniku celulozowym zawierającym chelerytrynę po 48 godzinach inkubacji. Widoczne są komórki o zmniejszonym turgorze, zmienionej morfologii oraz liczne, silnie uszkodzone komórki.

5. Dyskusja

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, a w efekcie do martwicy kości i odłączania się jej fragmentów nazywanych martwakami lub sekwestrami [46]. Częstość występowania septycznego zapalenia stawów wynosi 2 - 10 na 100 000 osób oraz 30 - 70 na 100 000 pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów. Z kolei częstość występowania krwiopochodnego zapalenia kości i szpiku wynosi około 20 przypadków na 100 000 pacjentów. Choroby te nieleczone lub leczone w sposób nieprawidłowy prowadzić mogą do poważnych powikłań zdrowotnych a nawet śmierci pacjenta.

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 [11].

Rezultaty badań przeprowadzonych w ostatnich latach wykazały, że *S.aureus* cechuje się zdolnością do sekwestracji kości nawet bez udziału układu immunologicznego [47]. Rozwój komórek w formie biofilmu na powierzchniach kostnych doprowadza do okresowych zmian wartości pH w mikrośrodowisku tej struktury i uszkodzeń macierzy kostnej [19]. W efekcie, gronkowiec złocisty jest w stanie wnikać pod powierzchnię kości i rozwijać się w tym obszarze unikając odpowiedzi immunologicznej. Wykazano zdolność biofilmu gronkowca do rozkładu i żywienia się różnego rodzaju komórkami pacjenta – w tym osteoblastami [48].

Wysoka oporność gronkowców złocistych, szczególnie MRSA, na antybiotyki znacznie ogranicza możliwe opcje terapeutyczne. Podawane układowo antybiotyki, zwłaszcza te hamujące proces transkrypcji lub translacji, nie mają zadowalającej skuteczności.

Może to wynikać z faktu, że w głębi struktury kostnej jest zmniejszona dostępność tlenu – co powoduje zwiększenie ilości wytwarzanej macierzy pozakomórkowej i obniżenie aktywności metabolicznej komórek gronkowca [49]. Prowadzi to do niepełnej eradykacji biofilmu oraz do nawrotów infekcji.

Wiedza i doświadczenie, dotyczące zapobiegania i leczenia zakażeń kości i stawów, zostały usystematyzowane, stały się ogólnie dostępne, dzięki powstaniu konsensusu filadelfijskiego [50]. Określono w nim między innymi czynniki ryzyka i sposoby jego zmniejszania. Jednym z możliwych sposobów, zmniejszających ryzyko infekcji jest wprowadzenie w obręb miejsca operowanego różnego rodzaju biokompatybilnych nośników (na przykład kolagenowych gąbek [51] lub hydroksyapatytu [52] zawierających gentamycynę i inne antybiotyki). Nośniki takie, stosowane są miejscowo, co umożliwia dostarczenie do miejsca zmienionego zapalnie istotnie wyższych stężeń antybiotyku niż tych osiągniętych poprzez podanie układowe. Obecnie zauważalne jest olbrzymie zapotrzebowanie na nowe rodzaje nośników tego typu. Powinny się one cechować wysoką biokompatybilnością, umożliwiając narastanie w ich głąb komórkom kostnym (osteoblastom oraz osteocytom) oraz przede wszystkim istotnie zmniejszać (a optymalnie – nie pozwalać) rozwój drobnoustrojów, które mogą dostać się w obszar wymagający operacji przez bezpośrednią kontaminację, drogą krwiopochodną czy inną.

Dlatego też, w mojej pracy doktorskiej zwróciłem uwagę na jeden z najbardziej fascynujących polimerów naturalnych, którego cechy oraz potencjalna aplikacja, studiowane są w laboratoriach badawczych na całym świecie, czyli bakteryjną celulozę (BC).

Należy zauważyć, że polimer ten możliwy jest do uzyskania z podstawowych surowców, będących często odpadami powstałymi podczas różnego rodzaju procesów obróbki żywności spożywczej. Doniesienia ostatnich lat wskazują na możliwość uzyskania BC o satysfakcjonującej jakości między innymi z soku jabłkowego, odpadów krochmalniczych a nawet ze ścieków [53, 54]. Niezależnie od sposobu uzyskania, bakteryjna celuloza, po oczyszczeniu z komórek w relatywnie łatwym do przeprowadzenia procesie lizy alkalicznej, cechuje się szeregiem cech predysponujących ją do zastosowania w farmacji i medycynie, takimi jak wysoka zdolność do pochłaniania i oddawania wody (oraz innych płynów), wysoka porowatość, brak cytotoksyczności, neutralne pH, elastyczność oraz wysoka kompatybilność. Porowata struktura BC stanowi także dla komórek eukariotycznych rusztowanie, do pewnego stopnia, przypominające środowisko (macierz pozakomórkową), w której komórki te bytują w warunkach naturalnych. Złożona, elastyczna powierzchnia (będąca efektem usieciowania BC) oraz występujące w rusztowaniu pory, umożliwiają komórkom eukariotycznym szybszy rozwój niż ma to miejsce w przypadku różnego rodzaju abiotycznych powierzchni płaskich [55]. W znaczeniu zapobieganiu infekcji kości fakt ten ma olbrzymie znaczenie z powodu zjawiska tak zwanego „wyścigu o powierzchnię” (ang. „race for surface”), w którym – w przypadku kontaminacji miejsca operowanego – biorą udział bakterie i komórki (w tym wypadku komórki kostne) gospodarza [56, 57]. Z racji szybszego tempa podziału, komórki bakteryjne są faworyzowane w tym wyścigu, a zajmowanie przez nie kolejnych obszarów kolonizacyjnych i sekrecja różnego rodzaju czynników szkodliwych (np. toksyn) dodatkowo spowalnia rozwój komórek eukariotycznych. Dlatego tak istotne jest stworzenie środowiska przyspieszającego rozwój osteoblastów i osteocytów i jednocześnie spowalniającego namnażania się bakterii i tworzenia przez nie biofilmu. Niestety, porowate, elastyczne powierzchnie złożone (takie jak struktura BC) są również idealnym środowiskiem dla rozwoju mikroorganizmów.

Tak więc, do pewnego stopnia, wykorzystanie nośnika BC pozbawionego zawartości środka przeciwdrobnoustrojowego byłoby jedynie przyspieszeniem „wyścigu o powierzchnię” i prowadziłyby do szybszego namnażania nie tylko komórek kostnych, ale i drobnoustrojów. Z drugiej strony rozważyć należy możliwość wprowadzenia w miejsce operowane natywnego nośnika BC (bez dodatku związku przeciwdrobnoustrojowego) oraz usunięcie go po odpowiednio dobranym czasie. Można założyć, że w zależności od grubości i stopnia usieciowania BC, mikroorganizmy ulegną sekwestracji w obrębie struktury nośnika i nie przenikną do powierzchni kości. W tym samym czasie, komórki kostne pokryte jałowym, biokompatybilnym nośnikiem BC, rozpoczną proces proliferacji i odbudowy struktury kostnej. Dodatkowo, w celu zapewnienia komórkom kostnym środowiska jak najbardziej przypominającego to, w którym bytują naturalnie, wskazanym jest wprowadzenie do nośnika BC mineralnego komponentu kości, czyli hydroksyapatytu.

Zasadną zdaje się także koniugacja BC z substancjami, które hamowałyby rozwój drobnoustrojów, nie wpływając ujemnie na rozwój komórek kostnych. Mając na względzie narastającą oporność gronkowców na antybiotyki, należałoby rozważyć zastosowanie związku nie-antybiotykowego, lecz wykazującego aktywność przeciwdrobnoustrojową i porównanie poziomu jej aktywności ze stosowanymi już w leczeniu infekcji kości antybiotykami.

Dlatego też, w mojej pracy doktorskiej podjąłem się charakterystyki aktywności różnego rodzaju nośników z bakteryjnej celulozy, począwszy od natywnego, poprzez nośnik zawierający hydroksyapatyt, po nośniki zawierające hydroksyapatyt oraz chelerytrynę - relatywnie proste do uzyskania (w znaczeniu zarówno technologicznym jak i ekonomicznym) związki pochodzenia roślinnego o wykazanej uprzednio aktywności przeciwostronkowcowej [24]. Jako rozbudowane układy kontrolne posłużyły mi nośniki BC (wzbogacone lub nie wzbogacone hydroksyapatytem), zawierające antybiotyki gentamycynę, lewofloksacynę oraz oritawancynę.

Przed rozpoczęciem badań właściwych nad skutecznością wytworzonych nośników BC wykonałem szereg analiz, mających na celu określenie zdolności szczepów gronkowca złocistego MRSA do tworzenia biofilmu *in vitro* oraz jego wrażliwości na stosowane w kolejnych etapach pracy, związki przeciwdrobnoustrojowe. W skład badanej przeze mnie grupy wchodziły zarówno szczepy kliniczne izolowane z zakażeń kości, jak i szczep referencyjny. Badania ostatnich lat oraz rosnący poziom wiedzy mikrobiologicznej (będący efektem zastosowania zaawansowanych technik genomicznych, metabolomicznych oraz proteomicznych) przełożyły się na narastające zrozumienie wagi zmienności wewnątrzgatunkowej bakterii w aspekcie ich odpowiedzi na bodźce [58]. Obecnie bakterie nie są (i nie mogą być) traktowane jedynie jako proste biologiczne automaty, które cechują się zbliżoną odpowiedzią na ten sam bodziec zewnętrzny. Świadczy o tym nie tylko, do pewnego stopnia oczywiste, zróżnicowanie ich wzorów oporności na antybiotyki (**Tabela 1, Wykres 1**), ale przede wszystkim istotnie zróżnicowana zdolność do tworzenia biofilmu wykazana w badaniach przesiewowych przedstawionych na **Wykresie 2** oraz na **Wykresie 3**. W obrębie badanej puli szczepów wyróżniono aż 4 grupy różniące się siłą tworzenia biomasy biofilmowej (grupa I tworzyła biofilm najslabiej, grupa IV najsilniej), przy czym obserwowane różnice między grupami były istotne statystycznie. Różnica w poziomie biomasy między szczepem najslabiej a najsilniej tworzącym biofilm (**Wykres 2, Tabela 2**) była niemal siedmiokrotna. Ekstrapolując te wyniki na sytuację kliniczną należy zauważyć, że możliwość eradykacji z kości szczepu MRSA najsilniej tworzącego biofilm może być obarczona znacznie wyższym ryzykiem niepowodzenia niż szczepu należącego do wyróżnionej na **Wykresie 3** grupy I. Mając jednak świadomość występowania tak wysokich różnic w zdolności biofilmu, zasadnym zdaje się zastosowanie profilaktyczne środków zdolnych do eradykacji szczepów o najwyższej zdolności do tworzenia biofilmu.

Przedstawione na **Wykresie 2** oraz **3** dane powstały z wykorzystaniem techniki umożliwiającej pomiar poziomu tak zwanej biomasy biofilmowej, czyli zarówno komórek, jak i zewnątrzkomórkowej macierzy. Należy jednak postawić pytanie o proporcje pomiędzy tymi dwoma komponentami. Uważa się, że im większy jest udział komponentu macierzy w biofilmie, tym penetracja różnego rodzaju środków przeciwdrobnoustrojowych przez tę strukturę i w efekcie eradykacja biofilmu jest trudniejsza [59]. Przyjmuje się, że biofilm jest strukturą tworzoną przez komórki osadzone w zewnętrznej macierzy polimerowej [60]. Jednakże w warunkach *in vitro*, takich jak te użyte w niniejszej pracy, stwierdzenie to zdaje się nie odzwierciedlać w pełni stanu faktycznego. Biofilmy gronkowców *in vitro* są wielowarstwowymi, przylegającymi do powierzchni, agregatami komórek, natomiast udział komponentu macierzy zdaje się być znacznie niższy niż komponentu komórkowego. W celu potwierdzenia tej tezy, wykonałem badanie określające poziom aktywności metabolicznej biofilmu, które jednocześnie (w sposób niebezpośredni) określa liczbę komórek tworzących biofilm (**Wykres 4, 5, 6, Tabela 3**).

Uzyskane wyniki wykazały wysoką korelację między poziomem tworzenia biomasy biofilmowej a komponentą komórkową biofilmu. Oznacza to, że udział komponentu macierzy biofilmowej w całej strukturze jest niski, a większość biofilmu tworzona jest przez warstwowo ułożone komórki gronkowca złocistego. Wyniki te, pochodzące z analizy ilościowej (poziom pomiaru absorbancji fioletu krystalicznego bądź formazanu) potwierdzono z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej (**Zdjęcie 1 A, B, C**). Z jej pomocą zaobserwowano liczne warstwy komórek gronkowca złocistego, niepokryte macierzą zewnątrzkomórkową. Zastosowanie wyższych powiększeń obrazujących (**Zdjęcie 1D**) pozwoliło na dostrzeżenie połączeń międzykomórkowych, nieprzypominających jednak macierzy tworzonej przez np. poli-N-acetyloglukozaminę, jeden z głównych komponentów polisacharydowych macierzy biofilmu gronkowca [61].

Z drugiej strony, obecność zaobserwowanych połączeń międzykomórkowych, potwierdza fakt, że w zastosowanym układzie eksperymentalnym doszło do wytworzenia biofilmu gronkowcowego, a nie osiadłych na skutek prowadzenia hodowli w sposób statyczny skupisk gronkowcowych, pozbawionych cech funkcjonalnych biofilmu.

W kolejnym etapie badań określono zdolność gronkowców do formowania biofilmu na różnych powierzchniach zawierających hydroksyapatyt – proszku, krążkach oraz na kościach długich szczurów. Charakter powierzchni ma decydujące znaczenie dla rozwoju biofilmu (pozostałymi głównymi czynnikami jest czas hodowli, pożywka oraz zastosowana atmosfera). Wyżej wymienione powierzchnie cechowały się zróżnicowaniem w aspekcie kształtu, obszaru oraz (porównując proszek i krążki do kości długich) również składem. Powierzchnia cząstek proszku hydroksyapatytowego cechowała się największą łączną powierzchnią, natomiast krążki hydroksyapatytowe najwyższą gładkością (uzyskaną podczas procesu tłoczenia i spiekania). Z kolei kości długie szczurów wykazywały najwyższe zróżnicowanie topograficzne oraz pod względem składu tworzących je komponentów. Dlatego też w przypadku tego ostatniego materiału spodziewano się najwyższych odchyłeń standardowych w uzyskanych wynikach. Biorąc pod uwagę niską przydatność techniki wykorzystującej fiolet krystaliczny do barwienia biofilmów rosnących na hydroksyapatytach (będącej efektem ciężko odwracalnego i silnego wiązanie się tego barwnika z materiałem) zdecydowano się na wykonanie badań bazujących na posiewie ilościowym komórek tworzących biofilm. W związku z powyższym, do grupy badanej zakwalifikowano 10 szczepów o zróżnicowanej (od słabej do silnej) zdolności do tworzenia biofilmu, uprzednio oszacowanej w badaniach przesiewowych. Szczepy te tworzyły biofilm na proszku hydroksyapatytowym (**Wykres 7, 8**) w odwrotny sposób niż na powierzchni polistyrenowej (szczepy wchodzące do grupy I - w sposób najsilniejszy, a wchodzące w skład grupy IV – w sposób najslabszy).

Z kolei siła tworzenia biofilmu na krążkach hydroksyapatytowych wykazywana przez badane szczepy (**Wykres 9, 10**) korelowała z wynikami uzyskanymi dla powierzchni polistyrenowej. Przyczyną takiego zjawiska mogło być wspomniane już wyżej podobieństwo obu tych powierzchni w aspekcie stopnia ich gładkości. W badaniach innych autorów, zajmujących się wpływem struktury materiałów na proces adhezji, parametr ten określany angielskim mianem „roughness” czyli szorstkości zaliczany jest do kluczowych cech warunkujących szybkość przylegania oraz tempo kolonizacji komórkowej [62]. Wyniki uzyskane dla kości długich jako powierzchni wzrostowych (**Wykres 11, 12**) prezentowały odmienny trend zarówno w porównaniu do cząsteczek proszku, jak i krążków hydroksyapatytowych. Szczepy uprzednio skategoryzowane do grupy I oraz IV w aspekcie siły tworzenia biofilmu (niska i wysoka, odpowiednio) tworzyły tę strukturę na porównywalnym między sobą poziomie, kilkakrotnie wyższym niż szczepy, które uprzednio włączono do grupy tworzącej biofilm w sposób umiarkowany. Niestety, zgodnie z przewidywaniami, średnie wartości odczytów cechowały się wysokimi odchyleniami standardowymi. W celu dodatkowego potwierdzenia obecności biofilmów gronkowców na analizowanych powierzchniach wykonano zatem ich obrazowanie za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (**Zdjęcie 2**). Podobnie jak w przypadku biofilmów tworzonych na insertach, również biofilmy tworzone na cząsteczkach proszku i krążkach hydroksyapatytowych a także na kościach szczurów charakteryzowały się obecnością licznych warstw komórek oraz skąpym udziałem macierzy zewnątrzkomórkowej. Uzyskane wyniki, zbiorczo przedstawione w **Tabeli 4**, wskazują zarówno na istotny wpływ zmienności wewnątrzgatunkowej w aspekcie tworzenia biofilmu oraz na istotny wpływ powierzchni (na której biofilm jest hodowany) na tę cechę. Wnioskiem o wyższym poziomie ogólności płynącym z tej serii doświadczeń jest konieczność stosowania zróżnicowanych modeli badawczych w celu uzyskania wiarygodnych danych mogących służyć jako podstawa do kolejnych badań, wykonanych na modelu zwierzęcym, a następnie badań klinicznych.

Udowodniwszy zdolność badanych gronkowców złocistych MRSA do tworzenia biofilmu na powierzchniach zawierających hydroksyapatyt, wykonałem serię analiz określających zdolność związków (gentamycyny, lewofloksacyny, oritawancyny oraz chelerytryny mających być wprowadzonych do wytworzonych nośników BC) do eradykacji zarówno komórek planktonicznych, jak i biofilmu tworzonego przez *S.aureus*. Dane przedstawione w **Tabeli 5** oraz **Tabeli 6** wykazały znacząco podniesioną tolerancję biofilmu gronkowców na użyte związki przeciwdrobnoustrojowe, co pozostaje w zgodzie z danymi z piśmiennictwa [63] wskazującymi na obronną funkcję tej struktury przed szeroko definiowanymi czynnikami zewnętrznymi. Stosunkowo najniższą różnicę w minimalnych stężeniach hamujących i eradykujących biofilm wykazano dla chelerytryny, co może mieć związek z jej mechanizmem działania [26], przypominającym ten występujący u takich antyseptyków jak oktenidyna czy poliheksanidyna, a polegającym na niszczeniu integralności ścian komórkowych drobnoustrojów, wycieku cytoplazmy do środowiska zewnętrznego a w efekcie śmierci komórek [64, 65]. Z drugiej strony, dla 4 szczepów eksponowanych na chelerytrynę nie wyznaczono wartości MBEC, a jedynie wartość redukcji biofilmu poniżej 100%. Wszystkie szczepy użyte w kolejnych badaniach cechowały się – w różnym zakresie - wrażliwością na badane związki przeciwdrobnoustrojowe (chelerytryna oraz antybiotyki) zastosowane w określonym przedziale stężeń. Jakkolwiek możliwość „przełamania” oporności szczepów na gentamycynę poprzez zastosowanie wysokich stężeń tego antybiotyku (możliwych do uzyskania w warunkach podania miejscowego) została wykazane przez Mączyńską i wsp. [45], to jednak w mojej pracy nie zdecydowałem się na włączenie szczepów opornych do grupy badanej, mając na względzie fakt, że wprowadzenie kolejnej zmiennej do (i tak już złożonego) układu badawczego, może przełożyć się na uzyskanie ciężkich do zinterpretowania danych wymagających przeprowadzenia dodatkowych analiz odbiegających już znacząco od głównego nurtu badawczego.

Udowodniwszy, że szczepy MRSA wchodzące w skład grupy badanej są w stanie tworzyć biofilm na powierzchniach hydroksyapatytowych oraz wykazawszy ich (zróżnicowaną) wrażliwość na szereg środków przeciwdrobnoustrojowych, podjąłem się wytworzenia nośników BC mających w finalnej części mojej pracy posłużyć jako okładzina sekwestrująca, chroniąca powierzchnie przed dostępem patogenów. Uzyskany przeze mnie i oczyszczony nośnik natywny BC (**Zdjęcie 3 po prawej**) wykazywał cechy wagowe oraz pochłaniania i oddawania wody (**Wykres 12**) zbliżone do tych uzyskiwanych przez innych badaczy [**53, 66**], podczas gdy nośnik wzbogacony o dodatek hydroksyapatytu (HA-BC, **Zdjęcie 4**) charakteryzował się zdolnością oddawania wody o blisko jedną trzecią niższą od nośnika natywnego (**Wykres 13**), co mogło być spowodowane obecnością w jego strukturze cząstek stałych HA spowalniających proces ewaporacji cieczy. W kolejnym etapie badań, do nośników BC oraz HA-BC wprowadzono związki przeciwdrobnoustrojowe i oszacowano ich aktywność po uwolnieniu się z nośnika za pomocą metody dyfuzyjnej na płytkach agarowych zawierających gronkowce złociste posiane metodą na murawę (**Tabela 7**). Zaobserwowano strefy zahamowania wzrostu dookoła wszystkich typów nośników, przy czym trendem wspólnym było wytworzenie większych stref wzrostu dookoła nośników zawierających środki przeciwdrobnoustrojowe ale nie zawierające hydroksyapatytu w porównaniu do nośników zawierających ten związek mineralny. Możliwymi przyczynami stojącymi za zaobserwowanym zjawiskiem był niższe tempo uwalniania substancji z nośników HA-BC (skutkujące uwalnianiem niższych stężeń w określonym przedziale czasowym), niższa objętość zaabsorbowanych roztworów związków przeciwdrobnoustrojowych (na skutek potencjalnego blokowania porów przez wytworzony hydroksyapatyt) bądź łączenie się związków przeciwdrobnoustrojowych z hydroksyapatytem [**67**].

Niemniej jednak, przeprowadzona analiza wykazała możliwość skutecznego uwalniania się antybiotyków oraz alkaloidu roślinnego zarówno z natywnych nośników BC jak i tych zawierających dodatek hydroksypatytu.

Mając na względzie fakt, że opracowywany nośnik powinien cechować się brakiem cytotoksyczności oraz wysoką biokompatybilnością, oraz mając świadomość, że inkorporacja związków przeciwdrobnoustrojowych do nośnika może zmieniać jego parametry w aspekcie cech biologicznych, wykonano analizy określenia stopnia ich cytotoksyczności *in vitro* (**Wykres 15**). Wszystkie nośniki cechowały się, zgodnie z wymogami normatywnymi brakiem cytotoksyczności. Najwyższym spadkiem przeżywalności osteoblastów (lecz wciąż pozostającym w zakresie normatywnego „braku cytotoksyczności”) cechował się nośnik zawierający chelerytrynę. W badaniach innych autorów wykazano, że alkaloid ten w wysokich stężeniach prowadzić może do uszkodzeń i śmierci komórek eukariotycznych [68]. Biorąc jednak pod uwagę prawidłowość wyników uzyskanych w tym badaniu dla układu kontrolnego (komórki nieeksponowane na aktywność żadnego środka przeciwdrobnoustrojowego) oraz spójne z omawianą analizą wyniki dla kolejnych badań (ocena tempa zasiedlania nośników przez osteoblasty) należy przyjąć, że w użytych stężeniach oraz przy zastosowanej metodzie normatywnej, chelerytryna nie prowadzi do uszkodzeń użytej linii komórkowej.

Porównanie tempa zasiedlania nośników przez osteoblasty wykazało istotnie wyższy – w całym przebiegu doświadczenia, to znaczy od 24 do 96 godziny- poziom kolonizacji nośników HA-BC w porównaniu do nośników BC pozbawionych hydroksypatytu (**Wykres 16 i 17**). Wynik ten pozostaje w zgodności z danymi innych autorów wykazujących hydroksypatytyt jako podłoże przyspieszające proces kolonizacji przez różnego rodzaju komórki kostne, a także ich różnicowanie [69].

Także nośniki zawierające HA oraz substancje przeciwdrobnoustrojowe cechowały się wyższym poziomem i tempem kolonizacji przez osteoblasty niż nośniki BC nie zawierające hydroksyapatytu a zawierające substancje przeciwdrobnoustrojowe (**Wykresy 18-21**). Założyć można, że optymalna do rozwoju osteoblastów powierzchnia hydroksyapatytu niwelowała do pewnego stopnia wpływ substancji przeciwdrobnoustrojowych, które w określonych stężeniach zdolne są do negatywnych interakcji również z komórkami eukariotycznymi. Nośniki BC z chelerytryną wykazywały również w tym badaniu odmienne właściwości od nośników zawierających antybiotyki. W punkcie pomiarowym w 48 godzinie, obserwowany był spadek tempa zasiedlania nośnika osteoblastami, jednakże ulegał on przyśpieszeniu w kolejnych dobach. Finalnie, przeprowadzono badanie mające na celu określenie zdolności wytworzonych nośników do hamowania procesu adhezji gronkowca złocistego i tworzenia biofilmu na powierzchniach zawierających hydroksyapatyt.

W badaniach wstępnych przeprowadzonych przez pracowników Katedry, w której wykonywałem swoje badania [44], posłużono się do tego celu układem badawczym zawierającym nośniki celulozowe z gentamycyny lub nośniki natywne oraz kości długie szczurów wprowadzane do pożywki płynnej bakteriologicznej. Układ ten mógł sprzyjać przedostawaniu się bakterii przez nośnik na zasadzie ruchów Browna, spowodowanych ruchem cieczy. W celu uniknięcia tego zjawiska w mojej pracy oparłem się o badanie normatywne wykorzystywane do oceny skuteczności włóknistych materiałów filtrujących, które przeprowadzane jest w komorze wilgotnej, i które nie wymaga wprowadzenia układu badawczego do naczyń zawierających pożywkę bakteriologiczną. Badanie przeprowadzono w okresie czasowym wynoszącym 96 godzin, analogicznie do badania nad tempem zasiedlania nośnika przez osteoblasty. Co 24 godziny wykonywano posiew komórek gronkowca złocistego zarówno z nośnika, jak i z powierzchni, którą okrywał (krażki hydroksyapatytowe lub kości długie szczurów (**Tabela 8 – 9**)).

Uzyskane wyniki ponownie wykazały istotność zastosowanej powierzchni wzrostowej – komórki gronkowca przedostawały się szybciej i silniej tworzyły biofilm na zróżnicowanej topograficznie powierzchni kości niż na gładkiej powierzchni krążków hydroksyapatytowych. Przyczyną tego zjawiska może być zróżnicowane naprężenie nośnika pokrywającego kości, przekładające się na zmiany w porowatości i usieciowaniu celulozy, które w określonych zmianach mogły nie stanowić odpowiedniej bariery dla drobnoustrojów. Niemniej jednak, w zastosowanym układzie badawczym, zaobserwowano zdolność natywnego nośnika BC do sekwestracji komórek gronkowca w pierwszych 24 godzinach inkubacji i w okresie 24 - 48 godzin inkubacji, gdy okładziną sekwestrującą był nośnik HA-BC. Należy zwrócić uwagę na fakt, że w użytym układzie badawczym zastosowano jako *inoculum* zawiesinę zawierającą 10^4 komórek drobnoustrojów. Mając na względzie normy stawiane pomieszczeniom chirurgicznym w aspekcie czystości powietrza i dezynfekcji oraz wymogi dotyczące antyseptyki ciała pacjentów przed operacją oraz personelu medycznego, można założyć, że *inoculum* drobnoustrojów, mogące kontaminować odsłoniętą powierzchnię kości, cechuje się prawdopodobnie istotnie niższą liczbą komórek bakteryjnych (jakkolwiek empiryczne udowodnienie tej hipotezy cechuje się wysokim poziomem trudności). Niemniej jednak, dokonując ekstrapolacji wyników *in vitro* uzyskanych dla nośników BC i HA-BC na warunki kliniczne, należy wziąć powyższy fakt pod rozwagę. Przyjmując zatem to założenie, należy stwierdzić, że zdolność sekwestracji patogenów w obrębie struktury nośników BC oraz HA-BC w warunkach klinicznych powinna cechować się wyższą skutecznością niż ta obserwowana w warunkach *in vitro*.

Z kolei wprowadzenie do nośników BC oraz HA-BC substancji przeciwdrobnoustrojowych przekładało się na istotnie zmniejszone tempo kolonizacji i przenikania komórek bakteryjnych w głąb struktury celulozowej i finalnie na zmniejszony poziom adhezji gronkowców do powierzchni krążków hydroksyapatytowych oraz kości długich szczurów, niezależnie od zastosowanego związku (antybiotyków bądź chelerytryny). Mimo że w badaniach przedstawionych w **Tabeli 7** nośniki BC z chelerytryną nie cechowały się najwyższą skutecznością przeciwdrobnoustrojową w porównaniu do nośników BC zawierających antybiotyki, to w układzie badawczym wykorzystującym komorę wilgotną oraz w którym wprowadzono drobnoustroje na górną warstwę BC, to właśnie zastosowanie nośników BC zawierających hydroksyapatyt oraz chelerytrynę przekładało się na brak penetracji gronkowców na powierzchnię krążków HA i kości długich w całym okresie trwania doświadczenia (24h-96h). Należy zauważyć, że nośniki CH-HA-BC cechowały się wydłużonym, w porównaniu do nośników BC bez hydroksyapatytu czasem uwalniania wody. Zjawisko to widoczne było także przy zastosowaniu metody dyfuzyjno-krążkowej, w której jak wspomniano uwalnianie chelerytryny na powierzchnię agaru nie prowadziło do powstawania większych stref zahamowania wzrostu w porównaniu do stref zahamowania wzrostu będących efektem aktywności określonych antybiotyków. W odróżnieniu od antybiotyków, które dostarczone były przez producentów w postaci rozpuszczalnych w wodzie soli, chelerytryna rozpuszczana była w hydrofobowym rozpuszczalniku organicznym, dimetylosulfotenu. Mając na względzie wyżej wymienione czynniki, należy przypuszczać, że cząsteczki chelerytryny pozostawały w wyższym stężeniu i przez dłuższy okres czasu w nośnikach BC, co przełożyło się na wyższą zdolność tego alkaloidu do eradykacji patogenów, niż miało to miejsce w przypadku antybiotyków, które z kolei działały skuteczniej w podstawowych układach badawczych służących do określenia wartości MIC oraz MBEC (**Tabela 5** oraz **Tabela 6**).

W świetle przedstawionych przeze mnie wyników, najwyższą potencjalną skutecznością do hamowania rozwoju biofilmu gronkowcowego na powierzchni kości cechują się nośniki BC zawierające hydroksyapatyt oraz chelerytrynę. Nośniki HA-BC zawierające antybiotyki, zastosowane przeze mnie jako rozbudowana grupa kontrolna, również cechują się pożądanymi właściwościami, natomiast ich stosowanie powinno być w warunkach klinicznych poprzedzone identyfikacją wzorów oporności czynnika etiologicznego zakażenia i zastosowania antybiotyków, na które drobnoustrój ten wykazuje wrażliwość. Zastosowanie natywnych nośników BC oraz nośników BC, zawierających hydroksyapatyt jako okładzin okrywających kość, również można uznać za potencjalnie przydatne, przy założeniu względnie niskiego inoculum bakterii kontaminujących pole operacyjne.

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.

6. Wnioski

1. Analizy dotyczące zdolności szczepów gronkowca złocistego do penetracji przez nośniki mające służyć jako okładziny na kości powinny uwzględniać wysoką zmienność wewnątrzgatunkową *Staphylococcus aureus* w aspekcie nie tylko cech podstawowych, takich jak profil antybiotykoodporności, ale także różnice w aktywności metabolicznej oraz zdolności do produkcji biomasy biofilmowej.
2. Zdolność gronkowców złocistych do formowania biofilmu w dużym mierze zależy od zastosowanej powierzchni wzrostowej oraz od zastosowanego układu badawczego. Należy posilkować się wynikami pochodzącymi z przynajmniej kilku układów doświadczalnych przed wyciągnięciem wniosków koniecznych do przeprowadzenia kolejnych doświadczeń.
3. Nośniki z bakteryjnej celulozy cechują się pożądanymi parametrami fizycznymi predysponującymi je do zastosowaniu w charakterze okładzin na kości
4. Dodatek hydroksyapatytu do bakteryjnej celulozy podnosi tempo zasiedlania tego nośnika przez komórki kościotwórcze, osteoblasty.

5. Poziom skuteczności nośników z bakteryjnej celulozy niezawierających środków przeciwdrobnoustrojowych jako okładziny hamującej penetrację drobnoustrojów do powierzchni kości zależy odwrotnie proporcjonalnie od liczby drobnoustrojów (inoculum) osadzonych na zewnętrznej powierzchni celulozy.
6. Nośniki z bakteryjnej celulozy zawierające antybiotyki cechują się wysoką skutecznością w aspekcie hamowania penetracji gronkowca złocistego (przy założeniu wrażliwości danego szczepu na określony antybiotyk).
7. Nośnik z bakteryjnej celulozy zawierający hydroksyapatyt oraz chelerytrynę cechuje się najkorzystniejszymi łącznymi parametrami w aspekcie jego zastosowania jako okładziny hamującej penetrację gronkowca złocistego na powierzchnię kości.
8. Uzyskane wyniki skłaniają do podjęcia bardziej zaawansowanych badań na modelu zwierzęcym.

7. Spis Tabel, Zdjęć i Wykresów

- Tabela 1.** Profil antybiotykooporności badanych szczepów gronkowca złocistego [str. 36-37]
- Tabela 2.** Średnie różnice [%] w zdolności do tworzenia biomasy biofilmowej między poszczególnymi arbitralnie ustanowionymi grupami [str. 41]
- Tabela 3.** Średnie różnice [%] w zdolności do tworzenia biomasy biofilmowej między poszczególnymi arbitralnie ustanowionymi grupami [str. 47]
- Tabela 4.** Siła tworzenia biofilmu przez poszczególne szczepy gronkowców złocistych MRSA w zależności od zastosowanej powierzchni wzrostowej [str. 57]
- Tabela 5.** Wartości Minimalnego Stężenia Hamującego wyznaczonych dla badanych związków przeciwdrobnoustrojowych. [str. 58]
- Tabela 6.** Wartości Minimalnego Stężenia Eradykującego Biofilm wyznaczonych dla badanych związków przeciwdrobnoustrojowych. [str. 59]
- Tabela 7.** Średnica stref zahamowania wzrostu gronkowca złocistego na skutek aktywności związków przeciwdrobnoustrojowych wydobywających się z nośników celulozowych [str.66]
- Tabela 8.** Porównanie liczby komórek gronkowca na powierzchni krążków HA uprzednio osłoniętych nośnikami z celulozy [str.82]
- Tabela 9.** Porównanie liczby komórek gronkowca na powierzchni kości uprzednio osłoniętych nośnikami z celulozy. [str.83]
-
- Zdjęcie 1.** Obrazowanie biofilmu tworzonego przez gronkowce złociste MRSA z wykorzystaniem Skaningowej Mikroskopii Elektronowej [str. 47]
- Zdjęcie 2.** Powierzchnie wzrostowe do rozwoju biofilmu [str. 49]
- Zdjęcie 3.** Makro- oraz mikro-struktura nośnika BC [str. 62]
- Zdjęcie 4.** Modyfikowany kompozyt HA-BC oraz natywny nośnik BC [str. 64]
- Zdjęcie 5.** Komórki gronkowca złocistego w nośniku celulozowym po 48 godzinach inkubacji. [str.86]
- Zdjęcie 6.** Komórki gronkowca złocistego w nośniku celulozowym zawierającym chelerytrynę po 48 godzinach inkubacji [str.87]
-
- Wykres 1.** Oporność [%] szczepów gronkowca złocistego MRSA (n=50) na antybiotyki wykorzystane w antybiogramie [str. 38]
- Wykres 2.** Zdolność badanych szczepów MRSA (n=50) do tworzenia biomasy biofilmowej oceniana za pomocą barwienia fioletem krystalicznym [str. 39]

- Wykres 3.** Różnice pomiędzy grupami w zdolności badanych szczepów MRSA (n=50) do tworzenia biomasy biofilmowej oceniana za pomocą barwienia fioletem krystalicznym. [str. 40]
- Wykres 4.** Ocena poziomu aktywności metabolicznej badanych szczepów MRSA (n=50) wykonana z wykorzystaniem techniki Richardsa [str. 42]
- Wykres 5.** Brak istotnych różnic statystycznych w poziomie aktywności metabolicznej ocenianej metodą Richardsa między grupami szczepów zaliczanych w pomiarze poziomu tworzenia biomasy biofilmowej do grup III i IV [str.44]
- Wykres 6.** Różnice pomiędzy grupami w poziomie aktywności metabolicznej badanych szczepów MRSA (n=50) oceniana za pomocą barwienia z chlorkiem tetrazoliowy [str. 46]
- Wykres 7.** Porównanie liczby komórek szczepów gronkowca złocistego MRSA tworzącego biofilm na proszkach hydroksyapatytowych [str. 51]
- Wykres 8.** Porównanie różnic w zdolności badanych szczepów do tworzenia biofilmu na cząsteczkach proszku hydroksyapatytowego [str.52]
- Wykres 9.** Porównanie liczby komórek szczepów gronkowca złocistego MRSA tworzącego biofilm na krążkach hydroksyapatytowych [str. 53]
- Wykres 10.** Porównanie różnic w zdolności badanych szczepów do tworzenia biofilmu na krążkach hydroksyapatytowych. [str. 54]
- Wykres 11.** Porównanie liczby komórek szczepów gronkowca złocistego MRSA tworzącego biofilm na kościach długich [str.55]
- Wykres 12.** Porównanie różnic w zdolności badanych szczepów do tworzenia biofilmu na kościach długich szczurów [str. 56]
- Wykres 13.** Redukcja [%] biofilmu przez chelerytrynę [str. 60]
- Wykres 14.** Proces oddawania wody przez nośnik BC w czasie [str.63]
- Wykres 15.** Proces oddawania wody przez nośnik HA-BC w czasie [str.65]
- Wykres 16.** Średnie wartości średnicy stref zahamowania wzrostu gronkowca na skutek aktywności związków przeciwdrobnoustrojowych uwalniających się z nośników BC i kompozytów BC zawierających hydroksyapatyt [str. 67]
- Wykres 17.** Przeżywalność linii komórkowej osteoblastów po kontakcie z pożywką, w której uprzednio inkubowano nośniki BC [str. 69]
- Wykres 18.** Porównanie tempa zasiedlania osteoblastami wszystkich badanych nośników celulozowych [str. 70]
- Wykres 19.** Porównanie tempa zasiedlania osteoblastami nośników celulozowych BC i HA-BC [str.71]
- Wykres 20.** Porównanie tempa zasiedlania osteoblastami nośników celulozowych BC i HA-BC vs G-BC i G-HA-BC [str. 72]
- Wykres 21.** Porównanie tempa zasiedlania osteoblastami nośników celulozowych BC i HA-BC vs L-BC i L-HA-BC [str. 73]

Wykres 22. Porównanie tempa zasiedlania osteoblastami nośników celulozowych BC i HA-BC vs O-BC i O-HA-BC [str. 74]

Wykres 23. Porównanie tempa zasiedlania osteoblastami nośników celulozowych BC i HA-BC vs CH-BC i CH-HA-BC. [str. 75]

Wykres 24. Porównanie liczby komórek gronkowca złocistego w nośniku BC i HA-BC w ciągu 24-96h [str.77]

Wykres 25. Porównanie liczby komórek gronkowca złocistego w nośniku G-BC i G-HA-BC w ciągu 24-96h. [str.78]

Wykres 26. Porównanie liczby komórek gronkowca złocistego w nośniku L-BC i L-HA-BC w ciągu 24-96h [str.79]

Wykres 27. Porównanie liczby komórek gronkowca złocistego w nośniku O-BC i O-HA-BC w ciągu 24-96h. [str. 80]

Wykres 28. Porównanie liczby komórek gronkowca złocistego w nośniku CH-BC i CH-HA-BC w ciągu 24-96h [str.81]

8. Oświadczenie dotyczące zgody Komisji Bioetycznej na przeprowadzenie badań



UNIWERSYTET MEDYCZNY IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU

Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej i Parazytologii
Prof. dr hab. Marzenna Bartoszewicz

Wrocław, 23.02.2022

Oświadczenie dotyczące zgody Komisji Bioetycznej

Oświadczam, że badania w ramach pracy doktorskiej pt: „Ocena przydatności matrycy biocelulozowej do nieantybiotykowej profilaktyki zakażeń kości w badaniach in vitro” lek. Arkadiusza Janusza są wykonywane na drobnoustrojach pochodzących z kolekcji Katedry i Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej i Parazytologii. Natomiast nie są wykonywane żadne badania na pacjentach czy też zwierzętach laboratoryjnych.

Z wyrazami Szacunku
Prof. dr hab. Marzenna Bartoszewicz

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA I ZAKŁAD MIKROBIOLOGII
FARMACEUTYCZNEJ I PARAZYTOLOGII

prof. dr hab. n. med. Marzenna Bartoszewicz

9. 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 niezmodyfikowane. 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 tą 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.

10. Piśmiennictwo

1. Górecki A, Babiak I.: Leczenie zakażeń w obrębie narządu ruchu. W: Antybiotyki w profilaktyce i leczeniu zakażeń. Po redakcją W. Hryniewicz i J. Meszarosa. PZWL, Warszawa 2001, 732-770,
https://www.researchgate.net/publication/236591909_Leczenie_zakazen_w_obrebie_narządu_ruchu
2. Babiak I, Pędzisz P.: Zakażenia w ortopedii. Teoria i praktyka. Medisfera, 2019.
3. White M, Dennison M.W.: Acute haematogeneous osteitis in childhood: a review of 212 cases. Bone Jt Surg Br 1952; 34, 608-623. <https://doi.org/10.1302/0301-620X.34B4.608>
4. Blyth MJG, Kincaid R, Craigen MAC, Bennet GC.: The Changing Epidemiology of Acute and Subacute Haematogenous Osteomyelitis in Children. 2001, 83, 99-102.
<https://doi.org/10.1302/0301-620X.83B1.0830099>
5. Hotchen AJ, McNally MA, Sendi P.: The Classification of Long Bone Osteomyelitis: A Systemic Review of the Literature. J. Bone Jt Infect. 2017, 2(4), 167-17. <https://jbji.copernicus.org/articles/2/167/2017/jbji-2-167-2017.pdf>
6. Trueta J.: The three types of acute haematogenous osteomyelitis. A clinical and vascular Study. The Journal of Bone and Joint Surgery, British volume, 1959, 41-B, 4, 671-680. <https://doi.org/10.1302/0301-620X.41B4.671>
7. Stephen RF, Benson MKD, Nade S.: Misconceptions about childhood acute osteomyelitis. J Child Orthop. 2012, 6(5), 353-356. <https://doi.org/10.1007/s11832-012-0435-x>
8. Berríos-Torres SI, Umscheid CA, Bratzler DW, et al.: Centers for Disease Control and Prevention Guideline for the Prevention of Surgical Site Infection. JAMA Surg. 2017, 152(8), 784–791. <https://doi:10.1001/jamasurg.2017.0904>

9. Definicje zakażeń związanych z opieką zdrowotną (HAI) obowiązujące od 1. Stycznia 2016 r. http://antybiotyki.edu.pl/wp-content/uploads/dokumenty/Definicje_HAI-10_10_17.pdf
10. Shirtliff ME; Mader JT: Acute septic arthritis. *Clin Microbiol.Rev*, 2002, 15, 527–544.. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.4.527-544.2002>
11. Kavanagh N, Ryan EJ, Widaa A. et al: Staphylococcal Osteomyelitis: Disease Progression, Treatment Challenges, and Future Directions. *Clin Microbiol Rev*, 2018, 14, 31(2). <https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.00084-17>
12. Kistler JM, Vroome CM, Ramsey FV, Ilyas AM: Increasing Multidrug Antibiotic Resistance in MRSA Infections of the Hand: A 10-Year Analysis of Risk Factors. *Hand*, 2020, 15(6), 877-881. <https://doi.org/10.1177/1558944719837693>
13. Lee A.S, De Len Lee A, de Lencastre H. et al: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Dis Primers* 4, 18033 (2018). <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.33>
14. Peacock SJ, Day NP, Thomas MG. et al: Clinical isolates of *Staphylococcus aureus* exhibit diversity in *fnb* genes and adhesion to human fibronectin. *J Infect* 2000, 41. 23–31. <https://doi.org/10.1053/jinf.2000.0657>
15. Sdougkos G, Chini V, Papanastasiou DA et al: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* producing Panton–Valentine leukocidin as a cause of acute osteomyelitis in children. *Clin Microbiol Infect* 2007, 13, 651–654. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01713.x>
16. Galant K, Giedrys-Kalemba S, Johaniuk A, Roszkowska P, Jursa-Kulesza J.: Częstość występowania genów związanych ze zdolnością do tworzenia biofilmu wśród metycylinowrażliwych i metycylinoopornych szczepów *Staphylococcus aureus* izolowanych z zapaleń kości. *Forum Zakażeń* 2016, 7, 385-388. <http://evereth.home.pl/archiwum-pdf/FZ/2016/5/14.pdf>

17. Hiltunen AK, Savijoki K, Nyman TA. et al: Structural and Functional Dynamics of Staphylococcus aureus Biofilms and Biofilm Matrix Proteins on Different Clinical Materials. *Microorganisms*. 2019, 7, 584.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms7120584>
18. Woźna AE, Junka AF, Szymczyk PE.: The influence of different composite mixtures (PLA/HA) manufactured with additive laser technology on the ability of S. aureus and P. aeruginosa to form biofilms. *Acta Bioeng Biomech*. 2018, 20, 4, 101-106. <http://www.actabio.pwr.wroc.pl/Vol20No3/52.pdf>
19. Junka A, Szymczyk P, Ziółkowski G. et al.: Bad to the Bone: On In Vitro and Ex Vivo Microbial Biofilm Ability to Directly Destroy Colonized Bone Surfaces without Participation of Host Immunity or Osteoclastogenesis. *PLoS One*. 2017, 11, 12, 1. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169565>
20. Khalil H, Williams RJ, Stenbeck G. et al: Invasion of bone cells by Staphylococcus epidermidis. *Microbes Infect* 2007, 9, 460–465.
<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.01.002>
21. Stoodley P, Nistico L, Johnson S. et al: Direct demonstration of viable Staphylococcus aureus biofilms in an infected total joint arthroplasty. A case report. *J Bone Joint Surg Am* 2008, 90, 1751–1758 <https://doi.org/10.2106/jbjs.g.00838>
22. Costerson JW.: Biofilm theory can guide the treatment of device-related orthopaedic infections. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 2005, 437, 7-11.
<https://doi.org/10.1097/00003086-200508000-00003>
23. Spellberg B, Lipsky BA.: Systemic antibiotic therapy for chronic osteomyelitis in adults. *Clin Infect Dis*. 2012, 1, 54, 393-407. <https://doi.org/10.1093/cid/cir842>
24. Zelińska S, Wójciak-Kosior M, Dziągwa-Becker M, Junka AF. et al: The Activity of Isoquinoline Alkaloids and Extracts from *Chelidonium majus* against Pathogenic

- Bacteria and *Candida* sp. Toxins. 2019, 12, 11,406.
<https://doi.org/10.3390/toxins11070406>
25. Dhopeswarkar A, Saurabh J, Chengyong L. et al: The actions of benzophenanthridine alkaloids, piperonyl butoxide and (S)-methoprene at the G-protein coupled cannabinoid CB₁ receptor in vitro". European Journal of Pharmacology. 654,1, 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.11.033>
26. He N, Wang, P, Wang P. et al: Antibacterial mechanism of chelerythrine isolated from root of *Toddalia asiatica* (Linn) Lam". BMC Complementary and Alternative Medicine. 18, 1, 261.
<https://bmccomplementmedtherapies.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12906-018-2317-3>
27. Rodriguez-Merchan EC.: Antibiotic-loaded bone cement in primary total knee arthroplasty: does it reduce the risk of periprosthetic joint infection? Hosp Pract, 2000, 48, 188-195). <https://doi.org/10.1080/21548331.2020.1769417>
28. Knaepler H. Local application of gentamicin-containing collagen implant in the prophylaxis and treatment of surgical site infection in orthopaedic surgery. Int J Surg. 2012, 10, Suppl 1, 15-S20. <https://doi.org/10.1016/j.ijssu.2012.05.020>
29. Ingole V.H, Ghule S.S, Vuherer T et al.: Mechanical Properties of Differently Nanostructured and High-Pressure Compressed Hydroxyapatite-Based Materials for Bone Tissue Regeneration. Minerals 2021, 11, 1390.
<https://doi.org/10.3390/min11121390>
30. Xiong M-H, Li Y-J, Bao Y. et al.: Bacteria-responsive multifunctional nanogel for targeted antibiotic delivery. Adv Mater. 2012, 24, 46, 6175-6180.
<https://doi.org/10.1002/adma.201202847>

31. Stravinskas M, Horstmann P, Ferguson J et al: Pharmacokinetics of gentamicin eluted from a regenerating bone graft substitute: In vitro and clinical release studies. *Bone Jt Res.* 2016; 5, 427-435.
https://www.researchgate.net/publication/308763190_Pharmacokinetics_of_gentamicin_eluted_from_a_regenerating_bone_graft_substitute_In_vitro_and_clinical_release_studies
32. Gorgieva S, Trček J.: Bacterial Cellulose: Production, Modification and Perspectives in Biomedical Applications. *Nanomaterials.* 2019, 9 (10).
<https://doi.org/10.3390/nano9101352>
33. Augimeri RV, Varleyand AJ, Strap JL: Establishing a role for bacterial cellulose in environmental interactions: lessons learned from diverse biofilm – producing Proteobacteria. *Front Microbiol* 2015, 6, 1–27.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01282>
34. Antolak H, Kręgiel D: Bakterie kwasu octowego – taksonomia, ekologia oraz wykorzystanie przemysłowe. *ŻNTJ*, 2015, 4(101), 21–35.
DOI:10.15193/ZNTJ/2015/101/053 . https://journal.pttz.org/wp-content/uploads/2016/01/02_Antolak.pdf
35. Junka AF, Fijałkowski K, Ząbek A. et al.: Correlation between type of alkali rinsing, cytotoxicity of bionanocellulose and presence of metabolites within cellulose membranes. *Carbohydr Polym*, 2017, 157, 371–379
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.10.007>
36. Żywicka A, Fijałkowski K, Junka AF. Et al.: Modification of Bacterial Cellulose with Quaternary Ammonium Compounds Based on Fatty Acids and Amino Acids and the Effect on Antimicrobial Activity. *Biomacromolecules.* 2018, 14, 19, 1528-1538. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b00183>

37. Basu A, Vadanam S.V, Lim, S.: A Novel Platform for Evaluating the Environmental Impacts on Bacterial Cellulose Production. *Sci Rep*, 2018, 8, 5780.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-23701-y>
38. Chang S.T, Chen L.C, Lin S.B.: Nano-biomaterials application: Morphology and physical properties of bacterial cellulose/gelatin composites via crosslinking. *Food Hydrocolloids*, 2012, 27, 1, 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.08.004>
39. Czaja W, Krystynowicz A, Bielecki S, Brown R.M.: Microbial cellulose – the natural power to heal wounds. *Biomaterials* 2006, 27, 145–151.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.07.035>
40. Dydak K, Junka A, Dydak A. et al.: In Vitro Efficacy of Bacterial Cellulose Dressings Chemisorbed with Antiseptics against Biofilm Formed by Pathogens Isolated from Chronic Wounds. *Int J Mol Sci*. 2021, 13, 22, 8, 3996.
<https://doi.org/10.3390/ijms22083996>
41. Krasowski G, Wicher-Dudek R, Bartoszewicz M, Junka A et al.: Potential of Novel Bacterial Cellulose Dressings Chemisorbed with Antiseptics for the Treatment of Oral Biofilm Infections. *Appl. Sci*. 2019, 9, 5321.
<https://doi.org/10.3390/app9245321>
42. Golonka I, Gerber K.E, Oleksy-Warzyniak M. et al.: Antimicrobial and antioxidative activity of newly synthesized peptides absorbed into bacterial cellulose carrier against *Acne vulgaris*. *Int J Mol Sci*. 2021, 22,14, 7466.
<https://dx.doi.org/10.3390%2Fijms22147466>
43. Orlando I, Basnett P, Nigmatullin R et al: Chemical Modification of Bacterial Cellulose for the Development of an Antibacterial Wound Dressing. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020, 24, 8, 557885. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.557885>

44. Junka A, Bartoszewicz M, Dziadas M. et al.: Application of bacterial cellulose experimental dressings saturated with gentamycin for management of bone biofilm in vitro and ex vivo. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2020, 108 (1), 30-37.
<https://doi.org/10.1002/jbm.b.34362>
45. Mączyńska B, Secewicz A, Smutnicka D et al.: In vitro efficacy of gentamicin released from collagen sponge in eradication of bacterial biofilm preformed on hydroxyapatite surface. *PLoS One*. 2019, 4, 14 (6), 0217769.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217769>
46. Lazzarini L, Mader JT, Calhoun JH.: Osteomyelitis in long bones. *J Bone Joint Surg. Am* 2004, 86, 2305–2318. <https://doi.org/10.2106/00004623-200410000-00028>
47. Junka AF, Szymczyk P, Smutnicka D. et. al: Microbial biofilms are able to destroy hydroxyapatite in the absence of host immunity in vitro. *J Oral Maxillofac Surg*. 2015, 73 (3), 451-64. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2014.09.019>
48. Wrihgt J.A, Nair S.P: Mini Review - Interaction of staphylococci with bone. *International Journal of Medical Microbiology*, 2010, 193–204.
<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2009.10.003>
49. Cramton S.E, Ulrich M, Götz G, Döring G: Anaerobic Conditions Induce Expression of Polysaccharide Intercellular Adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *ASM Journals, Infection and Immunity*, 2001, 69, 6
<https://doi.org/10.1128/IAI.69.6.4079-4085.2001>
50. Parvizi J, Gehrke T (red), Marczyński W, Białecki J, Kruczyński J. (red. wydania polskiego): KONSENSUS | Ustalenia II Międzynarodowego Spotkania w sprawie infekcji mięśniowo-szkieletowych, *Medisfera* 2021, 1-1084.

51. Lovering A.M, Sunderland J: Impact of soaking gentamicin-containing collagen implants on potential antimicrobial efficacy. *Int J Surg*, 2012, 10, 1, 52-54.
<https://doi.org/10.1016/j.ijisu.2012.05.013>
52. Ferguson J, Diefenbeck M, McNally.: Ceramic Biocomposites as Biodegradable Antibiotic Carriers in the Treatment of Bone Infections. *J Bone Jt Infect*. 2017, 1, 2 (1), 38-51. <https://doi.org/10.7150/jbji.17234>
53. Wang J, Tavakoli J, Tang J: Bacterial cellulose production, properties and applications with different culture methods – A review. *Carbohydr Polym*. 2019, 1, 219, 63-76. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.05.008>
54. Zhong Ch: Industrial-Scale Production and Applications of Bacterial Cellulose. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2020, 20. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.605374>
55. Nandgaonkar A.G, Krause W.E, Lucia A: Nanocomposites for Musculoskeletal Tissue Regeneration, Fabrication of cellulosic composite scaffolds for cartilage tissue engineering. 2016,187-212. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-452-9.00009-1>
56. Gristina A.G, Naylor P.T, Myrvikhe Q: Molecular Mechanisms of Microbial Adhesion, *Race for the Surface: Microbes, Tissue Cells, and Biomaterials*. 1989, 177-211. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3590-3_15
57. Linyang C, Ying Y, Shengbing Y et al.: Preferential Colonization of Osteoblasts Over Co-cultured Bacteria on a Bifunctional Biomaterial Surface, *Front. Microbiol.*, 2018, 02. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02219>
58. Coates-Brown R, Moran J.C, Pongchaikul P et al: Comparative Genomics of *Staphylococcus* Reveals Determinants of Speciation and Diversification of Antimicrobial Defense. *Front Microbiol*. 2018, 9, 2753.
<https://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2018.02753>

59. Rohde H, Frankenberger S, Zähringer U et al: Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and pathogenesis of bio-material-associated infections. *Eur J Cell Biol.* 2010, 89, 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2009.10.005>
60. Donlan R.: Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerg Infect Dis.* 2002, 881–890. <https://doi.org/10.3201/eid0809.020063>
61. Joyce J.G, Abeygunawardana Ch, Xu Q. et al.: Isolation, structural characterization, and immunological evaluation of a high-molecular-weight exopolysaccharide from *Staphylococcus aureus*, *Carbohydrate Research*, 2003, 338, 9, 903-922. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(03\)00045-4](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(03)00045-4)
62. Sherry Z, Marwa B, Atul B et al: Implication of Surface Properties, Bacterial Motility, and Hydrodynamic Conditions on Bacterial Surface Sensing and Their Initial Adhesion, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2021, 9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.643722>
63. Stewart P.S.: Antimicrobial Tolerance in Biofilms. *Microbiol Spectr.* 2015, 3 (3). <https://dx.doi.org/10.1128%2Fmicrobiolspec.MB-0010-2014>
64. Malanovic H, Ön A, Pabst G et al.: Octenidine: Novel insights into the detailed killing mechanism of Gram-negative bacteria at a cellular and molecular level. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2020, 6, 5. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106146>
65. Sowlati-Hashjin S, Carbone P, Karttunen M.: Insights into the Polyhexamethylene Biguanide (PHMB) Mechanism of Action on Bacterial Membrane and DNA: A Molecular Dynamics Study. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2020, 124 (22), 4487-4497. <https://doi.org/10.1021/acs.jpccb.0c02609>

66. Ul-Islam M, Khan T, Park J.K: Water holding and release properties of bacterial cellulose obtained by in situ and ex situ modification. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 88, 2, 596-603, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.01.006>.
67. Parent M, Baradari H, Champion E. et al: Design of calcium phosphate ceramics for drug delivery applications in bone diseases: A review of the parameters affecting the loading and release of the therapeutic substance. *Journal of Controlled Release*. 2017, 252, 1-17. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.02.012>.
68. Ulrichová Z, Dvořák Z, Vičar J. et al.: Cytotoxicity of natural compounds in hepatocyte cell culture models: The case of quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids. *Toxicology Letters*, 2001, 125, 1–3, 125-132.
[https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(01\)00430-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(01)00430-1).
69. Amini A.R, Laurencin C.T, Nukavarapu S.P.: Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Crit Rev Biomed Eng*. 2012, 40 (5), 363-408.
<https://doi.org/10.1615/critrevbiomedeng.v40.i5.10>