

**BADANIA NANOKOMPOZYTÓW
HYDROKSYAPATYTOWYCH WOBEC BAKTERII
BEZTLENOWYCH**

**INVESTIGATIONS OF HYDROXYAPATITE
NANOCOMPOSITES AGAINST ANAEROBIC
BACTERIA**

Anna Kędziora¹, Agata Bernat¹, Rafał Jakub Wiglusz^{2*}

¹ *Uniwersytet Wrocławski, Wydział Nauk Biologicznych,
Instytut Genetyki i Mikrobiologii*

ul. Przybyszewskiego 63-68, 51-148 Wrocław

² *Instytut Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych, Polska Akademia Nauk*

ul. Okólna 2, 50-422 Wrocław

**e-mail: r.wiglusz@intibs.pl*

Pracę dedykujemy pamięci Pani Profesor Małgorzaty Jeżowskiej-Bojczuk

Abstract

1. Wstęp; 1.1. Bakterie beztlenowe w organizmie człowieka; 1.1.1. Komórka tlenowa i beztlenowa
1.1.2. Beztlenowa mikroflora człowieka; 1.1.3. Patogeneza zakażeń; 1.2. Diagnostyka infekcji
powodowanych bakteriami beztlenowymi; 1.3. Potencjalne możliwości zastosowania bakterii
beztlenowych w medycynie; 1.4. Chorobotwórczość badanych gatunków; 1.4.1. *Prevotella bivia*;
1.4.2. *Parabacteroides distasonis*; 1.5. Hydroksyapatyty i ich biofunkcjonalizacja oraz potencjalne
zastosowanie; 1.5.1. Antybiotyki w inżynierii biomateriałowej: metronidazol i tinidazol; 1.5.2.
Jony i nanocząsteczki srebra w inżynierii biomateriałowej

2. Materiały i metody; 2.1. Podłoża i warunki hodowli; 2.2. Testowane gatunki bakterii; 2.3. Testo-
wane związki antybakteryjne; 2.4. Liza krwi końskiej; 2.5. Przechowywanie szczepów bakterii; 2.6.
Przygotowanie szeregu mikrorozcieńczeń związków antybakteryjnych; 2.7. Inokulacja i inkubacja
płytki titracyjnej; 2.8. Odczyt wyników

Wyniki i dyskusja

Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane

Anna Kędziora, dr nauk biologicznych, wieloletni pracownik naukowo-dydaktyczny Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego. Jej zainteresowania naukowe obejmują przede wszystkim sposoby oddziaływania nanomateriałów na komórkę bakterii oraz znaczenie srebra w terapii antybakteryjnej.

Agata Bernat, mgr mikrobiologii, absolwentka studiów magisterskich na kierunku Mikrobiologia na Wydziale Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego. Podczas studiów uczestniczyła w badaniach związanych z wrażliwością bakterii beztlenowych na bionanokompozyty apatytowe.

Rafał Jakub Wiglusz jest profesorem nadzwyczajnym w Instytucie Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych PAN we Wrocławiu. W 1999 roku ukończył Wydziału Matematyki-Fizyki-Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego (specjalność Chemia Środowiska). Doktorat obronił w 2004 roku na temat syntezy i spektroskopii związków lantanowców. W 2005–2006 przebywał jako post-doc na Uniwersytecie w Kolonii. Obecnie prowadzi badania biokompozytów na bazie nanoapatytów przeznaczonych do teranostyki.

ABSTRACT

Nanocrystalline apatites $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (HAp) non-doped and doped with Ag^+ and Eu^{3+} ions were synthesized by different wet chemistry methods. The obtained hydroxyapatite was loaded with Ag^0 , as well as nitroimidazole antimicrobials: metronidazole and tinidazole. The antimicrobial activity of the obtained materials against *Prevotella bivia* and *Parabacteroides distasonis* was studied. The method used for the antibacterial susceptibility testing was broth microdilution, according to the CLSI – Clinical and Laboratory Standard Institute – standard M11-A8; agar Schaedler, enriched with 50% LHB - Lysed Horse Blood, was used as a medium for culturing strains. The antibacterial activity increased for the immobilized antibiotics – HAp doped with metronidazole and tinidazole was six times more bactericidal than non-immobilised metronidazole for both clinical isolates. In comparison with non-immobilised tinidazole, HAp immobilised with tinidazole was six thousand times more effective against *P. distasonis* and two hundred times more effective against *P. bivia*. HAp doped with tetracycline was over two times more bactericidal than tetracycline non-immobilised (according to the literature data). The exact MIC for bionanocomposites of HAp and silver was not obtained. The research shows that bionanocomposites of hydroxyapatite are good drug carriers for both antibiotics and silver particles and ions. The use of bionanocomposites of apatite immobilised with antibiotics in dentistry could result in a prolonged antibacterial activity of these compounds.

Keywords: nanotechnology, hydroxyapatite, endodontics, anaerobic bacteria

Słowa kluczowe: nanotechnologia, hydroksyapatyt, endodoncja, bakterie beztłenowe

1. WSTĘP

1.1. BAKTERIE BEZTLENOWE W ORGANIZMIE CZŁOWIEKA

1.1.1. KOMÓRKA TIENOWA A BEZTLENOWA

Podstawową różnicą w metabolizmie bakterii obligatoryjnie beztlenowych i tlenowych jest fakt, że bakterie beztlenowe nie potrafią wykorzystywać tlenu, jako akceptora elektronów w procesie wytwarzania energii (ATP). Obecność tlenu jest dla nich toksyczna (wyjątkiem są tzw. beztlenowce aerotolerancyjne, np. z rodzaju *Clostridium* spp., które choć nie wykorzystują tlenu w swoim metabolizmie, tolerują jego obecność przez określony czas). Z kolei metabolizm bakterii tlenowych opiera się na wykorzystaniu tej cząsteczki przy udziale oksydaz, jako końcowego akceptora elektronów. Bakterie względnie beztlenowe są formą pośrednią; ich wzrost można zaobserwować zarówno w warunkach tlenowych, jak i przy braku tlenu – jest to przystosowanie do zmiennych warunków środowiska i polega na przechodzeniu z metabolizmu tlenowego na beztlenowy i odwrotnie [1]. Adaptacja ta wiąże się z koniecznością syntezy nowych enzymów przez komórkę [2]. Gdy w środowisku występuje tlen, u bakterii beztlenowych dochodzi do szoku oksydacyjnego; tlen powoduje nagromadzenie reaktywnych form tlenu (ang. *reactive oxygen species*, ROS). Wśród nich wyróżnia się: anionorodnik ponadtlenkowy, nadtlenek wodoru, rodnik hydroksylowy. Bakterie beztlenowe nie są w stanie pozbyć się ROS z komórki, ze względu na brak u zdecydowanej większości z nich enzymów detoksykacyjnych, tj. dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza, peroksydaza [3, 4]. Bakterie beztlenowe mogą przetrwać ekspozycję na tlen, jeśli posiadają alternatywny system rozkładu ROS bez wytwarzania tlenu. System ten może być kodowany na operonie sor-rub; jest złożony z białek Sor (reduktaza ponadtlenkowa, ang. *superoxide reductase*) i Rbr (rubrerytryna) [5]. Bakterie beztlenowe mogą pozyskiwać energię w procesie fosforylacji substratowej przez fermentację węglowodanów, a najważniejszą reakcją w tym procesie jest przekształcanie aldehydu 3-fosfoglicerynowego do pirogronianu przez kinazę pirogronianową [1]. Fermentacja jest procesem katabolicznym, w którym związek organiczny jest zarówno donorem, jak i akceptorem elektronów [6], z tego właśnie względu, że nie występuje zewnętrzny czynnik utleniający [7]. Beztlenowce mogą także uzyskiwać energię w procesie oddychania beztlenowego, które jest procesem katabolicznym, wykorzystującym fosforylację oksydacyjną i alternatywne akceptory elektronów [6]. W oddychaniu beztlenowym (w przeciwieństwie do tlenowego) łańcuch oddechowy jest krótszy [8], a końcowym akceptorem elektronów nie jest tlen, ale może to być: NO^{3-} , SO_4^{2-} , CO_2 , S^0 , Fe^{3+} , AsO_4^{3-} , SeO_4^{2-} , ClO_4^- , ClO_3^- , fumaran, dimetylosulfotlenek lub tlenek tri metyloaminy [5]. Oddychanie beztlenowe jest bardziej wydajne niż fermentacja, ale mniej wydajne niż oddychanie tlenowe [8].

1.1.2. Beztlenowa mikroflora człowieka

Bakterie beztlenowe występują licznie w organizmie człowieka, jako główny składnik mikroflory błon śluzowych; znacznie przewyższają liczebnie bakterie tlenowe zarówno w jamie ustnej (100:1), jak i w układzie pokarmowym (1000:1). W Tabeli 1 przedstawiono najczęściej występujące gatunki beztlenowe w wybranych partiach organizmu człowieka.

Tabela 1. Beztlenowa mikroflora człowieka (w oparciu o: [1, 4, 9])

Table 1. Anaerobic microflora of the human body [1, 4, 9]

Miejsce występowania	Wybrane rodzaje bakterii beztlenowych
Górne drogi oddechowe i jama ustna	<i>Fusobacterium spp.</i> <i>Prevotella spp.</i> <i>Porphyromonas spp.</i> <i>Peptostreptococcus spp.</i>
Przewód pokarmowy	<i>Bacteroides spp.</i> <i>Clostridium spp.</i> <i>Peptostreptococcus spp.</i> <i>Lactobacillus spp.</i> <i>Bifidobacterium spp.</i>
Skóra	<i>Propionibacterium spp.</i> <i>Peptostreptococcus spp.</i>
Pochwa	<i>Bacteroides spp.</i> <i>Clostridium spp.</i> <i>Peptostreptococcus spp.</i> <i>Lactobacillus spp.</i> <i>Prevotella spp.</i>

Jama ustna jest złożonym i heterogennym środowiskiem dla mikroorganizmów. Ślina zawiera co prawda składniki odżywcze niezbędne do wzrostu mikroorganizmów, jednak występują one w niewielkich stężeniach. Jest ona źródłem substancji bakteriobójczych tj. lizozym, laktooperoksydaza. Korzystniejsze warunki do przeżycia bakterie znajdują w okolicy zębów i dziąseł. W pierwszym roku życia człowieka mikroflora jamy ustnej składa się głównie z bakterii beztlenowych aero-tolerancyjnych oraz bakterii tlenowych, natomiast po pojawieniu się zębów równowaga mikroflory przesuwana się w stronę organizmów obligatorycznie beztlenowych, które zasiedlają powierzchnię zębów i kieszeń przyzębia [6]. Jako składnik mikroflory jelita grubego, beztlenowce pełnią główną rolę w fermentacji polisacharydów, których organizm człowieka sam nie potrafi katabolizować. Produktami tej fermentacji są m. in. ditlenek węgla, wodór, krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (octan, propionian, maślan). Te ostatnie są absorbowane przez komórki jelita i zużywane jako źródło węgla i energii [9, 10]. Bakterie beztlenowe pełnią także rolę w rozwoju błon śluzowych układu immunologicznego [11]. Odpowiadają za syntezę witamin i aminokwasów, transformują żółć [10].

Ostatnie badania pokazują, że beztlenowa mikroflora jelit różni się u osób otyłych i szczupłych, prawdopodobnie ze względu na różnice w diecie. Analiza 16S rRNA wykazała, że mikroflora otyłych myszy i ludzi różni się od mikroflory osobników nieotyłych stosunkiem występowania obligatoryjnie beztlenowych bakterii z typu *Bacteroidetes* do typu *Firmicutes*. U ludzi i myszy otyłych występowały wyższe proporcje *Firmicutes* niż *Bacteroidetes*. Co więcej, sterylne myszy (nie posiadające żadnych bakterii jelitowych), skolonizowane bakteriami z typu *Firmicutes*, przytyły w trakcie trwania eksperymentu więcej; niż sterylne myszy skolonizowane bakteriami z typu *Bacteroidetes*. Zakłada się, że jest to związane z wydajnością fermentacji, która jest wyższa u *Firmicutes* [12].

1.1.3. Patogeneza zakażeń

Ze względu na powszechność występowania bakterii beztlenowych w organizmie człowieka, mogą one być przyczyną infekcji endogennych. Wybrane chorobotwórcze bakterie beztlenowe i związan z nimi zakażenia przedstawiono w Tabeli 2.

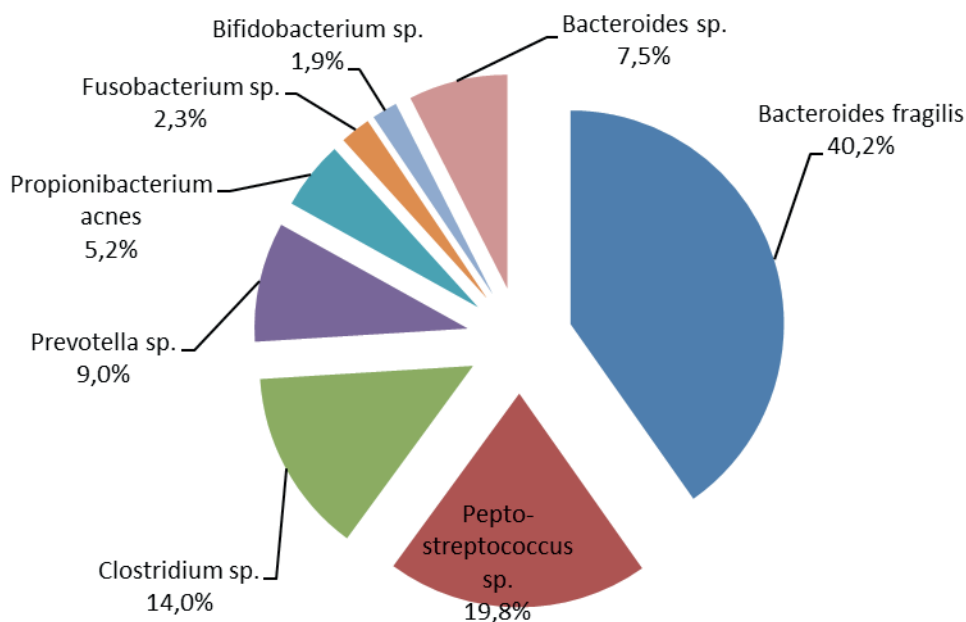
Zakażenia mogą być mieszane, czyli powodowane przez dwa lub więcej gatunków – tylko bakterii beztlenowych lub razem z gatunkami tlenowymi, jak np. w przypadku zakażeń wewnątrz jamy brzusznej, położniczo-ginekologicznych, infekcji stopy cukrzycowej [13], przewlekłego zapalenia zatok, ucha środkowego, anginy Ludwiga, ropni przyzębia [14]. Infekcje mieszane są szczególnie niebezpieczne, ze względu na wymianę informacji genetycznej pomiędzy gatunkami tlenowymi i beztlenowymi, a tym samym ich większą wirulencję i oporność na antybiotyki [9].

Tabela 2. Wybrane chorobotwórcze bakterie beztlenowe i związan z nimi zakażenia [4]
Table 2. Selected anaerobic bacteria and their infections [4]

Gatunek	Zakażenie
<i>Clostridium difficile</i>	Biegunka poantybiotykowa, rzekomobloniaste zapalenie jelit
<i>Actinomyces spp.</i>	Zlokalizowane zakażenia jamy ustnej, promienica
<i>Propionibacterium spp.</i>	Trądzik, zapalenie kanalików łzowych, zakażenia oportunistyczne
<i>Mobiluncus spp.</i>	Bakteryjna waginoza, zakażenia oportunistyczne
<i>Lactobacillus spp.</i>	Zapalenie wsierdzia, zakażenia oportunistyczne
<i>Eubacterium spp.</i>	Zakażenia oportunistyczne
<i>Bifidobacterium spp.</i>	Zakażenia oportunistyczne
<i>Bacteroides fragilis</i>	Zakażenia jamy brzusznej, skóry, tkanek miękkich, bakteriemia
<i>Fusobacterium spp.</i>	Zakażenia jamy ustnej, bakteriemia
<i>Prevotella bivia</i>	Zakażenia jamy ustnej, przewlekłe zapalenie zatok i uszu, ropnie mózgu, zakażenia ginekologiczne

Gatunek	Zakażenie
<i>Prevotella melaninogenica</i>	Zakażenia jamy ustnej, przewlekłe zapalenie zatok i uszu, ropnie mózgu, zakażenia jamy brzusznej

Badania pokazują, że liczba zarówno tlenowych, jak i beztlenowych izolatów z miejsca mieszanych infekcji wynosiła od 1 do 5 patogenów, średnio 3,7 z próbki; z kolei organizmów tylko beztlenowych znajdowano średnio 1 na próbkę. Najczęściej izolowaną z organizmu pacjentów bakterią beztlenową jest *B. fragilis* (40,2% przypadków) (Rys. 1). Tlenowce, które często towarzyszą zakażeniom bakteriami beztlenowymi, to najczęściej *E. coli* (41,8%), *S. aureus* (7,5%) i *K. pneumoniae* (7,5%) [14]. Procentowy rozkład izolatów bakterii beztlenowych pobranych od 3260 pacjentów przedstawiono na Rysunku 1.



Rysunek 1. Procentowy rozkład izolatów bakterii beztlenowych, pobranych od 3260 pacjentów (materiały własne, w oparciu o: [14])

Figure 1. Percentage distribution of anaerobic bacterial isolates, obtained from 3260 patients, according to Y. Park et. al. [14]

Infekcje beztlenowcami powstają często jako choroby oportunistyczne (występujące u osób z obniżoną odpornością, np. po antybiotykoterapii, zabiegach chirurgicznych, immunosupresji, w trakcie ciąży, w podeszłym wieku) i/lub wtedy, kiedy zaburzona zostaje równowaga mikrobiomu jelitowego [14].

Oportunistyczną chorobą powodowaną przez beztlenowe *Clostridium difficile* jest m.in. rzekomobłoniaste zapalenie jelit. W następstwie antybiotykoterapii lekami o szerokim zakresie działania (głównie klindamycyną) zaburzona zostaje

naturalna beztlenowa mikroflora jelita grubego i dochodzi do niekontrolowanego namnożenia *C. difficile* (naturalnie opornego na klindamycynę) w świetle jelita (tzw. oportunistyczna dominacja). Produkowane toksyny CDTA i CDTB prowadzą do powstania biegunki i stanu zapalnego.

Innym przykładem oportunistycznego beztlenowego patogenu może być *Bacteroides fragilis*, bytujący w jelicie grubym człowieka. Staje się on niebezpieczny, gdy dostaje się do krwiobiegu człowieka. Może to nastąpić np. wskutek pooperacyjnych uszkodzeń jelita lub innych urazów zaburzających integralność tkanek. Kiedy bakteria ta dostaje się do krwiobiegu, powoduje szereg schorzeń, m. in. ropnie, bakterie, ropnie, ropnie [9]. Bakteriemia powodowana *B. fragilis* może być uznana za chorobę typu „*emerging*” [9]; choroba ta nie była dotąd znana, ponieważ nie przeprowadzono rutynowej hodowli w kierunku beztlenowców z próbek krwi pacjentów. Rozwój bakterii z tego gatunku trwa kilka dni, w przeciwieństwie do bakterii powodowanej przez *E. coli*, która rozwija się w kilkanaście godzin i szybko może doprowadzić do śmierci pacjenta. Po opracowaniu skutecznej terapii dla pacjentów z infekcją krwi powodowaną przez *E. coli* okazało się, że krew tych pacjentów wciąż była zainfekowana bakteriami. Po czasie okazało się, że terapia ta, mimo że skuteczna wobec *E. coli*, nie miała wpływu na oporny gatunek beztlenowy *B. fragilis*, co prowadziło do powstania infekcji krwi przez *B. fragilis*. Posocznica powodowana przez *E. coli* jest w stanie zabić pacjenta o wiele szybciej niż powolnie rozwijająca się infekcja krwi z udziałem *B. fragilis*. Innym powodem, dla którego nie znano wcześniej tej choroby, jest fakt, że aż do lat 70. XX w. nie sądzono, że jakiegokolwiek bakterie beztlenowe są w stanie przeżyć (jak się wydawało) tlenowym środowisku ludzkich tkanek i krwi. Nie brano jednak pod uwagę regionów martwej tkanki, które w szybkim tempie są pozbawione tlenu ze względu na utratę krwi. Takie beztlenowe środowisko może wystąpić nawet w płucach [9], np. w przypadku zachłystowego zapalenia płuc, ropniaka, ale najczęściej ropnia płuc, którego bakterie beztlenowe są przyczyną nawet w 80% przypadków, z przewagą izolatów *Prevotella melaninogenica*, *Fusarium nucleatum*, *Peptostreptococcus spp.* [15]. Zdrowa mikroflora jamy ustnej składa się głównie z fakultatywnie beztlenowych bakterii gram dodatnich, głównie ziarniaków (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*). W chorobach przyzębia równowaga ta zostaje zachwiana i w miejscu styku zębów z dziąsłem (tzw. kieszeń przyzębia), gdzie środowisko jest beztlenowe, dochodzi do rozrostu gramujemnych obligatoryjnie beztlenowych pałeczek, np. *Porphyromonas gingivalis* czy *Prevotella spp.* Gatunki te występują jako flora jamy ustnej, tworząc biofilmy. Produkują proteazy i inne enzymy degradujące tkankę, co może doprowadzić do reakcji zapalnej i w efekcie do chorób dziąseł, a nawet utraty uzębienia u dorosłych [6, 9].

Naukowcy sugerują, że inny gatunek zaangażowany w choroby przyzębia, *Fusobacterium nucleatum* (gramujemny, obligatoryjny beztlenowiec), może być jednym z czynników odpowiedzialnych za wywołanie przedwczesnego porodu (tzn. przed 37 tygodniem ciąży). Hipoteza zakłada, że przez tkankę zapalną dziąseł bakteria dostaje się do krwiobiegu i przenosi się razem z krwią do łożyska. Tam powoduje

stan zapalny, przez co dziecko rodzi się przedwcześnie. Inne źródła podają, że bakterie jamy ustnej wywołujące zapalenie dziąseł (np. *Fusobacterium nucleatum subsp. polymorphum*, *Prevotella oulorum*) mogą dostać się do krwiobieg powodując stan zapalny naczyń krwionośnych, prowadząc do powstania chorób serca [9]. Uważa się także, że codzienne mycie zębów znacznie zmniejsza ryzyko takich powikłań i jest bezpieczniejsze i mniej kosztowne niż profilaktyczne stosowanie antybiotykoterapii, którą zaleca się tylko pacjentom z kategorii wysokiego ryzyka (chorującym przewlekle, po inwazyjnych zabiegach chirurgicznych z ryzykiem wystąpienia bakteriemii, u osób z niedoborami odporności) [16, 17].

1.2. DIAGNOSTYKA INFEKCI POWODOWANYCH BAKTERIAMI BEZTLENOWYMI

Diagnostyka w kierunku bakterii beztlenowych nie jest łatwa, ze względu na trudności hodowlane – bakterie beztlenowe mają wysokie wymagania wzrostowe. Wymagają obecności czynników wzrostu oraz obniżonego potencjału oksydoredukcyjnego [3]. Ponadto cechują się długim czasem generacji (hodowla *in vitro* w temperaturze 37°C trwa zazwyczaj od 48h do kilku dni, a nawet tygodni). Izolacja materiału z zainfekowanych lub zmienionych chorobowo miejsc wymaga odpowiednich metod transportu i przechowywania próbek [18]. Z tych powodów hodowla laboratoryjna beztlenowców jest kosztowna i nierzadko nie przynosi rezultatów. Badania często należy wielokrotnie powtarzać, a każdy posiew niesie ryzyko zanieczyszczenia próbki tlenowcami lub względnymi beztlenowcami, z uwagi na stosowane bogate media hodowlane. Diagnostyka infekcji powodowanych bakteriami beztlenowymi możliwa jest dopiero po kilku dniach, dlatego terapia celowana opóźniona jest w czasie. Leczenia nie ułatwia też fakt, że oporność bakterii na środki bakteriobójcze stale rośnie. W ciągu ostatnich trzydziestu lat znacznie zmalała wrażliwość bakterii beztlenowych na antybiotyki, zwłaszcza z grupy *Bacteroides* (wykaz bakterii należących do tej grupy zamieszczono w Tabeli 3). Pojawiła się oporność nawet na najbardziej aktywne antybiotyki, tj. imipenem, piperacylina-tazobaktam, tigeicyklina, ampicylina-sulbaktam oraz metronidazol [19]. CLSI rekomenduje dwie metody badania lekowrażliwości bakterii beztlenowych: rozcieńczeń w agarze lub mikrorozcieńczeń w bulionie. Metoda mikrorozcieńczeń nie jest zalecana dla bakterii bardziej wymagających czy wolnorosnących, ponieważ może dawać niespójne i niezetelne wyniki z powodu słabego wzrostu mikroorganizmów, co powodowane jest nadmierną ekspozycją na tlen w części procedury. Stąd CLSI zaleca metodę mikrorozcieńczeń tylko dla bakterii z grupy *Bacteroides* oraz dla *C. perfringens*, które rosną stosunkowo szybko (ok. 48 h) i przeżywają ekspozycje na tlen (choć nie-możliwa jest ich hodowla w warunkach tlenowych). Metoda rozcieńczeń w agarze nie ma takich zastrzeżeń, pozwala na badanie wielu gatunków beztlenowych [19].

1.3. POTENCJALNE MOŻLIWOŚCI ZASTOSOWANIA BAKTERII BEZTLENOWYCH W MEDYCYNIE

Na przełomie XIX i XX wieku u pacjentów z gangreną powodowaną przez *Clostridium sp.* zaobserwowano spontaniczną regresję nowotworu. Nieliczne przeprowadzane próby kliniczne nie wykazywały jednak dużej wartości onkolizy przeprowadzanej przez *Clostridium sp.* Obecnie rozwój genetyki molekularnej i idące za tym modyfikacje genomów bakteryjnych pozwalają na zastosowanie terapii celowanej bakteriami beztlenowymi, jako jednej z metod zwalczania nowotworów. Użyciu beztlenowców sprzyja fakt, że w tkance nowotworowej panuje beztlenowe środowisko, w przeciwieństwie do tkanek zdrowych [20].

Kandydatem do wykorzystania w terapii nowotworowej jest także niepatogeny beztlenowiec *Bifidobacterium bifidum*. Gatunek ten, zawieszony w PBS i wstrzyknięty myszom z chorobą nowotworową nie powodował dodatkowych symptomów, a ponadto znikał ze zdrowych tkanek i organów w ciągu 48–96 h, następnie kumulując się i namnażając jedynie w tkance nowotworowej. Kolejne badania z użyciem metod molekularnych pozwoliły na wprowadzenie do plazmidu *Bifidobacterium longum* genów kodujących deaminazę cytozyny, która odpowiada za przekształcenie 5-fluorocytozyny – podawanego pacjentowi doustnie leku przeciwgrzybiczego – w 5-fluorouracyl, lek antynowotworowy; pierwsze próby przeprowadzane na modelach zwierzęcych (myszy, szczury, małpy) wykazały skuteczność i brak efektów ubocznych takiej terapii [20].

Jedną z proponowanych strategii terapeutycznych przeciwko chorobom zapalnym jelit (ang. *inflammatory bowel disease*, IBD) jest doustne podawanie fragmentowanych bakterii probiotycznych. Udowodniono, że specyficzne beztlenowe lizaty *P. distasonis* i składniki jego komórki mają właściwości antyzapalne. Zmniejszają produkcję cytokin prozapalnych, jak np. TNF- α , produkowany przez makrofagi, także IL-6, IL-10, IFN- γ . Podawanie fragmentów bakterii jest bezpieczniejsze niż podawanie żywych bakterii, zwłaszcza dla pacjentów poważnie chorych lub z obniżoną odpornością. Może zatem stanowić nowe podejście kliniczne wobec chronicznych zapaleń jelit [11].

1.4. CHOROBOTWÓRCZOŚĆ BADANYCH GATUNKÓW

1.4.1. *Prevotella bivia*

Obligatoryjnie beztlenowy gatunek *Prevotella bivia* (dawniej znany jako *Bacteroides bivius* [21]) to gramujemna, niepigmentująca pałeczka, która występuje w jamie ustnej, gdzie może być przyczyną chorób przyzębia [22]. Rodzaj *Prevotella spp.* bierze udział w rozprzestrzenianiu się oporności na antybiotyki, głównie beta-

-laktamy (najczęściej przepisywane w medycynie i stomatologii) wśród bakterii występujących w jamie ustnej, a także w przestrzeni poddąsłowej. Wraz z *Fusobacterium sp.* stanowią główne źródło beta-laktamaz [23, 24]. Jest składnikiem naturalnej mikroflory dolnych partii układu rozrodczego. Rośnie obficie w obecności estrogenu [22, 25]. Ma zdolność adherencji i inwazji do komórek epitelium szyjki macicy, a co za tym idzie, jest zdolna powodować zakażenie wewnątrzmaciczne. Kojarzona z bakteryjną waginozą (izolowana od 44% chorych). Jest także izolowana z krwi pacjentów urodzonych przez cesarskie cięcie oraz u pacjentów ze zdiagnozowanym ostrym zapaleniem narządów miednicy mniejszej [4, 26]. Infekcja *P. bivia* zwiększa ryzyko przedwczesnego porodu u ciężarnych kobiet, co związane jest ze zwiększoną produkcją prostaglandyn [27]. Może także powodować choroby u mężczyzn, np. ropnie prącia [24].

Poza układem moczowo-płciowym, zanotowano także przypadki izolacji tego gatunku z wysięku w opłucnej i ropniaków [21], a także z kości, stawów, z łożyska paznokcia, z męskich narządów rozrodczych, a także z wsierdzia [27]. Nieleczone infekcje *P. bivia* prowadzą do poważnych schorzeń, m.in. martwiczego zapalenia powięzi, zapalenia szpiku lub septycznego zapalenia stawów [22]. *P. bivia* izolowana jest z miejsc zakażenia jako jedyny patogen lub w powiązaniu z innymi (względny lub obligatoryjnymi) beztlenowcami (infekcje mieszane), np. *Bacteroides sp.*, *Porphyromonas sp.*, *Gardnerella vaginalis*, *Streptococcus constellatus* [27]. *P. bivia* i *G. vaginalis* wykazują symbiotyczną zależność i często powodują mieszane infekcje (oba gatunki izolowane są razem u 59,1% kobiet z bakteryjną waginozą, oraz u 3,9% kobiet zdrowych; oba gatunki często są znajdowane u pacjentek z rakiem szyjki macicy). Patogenność *P. bivia* wzrasta przy obecności względnych beztlenowców [26] oraz tlenowców [24]. Uznawana jest ona za późnego kolonizatora, w przypadku bakteryjnych waginoz [28]. Z drugiej strony obecność naturalnej flory pochwy, np. rodzaju *Lactobacillus*, hamuje wzrost *P. bivia* [27]. *Lactobacillus* wykorzystuje flawoproteiny w reakcji utleniania, prowadzącej do powstania nadtlenu wodoru. *P. bivia* nie ma peroksydazy katalazy, nie jest zatem w stanie wyeliminować ze środowiska toksycznego dla niej nadtlenu wodoru [29].

P. bivia moduluje ekspresję prozapalnych cytokin, aktywuje produkcję lizosomalnych enzymów i zwiększa fagocytozę. Oprócz tego produkuje sjalidazy, które degradują mucyny i zwiększają adherencję bakterii, a także uszkadzają odpowiedź zależną od przeciwciał IgA, skierowaną przeciwko wydzielanym przez bakterie cytotoxynom [30]. Zwykle jest wrażliwa na klindamycynę, metronidazol, imipenem i amoksycylinę z kwasem klawulonowym [24].

1.4.2. *Parabacteroides distasonis*

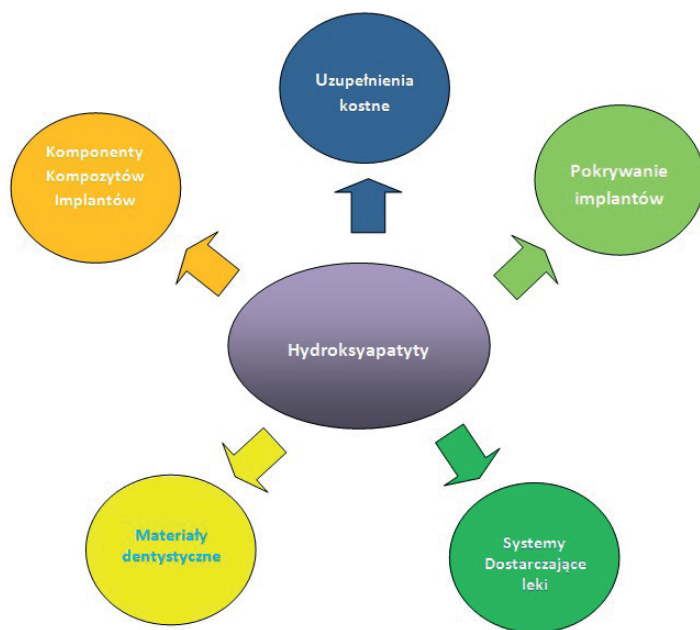
P. distasonis jest gramujemną, obligatoryjnie beztlenową pałeczką, oporną na żółć, niesporulującą. Występuje w jelicie grubym człowieka, jako naturalna mikroflora, jest jednym z dwóch (obok *B. thetaiotamicron*) dominujących gatunków

beztlenowych gatunków gram ujemnych [4]. Po dostaniu się do krwiobiegu może powodować stany patologiczne, zarówno bakteriemię, jak i ropnie wewnętrzne (w jamie brzusznej, mózgu, wątrobie, płucach) [31]. Jego wzrost stymulowany jest przez 20% żółć. Posiada zdolność hydrolizy eskuliny [4, 24].

P. distasonis jest fenotypowo podobny do *Bacteroides sensu stricto*, ale filogenetyczne różnice dotyczące budowy metachinonu (jedna z form witaminy K, produkowana przez bakterie w jelitach, niezbędna w procesie tworzenia skrzepów) spowodowały zaklasyfikowanie go do rodzaju *Parabacteroides*, a nie *Bacteroides* [31]. *P. distasonis* wywołuje zapalne stany jelit (np. choroba Leśniowskiego-Crohna, wrzodziejące zapalenie okrężnicy), a także infekcje krwi [11].

1.5. HYDROKSYAPATYTY I ICH BIOFUNKCJONALIZACJA ORAZ POTENCJALNE ZASTOSOWANIE

Minerał apatyt jest fosforanem wapnia (ang. *calcium phosphate*, CaP), tworzącym agregaty mineralne, zwane fosforytami. Światowe zasoby fosforytów są duże, choć nierównomiernie rozmieszczone. W zależności od stężenia jonów OH^- , F^- , Cl^- , mamy do czynienia odpowiednio z: hydroksy-, fluoro- oraz chlorapatytami [32].



Rysunek 2. Schemat przedstawiający zastosowania hydroksyapatytów w medycynie [32]

Figure 2. Schematic illustration of medical applications of hydroxyapatite [32]

Obecnie apatyty wykorzystywane są szeroko w jubilerstwie, rolnictwie, elektrotechnice, kosmetyce i przemyśle [33], rzadziej w genetyce (do transfekcji) [34], jednak

najważniejsze jest ich zastosowanie w medycynie, farmacji i stomatologii [32]. Stanowią obiecujący materiał do zastosowania biomedycznego, ze względu na swoją wysoką specyficzność i czułość; są nietoksyczne [35, 36]. Jednak ze względu na ich słabe właściwości mechaniczne (kruchość i brak elastyczności), stosowanie hydroksyapatytu jako substytutu kości jest ograniczone do miejsc, w których nie będzie on poddany zbyt dużemu naciskowi [32, 37]. Schemat przedstawiający zastosowania hydroksyapatytów w medycynie przedstawiono na Rysunku 2.

Fosforany wapnia są głównym nieorganicznym składnikiem kości oraz szkliwa zębów. Nieorganiczne składniki kości zawierają kryształy hydroksyapatytów (HAp, ang. *hydroxyapatite*) o wzorze sumarycznym: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, o długości 100 nm, szerokości 20–30 nm i grubości 3–6 nm [38]. HAp stanowią ok. 60-70% składu kości [39]. Naturalne HAp i syntetyczne HAp różnią się strukturą chemiczną i właściwościami. Większość syntetycznych HAp jest stechiometryczna, a bioapatyty cechują się występowaniem innych jonów, głównie CO_3^{2-} (także Na^+ , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Cl^- , F^-). Stosunek Ca/P (atomów wapnia do atomów fosforu) w kościach jest niższy, w porównaniu do syntetycznych HAp. Wartość ta ma znaczenie jeśli chodzi o adhezję komórek, proliferację oraz remodelowanie i formowanie kości [40].

Bioapatyty stanowią nawet do 98% szkliwa zębów (pozostałe składniki to woda i związki organiczne, stanowiące 1–3% szkliwa) i aż do 50% dentyny (oraz ok. 30% związków organicznych i ok. 20% wody) [34]. Ponieważ HAp powstają w trakcie biomineralizacji w organizmie człowieka, wprowadzone do organizmu z zewnątrz nie wywołują nadmiernej reakcji immunologicznej. Dzięki tej biokompatybilności z tkankami człowieka, stosowane są jako nośniki leków [35], elementy plomb, implantów czy protez [32]. Znajdują zastosowanie w inżynierii tkankowej, planuje się także użycie ich jako markerów, np. w obrazowaniu fluorescencyjnym, przy udziale jonów europu [38].

Oprócz biokompatybilności i zdolności do biodegradacji, HAp wykazują się także optymalne dla zastosowania w nanomedycynie właściwości mechaniczne (Tab. 3), zwłaszcza jeśli chodzi o ich sztywność i twardość, podatność na biodegradację oraz wchłanianie (bioresorpcja, ang. *bioresorbability*). Tempo ich bioresorpcji może być zaprojektowane w zależności od rozpuszczalności lub warunków pH w organellach komórkowych, co np. umożliwi stopniowe uwalnianie aktywnej substancji, którą są one domieszkowane. Nanomateriały HAp mają porowatą strukturę, co jest korzystne przy domieszkowaniu, ze względu na większą powierzchnię oraz obecność nanokanalików, które mogą pomieścić dużą ilość substancji aktywnej, a następnie ją stopniowo uwalniać, np. pod wpływem zmian pH [38].

HAp są w stanie poprawiać właściwości metalowych implantów. Użycie takich materiałów ma swoje ograniczenia ze względu na możliwość uwalniania toksycznych jonów metali wskutek korozji; formowanie słabych wiązań chemicznych z kośćmi; ich kruchość i nieoptymalne właściwości mechaniczne. Hydroksyapatyty zapobiegają korozji poprzez tworzenie bariery ochronnej przeciwko rozpuszczeniu jonów metali, a mocne wiązania z kośćmi sprzyjają ich regeneracji [41]. Metalowe

implanty, w przeciwieństwie do HAp, nie są wchłaniane ani aktywne biologicznie, a po pewnym czasie się zużywają i należy je wymienić chirurgicznie [42]. Aktywność biologiczna HAp polega na tym, że w warunkach *in vivo* tworzą bezpośrednie wiązanie pomiędzy implantem a kością (osseointegracja), co wspomaga odbudowę kości w celu ułatwienia procesu gojenia [34, 43]. Właściwości cząstek fosforanów w wymiarze nano i mikro/makro porównano w Tabeli 3.

Tabela 3. Porównanie właściwości cząstek fosforanów wapnia nano-, mikro- i makrowymiarze [34, 44]
Table 3. Comparison of the hydroxyapatite properties in nano, micro and macro scales [34, 44]

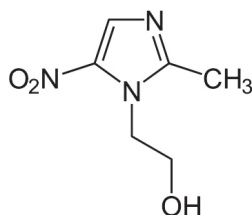
Nanocząstki CaP	Mikro-, makrocząstki CaP
Resorpcja podobna jak u bioapatytów obecnych w kościach	Resorpcja różni się od resorpcji kości
Może inhibować demineralizację	Nie ma wpływu na demineralizację
Duży stosunek powierzchni do objętości dzięki porowatej strukturze	Niewielki stosunek powierzchni do objętości
Większa bioaktywność (zwiększona osseointegracja i większa adhezja osteoblastów)	Mniejsza bioaktywność
Większa rozpuszczalność, a tym samym bioresorpcja <i>in vivo</i>	Mniejsza rozpuszczalność i bioresorpcja
Możliwość rozwoju w roztworze (np. dojrzewanie) podobne do rozwoju kości	Stabilność
Wyższa spiekalność	Mniejsza podatność na spiekanie
Bardziej szorstkie	Mniej chropowate
Lepsze zwilżanie (mniejszy kąt zwilżania)	Słabe zwilżanie (większy kąt zwilżania)
Średnica porów ok. 6,6 Å	Średnica porów ok. 19,8–31 Å
Większa adsorpcja substancji	Mniejsza adsorpcja substancji

Ostatnie badania wykazują, że hydroksyapatyty mogą inhibować wzrost komórek nowotworowych [37]. Mechanizm działania przeciwnowotworowego nie jest jeszcze dobrze poznany, ale uważa się, że ma on związek z endocytozą przez komórki nowotworowe, a także z inhibicją syntezy białek poprzez akumulację HAp w retikulum endoplazmatycznym [38]. Nanocząsteczki HAp (w przeciwieństwie do mikrocząsteczek) mogą silnie indukować apoptozę komórek wątrobiaka, stąd rozważa się jego potencjalne zastosowanie jako środka przeciwnowotworowego [45]. Hydroksyapatyty nie posiadają właściwości antybakteryjnych, dlatego po znalezieniu się nanomateriałów hydroksyapatytowych w organizmie może nastąpić adhezja biofilmu do powierzchni HAp [43]. Związki te jednak mogą łatwo ulec nasyceniu różnymi antybakteryjnymi substancjami (np. lekami, antybiotykami) lub jonami srebra, dzięki swojej mikroporowatej strukturze [32]. Apatyty mogą akceptować zarówno kationowe, jak i anionowe domieszki [37]. Implanty o właściwościach antybakteryjnych zmniejszają czas leczenia pacjenta i zwiększają wydajność terapii przez zmniejszanie środków ubocznych leczenia [43]. W inżynierii biomateriałowej stosuje się także jony magnezu, w celu polepszenia osseointegracji (zespoleńca wszczepu z kością), z kolei jony manganu sprzyjają proliferacji osteoblastów i zwiększają

szają biokompatybilność związku [32]. Aby poprawić siłę mechaniczną hydroksyapatytów, domieszkuje się je cynkiem, strontem, tytanem [37].

1.5.1. Antybiotyki w inżynierii biomateriałowej: metronidazol i tinidazol

Właściwości bakteriobójcze może nadać hydroksyapatytom domieszkowanie czynnikami o charakterze antybakteryjnym, np. antybiotykami, takimi jak metronidazol i tidazol z grupy 5-nitroimidazoli (strukturę chemiczną metronidazolu przedstawiono na Rysunku 3.) [46]. Jest to antybiotyk znany od lat 50. XX w., początkowo wykorzystywany do leczenia zakażeń pierwotniakami. Dopiero po 10 latach zorientowano się, że ma on także szerokie działanie bójcze wobec bakterii beztlenowych [47]. Wynika to z tego, że substancja ta jest aktywna tylko przy niskim potencjale oksydoredukcyjnym w środowisku [7]. Jest jednym z najczęściej używanych antybiotyków w periodontologii, w leczeniu chorób przyzębia [23], a także w przypadku chorób zapalnych jelit [47], a także profilaktycznie - w zabiegach chirurgicznych jelit (ochrona przed oportunistycznymi zakażeniami składnikami mikroflory) [7].



Rysunek 3. Chemiczna struktura metronidazolu
Figure 3. Chemical structure of metronidazole

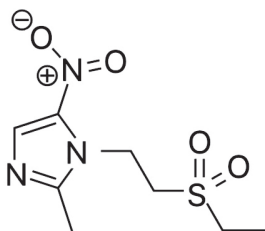
Metronidazol wnika do komórki bakteryjnej, gdzie następuje jego aktywacja i rozpad na mniejsze cząsteczki przez proces redukcji grupy nitrowej leku. Proces ten przeprowadzają składniki transportu elektronów, np. ferredoksyny. Powstające w ten sposób cytotoksyczne pochodne działają destrukcyjnie na materiał genetyczny, wprowadzając cięcia w DNA lub RNA, co powoduje śmierć komórki [7, 48].

Oporność na metronidazol wynika z syntezy przez bakterie pomp efflux lub z rozkładu antybiotyku, ale nie na cytotoksyczne pochodne lecz na nietoksyczne dla komórki bakteryjnej cząsteczki. Oporność na metronidazol wiąże się z obecnością genów *nim* (*nimA*, *nimB*, *nimC*, *nimD*), które kodują reduktazę nitroimidazolu [23]. Przeprowadza ona redukcję 5-nitroimidazolu do 5-amino pochodnych [48].

Innym antybiotykem z grupy 5-nitroimidazoli, stosowanym zamiennie z metronidazolem, jest tinidazol (strukturę chemiczną przedstawiono na Rysunku 4). Używany jest w leczeniu chorób jamy ustnej zarówno pierwotniaczych, jak i bakteryjnych – skuteczny wobec *Bacteroides spp.*, *G. vaginalis*, *Prevotella spp.* [46].

Jego mechanizm działania jest taki sam jak u innych 5-nitroimidazoli, tzn. *in vivo* następuje rozpad związku na mniejsze cząsteczki o właściwościach cytotox-

sycznych. Efektem działania tych pochodnych jest kowalencyjne ich przyłączenie do DNA, co skutkuje utratą struktury helisy, a tym samym utratą funkcji i przerwaniem nici, w efekcie powodując śmierć komórki [49].



Rysunek 4. Chemiczna struktura tinidazolu
Figure 4. Chemical structure of tinidazole

Tinidazol, w porównaniu do metronidazolu, jest lepiej tolerowany przez pacjentów, ma dwa razy dłuższy okres półtrwania (12–14 h, dzięki czemu wystarczy zażywać go raz dziennie [50]) i ma mniej szkodliwe skutki uboczne (metronidazol może powodować ataksję, zawroty głowy, konwulsje, neuropatię obwodową, nudności, wymioty, metaliczny posmak, anoreksję, biegunkę [18]). Ze względu na farmakokinetykę tinidazolu, rozważa się stosowanie go jako leku pierwszego wyboru, mając przy tym na uwadze badania pokazujące wyższy wskaźnik wyleczeń pacjentów w terapii tinidazolem (w porównaniu do metronidazolu), np. w leczeniu bakteryjnych waginoz [49, 51]. Tinidazol potencjalnie może być stosowany w leczeniu infekcji szczepami opornymi na metronidazol [49].

1.5.2. Jony i nanocząstki srebra w inżynierii biomateriałowej

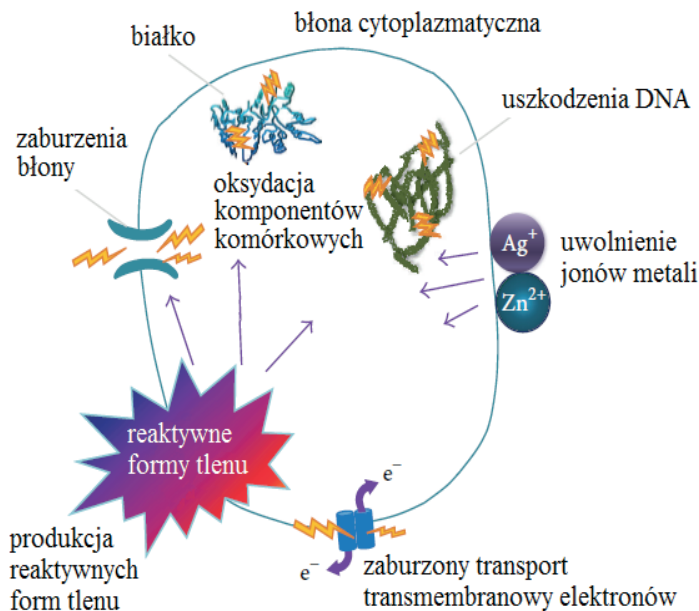
W celu nadania materiałom właściwości bakteriobójczych, wykorzystuje się jony srebra, cynku lub miedzi, jako składników domieszkujących apatyty [32, 35]. Substytuty jonowe mogą wpływać na strukturę kryształów, krystaliczność, ładunek powierzchniowy, rozpuszczalność i inne właściwości, prowadząc do zmian w wydajności [37].

Zaletą stosowania srebra jest fakt, że nie obserwuje się występowania reakcji alergicznej na srebro, w przeciwieństwie do antybiotyków. Także pojawienie się wśród bakterii oporności na srebro nie jest tak częste, jak w przypadku antybiotyków, zwłaszcza jeśli stosuje się jego biokompozyty [53]. Obecność srebra na powłoce HA_p zapobiega adhezji bakterii do implantów, co jest kluczowe, zwłaszcza w ciągu pierwszych tygodni od zabiegu chirurgicznego, kiedy ryzyko zakażenia jest największe. Potem właściwości bakteriobójcze materiału znacznie maleją [52].

Mechanizm działania wymienionych jonów polega na wnikanii do wnętrza komórki bakteryjnej i wpływu na syntezę ATP oraz zaburzenie syntezy DNA. Inny mechanizm polega na gromadzeniu jonów w ścianie komórkowej bakterii, w efekcie

zmienia się jej przepuszczalność – stopniowe uwalnianie białek i lipopolisacharydów. Zaburzenie transportu substancji ostatecznie prowadzi do śmierci komórki. Trzeci mechanizm działania tych jonów opiera się na indukcji ROS, które łączą się z elementami błony i ściany komórkowej, a także organelli wewnętrznych, prowadząc do nieodwracalnych zmian [32].

Jony srebra wykazują działanie hamujące wzrost bakterii przez wiązanie z grupami tiolowymi –S-H w białkach, prowadząc do powstania wiązania –S-Ag. W efekcie dochodzi do denaturacji białek ważnych pod względem funkcjonalnym i strukturalnym. Ponadto jony srebra hamują replikację DNA w komórce, zwiększając produkcję ROS. W efekcie ich działania ściana komórkowa ulega obkurczeniu, a jednocześnie zwiększa się jej przepuszczalność, co doprowadza do wypływu zawartości komórki i powoduje jej śmierć. Ze względu na różnice w budowie ściany komórkowej bakterii, Ag:HAp działają efektywniej na bakterie gram-ujemne niż na gram-dodatnie. Badania wykazały, że Ag:HAp mogą być toksyczne nie tylko w stosunku do mikroorganizmów, ale i wobec komórek ssaków hamując ich wzrost. Należy zatem tak dobrać stężenie jonów, aby wykazały jak najwyższą skuteczność wobec patogenów i jak najmniejszą toksyczność dla człowieka [32, 54].

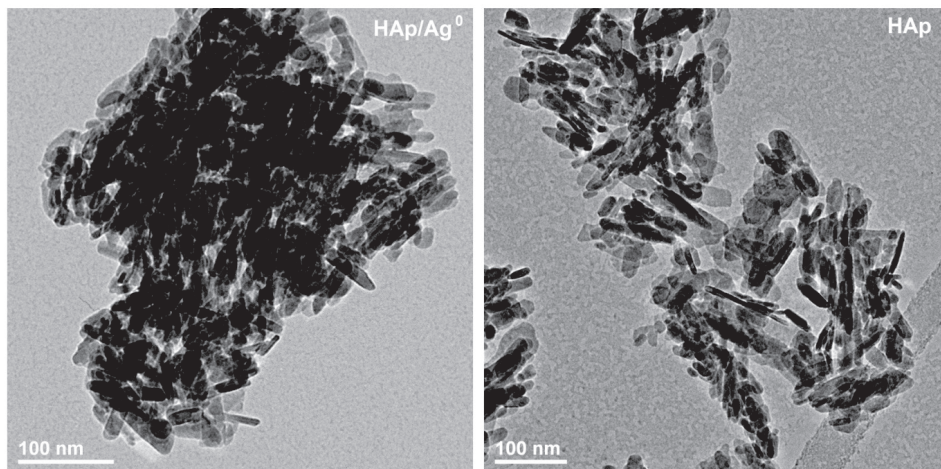


Rysunek 5. Schemat antybakteryjnego działania nanocząstek i jonów [32]

Figure 5. Proposed mode of antimicrobial activity of nanoparticles and metal ions [32]

Hydroksyapatyty można domieszkować nie tylko jonami, ale pokrywać je nanocząsteczkami srebra [55]. Takie biokompozyty cechują się większą rozpuszczalnością. Podobnie jak jony srebra, mają one aktywność bakteriobójczą, a dodatkowo przyspieszają gojenie ran. Nanocząsteczki srebra (AgNPs), w porównaniu do jonów

srebra, mają mniejszą toksyczność dla człowieka, większy stosunek powierzchni do objętości i cechują się wyższą bakteriobójczością. Niektóre badania jednak sugerują, że AgNPs mogą wchodzić w interakcje z mitochondriami lub szlakiem indukcji apoptozy, co może być cytotoksyczne [56].



Rysunek 6. Zdjęcia z transmisyjnego mikroskopu elektronowego, przedstawiające hydroksyapatyt (HAp) oraz próbkę hydroksyapatytu z imobilizowanym srebrem (HAp/Ag⁰) [55]

Figure 6. TEM images of hydroxyapatite (HAp) and hydroxyapatite immobilised with silver (HAp/Ag⁰) [55]

Badania zarówno na gramujemnych, jak i na gramodatnich bakteriach wykazały, że AgNPs są bardziej wydajne (jeśli chodzi o właściwości antybakteryjne); mają ok. 1,4–1,9 razy silniejsze działanie antybakteryjne niż jony srebra [53].

Właściwości antybakteryjne AgNPs opierają się na niszczeniu błon bakteryjnych, inhibicji replikacji DNA (poprzez powodowanie jego kondensacji), inhibicji syntezy białek lub ich właściwości enzymatycznych (poprzez interakcję srebra z grupami tiolowymi), oraz przez zmiany w reakcjach oddychania komórkowego [53]. Mechanizmy te działają synergicznie, co skutkuje niewielką opornością bakterii na AgNPs; co więcej: AgNPs mogą z tego względu stanowić skuteczną metodę eradykacji biofilmów. Ponadto, AgNPs mają działanie przeciwwirusowe i przeciwzapalne, co jest kolejną zaletą w porównaniu z antybiotykami [56]. Schemat antybakteryjnego działania nanosrebra przedstawiono na Rysunku 6.

Rozmiar i kształt AgNPs mają duży wpływ na ich aktywność bakteriobójczą. Im mniejsza jest cząsteczka, tym większy jest jej stosunek powierzchni do objętości, tym samym są one bardziej efektywne w działaniu przeciwbakteryjnym. AgNPs o kształcie trójkątnym (ang. *triangular*) inhibują wzrost bakterii w mniejszych stężeniach niż sferyczne AgNPs (ang. *spherical*), a najslabszą aktywnością cechują się cząsteczki o kształcie rurek (ang. *nanorods*) [53].

Nanocząsteczki znajdują obecnie zastosowanie w produkcji implantów naczyniowo-sercowych, cewników do wkłucia centralnego, cewników neurochirurgicznych, cementu kostnego i opatrunków [56]. Badania wykazały, że cement kostny zawierający nanosrebro ma największą aktywność bakteriobójczą, w porównaniu do cementu domieszkowanego gentamycyną i cementu niedomieszkowanego. Wykazano również, że dobrym materiałem stabilizującym nanocząsteczki srebra jest tiopronina, która ani nie wpływa na właściwości cementu, ani na cytotoksyczność [52].

2. MATERIAŁY I METODY

2.1. PODŁOŻA I WARUNKI HODOWLI

Do izolacji i hodowli bakterii beztlenowych, ze względu na ich wysokie wymagania odżywcze, zostały użyte podłoża firmy Biomerieux: Agar Brucella (BBA) z krwią, SCS Agar Schaedlera z 5% krwi baraniej, bulion Schaedlera z witaminą K3 oraz używany do izolacji i hodowli bakterii tlenowych Columbia Agar z krwią (COS), których skład przedstawiono w Tabelach 4–7. Do wzbogacenia bulionu SCS użyto 50% lizatu krwi końskiej (LHB 50%), przygotowanego z jałowej krwi końskiej otrzymanej z firmy ProAnimali.

Tabela 4. Skład podłoża stałego SCS wg danych producenta

Table 4. Composition of SCS medium

Składnik	Zawartość
Pepton kazeinowy (wołowy)	5,7 g
Pepton sojowy	1 g
Pepton mięsny (wołowy lub wieprzowy)	5 g
Wyciąg drożdżowy	5 g
Dekstroza	5,83 g
Chlorek sodu	1,7 g
Tris (hydroksymetylo) aminometan	3 g
Hemina (wołowa lub wieprzowa)	0,01 g
L-cystyna	0,40 g
Witamina K3 (menadion)	0,0005 g
Agar	13,5 g
Krew (barania)	50 ml
Oczyszczona woda	1 l

Tabela 5. Skład podłoża stałego BBA wg danych producenta
Table 5. Compositions of BBA medium

Składnik	Zawartość
Pepton kazeinowy (wołowy)	10 g
Pepton mięsny (wołowy lub wieprzowy)	10 g
Wyciąg drożdżowy	2 g
Glukoza	1 g
Chlorek sodu	5 g
Wodorosiarczyn sodu	0,1 g
Hemina (wieprzowa)	0,005 g
Witamina K1	0,001 g
Agar	15 g
Krew (barania)	50 ml
Oczyszczona woda	1 l

Tabela 6. Skład podłoża stałego COS wg danych producenta
Table 6. Composition of COS medium

Składnik	Zawartość
Pepton mięsny i kazeinowy (wołowy lub wieprzowy)	10 g
Hydrolyzat białek zwierzęcych (wołowy lub wieprzowy)	10 g
Wyciąg sercowy (wołowy lub wieprzowy)	3 g
Skrobia kukurydziana	1 g
Chlorek sodu	5 g
Agar	13,5 g
Krew (barania)	50 ml
Oczyszczona woda	1 l

Tabela 7. Skład bulionu SCS wg danych producenta
Table 7. Composition of SCS broth

Składnik	Zawartość
Pepton kazeinowy (wołowy)	8,2 g
Glukoza	5,8 g
Wyciąg drożdżowy	5 g
Tris (hydroksymetylo) aminometan	3 g
Pepton mięsny (wołowy lub wieprzowy)	2,5 g
Chlorek sodu	1,7 g
Pepton sojowy	1 g
K ₂ HPO ₄	0,8 g
L-cysteina	0,4 g
Hemina (wieprzowa)	0,01 g
Witamina K3	0,5 g
Oczyszczona woda	1 l

W celu uzyskania atmosfery beztlenowej, posłużono się generatorami do hodowli bakterii beztlenowych firmy Biomerieux: GENboxanaer i GENbox CO₂ (Tab. 8), umieszczanych w GENbagach firmy Biomerieux. Hodowla odbywała się w cieplarni laboratoryjnej, w temperaturze 36°C ±1.

Tabela 8. Teoretyczny skład atmosfery uzyskiwanej w GENbagu dzięki zastosowaniu GENboksów w oparciu o dane producenta

Table 8. Composition of the atmosphere after GENbag usage

	Stężenie tlenu	Stężenie dwutlenku węgla
GENboxanaer	< 0,1% po 2,5 h	> 15% po 24 h
GENbox CO ₂	Nie występuje	Od 3,5 do 9% po 24 h

Przechowywanie hodowli w zamrożeniu odbywało się w probówkach CRYO-BILLES firmy Biomerieux, przy użyciu zamrażarek laboratoryjnych RevCo, utrzymujących temperaturę -70°C .

2.2. TESTOWANE GATUNKI BAKTERII

Badane gatunki bakterii beztlenowych *Prevotella bivia* i *Parabacteroides distasonis* to szczepy kliniczne, wyizolowane z kanałów zębowych.

Prevotella bivia na podłożu BBA rośnie w postaci drobnych, białych, okrągłych kolonii, o średnicy około 0,5 do 1,5 mm, równym brzegu i kruchej konsystencji. Powierzchnia kolonii jest gładka i błyszcząca, lekko wzniesiona ponad powierzchnię płytki.

Parabacteroides distasonis tworzy na podłożu BBA bardzo drobne, nieprzejrzyste, gładkie i błyszczące kolonie o średnicy ok. 0,3 mm, nieprzekraczającej 1 mm, i charakterystycznym nieprzyjemnym zapachu.

2.3. TESTOWANE ZWIĄZKI ANTYBAKTERYJNE

Związki chemiczne, na których działanie wystawiano bakterie, zostały zsyntezowane w Instytucie Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych Państwowej Akademii Nauk we Wrocławiu. Ich nazwy oraz charakterystykę makroskopową zebrano w Tabeli 9.

Tabela 9. Związki antybakteryjne zastosowane w badaniach
Table 9. The tested antibacterial compounds

Nazwa związku	Opis wyglądu
Metronidazol	Biały proszek
Tinidazol	Biały proszek
Metronidazol + HAp	Biały proszek
Tinidazol + HAp	Biały proszek
Ag ₀ + HAp	Brązowo-szary proszek
Ag ⁺ + cytrynian sodu + HAp	Szary proszek
Ag 5% + HAp	Biały proszek
Ag 5% + Eu 1% + HAp	Biały proszek

Oznaczenia: HAp – hydroksyapatyt; Ag – srebro, Eu³⁺ – jon europu.

2.4. LIZA KRWI KOŃSKIEJ

Krew końska została użyta w badaniach w celu wzbogacenia bulionu SCS i poprawienia warunków hodowli bakterii bezwzględnie beztlenowych. Przygotowana była według procedury CLSI (M7, sekcja 7.1 z 2007r.). Krew (100 ml) pobrana od zwierzęcia do chwili przystąpienia do przygotowywania lizatu przechowywano w temperaturze 4°C. W celu optymalizacji procesu lizy komórek, krew przeniesiono w objętości 20 ml do pięciu jałowych falkonów i zamrożono w -20°C na 24 h. Następnie przeprowadzono lizę elementów morfotycznych krwi przez naprzemienne rozmrażanie (2–4 h) i ponowne zamrażanie (24 h). Procedurę przeprowadzono siedmiokrotnie.

Efektywność lizy sprawdzono mikroskopowo przygotowując preparat mokry i obserwując pod mikroskopem świetlnym. Brak widocznych elementów morfotycznych (erytrocytów) pozwolił na zakończenie procesu lizy. W kolejnym kroku do każdego falkonu dodano 50 ml wody miliQ, w celu rozcieńczenia krwi w stosunku 1:1. Tak otrzymany roztwór przemieszano kilkukrotnie poprzez inwersję. Po szczelnym zamknięciu, falkony zwirowano w 5000 rpm przez 30 minut. Następnie ostrożnie, nie naruszając osadu, rozlano supernatant po 4 ml do jałowych próbek. Tak przygotowane próby przechowywano w temperaturze -20°C. Pozostały we falkonach osad został zutyliczowany zgodnie z procedurą utylizacji materiałów medycznych.

2.5. PRZECHOWYWANIE SZCZEPÓW BAKTERII

Po inokulacji świeżej (18–24 godzinnej) hodowli do próbówki CRYO-BILLES i ich zawieszeniu i adhezji (przez kilkakrotne odwrócenie próbówki) do porowatych kulek polistyrenowych, usunięto nadmiar obecnego w niej płynu kriokonserwacyjnego. Po szczelnym zamknięciu próbówki, szczepy przechowywano w temperaturze -70°C. W warunkach aseptycznych, po otwarciu próbówki, pobierano zęą od

jednej do pięciu kulek polistyrenowych bezpośrednio na podłoża stałe lub płynne. Po rozproszaniu bakterii po podłożu BBA lub SCS, płytki inkubowano w 37°C przez 48–72 h w warunkach beztlenowych, zapewnionych obecnością GENboxu w szczelnie zamkniętym GENbagu. W celu weryfikacji czystości szczepu i aseptyczności pracy, równolegle zakładano hodowlę kontrolną w warunkach tlenowych, tj. na pożywce COS, którą inkubowano w 37°C przez 24–72 h; brak wzrostu bakterii na pożywce COS potwierdzał brak zanieczyszczeń bakteriami tlenowymi lub względnymi beztlenowcami. Analogicznie do wyżej opisanej procedury, hodowlę odmładzano także z powodzeniem z płytek przechowywanych w GENbagu, w temperaturze 4°C.

2.6. PRZYGOTOWANIE SZEREGU MIKROROZCIEŃCZEŃ ZWIĄZKÓW ANTYBAKTERYJNYCH

Metodyka pracy opiera się na normie CLSI M11-A8 [19], która opisuje referencyjne procedury dla określenia minimalnego stężenia hamującego wzrost (MIC) dla bakterii beztlenowych metodą rozcieńczeń w agarze lub mikrorozcieńczeń w bulionie. Pierwszym krokiem jest odważenie badanej substancji tak, aby stworzyć roztwór w bulionie o dwukrotnie wyższym stężeniu niż pożądane. Tak przygotowany roztwór może być użyty do utworzenia kolejnych rozcieńczeń w postępie geometrycznym (schemat postępowania przedstawiony w Tabeli 10 i 11).

Tabela 10. Schemat szeregu rozcieńczeń

Table 10. Schematic prepared dilution

Nr próbówki	Początkowa objętość [ml]	Pobrana ze źródła objętość roztworu [ml]	Końcowa objętość [ml]	Źródło	Końcowe rozcieńczenie
0 (stock)	3	Nd.	3	Nd.	Nd.
1	1	1	2	Stock	1:1
2	1,5	0,5	2	Stock	1:3
3	3,5	0,5	4	Stock	1:7
4	1	1	2	Próbówka 3	1:1
5	1,5	0,5	2	Próbówka 3	1:3
6	3,5	0,5	4	Próbówka 3	1:7
7	1	1	2	Próbówka 6	1:1
8	1,5	0,5	2	Próbówka 6	1:3
9	3,5	0,5	4	Próbówka 6	1:7
10	1	1	2	Próbówka 9	1:1
11	1,5	0,5	2	Próbówka 9	1:3
12	3,5	0,5	4	Próbówka 9	1:7

Przygotowane 12 probówek odpowiada 12 kolumnom płytki titracyjnej; numer probówki odpowiada numerowi kolumny na płytce, do której roztwór będzie dodany. Tak przygotowane rozcieńczenia związku w bulionie zostały przeniesione do dołków A-G za pomocą pipety, po 180 μ l do każdego dołka. Rząd H przypisano kontrolom dodatnim i ujemnym hodowli. Kontrolę dodatnią stanowiła pożywka (180 μ l bulionu + 20 μ l LHB 50%) oraz szczep (20 μ l). Kontrole ujemne stanowiły: kontrola jałowości krwi (180 μ l bulionu + 20 μ l LHB 50%) oraz kontrola jałowości bulionu (180 μ l bulionu).

Tabela 11. Schemat płytki titracyjnej, gotowej do inkubacji
Table 11. Schematic preparation of microplate for incubation

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Szereg rozcieńczeń związku w bulionie SCS + LHB 50%											
B	Szereg rozcieńczeń związku w bulionie SCS + LHB 50% + <i>Prevotella bivia</i>											
C	Szereg rozcieńczeń związku w bulionie SCS + LHB 50% + <i>Prevotella bivia</i>											
D	Szereg rozcieńczeń związku w bulionie SCS + LHB 50% + <i>Prevotella bivia</i>											
E	Szereg rozcieńczeń związku w bulionie SCS + LHB 50% + <i>Parabacteroides distasonis</i>											
F	Szereg rozcieńczeń związku w bulionie SCS + LHB 50% + <i>Parabacteroides distasonis</i>											
G	Szereg rozcieńczeń związku w bulionie SCS + LHB 50% + <i>Parabacteroides distasonis</i>											
H	Bulion SCS + LHB 50%			Bulion SCS + LHB 50% + <i>P. bivia</i>			Bulion SCS + LHB 50% + <i>P. distasonis</i>			Bulion SCS		

2.7. INOKULACJA I INKUBACJA PŁYTKI TITRACYJNEJ

W celu inokulacji płytki testowanymi bakteriami i próbami, konieczne jest ustalenie odpowiedniej gęstości optycznej (OD) roztworu bakterii w płynie fizjologicznym za pomocą skali McFarlanda (McF). Z czystej hodowli pobierano jałową wymazówką lub ezą kolonie i przygotowywano zawiesinę bakterii w płynie fizjologicznym (min. 2 ml). Po ustaleniu gęstości optycznej na poziomie 0,5 McF, odpowiadającej $1,5 \cdot 10^8$ cfu/ml, przygotowaną zawiesinę bakteryjną rozcieńczano dziesięciokrotnie, a następnie inokulowano odpowiednie dołki na płytce titracyjnej 20 μ l zawiesiny bakterii. Płytkę następnie inkubowano przez 48 h w cieplarni z temperaturą 37°C, w warunkach beztlenowych, zapewnionych szczelnym GENbagiem z GENboksem.

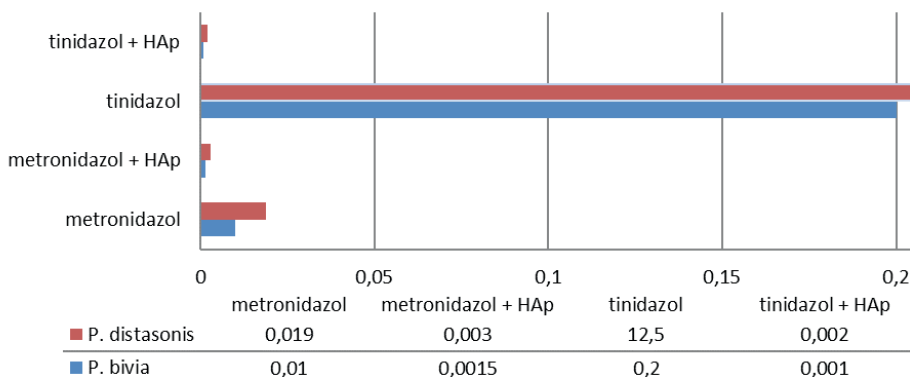
2.8. ODCZYT WYNIKÓW

Odczytu dokonano wizualnie, po 48 h inkubacji w temperaturze 37°C, zgodnie z wytycznymi normy M11-A8 CLSI [19]. Minimalne stężenie hamujące wzrost (MIC) odpowiada najniższemu stężeniu środka bakteriobójczego, przy którym już nie obserwuje się wzrostu bakterii. Minimalne stężenie bójcze (MBC) odpowiada najniższemu stężeniu, przy którym ginie 99,9% drobnoustrojów.

W celu określenia wartości MBC, posiewano po 10 μ l hodowli na podłoże BBA lub SCS (zamiennie). Następnie po 48h inkubacji w 37°C, liczono wyrosłe kolonie. MBC odpowiada 99,9% zabitych komórek bakterii.

3. WYNIKI I DYSKUSJA

W efekcie przeprowadzonych doświadczeń wyznaczono zakres wrażliwości bakterii beztlenowych na testowane kompozyty hydroksyapatytowe. Z otrzymanych rezultatów wynika, że obecność hydroksyapatytu podnosi skuteczność zastosowanych antybiotyków (metronidazolu i tinidazolu) wobec *Prevotella bivia* i *Parabacteroides distasonis*. Tinidazol immobilizowany na HAp jest ponad 6 tysięcy razy skuteczniejszy wobec *P. distasonis*, niż sam wolny antybiotyk. Wobec *P. bivia* nieimmobilizowany tinidazol okazał się 200 razy mniej skuteczny niż bionanokompozyt tinidazolu (Rys. 7). Wyniki uzyskane dla metronidazolu potwierdzają, że hydroksyapatytowy bionanokompozyt metronidazolu jest bardziej aktywny bakteriobójczo niż wolny antybiotyk, zarówno wobec *P. distasonis* i *P. bivia*. Ridi i in. [38] tłumaczą ten fakt unikalnymi właściwościami nanomateriałów, które rzutują na wysoką biologiczną skuteczność i specyficzność. Bionanokompozyty hydroksyapatytowe domieszkowane srebrem wykazują skuteczność wobec testowanych bakterii beztlenowych w bardzo wysokich stężeniach (powyżej 40 mg/ml, w zależności od zastosowanej formy kompozytu i rodzaju bakterii), co w praktyce oznacza wartości niemożliwe do osiągnięcia w warunkach *in vivo*.



Rysunek 7. Wartości MIC dla wolnych metronidazolu i tinidazolu oraz kompozytów immobilizowanych tymi antybiotykami [mg/ml]

Figure 7. MIC values for metronidazole, tinidazole and compounds immobilised with them [mg/ml]

Obecnie jednym z głównym problemem medycyny jest narastanie oporności bakterii na antybiotyki. Wiele czynników przyczynia się do powstania szczepów opornych; jednym z głównych jest wysoka plastyczność genetyczna bakterii – łatwo nabywają mutacje, ponadto mają możliwość przekazywania genów oporności poprzez horyzontalny transfer genów, nie tylko pomiędzy osobnikami tego samego

gatunku, ale nawet pomiędzy różnymi rodzajami. Wilson zauważa, że narastanie oporności na antybiotyki jest ściśle związane z ich nadużyciami – są stosowane w rolnictwie jako suplement dla zwierząt, a w medycynie nadmiernie przepisywane pacjentom w terapii antibakteryjnej [9]. Według badań prowadzonych przez Konde i wsp. wynika, że stomatolodzy przepisują swoim pacjentom 7–11% wszystkich powszechnie stosowanych antybiotyków; 66% dentystów dziecięcych przepisuje antybiotyki dla schorzeń jamy ustnej, dla których nie potrzeba rutynowej antybiotykoterapii [16].

Z kolei Wilson i Napora wykazują zasadność stosowania profilaktyki antibakteryjnej, w przypadkach, gdy zapobiega to poważnym chorobom bakteryjnym (tj. bakteriemia, sepsa, zapalenie wsierdza), których niebezpieczeństwo niosą ze sobą różnorodne zabiegi dentystyczne, zwłaszcza u osób z grupy wysokiego ryzyka [9, 17], czyli:

- chorujących przewlekle (np. miażdżyca, marskość wątroby, AIDS);
- po inwazyjnych zabiegach chirurgicznych z ryzykiem wystąpienia bakteriemii, np. u pacjentów po wszczepieniu zastawki;
- z niedoborami odporności (dzieci, osoby starsze, kobiety w ciąży lub osoby po immunosupresji czy chemioterapii).

Ze statystyki zabiegów dentystycznych (Napora i in.) wynika, że bakteriemia może wystąpić nawet w 100% przypadków podczas ekstrakcji mnogich, w ponad połowie przypadków podczas ekstrakcji pojedynczych, a także w co trzecim przypadku leczenia endodontycznego [17]. Autorzy jednak zwracają uwagę na to, że u osób z grupy niskiego ryzyka bakteriemia po zabiegach stomatologicznych trwa do 30 minut i nie zagraża wystąpieniu powikłań.

Soares wykazuje wzrost zainteresowania wykorzystaniem hydroksyapatytów w medycynie. Pełnią one ważną rolę w stomatologii przy leczeniu miazgi zębowej oraz nadwrażliwości zębiny, są związane z ekspozycją kanalików zębowych [48]. Hydroksyapatyt jest obecny w paście do zębów i w żelach dentystycznych. Zmniejsza odkładanie złogów w jamie ustnej. Używany jest jako składnik wypełnień zębowych i cementów dentystycznych.

Kolmas wskazuje na łatwość modyfikacji właściwości fizykochemicznych hydroksyapatytów, a także możliwość domieszkowania ich jonami, nanocząstkami lub bardziej złożonymi związkami, np. antybiotykami, które zapobiegać mogą adhezji bakteryjnych biofilmów do plomby czy implantu [32]. Według badań przeprowadzonych przez Koukos, w jamie ustnej tworzą się biofilmy złożone nawet z ponad tysiąca gatunków bakterii, w tym z rodzaju *Prevotella* i *Parabacteroides*. [23]. Alternatywę dla antybiotykoterapii mogą zatem stanowić hydroksyapatyty domieszkowane metronidazolem lub tinidazolem. Jak podają badacze [23, 46, 47], są to powszechnie stosowane antybiotyki w zwalczaniu infekcji jamy ustnej, skuteczne np. wobec rodzajów *Prevotella sp.* czy *Bacteroides sp.*

Lim zwraca uwagę na fakt, że hydroksyapatyty stanowią doskonałą powierzchnię do adhezji bakterii i tworzenia biofilmu [43]. Codzienne czynności higieny jamy

ustnej, np. szczotkowanie zębów, mogą stać się przyczyną powstania zadrapań lub ran, które otwierają bakteriom obecnym w biofilmie drogę do układu krwionośnego. Potencjalnie u 40% przypadków może to skutkować przejściową bakteremią. Istotnym elementem badań było zatem użycie 50% LHB, w celu przybliżenia warunków panujących w środowisku bakterii, jakim jest organizm wyższy. Lizat stanowił jednocześnie wzbogacenie warunków pożywki dla wymagających gatunków bakterii.

W Tabeli 12 zebrano wartości MIC lub MIC₉₀ wolnego metronidazolu dla rodzaju *Prevotella* spp. i *Parabacteroides* spp. na podstawie danych literaturowych. Badania Rasmussena i in. [57] z lat 1989–91, z Europy, podają wartość MIC₉₀ dla grupy *B. fragilis* w zakresie 0,5–1 µg/ml. Podobne wartości podaje Ackerman – MIC₉₀ metronidazolu dla obu ATCC *P. distasonis* określa jako 1 µg/ml, a dla *Prevotella* spp. jako 0,25 µg/ml [58]. Ednie podaje MIC₉₀ dla *P. bivia* jako wartość 4 µg/ml, a dla *P. distasonis* – 1 µg/ml [59]. Hedberg określa MIC₉₀ dla *P. distasonis* jako 2 µg/ml [60]. Badania Liebetau wykazały, że stężenie hamujące wzrost większości pozyskanych szczepów to dla *Prevotella* spp. 0,25–1 µg/ml, dla grupy *B. fragilis* 0,5–1 µg/ml. [61]. Liu podaje wartości dla *Bacteroides* spp. jako MIC₉₀ wynoszący 4 µg/ml, dla *Prevotella* spp. 8 µg/ml [62]. Peric podaje MIC₉₀ *P. bivia*: 4 µg/ml, a *B. distasonis*: 1 µg/ml [63].

Tabela 12. Porównanie wartości MIC lub MIC₉₀ wolnego metronidazolu wobec bakterii z rodzaju *Prevotella* sp. i *Bacteroides* sp. na podstawie danych literaturowych

Table 12. Comparison of the MIC and MIC₉₀ values for metronidazole against *Prevotella* spp. according to published data

<i>Prevotella</i>	<i>Parabacteroides</i>	Źródło literaturowe
b.d.	0,51 µg/ml	57
0,25 µg/ml	1 µg/ml	58
4 µg/ml	1 µg/ml	59
b.d.	2 µg/ml	60
0,25–1 µg/ml	0,5–1 µg/ml	61
8 µg/ml	4 µg/ml	62
4 µg/ml	1 µg/ml	63

Objaśnienia: b.d. – brak danych.

Według danych CLSI, 100% (173) izolatów *Prevotella* sp. oraz 100% (111) szczepów *P. distasonis* okazało się wrażliwymi na metronidazol. Pokazuje to, że metronidazol jest bardzo skuteczny wobec beztlenowców, a jednocześnie podkreśla zasadność tworzenia domieszkowanych nim bionanokompozytów [19]. Jak zaznacza Brook, ponad 90% obligatoryjnych beztlenowców jest wrażliwych na stężenia metronidazolu mniejsze niż 2 µg/ml [18].

Powyższe dane literaturowe różnią się od otrzymanych wyników wrażliwości na metronidazol, testowanych w nieniejszej pracy szczepów bakterii (*P. bivia* 10 µg/ml, *P. distasonis* 19 µg/ml). Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, że większość wyników nie dotyczy konkretnego gatunku, ale uogólnia je do rodzaju lub też grupy. Ponadto wiele odniesień literaturowych podaje MIC₉₀. Wartości także różnią

się, w zależności od miejsca geograficznego pozyskania próbki, a najnowsze dane pochodzą sprzed dziewięciu lat (2009 r.).

Porównanie otrzymanych w badaniach wyników dla tinidazolu zmusza do przemyśleń, czy rzeczywiście metronidazol można zastąpić tinidazolem [49, 51] – zwraca uwagę fakt, że w przeprowadzonych badaniach metronidazol wykazywał 20-krotnie większą bakteriobójczość wobec *P. bivia* i był ponad 650-krotnie bardziej skuteczny wobec *P. distasonis* niż tinidazol. Jak sugerował Nigro, tinidazol potencjalnie mógłby być użyty w leczeniu infekcji bakteriami opornymi na metronidazol [49], mimo że niektórzy badacze wykazują małe prawdopodobieństwo występowania szczepów opornych na metronidazol [18, 19].

W ramach niniejszej pracy zostały zbadane także nanobiokompozyty apatytowe, zawierające jony i nanocząstki srebra, stanowiące również potencjalną alternatywę dla antybiotyków; jednak, jak podaje Kędzióra, coraz częściej obserwuje się u bakterii narastanie oporności na metale ciężkie, w tym także na związki srebra [64]. Uzasadnia to przeprowadzone w niniejszej pracy zbadanie działania nanobiokompozytów srebra, a w przyszłości także przeprowadzenie porównania ze srebrem nieimmobilizowanym.

W literaturze nie znaleziono informacji nt. badania skuteczności związków i kompozytów srebra wobec badanych gatunków, bardzo nieliczne są też dane dla bakterii beztlenowych. Badania Lu i wsp. na bakteriach wyizolowanych z jamy ustnej wskazują, że bakterie tlenowe były bardziej wrażliwe na 5 nm nanocząstki srebra, niż beztlenowe patogeny [65]. Lu wskazuje także, że porównując działanie nanocząstek srebra o wielkości 5 nm, 15 nm i 50 nm, najskuteczniejsze wobec bakterii beztlenowych były cząsteczki 5 nm. Wyniki Lu potwierdzają, że AgNPs można zastosować w celu zahamowania wzrostu mikroorganizmów.

Badania Kawahary na związkach srebra w postaci jonów określają MIC wobec beztlenowych patogenów jamy ustnej w zakresie 4,8–38,4 µg/ml [66]. W niniejszej pracy określono MIC kompozytów domieszkowanych srebrem jonowym na większy niż 8–9 µg/m [66].

PODZIĘKOWANIA

Badania ujęte w tej pracy zostały wykonane w Instytucie Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych im. W. Trzebiatowskiego PAN, we Wrocławiu, oraz Zakładzie Mikrobiologii Instytutu Genetyki i Mikrobiologii Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego. Badania zostały zrealizowane w ramach projektu „Otrzymywanie i badanie właściwości nanoapatytów domieszkowanych jonami ziem rzadkich i ich biokompozytów”, Narodowe Centrum Nauki, UMO-2012/05/E/ST5/03904. Autorzy składają podziękowania dr Kamili Korzekwie za udostępnienie do badań szczepów bakterii *P. bivia* i *P. distasonis* oraz dr Katarzynie Szyszka za przygotowanie materiałów do badań mikrobiologicznych.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] H.G. Schlegel, *Mikrobiologia ogólna*, PWN, Warszawa 2003.
- [2] Z. Markiewicz, Z.A. Kwiatkowski, J. Baj, *Bakterie, antybiotyki, lekooporność*, Wydawnictwo Naukowe PWN, 2008.
- [3] N.W. Yang, J.M. Kim, G.J. Choi, S.J. Jang, *Korean J. Lab. Med.*, 2010, **30**, 133.
- [4] P.R. Murray, K.S. Rosenthal, M.A. Pfaller, A. Przondo-Mordarska, G. Martirosian, A. Szkaradkiewicz, *Mikrobiologia*, Elsevier Urban & Partner, 2011.
- [5] J. Baj, Z. Markiewicz, E.K. Jagusztyn-Krynicka, A. Piekarowicz, M. Włodarczyk, D. Bartosik, Ł. Dziewit, K.I. Wolska, Wydawnictwo Naukowe PWN, *Biologia molekularna bakterii*, Wydawnictwo Naukowe PWN, 2015.
- [6] M.T. Madigan, J.M. Martinko, P. Dunlap, D. Clarke, *Brock Biology of Microorganisms*, 2009.
- [7] P. Singleton, *Bakterie w Biologii, Biotechnologii i Medycynie*, Wydawnictwo Naukowe PWN, 2000.
- [8] W. Kunicki-Goldfinger, J. Baj, Z. Markiewicz, S. Kobyliński, *Życie bakterii*, Wydawnictwo Naukowe PWN, 2008.
- [9] B.A. Wilson, A.A.S.D.D. Whitt, M.E. Winkler, *Bacterial Pathogenesis: A molecular Approach*, ASM Press, 2011.
- [10] M.J. Bull, N.T. Plummer, *Integr. Med. (Encinitas)*, 2014, **13**, 17.
- [11] M. Kverka, Z. Zakostelska, K. Klimesova, D. Sokol, T. Hudcovic, T. Hrnrcir, P. Rossmann, J. Mrazek, J. Kopečný, E.F. Verdu, H. Tlaskalova-Hogenova, *Clin. Exp. Immunol.*, 2011, **163**, 250.
- [12] A. Damms-Machado, S. Mitra, A.E. Schollenberger, K.M. Kramer, T. Meile, A. Königsrainer, D.H. Huson, S.C. Bischoff, *Biomed Res. Int.*, 2015, **2015**, 1.
- [13] K.E. Aldridge, D. Ashcraft, K. Cambre, C.L. Pierson, S.G. Jenkins, J.E. Rosenblatt, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2001, **45**, 1238.
- [14] Y. Park, J.Y. Choi, D. Yong, K. Lee, J.M. Kim, *Korean J. Intern. Med.*, 2009, **24**, 13.
- [15] J.G. Bartlett, *Clin. Infect. Dis.*, 2005, **40**, 923.
- [16] S. Konde, L. Jairam, P. Peethambar, S. Noojady, N. Kumar, *J. Indian Soc. Pedod. Prev. Dent.*, 2016, **34**, 145.
- [17] M. Napora, *Nowa Stomatol.*
- [18] I. Brook, H.M. Wexler, E.J.C. Goldstein, *Clin. Microbiol. Rev.*, 2013, **26**, 526.
- [19] D.W. Hecht, D.M. Citron, J. Dzink-Fox, W.W. Gregory, N.V. Jacobus, G.S. Jenkins, J.E. Rosenblatt, A.N. Svhuetz, H. Wexler, *M11A8: Anaerobic Bacteria Antimicrobial Susceptibility*, 8th edn., 2012.
- [20] S. Taniguchi, M. Fujimori, T. Sasaki, H. Tsutsui, Y. Shimatani, K. Seki, J. Amano, *Cancer Sci.*, 2010, **101**, 1925.
- [21] A. Di Marco Berardino, R. Inchingolo, A. Smargiassi, A. Re, R. Torelli, B. Fiori, T. D'Inzeo, G.M. Corbo, S. Valente, M. Sanguinetti, T. Spanu, *J. Clin. Microbiol.*, 2014, **52**, 1284.
- [22] A. Mirza, J. Bove, J. Litwa, G. Appelbe, *J. Hand Microsurg.*, 2016, **04**, 77.
- [23] G. Koukos, A. Konstantinidis, L. Tsalikis, M. Arsenakis, T. Slini, D. Sakellari, *Open Dent. J.*, 2016, **10**, 89.
- [24] S. Nalmas, E. Bishburg and T. Chan, *ScientificWorldJournal.*, 2007, **7**, 1631.
- [25] H. Mikamo, K. Kawazoe, K. Izumi, K. Watanabe, K. Ueno and T. Tamaya, *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.*, 1998, **6**, 61.
- [26] A. Aroutcheva, Z. Ling, S. Faro, *Anaerobe*, 2008, **14**, 256–260.
- [27] S.N. Hsu, S. Yonekura, C.Y. Ting, H.M. Robertson, Y. Iwai, T. Uemura, C.H. Lee, A. Chiba, *PLoS Genet.*, 2009, **5**, e1000441.
- [28] A. Machado, K.K. Jefferson, N. Cerca, *Int. J. Mol. Sci.*, 2013, **14**, 12004.
- [29] C.A. Spiegel, *Clin. Microbiol. Rev.*, 1991, **4**, 485.

- [30] S. Cauci, S. Driussi, R. Monte, P. Lanzafame, E. Pitzus, F. Quadrifoglio, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1998, **178**, 511.
- [31] J.A. Al-Tawfiq, *Intern. Med.*, 2008, **47**, 69.
- [32] J. Kolmas, E. Groszyk, D. Kwiatkowska-Rózycka, *Biomed Res. Int.*, 2014, **2014**, 178123.
- [33] S. Pujari-Palmer, S. Chen, S. Rubino, H. Weng, W. Xia, H. Engqvist, L. Tang, M.K. Ott, *Biomaterials*, 2016, **90**, 1.
- [34] S.V. Dorozhkin, *Acta Biomater.*, 2010, **6**, 715.
- [35] J. Dong, S. Zhang, J. Ma, H. Liu, Y. Du, Y. Liu, *PLoS One*, 2014, **9**, e94937.
- [36] K.R. Mohamed, H.H. Beherei, Z.M. El-Rashidy, *J. Adv. Res.*, 2014, **5**, 201.
- [37] M. Šupová, *Ceram. Int.*, 2015, **41**, 9203.
- [38] F. Ridi, I. Meazzini, B. Castroflorio, M. Bonini, D. Berti, P. Baglioni, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2017, **244**, 281.
- [39] S.R. Dutta, D. Passi, P. Singh, A. Bhuibhar, *Ir. J. Med. Sci.*, 2015, **184**, 101.
- [40] M. Šupová, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 2009, **20**, 1201–1213.
- [41] R.I.M. Asri, W.S.W. Harun, M.A. Hassan, S.A.C. Ghani, Z. Buyong, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, 2016, **57**, 95.
- [42] R. Yunus Basha, S.K. Sampath, M. Doble, *Mater. Sci. Eng. C*, 2015, **57**, 452.
- [43] P.N. Lim, L. Chang, E.S. Thian, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, 2015, **11**, 1331.
- [44] M. Sadat-Shojai, M.T. Khorasani, E. Dinpanah-Khoshdargi, A. Jamshidi, *Acta Biomater.*, 2013, **9**, 7591.
- [45] W. Yanhua, H. Hao, Y. Li, S. Zhang, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 2016, **140**, 297.
- [46] H. Kauser, M. Qadir, W. Anwar, *J. Fam. Med. Prim. care*, 2014, **3**, 467.
- [47] S. Löfmark, C. Edlund, C.E. Nord, *Clin. Infect. Dis.*, 2010, **50**, S16.
- [48] G.M.S. Soares, L.C. Figueiredo, M. Faveri, S.C. Cortelli, P.M. Duarte, M. Feres, *J. Appl. Oral Sci.*, 2012, **20**, 295.
- [49] M.M. López Nigro, M.A. Carballo, *Toxicol. Lett.*, 2008, **180**, 46.
- [50] L. Alou, M.J. Giménez, F. Manso, D. Sevillano, M. Torrico, N. González, J.J. Granizo, A. Bascones, J. Prieto, J.R. Maestre, L. Aguilar, *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2009, **33**, 449.
- [51] J.R. Schwebke, R.A. Desmond, [w:] *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, NIH Public Access, 2011, vol. 204, str. 211.e1-6.
- [52] S.A. Brennan, C.N. Fhoghlú, B.M. DeVitt, F.J. O'Mahony, D. Brabazon, A. Walsh, *Bone Jt. J.*, 2015, **97-B**, 582.
- [53] L. Actis, L. Gaviria, T. Guda, J. L. Ong, *J. Korean Assoc. Oral Maxillofac. Surg.*, 2013, **39**, 43.
- [54] M.J. Hajipour, K.M. Fromm, A. Akbar Ashkarran, D. Jimenez de Aberasturi, I.R. de Larramendi, T. Rojo, V. Serpooshan, W.J. Parak, M. Mahmoudi, *Trends Biotechnol.*, 2012, **30**, 499.
- [55] R.J. Wiglusz, A. Kedziora, A. Lukowiak, W. Doroszkiewicz, W. Strek, *J. Biomed. Nanotechnol.*, 2012, **8**, 605.
- [56] H. Lu, Y. Liu, J. Guo, H. Wu, J. Wang, G. Wu, *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, **17**, 334.
- [57] B.A. Rasmussen, K. Bush, F.P. Tally, *Clin. Infect. Dis.*, 1997, **24 Suppl 1**, S110-20.
- [58] G. Ackermann, R. Schaumann, B. Pless, M.C. Claros, A.C. Rodloff, *J. Antimicrob. Chemother.*, 2000, **46**, 115.
- [59] L.M. Ednie, P.C. Appelbaum, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2009, **53**, 2163.
- [60] M. Hedberg, *K. Institutet, Methods*, 2003, **9**, 475.
- [61] A. Liebetrau, A.C. Rodloff, J. Behra-Miellet, L. Dubreuil, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2003, **47**, 3667.
- [62] C.Y. Liu, Y.T. Huang, C.H. Liao, L.C. Yen, H.Y. Lin, P.R. Hsueh, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2008, **52**, 3161.
- [63] M. Peric, M.R. Jacobs, P.C. Appelbaum, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004, **48**, 3188.

- [64] A. Kędziora, K. Sobik, *Probl. Nauk Biol.*, 2013, **62**, 557.
- [65] Z. Lu, K. Rong, J. Li, H. Yang, R. Chen, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 2013, **24**, 1465.
- [66] K. Kawahara, K. Tsuruda, M. Morishita, M. Uchida, *Dent. Mater.*, 2000, **16**, 452.

Praca wpłynęła do Redakcji 3 czerwca 2018

