

## VII. Streszczenie w języku polskim

Zakażenia układu moczowego (ZUM) to jedne z najczęstszych chorób infekcyjnych występujących u ludzi. *Proteus mirabilis* to częsty patogen dróg moczowych, szczególnie zakażeń związanych z długotrwałym cewnikowaniem. Infekcje tymi drobnoustrojami mogą prowadzić do wielu powikłań, w tym powstawania infekcyjnych kamieni moczowych. Ich tworzenie można podzielić na kilka głównych etapów. W pierwszej kolejności dochodzi do adhezji patogenów do nabłonka dróg moczowych. Następnie zachodzi krystalizacja składników mineralnych moczu, pod wpływem bakteryjnego enzymu- ureazy, która rozkłada mocznik do amoniaku i dwutlenku węgla. W kolejnym etapie dochodzi do agregacji kryształów i tworzenia infekcyjnych kamieni moczowych, które zatrzymują się w drogach moczowych. Ze względu na nieskuteczne metody leczenia oraz prewencji chorób związanych z infekcjami dróg moczowych, ciekawym aspektem może być wykorzystanie naturalnej mikroflory dróg moczowych we wspomaganie terapii ZUM i poznanie mechanizmów ich działania wobec uropatogenów. *Lactobacillus* spp. to pałeczki bytujące w tym środowisku. Zapewniają one homeostazę poprzez wydzielanie wielu substancji o charakterze przeciwbakteryjnym jak kwasy organiczne, bakteriocyny czy nadtlenuk wodoru. Ponadto, wykazują one wiele właściwości antagonistycznych wobec patogenów, jak na przykład konkurencja z patogenami o składniki odżywcze oraz hamowanie adhezji patogenów do komórek nabłonka.

Celem pracy była ocena wpływu drobnoustrojów z rodzaju *Lactobacillus*, należących do naturalnej mikroflory dróg moczowych na patogenność *P. mirabilis* oraz tworzenie infekcyjnych kamieni moczowych. W toku badań analizowano wpływ szczepów *Lactobacillus* na każdy etap ich tworzenia. Badano ich wpływ na adhezję *P. mirabilis* do nabłonka, wrażliwość tych patogenów na substancje przeciwbakteryjne *Lactobacillus*, krystalizację składników mineralnych moczu oraz na agregację powstałych kryształów.

Drobnoustroje z rodzaju *Lactobacillus* zostały wyizolowane z dróg moczowych zdrowych ludzi, natomiast szczepy *P. mirabilis* pochodziły z moczu osób ze współistniejącą kamicą oraz z kamieni moczowych. W badaniach wykazano, że substancje zewnątrzkomórkowe *Lactobacillus* hamują patogenność szczepów

*P. mirabilis* poprzez wielokierunkowe działanie. *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. saerimneri* oraz *L. jensenii* wykazywały silne działanie przeciwbakteryjne wobec badanych szczepów *P. mirabilis*. Analizy chromatograficzne wykazały, że to głównie kwasy organiczne odpowiadają za te właściwości. Kwas mlekowy, kwas bursztynowy oraz kwas cytrynowy oznaczone jako kwasy produkowane przez badane szczepy *Lactobacillus* hamowały wzrost oraz tworzenie biofilmu *P. mirabilis*. Określono również, że zachodzi to poprzez niszczenie błony komórkowej *P. mirabilis* co prowadzi do śmierci tych komórek. Ponadto, substancje zewnątrzkomórkowe *Lactobacillus* hamowały adhezję *P. mirabilis* do nabłonka dróg moczowych oraz cytotoksyczność wobec komórek pęcherza moczowego indukowaną tymi uropatogenami.

W kolejnych etapach badań wykazano, że wyizolowane szczepy należące do drobnoustrojów komensalnych układu moczowego oraz substancje zewnątrzkomórkowe które wytwarzają, hamują krystalizację składników mineralnych moczu indukowaną szczepami *P. mirabilis*, czyli jeden z pierwszych etapów powstawania infekcyjnych kamieni moczowych. Wskazano, że ma to związek z ich właściwościami przeciwbakteryjnymi oraz dowiedziono, co stanowi pierwsze takie doniesienie, że wytwarzany przez *Lactobacillus*, kwas L-mlekowy ma wpływ na kluczowy czynnik wirulencji *P. mirabilis*- ureazę. Umożliwiły to analizy kinetyki reakcji enzymatycznej oraz badania dokowania molekularnego, które wykazały oddziaływania kompetycyjne kwasu L-mlekowego z centrum aktywnym tego enzymu.

Agregacja kryształów struwitu i apatytu to kolejny etap tworzenia infekcyjnych kamieni moczowych. Wyniki niniejszej pracy sugerują, że substancje zewnątrzkomórkowe *Lactobacillus*, głównie polisacharydy mają wpływ również i na ten proces. Okazało się, że cukry *L. jensenii* wzmagają ten proces, poprzez tworzenie większych agregatów kryształów struwitu.

Podsumowując, w świetle powyższych wyników można uznać szczepy *Lactobacillus* oraz wytwarzany przez nie kwas L-mlekowy jako potencjalny środek mogący w przyszłości wspomagać leczenie ZUM oraz infekcyjnych kamicy moczowej lub być skutecznym środkiem prewencji tych chorób.

## VIII. Streszczenie w języku angielskim

Urinary tract infections (UTIs) are one of the most frequent infectious diseases occurring in humans. *Proteus mirabilis* is a common pathogen of the urinary tract, especially infections associated with long-term catheterization. Infections with these microorganisms can lead to many complications, including the formation of infectious urinary stones. Their formation can be divided into several main stages. The first stage is the adhesion of pathogens to the urinary tract epithelium. Subsequently, due to the activity of the urease enzyme which hydrolyzes urea into ammonia and carbon dioxide, crystallization of urine mineral components occurs. In the next stage, crystals aggregate which causes the formation of urinary stones and their retention in the urinary tract. Due to the ineffective methods of treatment and prevention of diseases related to UTI, an interesting aspect may be the use of the natural microbiota of the urinary tract to support the treatment of UTI, and understanding the mechanisms of their action against uropathogens. *Lactobacillus* spp. are bacteria belonging to this habitat. They ensure homeostasis by secreting many antibacterial substances, such as organic acids, bacteriocins, and hydrogen peroxide. Moreover, they exhibit many antagonistic properties against pathogens, such as competition with pathogens for nutrients and inhibition of pathogens adhesion to epithelial cells.

The aim of the study was to assess the influence of microorganisms of the *Lactobacillus* genus, belonging to the natural microbiota of the urinary tract, on the pathogenicity of *P. mirabilis* and the formation of infectious urinary stones. During the research, the impact of *Lactobacillus* strains at each stage of their development was analyzed. Their influence on the adhesion of *P. mirabilis* to the epithelium, the sensitivity of these pathogens to substances produced by *Lactobacillus*, the crystallization of urine mineral components, and the aggregation of crystals were examined.

Microorganisms of the *Lactobacillus* genus were isolated from the urinary tract of healthy people, while *P. mirabilis* strains were collected from the urine of individuals with diagnosed infectious urolithiasis and from urinary stones. Studies have shown that extracellular substances of *Lactobacillus* inhibit the pathogenicity of *P. mirabilis* strains through multidirectional action. *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. saerimneri*, and *L. jensenii* showed strong antibacterial activity against the tested strains of *P. mirabilis*.

Chromatographic analyses showed that organic acids are mainly responsible for these properties. Lactic acid, succinic acid, and citric acid produced by the tested *Lactobacillus* strains inhibited the growth and formation of *P. mirabilis* biofilm. It was also determined that this occurs by destroying the cell membrane of *P. mirabilis*, which leads to the death of these cells. Moreover, extracellular substances of *Lactobacillus* inhibited the adhesion of *P. mirabilis* to the urinary tract epithelium and the cytotoxicity of bladder cells induced by these uropathogens.

Furthermore, the next stages of research showed that isolated strains belonging to the commensal microbiota of the urinary tract and the produced extracellular substances inhibit the crystallization of urine mineral components induced by *P. mirabilis* strains, which is one of the first stages of the formation of infectious urinary stones. It was indicated that this is related to their antibacterial properties. Moreover, it was proven, which is the first such report, that L-lactic acid produced by *Lactobacillus*, suppresses the activity of urease, the main virulence factor of *P. mirabilis*. This was made possible by analyses of the kinetics of the enzymatic reaction and molecular docking studies, which showed competitive interaction of L-lactic acid with the active center of this enzyme.

Aggregation of struvite and apatite crystals is the next stage in the formation of infectious urinary stones. The results of this study suggest that extracellular substances of *Lactobacillus*, mainly polysaccharides, also influence this process. It turned out that the extracellular polysaccharides of *L. jensenii* enhance this process by creating larger aggregates of struvite crystals.

In conclusion, *Lactobacillus* strains and the L-lactic acid produced by them can be considered as a potential agent that may support the treatment of UTI and infectious urolithiasis in the future, or be an effective agent for preventing these diseases.