

**Streszczenie  
w języku polskim**

Metabolity bakteryjne stanowią jedno z głównych źródeł pozyskiwania szerokiej gamy substancji bioaktywnych o potencjalnych zastosowaniach biomedycznych. Piomelanina (PyoM) wytwarzana przez bakterie *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) będąca czarno-brązowym polimerem kwasu homogentyzynowego (HGA) z racji swoich unikalnych właściwości fizykochemicznych i biologicznych, jest rozważana jako substancja o działaniu przeciwoksydacyjnym, cytoprotekcyjnym, przeciwbakteryjnym, a także stymulującym regenerację uszkodzonych tkanek i aktywującą komórki odpornościowe.

W niniejszej rozprawie doktorskiej scharakteryzowano właściwości fizykochemiczne i biologiczne dwóch wariantów naturalnej PyoM: rozpuszczalnej (PyoM<sub>sol</sub>) lub nierozpuszczalnej w wodzie (PyoM<sub>insol</sub>), a także syntetycznego odpowiednika tego polimeru (sPyoM). Zoptymalizowano sposób ich wytwarzania. W pracy wykazano przydatność podłoży minimalnych PMM I i PMM II do hodowli *P. aeruginosa* i izolacji PyoM<sub>sol</sub> i PyoM<sub>insol</sub>. W naturalnej i syntetycznej PyoM wykazano obecność hydroksylowych i karboksylowych grup charakterystycznych dla związków melaninowych pochodnych HGA oraz wysoką termoodporność badanych PyoM. Bakteryjne PyoM w przeciwieństwie do wariantu syntetycznego cechowały się wysoką cytokompatybilnością względem fibroblastów myszy (L-929), monocytów (THP-1), komórek nabłonka żołądka (AGS) i osteoblastów człowieka (hFOB 1.19) oraz bezpieczeństwem *in vivo* na modelu *Galleria mellonella*.

Na modelu *in vitro* komórek nabłonkowych żołądka wykazano działanie przeciwbakteryjne naturalnych PyoM wobec pałeczek *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) wywołujących zapalenie błony śluzowej żołądka lub dwunastnicy, zarówno wobec szczepów wzorcowych jak i klinicznych, a także zdolność PyoM do neutralizacji wzbudzanego przez te bakterie stresu oksydacyjnego, ograniczenia apoptozy i przywracania barierowości komórek. Ponadto wykazano, że PyoM<sub>sol</sub> nasila aktywność fagocytarną monocytów zahamowaną przez komponenty *H. pylori* i aktywuje czynnik transkrypcyjny NF-κB. Uzyskane wyniki wskazują na potencjał PyoM w ograniczaniu zakażenia *H. pylori* i jego negatywnych skutków dla nabłonka żołądka.

PyoM jako bezpieczny biomimetyk złogów ochronotycznych odpowiedzialnych za nadmierną mineralizację tkanki chrzęstnej w alkaptonurii może stanowić potencjalny stymulator dojrzewania osteoblastów, a w konsekwencji przyczyniać się do regeneracji uszkodzonej tkanki kostnej. W przeprowadzonych badaniach wykazano bowiem istotną rolę bakteryjnej PyoM we wspomaganie migracji komórek kościotwórczych, a także ograniczaniu

apoptozy tych komórek indukowanej dokсорubicyną. W środowisku osteoblastów bakteryjne PyoM nasilały aktywność fosfatazy alkalicznej i sekrecję osteokalcyny, interleukiny (IL)-6, IL-10 oraz czynnika martwicy guza (TNF)- $\alpha$ , które stanowią kluczowe markery osteoindukcji i osteokondukcji. W pracy wykazano także przeciwbakteryjne właściwości PyoM przeciwko klinicznemu szczepom *Staphylococcus* sp. wyizolowanym z zakażonej tkanki kostnej.

Prezentowane wyniki stanowią przesłankę do dalszych badań *in vivo* na dedykowanych modelach zwierzęcych z indukowanym zapaleniem nabłonka żołądka w następstwie zakażenia *H. pylori* lub z ubytkami kostnymi, z użyciem PyoM wolnej lub związanej z kompozytami. Wyniki tych badań pozwolą na ukierunkowane zastosowanie bakteryjnej PyoM jako substancji bioaktywnej będącej składnikiem żywności specjalnego przeznaczenia lub komponentem wyrobów medycznych do regeneracji tkanki kostnej.

**Streszczenie  
w języku angielskim**

Bacterial metabolites are one of the primary sources of obtaining a wide range of bioactive substances with potential biomedical applications. Pyomelanin (PyoM) produced by *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), which is a black-brown polymer of homogentisic acid (HGA) due to its unique physicochemical and biological properties, has been considered an attractive stimulator of tissue regeneration and an immunomodulator, as well as an antibacterial, antioxidant, and cytoprotective biomolecule.

This doctoral dissertation characterizes the physicochemical and biological properties of two variants of natural PyoM: soluble (PyoM<sub>sol</sub>) or water-insoluble (PyoM<sub>insol</sub>), as well as the synthetic form of this polymer (sPyoM). The study demonstrated the usefulness of PMM I and PMM II minimal media for the cultivation of *P. aeruginosa* and the isolation of PyoM<sub>sol</sub> and PyoM<sub>insol</sub>. Also, it revealed the presence of hydroxyl and carboxyl groups in PyoM<sub>sol</sub>, PyoM<sub>insol</sub> and sPyoM molecules, which are representative of melanin compounds derived from HGA. Moreover, the thermogravimetric analysis showed high heat resistance of the tested PyoM. Bacterial PyoM, unlike the synthetic variant, exhibited high cytocompatibility against L-929 fibroblasts, THP-1 monocytes, AGS gastric epithelial cells and hFOB 1.19 osteoblasts and *in vivo* safety in the *Galleria mellonella* model.

In an *in vitro* model of gastric epithelial cells, the antibacterial effect of natural PyoM against *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) strains causing gastritis or duodenitis, including the reference and clinical strains was showed, as well as the ability of PyoM to neutralize the oxidative stress induced by these bacteria, limit apoptosis and restore the gastric cell barrier. Moreover, it was demonstrated that bacterial PyoM improve the phagocytic activity of monocytes inhibited by *H. pylori* components and activate the NF- $\kappa$ B transcription factor. These results indicate the potential of natural PyoM in eliminating *H. pylori* and reversing negative effects driven by these bacteria in the gastric mucosa.

PyoM, as a safe biomimetic of ochronotic deposits responsible for excessive mineralization of cartilage tissue in alkaptonuria, may be a potential stimulator of osteoblast maturation and contribute to the regeneration of damaged bone tissue. The studies demonstrated the important role of bacterial PyoM in supporting the migration of bone-forming cells and limiting apoptosis induced by doxorubicin. In the cell cultures of osteoblasts, bacterial PyoM increased the activity of alkaline phosphatase and the secretion of osteocalcin, interleukin (IL)-6, IL-10 and tumour necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , which are the key markers of osteoinduction and osteoconduction. The study also presented the antibacterial

properties of PyoM against clinical strains of *Staphylococcus* sp. isolated from infected bone tissue.

The presented results constitute a premise for further *in vivo* research on dedicated animal models with *H. pylori* induced gastritis or with bone defects, using PyoM alone or as a part of a biocomposite. The results of the above research will allow for the future targeted use of PyoM as a bioactive substance in food for special medical purposes or as a stimulator in medical devices for the regeneration of bone tissue.