

STRESZCZENIA

Streszczenie w języku polskim

Wstęp: Zakażenia dróg moczowych (ZUM) są w populacji ludzkiej poważnym problemem zdrowotnym ze względu na ich przewlekły i nawracający charakter. Bakterie wywołujące ZUM tworzą wielogatunkowe biofilmy, które są odporne na działanie konwencjonalnie stosowanych antybiotyków. Z uwagi na stale rosnącą liczbę bakterii wielolekoopornych, prowadzone są poszukiwania związków pochodzenia roślinnego o przeciwbakteryjnym mechanizmie działania. Jedną z takich grup stanowią triterpeny pentacykliczne (TP) charakteryzujące się szerokim spektrum właściwości leczniczych. Należące do tej grupy kwas azjatykowy (AA) i kwas ursolowy (UA), wykazują różnorodności biologiczne, w tym działanie przeciwdrobnoustrojowe. W dostępnej literaturze z ostatnich kilkunastu lat, stosunkowo niewiele wyników badań dotyczy wpływu AA i UA na formy planktonowe i biofilmowe bakterii chorobotwórczych dla człowieka.

Cel pracy: Niniejsza praca doktorska miała na celu szersze zrozumienie działania AA i UA na uropatogenne pałeczki Gram-ujemne (*Escherichia coli* CFT073, *Enterobacter cloacae* ATCC-BAA 2468 i *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25000), zarówno na ich formy planktonowe, jak i na tworzone przez nie biofilmy, również wielogatunkowe. Cel zrealizowano, określając wpływ AA i UA na przeżywalność, zdolność do tworzenia masy biofilmowej oraz aktywność metaboliczną bakterii żyjących w konsorcjach jedno-, dwu- i trzygatunkowych, a także ich wpływ na morfologię komórek bakteryjnych.

Materiały: Szczepy referencyjne wyizolowane z moczu, pochodzące z kolekcji ATCC: *E. coli* CFT 073, *E. cloacae* ATCC-BAA 2468, *P. aeruginosa* ATCC 25000. AA i UA zakupione w firmie Sigma-Aldrich.

Metody: Przeżywalność bakterii ustalono stosując test seryjnych rozcieńczeń. Do oznaczenia ilości wytworzonej biomasy oraz aktywności metabolicznej wykorzystano metody spektrofotometryczne (z użyciem CV i TTC). Obserwację zmian w morfologii komórek bakteryjnych przeprowadzono techniką mikroskopową.

Wyniki: Stwierdzono występowanie antagonistycznych oddziaływań pomiędzy badanymi bakteriami, rosnącymi w biofilmach wielogatunkowych. Następnie wyznaczono wartości MIC oraz MBC dla AA i UA wobec poszczególnych szczepów. Wykazano, że obecność AA i UA w sposób istotny statystycznie wpływa na przeżywalność, ilość masy biofilmowej, aktywność metaboliczną oraz morfologię pałeczek w biofilmach jedno- jak i wielogatunkowych oraz na

występowanie stosunków antagonistycznych między badanymi szczepami. Pod wpływem działania AA i UA zaobserwowano zmniejszenie liczebności komórek bakteryjnych, osłabienie zdolności do tworzenia biomasy i zmniejszenie aktywności metabolicznej w biofilmach jedno-, dwu- i trzygatunkowych, a także zmiany w morfologii komórek bakteryjnych. Analiza porównawcza wszystkich uzyskanych wyników pozwala stwierdzić, że silniejsze działanie bakteriobójcze i antybiofilmowe wykazał AA, natomiast większą redukcję aktywności metabolicznej powodował UA.

Wnioski: W związku z tym, że AA i UA najlepiej działały przeciwko młodym biofilmom, stosowanie preparatów zawierających TP, zwłaszcza w początkowych stadiach infekcji, wydaje się uzasadnione i prawdopodobnie mogłoby stanowić alternatywną strategię dla antybiotykoterapii na tym etapie. Potrzebne są jednak dalsze badania dotyczące AA i UA, zwłaszcza w odniesieniu do mechanizmu ich antibakteryjnego działania. Wyniki badań przeprowadzonych w niniejszej pracy doktorskiej wskazują, że w dłuższej perspektywie AA i UA mogłyby być stosowane w profilaktyce i leczeniu zakażeń bakteryjnych.

Streszczenie w języku angielskim (*Summary*)

Introduction: Urinary tract infections (UTIs) are a severe health problem in the human population due to their chronic and recurrent nature. Bacteria causing UTIs form multispecies biofilms being resistant to the activity of the conventionally used antibiotics. Due to the ever-increasing number of multidrug-resistant bacteria, research concerning plant-derived compounds with antimicrobial mechanisms of action is being conducted. Pentacyclic triterpenes (TPs), which have a broad spectrum of medicinal properties, are one of such groups. Asiatic acid (AA) and ursolic acid (UA) belong to this group, and exhibit diverse biological action, including antimicrobial activity. In available literature over the past several years, relatively few results of the research concern the influence of AA and AU on planktonic and biofilm forms of pathogenic bacteria.

Aims: Therefore, this doctoral thesis aimed at a broader understanding of the activity of AA and UA against uropathogenic gram-negative rods: *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas aeruginosa* living both form planktonic as well as a biofilm (also multispecies biofilms). The influence of AA and UA on the survival, biofilm mass formation by bacteria living in mono-, dual-, and triple-species consortia as well as the metabolic activity and bacterial cell morphology were determined.

Materials: Reference strains isolated from urine were purchased from ATCC: *E. coli* CFT 073, *E. cloacae* ATCC-BAA 2468, and *P. aeruginosa* ATCC 25000. AA and UA were purchased from Sigma-Aldrich.

Methods: The survival of bacteria was established using the serial dilution assay. The spectrophotometric methods (with CV and TTC) were applied for biofilm mass synthesis and metabolic activity determination. The changes in bacterial cell morphology were observed using the microscopic technique.

Results: The occurrence of antagonistic interactions between studied bacteria growing in multispecies biofilms was found. Then, the MIC and MBC values of AA and UA for tested strains were determined. It has been shown that AA and UA statistically significant influences survivance, biofilm mass formation, metabolic activity and cell morphology in single- and multispecies biofilms, and the presence of antagonistic relations between tested strains. After incubation of bacteria in the presence of AA and UA, the reduction of bacterial cell number, weakening of the ability to form biofilms and reduction of metabolic activity in single-, dual-, and triple-species consortia, as well as changes in the morphology of bacterial cells were noticed. A comparative analysis of all obtained results demonstrates that AA showed a stronger bactericidal and antibiofilm activities, while UA caused a significant reduction of metabolic activity.

Conclusions: The activity of AA and UA is the best against young biofilms, therefore the use of TP-containing formulations, especially during the initial stages of infection, seems to be reasonable and probably could constitute an alternative strategy to antibiotic therapy at this stage. However, there is a need for further research concerning AA and UA, especially regarding their antibacterial mechanisms of action. The results of the research carried out by this doctoral dissertation indicate that, in the long run, AA and UA can be used in the prevention and treatment of bacterial infectious diseases.