

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

Α΄ ΟΡΘΟΠΑΙΔΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

Διευθυντής: Καθηγητής Π. Ι. Παπαγγελόπουλος

**ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΕΚΒΑΣΗΣ ΣΟΒΑΡΩΝ GRAM
ΑΡΝΗΤΙΚΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΟΣΤΕΟΜΥΕΛΙΤΙΔΑ**

ΣΤΑΥΡΟΣ Δ. ΓΟΥΜΕΝΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ 2020

ΙΠΠΟΚΡΑΤΙΚΟΣ ΟΡΚΟΣ ΚΕΙΜΕΝΟ

ΟΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ ΚΑΙ ΥΓΙΕΙΑΝ ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΕΥ-
ΜΕΝΟΣ, ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ
ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ. ΗΓΗΣΕΣΘΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ
ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ
ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΕΣΘΑΙ ΚΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗ-
ΣΕΣΘΑΙ ΚΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΑΥΤΟΥ ΑΔΕΛΦΕΥΣΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝΕΕΙΝ
ΑΡΡΕΣΙ ΚΑΙ ΔΙΔΑΞΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ. ΗΝ ΧΡΗΖΩΣΙ ΜΑΝ-
ΘΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΣ, ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ
ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΟΙΠΗΣ ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗ-
ΣΕΣΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ ΚΑΙ ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝΤΟΣ ΚΑΙ
ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΞΥΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙΣ ΤΕ ΚΑΙ ΟΡΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ
ΙΗΤΡΙΚΩ, ΑΛΛΩ ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ'
ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ
ΔΗΛΗΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗ ΕΙΡΕΒΕΙΝ. ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ
ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ, ΟΥΔΕ ΥΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΙΗΝ
ΤΟΙΗΝΔΕ· ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ.
ΑΓΝΩΣ ΔΕ ΚΑΙ ΟΣΙΟΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ
ΤΗΝ ΕΜΗΝ. ΟΥ ΤΕΜΕΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘΙΩΝΤΑΣ, ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ
ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙΝ ΠΡΗΞΙΟΣ ΤΗΣΔΕ. ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ
ΕΣΙΩ, ΕΞΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤΟΣ ΕΩΝ
ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ ΤΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟ-
ΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ ΓΥΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΕΙΩΝ,
ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ. Α Δ' ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΗ Η ΙΔΩ Η
ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΕΙΗΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Α ΜΗ
ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑΛΕΕΣΘΑΙ ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ. ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ
ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟΙΑΥΤΑ. ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕΑ
ΠΟΙΕΟΝΤΙ ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧ-
ΝΗΣ, ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ ΠΑΡΑ ΠΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΑΙΕΙ ΧΡΟ-
ΝΟΝ· ΠΑΡΑΒΑΙΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΕΟΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ.

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 24/02/2015

Ημερομηνία κατάθεσης θέματος και πρωτοκόλλου διδακτορικής διατριβής: 30/08/2017

Ημερομηνία κατάθεσης πρώτης έκθεσης προόδου: 06/09/2017

Ημερομηνία κατάθεσης δεύτερης έκθεσης προόδου: 09/11/2018

Ημερομηνία κατάθεσης τρίτης έκθεσης προόδου: 05/04/2019

Ημερομηνία κατάθεσης διδακτορικής διατριβής:

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής

Αναπλ. Καθηγήτρια Ο. Σαββίδου, Επιβλέπον Μέλος ΔΕΠ

Καθηγητής Ε. Ι. Γιαμαρέλλος-Μπουρμπούλης

Καθηγητής Π. Παπαγγελόπουλος

Πρόεδρος Ιατρικής Σχολής: Καθηγητής Π. Π. Σφηκάκης

ΑΝΤΙ ΠΡΟΛΟΓΟΥ

Η οστεομελίτιδα είναι μία σχετικά ασυνήθης παρόλα ταύτα αρκετά κοστοβόρος μάστιγα του σύγχρονου δυτικού κόσμου. Επιπλέκει σε ποσοστό 1.5-2.5 % τις απλές χειρουργικές επεμβάσεις αρθροπλαστικής στις κατά γόνυ και κατ'ίσχιον αρθρώσεις, ενώ τα ποσοστά ανέρχονται έως και 10-20% σε επεμβάσεις τοποθέτησης ογκολογικών προθέσεων ή αναθεώρησης αρθροπλαστικών. Αποτελεί επιπροσθέτως τη συνηθέστερη επιπλοκή μετά από ανοιχτά κατάγματα μακρών οστών με επίπτωση από 4% έως και 64% ανάλογα τον τύπο της κάκωσης. Όσον αφορά δε το συνολικό κόστος που επιβαρύνει τα συστήματα υγείας, υπολογίζεται ότι στις ΗΠΑ κάθε ένα περιστατικό με οστική λοίμωξη μετά από τοποθέτηση εμφυτευμάτων κοστίζει στο αμερικανικό σύστημα υγείας περίπου 25.000-50.000 δολάρια. Το συνολικό κόστος στην πραγματικότητα είναι ακόμα υψηλότερο αν συμπεριλάβει κανείς την όψιμη ζημεία στην παραγωγικότητα λόγω των αυξημένων ποσοστών αναπηρίας των ασθενών μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας. Η παρούσα μελέτη φιλοδοξεί στο να συνεισφέρει στην παθοφυσιολογία του ασθενή με περιπροθετική λοίμωξη εστιάζοντας στην τροποποίηση της απόκρισης του ανοσολογικού του συστήματος στο αρχικό αλλά και σε ένα νέο σηπτικό ερέθισμα, έτσι ώστε να εμπλουτιστεί η συσσωρευθείσα γνώση με απώτερο στόχο νέες θεραπευτικές μεθόδους.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή δεν θα ήταν δυνατό να εκπονηθεί δίχως την συνεργασία και συμπαράσταση των μελών της Μονάδας Χρήσης Ζώων για Ιατρικούς και Επιστημονικούς Σκοπούς του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου «Αττικόν» καθώς επίσης και του εργαστηρίου ανοσολογίας λοιμώξεων και αντιμικροβιακής χημειοθεραπείας της Δ' Παθολογικής Κλινικής της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ, των οποίων η τεχνογνωσία προσέφερε αποτελέσματα βέλτιστης ποιότητας, ενώ ταυτόχρονα επέδειξαν απaráμιλλο επαγγελματισμό που ξεπεράστηκε μόνο από την θερμή φιλοξενία και συναδελφικότητα προς το πρόσωπό μου. Θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου για την αδιάλειπτη στήριξη και εμπιστοσύνη που μου παρείχαν ο Καθηγητής κ. Π. Παπαγγελόπουλος, αλλά και η αναπληρώτρια καθηγήτρια κ. Ο. Σαββίδου, της οποίας η πόρτα ήταν πάντα ανοιχτή για να με εφοδιάσει με εποικοδομητική κριτική και καίριες συμβουλές για την επιτέλεση του απαιτητικού χειρουργικού μέρους της πειραματικής μελέτης. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά

τον καθηγητή κ. Ε. Γιαμαρέλλο-Μπουρμπούλη για την διαρκή και αφοσιωμένη επίβλεψη, τον άρτιο σχεδιασμό, την υπομονετική καθοδήγηση, την πολύτιμη ενθάρρυνση, την αδιάκοπη παρουσία του, αλλά κυρίως για την ακεραιότητα που επιδεικνύει στην εκπλήρωση υψηλού επιπέδου απαιτήσεων και για τη γενναιοδωρία με την οποία εφοδιάζει όλους τους μαθητές του με τα απαραίτητα επιστημονικά εργαλεία. Ήταν μεγάλη τιμή και ασύγκριτη εμπειρία που μαθήτευσα κοντά του.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Παθοφυσιολογία της οστεομυελίτιδας.....	8
2. Οξεία και χρόνια οστεομυελίτιδα.....	9
3. Διαγνωστική προσέγγιση περιπρωθετικών λοιμώξεων.....	10
4. Παθογόνοι μικροοργανισμοί.....	11
5. Τα στάδια δημιουργίας της βιομεμβράνης.....	12
6. Μη ειδική ανοσολογική απόκριση στη βιομεμβράνη.....	15
7. Ειδική ανοσολογική απόκριση στη βιομεμβράνη.....	21
8. Η επίδραση της ανοσιακής απόκρισης στον οστικό μεταβολισμό.....	24
9. Τροποποίηση της ανοσιακής απόκρισης στη χρόνια νόσο.....	32

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Εισαγωγή.....	35
2. Ζωικά πρότυπα και μέθοδοι.....	36
3. Αποτελέσματα.....	44
4. Συζήτηση.....	61
5. Ελληνική περίληψη.....	65
6. Αγγλική περίληψη.....	67
7. Βιβλιογραφία.....	68

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΟΣΤΕΟΜΥΕΛΙΤΙΔΑΣ

Ως οστεομυελίτιδα ορίζουμε την φλεγμονώδη διεργασία που κινητοποιείται όταν ένα παθογόνο αίτιο (συνήθως βακτήριο) και προσβάλλει τον οστικό μυελό, φλοιό ή περιόστεο και περιβάλλοντες ιστούς προκαλώντας οστεόλυση [1,3,4]. Η νόσος μπορεί να προσβάλλει οποιοδήποτε οστό του σκελετού, εμφανίζοντας σηπτικές εστίες σε μία ή και πολλαπλές περιοχές του ιδίου οστού ή και πέριξ αυτού. Χαρακτηριστικό της νόσου είναι ότι δύναται να εμφανιστεί σε ασθενείς όλων των ηλικιών εκδηλώνοντας ένα εξαιρετικά ευρύ φάσμα παθοφυσιολογικών εναλλαγών και κλινικής εικόνας [1,2,5]. Σημειώνεται σε αυτό το σημείο ότι η μη βακτηριακή οστεομυελίτιδα αποτελεί μόνο το 2-5% του συνόλου των ασθενών με κλινική κι εργαστηριακή εικόνα οστικής φλεγμονής. Η πλειοψηφία εξ αυτών πάσχει από μία ανοσολογικής αρχής νόσο ονομαζόμενη χρόνια υποτροπιάζουσα πολυεστιακή οστεομυελίτιδα [6,7]. Εκ της συντριπτικής πλειοψηφίας των ασθενών με μικροβιακή οστεομυελίτιδα είναι πλέον ευρέως αποδεδειγμένο ότι βακτήρια της δερματικής χλωρίδας και ιδίως gram θετικοί κόκκοι αποτελούν τους συνηθέστερους αιτιολογικούς παράγοντες [8,9]. Βάσει της πύλης εισόδου του παθογόνου προκύπτουν τρεις κατηγορίες οστικής λοίμωξης [4] :

- **Αιματογενής διασπορά** : Συναντάται συνήθως σε παιδιά και λιγότερο συχνά σε ηλικιωμένους. Είναι πολύ σπάνια σε ενήλικους, εκτός αν υπεισέρχονται επιβαρυντικοί παράγοντες όπως μεσογειακή αναιμία, σύνδρομο επίκτητης ανοσοανεπάρκειας, φυματίωση κλπ. Προκαλεί αυτόματο οστικό ενοφθαλμισμό ή και προσβολή οστικών εμφυτευμάτων αν υπάρχουν, ως απόρροια αλλόθεσης από άλλες σηπτικές εστίες ή αυτόματη βακτηριαιμία. Στις περισσότερες περιπτώσεις είναι μονομικροβιακές [10,11].
- **Δευτερογενής οστεομυελίτιδα επί νευραγγειακής δυσπραγίας** : Εμφανίζεται συνήθως σε ασθενείς με αγγειακή ανεπάρκεια, μικροαγγειοπάθεια ή νευροπάθεια, που πάσχουν από χρόνια δερματικά έλκη, πχ διαβητικό πόδι ή νευροπαθητική αρθροπάθεια Charcot. Κατά κανόνα είναι πολυμικροβιακές [12].
- **Οστεομυελίτιδα κατά συνέχεια ιστικού τραύματος** : Αποτελεί τη συνηθέστερη οδό αποικισμού του οστού στους ενήλικες. Συμβαίνει κυρίως μετά από ανοιχτά κατάγματα ή μετά από επεμβάσεις οστεοσύνθεσης ή αρθροπλαστικής, όπου το μικρόβιο μεταφέρεται μέσω επιμόλυνσης του χειρουργικού πεδίου ή και διά του

ανοιχτού τραύματος. Η επίπτωση της μετακαταγματικής βακτηριακής επιμόλυνσης κυμαίνεται από 2% σε περιπτώσεις κλειστών καταγμάτων έως και 25% [13-15] ή ακόμα και 50% [16] μετά από ανοιχτά συντριπτικά κατάγματα επί ρυπαρού περιβάλλοντος. Όσον αφορά την οστική λοίμωξη μετά από επεμβάσεις αρθροπλαστικής, η επίπτωσή της στις Ηνωμένες Πολιτείες αναφέρεται ότι ήταν 2-2.5% εκ των γενομένων ολικών αρθροπλαστικών στις κατά γόνυ και ισχίου αρθρώσεις στο χρονικό διάστημα μεταξύ 2001 και 2009 [17]. Παρόλα αυτά η πιθανότητα υποτροπής τυχόν λοίμωξης μετά από το χειρουργείο αναθεώρησης των υλικών ανέρχεται έως και 40% [18]. Είναι ευνόητο ότι αυτού του τύπου η οστεομυελίτιδα αποτελεί μία ακόμα μεγαλύτερη πρόκληση προς επιτυχή θεραπεία, καθώς η παρουσία επιμολυσμένων ορθοπαιδικών εμφυτευμάτων καθιστά επιτακτική τη συμμετοχή ομάδας εξειδικευμένων θεραπόντων με στόχο την οριστική εκρίζωση του παθογόνου. Για αυτές τις λοιμώξεις έχει επικρατήσει να χρησιμοποιείται ο όρος περιπροθετικές λοιμώξεις.

2. ΟΞΕΙΑ ΚΑΙ ΧΡΟΝΙΑ ΟΣΤΕΟΜΥΕΛΙΤΙΔΑ

Ένας βασικός και πολλές φορές δύσκολος διαχωρισμός της οστεομυελίτιδας είναι η διάκρισή της σε οξεία και χρόνια, πράγμα που αποκτά τεράστια σημασία όσον αφορά τις στρατηγικές αντιμετώπισής της. Η επικρατούσα επιστημονική άποψη είναι ότι πιο αξιόπιστο κριτήριο χρονιότητας αποτελούν συγκεκριμένα ιστολογικά ευρήματα κατόπιν μικροσκόπησης ιστοτεμαχίου, σε αντίθεση με τον κλασσικό εμπειρικό διαχωρισμό βασισμένο στο χρονικό διάστημα από την εκδήλωση συμπτωμάτων της λοίμωξης. Η οξεία οστεομυελίτιδα χαρακτηρίζεται από αιφνίδιας έναρξης έντονα κλινικά σημεία οξείας οστικής φλεγμονής με συμμετοχή των πέριξ μαλακών μορίων, όπως εμπύρετο, έντονο οίδημα, θερμότητα και ερυθρότητα, ενώ τοποθετείται χρονικά συνήθως εντός δύο εβδομάδων από την εισβολή της λοίμωξης. Χαρακτηριστικά ιστολογικά ευρήματα είναι η ουδετεροφιλική διήθηση, παρουσία υψηλού μικροβιακού φορτίου, μικροαγγειακή καταστροφή και νεκρώσεις του οστού και των πέριξ μαλακών μορίων. Τα περιστατικά με αιματογενή οστεομυελίτιδα είναι κατά κανόνα οξέα. Εν αντιθέσει χρόνια οστεομυελίτιδα παρατηρείται συνήθως μετά από ανοιχτά κατάγματα και επεμβάσεις

αρθροπλαστικής ή κατά συνέχεια ιστού σε περιπτώσεις διαβητικού ποδός, ιεροκοκκυγικών κατακλίσεων, κλπ. Χαρακτηρίζεται μακροσκοπικά από οστικές νεκρώσεις και παρουσία απολύματος με ή χωρίς περιουσιτική αντίδραση παραγωγής νέου οστού. Ιστολογικά προεξάρχουν τα λεμφοκύτταρα και τα μακροφάγα. Τα συμπτώματα και κλινικά σημεία εμφανίζονται συνήθως περί τις 6 εβδομάδες μετά τη λοίμωξη και τις περισσότερες φορές δεν είναι ειδικά. Περιλαμβάνουν χρόνια άτυπο άλγος, ενίοτε εμπύρετο ή δεκατική πυρετική κίνηση, παρουσία χρόνιων δερματικών βλαβών, συρίγγια ή συλλογές πέριξ του οστού ή πέριξ των υλικών της αρθροπλαστικής ή της οστεοσύνθεσης και χαλάρωση αυτών [19,20,24].

Οι περιπροθετικές λοιμώξεις μπορούν να διαχωριστούν περαιτέρω σε πρώιμες μετεγχειρητικές εφόσον διαγνωσθούν εντός ενός μηνός από την ημέρα της επέμβασης, ενώ χαρακτηρίζονται ως όψιμες μετεγχειρητικές αν διαγνωσθούν μετά του ενός μηνός. Περιπροθετικές λοιμώξεις προερχόμενες από αιματογενή διασπορά του παθογόνου χωρίζονται σε οξείες, αν μεσολαβούν λιγότερο από 3 εβδομάδες μεταξύ της έναρξης των συμπτωμάτων και της χειρουργικής επέμβασης, ενώ θεωρούνται χρόνιες αν τα συμπτώματα της λοίμωξης εμφανιστούν μετά από τις 3 εβδομάδες. Όσον αφορά τις λοιμώξεις επί υλικών οστεοσύνθεσης καταγμάτων, αυτές διακρίνονται σε πρώιμες (< 2 εβδομάδες), μέσης χρονιότητας (3-10 εβδομάδες) και όψιμες (>10 εβδομάδες) με κριτήριο τη χρονική στιγμή εμφάνισης των συμπτωμάτων μετεγχειρητικά [21].

3. ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΠΕΡΙΠΡΟΘΕΤΙΚΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ

Τα κριτήρια για τη διάγνωση της οστεομυελίτιδας δυστυχώς δεν είναι σαφή, παρά την πληθώρα των εργασιών που κατά καιρούς έχουν δημοσιευτεί. Επίσης δεν υφίσταται προς το παρόν κάποια συγκεκριμένη εργαστηριακή δοκιμασία με την απαιτούμενη ευαισθησία και ειδικότητα, έτσι ώστε να αρκεί για τη διάγνωση της νόσου. Παρόλα αυτά υπάρχουν κοινώς αποδεκτά μείζονα και ελάσσονα κριτήρια, τα οποία αθροιστικά θέτουν υψηλή ένδειξη παρουσίας της νόσου. Ισχυρή τεκμηρίωση του αιτιολογικού παράγοντα κατόπιν ένδειξης οστικής λοίμωξης, όπως η ταυτοποίηση παθογόνου σε καλλιέργεια δύο τουλάχιστον ιστοτεμαχίων από δερματικό συρίγγιο, ή η παρουσία μικροοργανισμού μετά από καλλιέργεια τουλάχιστον τριών δειγμάτων οστικής βιοψίας ή σε δύο από τα έξι

δείγματα ληφθέντα από χειρουργείο ή μετά από ζεύγος αιμοκαλλιιεργειών, θεωρούνται μείζονα κριτήρια. Επίσης μείζον κριτήριο αποτελεί η πυώδης εκροή.

Ελάσσονα κριτήρια αποτελούν η αιφνίδια και φαινομενικά αναίτια αύξηση των δεικτών φλεγμονής C αντιδρώσας πρωτεΐνης, ταχύτητας καθίζησης ερυθρών, D-διμερών και προκαλσιτονίνης, καθώς επίσης και η λευκοκυττάρωση αρθρικού υγρού με ουδετεροφιλικό τύπο, η αυξημένη συγκέντρωση λευκοκυτταρικής εστεράσης, C αντιδρώσας πρωτεΐνης και β-ντεφενσίνης στο αρθρικό υγρό. Σημειώνεται ότι μία τυχαία θετική καλλιέργεια σε ιστοτεμάχιο ληφθέν από το χειρουργείο αξιολογείται ως έλασσον κριτήριο, ενώ μία θετική καλλιέργεια από στυλεό που λήφθηκε από τραύμα επί κλίνης έχει πολύ χαμηλή διαγνωστική αξία. Ένα τουλάχιστον ιστοτεμάχιο βιοψίας πρέπει οπωσδήποτε να αποστέλλεται για ιστολογική εξέταση.

Ως προς τις απεικονιστικές μεθόδους η απλή ακτινογραφία συνεχίζει να αποτελεί τον χρυσό κανόνα για την πρώτη γραμμή απεικόνισης των μακρών οστών. Επί ενδείξεων των παραπάνω ή επί υποψίας λοίμωξης στην περιοχή της σπονδυλικής στήλης συνιστάται η διενέργεια αξονικής τομογραφίας ή σπινθηρογραφήματος οστών αναλόγως της παρουσίας ή όχι ορθοπαιδικών εμφυτευμάτων. Πιο ειδικές απεικονιστικές εξετάσεις όπως μαγνητική τομογραφία, σπινθηρογράφημα με σεσημασμένα λευκοκύτταρα και τομογραφία ποζιτρονίων αποτελούν τελευταίες εναλλακτικές και προσδίδουν στον θεράποντα συγκεκριμένες πληροφορίες σχετικά με την ακριβή έκταση και ενεργότητα της βλάβης, αλλά και εντοπίζουν σηπτικές εστίες που μπορεί να ήταν κλινικά μη εμφανείς [25,26].

4. ΠΑΘΟΓΟΝΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ

Τα συχνότερα παθογόνα που απομονώνονται από ασθενείς με οστεομυελίτιδα είναι gram θετικοί κόκκοι σε ποσοστό πάνω από 80% [22] και ιδίως ο *Staphylococcus aureus* και σταφυλοκοκκικά στελέχη αρνητικά στη δοκιμασία της κοαγκουλάσης, πχ *Staphylococcus epidermidis*. Θορυβώδης κλινική εικόνα δίκην οξείας οστεομυελίτιδας όπως περιγράφηκε παραπάνω, συνήθως σχετίζεται μετά από λοίμωξη από τα εξαιρετικά παθογόνα στελέχη *Staphylococcus aureus*, ενώ η μόλυνση από τα χαμηλότερης παθογονικότητας στελέχη *Staphylococcus epidermidis* χαρακτηρίζεται

από πιο υποκλινική εικόνα προσιδιάζοντας στον χαρακτήρα μιας χρόνιας οστεομυελίτιδας [23]. Σε συχνότητα εμφάνισης ακολουθούν λοιποί gram θετικοί κόκκοι, όπως στελέχη εντεροκόκκων, στρεπτοκόκκων και αναεροβίων, καθώς επίσης και gram αρνητικών βακτηριδίων. Σύνηθες παθογόνο ειδικά σε περιπτώσεις οστεομυελίτιδας της σπονδυλικής στήλης αποτελεί και το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης [4,8].

5. ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΤΗΣ ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΗΣ

Ο ακρογωνιαίος λίθος στην εξέλιξη μίας οξείας οστεομυελίτιδας σε χρόνια εγκατεστημένη οστική λοίμωξη είναι η δημιουργία του βιοφίλμ (biofilm), αλλιώς γνωστό ως βιομεμβράνη. Ως βιομεμβράνη ορίζεται ένας βακτηριακός πληθυσμός που λειτουργεί σαν μία κοινότητα, η οποία είναι προσκολλημένη σε μία επιφάνεια και καλύπτεται από εξωκυττάριο πολυμερές στρώμα (γλυκοκάλυκα). Οι μικροοργανισμοί που δημιουργούν βιομεμβράνη επιδεικνύουν έναν ειδικό φαινότυπο χαμηλού ρυθμού ανάπτυξης, μέσω έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων, τα οποία επιπροσθέτως προσδίδουν στην κοινότητα αξιοσημείωτη ικανότητα να ανθίστανται σε αντιβιοτικά και στην άμυνα του ξενιστή. Η διαδικασία δημιουργίας της βιομεμβράνης φαίνεται να περνάει από τρία στάδια ανάπτυξης, τα οποία είναι πρώτον η προσκόλληση, στη συνέχεια η ωρίμανση και τέλος η απόσπαση / διασπορά [28]. Σημειώνεται ότι βακτηριακές βιομεμβράνες παρατηρούνται εξίσου σε έμβιες επιφάνειες, πχ οστό, βρόγχοι, κύστη, κλπ αλλά και σε άβιες επιφάνειες, όπως ορθοπαιδικά και αγγειακά εμφυτεύματα, φλεβοκαθετήρες και ουροκαθετήρες, βηματοδότες, τεχνητές βαλβίδες κ.α. [27].

Όπως αναφέρθηκε, το πρώτο και απαραίτητο στάδιο για την ανάπτυξη της βιομεμβράνης είναι η προσκόλληση του ευκαιριακού παθογόνου με το οστό, η οποία θα γίνει είτε μέσω αιματογενούς διασποράς και εμφύτευσης είτε με άμεση επαφή κατά συνέχεια ιστού είτε λόγω υπέρμετρου πολλαπλασιασμού αυτού σε ιστό που δεν αγγειώνεται επαρκώς [4]. Ευνόητο είναι ότι το εκτεθειμένο στο περιβάλλον οστό αποτελεί μία ιδανική επιφάνεια στόχο προς αποικισμό, ιδιαίτερα μάλιστα για συγκεκριμένα βακτηριακά είδη που διαθέτουν στην επιφάνειά τους εξειδικευμένες πρωτεΐνες πρόσδεσης, όπως είναι οι σταφυλόκοκκοι [29]. Αυτές οι πρωτεΐνες ονομάζονται προσκολλητίνες (microbial surface components recognizing adhesive

matrix molecules, MSCRAMM) και αλληλεπιδρούν με συγκεκριμένες πρωτεΐνες - δομικά συστατικά του εξωκυττάρου οστικού στρώματος και των οστεοκυττάρων, οι κυριότερες των οποίων είναι η φμπρονεκτίνη και η οικογένεια του κολλαγόνου [30]. Η μεγαλύτερη υποκατηγορία των προσκολλητινών είναι οι πρωτεΐνες που προσδένονται στη φμπρονεκτίνη (FBPs) [31].

Η κυτταρική προσκόλληση στις επιφάνειες του οστίτη ιστού ή του ξένου σώματος είναι ο μηχανισμός-κλειδί εκκίνησης της ανάπτυξης της σταφυλοκοκκικής βιομεμβράνης [3]. Είναι πλέον αποδεδειγμένο ότι η παρουσία ιατρικών εμφυτευμάτων αποτελεί μείζονα προδιαθεσικό παράγοντα για την βακτηριακή προσκόλληση και την επακόλουθη ανάπτυξη οστεομυελίτιδας [32]. Μάλιστα αναφέρεται ότι βακτηριακό φορτίο έως και 10^2 CFUs του στελέχους *S. aureus* αρκεί για να αποικίσει ορθοπαιδικά εμφυτεύματα και να εγκαταστήσει χρόνια λοίμωξη επί υλικών (implant-related osteomyelitis) [33]. Η αυξημένη ευπάθεια των ξένων σωμάτων στον βακτηριακό αποικισμό οφείλεται στις εγγενείς δομικές και φυσικοχημικές ιδιότητες των υλικών. Για παράδειγμα εμφυτεύματα που διαθέτουν μικροπορώδεις και υδρόφοβες επιφάνειες, τείνουν να αυξάνουν τις διαμοριακές ελκτικές δυνάμεις ενώ παράλληλα μειώνουν τις απωθητικές, ενισχύοντας με αυτόν τον τρόπο τη βακτηριακή προσκόλληση [34,35]. Επίσης, η διαδικασία της εμφύτευσης ενός ξένου σώματος σε περιβάλλον υγιών ιστών προκαλεί μία προσωρινή φλεγμονώδη αντίδραση που οδηγεί σε παροδική κυτταροτοξικότητα για τα κύτταρα του περιβάλλοντος. Αυτό ως αποτέλεσμα επηρεάζει του μηχανισμούς άμυνας της μη ειδικής ανοσίας, όπως την φαγοκυτταρική ικανότητα των ουδετεροφίλων και την ενεργοποίηση του συμπληρώματος [36,37]. Ο όρος “race to the surface” τονίζει τον τεράστιας σημασίας ρόλο που παίζει η γρήγορη υποχώρηση της οξείας τοπικής φλεγμονής και η ταχύτητα ενσωμάτωσης του υλικού από τον οργανισμό έναντι της ταχύτητας αποικισμού του εμφυτεύματος από τον βακτηριακό πληθυσμό [57]. Μάλιστα σε μία πειραματική μελέτη σε επίμυες έδειξε την έναρξη ανάπτυξης βιομεμβράνης μετά την πρώτη ημέρα μετεγχειρητικά κιάλας. Μεταξύ της τρίτης και έβδομης μετεγχειρητικής ημέρας παρατηρήθηκε έντονος πολλαπλασιασμός του παθογόνου και αύξηση των διαστάσεων της βιομεμβράνης, ενώ μέχρι την δέκατη τέταρτη μετεγχειρητική ημέρα η ωρίμανση της βιομεμβράνης είχε φτάσει στο μέγιστό της [59].

Όταν σταδιακά οι ελκτικές δυνάμεις (van der Waals) αρχίζουν να υπερτερούν των απωθητικών, η αναστρέψιμη αρχική φάση της προσκόλλησης και συνάθροισης μεταπίπτει σταδιακά στο μη αναστρέψιμο δεύτερο στάδιο της ανάπτυξης της βιομεμβράνης, αυτό της ωρίμανσης [27]. Κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης η βακτηριακή ενδοεπικοινωνία μέσω αυτοεπαγωγικών σημάτων με κύριους πρωταγωνιστές τον αυτοεπαγωγέα 2 (AI-2) και τα αυτοεπαγόμενα πεπτιδία (AIPs) κινητοποιεί τη διαδικασία παραγωγής εξωκυτταρίων πολυμερών που περιέχουν πολυσακχαρίτες, νουκλεϊκά οξέα, λιπίδια και πρωτεΐνες, γνωστό ως γλυκοκάλυκα (extracellular polymeric substance - EPS) ο οποίος αποτελεί το εξωκυττάριο αγκυροβόλιο που σταθεροποιεί, προστατεύει και θρέφει τη βιομεμβράνη [37,38]. Τα βακτήρια φαίνεται να αποκτούν μία μορφή διακυτταρικής επικοινωνίας μεταξύ τους (quorum sensing - QS), η οποία συντονίζει την έκφραση μιας σειράς γονιδίων των μικροοργανισμών που συνδέονται με την παραγωγή ποικίλων λοιμογόνων παραγόντων, σηματοδοτικών μορίων και ενζύμων με καταληκτικό βήμα την «αλλαγή φαινοτύπου» των βακτηρίων, όσον αφορά το μεταβολισμό και την επιθετικότητά τους. Πλέον τα βακτήρια της βιομεμβράνης φαίνεται να δρουν συντονισμένα σαν ομάδα, και όχι σαν μεμονωμένα κύτταρα [39]. Σε αυτή τη φάση παρατηρείται μία αύξηση στον πληθυσμό της αποικίας, η οποία σταδιακά προσαρτά τους γειτονικούς διάφορους άλλους μικροβιακούς πληθυσμούς. Αυτός ο «συντροφισμός» είναι καίριας σημασίας στην ανταλλαγή θρεπτικών συστατικών για τη διατήρηση της βιομεμβράνης [27]. Τα βακτήρια διαβιούν πλέον σε ένα είδος οργανωμένης κοινωνίας και τροποποιούν τη συμπεριφορά τους ανάλογα με τις ανάγκες του περιβάλλοντος. Επικοινωνώντας μέσω των μορίων του QS, αποκτούν νέες ιδιότητες όπως, αυξημένη αντοχή στα αντιβιοτικά, παραγωγή λοιμογόνων παραγόντων, παραγωγή σπόρων, μεταφορά γενετικού υλικού, κ.ά. Η βιομεμβράνη τους παρέχει επίσης σημαντική προστασία τόσο έναντι του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή, όσο και του μικροπεριβάλλοντος, καθώς διευκολύνει τη μετακίνηση των θρεπτικών ουσιών αλλά και την απέκκριση των βλαπτικών προϊόντων μέσω της δημιουργίας υδάτινων διαύλων [32,39].

Η τελευταία φάση του χρόνου ζωής της βιομεμβράνης είναι η απόσπαση και διασπορά μεμονωμένων βακτηρίων, τα οποία επανενεργοποιήθηκαν από προσκολλημένα σε πλαγκτονικά ελεύθερα. Η απελευθέρωση αυτή μικροοργανισμών

από την ώριμη πλέον βιομεμβράνη είναι επίσης ελεγχόμενη και διαβιβάζεται μέσω QS. Αξιοσημείωτο είναι ότι από τον λοιπό πληθυσμό που παραμένει σε προσκόλληση περίπου το 1% βακτηρίων μέσα στη βιομεμβράνη παραμένουν σε «ύπνωση» και συνεχίζουν να είναι ανθεκτικά στα αντιβιοτικά, παρ' όλο που τα υπόλοιπα μπορεί να εξουδετερωθούν. Τα κύτταρα αυτά ονομάζονται εμμένοντα κύτταρα (persister cells) και είναι φαινοτυπικές αλλαγές της «άγριας» μορφής βακτηρίων. Ο πληθυσμός αυτός μοιάζει να παραμένει άθικτος ακόμα και σε υψηλές συγκεντρώσεις αντιβιοτικών [27,39]. Ένας ακόμα πρόσφατα αναγνωρισμένος υποπληθυσμός της ώριμης βιομεμβράνης είναι οι SCVs (small colony variants). Αυτοί οι μικροοργανισμοί είναι μεταβολικά ανενεργοί με ρυθμό πολλαπλασιασμού σχεδόν μηδενικό, που εξελίσσονται μέσα στην ώριμη βιομεμβράνη λόγω τοπικών ελλειμάτων στην μεταφορά ηλεκτρονίων και σύνθεση της θυμιδίνης. Αυτοί οι υποπληθυσμοί περιγράφεται ότι καταφέρνουν και επιβιώνουν μέσα στα φαγοκύτταρα του ξενιστή και μαζί με τα εμμένοντα κύτταρα (persister cells) αποτελούν τους ανθεκτικότερους πληθυσμούς της βιομεμβράνης που συνεισφέρουν τα μέγιστα στη χρονιότητα και σε πιθανές υποτροπές της νόσου [41,58].

6. ΜΗ ΕΙΔΙΚΗ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΤΗ ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΗ

Στα πρωταρχικά στάδια της εγκατάστασης της λοίμωξης η κυρίαρχη παρουσία των πλαγκτονικών βακτηρίων διεγείρει τη διήθηση του περιβάλλοντος από ενεργοποιημένα φαγοκύτταρα, όπως ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρηνα και M1 μακροφάγα. Η αναγνώριση και πρόσδεση των στοιχείων των παθογόνων μικροοργανισμών, των σχετιζόμενων με το παθογόνο μοριακών προτύπων (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) στους υποδοχείς αναγνώρισής τους (pattern recognition receptors, PRRs), οι οποίοι εμφανίζονται στην επιφάνεια των περιφερικών μονοπύρηνων και μακροφάγων, οδηγεί στην ενεργοποίηση του μονοπατιού του μεταγραφικού παραγοντα NF-κΒ. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων (TNFα) και οι ιντερλευκίνες IL-1β και IL-6 (**πιν.1**). Αυτές οι κυτταροκίνες ενεργοποιούν τα ουδετερόφιλα και ευοδώνουν την εξουδετέρωση του παθογόνου μέσω απελευθέρωσης ριζών οξυγόνου (ROS) και

αζώτου (NOS), παγίδευσης του μικροοργανισμού από εξωκυττάρια πρωτεϊνικές «παγίδες» των ουδετερόφιλων (NETs) και μέσω της φαγοκυττάρωσης. Αυτή η άμεση κυτταρική απόκριση της μη ειδικής ανοσίας συνήθως είναι αρκετά αποτελεσματική στον έλεγχο της λοίμωξης από τα ελεύθερα βακτήρια. Δυστυχώς όμως ο αμυντικός μηχανισμός αυτός φαίνεται να είναι αναποτελεσματικός στην εξουδετέρωση των προσκολλημένων στη βιομεμβράνη μικροοργανισμών, ιδιαίτερα επί παρουσίας ξένων σωμάτων [40].

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το ίδιο το εμφύτευμα αναγνωρίζεται από τα κύτταρα της μη ειδικής ανοσίας ως ξένο σώμα κινητοποιώντας τους μηχανισμούς λύσης και φαγοκυττάρωσης. Όμως ως άβιο και μη αποδομήσιμο υλικό δεν δύναται να φαγοκυτταρωθεί και οι μηχανισμοί της μη ειδικής ανοσιακής απόκρισης εξαντλώνται απρόσφορα με άμεσο επακόλουθο τον κυτταρικό θάνατο. Ως αποτέλεσμα η εξαντλημένη τοπική άμυνα του ξενιστή δεν δύναται να αντιμετωπίσει ταχέως και αποτελεσματικά τους ελεύθερους μικροοργανισμούς, μέρος των οποίων διαφεύγουν και κερδίζουν έδαφος στη διαδικασία της προσκόλλησης [41]. Με το πέρας των ημερών τόσο ισχυρότερα θωρακίζονται οι μικροοργανισμοί μέσα στον γλυκοκάλυκα και τόσο δυσκολότερο καθίσταται στα εξαντλημένα ουδετερόφιλα και μακροφάγα να τα αναγνωρίσουν. Απόρροια αυτής της παρατεταμένης και μη στοχευμένης έντονης απόκρισης των κυττάρων της μη ειδικής ανοσίας είναι η ιστική καταστροφή περίξ της σηπτικής εστίας, πράγμα που αναγνωρίζεται απεικονιστικά ως οστεόλυση [32].

Η ικανότητα προσκόλλησης των φαγοκυττάρων στην επιφάνεια της βιομεμβράνης και η διήθηση του εξωκυττάρου γλυκοκάλυκα ήταν πάντα αντικείμενο προς αμφισβήτηση. Είναι πλέον ευρέως αποδεκτό ότι η ώριμη βιομεμβράνη εν γένει προστατεύει τη βακτηριακή κοινότητα δυσχεραίνοντας τη διαδικασία της αναγνώρισης από τα κύτταρα της ανοσίας του ξενιστή, ενώ οι πυκνές στρώσεις από EPS καθιστούν δύσκολη την διήθηση από τα φαγοκύτταρα [50]. Επιπλέον εντός και περίξ της βιομεμβράνης επικρατούν συνθήκες υποξίας, μεταβολικής οξέωσης και ένδειας θρεπτικών στοιχείων λόγω της μεταβολικής στροφής των μικροοργανισμών της κοινότητας. Αυτές οι συνθήκες δεν ευοδώνουν την ενεργοποίηση των φαγοκυττάρων, αλλά αντιθέτως συνεισφέρουν στη διαφοροποίηση των μακροφάγων σε M2 (αντιφλεγμονώδη) και στη συσσώρευση κατασταλτικών κυττάρων της μυελικής σειράς

(MDSCs), τα οποία με τη σειρά τους επιδρούν κατασταλτικά στα T κύτταρα και προάγουν την ανοσιακή αντοχή [61]. Από την άλλη πλευρά νεότερα στοιχεία ανάλυσης των επιμέρους συστατικών του EPS δείχνουν πως μέσα σε αυτό το μακρομοριακό συνοθύλευμα υπάρχουν στοιχεία που παρεμποδίζουν την ανοσοκυτταρική ενεργοποίηση (πχ η προσκολλιλίνη PIA), αλλά και στοιχεία που την ευοδώνουν, όπως βακτηριακά δομικά συστατικά που λειτουργούν ως PAMPs. Αυτά τα μόρια προσδένονται στους TLR υποδοχείς των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων και σηματοδοτούν την έναρξη της μη ειδικής ανοσιακής κυτταρικής απόκρισης [60].

Όμως εκτός από τα PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) είναι αποδεδειγμένο ότι ουσίες που απελευθερώνονται μετά από κυτταρική καταστροφή γνωστές ως «αλαρμίνες» ή DAMPs (Damage-associated Molecular Patterns, Μοριακά πρότυπα σχετιζόμενα με καταστροφή) επίσης διεγείρουν τα κύτταρα της μη ειδικής ανοσίας μέσω αλληλεπίδρασης με τους υποδοχείς της οικογένειας TLR και ειδικότερα με τον TLR-9. Τα μοριακά συμπλέγματα αυτά περιλαμβάνουν ιστόνες, την τριφωσφορική αδενοσίνη, πρωτεΐνες της ομάδας υψηλής κινητικότητας box 1 καθώς επίσης και νουκλεϊκά οξέα [63,64]. Όπως αναφέρθηκε, ο EPS είναι πλούσιος εκτός των άλλων συστατικών και σε νουκλεϊκά οξέα, τα οποία περιλαμβάνουν τμήματα ευκαρυωτικού ουδετεροφιλικού DNA που περιέχεται στις NETs, αλλά και επίσης τμήματα προκαρυωτικού DNA που απελευθερώνεται κατόπιν της QS καθοδηγούμενης βακτηριακής αυτόλυσης. Αυτό το εξωκυττάριο βακτηριακό DNA είναι πάρα πολύ σπουδαίο για την διαστρωμάτωση του γλυκοκαλυκικού ικριώματος, αλλά και για την οριζόντια μεταφορά γονιδίων μέσα στην κοινότητα [60,65].

Στον αντίποδα ενδιαφέροντα πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι τα ανθρώπινα λευκοκύτταρα μπορούν να αναγνωρίσουν, να προσκολληθούν και να διηθήσουν τις εξωτερικές στιβάδες του γλυκοκάλυκα ακόμα και μιάς πλήρως ωριμασμένης βιομεμβράνης από *S. aureus* [42]. Μάλιστα φαίνεται ότι σε αντίθεση με την κλασσική οδό φαγοκυττάρωσης ελεύθερων βακτηρίων κατόπιν οψινοποίησης με IgG ανοσοσφαιρίνες ή μόρια του συμπληρώματος [69], στην προκειμένη περίπτωση ουδετερόφιλα μπορούσαν να φαγοκυτταρώσουν τμήματα της βιομεμβράνης χωρίς το ενδιάμεσο στάδιο της οψινοποίησης. Οι συγγραφείς καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι δομικά στοιχεία του γλυκοκάλυκα λειτουργούν ομοίως σαν ενεργοποιητές των

φαγοκυττάρων [43]. Πράγματι σε μελέτη που ακολούθησε αποδείχθηκε ότι ουδετερόφιλα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν *in vitro* με EPS που απομονώθηκε από βιομεμβράνη του στελέχους *S. epidermidis*, καθώς επίσης και μετά από διέγερση με δομικά συστατικά των βακτηρίων όπως λιποτεϊχοϊκό οξύ (LTA) και λιποπολυσακχαρίτη (LPS) [44]. Μετά την διείσδυση των ουδετεροφίλων διά της βιομεμβράνης τα κύτταρα αποκοκκιώνουν λυτικά ένζυμα, όπως λακτοφερρίνη και ελαστάση. Τα μόρια αυτά είναι αρκετά δραστικά έναντι των στοιχείων του γλυκοκάλυκα, όμως για πολύ μικρό χρονικό διάστημα, καθότι σύντομα τα πολυμορφοπύρρηνα μεταβαίνουν σε φάση απόπτωσης [45]. Αυτός είναι ένας φυσιολογικός εξελικτικός μηχανισμός της δράσης τους, έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθεί η ιστική καταστροφή. Αυτός ο μηχανισμός έχει το μειονέκτημα ότι εξαντλεί ακόμα περεταίρω τις μη ειδικές ανοσιακές εφεδρείες του ξενιστή, ενώ ταυτόχρονα συνεχίζεται η διαδικασία της ωρίμανσης της βιομεμβράνης ενισχύοντας σταδιακά όλο και περισσότερο την άμυνα της κοινότητας. Σε παρόμοιο συμπέρασμα οδηγήθηκαν οι συγγραφείς μίας άλλης μεγάλης σειράς ασθενών με περιπρωθετική λοίμωξη, αφού απομόνωσαν από το αίμα έντονα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα, τα οποία επέδειξαν μειωμένη ικανότητα διαπύδησης και έντονη παραγωγή ριζών. Μετά από την αθρόα εισβολή τους στην εστία της λοίμωξης και την κάθαρση των μικροοργανισμών που βρίσκονται ακόμα στην πλαγκτονική τους φάση, τα πολυμορφοπύρρηνα μεταβαίνουν σε ένα στάδιο εξάντλησης καθώς δεν επιτυγχάνουν φαγοκυττάρωση των προσκολλημένων βακτηρίων. Μέσα σε αυτό το βραχυπρόθεσμο στάδιο εξάντλησης αποκοκκιώνουν λυτικά ένζυμα και ρίζες προκαλώντας κυρίως ιστική καταστροφή στο μικροπεριβάλλον, έως ότου σηματοδοτηθεί η απόπτωσή τους [67,68].

Πιθανολογείται ότι στο μηχανισμό διαφυγής των βακτηρίων εντός της βιομεμβράνης από τα κύτταρα της μη ειδικής ανοσίας μετέχουν διάφοροι μηχανισμοί. Ένας από τους σημαντικότερους αμυντικούς μηχανισμούς των βακτηρίων είναι η παραγωγή της πολυσακχαριδικής ενδοκυττάριας προσκολλητίνης (PIA) [60]. Η αυξημένη παραγωγή της PIA κατά τη διάρκεια της φάσης ωρίμανσης της βιομεμβράνης, όχι μόνο ενισχύει την παθογονικότητα του στελέχους *S. epidermidis*, αλλά μειώνει σημαντικά την φαγοκυτταρική ικανότητα των ουδετεροφίλων και των μακροφάγων [46,47]. Μάλιστα σε πειραματικό μοντέλο φάνηκε ότι αυτή η φαγοκυτταρική ικανότητα συσχετίζεται αντιστρόφως ανάλογα με τη φάση ωρίμανσης στην οποία βρίσκεται η

βιομεμβράνη. Πιο συγκεκριμένα, βιομεμβράνη από *S. aureus* σε αρχόμενη φάση ωρίμανσης (1^η έως 6^η ημέρα) ήταν σημαντικά πιο ευάλωτη σε φαγοκυττάρωση *in vitro* σε σχέση με την 15^η ημέρα, δηλαδή στην πλέον ώριμη φάση της [70]. Δύο πιθανές εξηγήσεις για αυτό είναι πρώτον η μέγιστη αύξηση των διαστάσεων της βιομεμβράνης που συμβαίνει σε αυτό το χρονικό παράθυρο, καθιστώντας δυσχερή τον περιβρογχισμό αυτής από τα πολυμορφοπύρρηνα, αλλά και δεύτερον λόγω της ρύθμισης στη γονιδιακή έκφραση συγκεκριμένων γονιδιακών τόπων, όπως ο *agr* (accessory gene regulator locus), η ενίσχυση των οποίων πυροδοτεί την έκφραση παραγόντων παθογονικότητας και αντοχής στην φαγοκυττάρωση [71,72].

Επιπροσθέτως, ακόμα και μετά από τυχόν φαγοκυττάρωση, κάποια βακτήρια όπως ο *S. aureus* επιστρατεύουν μηχανισμούς αποφυγής της λύσης τους, έτσι ώστε να καταφέρνουν να επιβιώνουν εντός των φαγοκυττάρων τους [48,55]. Έχει παρατηρηθεί η επιβίωση *S. aureus* εντός μακροφάγων μετά από *in vitro* φαγοκυττάρωση για χρονικό διάστημα έως και 4 ημερών, έως ότου το μικρόβιο απελευθερώθηκε στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου προκαλώντας τη λύση του [49]. Επιπροσθέτως σε πρόσφατη εργασία αποδείχθηκε ότι ο *S. aureus* δύναται να αποικίσει τις οστικές δοκίδες και τα αβερσιανά μικροκανάλια υγιούς οστού παραμένοντας εκεί και διαφεύγοντας από τα κύτταρα της ανοσίας [56]. Ομοίως σε πειραματική μελέτη *in vitro* φαγοκυττάρωσης SCVs βιομεμβράνης *S. epidemidis* από μακροφάγα φάνηκε ότι τα στελέχη αυτά πυροδοτούσαν την έκφραση των προσδετών των πρωτεϊνών προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (PD-1/PD-L1) μέσα στο μακροφάγο παρατείνοντας την ενδοκυττάρια επιβίωσή τους μέσα στα κύτταρα του ξενιστή [80].

Ένας ακόμα αξιοσημείωτος μηχανισμός άμυνας των βακτηρίων που είναι μέρος της βιομεμβράνης είναι η αντοχή τους στις ελεύθερες ρίζες που απελευθερώνονται από τα λευκοκύτταρα με σκοπό τη βακτηριακή λύση, όπως τεκμηριώθηκε μετά από μέτρηση σημαντικής μείωσης στην έκφραση της συνθάσης του νιτρικού οξειδίου και την επαγωγή της αργινάσης-1 σε μακροφάγα τα οποία αλληλεπίδρασαν με σταφυλοκοκκική βιομεμβράνη σε πειραματικό μοντέλο σε επίμυες. Αποτέλεσμα ήταν η πρόκληση της διαφοροποίησης των μακροφάγων από M1 (προφλεγμονώδη και ενεργοποιημένα προς φαγοκυττάρωση) σε M2 (αντιφλεγμονώδη, κατασταλτικά με στόχο την ιστική αποκατάσταση) [50,73]. Ειδικότερα ο *S. aureus* έχει βρεθεί ότι παράγει ένζυμα, όπως

καταλάση, δισμουτάση του υπεροξειδίου και σταφυλοξανθίνη ως προστασία έναντι στις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS), ενώ επιπλέον διαθέτει μηχανισμούς αναγνώρισης των καίριων ουδετεροφιλικών αντιμικροβιακών πεπτιδίων [51]. Επίσης απελευθερώνει τοξίνες, όπως η λευκοσιδίνη AB και η α -τοξίνη, που επιδρούν στα κύτταρα της μη ειδικής ανοσίας και προάγουν τον κυτταρικό θάνατο [62]. Παρόμοιου τύπου επαγόμενη από εξωκυττάριο DNA αντοχή σε αντιμικροβιακές ουσίες επέδειξε και η βιομεμβράνη της *P. aeruginosa* [66]. Σε μία άλλη μελέτη πειραματικής διέγερσης μονοκυττάρων αποδείχθηκε ότι βακτήρια σε φάση προσκόλλησης επιδρούν στα κύτταρα της μη ειδικής ανοσίας μεταβάλλοντας την παραγωγή κυτταροκινών. Οι συγγραφείς κατέδειξαν μειωμένη παραγωγή των προφλεγμονωδών κυτταροκινών TNF α , IFN- γ και IL-12 μετά από απομόνωση και *in vitro* διέγερση περιφερικών μονοπύρηνων κυττάρων (PBMCs) με *S. epidermidis* σε φάση προσκόλλησης [52], επιβεβαιώνοντας σχετικά ευρήματα προηγούμενης μελέτης στην οποία φάνηκε ότι στοιχεία του EPS βιομεμβράνης του *S. aureus* είχαν κατασταλτική επίδραση στην TLR-2 και TLR-9 ενεργοποίηση [50].

Εκτός από τα M2 μακροφάγα υπάρχει ένας ακόμα κυτταρικός πληθυσμός που συντελεί καθοριστικά στον κατευνασμό της φλεγμονώδους απάντησης και αυτός είναι τα κατασταλτικά κύτταρα της μυελικής σειράς (MDSCs). Αυτά είναι αδιαφοροποίητα κύτταρα του μυελού που επίκειται να ωριμάσουν σε μονοκύτταρα (μακροφάγα ή δενδριτικά) ή κοκκιοκύτταρα όταν εκτεθούν στα αντιγονικά ερεθίσματα μίας χρόνιας φλεγμονώδους κατάστασης. Επίσης προάγουν τη διαφοροποίηση των M2 αντί των M1 μακροφάγων. Σκοπός τους είναι η καταστολή του ανοσοποιητικού και η διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ της χρόνιας φλεγμονώδους απάντησης και της υποκείμενης ιστικής καταστροφής [74,75]. Πράγματι σε πειραματική μελέτη σε επίμυες [76] αλλά και σε σειρά ασθενών που υπεβλήθησαν σε αναθεώρηση εμφυτευμάτων λόγω περιπροθετικής λοίμωξης [77,78] σημειώθηκε αυξημένη τοπική συγκέντρωση MDSCs, τα οποία μάλιστα φαίνεται να πληθαίνουν όσο αναπτύσσεται η βιομεμβράνη, ενώ σταθεροποιούνται σε αριθμό καθώς η νόσος μεταβαίνει σε χρόνια [78]. Η υπεύθυνη κυτταροκίνη για την ενεργοποίησή τους φαίνεται να είναι η IL-12 [78], ενώ η επαγόμενη από MDSCs ανοσιακή καταστολή και M2 διαφοροποίηση φαίνεται να προάγεται κυρίως μέσω της IL-10 [79].

7. ΕΙΔΙΚΗ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΤΗ ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΗ

Οι δύο βασικοί κυτταρικοί πληθυσμοί που απαρτίζουν την επίκτητη ή αλλιώς ειδική ανοσία είναι τα T και τα B λεμφοκύτταρα. Η χρόνια απόκριση της ειδικής ανοσίας στη βιομεμβράνη αφορά την κυτταρική ανοσία (T κύτταρα) και όχι τόσο την χυμική (B κύτταρα που παράγουν αντισώματα), επομένως ιδιαίτερη μνεία θα γίνει στο ρόλο που διαδραματίζουν τα T λεμφοκύτταρα [106,107] **(πιν. 2)**. Αυτά χωρίζονται σε δύο βασικές κατηγορίες ανάλογα το ρόλο που επιτελούν: Τα αποκαλούμενα «βοηθητικά» T κύτταρα που εκφράζουν τον αντιγονικό τόπο CD4+ στην επιφάνειά τους και βοηθούν στη διαδικασία της αντιγονοπαρουσίασης και τα αποκαλούμενα «κυτταροτοξικά» T κύτταρα, που εκφράζουν τον αντιγονικό τόπο CD8+ στην επιφάνειά τους και σκοπό έχουν την καταστροφή των μολυσμένων κυττάρων. Τα βοηθητικά T κύτταρα πρέπει πρωτίστως να ενεργοποιηθούν από τα κατεξοχήν αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APCs), έτσι ώστε να συμμετέχουν καθοριστικά στην ειδική κυτταρική και χυμική ανοσιακή απόκριση. Η ενεργοποίηση των T κυττάρων πυροδοτείται από τη σύνδεση των συμπλεγμάτων μείζονος ιστοσυμβατότητας (MHC) επιφανείας των APCs στους ειδικούς υποδοχείς (TCR) των T κυττάρων. Έτσι τα T κύτταρα αναγνωρίζουν μέσα στα MHCs αντιγόνα του παθογόνου που το αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο μόλις φαγοκυττάρωσε. Αυτή η σύνδεση σταθεροποιείται και παγιώνεται με την επικουρική σύνδεση των υποδοχέων CD28 των T κυττάρων στους CD80/86 των APCs. Επίσης ανάλογα των κυτταροκινών που δεσπόζουν στο μικροπεριβάλλον τα T κύτταρα διαφοροποιούνται περαιτέρω σε Th1, Th2, Th17 ή ρυθμιστικά T_{reg}s [105]. Τα Th1 κύτταρα είναι προφλεγμονώδη και εκκρίνουν τις κυτταροκίνες ιντερφερόνη-γ (IFN-γ), ιντερλευκίνη 2 (IL-2), ιντερλευκίνη 12 (IL-12) και παράγοντα νέκρωσης των όγκων (TNF-β). Τα Th2 κύτταρα είναι προσανατολισμένα προς την ατοπία και εκκρίνουν τις ιντερλευκίνες IL-4, IL-5 και IL-13. Τα Th17 κύτταρα εκκρίνουν την ιντερλευκίνη 17 (IL-17) και τέλος τα ρυθμιστικά T_{reg}s έχουν κυρίως αντιφλεγμονώδη ρόλο εκκρίνοντας ιντερλευκίνη 10 (IL-10) και τον μετατρεπτικό αυξητικό παράγοντα (TGF-β), αλλά και επιδρώντας κατασταλτικά μέσω διακυτταρικής επικοινωνίας [119].

Κυρίαρχο εύρημα σε πολλές μελέτες σειρών ασθενών με περιπρωθετικές λοιμώξεις είναι η αυξημένη αναλογία CD28-/CD11b+ T κυττάρων κάτι που συνεπάγεται ολοκληρωμένη διαφοροποίηση των T προσαγωγών κυττάρων. Αυτά τα κύτταρα επίσης

παρήγαγαν μεγάλες ποσότητες περφορίνης και IFN- γ , κάτι που είναι χαρακτηριστικό εξ άλλου των T κυτταροτοξικών κυττάρων [107-109]. Παράλληλα πειραματικές μελέτες σε επίμυες έδειξαν ότι οι χρόνιες περιπρωθετικές λοιμώξεις μπορεί να διέπονται από έντονη προφλεγμονώδη T δραστηριότητα με προεξάρχοντες κυτταρικούς πληθυσμούς τα Th1 και Th17, πράγμα που εμποδίζει τον έλεγχο της τοπικής φλεγμονής και συμβάλλει στη παράταση αυτής [111,113]. Στον αντίποδα σε άλλη πειραματική μελέτη φάνηκε ότι η αντίστροφη T κυτταρική αναλογία με προεξάρχοντες πληθυσμούς τα Th2 και T_{reg}S κατάφερε να παρεμποδίσει τη χρονιότητα της οστικής λοίμωξης [112]. Μία άλλη ερευνητική ομάδα έδειξε μέσα από πειραματικό μοντέλο και ταυτόχρονη μελέτη σειράς ασθενών, ότι ο συνολικός αριθμός των ευρισκόμενων T κυττάρων στην εστία της λοίμωξης ήταν σημαντικά χαμηλός [76-78], κάτι που αποδόθηκε στην καταστολή αυτών από τα αυξημένα MDSCs που παρατηρήθηκαν [76,110]. Αυτό το εύρημα έρχεται σε συμφωνία με παρόμοια μελέτη σειράς ασθενών με χρόνια οστεομυελίτιδα που έδειξε επίσης μειωμένους αριθμούς T κυττάρων σε ιστοτεμάχια βιοψίας [107]. Πέραν από την κατασταλτική επίδραση στον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων, φαίνεται ότι τα MDSCs επιδρούν και στην χημειοταξία αυτών, καθώς βρέθηκε ότι καταστέλλουν την έκφραση της L-σελεκτίνης (CD62L) [114], κάτι που θα μπορούσε από τη μεριά του επίσης να εξηγεί τη μειωμένη T κυτταρική διήθηση.

Ενδιαφέρον είναι ότι αυτή η καταστολή που επάγουν τα MDSCs φαίνεται να αφορά σε μεγάλο βαθμό και τα κύτταρα της μη ειδικής ανοσιακής απόκρισης (ουδετερόφιλα και μακροφάγα) και μάλιστα φαίνεται να μην προέρχεται από τις κυτταροκίνες IL-10 & IL-12. Προς επαλήθευση αυτής της υπόθεσης οι ερευνητές δημιούργησαν ένα μοντέλο πειραματικής περιπρωθετικής λοίμωξης, όπου επί απουσίας MDSCs έδειξαν αυξημένη και ταχεία φαγοκυτταρική διήθηση με συνοδό σημαντική μείωση του μικροβιακού φορτίου της βιομεμβράνης [76,78,79]. Τα πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα με τη σειρά τους σε περιβάλλον ώριμης βιομεμβράνης επιδρούν στα T κύτταρα είτε ενεργοποιώντας τα μέσω αλληλεπίδρασης με τα MHCs είτε κατασταλτικά μέσω της έκφρασης Arg-1 και επακόλουθης κατανάλωσης L-αργινίνης που διαφοροποιεί τα ουδετερόφιλα προς ένα φαινότυπο δίκην MDSC. Οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η παρουσία ώριμης βιομεμβράνης προδιαθέτει σε στροφή κάποιων ουδετεροφίλων προς μία

περισσότερο αντιφλεγμονώδη φάση, πράγμα που αποτελεί σημαντικό πεδίο διερεύνησης στο μέλλον [110,115].

Σε μία πειραματική μελέτη επαγωγής οξείας και χρόνιας περιπρωθετικής λοίμωξης από *S. aureus* σε επίμυες οι ερευνητές μέτρησαν τα παραγόμενα επίπεδα κυτταροκινών και χυμοκινών σε ιστοτεμάχια με τη μέθοδο της πρωτεομικής και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι αυξημένες προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες προήγαγαν την Th1 και Th17 απόκριση, αλλά οι μειωμένες χυμοκίνες είχαν ως αποτέλεσμα τη μειωμένη συνολικά T λεμφοκυτταρική διήθηση του οστού [116]. Οι παραγόμενες κυτταροκίνες ήταν οι ίδιες ποιοτικά στο μοντέλο της οξείας οστεομυελίτιδας (7 ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό) σε σύγκριση με το μοντέλο της χρόνιας οστεομυελίτιδας (21 ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό), μόνο που στην δεύτερη περίπτωση ήταν όλες σημαντικά μειωμένες σε συγκέντρωση.

Η ενεργοποίηση των T κυττάρων από τα APCs είναι από τα πιο κρίσιμα βήματα στην επιτυχή απόκριση της επίκτητης ανοσίας. Είναι ευνόητο ότι οποιοδήποτε έλλειμμα στη λειτουργία του αντιγονοπαρουσιαστικού κυττάρου θα επηρεάσει τη σωστή ενεργοποίηση του T βοηθητικού κυττάρου. Σε περιβάλλον χρόνιας οστικής λοίμωξης επί παρουσίας εμφυτευμάτων, όπως αναφέρθηκε, τα φαγοκύτταρα μπαίνουν σταδιακά σε μία φάση εξάντλησης λόγω της αναποτελεσματικής φαγοκυττάρωσης και της μικροβιακής κυριαρχίας στην επιφάνεια του υλικού. Εγείρεται λοιπόν το ερώτημα κατά πόσον επηρεάζεται η αντιγονοπαρουσίαση και η επιτυχής ενεργοποίηση των T κυττάρων σε αυτό το περιβάλλον. Προς αυτή την κατεύθυνση οι ερευνητές μιας πρόσφατης πειραματικής εργασίας μελέτησαν την επίδραση δύο βιοαπορροφήσιμων υλικών στην δραστηριότητα των δενδριτικών κυττάρων επί παρουσίας και απουσίας *S. aureus* και *S. epidermidis* σε πλαγκτονική φάση. Τα αποτελέσματα ήταν ότι η παρουσία των βιοϋλικών φαινόταν να επιδρά στην δενδριτική απόκριση πάνω στα βακτήρια, αλλά σε συνδυασμό με τη βακτηριακή αλληλεπίδραση δεν επηρέαζε σε σημαντικό βαθμό την δενδριτική αντιγονοπαρουσίαση [117].

Η κοινή κατακλείδα των ελαχίστων μελετών που πραγματεύονται την τροποποίηση της λειτουργίας των T κυττάρων στη χρόνια οστεομυελίτιδα είναι ότι χαρακτηρίζεται από την παρουσία ενεργοποιημένων T κυτταροτοξικών κυττάρων στην εστία ανάπτυξης βιομεμβράνης σε συνδυασμό με μία προφλεγμονώδη στροφή των T βοηθητικών

κυττάρων Th1 και Th17 με ταυτόχρονη καταστολή του λεμφοκυτταρικού πολλαπλασιασμού και της T χημειοταξίας. Αυτός ο ανοσοκυτταρικός φαινότυπος πιθανολογείται ότι προάγει την καθυστερημένη μεταστροφή των T κυττάρων σε κατασταλτικά καθώς η χρονιότητα της νόσου παρατείνεται [32].

Πρέπει να τονισθεί ότι οι περισσότερες πειραματικές μελέτες σε επίμυες χρησιμοποιούν το στέλεχος *S. aureus* για την επαγωγή περιπρωθετικής λοίμωξης και επομένως καταλήγουν να μελετούν την ανοσιακή απόκριση στα αντιγόνα και τη βιομεμβράνη του συγκεκριμένου μόνο μικροβίου, το οποίο είναι γνωστό ότι είναι εξαιρετικά παθογόνο και επάγει έντονη προφλεγμονώδη Th1 απόκριση [116]. Επομένως ένας μελλοντικός στόχος είναι η διερεύνηση της ενεργοποίησης των μονοπατιών της ειδικής κυτταρικής ανοσίας σε περιπρωθετικές λοιμώξεις από λιγότερα παθογόνα είδη. Παραδείγματος χάριν σε ένα πειραματικό μοντέλο πρόκλησης χρόνιας οστεομυελίτιδας από *S. aureus* και *S. epidermidis* σε επίμυες φάνηκε η διαφορετική επίδραση στο οστό με τον χρυσίζοντα σταφυλόκοκκο να προκαλεί έντονη οστεόλυση και δημιουργία αποσθημάτων σε αντίθεση με τον επιδερμικό. Και οι δύο μικροοργανισμοί αποίκισαν το εμφύτευμα και σχημάτισαν ώριμη βιομεμβράνη [118].

Ο ρόλος των T λεμφοκυττάρων στη χρόνια οστεομυελίτιδα φαίνεται ότι είναι καίριας σημασίας και μεγάλο κομμάτι της σχετικής έρευνας έχει στραφεί προς τη διερεύνηση αυτού του πεδίου. Επί του παρόντος ο αριθμός των σχετικών μελετών είναι μικρός και ο σκοπός τους περιορίζεται στην ανίχνευση συγκεκριμένων πληθυσμών T κυττάρων σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές στην εστία ανάπτυξης της βιομεμβράνης. Παρόλα αυτά η έκφανση της λειτουργικότητας των T λεμφοκυττάρων που σχετίζονται με τη βιομεμβράνη, η μεταξύ τους σηματοδότηση και οι μηχανισμοί που οδηγούν στην εν τέλει ανεπαρκή T κυτταρική απόκριση παραμένουν άγνωστο πεδίο προς έρευνα [32].

8. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΝΟΣΙΑΚΗΣ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΣΤΟΝ ΟΣΤΙΚΟ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ

Για την κατανόηση των επιπτώσεων της φλεγμονώδους απάντησης στον οστίτη ιστό είναι απαραίτητη η γνώση των εγγενών μηχανισμών που διατηρούν την οστεογένεση σε ομοιόσταση. Ο οστίτης ιστός βρίσκεται σε μία αέναη διαδικασία καταστροφής και παραγωγής. Οι οστεοβλάστες, που διαφοροποιούνται από

μεσεγγυματικά κύτταρα του στρώματος, ευθύνονται για την οστεονεογένεση, ενώ οι οστεοκλάστες, που διαφοροποιούνται από αρχέγονα κύτταρα του μυελού, ευθύνονται για την καταστροφή των οστικών δοκίδων. Καθότι αμφότεροι οι κυτταρικοί πληθυσμοί είναι απαραίτητη για την οστική ανάπλαση, αυτή η μεταβολική διελκυστίνδα διατηρείται σε ισορροπία μέσω του μονοπατιού της οστεοπροτεγερίνης (OPG), του ενεργοποιητή του υποδοχέα του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ (RANK) και του προσδέτη του RANK (RANKL). Έτσι η οστεοπροτεγερίνη αναστέλλει την οστεοκλαστογένεση ανταγωνιζόμενη τη σύνδεση RANK-RANKL [53]. Η ομοίωση του οστού επομένως εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις κυτταροκίνες στο ιστικό μικροπεριβάλλον και μάλιστα έχει αποδειχθεί ότι σε περιβάλλον λοίμωξης τα ενδοκυττάρια μονοπάτια της φλεγμονής οδηγούν την ισορροπία των OPG-RANK-RANKL προς οστεοκλαστογένεση και επακόλουθη οστική απορρόφηση. Οι προεξάρχουσες προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες που συντελούν σε αυτό είναι ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων TNFα και οι ιντερλευκίνες IL-1β & IL-6 [54].

Πέραν όμως από το παραπάνω γνωστό μονοπάτι της ρύθμισης του οστικού μεταβολισμού στη λοίμωξη, έχει αποδειχθεί σε αρκετές πρόσφατες μελέτες η ενεργή συμμετοχή των οστεοβλαστών στην οστεόλυση απελευθερώνοντας προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες επί ανίχνευσης και αλληλεπίδρασης με βακτήρια [84,85]. Μάλιστα αυτό σημειώθηκε είτε τα βακτήρια βρίσκονταν στην πλαγκτονική φάση είτε προσκολλημένα στη βιομεμβράνη [86,87]. Τα βακτήρια με τη σειρά τους επιδρούν στην εναπόθεση οστεοειδούς, πρώτον παρεμποδίζοντας την επιμετάλλωση και δεύτερον επάγοντας την απόπτωση των οστεοβλαστών [88], οποία με τη σειρά της απελευθερώνει τυχόν φαγοκυτταρωμένα βακτήρια και επιφορτίζει το μικροπεριβάλλον με αλαρμίνες, εντείνοντας τον φαύλο κύκλο της φλεγμονής. Αυτή η στροφή της ανοσιακής απόκρισης εναντίον της οστεοβλαστικής δραστηριότητας έχει δραματική επίπτωση στις περιπτώσεις όπου συνυπάρχουν εμφυτεύματα οστεοσύνθεσης καταγμάτων και η ανάγκη για ταχεία οστική επούλωση είναι καίρια. Σε αυτές τις περιπτώσεις η ανοσιακή απόκριση του ξενιστή έναντι της βιομεμβράνης πέριξ του εμφυτεύματος παρεμβάλλεται στην επιθυμητή φλεγμονώδη απάντηση στο τραύμα που είναι απαραίτητη για τη δημιουργία πώρου με μακροπρόθεσμη απόρροια την πλημμελή πώρωση ή και ψευδάρθρωση [89]. Απαραίτητος κυτταρικός πληθυσμός για την επίτευξη της πώρωσης

μίας λύσης της οστικής συνέχειας είναι τα μεσεγγυματικά βλαστοκύτταρα του οστού (MSCs), τα οποία είναι οι πρόδρομοι των οστεοβλαστών [90]. Εκτός από αυτό το ρόλο τους όμως φαίνεται ότι τα MSCs επιδρούν κατασταλτικά στα γειτονικά T κύτταρα [91] και μάλιστα σε μία πειραματική εργασία που μελετήθηκε η πιθανή ευεργετική δράση των MSCs στην οστική καταστροφή σε περιβάλλον οστεομυελίτιδας, φάνηκε ότι είχε το ανάποδο αποτέλεσμα προκαλώντας έξαρση της νόσου [92].

Όσον αφορά τους οστεοκλάστες, είναι πλέον γνωστό ότι πέραν του κυρίαρχου ρόλο τους στην οστική αποδόμηση είναι σημαντικοί τροποποιητές της λειτουργίας των T κυττάρων, μία σχέση που φαίνεται να λειτουργεί αμοιβαία [93,94]. Τα ενεργοποιημένα T κύτταρα εκφράζουν τον συνδέτη RANKL, πράγμα που διεγείρει τη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων σε ώριμους οστεοκλάστες [95]. Πιο συγκεκριμένα τα βοηθητικά κύτταρα Th17 μέσω της κυτταροκίνης τους (IL-17) φαίνεται να ευοδώνουν την οστεοκλαστογένεση, ενώ τα Th1 και Th2 κύτταρα παράγοντας IFN και IL-4 αντίστοιχα επιδρούν αντί της οστεοκλαστογένεσης [96,97]. Τα ρυθμιστικά T_{reg}s φαίνεται να έχουν ανασταλτική δράση έναντι της οστεοκλαστογένεσης [98] και μάλιστα εκτός από την επαγόμενη από τις κυτταροκίνες τους (IL-10 και TGF-β) δράση, ιδιαίτερο ρόλο αποδείχθηκε ότι διαδραματίζει η διακυτταρική τους σύνδεση με τα πρόδρομα κύτταρα των οστεοκλαστών μέσω του υποδοχέα CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4) αναστέλλοντας περεταίρω την οστεοκλαστογένεση [99]. Από την άλλη μεριά οι οστεοκλάστες μπορούν να επιτελέσουν ρόλο αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων και να ενεργοποιήσουν τα T κύτταρα επί παρουσίας παθογόνου [100], αλλά ταυτόχρονα έχει παρατηρηθεί ότι μπορούν να ευοδώσουν τη διαφοροποίηση CD8 T κυττάρων σε ρυθμιστικά iT_{reg}s, τα οποία με τη σειρά τους θα αναλάβουν κατασταλτικό ρόλο στα λοιπά T κύτταρα αναστέλλοντας συνάμα την οστεοκλαστογένεση [103]. Σε παρόμοιο συμπέρασμα καταλήγουν οι συγγραφείς μίας άλλης μελέτης που έδειξε *in vitro* καταστολή των T κυττάρων από οστεοκλάστες μέσω της δράσης του ενζύμου IDO (indoleamine 2,3-dioxygenase) [101,102]. Συνολικά φαίνεται ότι η ανοσοτροποποιητική δράση των οστεοκλαστών προσιδιάζει αρκετά σε αυτήν των MDSCs [93,104].

**ΠΙΝΑΚΑΣ 1. ΟΙ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΕΡΕΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ ΠΟΥ ΡΥΘΜΙΖΟΥΝ ΤΗΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΚΑΙ ΜΗ ΕΙΔΙΚΗ ΑΝΟΣΙΑΚΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΤΗΝ ΟΞΕΙΑ ΚΑΙ ΧΡΟΝΙΑ
ΛΟΙΜΩΞΗ**

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΗ	ΔΡΑΣΗ
[40,126,129]	TNFα <i>(Παράγων νέκρωσης των όγκων α)</i>	Αποτελεί μία από τις κυριότερες προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες. Παράγεται από τα μονοκύτταρα, το ενδοθήλιο και τα ενεργοποιημένα Τ κύτταρα. Προάγει την έκφραση IL-6, IL-8, IFNγ, IL-10 και ενεργοποιεί μακροφάγα και ουδετερόφιλα. Προάγει τη διαπύδηση των λευκοκυττάρων. Επάγει την έκκριση χημειοκινών και ελέγχει την κυτταρική απόπτωση. Εκφράζεται στην οξεία φλεγμονώδη φάση της οστεομυελίτιδας.
[40,127-129]	IL-1 <i>(Ιντερλευκίνη 1)</i>	Αποτελεί την σημαντικότερη προφλεγμονώδη κυτταροκίνη μαζί με τον TNFα. Έχει ισχυρή πυρετογόνο δράση και προάγει την διαπύδηση των λευκοκυττάρων. Εκκρίνεται από τα ενδοθηλιακά και τα επιθηλιακά κύτταρα (υποομάδα IL-1α) αλλά και από διεγερμένα μονοκύτταρα (υποομάδα IL-1β). Προάγει την παραγωγή χημειοκινών, IL-6 και IL-8. Εκφράζεται στην οξεία φλεγμονώδη φάση της οστεομυελίτιδας.
[40,123,125]	IL-6 <i>(Ιντερλευκίνη 6)</i>	Εκκρίνεται από τα Τ κύτταρα, τα μονοκύτταρα και το ενδοθήλιο. Αποτελεί ισχυρό πυρετογόνο όπως η IL-1, επάγει την παραγωγή πρωτεϊνών οξείας φάσης, την ενεργοποίηση των ουδετεροφίλων, των φυσικών φονικών κυττάρων και λεμφοκυττάρων. Εμποδίζει την απόπτωση των ουδετεροφίλων. Εμφανίζει προφλεγμονώδη δράση σε παρακρινές επίπεδο, αλλά στη συνέχεια και υπό συνθήκες συντελλεί στην αντιφλεγμονώδη μετάβαση. Συντελλεί στη φλεγμονώδη φάση της οστικής λοίμωξης.

[122,136,137]	IL-8 <i>(Ιντερλευκίνη 8)</i>	Παράγεται από μονοκύτταρα και ενδοθηλιακά κύτταρα κατόπιν IL-1β και TNFα διέγερσης. Δρα χημειοτακτικά για τα ουδετερόφιλα, τους ινοβλάστες και τα μακροφάγα. Συμβάλλει στο σχηματισμό των NETs. Εκφράζεται στη φλεγμονώδη φάση της οξείας οστεομυελίτιδας.
[119,124,138]	IL-17 <i>(Ιντερλευκίνη 17)</i>	Παράγεται κυρίως από τα Th17 βοηθητικά λεμφοκύτταρα και συνδράμει στην ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων και χημειοταξία των ουδετεροφίλων. Προάγει την αποστηματοποίηση και οστεοκλαστογένεση. Επιπλέον μαζί με την IL-22 προάγουν την έκφραση αντιμικροβιακών πεπτιδίων. Προάγει τη φλεγμονώδη φάση στην οστεομυελίτιδα.
[132,139,140]	IL-33 <i>(Ιντερλευκίνη 33)</i>	Ταξινομείται στην οικογένεια IL-1. Μαζί με την IL-1α διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην κινητοποίηση του μηχανισμού της φλεγμονής. Παράγεται από το ενδοθήλιο και το επιθήλιο. Έχει στόχο τα βασεόφιλα, ηωσινόφιλα, μαστικά, φυσικά φονικά και Th2 κύτταρα. Επάγει την έκφραση TNF-α, IFN-γ, IL-1β, IL-6, IL-5 και IL-13. Ευοδώνει την Th1/Th17 φλεγμονώδη απόκριση, αλλά ταυτόχρονα προάγει και την ιστική αναδόμηση μετά από σταφυλοκοκκική λοίμωξη.
[134,141]	IL-18 <i>(Ιντερλευκίνη 18)</i>	Σε συνδυασμό με την IL-12 ρυθμίζει τη διαφοροποίηση των T κυττάρων σε Th1. Σε συνδυασμό με την IL-23 προάγει τη διαφοροποίηση και πολλαπλασιασμό των Th17 κυττάρων. Αποτελεί μία προφλεγμονώδη κυτταροκίνη. Προάγει την παραγωγή IFN-γ από τα T κύτταρα. Η μειωμένη έκφρασή της έχει συσχετιστεί με μεταβολή του φαινοτύπου της λοίμωξης προς χρόνια φλεγμονή σε μοντέλο σταφυλοκοκκικής λοίμωξης.
[119,133,142]	IL-2 <i>(Ιντερλευκίνη 2)</i>	Παράγεται από τα Th1 λεμφοκύτταρα και ελέγχει τον πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση των λεμφοκυττάρων σε ρυθμιστικά, δραστικά και κύτταρα μνήμης. Η αυξημένη έκφρασή της έχει συσχετιστεί με φαινότυπο χρόνιας οστεομυελίτιδας και παρουσία T _{reg} κυττάρων.

[107,109,119]	IFNγ <i>(Ιντερφερόνη γ)</i>	Η ιντερφερόνη- γ συμβάλλει καταλυτικά στους μηχανισμούς τόσο της ειδικής όσο και της μη ειδικής ανοσίας. Ενεργοποιεί τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα και ρυθμίζει την Τ κυτταρική μεταστροφή. Εκκρίνεται από τα Τ κύτταρα. Δρα ανασταλτικά στην οστεοκλαστογένεση. Έχει πολλαπλό ρόλο στην εξέλιξη της χρονιότητας της νόσου, αλλά βασικά ευοδώνει τη φλεγμονώδη φάση της οστεομυελίτιδας.
[134,135]	G/GM-CSF <i>(Παράγοντες διέγερσης των αποικιών των κοκκιοκυττάρων και μονοκυττάρων)</i>	Οι παράγοντες διέγερσης αποικιών των κοκκιοκυττάρων και μονοκυττάρων είναι ουσίες που παράγονται από το ήπαρ ως απάντηση σε φλεγμονώδες ερέθισμα και διεγείρουν τον ενδομυελικό πολλαπλασιασμό των κοκκιοκυττάρων και μονοκυττάρων, καθώς επίσης και τη μετανάστευσή τους στην κυκλοφορία. Εκφράζονται ιδιαίτερα στην οξεία φάση της λοίμωξης.
[130-143]	IL-10 <i>(Ιντερλευκίνη 10)</i>	Αποτελεί την βασικότερη αντιφλεγμονώδη κυτταροκίνη. Εκφράζεται από τα Th2 κύτταρα, Β λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα, μακροφάγα και ενδοθηλιακά κύτταρα. Δρα κατασταλτικά στα μονοκύτταρα και λεμφοκύτταρα και στην παραγωγή των προφλεγμονωδών κυτταροκινών IL1, IL-6 και TNF α . Χαρακτηρίζει τη χρόνια μη φλεγμονώδη φάση της οστεομυελίτιδας. Μειωμένα επίπεδα της IL-10 έχουν συσχετιστεί με έξαρση της νόσου.
[119-144]	IL-4 <i>(Ιντερλευκίνη 4)</i>	Παράγεται από τα Th2 κύτταρα και προάγει τη μεταστροφή από Th1 σε Th2 φαινότυπο και καταστολή της προφλεγμονώδους απόκρισης. Προάγει την αναστολή της οστεοκλαστογένεσης. Σχετίζεται με χρόνια λοίμωξη.
[119-145]	TGF-β <i>(Μετατρεπτικός αυξητικός παράγων β)</i>	Ο μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας- β εκκρίνεται από τα Τ κύτταρα και τα μακροφάγα. Έχει αντιφλεγμονώδη δράση καθώς επάγει την καταστολή της έκφρασης των προφλεγμονωδών κυτταροκινών, προάγει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων του προσβεβλημένου ιστού και ενισχύει την παραγωγή πρωτεϊνών του εξωκυτταρίου στρώματος. Προάγει τη χρονιότητα και την αντιφλεγμονώδη φάση της οστεομυελίτιδας.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2. ΟΙ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΕΡΟΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΙ ΠΛΗΘΥΣΜΟΙ ΤΗΣ ΕΙΔΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΗ ΕΙΔΙΚΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΟΞΕΙΑ ΚΑΙ ΧΡΟΝΙΑ ΛΟΙΜΩΞΗ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	ΚΥΤΤΑΡΑ	ΔΡΑΣΗ
[110,115,131]	Ουδετερόφιλα	Αποτελούν την σημαντικότερη ομάδα κυττάρων της μη ειδικής ανοσίας στην καταπολέμηση ενός παθογόνου. Οι μηχανισμοί που επιστρατεύουν είναι η φαγοκυττάρωση, η παραγωγή τοξικών ουσιών και η δημιουργία NETs. Η παρουσία τους είναι έκδηλη στο οστό σε περιπτώσεις οξείας οστεομυελίτιδας.
[40,63,64]	Περιφερικά μονοκύτταρα (PBMCs)	Αποτελούν τη σημαντικότερη ομάδα κυττάρων της μη ειδικής ανοσίας στην ενεργοποίηση της ανοσιακής απόκρισης. Αναγνωρίζουν μοριακά πρότυπα των παθογόνων και εκφράζουν προφλεγμονώδεις και αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες ενεργοποιώντας ουδετερόφιλα και λεμφοκύτταρα. Διαφοροποιούνται σε ιστικά μακροφάγα όταν μεταφερθούν σε εστία φλεγμονής.
[50,73]	M1 μακροφάγα	Είναι διαφοροποιημένα μονοκύτταρα με φαινότυπο προς φλεγμονώδη απόκριση και φαγοκυττάρωση. Αποτελεί κυτταρικό πληθυσμό πιο χαρακτηριστικό της οξείας φλεγμονώδους φάσης της οστεομυελίτιδας.
[61]	M2 μακροφάγα	Είναι διαφοροποιημένα μονοκύτταρα με φαινότυπο προς αντιφλεγμονώδη απόκριση και κατασταλτική δράση. Αποτελεί κυτταρικό πληθυσμό πιο χαρακτηριστικό της χρόνιας μη φλεγμονώδους φάσης της οστεομυελίτιδας.
[76,110]	MDSCs (Κατασταλτικά κύτταρα της μυελικής σειράς)	Τα κατασταλτικά κύτταρα της μυελικής σειράς αποτελούν μία ειδική ομάδα μονοκυττάρων που στόχο έχουν την καταστολή της φλεγμονώδους απάντησης, των ουδετερόφιλων, των μονοκυττάρων και των T λεμφοκυττάρων. Είναι ομάδα κυττάρων που εντοπίζεται χαρακτηριστικά στη χρόνια οστική λοίμωξη.

[117]	Δενδριτικά	Μαζί με τα μακροφάγα αποτελούν τις δύο σημαντικότερες κυτταρικές ομάδες που μετά τη φαγοκυττάρωση επιτελούν την αντιγονοπαρουσίαση μοριακών προτύπων του παθογόνου στα Τ λεμφοκύτταρα ενεργοποιώντας την ειδική ανοσιακή απόκριση.
[111,113,116]	Th1 βοηθητικά (CD4⁺)	Αποτελούν υποομάδα των βοηθητικών Τ λεμφοκυττάρων με φαινότυπο που προσιδιάζει σε προφλεγμονώδη απόκριση. Προάγουν τη φλεγμονή στην οξεία φάση της οστεομυελίτιδας.
[112]	Th2 βοηθητικά (CD4⁺)	Αποτελούν υποομάδα των βοηθητικών Τ λεμφοκυττάρων με φαινότυπο που προσιδιάζει σε αντιφλεγμονώδη απόκριση. Προάγουν την ανοχή στην χρόνια φάση της οστεομυελίτιδας.
[119]	Τ ρυθμιστικά (T_{reg})	Αποτελούν υποομάδα των βοηθητικών Τ λεμφοκυττάρων με φαινότυπο που προσιδιάζει σε αντιφλεγμονώδη απόκριση. Καταστέλλουν τα Th1 και Th17 κύτταρα και προάγουν την ανοχή στην χρόνια φάση της οστεομυελίτιδας εκκρίνοντας ιντερλευκίνη 10 (IL-10) και τον μετατρεπτικό αυξητικό παράγοντα (TGF-β), αλλά και επιδρώντας κατασταλτικά μέσω διακυτταρικής επικοινωνίας.
[111,113,116]	Th17 βοηθητικά (CD4⁺)	Όπως τα Th1, αποτελούν υποομάδα των βοηθητικών Τ λεμφοκυττάρων με φαινότυπο που προσιδιάζει σε προφλεγμονώδη απόκριση. Προάγουν τη φλεγμονή στην οξεία φάση της οστεομυελίτιδας. Εκκρίνουν IL-17.
[32,107,109]	Τ κυτταροτοξικά (CD8⁺)	Αποτελούν ομάδα των Τ λεμφοκυττάρων της ειδικής ανοσίας και στόχο έχουν τα μολυσμένα κύτταρα του ξενιστή. Εκφράζουν IFN-γ. Η παρουσία τους είναι πιο έκδηλη στην φλεγμονώδη φάση της οστεομυελίτιδας (φαινότυπος Th1/Th17).

9. ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΟΣΙΑΚΗΣ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΣΤΗΝ ΧΡΟΝΙΑ ΝΟΣΟ

Σημαντική προσπάθεια έχει καταβληθεί από την επιστημονική κοινότητα για την ανάπτυξη νέων ιδεών για την αντιμετώπιση της χρόνιας οστεομυελίτιδας, από υποσχόμενα νέα αντιβιοτικά που στοχεύουν καινούργιους στόχους στο βακτήριο ή και στη διαδικασία του QS, μέχρι πολυποίκιλα αντιμικροβιακά επικεκαλυμμένα ικριώματα με στόχο την τοπική θεραπεία. Παράλληλα με τους παραπάνω υποσχόμενους τρόπους αντιμετώπισης της χρόνιας οστεομυελίτιδας φαίνεται να κερδίζει έδαφος η μελέτη της ανοσοθεραπείας σαν επικουρική αγωγή μαζί με την συστηματική χορήγηση αντιβίωσης και τον απαραίτητο χειρουργικό καθαρισμό. Η ιδέα πίσω από αυτό το εγχείρημα είναι η όσο το δυνατόν ενίσχυση του ωφέλιμου μέρους της ανοσίας του ασθενούς με συνοδό καταστολή του ζημιογόνου [32].

Το σύνολο της ανοσιακής απάντησης σε ένα ερέθισμα ρυθμίζεται πολύ αυστηρά σε πολλά από τα ενδιάμεσα βήματα, έτσι ώστε να αποφευχθεί μία ατέρμονη ανεξέλεγκτη φλεγμονή που θα προκαλέσει εκτεταμένη ιστική καταστροφή και μπορεί να απειλήσει τη βιωσιμότητα του ξενιστή. Αυτή η ρύθμιση προάγεται από κύτταρα της ειδικής και μη ειδικής ανοσίας και περιλαμβάνει τα MDSCs, τα αντιφλεγμονώδη M2 μακροφάγα και τα ρυθμιστικά T λεμφοκύτταρα T_{reg} s. Αυτοί οι κυτταρικοί πληθυσμοί φροντίζουν να αντιπαραβάλλεται η προφλεγμονώδης πλευρά της ανοσιακής απάντησης με μία εξίσου ισχυρή αντιφλεγμονώδη, που εκφράζεται μέσω παραγωγής IL-10, Arg-1 και TGF- β [81]. Αυτή η μοίρα της ανοσιακής απόκρισης περιορίζει την προφλεγμονώδη προσαγωγό φάση (effector phase), η οποία τυπικά λήγει με κάθαρση του αντιγονικού ερεθίσματος, λύση της φλεγμονής και επαγωγή της κυτταρικής μνήμης. Εν αντιθέσει η παράταση της νόσου με συνοδό χρόνιο έκθεση σε αντιγονικά ερεθίσματα, όπως σε περιπτώσεις χρόνιων λοιμώξεων ή νεοπλασιών, επάγουν την ενισχυμένη έκφραση κατασταλτικών σημάτων από τα κύτταρα, που ως απόρροια έχει τη δυσλειτουργία του κυττάρου [32].

Πιο συγκεκριμένα μετά από παρατεταμένο αντιγονικό ερεθισμό τα T κύτταρα αρχίζουν να εκφράζουν στην επιφάνειά τους ανασταλτικούς υποδοχείς, που είναι γνωστοί ως ICM (immune checkpoint molecules). Οι δύο σημαντικότεροι εξ αυτών είναι η Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4 (CTLA-4) που ανταγωνίζεται την πρόσδεση του CD28 στους υποδοχείς CD80/86 στην επιφάνεια των T κυττάρων και η

Programmed cell death protein-1 & 2 (PD-1 & 2). Με την πρόσδεση των αντιστοίχων προσδετών τους στην επιφάνεια των Τ λεμφοκυττάρων ενεργοποιούνται ενδοκυττάρια μονοπάτια που εξασθενούν την Τ διακυτταρική ενίσχυση και προσαγωγό δράση των Τ κυττάρων προάγοντας την καταστολή [121]. Παρόμοια σηματοδοτικά μόρια της ίδιας οικογενείας που έχουν αρχίσει να κερδίζουν έδαφος στην έρευνα είναι: 1) η πρωτεΐνη LAG-3 (Lymphocyte activation gene-3), η οποία εκφράζεται από τα CD4+, CD8+ και τα κύτταρα φυσικούς φονείς, ανταγωνίζεται την πρόσδεση τους υποδοχείς MHC II επιδρώντας στην αντιγονοπαρουσίαση και ενεργοποίηση των Τ κυττάρων, 2) η ανοσοσφαιρίνη TIM-3 (T cell immunoglobulin and mucin-domain containing protein-3), η οποία εκφράζεται από τα δενδριτικά, τα μακροφάγα, τα CD4+ Th1, CD8+ και τα κύτταρα φυσικούς φονείς, κατόπιν αλληλεπίδρασης με τον προσδέτη της (γαλεκτίνη-9) προάγει την αντιφλεγμονώδη απάντηση ενισχύοντας τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των MDSCs, M2 και T_{regs} και 3) η ανοσοσφαιρίνη TIGIT (T cell immunoglobulin and ITIM domain), η οποία εκφράζεται σε όλα τα Τ κύτταρα, ανταγωνίζεται την πρόσδεση στον αντιγονικό τόπο CD155 των APCs και Τ κυττάρων και προάγει την μεταστροφή από Th1 σε Th2 και την έκφραση IL-10 [120].

Η δυσλειτουργία των Τ κυττάρων στη χρόνια φλεγμονώδη νόσο έχει αποκτήσει ιδιαίτερο επιστημονικό ενδιαφέρον, καθότι αποτελεί πολύ υποσχόμενο πεδίο για ανάπτυξη νέων θεραπειών μιας και έχει αποδειχθεί ότι αυτή η «κυτταρική εξάντληση» είναι αναστρέψιμη με τη χορήγηση αναστολέων των ICMs [82,83].

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η οστεομυελίτιδα είναι μία σχετικά ασυνήθης λοίμωξη στο γενικό πληθυσμό που χρήζει παρατεταμένης χορήγησης αντιβιοτικής αγωγής και επανειλημμένες χειρουργικές επεμβάσεις, ενώ συχνά καταλήγει σε κάποιου βαθμού έκπτωση της λειτουργικότητας του ασθενούς ή και σε αναπηρία. Συχνότερα η οστεομυελίτιδα εμφανίζεται ως χρόνια λοίμωξη, όπως μετά από οστεοσύνθεση καταγμάτων ή αρθροπλαστική. Αντίθετα, οι οξείες οστικές λοιμώξεις με συνοδό σήψη είναι σχετικά ασυνήθεις. Συνήθως αφορούν σε ευπαθείς ομάδες, όπως σε μετεγχειρητικούς πολυτραυματίες σε νοσηλείας σε Μονάδα Εντατικής Θεραπείας, τραυματίες με ανοιχτά κατάγματα και σε ηλικιωμένους ή ανοσοκατασταλαμένους ασθενείς μετά από επεμβάσεις αρθροπλαστικών ή οστεοσύνθεσης [146-148]. Συχνότερο αίτιο των ανωτέρω λοιμώξεων αποτελεί ο *Staphylococcus aureus*. Οι ανωτέρω ασθενείς επίσης είναι ιδιαίτερα ευπαθείς σε συνακόλουθες δυνητικά θανατηφόρες λοιμώξεις, ιδίως από ενδονοσοκομειακά παθογόνα, όπως μικροβαιμία, λοιμώξεις κατώτερου αναπνευστικού και λοιμώξεις ουροποιητικού [149-150].

Βασικός ρυθμιστικός παράγοντας της λειτουργίας του ανοσιακού μηχανισμού για την αντιμετώπιση κάθε λοίμωξης αποτελεί η απελευθέρωση προφλεγμονωδών και αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών. Το πιο κρίσιμο βήμα στην ενεργοποίηση των μηχανισμών της μη ειδικής ανοσίας αποτελεί η πρόσδεση των στοιχείων των παθογόνων μικροοργανισμών, των σχετιζόμενων με το παθογόνο μοριακών προτύπων (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) στους υποδοχείς αναγνώρισής τους (pattern recognition receptors, PRRs), οι οποίοι εμφανίζονται στην επιφάνεια των περιφερικών μονοπύρηνων και ιστικών μακροφάγων [151]. Κατά τη χρόνια οστεομυελίτιδα τα προερχόμενα από τον *S. aureus* PAMPs, με κυριότερο εκπρόσωπο την πεπτιδογλυκάνη, αλληλεπιδρούν με τους κατάλληλους PRRs, όπως ο υποδοχέας τύπου Toll 2 (TLR2) ενεργοποιώντας και ρυθμίζοντας το μονοπάτι της φλεγμονής. Στην περίπτωση μιας νέας λοίμωξης, τα εισερχόμενα στον οργανισμό PAMPs αλληλεπιδρούν εκ νέου με τους PRRs, οι οποίοι όμως έχουν ήδη διεγερθεί από την προηγηθείσα οστεομυελίτιδα, εκλύοντας μία διαφορετική ανοσιακή απάντηση. Ο σκοπός της μελέτης αυτής είναι να διερευνήσει την επίδραση της χρόνιας οστεομυελίτιδας από *S. aureus* επί

υλικών οστεοσύνθεσης στην έκβαση μίας πειραματικής βαρειάς πυελονεφρίτιδας από *Escherichia coli*.

ΖΩΙΚΑ ΠΡΟΤΥΠΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Πειραματικό μοντέλο

Το πρωτόκολλο πειραματισμού αδειοδοτήθηκε από την Επιτροπή Βιοηθικής της Μονάδα Χρήσης Ζώων για Ιατρικούς και Επιστημονικούς Σκοπούς του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου «Αττικόν», το Επιστημονικό Συμβούλιο του Νοσοκομείου και την Κτηνιατρική Διεύθυνση Υγειονομικής Περιφέρειας Αθηνών (αρ. αδείας Ν. 2578/29-05-18) βάσει της Ελληνικής νομοθεσίας και σε συμφωνία με την Ευρωπαϊκή νομοθεσία περί πειραματισμού σε ζώα (Directive Council EU 2010).

Μελετήθηκαν συνολικά 46 αρσενικοί κόνικλοι Νέας Ζηλανδίας ηλικίας 12-14 εβδομάδων και βάρους 3.0-3.5 κιλών. Τα ζώα στεγάστηκαν σε μονήρεις μεταλλικούς κλωβούς, με συνεχή εναλλαγή αέρα, πρόσβαση σε πόσιμο νερό και την ισορροπημένη προβλεπόμενη ξηρά τροφή χωρίς περιορισμό καθόλη τη διάρκεια του πειραματισμού. Η διακύμανση της θερμοκρασίας ήταν 18-22 °C και η υγρασία διατηρούταν μεταξύ 55-65 %. Ο κύκλος ημέρας και νύχτας ήταν αυστηρά καθορισμένος στις 12 ώρες. Μετά από μία εβδομάδα προσαρμογής στο χώρο παραμονής τα πειραματόζωα τυχαιοποιήθηκαν σε 4 ομάδες πειραματισμού ως εξής:

- Εικονική οστεομυελίτιδα με τραύμα στην κνήμη και εν συνεχεία εικονική πυελονεφρίτιδα με μέση κοιλιακή προσπέλαση μετά από 3 εβδομάδες – ομάδα **S** (Sham Injury: 8 ζώα)
- Εικονική οστεομυελίτιδα με τραύμα στην κνήμη και εν συνεχεία πυελονεφρίτιδα από *E. coli* μετά από 3 εβδομάδες – ομάδα **P** (Pyelonephritis: 16 ζώα)
- Οστεομυελίτιδα κνήμης από *S. aureus* και εν συνεχεία πυελονεφρίτιδα από *E. coli* μετά από 3 εβδομάδες – ομάδα **OP** (Osteomyelitis-Pyelonephritis: 12 ζώα)
- Οστεομυελίτιδα κνήμης από *S. aureus* και εν συνεχεία πυελονεφρίτιδα από *E. coli* μετά από 4 εβδομάδες αφού έχει προηγηθεί μία εβδομάδα θεραπείας με νταλμπαβανσίνη - ομάδα **ODP** (Osteomyelitis-Dalbavancin-Pyelonephritis: 7 ζώα)

Τέλος τα 3 εναπομείναντα ζώα χρησιμοποιήθηκαν μόνο για αιμοληψίες.

Μικροβιακά στελέχη

Ένα στέλεχος ανθεκτικού στη μεθικιλίνη *S. aureus* (MRSA) που απομονώθηκε από ασθενή με διαγνωσμένη οστεομυελίτιδα μετά από εμφύτευση υλικών οστεοσύνθεσης και ένα στέλεχος πολυανθεκτικού *E. coli* που απομονώθηκε από ασθενή με διαγνωσμένη σηπτική πυελονεφρίτιδα χρησιμοποιήθηκαν για την πρόκληση πειραματικής οστεομυελίτιδας και πυελονεφρίτιδας αντίστοιχα. Πριν από κάθε πειραματικό κύκλο μονήρεις αποικίες των μικροβίων μετά από ανακαλλιέργεια διαλύονταν σε ζωμό Mueller-Hinton (Oxoid Ltd, London, UK) και επωάζονταν σε υδατόλουτρο στους 37°C. Το προκύπτον ενοφθάλμισμα αραιωνόταν σε συγκέντρωση 5×10^7 cfu/ml (μέσω McFarland) και τοποθετούταν σε αποστειρωμένη σύριγγα 1ml προς έγχυση.

Χειρουργική παρέμβαση

Σε κάθε ημέρα πειραματισμού τουλάχιστον ένα ζώο από κάθε ομάδα χειρουργούταν βάσει ενός τυχαιοποιημένου πίνακα. Η χειρουργική πρόκληση της οστεομυελίτιδας γινόταν στην δεξιά εγγύς κνήμη επί τα εντός της μετάφυσης σε όλα τα ζώα των ομάδων OP και ODP όπως έχει περιγραφεί [159-161]. Εν συντομία, τα πειραματόζωα καταστέλλονταν χρησιμοποιώντας 25 mg/kg κεταμίνη και 5 mg/kg ξυλαζίνη ενδομυϊκά (Alvet, Athens, Greece). Η αναισθησία διατηρούταν με επαναληπτικές δόσεις ξυλαζίνης 15mg/kg κάθε 30 λεπτά όποτε χρειαζόταν. Κατόπιν επιμελούς αποτρίχωσης και αποστείρωσης διενεργούταν τομή 1-1.5 cm κάτωθεν του γόνατος επί τα εντός αποκαλύπτοντας τον έσω φλοιό της εγγύς έσω μετάφυσης της δεξιάς κνήμης. Χρησιμοποιώντας μία φρέζα 2.5 mm (CliniLab, Athens, Greece) διανοιγόταν οπή μέσω της οποίας επαγόταν μηχανικά ενδοστικό τραύμα με τη βοήθεια μίας SLS βελόνας 18G. Ακολουθούσε η ενδοστική έγχυση 0.1 ml από το ενοφθάλμισμα MRSA (5×10^6). Η οπή σφραγιζόταν με μία SLS βίδα διαμετρήματος 3.2 mm και μήκους 10mm (CliniLab), η οποία χρησίμευε ως ξένο σώμα επαγωγής χρόνιας οστεομυελίτιδας. Ακολουθούσε σύγκλιση του τραύματος με ράμμα 3.0 silk και τα ζώα μεταφέρονταν στους κλωβούς τους αμέσως μετά την ανάνηψη. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε για τα ζώα των ομάδων S και P με τη μόνη διαφορά ότι αντί για ενοφθάλμισμα MRSA χρησιμοποιούταν 0.1 ml φυσιολογικού ορού 0.9% N/S. Επί 3 εβδομάδες τα ζώα

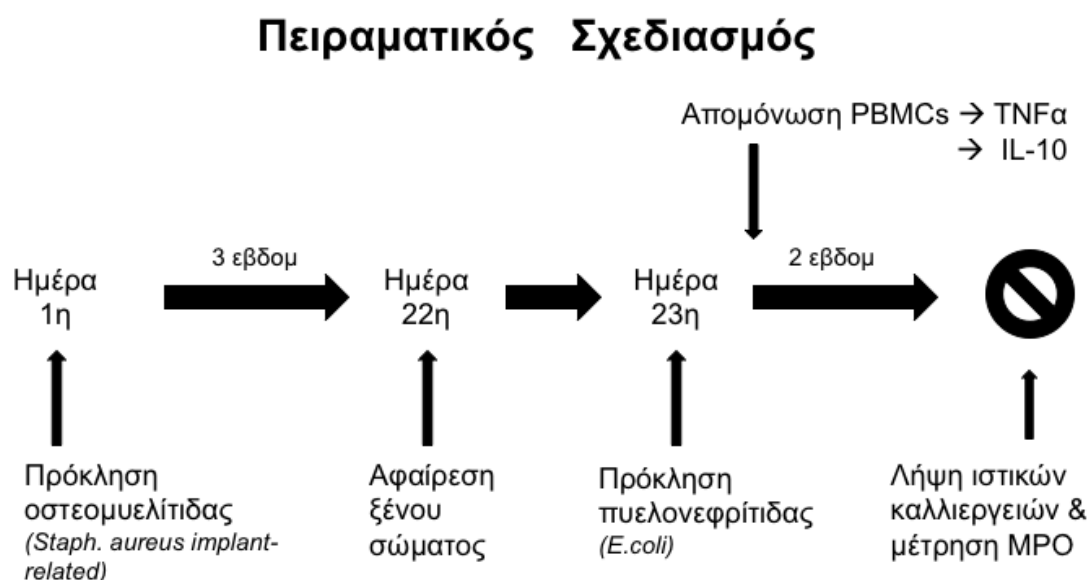
παρακολουθούνταν ως προς την επιβίωση, κινητικότητα, θρέψη, υπερπυρεξία και κατάσταση του τραύματος.

Μετά το πέρας των 3 εβδομάδων εγκατάστασης της οστικής λοίμωξης τα ζώα όλων των ομάδων (OP, S, P και ODP) χειρουργούνταν εκ νέου. Με μία μικρή τομή επί της παλαιάς η βίδα αφαιρούνταν υπό άσηπτες συνθήκες και ένα μικρό δείγμα σπογγώδους οστού μέσα από την πύλη εισόδου λαμβανόταν με μικρό κοχλιάριο με προσοχή ώστε να μη διαταραχθεί η εστία της λοίμωξης. Με στυλεό λαμβανόταν επίσης μία καλλιέργεια τραύματος από τα μαλακά μόρια πριν απομακρυνθεί η βίδα. Ειδικότερα για τα ζώα της ομάδας ODP, κατά την αφαίρεση της βίδας εκτελούνταν ένας πιο ευρύς χειρουργικός καθαρισμός της εστίας της λοίμωξης μαζί με άφθονη έκπλυση. Εν συνεχεία χορηγούταν άπαξ ενδοφλέβια 20mg/kg νταλμπαβανσίνη (Xydalba, Angelini, Athens, Greece), όπως περιγράφεται σε προηγούμενα πειράματα [162]. Τα ζώα αυτής της ομάδας παρακολουθούνταν για μία ακόμα εβδομάδα.

Μετά από 24 ώρες από την αφαίρεση του ξένου σώματος των ζώων των ομάδων S, P και OP, και επίσης μία βδομάδα μετά την αφαίρεση του ξένου σώματος των ζώων της ODP, όλα τα ζώα οδηγούνταν στο τελικό χειρουργείο πρόκλησης πυελονεφρίτιδας, χρησιμοποιώντας ένα γνωστό πειραματικό μοντέλο [163-166]. Κατόπιν επιμελούς αποτρίχωσης κι αποστείρωσης της κοιλιακής χώρας διενεργούταν μια μέση τομή και ενδοπεριτοναϊκή προσπέλαση διά της λευκής γραμμής του κοιλιακού τοιχώματος. Τα σπλάγχνα παρεκτοπίζονταν επιμελώς προς τα αριστερά και αναγνωριζόταν ο δεξιός νεφρός και ουρητήρας οπισθοπεριτοναϊκά. Ακολουθούσε υψηλή απολίνωση του ουρητήρα κοντά στην πυελοουρητηρική συμβολή και έγχυση ενοφθαλμίσματος *E. coli* όγκου 0.3 ml και συγκέντρωσης 1×10^7 cfu/ml άνωθεν της απολίνωσης. Ακολουθούσε συρραφή του τραύματος κατά στρώματα. Το πρωτόκολλο αναισθησίας ήταν το ίδιο όπως στο χειρουργείο πρόκλησης οστεομυελίτιδας. Όλες οι χειρουργικές επεμβάσεις έγιναν από την ίδια χειρουργική ομάδα.

Επί δύο εβδομάδες τα ζώα παρακολουθούνταν ως προς την κατάσταση του τραύματος, υπερπυρεξία και θρέψη, ενώ η επιβίωσή τους καταγραφόταν ανά 12 ώρες. Επιπλέον, ακριβώς πριν την πρόκληση πυελονεφρίτιδας και 24, 48 και 72 ώρες μετά την πρόκληση της πυελονεφρίτιδας λαμβάνονταν 6 ml ηπαρινισμένου αίματος κατόπιν αρτηριοκέντησης της ραχιαίας αρτηρίας του αριστερού ωτός.

Μετά το πέρας των 14 ημερών καταγραφής της επιβίωσης τα ζώα που είχαν επιβιώσει θυσιάστηκαν με ενδοφλέβια έγχυση θειοπεντάλης (Alvet). Μετά τον θάνατο ή ευθανασία ακολουθούσε νεκροτομή με μέση ενδοπεριτοναϊκή προσπέλαση και δειγματοληψία ιστικών τεμαχίων από το ήπαρ, σπλήνα, κάτω λοβό δεξιού πνεύμονα και δεξιού νεφρού. Τα δείγματα συλλέγονταν υπό άσηπτες συνθήκες σε φυαλίδια με 0.9 % N/S (Εικ. 1).



Εικόνα 1 - Σχεδιασμός μελέτης. Η εναρκτήρια παρέμβαση του πειραματικού πρωτοκόλλου ήταν το χειρουργείο πρόκλησης οστεομυελίτιδας. Μετά από 3 εβδομάδες εγκατάστασης της οστικής λοίμωξης, το ξένο σώμα αφαιρούταν και την επόμενη ημέρα διεξαγόταν το χειρουργείο πρόκλησης πνευμονοφρίτιδας. Αμέσως πριν από την επέμβαση αλλά και 24, 48 και 72 ώρες μετά γινόταν η λήψη των PBMCs. Τα ζώα παρακολουθούνταν μετεγχειρητικά επί 14 ημέρες συνολικά, διάστημα κατά το οποίο η επιβίωσή τους καταγραφόταν καθημερινά. Μετά το πέρας των δύο εβδομάδων τα ζώα που είχαν επιβιώσει θυσιάζονταν και κατά τη νεκροτομή συλλέγονταν δείγματα ιστών προς ποσοτικές καλλιέργειες και μέτρηση δραστηριότητας MPO. PBMCs: μονοπύρηνια κύτταρα περιφερικού αίματος, MPO: μυελοϋπεροξειδάση των ουδετεροφίλων, TNFα: παράγοντας νέκρωσης των όγκων άλφα, IL-10: Ιντερλευκίνη 10.

Μετά από κάθε χειρουργική επέμβαση και για τις πρώτες 48 ώρες μετεγχειρητικά χορηγούταν στα ζώα μελοξικάμη ενδομυϊκά 1mg/ml (Metacam, Alvet) μία φορά τη μέρα. Μετέπειτα και επί ενδείξεων άλγους χρησιμοποιούνταν για την αντιμετώπιση του πόνου απλή αναλγησία με υπόθετα παρακεταμόλης 250mg/kg (Deron).

Καλλιέργειες ιστών

Τα ιστοτεμάχια του σπογγώδους οστού που λαμβάνονταν κατά την επέμβαση αφαίρεσης του ξένου σώματος στις 3 εβδομάδες, καθώς επίσης και τα ιστοτεμάχια όλων των οργάνων που λαμβάνονταν κατά την ευθανασία, ζυγίζονταν σε ηλεκτρονική ζυγαριά ακριβείας και ομογενοποιούνταν μηχανικά μαζί με 1 ml N/S με τη βοήθεια ειδικού ηλεκτρονικού ομογενοποιητή (Hilden, Germany). Από το ομογενοποίημα που προέκυπτε ποσότητα ίση με 0.1 ml υποβάλλονταν σε διαδοχικές αραιώσεις 1:10 σε ζωμό Mueller-Hinton (Oxoid) και 0.1 ml από όλες τις αραιώσεις καλλιεργούνταν ποσοτικά σε τρυβλία με McConkey και Charman άγαρ (Oxoid). Εν συνεχεία οι καλλιέργειες επωάζονταν σε κλίβανο στους 37°C με 5% CO₂ για 24 ώρες, έως ότου καταμετρούνταν οι βιώσιμες αποικίες εκφραζόμενες ως δεκαδικός λογάριθμος cfu ανά γραμμάριο ιστού (log₁₀cfu/gr). Το κατώτερο όριο ανίχνευσης ήταν οι 10 cfu/ml. Επιπροσθέτως οι αφαιρεθείσες βίδες τοποθετούνταν σε αποστειρωμένο πλαστικό φυαλίδιο με 1 ml N/S, το οποίο υφίταν υπερηχητική κρούση εντός υδατόλουτρου για 3 λεπτά (sonication – Bandelin Bactosonic, Germany) και το εναιώρημα καλλιεργούνταν σε τρυβλία με McConkey και Charman άγαρ. Για την ταυτοποίηση του *S. aureus* χρησιμοποιούνταν η δοκιμασία της κοαγκουλάσης. Τέλος, η ίδια διαδικασία ποσοτικής καλλιέργειας ακολουθούταν και για τα δείγματα περιφερικού αίματος μετά τις αιμοληψίες στις 0, 24, 48 και 72 ώρες μετά την πρόκληση πνευμονοφρίτιδας.

Δραστηκότητα μυελοϋπεροξειδάσης (MPO)

Τα ιστικά δείγματα που λαμβάνονταν κατά τη νεκροτομή των ζώων τοποθετούνταν σε ξεχωριστά αποστειρωμένα φυαλίδια μαζί με 1 ml N/S, ζυγίζονταν σε ηλεκτρονική ζυγαριά, ομογενοποιούνταν όπως αναφέρθηκε παραπάνω και εν συνεχεία φυγοκεντρούνταν στις 3.500 στροφές επί 15 λεπτά. Τα υπερκείμενα συλλέγονταν και επωάζονταν για 5 λεπτά στους 37 βαθμούς με διάλυμα περιέχον 4.2 mM

τετραμεθυλβενζιδίνη (Serva, Germany), 2.5 mM κιτρικό, 5 mM φωσφορικό νάτριο και 1.18 M υπεροξειδίο του υδρογόνου. Η αντίδραση τερματιζόταν μετά την προσθήκη 50 ml 0.18 M θειικού οξέος στα 5 λεπτά. Η απορρόφηση μετρούταν στα 450 nm φάσματος χρησιμοποιώντας μέτρο σύγκρισης μετρήσεις από κενά διάφανα βυθίσματα. Η μονάδα μέτρησης της δραστικότητας της μυελοϋπεροξειδάσης βασίστηκε στην αναλογία 1 μονάδα MPO να αντιστοιχεί σε 1 mmol H₂O₂ και να παράγει 1.13×10^2 αλλαγή στην απορρόφηση στο φάσμα. Τα αποτελέσματα προσαρμόστηκαν για το εκάστοτε πρωτεϊνικό φορτίο του κάθε δείγματος χρησιμοποιώντας την τεχνική Bradford (Sigma-Aldrich). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μονάδα δραστικότητας MPO ανά γραμμάριο ιστού ανά γραμμάριο περιέχουσας πρωτεΐνης (Umpo/gr/g) [165].

Καλλιέργεια μονοπυρήνων και μέτρηση πρωτεϊνών

Τις χρονικές στιγμές 0 (προ της πνευμονοφρίτιδας), 24, 48 και 72 ωρών μετά την πρόκληση της λοίμωξης 6 ml ηπαρινισμένου αίματος συλλέγονταν από όλα τα ζώα κατόπιν αρτηριοκέντησης της ραχιαίας αρτηρίας του ωτός. Από αυτόν τον όγκο τα 4 ml χρησιμοποιούνταν για την απομόνωση περιφερικών μονοπύρηνων, το 1 ml καλλιεργούταν ποσοτικά όπως περιγράφηκε παραπάνω και το εναπομείναν 1 ml φυγοκεντρούταν στις 3.500 στροφές για 15 λεπτά και οι υπερκείμενοι οροί συλλέγονταν και φυλάσσονταν στους -70°C.

Τα μονοπύρηνα κύτταρα απομονώνονταν μετά από επιστίβαση και κλασματική φυγοκέντρηση του ηπαρινισμένου αίματος υπέρθεν διαλύματος φικόλης (Ficoll-Hydraque, Biochrom AG, Germany). Μετά από 3 συνεχόμενες εκπλύσεις με διάλυμα PBS pH 7.2 (Biochrom) τα κύτταρα μετρούταν πάνω σε ειδική πλάκα (Neubauer) εξαιρώντας τα μη βιώσιμα μέσω χρώσης κυανού της τρυππάνης. Εν συνεχεία ισοκατανέμονταν σε συγκέντρωση 2×10^6 PBMCs/ml και όγκο 0.2 ml σε αποστειρωμένα βυθίσματα ειδικής πλάκας κυτταροκαλλιέργειών 96 βυθισμάτων και επωάζονταν με RPMI 1640 10% εμβρυικό βόειο ορό (Biochrom), 2mM γλουταμίνης, 10mM πυροσταφυλικού, 100 U/ml πενικιλίνης G, 0.1 mg/ml στρεπτομυκίνης υπό παρουσία 10 ng/ml LPS (λιποπολυσακχαρίτη) *E. coli* O55:B5 ή 5 μg/ml PHA (φυτοαιματογλουτινίνη) για 24 ώρες στους 37°C με 5% CO₂. Μετά το πέρας της επώασης οι πλάκες φυγοκεντρούνταν στις 1.700 στροφές για 7 λεπτά και τα

υπερκείμενα συλλέγονταν και αποθηκεύονταν στους -70°C . Οι συγκεντρώσεις του παράγοντα νέκρωσης των όγκων (TNF α) και της ιντερλευκίνης 10 (IL-10) μετρήθηκαν στα υπερκείμενα των διεγερμένων μονοπύρηνων όλων των ζώων τις 4 χρονικές στιγμές χρησιμοποιώντας ανοσοενζυμική μέθοδο (ELISA, R&D Inc, USA). Το κατώτερο όριο ανίχνευσης ήταν 156.5 pg/ml για τον TNF α και 31.1 pg/ml για την IL-10. Επίπεδα φερριτίνης επίσης μετρήθηκαν σε όλα τα δείγματα ορού ομοίως με τη μέθοδο ELISA με κατώτερο όριο ανίχνευσης τα 75 ng/ml [167].

Όσον αφορά στο ρόλο των τριών υπολειπόμενων ζώων, κατόπιν αιμοληψίας 12 ml αίματος και απομόνωσης περιφερικών μονοπυρήνων κυττάρων και από τα τρία ζώα, τα κύτταρα διαχωρίστηκαν ισομερώς σε βυθίσματα με συγκέντρωση 5×10^6 κύτταρα/ml και επωάστηκαν στις προαναφερθείσες συνθήκες το καθένα εις διπλούν. Εν συνεχεία σπογγώδες οστόν από τη δεξιά κνήμη των τριών ζώων αφαιρέθηκε και ομογενοποιήθηκε σε 0.9% N/S. Τα μονοπύρηνια κύτταρα επωάστηκαν υπό την παρουσία ή απουσία 5×10^5 cfu/ml HKSA (θερμικά εξασθενημένου *S. aureus*) με ή χωρίς 1 mg/ml φρέσκο οστικό ομογενοποίημα. Μετά από 24 ώρες επώασης σε κλίβανο στους 37°C και 5% CO $_2$ το θρεπτικό υλικό ανανεώθηκε και τα κύτταρα στα βυθίσματα έμειναν χωρίς ερέθισμα ή διεγέρθηκαν με 5×10^5 cfu/ml HKEC (θερμικά εξασθενημένο *E. coli*). Το πείραμα επαναλήφθηκε με 1μg/ml anti-TLR4 (LPS-EK, InvivoGen) ή anti-TLR9 (ODN D-SL01, InvivoGen). Μετά από επιπλέον 24 ώρες οι πλάκες φυγοκεντρούνταν όπως έχει αναφερθεί παραπάνω και τα υπερκείμενα συλλέγονταν προς προσδιορισμό των επιπέδων TNF α με ανοσοενζυμική μέθοδο (ELISA).

Ισχύς της μελέτης

Το πρωτογενές καταληκτικό σημείο ήταν η σύγκριση της θνητότητας μεταξύ των ομάδων P και OP εντός των 14 ημερών παρακολούθησης. Βάσει προηγούμενων εργασιών [161-164] η εκτιμώμενη θνητότητα της ομάδας P αναμενόταν να είναι 60%. Υποθέτοντας ότι αυτό το ποσοστό θα μειωθεί τουλάχιστον κατά 10% στην ομάδα OP, έπεται ότι θα χρειάζονταν τουλάχιστον 14 ζώα ανά ομάδα για να τεκμηριωθεί στατιστικά σημαντική διαφορά με ισχύ 80% και 10% όριο σημαντικότητας.

Στατιστική επεξεργασία

Η επιβίωση των ζώων μεταξύ των ομάδων συγκρίθηκε χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία log-rank και το αποτέλεσμα εκφράστηκε με καμπύλη Kaplan-Meier. Ποσοτικές μεταβλητές, όπως TNF α , MPO και βακτηριακό φορτίο, εκφράστηκαν με τη μέση τιμή \pm τυπικό σφάλμα. Οι επιμέρους συγκρίσεις των ποσοτικών μεταβλητών μεταξύ των ομάδων έγιναν μέσω ANOVA. Συγκρίσεις μεγεθών μεταξύ χρονικών στιγμών εντός της ίδιας ομάδας έγιναν με τη βοήθεια της δοκιμασίας Wilcoxon ranked-sum. Συσχετίσεις μεταξύ ποσοτικών μεταβλητών έγιναν χρησιμοποιώντας το συντελεστή Spearman. Μία καμπύλη λειτουργικού χαρακτηριστικού δέκτη (ROC) χρησιμοποιήθηκε για τη αξιολόγηση της ευαισθησίας της πρόωρης μείωσης του TNF α ως δείκτη της έκβασης της επιβίωσης. Οποιαδήποτε τιμή $p < 0.05$ κατόπιν διόρθωσης κατά Bonferroni για πολλαπλές συγκρίσεις θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική.

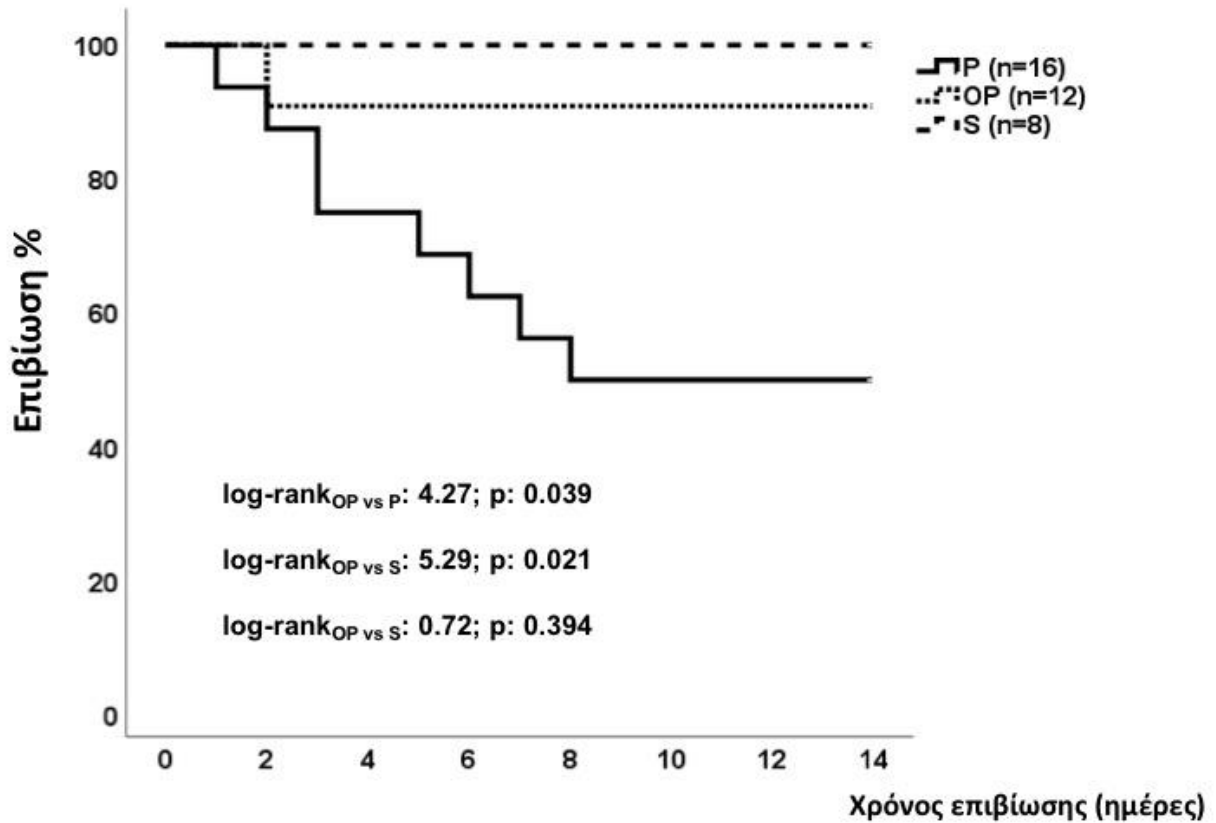
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Όλα τα ζώα επιβίωσαν σε πολύ καλή γενική κατάσταση μετά την πρώτη χειρουργική επέμβαση πρόκλησης οστεομυελίτιδας της δεξιάς κνήμης από *S. aureus* και επομένως όλα συμμετείχαν στη δεύτερη επέμβαση πρόκλησης πυελονεφρίτιδας μετά από 3 εβδομάδες. Σε εκείνο το σημείο όλα τα ζώα της ομάδας S που είχαν υποστεί εικονική οστεομυελίτιδα, υπέστησαν εικονική πυελονεφρίτιδα. Τα ζώα της ομάδας P που είχαν υποστεί εικονική οστεομυελίτιδα, υπέστησαν πυελονεφρίτιδα δεξιού νεφρού από *E. coli* και τα ζώα της ομάδας OP που είχαν υποστεί οστεομυελίτιδα, ομοίως. Τα ζώα της ομάδας ODP χειρουργούνταν για πρόκληση πυελονεφρίτιδας μία εβδομάδα αργότερα, όπως αναφέρθηκε, λόγω της θεραπείας με νταλμπαβανσίνη. Κατά το πέρας της παρακολούθησης και καταγραφής της επιβίωσης επί 14 ημέρες, η θνητότητα ήταν 0% για την ομάδα S, 50% για την ομάδα P και 8.3% για την ομάδα OP **(Εικ. 2)**.

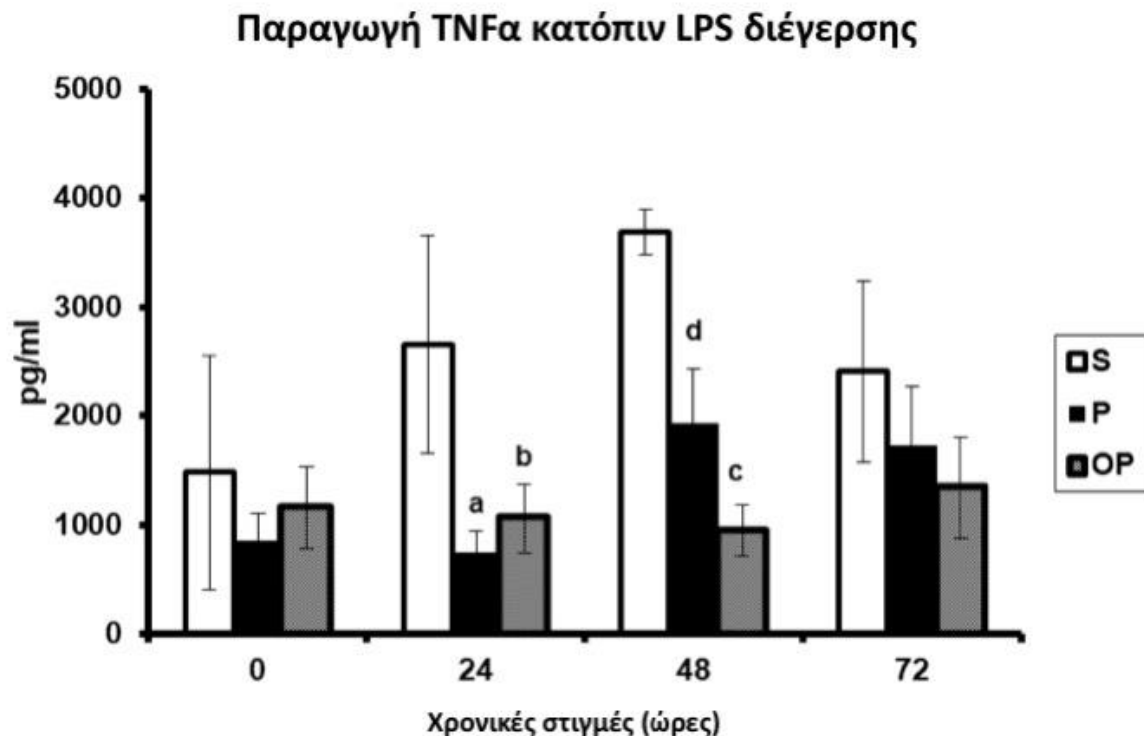
Στην προσπάθεια να αποσαφηνιστούν οι μηχανισμοί που οδήγησαν σε αυτό το πλεονέκτημα στην επιβίωση των ζώων της ομάδας OP έναντι αυτών της P, η έρευνα επικεντρώθηκε γύρω από τις εξής δύο βασικές λειτουργίες της έμφυτης ανοσίας που πιθανώς τροποποιήθηκαν: πρώτον στην εγγενή ανοσιακή απόκριση όπως αυτή εκφράζεται μέσω της παραγωγής κυτταροκινών από τα περιφερικά μονοπύρρηνα ανοσοκύτταρα (PBMCs) και δεύτερον, στην φαγοκυτταρική ικανότητα των ουδετεροφίλων εκφραζόμενη μέσω της δραστηριότητας της μυελοϋπεροξειδάσης (MPO) στους ιστούς.

Όσον αφορά στην πρώτη υπόθεση, βρέθηκε ότι η παραγωγή του παράγοντα νέκρωσης των όγκων TNFα από τα απομονωθέντα PBMCs στις 48 ώρες μετά πυελονεφρίτιδας κατόπιν διέγερσης με LPS ήταν σημαντικά μειωμένη στην ομάδα OP συγκριτικά με τις άλλες ομάδες **(Εικ. 3)**. Αντιθέτως η παραγωγή TNFα από τα ίδια PBMCs κατόπιν διέγερσης με PHA δεν έδειξε σημαντικές διακυμάνσεις σε καμία ομάδα **(Εικ. 4)**.

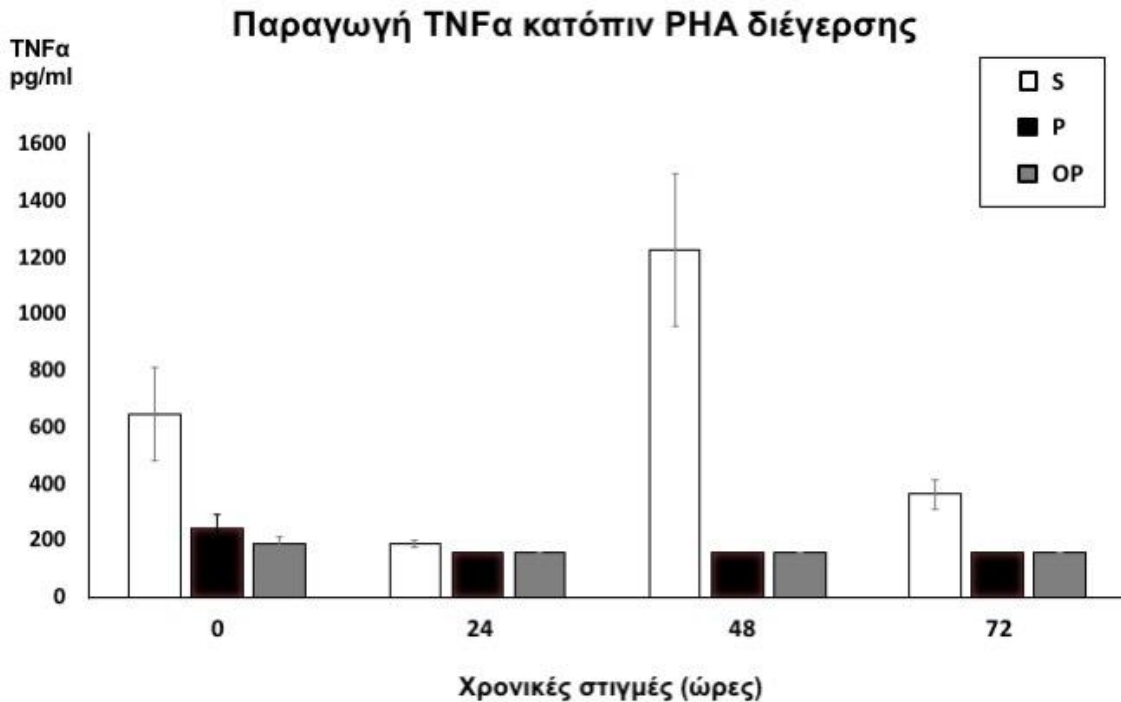
Επιβίωση των ζώων ανά ομάδα μελέτης



Εικόνα 2 - Επιβίωση των ζώων ανά ομάδα μελέτης. Οι 36 κόνικλοι τυχαιοποιήθηκαν σε 3 ομάδες πειραματισμού: **S**: εικονική οστεομυελίτιδα και εικονική πυελονεφρίτιδα μετά από 3 εβδομάδες, **P**: εικονική οστεομυελίτιδα και πυελονεφρίτιδα από *Escherichia coli* μετά από 3 εβδομάδες, **OP**: οστεομυελίτιδα από *Staphylococcus aureus* και πυελονεφρίτιδα από *Escherichia coli* μετά από 3 εβδομάδες. Αναπαράσταση και σύγκριση της επιβίωσης των ομάδων με καμπύλη Kaplan-Meier. Η τιμή της δοκιμασίας log-rank και ο βαθμός στατιστικής σημαντικότητας p για τις επιμέρους συγκρίσεις αναγράφονται.

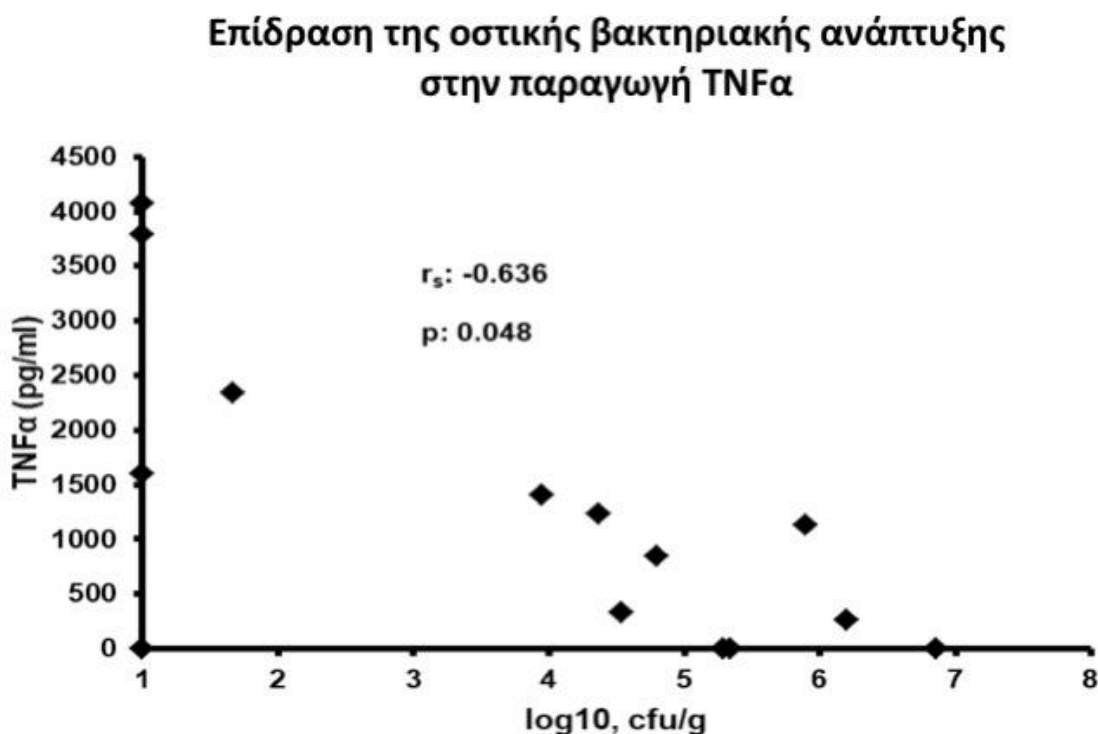


Εικόνα 3 - Παραγωγή του παράγοντα νέκρωσης των όγκων (TNFα) από τα απομονωμένα περιφερικά μονοπύρηνια κύτταρα (PBMCs) κατόπιν ανοσοδιέγερσής τους με λιποπολυσακχαρίτη (LPS). Οι 36 κόνικλοι τυχαιοποιήθηκαν σε 3 ομάδες πειραματισμού: **S**: εικονική οστεομυελίτιδα και εικονική πυελονεφρίτιδα μετά από 3 εβδομάδες, **P**: εικονική οστεομυελίτιδα και πυελονεφρίτιδα από *Escherichia coli* μετά από 3 εβδομάδες, **OP**: οστεομυελίτιδα από *Staphylococcus aureus* και πυελονεφρίτιδα από *Escherichia coli* μετά από 3 εβδομάδες. Αμέσως πριν από την επέμβαση πρόκλησης της πυελονεφρίτιδας καθώς και 24, 48 και 72 ώρες μετά απομονώνονταν τα περιφερικά μονοπύρηνια κύτταρα, τα οποία εν συνεχεία καλλιεργούνταν με τον ανοσοδιεγερτικό παράγοντα LPS επί 24 ώρες κάθε φορά. Στα υπερκείμενα μετρούνταν οι συγκεντρώσεις του παραγόμενου TNFα. Ο βαθμός στατιστικής σημαντικότητας p για τις στατιστικά σημαντικές συγκρίσεις ήταν: ^a0.009 ομάδα S vs ομάδα P, ^b0.048 ομάδα S vs ομάδα OP, ^c0.012 ομάδα S vs ομάδα OP, ^d0.034 vs της αντίστοιχης τιμής τη χρονική στιγμή 0.



Εικόνα 4 - Παραγωγή του παράγοντα νέκρωσης των όγκων (TNFα) από τα απομονωμένα περιφερικά μονοπύρρηνα κύτταρα (PBMCs) κατόπιν ανοσοδιέγερσής τους με φυτοαιματογλουτινίνη (PHA). Οι 36 κόνικλοι τυχαιοποιήθηκαν σε 3 ομάδες πειραματισμού: **S**: εικονική οστεομυελίτιδα και εικονική πυελονεφρίτιδα μετά από 3 εβδομάδες, **P**: εικονική οστεομυελίτιδα και πυελονεφρίτιδα από *Escherichia coli* μετά από 3 εβδομάδες, **OP**: οστεομυελίτιδα από *Staphylococcus aureus* και πυελονεφρίτιδα από *Escherichia coli* μετά από 3 εβδομάδες. Αμέσως πριν από την επέμβαση πρόκλησης της πυελονεφρίτιδας καθώς και 24, 48 και 72 ώρες μετά απομονώνονταν τα περιφερικά μονοπύρρηνα κύτταρα, τα οποία εν συνεχεία καλλιεργούνταν με τον ανοσοδιεγερτικό παράγοντα PHA επί 24 ώρες κάθε φορά. Στα υπερκείμενα μετρούνταν οι συγκεντρώσεις του παραγόμενου TNFα. Τα επίπεδα παραγόμενου TNFα από τα διεγερμένα PBMCs που συλλέχθηκαν όλες τις χρονικές στιγμές και από όλα τα ζώα όλων των ομάδων ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης.

Επιπροσθέτως σημειώθηκε αρνητική συσχέτιση μεταξύ του βακτηριακού φορτίου του *S. aureus* στα δείγματα σπογγώδους οστού που συλλέχθηκαν από την κνήμη των ζώων της ομάδας OP και του παραγόμενου TNFα από τα PBMCs που απομονώθηκαν 48 ώρες μετά την πνευμονεφρίτιδα (Εικ. 5).

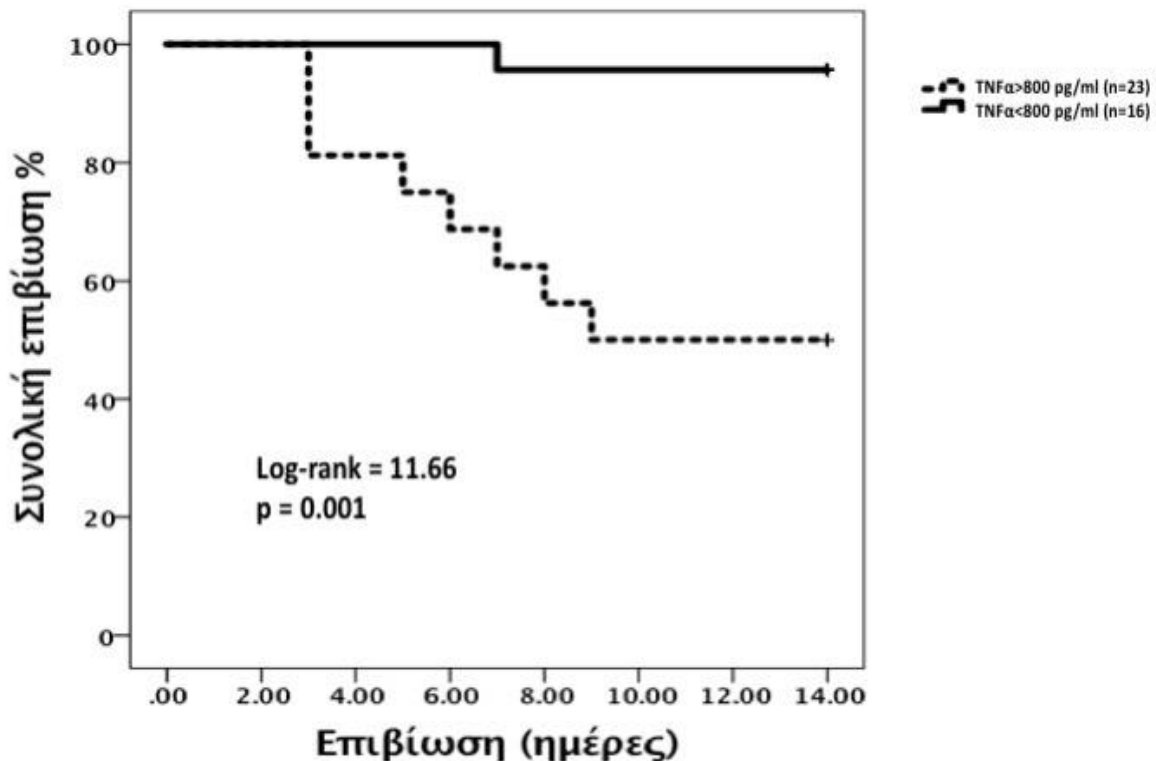


Εικόνα 5 - Συσχέτιση της παραγωγής του παράγοντα νέκρωσης των όγκων (TNFα) με το προϋπάρχον σταφυλοκοκκικό φορτίο στο οστό. Τα επίπεδα του παραγόμενου TNFα από τα διεγερμένα με LPS PBMCs που απομονώθηκαν 48 ώρες μετά την πρόκληση πνευμονεφρίτιδας στα ζώα της ομάδας OP εμφανίζουν αρνητική συσχέτιση με το βακτηριακό φορτίο του *S. aureus* στα δείγματα σπογγώδους οστού της δεξιάς κνήμης των ζώων 24 ώρες πριν την πρόκληση πνευμονεφρίτιδας. Ο συντελεστής συσχέτισης Spearman και ο βαθμός στατιστικής σημαντικότητας p αναγράφονται.

Τα επίπεδα παραγόμενης IL-10 από τα υπερκείμενα των διεγερμένων PBMCs όλων των χρονικών στιγμών όλων των ομάδων ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης. Το ίδιο ίσχυσε και για τα επίπεδα φερριτίνης ορού όλων των ζώων όλων των χρονικών στιγμών αιμοληψίας.

Αυτά τα ευρήματα μεταφράστηκαν σαν εξασθένηση της προφλεγμονώδους απόκρισης των PBMCs ως απόρροια κάποιου φαινομένου κυτταρικής ανοχής, η οποία φαίνεται να συνδράμει καθοριστικά, παρέχοντας ωφέλεια στην επιβίωση της ομάδας OP και διαφαίνεται να έχει κρίσιμο σημείο τις 48 ώρες. Αυτό διαγράφεται και στις καμπύλες επιβίωσης, οι οποίες τείνουν να διαχωρίζονται μετά τις 48 ώρες (**Εικ. 2**). Στη συνέχεια διερευνήθηκε η συσχέτιση μεταξύ επιπέδων παραγόμενου TNFα και συνολικής επιβίωσης ανεξαρτήτως ομάδας πειραματισμού. Το αποτέλεσμα ήταν ότι η συνολική επιβίωση αποδείχθηκε να μειώνεται σε βαθμό στατιστικά πολύ σημαντικό εφόσον ο παραγόμενος TNFα από διεγερμένα με LPS PBMCs στις 48 ώρες ξεπερνούσε το κατώφλι των 800 pg/ml (**Εικ. 6**). Αυτό με τη σειρά του δημιούργησε το ερώτημα αν η πρόωρη μεταβολή των επιπέδων παραγόμενου TNFα τις πρώτες 24 ώρες έχει σημασία στην έκβαση της επιβίωσης και κατά πόσον αυτή η παράμετρος μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν προγνωστικός δείκτης της τελικής έκβασης.

Επίδραση του TNFα στην επιβίωση

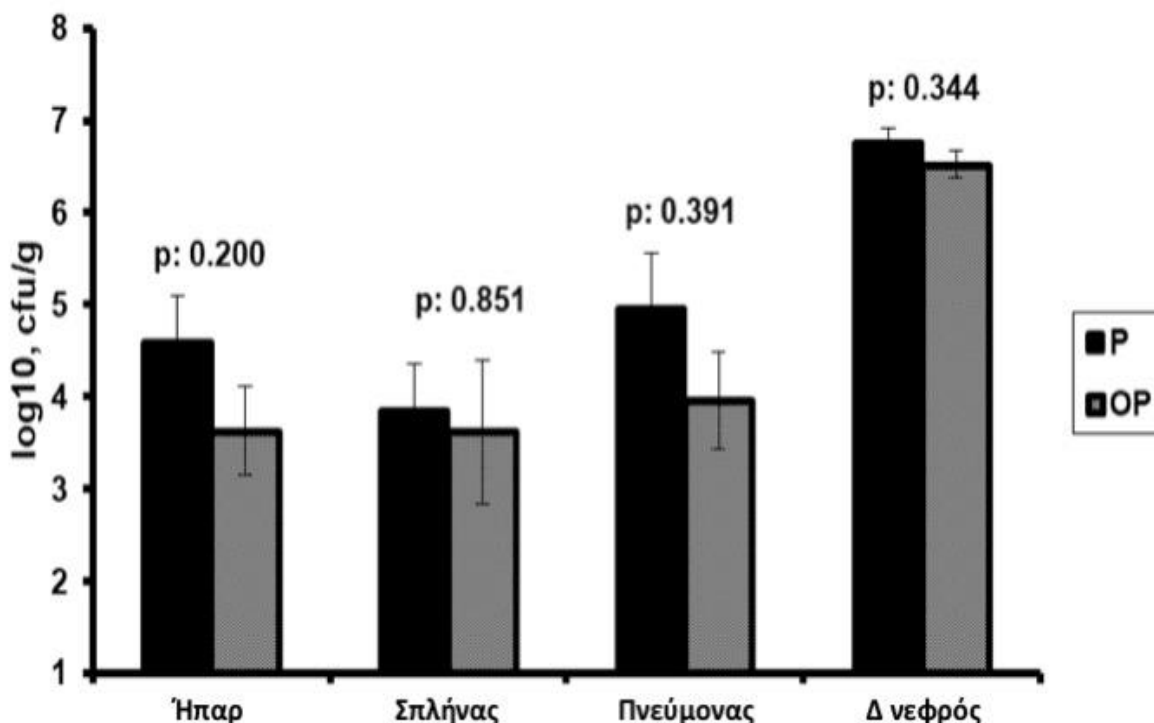


Εικόνα 6 - Συσχέτιση συνολικής επιβίωσης των ζώων με τα αυξημένα επίπεδα του παραγόμενου παράγοντα νέκρωσης των όγκων (TNFα) από διεγερμένα PBMCs 48 ώρες μετά πνευμονεφρίτιδας. Η επιβίωση όλων των ζώων ανεξαρτήτως ομάδας αναπαρίσταται σε καμπύλη Kaplan-Meier. Παρατηρείται στατιστικά πολύ σημαντική διαφορά στην έκβαση της επιβίωσης των ζώων των οποίων τα διεγερμένα με LPS PBMCs (48h) παρήγαγαν TNFα > 800 pg/ml συγκριτικά με αυτά που παρήγαγαν TNFα < 800 pg/ml. Το εν λόγω κατώφλι στη συγκέντρωση του παραγόμενου TNFα επιλέχθηκε ως τιμή όπου μεγιστοποιείται η TTS της μεθόδου.

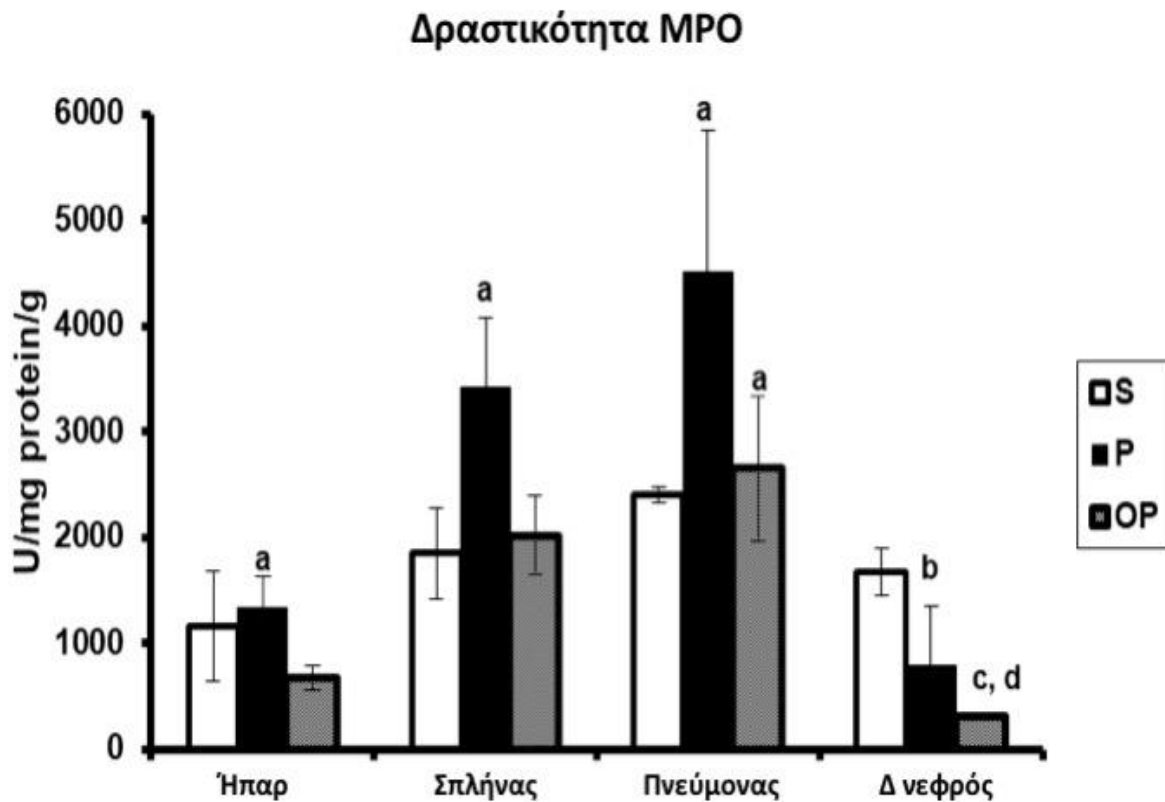
Η μέση τιμή \pm τυπικό σφάλμα \log_{10} cfu/g του βακτηριακού φορτίου του *S. aureus* στα δείγματα σπογγώδους οστού που ελήφθησαν δια της πύλης εισόδου στην κνήμη των ζώων της ομάδας OP ήταν 3.32 ± 0.52 cfu/g (θετική καλλιέργεια στο 70% των ζώων της ομάδας OP). Στο 61% των ζώων της ομάδας OP η καλλιέργεια του υπερκείμενου της υπερηχητικής κρούσης του ξένου σώματος ήταν θετική για την ανάπτυξη *S. aureus*. Η καλλιέργεια τραύματος μαλακών μορίων πέριξ της πύλης εισόδου ήταν αρνητική σε όλα τα ζώα. Επιπλέον ο *S. aureus* δεν αναπτύχθηκε σε κανέναν άλλον ιστό κατά τη δειγματοληψία στη νεκροτομή. Το βακτηριακό φορτίο του *E. coli* ανά τους ιστούς στις ποσοτικές καλλιέργειες μετά τη νεκροτομή ήταν παρόμοιο μεταξύ των ομάδων P και OP (**Εικ. 7**). Το 95% των ζώων των ομάδων OP και P είχαν μακροσκοπικά πυόνεφρο στη νεκροτομή με μέση τιμή ανάπτυξης 6.21 ± 0.17 cfu/g *E. coli*. Στα ζώα της ομάδας S δεν αναπτύχθηκε *E. coli* σε κανένα ιστικό δείγμα.

Όσον αφορά την αποτύπωση της δραστηριότητας της ιστικής MPO, δηλαδή του δείκτη που αντανακλά την ουδετεροφιλική ιστική διήθηση [152], βρέθηκε ότι ήταν σημαντικά μειωμένα στην ομάδα OP σε σύγκριση με τις άλλες. Ειδικότερα φάνηκε ότι η δραστηριότητα της MPO στα δείγματα του σπλήνα και του δεξιού πνεύμονα των ζώων της ομάδας OP ήταν σημαντικά αυξημένα σε σχέση με αυτήν του δεξιού νεφρού των ζώων της ίδιας ομάδας, όπου ήταν και η σηπτική εστία. Αυτό το φαινόμενο συνάδει με την πιθανή διαμερισματοποίηση των ουδετερόφιλων προς τα απομακρυσμένα όργανα καθώς εξελίσσεται και διασπείρεται η σήψη από το *E. coli* στα ζώα της ομάδας P. Αυτό δεν φάνηκε να συμβαίνει σε ανάλογο βαθμό στα ζώα της ομάδας OP (**Εικ. 8**). Αν και αυτό φαντάζει παράδοξο σε μία πρώτη ερμηνεία, θεωρήθηκε ότι αποτελεί δείκτη φαγοκυτταρικής ικανότητας των ουδετεροφίλων που ενεργοποιήθηκαν και διήθησαν τους ιστούς, όπως αυτό αντανακλάται από την αρνητική συσχέτιση μεταξύ του ιστικού βακτηριακού φορτίου *E. coli* και της δραστηριότητας της MPO στο σπλήνα και στο δεξιό νεφρό των ζώων της ομάδας OP (**Εικ. 9 και 10**).

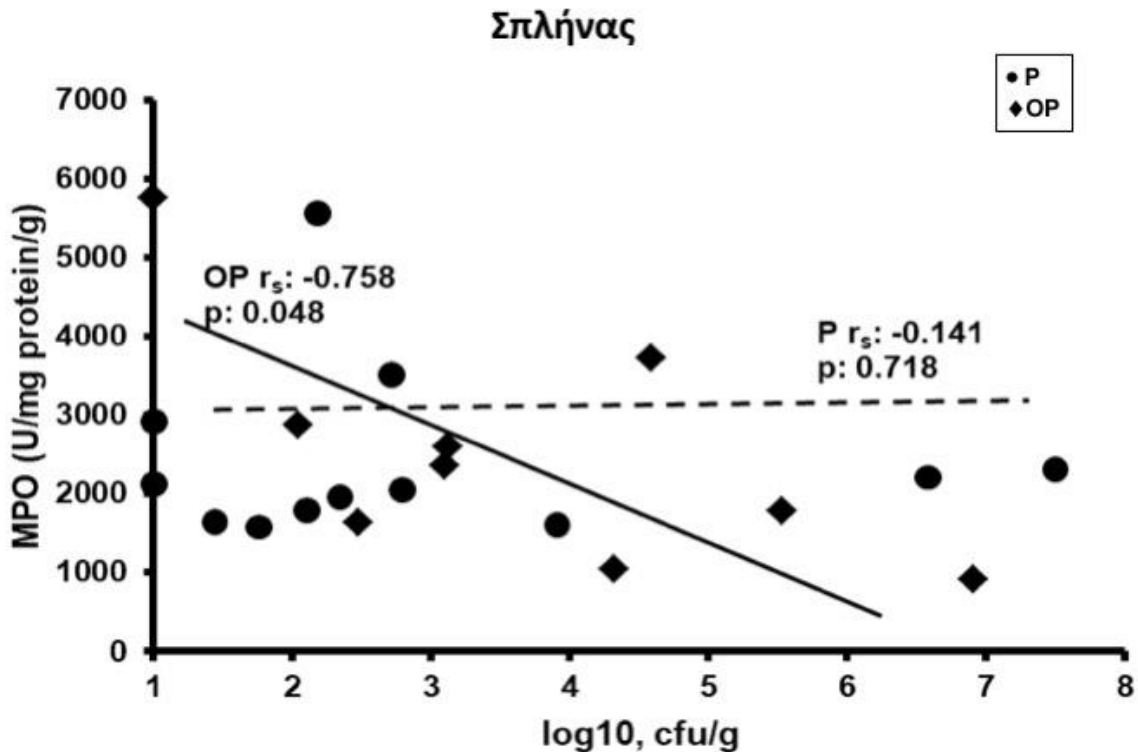
Ιστοική ανάπτυξη *E. coli*



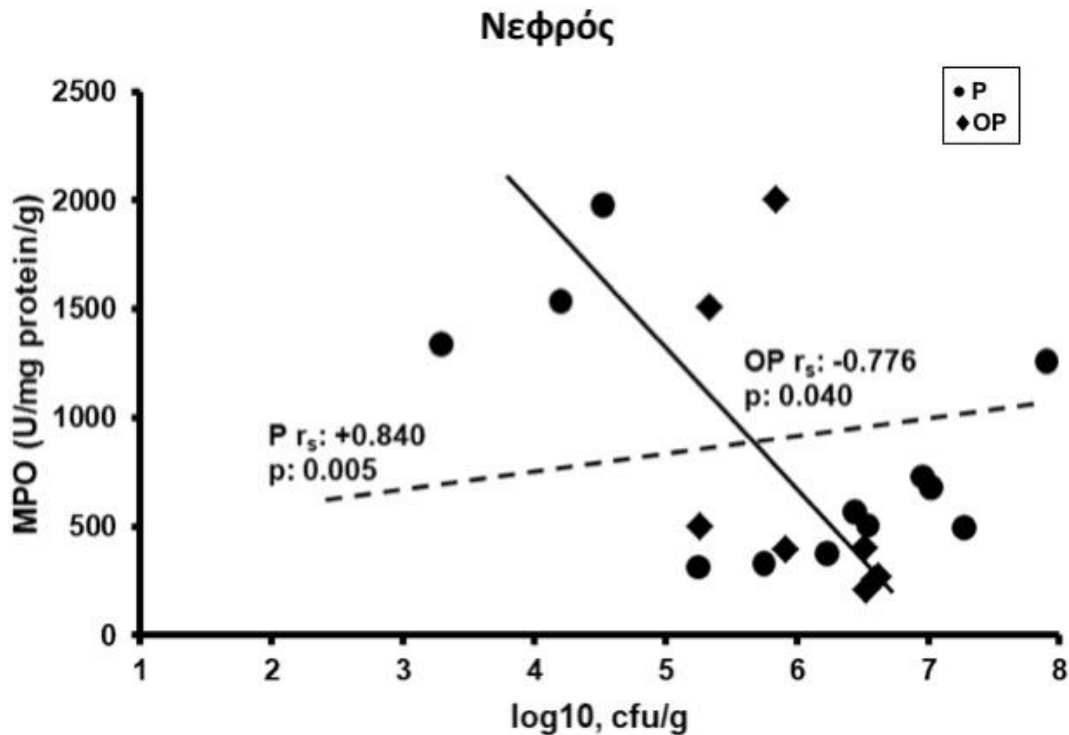
Εικόνα 7 - Βακτηριακό φορτίο *Escherichia coli* ανά ιστό κατόπιν ευθανασίας. Οι 36 κόνικλοι εξ αρχής τυχαιοποιήθηκαν σε 3 ομάδες πειραματισμού: **S**: εικονική οστεομυελίτιδα και εικονική πυελονεφρίτιδα μετά από 3 εβδομάδες, **P**: εικονική οστεομυελίτιδα και πυελονεφρίτιδα από *Escherichia coli* μετά από 3 εβδομάδες, **OP**: οστεομυελίτιδα από *Staphylococcus aureus* και πυελονεφρίτιδα από *Escherichia coli* μετά από 3 εβδομάδες. Ιστοτεμάχια από όλα τα μείζονα όργανα λαμβάνονταν υπό άσηπτες συνθήκες κατά τη νεκροτομή, η οποία λάμβανε χώρα είτε μετά το θάνατο είτε κατά την ευθανασία 14 ημέρες μετά την πρόκληση πυελονεφρίτιδας. Τα αποτελέσματα της ιστοικής ανάπτυξης του *Escherichia coli* μετά από ποσοτικές καλλιέργειες των δειγμάτων απεικονίζονται. Ο βαθμός στατιστικής σημαντικότητας p αναγράφεται για κάθε ζευγαρωτή σύγκριση μεταξύ των ομάδων OP και P. Σε όλα τα ζώα της ομάδας S η βακτηριακή ανάπτυξη ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης.



Εικόνα 8 – Η δραστικότητα της μυελοϋπεροξειδάσης ουδετεροφίλων (MPO) στα όργανα. Οι 36 κόνικλοι εξ αρχής τυχαιοποιήθηκαν σε 3 ομάδες πειραματισμού: **S:** εικονική οστεομυελίτιδα και εικονική πνευμονοφρίτιδα μετά από 3 εβδομάδες, **P:** εικονική οστεομυελίτιδα και πνευμονοφρίτιδα από *Escherichia coli* μετά από 3 εβδομάδες, **OP:** οστεομυελίτιδα από *Staphylococcus aureus* και πνευμονοφρίτιδα από *Escherichia coli* μετά από 3 εβδομάδες. Η δραστικότητα της MPO ως δείκτης ιστικής διήθησης των ουδετεροφίλων αναπαριστάται στο διάγραμμα ανά όργανο και ανά ομάδα μελέτης. Ο βαθμός *p* στατιστικής σημαντικότητας για τις στατιστικά σημαντικές συγκρίσεις ήταν: ^a0.018 vs της αντίστοιχης τιμής του δεξιού νεφρού, ^b0.002 ομάδα S vs ομάδα P, ^c<0.0001 ομάδα S vs ομάδα OP, ^d0.015 ομάδα P vs ομάδα OP.

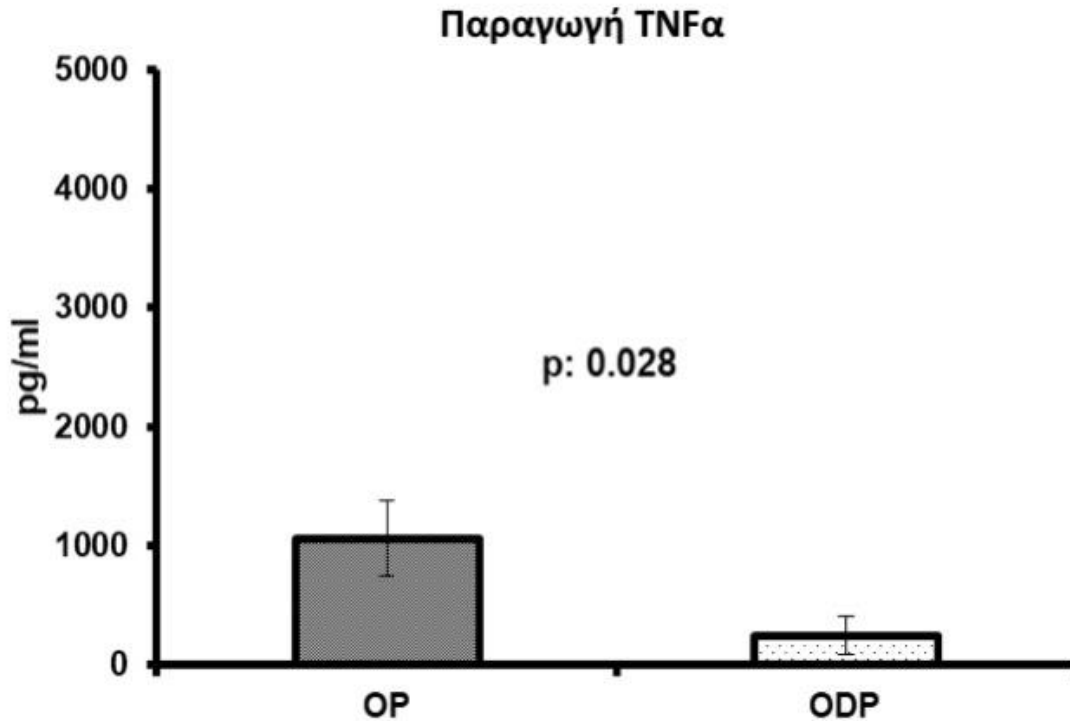


Εικόνα 9 - Τροποποίηση της φαγοκυτταρικής ικανότητας των ουδετεροφίλων στον σπλήνα. Οι 36 κόνικλοι τυχαιοποιήθηκαν σε 3 ομάδες πειραματισμού: **S**: εικονική οστεομυελίτιδα και εικονική πνευμονοφρίτιδα μετά από 3 εβδομάδες, **P**: εικονική οστεομυελίτιδα και πνευμονοφρίτιδα από *Escherichia coli* μετά από 3 εβδομάδες, **OP**: οστεομυελίτιδα από *Staphylococcus aureus* και πνευμονοφρίτιδα από *Escherichia coli* μετά από 3 εβδομάδες. Στα ιστοτεμάχια που ελήφθησαν κατά τη νεκροτομή μετρήθηκαν η δραστικότητα της μυελοϋπεροξειδάσης των ουδετεροφίλων (MPO) και το βακτηριακό φορτίο του *E. coli*. Αποδείχθηκε αρνητική συσχέτιση μεταξύ της δραστικότητας MPO και του βακτηριακού φορτίου του *Escherichia coli* στο σπλήνα των ζώων (OP). Ο συντελεστής συσχέτισης Spearman και ο βαθμός p της στατιστικής σημαντικότητας αναγράφονται για κάθε ομάδα.

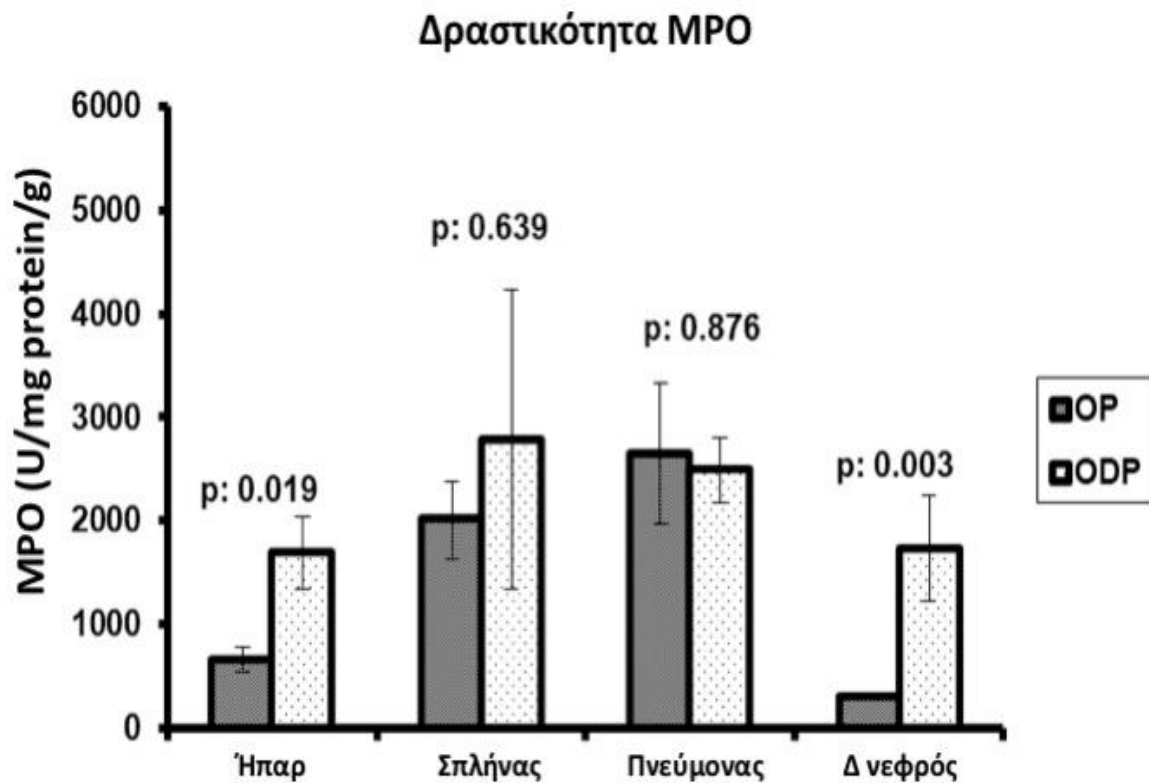


Εικόνα 10 - Τροποποίηση της φαγοκυτταρικής ικανότητας των ουδετεροφίλων στο δεξιό νεφρό. Οι 36 κόνικλοι τυχαιοποιήθηκαν σε 3 ομάδες πειρατισμού: **S**: εικονική οστεομυελίτιδα και εικονική πυελονεφρίτιδα μετά από 3 εβδομάδες, **P**: εικονική οστεομυελίτιδα και πυελονεφρίτιδα από *Escherichia coli* μετά από 3 εβδομάδες, **OP**: οστεομυελίτιδα από *Staphylococcus aureus* και πυελονεφρίτιδα από *Escherichia coli* μετά από 3 εβδομάδες. Στα ιστοτεμάχια που ελήφθησαν κατά τη νεκροτομή μετρήθηκαν η δραστικότητα της μυελοϋπεροξειδάσης των ουδετεροφίλων (MPO) και το βακτηριακό φορτίο του *E. coli*. Αποδείχθηκε αρνητική συσχέτιση μεταξύ της δραστικότητας MPO και του βακτηριακού φορτίου του *Escherichia coli* στο δεξιό νεφρό των ζώων της ομάδας OP. Αντιθέτως θετική βρέθηκε η ίδια συσχέτιση όσον αφορά τα ζώα της ομάδας P. Ο συντελεστής συσχέτισης Spearman και ο βαθμός p της στατιστικής σημαντικότητας αναγράφονται για κάθε ομάδα.

Μετά την διερεύνηση των μηχανισμών που τροποποίησαν την ανοσιακή απόκριση των μονοπύρηνων στις ομάδες OP και P, προέκυψε το ερώτημα κατά πόσο αυτή μπορεί να τροποποιηθεί περισσότερο αν οι ξενιστές ελάμβαναν αντισταφυλοκοκκική θεραπεία για την πρώτη λοίμωξη. Ως αποτέλεσμα εισήχθη η ομάδα μελέτης ODP απαρτιζόμενη από 7 ζώα στα οποία έγινε χειρουργικός καθαρισμός και θεραπεία με ένα νεότερο λιποπεπτιδίο με μακρά φαρμακοκινητική δράση (νταλμπάβανσίνη) πριν την πρόκληση της πυελονεφρίτιδας. Σημειώνεται ότι πρωταρχικός στόχος σε αυτό το σημείο δεν ήταν η διερεύνηση πιθανής εκρίζωσης του μικροβίου από το φάρμακο, αλλά η αδρανοποίησή του με συνοδό απελευθέρωση σταφυλοκοκκικών PAMPs από τα νεκρά μικρόβια, που εν συνεχεία αναμένεται να αλληλεπιδράσουν με τους PRRs των μονοπυρήνων κυττάρων τροποποιώντας ίσως περαιτέρω την απόκρισή τους στο νέο επικείμενο αντιγονικό σηπτικό ερέθισμα (*E. coli*). Όντως σε αυτά τα ζώα η παραγωγή TNFα από τα διεγερμένα PBMCs ήταν ακόμα πιο μειωμένη σε σχέση με αυτή της ομάδας OP στις 48 ώρες μετά πυελονεφρίτιδας (**Εικ. 11**). Επιπλέον η δραστικότητα της MPO στο ήπαρ και στο δεξιό νεφρό ήταν πιο αυξημένη σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές της ομάδας OP υπονοώντας ακόμα μεγαλύτερη ουδετεροφιλική διήθηση / φαγοκυτταρική ικανότητα (**Εικ. 12**).

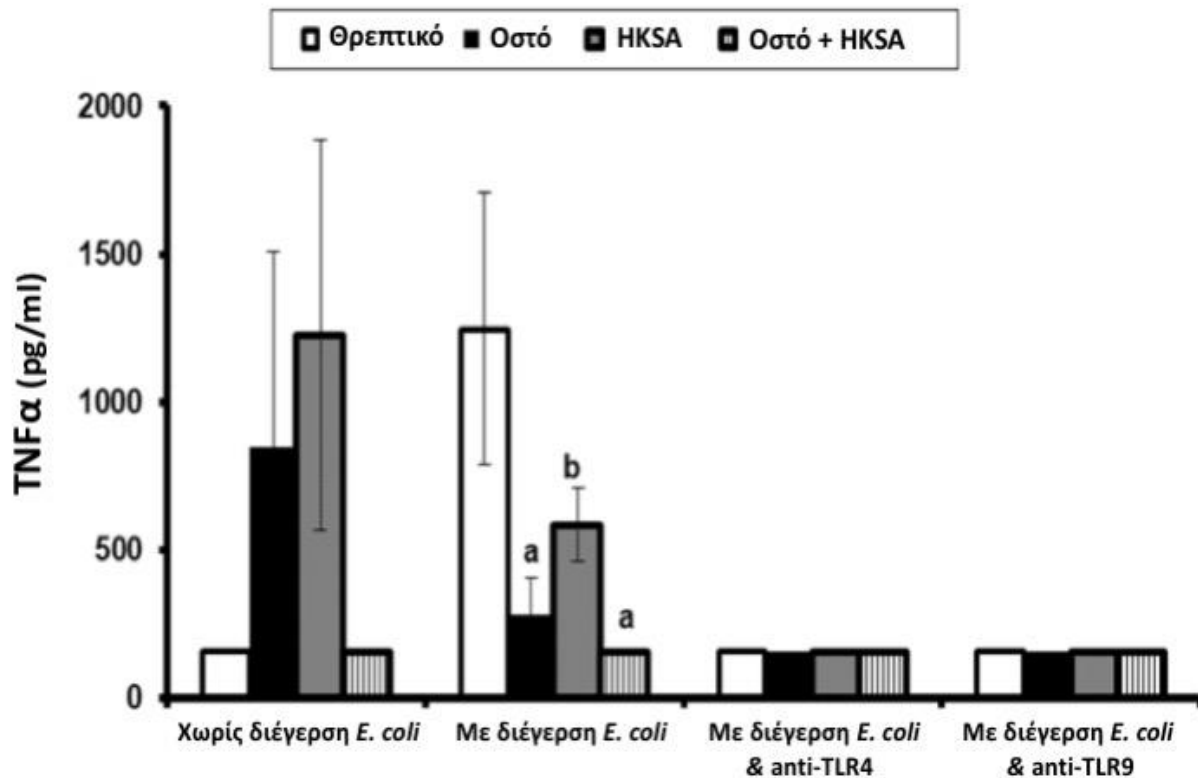


Εικόνα 11 - Η επίδραση της θεραπείας με νταλμπαβανσίνη στην παραγωγή παράγοντα νέκρωσης των όγκων (TNFα) από διεγερμένα PBMCs (48h). Οι κόνικλοι της ομάδας **OP** υποβλήθηκαν σε οστομυελίτιδα από *Staphylococcus aureus* και ακολούθως πνευμονοφρίτιδα από *Escherichia coli* μετά από 3 εβδομάδες. Οι κόνικλοι της ομάδας **ODP** υποβλήθηκαν σε οστομυελίτιδα από *Staphylococcus aureus*, χειρουργικό καθαρισμό και άπαξ χορήγηση νταλμπαβανσίνης μετά από 3 εβδομάδες και ακολούθως πνευμονοφρίτιδα από *Escherichia coli* μετά από ακόμα μία εβδομάδα. Η παραγωγή TNFα από διεγερμένα με LPS PBMCs στις 48 ώρες μετά από την πρόκληση της πνευμονοφρίτιδας αποδείχθηκε σημαντικά μειωμένη σε σχέση με αυτήν των ζώων της ομάδας OP. Ο βαθμός p της στατιστικής σημαντικότητας της διαφοράς αναγράφεται στο διάγραμμα.



Εικόνα 12 - Η επίδραση της θεραπείας με νταλμπαβανσίνη στην δραστικότητα της ιστικής μυελοϋπεροξειδάσης των ουδετεροφίλων (MPO). Οι κόνικλοι της ομάδας **OP** υποβλήθηκαν σε οστομυελίτιδα από *Staphylococcus aureus* και ακολούθως πυελονεφρίτιδα από *Escherichia coli* μετά από 3 εβδομάδες. Οι κόνικλοι της ομάδας **ODP** υποβλήθηκαν σε οστομυελίτιδα από *Staphylococcus aureus*, χειρουργικό καθαρισμό και άπαξ χορήγηση νταλμπαβανσίνης μετά από 3 εβδομάδες και ακολούθως πυελονεφρίτιδα από *Escherichia coli* μετά από ακόμα μία εβδομάδα. Η μετρούμενη δραστικότητα της MPO στους ιστούς των ζώων της ομάδας ODP συγκρίνεται με αυτήν της ομάδας OP. Ο βαθμός p της στατιστικής σημαντικότητας των επιμέρους συγκρίσεων αναγράφεται στο διάγραμμα.

Με σκοπό να αποσαφηνιστεί ο μηχανισμός που οδηγούσε σε αυτήν την τροποποίηση της παραγωγής TNF α , το *in vivo* πείραμα αναπαρήχθη *in vitro*. Ειδικότερα, PBMCs απομονωμένα από υγιείς κονίκλους και επωασμένα με οστικό ομογενοποίημα ή θερμικά εξασθενημένο *S. aureus* (heat-killed *S. aureus*, HKSA) ή και τα δύο εν συνεχεία ανοσοδιεγέρθηκαν με θερμικά εξασθενημένο *E. coli* (heat-killed *E. coli*, HKEC). Το αποτέλεσμα ήταν ότι τα επωασμένα PBMCs με οστικό ομογενοποίημα ή/και HKSA είχαν μειωμένη παραγωγή TNF α κατόπιν διέγερσής τους με HKEC. Αυτή η μείωση ήταν ακόμα πιο έκδηλη στα PBMCs μετά την προσθήκη ανταγωνιστών των TLR υποδοχέων anti-TLR4 και anti-TLR9 (Εικ. 13).



Εικόνα 13 - Τροποποίηση στην παραγωγή του παράγοντα νέκρωσης των όγκων (TNFα) από διεγερμένα ή μη PBMCs μετά από αλληλεπίδραση αυτών με σπογγώδες οστό ή/και *Staphylococcus aureus*. Περιφερικά μονοπύρρηνα κύτταρα υγιών κονίκλων καλλιεργήθηκαν *in vitro* και επωάστηκαν για 24 ώρες με θρεπτικό υλικό, σπογγώδες οστικό ομογενοποίηση, heat-killed *Staphylococcus aureus* (HKSA) ή το συνδυασμό των δύο τελευταίων. Εν συνεχεία επωάστηκαν εκ νέου με ερέθισμα στέλεχος heat-killed *Escherichia coli* ή χωρίς κανένα ερέθισμα. Η όλη επώαση των PBMCs διενεργήθηκε υπό την παρουσία και απουσία anti-TLR4 και anti-TLR9 ανταγωνιστών. Εν τέλει στα υπερκείμενα μετρήθηκαν επίπεδα παραγόμενου TNFα. Ο βαθμός στατιστικής σημαντικότητας p για τις στατιστικά σημαντικές συγκρίσεις ήταν: ^a p : 0.010 vs απλό θρεπτικό υλικό, ^b p : 0.005 vs απλό θρεπτικό υλικό.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα μελέτη έδειξε ότι η προηγηθείσα χρόνια οστική λοίμωξη από *S. aureus* παρείχε πλεονέκτημα επιβίωσης στην επικείμενη πυελονεφρίτιδα από *E. coli*. Στο μελετηθέν σηπτικό μοντέλο λοίμωξης ουροποιητικού ο θάνατος επέρχεται μετά από πολυοργανική ανεπάρκεια όπως διαφαίνεται από την εκτεταμένη ουδετεροφιλική διήθηση όλων των οργάνων (σπλήνας, δεξιός πνεύμονας, ήπαρ κλπ), στα οποία το μικρόβιο διεισπάρη μέσω της κυκλοφορίας. Η ωφέλεια στην επιβίωση των ζώων με οστεομυελίτιδα συσχετίστηκε με κάποιου τύπου καταστολή της προφλεγμονώδους μοίρας της έμφυτης ανοσιακής απόκρισης των μονοκυττάρων στην σήψη από *E. coli*, όπως αντανakλάται από την μειωμένη παραγωγή TNFα από τα διεγερμένα περιφερικά μονοκύτταρα ανοσοκύτταρα και τη μείωση της ουδετεροφιλικής διήθησης στον πάσχον νεφρό αλλά και στα λοιπά όργανα.

Ο μηχανισμός πίσω από αυτήν την υποφαινόμενη ωφέλεια θυμίζει αυτόν της γνωστής επαγόμενης κυτταρικής ανοχής στο LPS. Ως ανοχή στο LPS ορίζεται η μειωμένη ανοσιακή απόκριση των μονοκύτταρων σε ένα ερέθισμα περιέχον LPS, ως απόρροια μιας προηγούμενης τους έκθεσης σε *E. coli* ή LPS [153,154]. Επιπροσθέτως, μία πρόσφατη μελέτη, χρησιμοποιώντας μαστικά επιθηλιακά κύτταρα από βοοειδή, ανακάλυψε ένα παρόμοιο φαινόμενο κυτταρικής ανοχής επαγόμενο μέσω αγωνιστών των υποδοχέων TLR2 και TLR6. Ειδικότερα, τα κύτταρα επώαστηκαν σε κυτταροκαλλιέργειες με τον TLR2/6 αγωνιστή Pam2CSK4 και μετέπειτα εκτέθηκαν στον ανοσοδιεγερτικό παράγοντα LPS. Αυτά τα κύτταρα εν τέλει παρήγαγαν μειωμένη ποσότητα TNFα σε σχέση με την ομάδα μαρτύρων [155]. Ακόμα πιο ενδιαφέρον είναι ότι αυτό το φαινόμενο δεν μπορούσε να αναστραφεί με τη χρήση επιγενετικών αναστολέων. Επιστρέφοντας στην παρούσα μελέτη, εφόσον συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος του *S. aureus*, όπως η πεπτιδογλυκάνη και το μουραμυλ-διπεπτίδιο αναγνωρίζονται κυρίως από του υποδοχείς TLR2, πιθανολογείται ότι αυτού του τύπου η επαγόμενη κυτταρική ανοχή ευθύνεται για τη μειωμένη παραγωγή TNFα από τα PBMCs της ομάδας OP. Ενδιαφέρον είναι όμως ότι στα πειράματα χρειάστηκε μία δεύτερη *in vivo* πρόκληση για να φέρει στην επιφάνεια αυτό το φαινόμενο, μιας και οι τιμές του παραγόμενου TNFα στα ζώα τη χρονική στιγμή 0, δηλαδή πριν την πρόκληση πυελονεφρίτιδας, δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των ομάδων O και OP. Από κλινικής

σκοπιάς πρέπει να τονιστεί ότι αυτή η καταστολή στην έκφραση του TNFα ήταν ακόμα πιο έκδηλη στην ομάδα που έλαβε θεραπεία με αντισταφυλοκοκκική αγωγή. Επομένως, αυτή η τροποποίηση στην απόκριση του ανοσοποιητικού δεν πυροδοτείται μόνο μέσω ενεργού λοίμωξης με ταχέως πολλαπλασιαζόμενα στελέχη *S. aureus*, αλλά επίσης προκαλείται και από υπολειπόμενα αντιγόνα που απελευθερώθηκαν στην κυκλοφορία και στους ιστούς μετά τη βακτηριοκτόνο θεραπεία (νταλμπαβανσίνη).

Η νταλμπαβανσίνη ανήκει στην κατηγορία των νεότερων λιπογλυκοπεπτιδίων με χαρακτηριστικό τους τον ιδιαίτερα μακρό χρόνο ημίσειας ζωής (346 ώρες) μετά από άπαξ ενδοφλέβιο χορήγηση. Έχει ευρύ φάσμα δράσης έναντι gram θετικών μικροοργανισμών, όπως *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus anginosus*, *Enterococcus Faecium* και *Enterococcus faecalis*. Η νταλμπαβανσίνη έχει λάβει έγκριση ως θεραπεία για λοιμώξεις μαλακών μορίων (ABSSSIs) σε ενήλικες, ειδικά αν αυτές οφείλονται σε στελέχη *S. aureus* με αντοχή στη μεθικιλίνη ή με ενδιάμεση ευαισθησία στη βανκομυκίνη. Το θεραπευτικό εύρος της νταλμπαβανσίνης την καθιστά μία πολύ υποσχόμενη εναλλακτική θεραπεία έναντι των gram θετικών οστικών λοιμώξεων και ως εκ τούτου πρωταγωνιστεί σε πολλές κλινικές και πειραματικές μελέτες θεραπείας οστικών λοιμώξεων. Παρόλα αυτά, προς το παρόν υπάρχουν λίγα δεδομένα σχετικά με την αποτελεσματικότητά της σε αυτές [168].

Σε αυτό το σημείο πρέπει να σημειωθεί ότι καθώς γίνεται αναφορά σε καταστολή του παραγόμενου TNFα, εγείρεται το θέμα της γνωστής καταστολής του ανοσοποιητικού μετά από σοβαρές λοιμώξεις, το οποίο με τη σειρά του έχει ως αποτέλεσμα την μειωμένη ικανότητά του να αντιμετωπίζει επερχόμενες νέες λοιμώξεις. Πολλαπλές κλινικές και πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι η σηπτική κατάσταση, το σοβαρό τραύμα και άλλα ερεθίσματα που προκαλούν SIRS, μειώνουν τη δεινότητα της ανοσολογικής απόκρισης, φαινόμενο το οποίο είναι ευρέως γνωστό ως ανοσοκαταστολή που συνδέεται με την κριτική νόσο. Παρόλα αυτά, ο φαινότυπος της ανοσολογικής απόκρισης των ζωικών προτύπων στα πειράματά μας προσιδιάζε περισσότερο στην ανοχή παρά στην ανοσοκαταστολή.

Το φαινόμενο της ανοχής που επάγεται μέσω TLR υποδοχέων εξαρτάται πλήρως από την παθογονικότητα του μικροβίου που πρωταγωνιστεί. Πιο συγκεκριμένα,

σε μία πρόσφατη μελέτη επίμυες (free from specific pathogens, SPF) συγκρίθηκαν με επίμυες που συστεγάστηκαν με ζώα από καταστήματα κατοικίδιων (CoH). Όταν και οι δύο ομάδες εκτέθηκαν σε χαμηλής παθογονικότητας *Listeria monocytogenes*, η οποία αλληλεπιδρά με TLR2, τα ζώα CoH παρουσίασαν ενισχυμένη ανοσιακή απόκριση σε σχέση με τα SPF, πράγμα που οδηγούσε σε πλεονέκτημα επιβίωσης έναντι των άλλων. Το αντίθετο όμως συνέβαινε όταν τα ζώα αυτά υπέστησαν ενδοπεριτοναϊκή σήψη, λόγω της καταιγίδας των κυτταροκινών που ακολούθησε (cytokine storm) [156]. Με άλλα λόγια, η κυτταρική ανοχή επαγόμενη μέσω TLR2 αλληλεπίδρασης πιθανολογείται ότι εκδηλώνεται επί τω πλείστον σε περιβάλλον προηγηθείσας χρόνιας λοίμωξης χαμηλής παθογονικότητας, η οποία στη δική μας μελέτη ήταν η χρόνια οστεομυελίτιδα επί υλικών οστεοσύνθεσης.

Η παθοφυσιολογία των οστικών λοιμώξεων είναι πιο περίπλοκη, αφού παράλληλα με την απελευθέρωση των PAMPs το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή εκτίθεται και αλληλεπιδρά αναπόφευκτα με danger-associated molecular patterns (DAMPs) ή αλλιώς «αλαρμίνες», ενδοκυττάρια συστατικά δηλαδή, που απελευθερώνονται τοπικά αλλά και στην κυκλοφορία ως απόρροια της ιστικής καταστροφής. Παραδείγματα τέτοιων ουσιών είναι οι ιστόνες, η τριφωσφορική αδενosίνη, το ουρικό και τα μόρια high mobility group box 1. Ως γνωστόν, τα DAMPs αλληλεπιδρούν κυρίως με υποδοχείς TLR4 και TLR9 [63,157]. Στο δικό μας *in vitro* μοντέλο, το οστικό ομογενοποίημα με το οποίο επωάστηκαν τα PBMCs είναι προφανώς πλούσιο σε DAMPs μετά τον θρυμματισμό του οστού. Αφού λοιπόν επωάστηκαν τα ίδια PBMCs με anti-TLR4 και anti-TLR9 και κατόπιν διέγερσής τους με ΗΚΕC, επέδειξαν σχεδόν εκμηδενισμένα επίπεδα παραγόμενου TNF α . Εξ αυτού έπεται ότι η μειωμένη παραγωγή TNF α από την ομάδα OP οφείλεται, τουλάχιστον εν μέρει, στην αναστολή των υποδοχέων TLR4 και TLR9 των περιφερικών μονοπύρηνων κυττάρων.

Η παρούσα μελέτη ανέδειξε για πρώτη φορά ότι η χρόνια σταφυλοκοκκική οστεομυελίτιδα τροποποίησε την απόκριση της έμφυτης ανοσίας του ξενιστή σε τέτοιο βαθμό που τον προστάτεψε από την μεγάλη θνητότητα μιας επικείμενης σοβαρής λοίμωξης ουροποιητικού από εξαιρετικά παθογόνο στέλεχος *E. coli*. Ο μηχανισμός πίσω από αυτό το πλεονέκτημα επιβίωσης ομοιάζει με αυτό της ανοχής επαγόμενης μέσω υποδοχέων TLR και εκφράζεται ως μείωση στην παραγωγή και απελευθέρωση

TNFα αλλά και ως περιορισμός στην ενεργοποίηση και ιστική διήθηση των ουδετεροφίλων. Το εν λόγω φαινόμενο οφείλουμε να το λάβουμε σοβαρά υπόψιν ως προς την ασφάλεια των ασθενών που λαμβάνουν αντιμικροβιακή θεραπεία για χρόνιες λοιμώξεις [158].

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός: Η αυξημένη επίπτωση της οστεομυελίτιδας σε ευπαθείς ομάδες, όπως οι πολυτραυματίες και οι ηλικιωμένοι μετά από επεμβάσεις αρθροπλαστικής, δημιουργεί το ερώτημα ποιά μπορεί να είναι η απόκριση των ασθενών αυτών σε επαναλοίμωξη από μικροοργανισμούς υψηλής παθογονικότητας, όπως τα νοσοκομειακά στελέχη.

Ζώα και μέθοδοι: Κόνικλοι Νέας Ζηλανδίας υποβλήθηκαν σε δύο χειρουργικές επεμβάσεις μέσα σε χρονικό διάστημα 3 εβδομάδων: εικονική οστεομυελίτιδα και εικονική πυελονεφρίτιδα (ομάδα **S**), εικονική οστεομυελίτιδα και πυελονεφρίτιδα από *Escherichia coli* (ομάδα **P**), οστεομυελίτιδα από *Staphylococcus aureus* και πυελονεφρίτιδα από *Escherichia coli* με ή χωρίς αντισταφυλοκοκκική θεραπεία (ομάδες **OP** και **ODP**). Η επιβίωση των ζώων μελετήθηκε καθημερινά για 14 ημέρες. Δείγματα περιφερικού αίματος συλλέχθηκαν προς απομόνωση και καλλιέργεια των μονοπυρήνων κυττάρων του περιφερικού αίματος (PBMCs). Την 14^η ημέρα τα ζώα θυσιάστηκαν και ελήφθησαν ιστικά τεμάχια προς μέτρηση της δραστικότητας της μυελοϋπεροξειδάσης ουδετεροφίλων (MPO) και της βακτηριακής ανάπτυξης στους ιστούς. Στα ζώα της ομάδας ODP χορηγήθηκε άπαξ νταλμπαβανσίνη προ της πρόκλησης πυελονεφρίτιδας. Επιπλέον PBMCs από υγιή ζώα επωάστηκαν *in vitro* με οστικό ομογενοποίημα με ή χωρίς την παρουσία *Staphylococcus aureus* και οι παραγόμενες κυτταροκίνες μετρήθηκαν.

Αποτελέσματα: Η θνητότητα των ζώων των ομάδων (S, P, OP) μετά την πρόκληση πυελονεφρίτιδας ήταν 0%, 50% και 8.3% αντιστοίχως. Η παραγωγή TNFα από τα διεγερμένα PBMCs ήταν σημαντικά μειωμένη στην ομάδα OP στις 48 ώρες μετά πυελονεφρίτιδας. Το ιστικό βακτηριακό φορτίο του *E. coli* ήταν παρόμοιο στις ομάδες P και OP. Η δραστικότητα της MPO της ομάδας OP ήταν μειωμένη. Ο παραγόμενος TNFα ήταν ακόμα πιο μειωμένος στα ζώα της ομάδας ODP, ενώ η δραστικότητα της MPO ήταν αυξημένη. Η παραγωγή TNFα μειωνόταν όταν PBMCs απομονωμένα από υγιή ζώα και επωασμένα με οστικό ομογενοποίημα, *S. aureus* (HKSA) ή και τα δύο διεγείρονταν μετέπειτα με *E. coli* (HKEC). Ακόμα περισσότερο μειωνόταν δε υπό την παρουσία αναστολέων των TLR υποδοχέων anti-TLR4 και anti-TLR9.

Συμπέρασμα: Η σταφυλοκοκκική οστεομυελίτιδα τροποποιεί την έμφυτη ανοσιακή απόκριση του ξενιστή παρέχοντάς του πλεονέκτημα επιβίωσης μετά από θανατηφόρο

λοίμωξη του ουροποιητικού από *E. Coli*. Ο πιθανός μηχανισμός φαίνεται να είναι η ενίσχυση της ανοσίας μέσω ρύθμισης των υποδοχέων TLR.

ΑΓΓΛΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Aim: The high incidence of osteomyelitis in vulnerable populations like those with multiple injuries or elderly undergoing joint arthroplasties generates the question what may be their responses to subsequent infection by high virulent isolates.

Methods: Rabbits were subject to two operations at three week intervals; sham osteomyelitis and sham pyelonephritis (group S); sham osteomyelitis and *Escherichia coli* pyelonephritis (group P); and *Staphylococcus aureus* osteomyelitis and *E. coli* pyelonephritis (group OP). Survival was recorded; cytokine stimulation by circulating mononuclear cells (PBMCs) and tissue myeloperoxidase (MPO) activity and bacterial growth were monitored. In some experiments, dalbavancin treatment was given before pyelonephritis. Healthy PBMCs were pre-treated with bone homogenate, *S. aureus* or both.

Results: Mortality of groups S, P and OP after induction of pyelonephritis was 0%, 50% and 8.3% respectively. TNF α production by PBMCs was significantly decreased in the OP group at 48 hours. Tissue bacterial load of *E. coli* was similar in groups P and OP at death or sacrifice whereas the MPO activity of group OP was decreased. Production of TNF α was further decreased among dalbavancin treated rabbits; in these rabbits tissue MPO was increased. TNF α production decreased when healthy PBMCs pre-treated with bone homogenate, *S. aureus* (HKSA) or both were stimulated with *E. coli* (HKEC); production was further decreased in the presence of anti-TLR4 and anti-TLR9.

Conclusion: It is concluded that staphylococcal osteomyelitis modulated the innate immune responses of the host leading to protection from death by highly virulent *E. coli*. Tolerance to TLR ligands is the most likely mechanism of action.

10. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Panteli M & Giannoudis PV. Chronic osteomyelitis: what the surgeon needs to know. *EFFORT Open Rev* 2016, 1: 128-35.
2. Nathwani D, Barlow GD, Ajdukiewicz K, Gray K, Morrison J, Clift B, et al. Cost-minimization analysis and audit of antibiotic management of bone and joint infections with ambulatory teicoplanin, in-patient care or outpatient oral linezolid therapy. *J Antimicrob Chemother* 2003, 51: 391-396.
3. Birt MC, Anderson DW, Toby EB, Wang J. Osteomyelitis: Recent advances in pathophysiology and therapeutic strategies. *J Orthop* 2017, 14: 45-52.
4. Lew DP & Waldvogel FA. Osteomyelitis. *Lancet* 2004, 364: 369-79.
5. Beck-Broichsitter BE, Smeets R, Heiland M. Current concepts in pathogenesis of acute and chronic osteomyelitis. *Curr Opin Infect Dis* 2015, 28: 240-5.
6. Buch K, Thuesen ACB, Brøns C, Schwarz P. Chronic non-bacterial osteomyelitis: a review. *Calcif Tissue Int* 2019, 104: 544–53.
7. Deogaonkar K, Ghandour A, Jones A, Ahuja S, Lyons K. Chronic recurrent multifocal osteomyelitis presenting as acute scoliosis: a case report and review of literature. *Eur Spine J* 2008, 17: 248–52.
8. Schierholz JM & Beuth J. Implant infections: a haven for opportunistic bacteria. *J Hosp Infect* 2001, 49: 87–93.
9. Kavanagh N, Ryan EJ, Widaa A, Sexton G, Fennell J, O'Rourke S, et al. Staphylococcal osteomyelitis: Disease progression, treatment challenges, and future directions. *Clin Microbiol Rev* 2018, 31: 84-117.
10. Thakolkaran N & Shetty AK. Acute hematogenous osteomyelitis in children. *Ochsner J* 2019, 19:116–22.
11. Strecker W, Russ M, Schulte M. [Hematogenous osteomyelitis in adults] *Orthopade* 2004, 33: 273–86.
12. Mandell JC, Khurana B, Smith JT, Czuczman GJ, Ghazikhanian V, Smith SE. Osteomyelitis of the lower extremity: pathophysiology, imaging, and classification, with an emphasis on diabetic foot infection. *Emerg Radiol* 2018, 25: 175–88.
13. Chen AT & Vallier HA. Noncontiguous and open fractures of the lower extremity: Epidemiology, complications, and unplanned procedures. *Injury* 2016, 47: 742–7.
14. Fernandes MC, Peres LR, Queiroz-Neto AC, Lima-Neto JQ, Turíbio FM, Matsumoto MH. Open fractures and the incidence of infection in the surgical debridement 6 hours after trauma. *Acta Ortopédica Bras* 2015, 23: 38–42.

15. Kamat AS. Infection rates in open fractures of the tibia: Is the 6-hour rule fact or fiction? *Adv Orthop* 2011, 2011:1–4.
16. Okike K & Bhattacharyya T. Trends in the management of open fractures. *J Bone Joint Surg Am* 2006, 88: 2739-48.
17. Kurtz SM, Lau E, Watson H, Schmier JK, Parvizi J. Economic burden of periprosthetic joint infection in the United States. *J Arthroplasty* 2012, 27: 61-5e1.
18. Lee J, Kang C-I, Lee JH, Joung M, Moon S, Wi YM, et al. Risk factors for treatment failure in patients with prosthetic joint infections. *J Hosp Infect* 2010, 75: 273–6.
19. Hatzenbuehler J & Pulling TJ. Diagnosis and management of osteomyelitis. *Am Fam Physician* 2011, 84: 1027-33.
20. Trampuz A & Zimmerli W. Antimicrobial agents in orthopaedic surgery: Prophylaxis and Treatment. *Drugs* 2006, 66: 1089–105.
21. Zimmerli W, Sendi P. Orthopaedic biofilm infections. *APMIS* 2017, 125:353–64.
22. Bernard L, Dinh A, Ghout I, Simo D, Zeller V, Issartel B, et al. Antibiotic treatment for 6 weeks versus 12 weeks in patients with pyogenic vertebral osteomyelitis: an open-label, non-inferiority, randomised, controlled trial. *Lancet* 2015, 385: 375-82.
23. Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-joint infections. *N Engl J Med* 2004, 351:1645–54.
24. Tiemann A, Hofmann GO, Krukemeyer MG, Krenn V, Langwald S. Histopathological Osteomyelitis Evaluation Score (HOES) - An innovative approach to histopathological diagnostics and scoring of osteomyelitis. *GMS Interdiscip Plast Reconstr Surg* 2014, 3: 08.
25. Glaudemans AWJM, Jutte PC, Cataldo MA, Cassar-Pullicino V, Gheysens O, Borens O, et al. Consensus document for the diagnosis of peripheral bone infection in adults: a joint paper by the EANM, EBJIS, and ESR (with ESCMID endorsement). *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2019, 46: 957-70.
26. Parvizi J, Tan TL, Goswami K, Higuera C, Della Valle C, Chen AF, et al. The 2018 definition of periprosthetic hip and knee infection: An evidence-based and validated criteria. *J Arthroplasty* 2018, 33:1309-14.
27. Gupta P, Sarkar S, Das B, Bhattacharjee S, Tribedi P. Biofilm, pathogenesis and prevention—a journey to break the wall: a review. *Arch Microbiol* 2016, 198:1–15.

28. Saeed K, McLaren AC, Schwarz EM, Antoci V, Arnold WV, Chen AF, et al. 2018 international consensus meeting on musculoskeletal infection: Summary from the biofilm workgroup and consensus on biofilm related musculoskeletal infections. *J Orthop Res* 2019, 37:1007–17.
29. Josse J, Velard F, Gangloff SC. Staphylococcus aureus vs. osteoblast: Relationship and consequences in osteomyelitis. *Front Cell Infect Microbiol* 2015, 26: e5.
30. Paharik AE, Horswill AR. The staphylococcal biofilm: Adhesins, regulation, and host response. *Microbiol Spectr* 2016, 4: e2.
31. Wright JA, Nair SP. Interaction of staphylococci with bone. *Int J Med Microbiol* 2010, 300: 193–204.
32. Seebach E & Kubatzky KF. Chronic implant-related bone infections—Can immune modulation be a therapeutic strategy? *Front Immunol* 2019, 10: 1724.
33. Zimmerli W, Sendi P. Pathogenesis of implant-associated infection: the role of the host. *Semin Immunopathol* 2011, 33: 295–306.
34. Feng G, Cheng Y, Wang S-Y, Borca-Tasciuc DA, Worobo RW, Moraru CI. Bacterial attachment and biofilm formation on surfaces are reduced by small-diameter nanoscale pores: how small is small enough? *Npj Biofilms Microbiomes* 2015, 1:15022.
35. Achinas S, Charalampogiannis N, Euverink GJW. A brief recap of microbial adhesion and biofilms. *Appl Sci* 2019, 9: 2801.
36. Arciola CR, Hänsch GM, Visai L, Testoni F, Maurer S, Campoccia D, et al. Interactions of staphylococci with osteoblasts and phagocytes in the pathogenesis of implant-associated osteomyelitis. *Int J Artif Organs* 2012, 35: 713–26.
37. Arciola CR, Campoccia D, Speziale P, Montanaro L, Costerton JW. Biofilm formation in Staphylococcus implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. *Biomaterials* 2012, 33: 5967–82.
38. Vasudevan R. Biofilms: Microbial cities of scientific significance. *J Microbiol Exp* 2014, 1: e3.
39. Stamou A, Venizelou ED, Stavropoulou M, Fotakopoulou N, Kapsimali V, Vrioni G. Characteristics of biofilms and their formation in biomedical devices. Vol 59: 7-21.
40. Brandt SL, Putnam NE, Cassat JE, Serezani CH. Innate immunity to *Staphylococcus aureus*: Evolving paradigms in soft tissue and invasive infections. *J Immunol* 2018, 200: 3871–80.

41. Arciola CR, Campoccia D, Montanaro L. Implant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion. *Nat Rev Microbiol* 2018, 16: 397–409.
42. Leid JG, Shirtliff ME, Costerton JW, Stoodley AP. Human leukocytes adhere to, penetrate, and respond to *Staphylococcus aureus* biofilms. *Infect Immun* 2002, 70: 6339–45.
43. Stroh P, Günther F, Meyle E, Prior B, Wagner C, Hänsch GM. Host defence against *Staphylococcus aureus* biofilms by polymorphonuclear neutrophils: Oxygen radical production but not phagocytosis depends on opsonisation with immunoglobulin G. *Immunobiology* 2011, 216: 351–7.
44. Meyle E, Brenner-Weiss G, Obst U, Prior B, Hänsch GM. Immune defense against *S. epidermidis* biofilms: Components of the extracellular polymeric substance activate distinct bactericidal mechanisms of phagocytic cells. *Int J Artif Organs* 2012, 35: 700–12.
45. Meyle E, Stroh P, Günther F, Hoppy-Tichy T, Wagner C, Hänsch GM. Destruction of bacterial biofilms by polymorphonuclear neutrophils: Relative contribution of phagocytosis, DNA release, and degranulation. *Int J Artif Organs* 2010, 33: 608–20.
46. Vuong C, Voyich JM, Fischer ER, Braughton KR, Whitney AR, DeLeo FR, et al. Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. *Cell Microbiol* 2004, 6: 269–75.
47. Vuong C, Kocianova S, Voyich JM, Yao Y, Fischer ER, DeLeo FR, et al. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J Biol Chem* 2004, 279: 54881–6.
48. Foster TJ. Immune evasion by staphylococci. *Nat Rev Microbiol* 2005, 3: 948–58.
49. Kubica M, Guzik K, Koziel J, Zarebski M, Richter W, Gajkowska B, et al. A potential new pathway for *Staphylococcus aureus* dissemination: The silent survival of *S. aureus* phagocytosed by human monocyte-derived macrophages. *PLoS ONE* 2008, 3: e1409.
50. Thurlow LR, Hanke ML, Fritz T, Angle A, Aldrich A, Williams SH, et al. *Staphylococcus aureus* biofilms prevent macrophage phagocytosis and attenuate inflammation in vivo. *J Immunol* 2011, 186: 6585–96.
51. Liu GY, Essex A, Buchanan JT, Datta V, Hoffman HM, Bastian JF, et al. *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. *J Exp Med* 2005, 202: 209–15.

52. Spiliopoulou AI, Kolonitsiou F, Krevvata MI, Leontsinidis M, Wilkinson TS, Mack D, et al. Bacterial adhesion, intracellular survival and cytokine induction upon stimulation of mononuclear cells with planktonic or biofilm phase *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Microbiol Lett* 2012, 330: 56–65.
53. Raggatt LJ & Partridge NC. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J Biol Chem* 2010, 285: 25103-8.
54. Wright JA & Nair SP. Interaction of staphylococci with bone. *Int J Med Microbiol* 2010, 300: 193-204.
55. Löffler B, Tuchscher L, Niemann S, Peters G. *Staphylococcus aureus* persistence in non-professional phagocytes. *Int J Med Microbiol* 2014, 304: 170-6.
56. de Mesy Bentley KL, Trombetta R, Nishitani K, Bello-Irizarry SN, Ninomiya M, Zhang L, et al. Evidence of *Staphylococcus aureus* deformation, proliferation, and migration in canaliculi of live cortical bone in murine models of osteomyelitis. *J Bone Miner Res* 2017, 32: 985-90.
57. Busscher HJ, van der Mei HC, Subbiahdoss G, Jutte PC, van den Dungen JJ, Zaat SA, et al. Biomaterial-associated infection: locating the finish line in the race for the surface. *Sci Transl Med* 2012, 4: 153rv10.
58. Proctor RA, von Eiff C, Kahl BC, Becker K, McNamara P, Herrmann M, et al. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat Rev Microbiol* 2006, 4: 295-305.
59. Nishitani K, Sutipornpalangkul W, de Mesy Bentley KL, Varrone JJ, Bello-Irizarry SN, Ito H, et al. Quantifying the natural history of biofilm formation in vivo during the establishment of chronic implant-associated *Staphylococcus aureus* osteomyelitis in mice to identify critical pathogen and host factors. *J Orthop Res* 2015, 33:1311-9.
60. Watters C, Fleming D, Bishop D, Rumbaugh KP. Host responses to biofilm. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2016, 142: 193-239.
61. Yamada KJ & Kielian T. Biofilm-leukocyte cross-talk: Impact on immune polarization and immunometabolism. *J Innate Immun* 2019, 11: 280-88.
62. Scherr TD, Hanke ML, Huang O, James DB, Horswill AR, Bayles KW, et al. *Staphylococcus aureus* biofilms induce macrophage dysfunction through leukocidin AB and alpha-toxin. *mBio* 2015, e6.

63. Zhou H, Coveney AP, Wu M, Huang J, Blankson S, Zhao H, et al. Activation of both TLR and NOD signaling confers host innate immunity-mediated protection against microbial infection. *Front Immunol* 2019, 9: 3082.
64. Silk E, Zhao H, Weng H, Ma D. The role of extracellular histones in organ injury. *Cell Death Dis* 2017, 8: e2812.
65. Montanaro L, Poggi A, Visai L, Ravaioli S, Campoccia D, Speziale P, et al. Extracellular DNA in biofilms. *Int J Artif Organs* 2011, 34: 824-31.
66. Lewenza S. Extracellular DNA-induced antimicrobial peptide resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol* 2013, 4: 21.
67. Wagner C, Kaksa A, Müller W, Deneffle B, Heppert V, Wentzensen A, et al. Polymorphonuclear neutrophils in posttraumatic osteomyelitis: cells recovered from the inflamed site lack chemotactic activity but generate superoxides. *Shock* 2004, 22: 108-15.
68. Wagner C, Kondella K, Bernschneider T, Heppert V, Wentzensen A, Hänsch GM. Post-traumatic osteomyelitis: analysis of inflammatory cells recruited into the site of infection. *Shock* 2003, 20: 503-10.
69. van Kessel KP, Bestebroer J, van Strijp JA. Neutrophil-mediated phagocytosis of *Staphylococcus aureus*. *Front Immunol* 2014, 5: 467.
70. Günther F, Wabnitz GH, Stroh P, Prior B, Obst U, Samstag Y, et al. Host defence against *Staphylococcus aureus* biofilms infection: phagocytosis of biofilms by polymorphonuclear neutrophils (PMN). *Mol Immunol* 2009, 46: 1805-13.
71. Scherr TD, Roux CM, Hanke ML, Angle A, Dunman PM, Kielian T. Global transcriptome analysis of *Staphylococcus aureus* biofilms in response to innate immune cells. *Infect Immun* 2013, 81: 4363-76.
72. Ricciardi BF, Muthukrishnan G, Masters E, Ninomiya M, Lee CC, Schwarz EM. *Staphylococcus aureus* evasion of host immunity in the setting of prosthetic joint infection: Biofilm and beyond. *Curr Rev Musculoskelet Med* 2018, 11: 389-400.
73. Benoit M, Desnues B, Mege JL. Macrophage polarization in bacterial infections. *J Immunol* 2008, 181: 3733-9.
74. Gabilovich DI & Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2009, 9: 162-74.
75. Veglia F, Perego M, Gabilovich D. Myeloid-derived suppressor cells coming of age. *Nat Immunol* 2018, 19: 108-119.

76. Heim CE, Vidlak D, Scherr TD, Kozel JA, Holzapfel M, Muirhead DE, et al. Myeloid-derived suppressor cells contribute to *Staphylococcus aureus* orthopedic biofilm infection. *J Immunol* 2014, 192: 3778-92.
77. Heim CE, Vidlak D, Odvody J, Hartman CW, Garvin KL, Kielian T. Human prosthetic joint infections are associated with myeloid-derived suppressor cells (MDSCs): Implications for infection persistence. *J Orthop Res* 2018, 36: 1605-13.
78. Heim CE, Vidlak D, Scherr TD, Hartman CW, Garvin KL, Kielian T. IL-12 promotes myeloid-derived suppressor cell recruitment and bacterial persistence during *Staphylococcus aureus* orthopedic implant infection. *J Immunol* 2015, 194: 3861-72.
79. Heim CE, Vidlak D, Kielian T. Interleukin-10 production by myeloid-derived suppressor cells contributes to bacterial persistence during *Staphylococcus aureus* orthopedic biofilm infection. *J Leukoc Biol* 2015, 98: 1003-13.
80. Magryś A, Paluch-Oleś J, Bogut A, Kielbus M, Plewik D, Koziol-Montewka M. The role of programmed death ligand 1 pathway in persistent biomaterial-associated infections. *J Microbiol* 2015, 53: 544-52.
81. Ortega-Gómez A, Perretti M, Soehnlein O. Resolution of inflammation: an integrated view. *EMBO Mol Med* 2013, 5: 661-74.
82. Wherry EJ & Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol* 2015, 15: 486-99.
83. Paluch C, Santos AM, Anzilotti C, Cornall RJ, Davis SJ. Immune checkpoints as therapeutic targets in autoimmunity. *Front Immunol* 2018, 9: 2306.
84. Kubatzky KF, Uhle F, Eigenbrod T. From macrophage to osteoclast - How metabolism determines function and activity. *Cytokine* 2018, 112: 102-15.
85. Josse J, Velard F, Gangloff SC. *Staphylococcus aureus* vs. osteoblast: Relationship and consequences in osteomyelitis. *Front Cell Infect Microbiol* 2015, 5: 85.
86. Dapunt U, Giese T, Stegmaier S, Moghaddam A, Hänsch GM. The osteoblast as an inflammatory cell: production of cytokines in response to bacteria and components of bacterial biofilms. *BMC Musculoskelet Disord* 2016, 17: 243.
87. Dapunt U, Maurer S, Giese T, Gaida MM, Hänsch GM. The macrophage inflammatory proteins MIP1 α (CCL3) and MIP2 α (CXCL2) in implant-associated osteomyelitis: linking inflammation to bone degradation. *Mediators Inflamm* 2014, 2014: e728619.

88. Marriott I. Apoptosis-associated uncoupling of bone formation and resorption in osteomyelitis. *Front Cell Infect Microbiol* 2013, 3: 101.
89. Blanchette KA, Prabhakara R, Shirliff ME, Wenke JC. Inhibition of fracture healing in the presence of contamination by *Staphylococcus aureus*: Effects of growth state and immune response. *J Orthop Res* 2017, 35: 1845-54.
90. Bruder SP, Fink DJ, Caplan AI. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J Cell Biochem* 1994, 56: 283-94.
91. Bunnell BA, Betancourt AM, Sullivan DE. New concepts on the immune modulation mediated by mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* 2010, 1: 34.
92. Seebach E, Holschbach J, Buchta N, Bitsch RG, Kleinschmidt K, Richter W. Mesenchymal stromal cell implantation for stimulation of long bone healing aggravates *Staphylococcus aureus* induced osteomyelitis. *Acta Biomater* 2015, 21: 165-77.
93. Charles JF, Aliprantis AO. Osteoclasts: more than 'bone eaters'. *Trends Mol Med* 2014, 20: 449-59.
94. Takayanagi H. New immune connections in osteoclast formation. *Ann N Y Acad Sci* 2010, 1192: 117-23.
95. Kotake S, Udagawa N, Hakoda M, Mogi M, Yano K, Tsuda E, et al. Activated human T cells directly induce osteoclastogenesis from human monocytes: possible role of T cells in bone destruction in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum* 2001, 44: 1003-12.
96. Sato K, Suematsu A, Okamoto K, Yamaguchi A, Morishita Y, Kadono Y, et al. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med* 2006, 203: 2673-82.
97. Takayanagi H, Ogasawara K, Hida S, Chiba T, Murata S, Sato K, et al. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma. *Nature* 2000, 408: 600-5.
98. Bozec A & Zaiss MM. T regulatory cells in bone remodelling. *Curr Osteoporos Rep* 2017, 15: 121-5.
99. Zaiss MM, Axmann R, Zwerina J, Polzer K, Gückel E, Skapenko A, et al. Treg cells suppress osteoclast formation: a new link between the immune system and bone. *Arthritis Rheum* 2007, 56: 4104-12.

100. Li H, Hong S, Qian J, Zheng Y, Yang J, Yi Q. Cross talk between the bone and immune systems: osteoclasts function as antigen-presenting cells and activate CD4+ and CD8+ T cells. *Blood* 2010, 116: 210-7.
101. Grassi F, Manferdini C, Cattini L, Piacentini A, Gabusi E, Facchini A, et al. T cell suppression by osteoclasts in vitro. *J Cell Physiol* 2011, 226: 982-90.
102. Li H, Lu Y, Qian J, Zheng Y, Zhang M, Bi E, et al. Human osteoclasts are inducible immunosuppressive cells in response to T cell-derived IFN- γ and CD40 ligand in vitro. *J Bone Miner Res* 2014, 29: 2666-75.
103. Buchwald ZS & Aurora R. Osteoclasts and CD8 T cells form a negative feedback loop that contributes to homeostasis of both the skeletal and immune systems. *Clin Dev Immunol* 2013, 2013: e429373.
104. Charles JF, Hsu LY, Niemi EC, Weiss A, Aliprantis AO, Nakamura MC. Inflammatory arthritis increases mouse osteoclast precursors with myeloid suppressor function. *J Clin Invest* 2012, 122: 4592-605.
105. Pennock ND, White JT, Cross EW, Cheney EE, Tamburini BA, Kedl RM. T cell responses: naive to memory and everything in between. *Adv Physiol Educ* 2013, 37: 273-83.
106. Dapunt U, Giese T, Prior B, Gaida MM, Hansch GM. Infectious versus non-infectious loosening of implants: activation of T lymphocytes differentiates between the two entities. *Int Orthop* 2014, 38: 1291-6.
107. Kumar G, Roger PM, Ticchioni M, Trojani C, Bernard de Dompsur R, Bronsard N, et al. T cells from chronic bone infection show reduced proliferation and a high proportion of CD28(-) CD4 T cells. *Clin Exp Immunol* 2014, 176: 49-57.
108. Kotsougiani D, Pioch M, Prior B, Heppert V, Hansch GM, Wagner C. Activation of T lymphocytes in response to persistent bacterial infection: induction of CD11b and of toll-like receptors on T cells. *Int J Inflam* 2010, 2010: e526740.
109. Wagner C, Heck D, Lautenschlager K, Iking-Konert C, Heppert V, Wentzensen A, et al. T lymphocytes in implant-associated posttraumatic osteomyelitis: identification of cytotoxic T effector cells at the site of infection. *Shock* 2006, 25: 241-6.
110. Rochford ETJ, Sabate-Bresco M, Zeiter S, Kluge K, Poulsson A, Ziegler M, et al. Monitoring immune responses in a mouse model of fracture fixation with and without *Staphylococcus aureus* osteomyelitis. *Bone* 2016, 83: 82-92.

111. Prabhakara R, Harro JM, Leid JG, Harris M, Shirliff ME. Murine immune response to a chronic *Staphylococcus aureus* biofilm infection. *Infect Immun* 2011, 79: 1789–96.
112. Prabhakara R, Harro JM, Leid JG, Keegan AD, Prior ML, Shirliff ME. Suppression of the inflammatory immune response prevents the development of chronic biofilm infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 2011, 79: 5010–8.
113. Heim CE, West SC, Ali H, Kielian T. Heterogeneity of Ly6G(+) Ly6C(+) myeloid-derived suppressor cell infiltrates during *Staphylococcus aureus* biofilm infection. *Infect Immun* 2018, 86: 684–18.
114. Hanson EM, Clements VK, Sinha P, Ilkovitch D, Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-derived suppressor cells down-regulate L-selectin expression on CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol* 2009, 183: 937-44.
115. Müller I, Munder M, Kropf P, Hänsch GM. Polymorphonuclear neutrophils and T lymphocytes: strange bedfellows or brothers in arms? *Trends Immunol* 2009, 30: 522-30.
116. Brady RA, Mocca CP, Plaut RD, Takeda K, Burns DL. Comparison of the immune response during acute and chronic *Staphylococcus aureus* infection. *PLoS One* 2018, 13: e0195342.
117. Balraadjsing PP, de Jong EC, Grijpma DW, Tanck MW, Zaat SA. Poly(trimethylene carbonate) and poly(D,L-lactic acid) modify human dendritic cell responses to staphylococci but do not affect Th1 and Th2 cell development. *Eur Cell Mater* 2018, 35: 103-16.
118. Nishitani K, Ishikawa M, de Mesy Bentley K, Ito H, Matsuda S, Daiss J, et al. Evidence of *Staphylococcus epidermidis* biofilm infection in the absence of abscess formation or osteolysis in a murine implant-associated osteomyelitis model. *Orthopaed Proc* 2018, 100-B: 56.
119. Xiao J, Zhu F, Liu X, Xiong J. Th1/Th2/Th17/Treg expression in cultured PBMCs with antiphospholipid antibodies. *Mol Med Rep* 2012, 6: 1035-9.
120. Anderson AC, Joller N, Kuchroo VK. Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory receptors with specialized functions in immune regulation. *Immunity* 2016, 44: 989-1004.
121. Wherry EJ & Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol* 2015, 15: 486-99.

122. van Griensven M. Cytokines as biomarkers in polytraumatized patients. *Unfallchirurg* 2014, 117:699-702.
123. van Asten SAV, Nichols A, La Fontaine J, Bhavan K, Peters EJG, Lavery LA. The value of inflammatory markers to diagnose and monitor diabetic foot osteomyelitis. *Int Wound J* 2015, 14: 40-45.
124. Zenobia C & Hajishengallis G. Basic biology and role of interleukin-17 in immunity and inflammation. *Periodontol 2000* 2015, 69: 142-59.
125. Uhle F, Nouland Dv, Little S, Menges T, Weiterer S, Szalay G, et al. Plasmatic isoforms of cytokeratin 18 and RAGE after severe trauma: a longitudinal cohort study. *J Trauma Acute Care Surg* 2014, 77: 577-84.
126. Grealy R, White M, Stordeur P, Kelleher D, Doherty DG, McManus R, et al. Characterising cytokine gene expression signatures in patients with severe sepsis. *Mediators Inflamm* 2013, 2013: 164246.
127. Kim B, Lee Y, Kim E, Kwak A, Ryoo S, Bae SH, et al. The Interleukin-1 α precursor is biologically active and is likely a key alarmin in the IL-1 family of cytokines. *Front Immunol* 2013, 4: 39.
128. Raymond SL, Holden DC, Mira JC, Stortz JA, Loftus TJ, Mohr AM, et al. Microbial recognition and danger signals in sepsis and trauma. *Biochim Biophys Acta* 2017, pii: S0925-4439(17)30026-1.
129. Rochford TJ, Bresc o MS, Zeiter S, Kluge K, Poulsson A, Ziegler M, et al. Monitoring immune responses in a mouse model of fracture fixation with and without *Staphylococcus aureus* osteomyelitis. *Bone* 2016, 82-92.
130. Brumann M, Matz M, Kusmenkov T, Stegmaier J, Biberthaler P, Kanz KG, et al. Impact of STAT/SOCS mRNA expression levels after major injury. *Mediators Inflamm* 2014, 2014: 749175.
131. Leliefeld PH, Wessels CM, Leenen LP, Koenderman L, Pillay J. The role of neutrophils in immune dysfunction during severe inflammation. *Crit Care* 2016, 20: 73.
132. Molofsky AB, Savage A, Locksley RM. Interleukin-33 in tissue homeostasis, injury and inflammation. *Immunity* 2015, 42: 1005-19.
133. Luan YY, Yao RQ, Tong S, Dong N, Sheng ZY, Yao YM. Effect of tumor necrosis factor- α induced protein 8 like-2 on immune function of dendritic cells in mice following acute insults. *Oncotarget* 2016, 7: 30178-92.

134. Safra N, Hitchens PL, Maverakis E, Mitra A, Korff C, Johnson E, et al. Serum levels of innate immunity cytokines are elevated in dogs with metaphyseal osteopathy (hypertrophic osteodytrophy) during active disease and remission. *Vet Immunol Immunopathol* 2016, 179: 32-5.
135. De Lalla F, Pellizzer G, Strazzabosco M, Martini Z, Jardin GD, Lora L, et al. Randomized prospective controlled trial of recombinant granulocyte colony-stimulating factor as adjunctive therapy for limb-threatening diabetic foot infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2001, 45: 1094-8.
136. Gratz S, Rennen HJ, Boerman OC, Oyen WJ, Burma P, Corstens FH. (99m)Tc-interleukin-8 for imaging acute osteomyelitis. *J Nucl Med* 2001, 42: 1257-64.
137. Fullilove S, Jellis J, Hughes SP, Remick DG, Friedland JS. Local and systemic concentrations of tumour necrosis factor-alpha, interleukin-6 and interleukin-8 in bacterial osteomyelitis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000, 94: 221-4.
138. Krishna S & Miller LS. Innate and adaptive immune responses against *Staphylococcus aureus* skin infections. *Semin Immunopathol* 2012, 34: 261-80.
139. Yin H, Li X, Hu S, Liu T, Yuan B, Ni Q, et al. IL-33 promotes *Staphylococcus aureus*-infected wound healing in mice. *Int Immunopharmacol* 2013, 17: 432-8.
140. Verri WA Jr, Guerrero AT, Fukada SY, Valerio DA, Cunha TM, Xu D, et al. IL-33 mediates antigen-induced cutaneous and articular hypernociception in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, 105:2723-8.
141. Syed AK, Reed TJ, Clark KL, Bolew BR, Kahlenberg M. *Staphylococcus aureus* phenol-soluble modulins stimulate the release of proinflammatory cytokines from keratinocytes and are required for induction of skin inflammation. *Infect Immunol* 2015, 83: 3428-37.
142. Mao QF, Shang-Guan ZF, Chen HL, Huang K. Immunoregulatory role of IL-2/STAT5/CD4+CD25+Foxp3 Treg pathway in the pathogenesis of chronic osteomyelitis. *Ann Transl Med* 2019, 7: 384.
143. Sarray S & Almawi WY. Contribution of reduced interleukin-10 levels to the pathogenesis of osteomyelitis in children with sickle cell disease. *Clin Vaccine Immunol* 2015, 22: 1020-4.
144. Tissi L, Bistoni F, Puliti M. IL-4 deficiency decreases mortality but increases severity of arthritis in experimental group B *Streptococcus* infection. *Mediators Inflamm* 2009, 2009: 394021.

145. Wang P, Liu X, Xu P, Lu J, Wang R, Mu W. Decorin reduces hypertrophic scarring through inhibition of the TGF- β 1/Smad signaling pathway in a rat osteomyelitis model. *Exp Ther Med* 2016, 12: 2102-8.
146. Maffulli N, Papalia R, Zampogna B, Torre G, Albo E, Denaro V. The management of osteomyelitis in the adult. *Surgeon* 2016, 14: 345-60.
147. Metsemakers WJ, Kuehl R, Moriarty TF, Richards RG, Verhofstad MHJ, Borens O, et al. Infection after fracture fixation: current surgical and microbiological concepts. *Injury* 2018, 49: 511-22.
148. Hung DZ, Tien N, Lin CL, Lee YR, Wang CCN, Chen JJ, et al. Increased risk of chronic osteomyelitis after hip replacement: a retrospective population-based cohort study in an Asian population. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2017, 36: 611-17.
149. Ahmed AI, Soliman RA, Samir S. Cell free DNA and procalcitonin as early markers of complications in ICU patients with multiple trauma and major surgery. *Clin Lab* 2016, 62: 2395-404.
150. Chou SE, Rau CS, Tsai YC, Hsu SY, Hsieh HY, Hsieh CH. Risk factors and complications contributing to mortality in elderly patients with fall-induced femoral fracture: A cross-sectional analysis based on trauma registry data of 2,407 patients. *Int J Surg* 2019, 66: 48-52.
151. Chousterman BG, Swirski FK, Weber GF. Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. *Semin Immunopathol* 2017, 39: 517-28.
152. Dai R, Cowan C, Heid B, Khan D, Lian Z, Pham CTN, et al. Neutrophils and neutrophil serine proteases are increased in the spleens of estrogen-treated C57BL/6 mice and several strains of spontaneous lupus-prone mice. *PLoS One* 2017, 12: e0172105.
153. Cavillon JM, Adib-Conquy M. Bench-to-bedside review: endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. *Crit Care* 2006, 10: 233.
154. Kopanakis K, Tzepi IM, Pistiki A, Carrer DP, Netea MG, Georgitsi M, et al. Pre-treatment with low dose endotoxin prolongs survival from experimental lethal endotoxic shock: benefit for lethal peritonitis by *Escherichia coli*. *Cytokine* 2013, 62: 382-88.
155. Günther J, Petzl W, Zerbe H, Schuberth HJ, Seyfert HM. TLR ligands, but not modulators of histone modifiers, can induce the complex immune response pattern of endotoxin tolerance in mammary epithelial cells. *Innate Immun* 2017, 23: 155-64.

156. Huggings MA, Sjaastad FV, Pierson M, Kucaba TA, Swanson W, Staley C, et al. Microbial exposure enhances immunity to pathogens recognized by TLR2 but increase susceptibility to cytokine storm through TLR4 sensitization. *Cell Rep* 2019, 28: 1729-43.
157. Silk E, Zhao H, Weng H, Ma D. The role of extracellular histones in organ injury. *Cell Death Dis* 2017, 8: e2812.
158. Allison GM, Muldoon EG, Kent DM, Paulus JK, Ruthazer R, Ren A, et al. Prediction model for 30-day hospital readmissions among patients discharged receiving outpatient parenteral antibiotic therapy. *Clin Infect Dis* 2014, 58: 812-9.
159. Mader JT. Animal models of osteomyelitis. *Am J Med* 1985, 28: 213-7.
160. Kanellakopoulou K, Galanopoulos I, Soranoglou V, Tsaganos T, Tziortzioti V, Maris I, et al. Treatment of experimental osteomyelitis by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a synthetic carrier of calcium sulphate (Stimulan®) releasing moxifloxacin. *Int J Antimicrob Agents* 2009, 33: 354-9.
161. Kanellakopoulou K, Thivaos GC, Kolia M, Dontas I, Nakopoulou L, Dounis E, et al. Local treatment of experimental *Pseudomonas aeruginosa* osteomyelitis with a biodegradable dilactide polymer releasing ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 2008, 52: 2335-9.
162. Kussmann M, Obermueller M, Berndl F, Reischer V, Veletzky L, Burgmann H, et al. Dalbavancin for treatment of implant-related methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* osteomyelitis in an experimental rat model. *Sci Rep* 2018, 8: 9661.
163. Giamarellos-Bourboulis EJ, Adamis T, Laoutaris G, Sabracos L, Kousoulas V, Mouktaroudi M, et al. Immunomodulatory clarithromycin treatment of experimental sepsis and acute pyelonephritis caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004, 48: 93-9.
164. Giamarellos-Bourboulis EJ, Baziaka F, Antonopoulou A, Koutoukas P, Kousoulas V, Sabracos L, et al. Clarithromycin co-administered with amikacin attenuates systemic inflammation in experimental sepsis by *Escherichia coli*. *Int J Antimicrob Agents* 2005, 25: 168-72.
165. Dimopoulos G, Theodorakopoulou M, Armaganidis A, Tzepi IM, Lignos M, Giamarellos-Bourboulis EJ, et al. Esmolol: immunomodulator in pyelonephritis by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Surg Res* 2015, 198: 175-84.
166. Katsaris MP, Adamis T, Pistiki A, Carrer DP, Galani I, Sabracos L, et al. Immunomodulatory intervention with interferon- γ in *Escherichia coli* pyelonephritis. *J Urol* 2014, 192: 600-6.

167. Kyriazopoulou E, Leventogiannis K, Norrby-Teglund A, Dimopoulos G, Pantazi A, Orfanos SE, et al. Macrophage activation-like syndrome: an immunological entity associated with rapid progression to death in sepsis. *BMC Med* 2017, 15: 172.
168. Tobulic S, Forstner C, Burgmann H, Lagler H, Steininger C, Traby L, et al. Real-world experience with dalbavancin therapy in gram-positive skin and soft tissue infection, bone and joint infection. *Infection* 2019, 6: 1013-20.