

VII. Streszczenie w języku polskim

Pomimo rozległej wiedzy na temat gronkowców, *Staphylococcus aureus* jest nadal jednym z najczęstszych patogenów odpowiedzialnych za rozwój zakażeń szpitalnych i pozaszpitalnych u ludzi. Zakażenia gronkowcowe obejmują szeroki zakres zmian patologicznych – od miejscowych infekcji skóry i tkanek miękkich aż po choroby zagrażające życiu, takie jak bakteremia i sepsa. Sukces *S. aureus* jako patogenu opiera się na wykorzystaniu licznych czynników wirulencji ważnych dla przebiegu infekcji oraz zdolności tych bakterii do tworzenia biofilmów na powierzchniach abiotycznych (np. biomateriałach medycznych) czy w zainfekowanych tkankach. Dzięki temu drobnoustroje te z łatwością unikają mechanizmów obronnych gospodarza oraz zyskują ochronę przed niekorzystnymi warunkami środowiskowymi, w tym ukierunkowanym działaniem środków przeciwdrobnoustrojowych. Leczenie zakażeń o etiologii gronkowcowej jest trudne także z uwagi na stale rosnącą lekooporność gronkowców na dostępne antybiotyki. Jak dotąd nie udało się również stworzyć w pełni skutecznej szczepionki przeciwko *S. aureus*. Niniejsza praca doktorska poświęcona jest problemom związanym z zapobieganiem i leczeniem zakażeń o etiologii gronkowcowej, które stały się podstawą poszukiwania alternatywnych strategii ich prewencji, ograniczania rozwoju oraz eliminacji. Założono, że wśród metod prewencji zakażeń można wyróżnić trzy główne kierunki: rozwój szczepień ochronnych, działanie bezpośrednie na drobnoustroje i blokowanie ich czynników wirulencji oraz immunomodulacja odpowiedzi obronnej gospodarza.

Nadrzędnym celem pracy doktorskiej była weryfikacja możliwości zastosowania naturalnych ekstraktów roślinnych, na przykładzie ekstraktów z owoców i kory kaliny koralowej (*Viburnum opulus* L.) w zapobieganiu zakażeniom wywoływanym przez gronkowce złociste (*S. aureus*) oraz ich rozwojowi z zakażeń miejscowych do trudnych w eliminacji zakażeń uogólnionych i biofilmowych.

Biorąc pod uwagę cel nadrzędny oraz założone kierunki rozwiązań w zakresie prewencji zakażeń, w pracy zbadano właściwości przeciwdrobnoustrojowe ekstraktów z kaliny koralowej w działaniu bezpośrednim przeciwko *S. aureus*, oceniono możliwość zastosowania bakteryjnego enzymu - sortazy A jako celu molekularnego dla preparatów przeciwdrobnoustrojowych i potencjalnego składnika szczepionki przeciwgronkowcowej oraz dokonano analizy właściwości immunomodulujących badanych ekstraktów przez

ocenę wpływu czynników uwalnianych z planktonowych i biofilmowych hodowli *S. aureus* po ekspozycji na ww. ekstrakty na polaryzację makrofagów wyprowadzonych z monocytów linii THP-1 w subpopulacje M1 (fenotyp prozapalny) lub M2 (fenotyp regulatorowy) i wybrane parametry aktywności przeciwważkowej komórek fagocytarnych.

W pierwszym etapie prowadzonych badań wykazano, że ekstrakty z owoców i kory kaliny koralowej mogą być bezpiecznie stosowane u ludzi do stężenia 500 µg/ml, lecz wykazują słabą bezpośrednią aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec gronkowców złocistych. W związku z tym, do dalszych badań wybrano stężenia subinhibicyjne badanych ekstraktów (100 i 500 µg/ml). W drugim etapie pracy oceniano, czy hamowanie aktywacji enzymu błonowego sortazy A (SrtA) wykazane dla ekstraktów z kaliny koralowej ograniczy ekspresję adhezyn na powierzchni komórek gronkowców, a tym samym adhezję i tworzenie biofilmu przez te drobnoustroje. Stwierdzono zmniejszenie ekspresji białka A (SpA) na powierzchni komórek *S. aureus* oraz zmiany w składzie lipidów i kwasów tłuszczowych w błonach komórkowych tych bakterii po ekspozycji na ekstrakty z kaliny koralowej. Pomimo tego, bakterie te nadal skutecznie tworzyły biofilmy w obecności badanych ekstraktów. Tym samym stwierdzono, że sortaza A rozpatrywana samodzielnie nie jest wystarczającym celem molekularnym dla preparatów przeciwdrobnoustrojowych i szczepionek przeciwgronkowcowych.

W kolejnych etapach badań przeanalizowano właściwości immunomodulujące ekstraktów z kaliny koralowej (mechanizm prewencji zakażeń z zakresu immunomodulacji pośredniej), oceniając polaryzację makrofagów w subpopulacje M1/M2 oraz aktywność przeciwważkową komórek fagocytarnych. Wykazano, że aktywne składniki ściany komórkowej *S. aureus* uwalniane do środowiska z hodowli planktonowych i biofilmowych *S. aureus* pod wpływem działania ekstraktów z kaliny koralowej stosowanych w stężeniach subinhibicyjnych modulują produkcję cytokin przez makrofagi (wzmożona sekrecja TNF-α i IL-10), lecz nie wpływają na zmianę ekspozycji powierzchniowej markerów CD (CD11c, CD206, CD62L) w populacji komórek CD45+. W związku z tym, jednoznaczne określenie zmian fenotypu tych komórek po ekspozycji jest niemożliwe. Równocześnie zaobserwowano aktywację makrofagów przez ekspozycję na składniki uwalniane z komórek gronkowców pod wpływem badanych ekstraktów w zakresie ograniczania wewnątrzkomórkowego namnażania się pochłoniętych przez te komórki gronkowców. Ekstrakty z kaliny koralowej mogą więc pośrednio modulować aktywność wydzielniczą i fagocytarną makrofagów.

Podsumowując, w niniejszej pracy doktorskiej udowodniono, że ekstrakty z owoców i kory kaliny koralowej posiadają właściwości przeciwdrobnoustrojowe oraz immunomodulujące, lecz żaden z zaobserwowanych efektów nie byłby wystarczający, aby znacząco ograniczyć rozwój ewentualnie toczącego się już w organizmie zakażenia gronkowcowego. Jednakże, uzyskane wyniki pozwalają na sugestię wykorzystania ekstraktów z owoców i kory kaliny koralowej w prewencji zakażeń gronkowcowych. Ponieważ wnioski te zostały wyciągnięte na podstawie badań prowadzonych *in vitro*, warto dodać, że w przyszłości należy przeprowadzić dalsze badania na modelach zwierzęcych z użyciem ekstraktów z kaliny koralowej jako suplementów diety.

VIII. Streszczenie w języku angielskim

Despite the extensive knowledge of staphylococci, *Staphylococcus aureus* is still one of the most common pathogen responsible for the development of nosocomial and non-hospital infections in humans. Staphylococcal infections include a wide range of pathological changes - from skin and soft tissue infections to life-threatening diseases such as bacteraemia and sepsis. The success of *S. aureus* as a pathogen is based on its ability to use multiple virulence factors important to the course of infection and to form biofilms on abiotic surfaces (e.g. medical biomaterials) and infected tissues. This allow these bacteria to easily evade host defence mechanisms and gain protection from adverse environmental conditions, including targeted antimicrobials. Treatment of staphylococcal infections is also difficult due to the constantly increasing drug resistance of staphylococci to available antibiotics. To date, it has also not been possible to develop a fully effective vaccine against *S. aureus*. Presented doctoral thesis is devoted to the problems associated with the prevention and treatment of staphylococcal infections, which became the basis for the search for alternative strategies of their prevention, reduction and elimination. It was assumed that among the infection prevention methods, three main directions can be distinguished: the development of preventive vaccination, direct effect against the microorganisms and blocking their virulence factors, and immunomodulation of the host defence response.

The overarching aim of the dissertation was to verify the applicability of natural plant extracts, based on the extracts from the fruits and bark of *Viburnum opulus* L. in the prevention of *S. aureus* infections and their progression from local infections to systemic and biofilm infections that are difficult to eradicate.

Considering the overarching goal and the assumed directions for infection prevention, this study investigated direct antimicrobial activities of *V. opulus* extracts against *S. aureus*, the feasibility of using microbial enzyme - sortase A as a molecular target for antimicrobials and a potential component of the anti-staphylococcal vaccine, and the immunomodulatory properties of the tested extracts by evaluating the effect of biologically active substances released from planktonic and biofilm cultures of *S. aureus* after exposure to the *V. opulus* extracts on THP-1 derived macrophage polarization into M1 (pro-inflammatory phenotype) or M2 (regulatory phenotype) subpopulations and selected parameters of anti-infective activity of the cells.

In the first stage of the ongoing research, it was shown that the *V. opulus* fruits and bark extracts can be safely used in humans up to a concentration of 500 µg/ml, but show weak direct antimicrobial activity against *S. aureus*. Therefore, subinhibitory concentrations of the tested extracts (100 and 500 µg/ml) were chosen for further studies. In the second stage of the study, it was assessed whether the inhibition of membrane enzyme sortase A (SrtA) activity demonstrated for *V. opulus* extracts may limit surface expression of *S. aureus* adhesins and thus could reduce adhesion and biofilm formation by staphylococci. Decreased expression of protein A (SpA) on the surface of *S. aureus* cells and changes in the composition of lipids and fatty acids in *S. aureus* cell membranes after exposure to *V. opulus* extracts were demonstrated. Despite this, these bacteria still successfully formed biofilms in the presence of the tested extracts. Thus, it was concluded that sortase A considered alone is not a sufficient molecular target for antimicrobial preparations and anti-staphylococcal vaccines.

The immunomodulatory properties of *V. opulus* extracts (an indirect immunomodulatory mechanism to prevention of infections) by assessing the polarization of macrophages into M1/M2 subpopulations and the phagocytic activity of macrophages were analyzed in the next stages of the study. It was shown that active components of the *S. aureus* cell wall released into the supernatants from planktonic and biofilm cultures of *S. aureus* after exposure to *V. opulus* extracts used at subinhibitory concentrations modulate cytokine production by the macrophages (increased secretion of TNF-α and IL-10) but did not alter the surface exposure of CD markers (CD11c, CD206, CD62L) in the CD45+ cell population. Therefore, an unambiguous determination of the phenotype changes of these cells after exposure is not possible. At the same time, the macrophage activation after exposure to the components released from staphylococcal cells under the influence of the tested extracts with regards to reducing of intracellular proliferation of engulfed staphylococci was observed. Thus, *V. opulus* extracts may indirectly modulate the secretory and phagocytic activity of the macrophages.

In conclusion, this dissertation demonstrates that the extracts from fruits and bark of *V. opulus* possess antimicrobial and immunomodulatory properties, but none of the observed effects would be sufficient to significantly reduce the development of a possibly already ongoing staphylococcal infection in the body. However, the results obtained allow the suggestion of the use of *V. opulus* extracts in the prevention of staphylococcal infections.

Since these conclusions were drawn on the basis of *in vitro* studies, further studies on animal models using tested extracts as dietary supplements should be conducted.