

Załącznik nr 2

Autoreferat w języku polskim

Mariusz Grinholc

Autoreferat

1. Imię i Nazwisko: Mariusz Grinholc

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

- a) doktor nauk biologicznych w zakresie biochemii, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, 2009; praca doktorska pt. „Inaktywacja fotodynamiczna jako alternatywna metoda zwalczania wielolekoopornych szczepów *Staphylococcus aureus*”. Promotor: prof. dr hab. Krzysztof Piotr Bielawski.

Rozprawa została wyróżniona przez Radę Wydziału Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

- b) magister biotechnologii, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, 2004; praca magisterska pt. „Związek określonych czynników wirulencji i struktury klonalnej szczepów MRSA z wybranymi infekcjami gronkowcowymi”. Promotor: dr hab. Julianna Kurlenda.

Publiczna prezentacja wyników pracy magisterskiej została wyróżniona przez Radę Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- a) **Uniwersytet Gdański;** Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, ul. Abrahama 58, 80-307 Gdańsk, województwo pomorskie, Polska, **asystent (od 01.10.2009)**

- b) **Uniwersytet Gdański**; Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, ul. Abrahama 58, 80-307 Gdańsk, województwo pomorskie, Polska, **adiunkt (od 01.08.2012)**

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego

Opracowanie strategii prowadzących do skutecznej walki ze zjawiskiem szczepowo-zależnej odpowiedzi drobnoustrojów na inaktywację fotodynamiczną

b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego ze szczegółowym omówieniem indywidualnego wkładu wnioskodawcy

1. M. Kossakowska*, J. Nakonieczna, A. Kawiak, J. Kurlenda, K.P. Bielawski, **M. Grinholc**. Discovering the mechanisms of strain-dependent response of *S. aureus* to photoinactivation: oxidative stress toleration, endogenous porphyrin level and strain's virulence. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2013; 10(4): 348-55

IF₂₀₁₃ = **2,524**, IF_{5-letni} = **2,308**; liczba punktów MNiSW = **20**; liczba cytowań (Web of Science) = **5**

Wkład habilitanta: 40%. Autor do korespondencji. Autorstwo koncepcji badań; zaplanowanie większości doświadczeń; analiza i interpretacja większości wyników; przygotowanie manuskryptu; przygotowanie większości rycin i tabel; przygotowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów; pozyskanie finansowania badań (grant MNiSW luventus Plus nr IP2010 010970; w grantie pełniłem rolę kierownika projektu.)

2. J. Nakonieczna, A. Rapacka-Zdonczyk#, A. Kawiak, K.P. Bielawski, **M. Grinholc**. Sub-lethal photodynamic inactivation renders *Staphylococcus aureus* susceptible for silver nanoparticles. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2013; 12(9): 1622-7

IF₂₀₁₃ = **2,939**, IF_{5-letni} = **2,618**; liczba punktów MNiSW = **25**; liczba cytowań (Web of Science) = **3**

Wkład habilitanta: 44%. Autor do korespondencji. Współudział w opracowaniu koncepcji badań; zaplanowanie większości doświadczeń; analiza i interpretacja większości wyników; przygotowanie maszynopisu; przygotowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów; pozyskanie finansowania badań (grant MNiSW luventus Plus nr IP2010 010970 oraz grant NCBiR nr LIDER/32/36/L-2/10/NCBiR/2011; w obydwu grantach pełniłem rolę kierownika projektu).

3. **M. Grinholc**, J. Nakonieczna, A. Negri*, A. Rapacka-Zdonczyk#, A. Motyka*, G. Fila#, J. Kurlenda, J. Leibner-Ciszak, M. Otto, K.P. Bielawski. The *agr* function and polymorphism: impact on *Staphylococcus aureus* susceptibility to photoinactivation. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2013; 129: 100-7

IF₂₀₁₃ = **2,803**, IF_{5-letni} = **3,133**; liczba punktów MNiSW = **30**; liczba cytowań (Web of Science) = **1**

Wkład habilitanta: 44%. Autor do korespondencji. Autorstwo koncepcji badań; zaplanowanie wszystkich doświadczeń; analiza i interpretacja wszystkich wyników (z wyłączeniem analizy statystycznej); przygotowanie manuskryptu (większości tekstu oraz wszystkich rycin i tabel); przygotowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów; pozyskanie finansowania badań (grant NCN nr 1651/B/P01/2010/39; w grantcie pełniłem rolę kierownika projektu).

4. A. Rapacka-Zdonczyk#, A. Rhod Larsen, J. Empel, A. Patel, **M. Grinholc**. Association of susceptibility to photodynamic oxidation and the genetic background of *Staphylococcus aureus*. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2014; 33(4): 577-86

IF₂₀₁₄ = **2,668**, IF_{5-letni} = **2,628**; liczba punktów MNiSW = **25**; liczba cytowań (Web of Science) = **3**

Wkład habilitanta: 55%. Autor do korespondencji. Autorstwo koncepcji badań; zaplanowanie wszystkich doświadczeń; analiza i interpretacja wszystkich wyników; przygotowanie maszynopisu (większości tekstu oraz wszystkich rycin i tabel); przygotowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów; pozyskanie finansowania badań (grant NCN nr 1651/B/P01/2010/39; w grantcie pełniłem rolę kierownika projektu).

5. **M. Grinholc**, A. Rapacka-Zdonczyk#, B. Rybak, F. Szabados, K.P. Bielawski. Multiresistant strains are as susceptible to photodynamic inactivation as their naïve counterparts:

protoporphyrin IX-mediated photoinactivation reveals differences between methicillin resistant and methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* strains. *Photomedicine and Laser Surgery*, 2014; 32(3): 121-9

IF₂₀₁₄ = **1,672**, IF_{5-letni} = **1,900**; liczba punktów MNiSW = **25**; liczba cytowań (Web of Science) = **5**

Wkład habilitanta: 60%. Autor do korespondencji. Autorstwo koncepcji badań; zaplanowanie wszystkich doświadczeń; analiza i interpretacja wszystkich wyników; przygotowanie manuskryptu (większości tekstu oraz wszystkich rycin i tabel); przygotowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów; pozyskanie finansowania badań (grant NCN nr 1651/B/P01/2010/39; w grantie pełniłem rolę kierownika projektu).

6. **M. Grinholc**, J. Nakonieczna, G. Fila#, A. Taraszkiwicz, A. Kawiak, G. Szewczyk, T. Sarna, L. Lilge, K.P. Bielawski. Antimicrobial Photodynamic Therapy with Fulleropyrrolidine: Photoinactivation Mechanism of *Staphylococcus Aureus*, *In vitro* and *In vivo* Studies. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015; 99(9): 4031-4043

IF₂₀₁₄ = **3,337**, IF_{5-letni} = **3,848**; liczba punktów MNiSW = **35**; liczba cytowań (Web of Science) = **2**

Wkład habilitanta: 38%. Autor do korespondencji. Współudział w opracowaniu koncepcji badań; zaplanowanie i wykonanie większości doświadczeń; analiza i interpretacja większości wyników; przygotowanie maszynopisu (wszystkich rycin i tabel z wyłączeniem Ryc. 2; przygotowanie większości tekstu); przygotowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów; pozyskanie finansowania badań (grant NCBiR nr LIDER/32/36/L-2/10/NCBiR/2011; w grantie pełniłem rolę kierownika projektu).

7. **M. Grinholc**, A. Rodziewicz*, K. Forys*, A. Rapacka-Zdonczyk#, A. Kawiak, A. Domachowska, G. Golunski, Ch. Wolz, L. Mesak, K. Becker, K.P. Bielawski. Fine-tuning *recA* expression in *Staphylococcus aureus* for antimicrobial photoinactivation: importance of photo-induced DNA damage in the photoinactivation mechanism. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015; 99(21): 9161-76

IF₂₀₁₄ = **3,337**, IF_{5-letni} = **3,848**; liczba punktów MNiSW = **35**; liczba cytowań (Web of Science) = **0**

Wkład habilitanta: 40%. Autor do korespondencji. Autorstwo koncepcji badań; zaplanowanie i wykonanie większości doświadczeń; analiza i interpretacja wszystkich wyników; przygotowanie maszynopisu (przygotowanie wszystkich rycin i tabel z wyłączeniem rycin Ryc. 6 i 11; przygotowanie większości tekstu); przygotowanie

odpowiedzi na uwagi recenzentów; pozyskanie finansowania badań (grant NCBiR nr LIDER/32/36/L-2/10/NCBiR/2011; w grantie pełniłem rolę kierownika projektu).

** studenci wykonujący pracę magisterską pod moją opieką.*

doktoranci wykonujący pracę doktorską pod moją opieką – promotor pomocniczy

Oświadczenia współautorów określające ich indywidualny wkład w powstanie każdej z powyższych prac zamieszczono w Załączniku nr 5 (Oświadczenia współautorów). Nie przewiduje się wykorzystania którejkolwiek z wymienionych prac jako osiągnięcia w innym postępowaniu awansowym.

Dla prac opublikowanych w roku 2015 wykorzystano ostatnią dostępną w bazach wartość IF₂₀₁₄.

*łączny współczynnik oddziaływania (impact factor) czasopism, w których ukazały się publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego, zgodnie z rokiem opublikowania wynosi **19,280**; punkty MNIŚW – **195**; liczba cytowań wg bazy Web of Science – **19**.*

c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

WSTĘP

W roku 2004, Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *World Health Organization, WHO*) w dokumencie zatytułowanym "Najważniejsze leki dla Europy i Świata" (ang. *Priority Medicines for Europe and the World*) nadała zakażeniom wywołanym przez wielolekooporne bakterie priorytet najwyższej rangi i wskazała, że Europa powinna odgrywać pierwszoplanową rolę w kreowaniu kierunków badań dotyczących nowych opcji terapeutycznych. W ciągu ostatnich 10 – 20 lat obserwujemy dynamiczny wzrost lekooporności drobnoustrojów. W ekstremalnych przypadkach mamy do czynienia ze szczepami, które nie wykazują wrażliwości na żadne z licencjonowanych leków przeciwbakteryjnych lub są wrażliwe na leki znacznie bardziej toksyczne dla organizmu człowieka niż rutynowo stosowane chemioterapeutyki. Zaistniała sytuacja wymusza powstawanie nowych kierunków badań skupiających się wokół poszukiwania metod przeciwdziałających rozwojowi lekooporności oraz prowadzących do zmniejszenia użycia leków przeciwdrobnoustrojowych.

Inaktywacja fotodynamiczna drobnoustrojów (ang. *Photodynamic Inactivation, PDI*) jest od wielu lat podstawowym tematem moich badań naukowych zarówno w modelu *in vitro* jak i *in vivo*. Zgodnie z uzyskanymi przez nasz zespół badawczy wynikami oraz danymi literaturowymi przedstawionymi przez inne ośrodki badawcze na świecie, możemy wykazać, że fotoinaktywacja odznacza się **(i)** wysoką aktywnością bakteriobójczą niezależnie od stopnia lekooporności drobnoustrojów; **(ii)** brakiem rozwoju mechanizmów oporności drobnoustrojów na fotoinaktywację; **(iii)** brakiem wpływu na rozwój lekooporności drobnoustrojów; **(iv)** wysokim bezpieczeństwem wobec komórek eukariotycznych; **(v)** brakiem aktywności cyto- i genotoksycznej, oraz **(vi)** ograniczonym wpływem na towarzyszącą zakażeniu florę. PDI prowadzi do uszkodzenia komórek drobnoustrojów poprzez wytwarzanie reaktywnych form tlenu (ang. *reactive oxygen species, ROS*), indukowanych interakcjami między światłem widzialnym o odpowiedniej długości fali a światłoczułym związkem chemicznym zwanym fotouczulaczem (ang. *photosensitizer, PS*). Fotouczulacz, wskutek działania światła o określonej długości fali, przechodzi z podstawowego stanu energetycznego do stanu wzbudzonego. Wzajemne oddziaływania fotouczulacza w stanie trypletowym z tlenem cząsteczkowym w stanie podstawowym powoduje rozwój reaktywnych form tlenu, takich jak tlen singletowy (1O_2), poprzez przeniesienie energii i rodniki hydroksylowe (HO^\bullet) za pośrednictwem transferu elektronów. Tworzone reaktywne formy tlenu oraz tlen singletowy mogą wywierać efekt cytotoksyczny wobec różnych biomolekuł takich jak białka, lipidy, błony komórkowe czy materiał genetyczny (Tanielian i wsp., 2000).

Liczne badania *in vitro* i *in vivo* potwierdzają skuteczność przeciwbakteryjnej inaktywacji fotodynamicznej w eradykacji drobnoustrojów oraz eliminacji zakażenia. Wobec zakażeń różnych typów ran, takich jak oparzenia, otarcia, uszkodzenia tkanek miękkich, czy rany cięte wykazano skuteczność omawianej terapii zarówno w przypadku zakażeń drobnoustrojami Gram-ujemnymi jak i Gram-dodatnimi. Prof. Michael Hamblin z Bostonu jako pierwszy wykazał efektywność PDI *in vivo* przy użyciu myszy z raną ciętą zakażoną *Pseudomonas aeruginosa* i *Escherichia coli* (Hamblin i wsp., 2003). Jedynie zwierzęta leczone PDI przetrwały zakażenie *P. aeruginosa*. Przy użyciu PDI z wykorzystaniem błękitu toluidyny O (ang. *toluidine blue O, TBO*) znacznie inaktywowano *Vibrio vulnificus*, które u zwierząt niepoddanych leczeniu prowadziły do sepsy i śmierci. Podobne wyniki uzyskano dla zwierząt zakażonych bakteriami z gatunku *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* i innymi. Ponadto, PDI jest szeroko stosowana w zakażeniach jamy ustnej i zębów, w których głównie Gram-ujemne bakterie są odpowiedzialne za większość wywoływanych infekcji. Wykorzystanie PDI w różnych modelach zakażenia tkanek przyzębia wykazały zmniejszenie obciążenia bakteryjnego dla różnych gatunków bakterii. Żywotność *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* i *Prevotella intermedia* została znacznie zredukowana po zastosowaniu PDI (Dortbudak i wsp., 2001).

Bardzo ważnym aspektem inaktywacji fotodynamicznej jest fakt, iż możliwa jest selektywna inaktywacja patogennych drobnoustrojów bez wywoływania efektów cytotoksycznych wobec komórek i tkanek gospodarza. Ostatnie badania wskazują, że za pomocą fotouczulacza ftalocyjaninowego doprowadzono do spadku przeżywalności drobnoustrojów chorobotwórczych o 5 jednostek w skali logarytmicznej bez powodowania szkód wobec ludzkich komórek takich jak fibroblasty czy keratynocyty (Soncin i wsp., 2002). Inne badania pokazały, że pochodna chloryny e6 może skutecznie prowadzić do fotodestrukcji *P. gingivalis* i *Actinomyces viscosus* przy jednoczesnym braku inaktywacji komórek nabłonka jamy ustnej. Podsumowując, badania *in vitro* wykazały, że przy zastosowaniu tych samych parametrów dozymetrycznych inaktywacji fotodynamicznej komórki gospodarza są mniej wrażliwe na traktowanie niż komórki drobnoustrojów, sugerując istnienie marginesu bezpieczeństwa między inaktywacją bakterii a uszkodzeniem komórek gospodarza.

Mimo tego, że zjawisko inaktywacji fotodynamicznej drobnoustrojów zostało odkryte ponad 100 lat temu, pierwsze badania kliniczne odbyły się w roku 1970. Wykazano, że PDI z wykorzystaniem TBO z powodzeniem odkaziła implanty z kolonizacją bakteryjną u 15 pacjentów, zmniejszając obciążenie mikroorganizmami o 2 jednostki w skali \log_{10} . Ponadto, użycie błękitu metylenowego (ang. *methylene blue*, MB) i światła czerwonego o fali długości 665 nm doprowadziło do pełnej inaktywacji drobnoustrojów w zainfekowanych korzeniach zębów. W innym badaniu wykazano, że TBO-PDI może zmniejszyć 10-krotnie żywotność *Streptococcus mutans* obecnego w próchnicy zębiny lub zepsutych zębach. Innym przekonującym zastosowaniem PDI jest leczenie trądziku pospolitego. Prof. Hongcharu z Bostonu jako pierwszy wykazał skuteczność miejscowej PDI z użyciem kwasu aminolewulinowego (ang. *aminolevulinic acid*, ALA) w leczeniu trądzika pospolitego u dorosłych (Hongcharu i wsp., 2000). Istnieje również wiele innych badań klinicznych wykazujących skuteczność PDI w leczeniu różnych zakażeń bakteryjnych, leiszmaniozy, czy infekcji wirusowych.

Innym nowatorskim podejściem jest wykorzystanie światła niebieskiego (400-500 nm) w monoterapii bez użycia egzogennych związków fotouczulających. Letalność światła niebieskiego zarówno wobec bakterii Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych wykazano w warunkach *in vitro* jak i *in vivo*. Natomiast długość fali w zakresie 402-420 nm opisano jako najbardziej skuteczną w inaktywacji drobnoustrojów. Dokładny mechanizm przeciwbakteryjnego efektu światła niebieskiego nie jest w pełni poznany. Ogólnie przyjęte hipotezy mówią, że światło niebieskie prowadzi do wzbudzenia wewnątrzkomórkowych związków fotouczulających takich jak porfiryny, które zachowują się jak fotouczulacze w klasycznej metodzie PDI. Absorpcja fotonu prowadzi do transferu energii i ostatecznie produkcji wysoko cytotoksycznych reaktywnych form tlenu zwłaszcza tlenu singletowego. Jednak różne bakterie wykazują zmienną podatność na światło niebieskie. Badania wykazały, że bakterie Gram-dodatnie są na ogół bardziej wrażliwe na inaktywację światłem 405 nm niż

gatunki Gram-ujemne. Stwierdzono również, że różnice w kinetyce inaktywacji mogą być spowodowane specyficznymi różnicami w poziomie endogennych porfiryn oraz ich podtypów. Badania wykazały, że światło niebieskie jest w stanie prowadzić do inaktywacji patogenów beztlenowych jamy ustnej takich jak *Prevotella*, *Porphyromonas* i *Fusobacterium* oraz mikroaerofilnych drobnoustrojów takich jak *Propionibacterium acnes* i *Helicobacter pylori*. Co więcej, bakteriobójczą skuteczność *in vitro* światła niebieskiego wykazano dla *E. coli*, metycyloopornych szczepów *S. aureus* (MRSA), *P. aeruginosa*, oraz tworzących biofilm *S. mutans* (Guffey i Wilborn, 2006). Maclean i wsp. badali bakteriobójcze działanie światła 405 nm wobec niektórych gatunków bakterii, w tym Gram-dodatnich *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Clostridium perfringens*, oraz Gram-ujemnych *Acinetobacter baumannii*, *Proteus vulgaris* i *Klebsiella pneumonia*, które wiążą się z nabytymi zakażeniami szpitalnymi (Maclean i wsp., 2014). Wyniki wykazały, że większość Gram-dodatnich i Gram-ujemnych gatunków udało się wyeliminować. Jednym z głównych zastosowań światła niebieskiego dla leczenia chorób zakaźnych w klinice jest leczenie trądziku pospolitego, który jest ważnym zaburzeniem dermatologicznym z zakażeniem *P. acnes*. Ponadto, światło niebieskie stosuje się również w inaktywacji *Helicobacter pylori*, który jest głównym patogenem wywołującym zanikowe zapalenie błony śluzowej żołądka i wrzody trawienne. Ganz i wsp. wykazali na grupie 10 pacjentów leczonych endoskopowo światłem niebieskim (405 nm) znaczne spadki w przeżywalności *H. pylori*. U niektórych pacjentów wykazano redukcję obciążenia bakteryjnego o ok. 99%.

Warto też wspomnieć o kilku nowych zastosowaniach klinicznych fototerapii opracowanych w ostatnich latach. Firma Ondine Biomedical prowadzi duże badanie kliniczne, którego celem jest eradykacja metycyloopornych szczepów *S. aureus* przed zabiegiem szpitalnym przy użyciu błękitu metylenowego i PDI z jamy nosowo-gardłowej (www.ondinebio.com/wp-content/uploads/2011/04/OBP-NR-041511-Final.pdf). Ta sama firma planuje drugie badanie kliniczne fotodezynfekcji *in situ* rur dotchawiczych jako sposób zapobiegania odrespiratorowemu zapaleniu płuc (www.ondinebio.com/wp-content/uploads/2011/05/OBP-NR-051011-Final.pdf). Z kolei firma Sinuwave bada wykorzystanie MB-PDI w celu zwalczania przewlekłych zapaleń zatok (www.sinuwave.com).

Jak można zauważyć z przytoczonych powyżej przykładów, przeciwbakteryjna inaktywacja fotodynamiczna w większości badań naukowych stanowi propozycję alternatywnej opcji terapeutycznej, która niezależnie i w odcięciu od innych komplementarnych podejść przeciwbakteryjnych (np. antybiotykoterapii) ma prowadzić do skutecznej eradykacji patogennych drobnoustrojów w miejscu zakażenia. Z doświadczenia wynikającego z moich badań wiemy, że osiągnięcie satysfakcjonujących efektów klinicznych inaktywacji fotodynamicznej, rozumianych jako całkowitą eradykację drobnoustrojów w miejscu zakażenia, jest niezwykle trudne i rzadko opisywane mimo licznych prac prowadzonych na całym świecie.

Trzeba w tym miejscu wspomnieć, że ważnym ograniczeniem inaktywacji fotodynamicznej jest jej niższa skuteczność bakteriobójcza w stosunku do drobnoustrojów rosnących w biofilmie oraz fakt, że efektywność badań *in vitro* często nie przenosi się na modele zwierzęce *in vivo*. Nawet po skutecznej eliminacji drobnoustrojów z miejsca zakażenia, po 24 godzinach następuje ponowny wzrost mikroorganizmów i rozwój zakażenia. W związku z tym, w moim odczuciu, inaktywacja fotodynamiczna drobnoustrojów w bieżącym kształcie nie może stanowić alternatywnej i samowystarczalnej opcji terapeutycznej w leczeniu zakażeń bakteryjnych. Niemniej, jestem głęboko przekonany, że inaktywacja ta odznacza się wieloma zaletami, które czynią z niej atrakcyjne narzędzie do kompleksowej walki z wielolekoopornymi patogenami człowieka. Dlatego w swoim podejściu badawczym skupiłem się na poszukiwaniu strategii mogących zwiększyć bakteriobójczą efektywność inaktywacji fotodynamicznej.

Niestety, większość badań nad inaktywacją fotodynamiczną bakterii prowadzonych jest w oparciu o pojedynczych przedstawicieli poszczególnych gatunków. **Najważniejszym odkryciem wynikającym z mojej pracy doktorskiej i opisanym po raz pierwszy przeze mnie, było wykazanie szczepowo-zależnej odpowiedzi *S. aureus* na inaktywację fotodynamiczną.** Z badań przeprowadzonych w ramach mojej pracy doktorskiej wiadomo, że gronkowiec złocisty w zależności od szczepu może wykazywać bardzo różną wrażliwość na inaktywację fotodynamiczną (Grinholc i wsp., 2008). Mechanizm leżący u podstaw takiej szczepowej odpowiedzi na terapię fotodynamiczną nie był jak dotąd badany. Istnieją doniesienia literaturowe dotyczące badań prowadzonych na kilku szczepach jednego gatunku, natomiast w żadnym z nich nie wykazano tak dużych odchyień w odpowiedzi na inaktywację fotodynamiczną jak w badaniach naszego zespołu. Badania prowadzone przez zespół prof. Tima Maischa z Regensburga dotyczyły dwóch szczepów MRSA i dwóch szczepów MSSA, jednakże różnica w odpowiedzi na zastosowaną terapię nie przekroczyła 0,2 log₁₀ w redukcji liczby bakterii (Maisch i wsp., 2005). Zespół dr Saski Lambrechts z Amsterdamu analizował PDI wobec trzech dzikich szczepów *S. aureus* i zauważył, że wykazują one istotną statystycznie różnicę we wrażliwości na zastosowaną fotoinaktywację (Lambrechts i wsp., 2005). Różnica ta wynosiła 1 log₁₀. Istotną różnicę we wrażliwości na PDI wykazał również prof. Embleton z Londynu pokazując, że efektywność fotoinaktywacji *S. aureus* wahała się od 0,04 do 1,69 log₁₀ w redukcji liczby bakterii (Embleton i wsp., 2005). Jednakże, w żadnej z tych prac nie podjęto próby wyjaśnienia tego zjawiska. **W pierwszej kolejności, w pracach stanowiących osiągnięcie naukowe, podjąłem próbę identyfikacji czynników genetycznych i fenotypowych warunkujących istnienie fenotypów *S. aureus* o różnej wrażliwości na inaktywację fotodynamiczną. W kolejnej części podjąłem próbę opracowania strategii mogących przeciwdziałać podwyższonej oporności drobnoustrojów na reakcję fotodynamiczną.**

Cel badań

Celem badań była identyfikacja czynników warunkujących szczepowo-zależną odpowiedź drobnoustrojów na inaktywację fotodynamiczną oraz rozwój strategii prowadzących do skutecznej walki z fenotypami o podwyższonej oporności na fotoinaktywację. Uzyskane wyniki zostały opublikowane w siedmiu recenzowanych artykułach eksperymentalnych, które wchodzą w skład osiągnięcia naukowego przedłożonego do oceny. Najważniejsze z otrzymanych wyników omówiono poniżej.

WYNIKI

Publikacja 1: M. Kossakowska, J. Nakonieczna, A. Kawiak, J. Kurlenda, K.P. Bielawski, M. Grinholc. **Discovering the mechanisms of strain-dependent response of *S. aureus* to photoinactivation: oxidative stress toleration, endogenous porphyrin level and strain's virulence.** *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2013; 10(4): 348-55

W publikacji przedstawiono wyniki badań, które doprowadziły do odkrycia różnej wrażliwości szczepów *S. aureus* na fotoinaktywację w zależności od stosowanego fotouczulacza. Wykorzystując różne związki fotouczulające, ten sam szczep wykazywał zupełnie odmienną wrażliwość na inaktywację fotodynamiczną. Dodatkowo, uzyskane wyniki pozwoliły wyeliminować wpływ niektórych cech fenotypowych *S. aureus* na odpowiedź wobec inaktywacji fotodynamicznej. Doświadczenia prowadzono w ramach kierowanego przeze mnie projektu „Efektywna terapia fotodynamiczna skierowana przeciwko alarmowym patogenom szpitalnym wykorzystująca unikalne związki fotouczulające, ekstrakty roślinne oraz nanocząsteczki srebra” (grant MNiSW, luventus Plus nr IP2010 010970), realizowanego w latach 2010-2011.

Wykorzystując zarówno egzogenne jak i endogenne, indukowane kwasem delta-aminolewulinowym, związki fotouczulające, wykazano różną wrażliwość *S. aureus* na inaktywację fotodynamiczną. W zależności od stosowanego fotouczulacza, ten sam szczep drobnoustroju wykazywał dużą wrażliwość lub niewrażliwość na reakcję fotodynamiczną. Ponadto, uzyskane wyniki potwierdziły istnienie szczepowo-zależnej odpowiedzi drobnoustrojów na fotoinaktywację i wykazały, że zróżnicowanie wrażliwości na PDI dotyczy różnych grup związków fotouczulających.

W poszukiwaniu czynników mogących warunkować odmienną odpowiedź *S. aureus* na fotoinaktywację wykonano analizę produkcji endogennych porfiryn w badanych szczepach,

stawiając hipotezę, że zróżnicowany ich poziom wewnątrz komórek drobnoustrojów może determinować skuteczność inaktywacji fotodynamicznej z użyciem zarówno endo- jak i egzogennych fotouczulaczy. Podobny poziom produkcji wewnątrzkomórkowych porfiryn w badanych szczepach *S. aureus* wykazał brak jakiegokolwiek korelacji między ich produkcją a wrażliwością na PDI.

Mając na uwadze fakt, że mechanizm szczepowo-zależnej odpowiedzi drobnoustrojów na inaktywację fotodynamiczną pozostawał niewyjaśniony, podjęto próbę identyfikacji cech fenotypowych *S. aureus*, które mogły determinować skuteczność PDI. Lipovsky i wsp. w swojej pracy wykazali zależność różnej wrażliwości *S. aureus* na fototerapię od poziomu reaktywnych form tlenu, wrażliwości na stres oksydacyjny wywołany obecnością nadtlenu wodoru (H_2O_2), czy poziomem karotenoidów w komórkach bakterii (Lipovsky i wsp., 2009). Uzyskane przeze mnie wyniki nie wykazały żadnej statystycznie istotnej korelacji między badanymi czynnikami a wrażliwością na inaktywację fotodynamiczną. Podobnie, badając poziom akumulacji fotouczulaczy w komórkach drobnoustrojów, nie wykazano prostej zależności między skutecznością PDI a poziomem nagromadzonego wewnątrz komórki bakteryjnej fotouczulacza.

Wykorzystując badania na komórkach eukariotycznych (keratynocytach), po raz pierwszy wykazano, że szczepy o różnym stopniu wirulencji mogą być w równym stopniu inaktywowane z użyciem PDI. Ponadto, wykazano, że poddane fotoinaktywacji drobnoustroje charakteryzują się zmniejszoną wirulencją wobec komórek eukariotycznych. Opisana zdolność PDI do inaktywacji czynników wirulencji drobnoustrojów wydaje się niezwykle istotną i pożądaną klinicznie cechą.

Główne osiągnięcia poznawcze

Podsumowując, wyniki uzyskane w tej pracy umożliwiły:

- wysunięcie hipotezy, że szczepowo-zależna odpowiedź drobnoustrojów na fotoinaktywację jest zjawiskiem powszechnym i obecnym w przypadku każdej grupy związków fotouczulających,
- wykazanie, że poziom wrażliwości drobnoustrojów na PDI zależy od użytego związku fotouczulającego,
- wykazanie, że badane cechy fenotypowe *S. aureus* takie jak poziom endogennych porfiryn, poziom produkowanych keratynoidów czy wrażliwość na stres oksydacyjny indukowany nadtlakiem wodoru nie determinują skuteczności PDI sugerując, że mechanizm leżący u podstaw opisywanej szczepowo-zależnej odpowiedzi drobnoustrojów na PDI jest niezwykle złożony i wieloczynnikowy,

- wykazanie, że poziom wirulencji drobnoustrojów nie ogranicza skuteczności PDI, a w dodatku jest on redukowany w wyniku reakcji fotodynamicznej,
- zaproponowanie strategii umożliwiającej osiągnięcie efektu bakteriobójczego PDI wobec drobnoustrojów charakteryzujących się podwyższoną opornością na inaktywację fotodynamiczną; strategia ta zakłada opracowanie mieszaniny związków fotouczulających umożliwiającej inaktywację drobnoustrojów o różnych fenotypach wrażliwości na PDI.

Publikacja 2: J. Nakonieczna, A. Rapacka-Zdonczyk, A. Kawiak, K.P. Bielawski, M. Grinholc. **Sub-lethal photodynamic inactivation renders *Staphylococcus aureus* susceptible for silver nanoparticles.** Photochemical & Photobiological Sciences, 2013; 12(9): 1622-7

W publikacji przedstawiono wyniki badań, które doprowadziły do wykazania istnienia synergistycznego oddziaływania między inaktywacją fotodynamiczną i nanocząstkami srebra. Co więcej, po raz pierwszy zaproponowano sekwencyjne użycie obydwu podejść terapeutycznych, co poskutkowało znacznym wzrostem skuteczności bakteriobójczej. Doświadczenia prowadzono w ramach kierowanych przeze mnie projektów: „Efektywna terapia fotodynamiczna skierowana przeciwko alarmowym patogenom szpitalnym wykorzystująca unikalne związki fotouczulające, ekstrakty roślinne oraz nanocząsteczki srebra” (grant MNiSW, Iuventus Plus nr IP2010 010970, realizowany w latach 2010-2011) oraz „Nanobiotechnologia jako innowacyjne podejście w leczeniu zakażeń ran oparzeniowych” (grant NCBiR, Lider nr LIDER/32/36/L-2/10/NCRiR/2011, realizowany w latach 2011-2015).

Ze względu na to, że jednym z głównych ograniczeń inaktywacji fotodynamicznej jest istnienie fenotypów drobnoustrojów o podwyższonej oporności na PDI oraz fakt, że efekt eradykacji drobnoustrojów jest tracony w 24 godziny po traktowaniu – populacja drobnoustrojów odnawia się po traktowaniu inaktywacją fotodynamiczną – w kolejnej pracy skupiono się na poszukiwaniu strategii eliminującej obserwowane zjawisko.

Aktywność bakteriobójcza nanocząstek srebra znana jest od wielu dekad. Jednakże, wraz z wprowadzeniem antybiotyków do rutynowego leczenia, ich rola w leczeniu zakażeń bakteryjnych drastycznie spadła. Leaper i wsp. w swojej pracy wykazali, że nanocząstki srebra promują gojenie się ran oparzeniowych i poprawiają efekt kosmetyczny gojącej się rany (Leaper, 2006). Z kolei zespół prof. Tiana z Hong Kongu wykazał w badaniach *in vivo* wykorzystujących myszy model rany zakażonej, że oprócz aktywności bakteriobójczej nanocząstki srebra modulują odpowiedź immunologiczną gospodarza wpływając na poziom cytokin prozapalnych. Efekt ten znacząco skraca czas gojenia się ran (Tian i wsp., 2007).

Wykorzystując badania na komórkach eukariotycznych tj. keratynocytach, wykazano w naszej pracy, że stosowane nanocząstki srebra, zarówno w kombinacji z fotouczulaczem jak i działające niezależnie od procesu fotoinaktywacji, są niezwykle bezpieczne i nie wykazują żadnej aktywności cytotoksycznej wobec komórek gospodarza.

Proponując zupełnie nowe podejście oparte na sekwencyjnym użyciu nanocząstek srebra oraz inaktywacji fotodynamicznej, w niniejszej pracy wykazano, że fotoinaktywacja uwrażliwia drobnoustroje na działanie nanocząstek. Jedynie sekwencyjne użycie obydwu podejść doprowadziło do pełnej eradykacji drobnoustrojów oraz wyeliminowało ryzyko odnowienia populacji komórek bakteryjnych po 24 godzinach od traktowania. Ponadto, opisany efekt bakteriobójczy uzyskano stosując znacząco mniejsze stężenia nanocząstek srebra oraz fotouczulacza w porównaniu z działaniem każdego z tych czynników w monoterapii. Warto podkreślić, że takie podejście umożliwiło osiągnięcie efektu bakteriobójczego (spadek przeżywalności bakterii o 7 jednostek w skali logarytmicznej) przy użyciu niezwykle niskich stężeń fotouczulacza rzędu 0,05 i 0,5 μM . Uzyskane wyniki potwierdzają istnienie synergistycznego oddziaływania inaktywacji fotodynamicznej oraz nanocząstek srebra.

Poznanie wzajemnych oddziaływań inaktywacji fotodynamicznej z nanocząstkami srebra umożliwiło zaproponowanie alternatywnej i niezwykle bezpiecznej w stosunku do komórek eukariotycznych opcji terapeutycznej w leczeniu zakażeń dermatologicznych.

Główne osiągnięcia poznawcze

Podsumowując, wyniki uzyskane w tej pracy umożliwiły:

- wykazanie braku aktywności cytotoksycznej sekwencyjnego użycia PDI i nanocząstek srebra wobec komórek eukariotycznych,
- opracowanie nowej strategii prowadzącej do eliminowania fenotypów drobnoustrojów o podwyższonej oporności na PDI i zapobiegającej odnawianiu się populacji bakterii w miejscu zakażenia; proponowana strategia oparta jest na sekwencyjnym użyciu fotoinaktywacji i nanocząstek srebra.

Publikacja 3: M. Grinholc, J. Nakonieczna, A. Negri, A. Rapacka-Zdonczyk, A. Motyka, G. Fila, J. Kurlenda, J. Leibner-Cisak, M. Otto, K.P. Bielawski. **The *agr* function and polymorphism: impact on *Staphylococcus aureus* susceptibility to photoinactivation.** Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2013; 129: 100-7

W pracy przedstawiono wyniki badań, które doprowadziły do identyfikacji polimorfizmów genu globalnej regulacji u *S. aureus* (ang. *accessory gene regulator, agr*) mających bezpośredni wpływ na poziom wrażliwości drobnoustrojów na inaktywację fotodynamiczną. Doświadczenia prowadzone były w ramach kierowanego przeze mnie projektu „Związek polimorfizmu genu globalnej regulacji (*agr*), chromosomalnej kasety gronkowcowej *mec* (*SCCmec*) oraz obecności leukocydyny Panton-Valentine z zakażeniami gronkowcowymi oraz odpowiedzią *Staphylococcus aureus* na fotoinaktywację farmakologiczną” (grant MNiSW/NCN nr 1651/B/P01/2010/39) realizowanego w latach 2010-2013.

Jedną z przyczyn słabej efektywności inaktywacji fotodynamicznej może być istnienie wysoce efektywnych systemów antyoksydacyjnych w komórkach bakterii. W poprzednich pracach wykazano, że szczepy *S. aureus* z inaktywacją dysmutaz ponadtlenkowych charakteryzowały się znaczną wrażliwością na fotoinaktywację (Nakonieczna i wsp., 2010). Podobne obserwacje dotyczyły szczepów z obniżoną produkcją stafyloksantyny, gronkowcowego pigmentu znanego z jego antyoksydacyjnych właściwości. Istnienie fenotypów drobnoustrojów o podwyższonej oporności na PDI może wynikać również ze zróżnicowania w zdolności drobnoustrojów do produkcji biofilmu. Wpływ macierzy zewnątrzkomórkowej budującej strukturę biofilmu na skuteczność inaktywacji fotodynamicznej opisywano wielokrotnie (Gad i wsp., 2004). Na podstawie tych obserwacji, w badaniach zamieszczonych w prezentowanej pracy, skupiono się na poszukiwaniu czynników genetycznych, mogących warunkować istnienie fenotypów drobnoustrojów o różnej wrażliwości na inaktywację fotodynamiczną.

W pracy skupiono się na elemencie genetycznym, genie globalnej regulacji (*agr*) u *S. aureus*, który stanowi system regulacji ekspresji genów kodujących większość z opisywanych powyżej czynników tj. czynników wirulencji oraz produkcji biofilmu. Ponadto, system *agr* odgrywa również ważną rolę w kontroli równowagi oksydacyjnej w komórce bakterii, co bezpośrednio wiąże jego aktywność z inaktywacją fotodynamiczną indukującą stres oksydacyjny w traktowanych komórkach. W związku z powyższym, w prezentowanej pracy postawiono hipotezę dotyczącą wpływu funkcjonalności oraz polimorfizmu genu *agr* na efektywność inaktywacji fotodynamicznej.

W populacji szczepów *S. aureus* opisuje się istnienie czterech podstawowych genotypów związanych z locus *agr* (grupy od I do IV) (Ji i wsp., 1997). Uzyskane przez nasz zespół wyniki

dowodzą, że grupowanie szczepów na podstawie opisywanych genotypów koreluje z ich statystycznie różną odpowiedzią na inaktywację fotodynamiczną. Co więcej, wykrycie kilkudziesięciu polimorfizmów w obrębie locus *agr*, pozwoliła na identyfikację specyficznych polimorfizmów warunkujących różną odpowiedź *S. aureus* na PDI. Na podstawie uzyskanych wyników wysnuto hipotezę, że locus *agr* może być czynnikiem genetycznym warunkującym szczepowo-zależną odpowiedź *S. aureus* na fotoinaktywację.

W związku z tym, że system *agr* reguluje ekspresję licznych genów, włączając geny kodujące białka związane ze ścianą komórkową bakterii, białka wydzielane pozakomórkowo, czy białka związane z produkcją biofilmu, trudno jest zidentyfikować specyficzną ścieżkę regulacyjną systemu *agr*, która mogłaby bezpośrednio wpływać na poziom wrażliwości *S. aureus* na PDI. Możemy jedynie wysnuć hipotezę, że oznaczone polimorfizmy locus *agr* mogą wpływać na poziom transkrypcji, funkcjonalność i stabilność cząsteczki RNAIII, która jest głównym efektoorem systemu *agr*.

Ponadto, w ramach projektu, przeprowadzono wykrywanie aktywności hemolitycznej delta-toksyny, oznaczając tym samym, niezależnie od istniejących polimorfizmów, funkcjonalność systemu *agr*. Uzyskane na tej podstawie wyniki sugerują, że nie tylko polimorfizm, ale również funkcjonalność systemu *agr* wpływa na poziom wrażliwości drobnoustrojów na fotoinaktywację. Niemniej, uzyskane wyniki, mimo wykazanych istotnych statystycznie korelacji, jasno dowodzą, że mechanizm leżący u podstaw szczepowo-zależnej odpowiedzi na PDI jest wieloczynnikowy. Szczepy z tymi samymi polimorfizmami wykazywały całkowicie odmienną wrażliwość na fotoinaktywację, co sugeruje, że również procesy niezależne od systemu *agr* mają udział w warunkowaniu odpowiedzi *S. aureus* na PDI.

Główne osiągnięcia poznawcze

Podsumowując, wyniki uzyskane w tej pracy umożliwiły:

- wykazanie istotnej roli systemu *agr* w warunkowaniu odpowiedzi *S. aureus* na inaktywację fotodynamiczną,
- identyfikację polimorfizmów locus *agr* warunkujących określony poziom wrażliwości drobnoustrojów na fotoinaktywację,
- wykazanie wpływu funkcjonalności systemu *agr* na szczepowo-zależną odpowiedź *S. aureus* na PDI,
- rozwój badań nad opracowaniem strategii prowadzącej do zwiększenia skuteczności PDI; proponowana strategia oparta jest na ingerencji w proces *quorum sensing* (warunkujący funkcjonowanie systemu *agr*), prowadzącej do inaktywacji systemu *agr*.

Publikacja 4: A. Rapacka-Zdonczyk, A. Rhod Larsen, J. Empel, A. Patel, M. Grinholc. **Association of susceptibility to photodynamic oxidation and the genetic background of *Staphylococcus aureus*.** *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2014; 33(4): 577-86

W pracy przedstawiono wyniki badań, które doprowadziły do identyfikacji struktur klonalnych *S. aureus* związanych z różną wrażliwością drobnoustrojów na inaktywację fotodynamiczną. Doświadczenia były prowadzone w ramach kierowanego przeze mnie projektu „Związek polimorfizmu genu globalnej regulacji (*agr*), chromosomalnej kasety gronkowcowej *mec* (*SCCmec*) oraz obecności leukocydyny Panton-Valentine z zakażeniami gronkowcowymi oraz odpowiedzi *Staphylococcus aureus* na fotoinaktywację farmakologiczną” (grant NCN nr 1651/B/P01/2010/39), realizowanego w latach 2010-2013.

Istnienie fenotypów drobnoustrojów wykazujących zmniejszoną wrażliwość na inaktywację fotodynamiczną jest jednym z jej podstawowych ograniczeń. Warto w tym miejscu wspomnieć, że *de facto* w literaturze naukowej nie opisuje się mechanizmu oporności na PDI a jedynie istnienie fenotypów o zmniejszonej wrażliwości na fotoinaktywację. Oznacza to, że stosując bardziej rygorystyczne warunki reakcji takie jak zwiększenie dawki napromieniowania czy zwiększenie stężenia fotouczulacza, można uzyskać efekt bakteriobójczy PDI wobec drobnoustrojów wykazujących fenotyp o zwiększonej oporności. Niemniej, istnienie tego typu fenotypów wymusza poszukiwanie markerów diagnostycznych, które umożliwiłyby szybką identyfikację szczepów, wobec których trzeba zastosować bardziej rygorystyczny protokół inaktywacji fotodynamicznej celem ich zwalczania. Jest to niezwykle istotne z klinicznego punktu widzenia i stanowi ważną strategię w walce ze szczepowo-zależną odpowiedzią drobnoustrojów na PDI. W związku z powyższym, w prezentowanej pracy skupiono się na analizie epidemiologicznej, której celem było poszukiwanie istotnych statystycznie korelacji między genotypem szczepów *S. aureus* a ich wrażliwością na fotoinaktywację.

Wyniki uzyskane w poprzednich badaniach sugerowały, że populacja wielolekoopornych szczepów *S. aureus* (ang. methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) charakteryzuje się podwyższonym odsetkiem fenotypów z wyższą opornością na PDI w porównaniu do populacji szczepów lekowrażliwych (Grinholc i wsp., 2008). W związku z tym, w prezentowanej pracy, analizie poddano związek odpowiedzi *S. aureus* na PDI z typem gronkowcowej kasety chromosomalnej *mec* (ang. *staphylococcal cassette chromosome mec*, *SCCmec*), warunkującej wielolekooporność szczepów MRSA. Wyniki uzyskane w ramach opisywanej pracy wykazały brak korelacji między typem kasety *SCCmec* a wrażliwością szczepów *S. aureus* na fotoinaktywację. Na tej podstawie wysnuto hipotezę, że obserwowany wyższy odsetek szczepów z podwyższoną opornością na PDI w populacji szczepów wielolekoopornych jest wynikiem działania czynników niezależnych od mechanizmów oporności antybiotykowej.

W dalszej kolejności przeprowadzono analizę genomu szczepów *S. aureus* w oparciu o identyfikację kompleksów klonalnych (ang. *clonal complex*, CC) i sekwencję genu *spa*, kodującego gronkowcowe białko A (ang. *staphylococcal protein A*, *spa*). Tak oznaczona klonalność szczepów *S. aureus* wykazała istotny związek z wrażliwością drobnoustrojów na fotoinaktywację. Uzyskane wyniki wykazały, że szczepy z kompleksem klonalnym CC1 grupują się w populacji szczepów o podwyższonej oporności na PDI. Co więcej, szczepy o wysokiej wrażliwości na fotoinaktywację należały do konkretnych klonów epidemiologicznych o kompleksem klonalnym CC30 i typach *spa* t015 i t051. Uzyskane wyniki w sposób jednoznaczny pokazują, że opracowanie narzędzi diagnostycznych identyfikujących szczepy drobnoustrojów o podwyższonej oporności na fotoinaktywację jest możliwe w oparciu o badanie tła genetycznego mikroorganizmów.

Główne osiągnięcia poznawcze

Podsumowując, wyniki uzyskane w tej pracy umożliwiły:

- identyfikację kompleksów klonalnych i typów *spa* związanych z określoną wrażliwością *S. aureus* na fotoinaktywację,
- opracowywanie narzędzi diagnostycznych, opartych na badaniu tła genetycznego drobnoustrojów, identyfikujących fenotypy o podwyższonej oporności na PDI,
- zaproponowanie strategii walki ze szczepami o podwyższonej oporności na inaktywację fotodynamiczną opartej na ich precyzyjnej diagnostyce i stosowaniu bardziej rygorystycznych protokołów PDI.

Publikacja 5: M. Grinholc, A. Rapacka-Zdonczyk, B. Rybak, F. Szabados, K.P. Bielawski. **Multiresistant strains are as susceptible to photodynamic inactivation as their naïve counterparts: protoporphyrin IX-mediated photoinactivation reveals differences between methicillin resistant and methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* strains.** *Photomedicine and Laser Surgery*, 2014; 32(3): 121-9

W pracy przedstawiono wyniki badań, które doprowadziły do ostatecznego potwierdzenia hipotezy dotyczącej braku zależności między skutecznością inaktywacji fotodynamicznej a stopniem lekooporności drobnoustrojów. Doświadczenia były prowadzone w ramach kierowanego przeze mnie projektu „Związek polimorfizmu genu globalnej regulacji (*agr*), chromosomalnej kasety gronkowcowej *mec* (*SCCmec*) oraz obecności leukocydyny

Panton-Valentine z zakażeniami gronkowcowymi oraz odpowiedzią Staphylococcus aureus na fotoinaktywację farmakologiczną (grant NCN nr 1651/B/P01/2010/39) realizowanego w latach 2010-2013.

Jednym z podstawowych założeń inaktywacji fotodynamicznej jest możliwość uzyskania efektu bakteriobójczego PDI w stosunku do zarówno wielolekoopornych jak i lekowrażliwych szczepów bakterii. Zakłada się, że stopień lekowrażliwości drobnoustrojów nie wpływa na skuteczność inaktywacji fotodynamicznej. Założenie to jest powielane w literaturze od wielu dekad, jednakże do czasu powstania niniejszej pracy brak było jasnych dowodów na jej potwierdzenie. Przedstawiona do oceny praca stanowi meta-analizę postawionej hipotezy w oparciu o badanie 424 szczepów *S. aureus* wykazujących możliwie szeroki wachlarz mechanizmów oporności na rutynowo stosowane chemioterapeutyki oraz różny stopień lekowrażliwości.

Uzyskane wyniki dostarczają niezbitych dowodów potwierdzających niezależność skuteczności fotoinaktywacji od istniejących mechanizmów lekooporności *S. aureus* oraz stopnia lekowrażliwości na stosowane chemioterapeutyki. W każdej grupie szczepów, klasyfikowanej pod względem mechanizmu lekooporności oraz stopnia lekooporności, identyfikowano izolaty wykazujące zarówno wysoką wrażliwość jak i wysoką oporność na inaktywację fotodynamiczną.

Uzyskane wyniki wykazały, że szczepy wielolekooporne (MRSA) charakteryzują się generalnie podwyższoną opornością na inaktywację fotodynamiczną w porównaniu do szczepów lekowrażliwych (MSSA). Obserwowane zjawisko jest efektem niezależnym od mechanizmów oporności antybiotykowej i stopnia lekowrażliwości drobnoustrojów, niemniej sugeruje istnienie, innych niż lekowrażliwość, różnic między tymi populacjami *S. aureus*. Jednym z możliwych wyjaśnień tego zjawiska mogą być różnice w budowie ściany komórkowej szczepów MRSA i MSSA opisywane przez prof. Fourniera z Paryża (Fournier i wsp., 1989), który wykazuje istnienie otoczki polisacharydowej na powierzchni komórek MRSA. Obecność takiej otoczki mogłaby wpływać na stopień oddziaływania fotouczulacza ze ścianą komórkową drobnoustrojów i zmniejszać efekt fototoksyczny produkowanych w wyniku reakcji fotodynamicznej reaktywnych form tlenu. Kolejnym możliwym wyjaśnieniem opisywanego zjawiska mogłyby być różnice w produkcji biofilmu między szczepami MRSA i MSSA. Wiadomym jest, że poziom produkcji biofilmu wpływa na skuteczność PDI. Niemniej, w badanych populacjach szczepów MRSA i MSSA, rozkład silnych i słabych producentów biofilmu był niemal identyczny.

Główne osiągnięcia poznawcze

Podsumowując, wyniki uzyskane w tej pracy umożliwiły:

- potwierdzenie hipotezy o niezależności skuteczności fotoinaktywacji od stopnia lekooporności drobnoustrojów oraz mechanizmów oporności antybiotykowej,
- wykazanie istnienia różnic innych niż lekowrażliwość między populacjami szczepów MRSA i MSSA gronkowca złocistego,
- wykazanie, że szczepy wielolekooporne *S. aureus* (MRSA) charakteryzują się statystycznie istotną różnicą w odpowiedzi na PDI w stosunku do szczepów MSSA.

Publikacja 6: M. Grinholc, J. Nakonieczna, G. Fila, A. Taraszkiewicz, A. Kawiak, G. Szewczyk, T. Sarna, L. Lilge, K.P. Bielawski. **Antimicrobial Photodynamic Therapy with Fulleropyrrolidine: Photoinactivation Mechanism of *Staphylococcus Aureus*, *In vitro* and *In vivo* Studies.** Applied Microbiology and Biotechnology, 2015; 99(9): 4031-4043

W pracy przedstawiono wyniki badań dotyczące biofizycznej charakterystyki wysoce efektywnego związku fotouczulającego, jednokationowej pochodnej fuleropirolidyny oraz mechanizmu jej działania w reakcji fotodynamicznej. Doświadczenia były prowadzone w ramach kierowanego przeze mnie projektu „*Nanobiotechnologia jako innowacyjne podejście w leczeniu zakażeń ran oparzeniowych*” (grant NCBiR, Lider nr LIDER/32/36/L-2/10/NCBiR/2011) realizowanego w latach 2011-2015.

Istnienie fenotypów drobnoustrojów o podwyższonej oporności na fotoinaktywację wymusza poszukiwanie nowych związków fotouczulających, odznaczających się wysoką skutecznością bakteriobójczą. Uwaga badaczy skupia się na różnych grupach związków chemicznych, w tym na kationowych pochodnych fulerenu C₆₀, które charakteryzują się wieloma cechami skutecznych fotouczulaczy. W prezentowanej pracy podjęto próbę syntezy jednokationowej pochodnej fulerenu C₆₀, *N*-metylo-fuleropirolidyny. Związek ten scharakteryzowano pod kątem cech fizykochemicznych oraz oznaczono podstawowy mechanizm działania reakcji fotodynamicznej z jego udziałem. Ponadto, w ramach badań *in vitro* i *in vivo*, wykorzystując myszy model rany zakażonej szczepem MRSA *S. aureus*, wykazano wysoką aktywność fototoksyczną badanego związku wobec mikroorganizmów Gram-dodatnich.

Charakterystyka biofizyczna badanego związku wykazała, że w roztworach wodnych prowadzi on do produkcji reaktywnych form tlenu, z niewielką ilością tlenu singletowego. Obserwacja taka jest zgodna z badaniami prof. Yamakoshi z Tokio wykazującymi, że wzbudzone

światłem pochodne fulerenu generują reaktywne formy tlenu charakterystyczne dla mechanizmu reakcji fotodynamicznej typu I (Yamakoshi i wsp., 2003). Z drugiej strony, badania dr Pawła Mroza (Mroz i wsp., 2007) wykazały, że jednokationowe pochodne fulerenu mogą prowadzić do produkcji zarówno reaktywnych form tlenu charakterystycznych dla reakcji typu I jak i rodników odpowiedzialnych za efekt cytotoksyczny w mechanizmie typu II. Rozbieżność ta wynika z użycia różnych rozpuszczalników w badaniach biofizycznych. Badany przez nas związek w rozpuszczalnikach polarnych oraz w micelach tworzących zarówno środowisko hydrofilowe jak i hydrofobowe wykazywał znaczną produkcję tlenu singletowego, porównywalną z różem Bengalskim, który jest jednym z silniejszych generatorów tlenu singletowego w reakcji fotodynamicznej. Zakładając, że badany fotouczulacz wywiera efekt fototoksyczny głównie poprzez oddziaływanie z osłonami komórkowymi *S. aureus*, możemy stwierdzić, że w tym mikrośrodku komórki prowadzi on głównie do produkcji tlenu singletowego. Niemniej, na podstawie uzyskanych wyników nie można wykluczyć powstawania innych reaktywnych form tlenu charakterystycznych dla mechanizmu typu I.

Generalnie, kationowe pochodne fulerenu odznaczają się wysokim poziomem toksyczności, z wyłączeniem jednokationowych pochodnych fulerenu C_{60} . W przypadku badanego związku wykazano typowy poziom zależnej od światła toksyczności oraz niski poziom cytotoxyczności, bez udziału światła, wobec komórek bakteryjnych i eukariotycznych.

W prezentowanej pracy po raz pierwszy opisano mechanizm działania jednokationowych pochodnych fulerenu C_{60} . Generalnie zakłada się, że podstawowym celem komórkowym inaktywacji fotodynamicznej są osłony komórkowe, w których, poprzez produkcję reaktywnych form tlenu, indukowane są zmiany prowadzące do wycieku istotnych składników komórkowych z wnętrza bakterii, utraty integralności błony komórkowej oraz śmierci komórki. W przypadku przeciwbakteryjnej inaktywacji fotodynamicznej nie wykazano dotąd, że jednokationowe pochodne fulerenu indukują uszkodzenia błony komórkowej. Wyniki opisywane po raz pierwszy w prezentowanej pracy dowodzą, że badany fotouczulacz z pewnością prowadzi do zmian strukturalnych w błonie komórkowej *S. aureus*, jako że obserwowana jest istotna redukcja integralności osłon komórkowych. Sugeruje to, że błona komórkowa jest *de facto* pierwszorzędnym celem komórkowym inaktywacji fotodynamicznej z użyciem fuleropirolidyny i odgrywa istotną rolę w indukowaniu śmierci komórek *S. aureus*.

Pierwszym opisywanym biologicznym zastosowaniem fotowzbudzonych fulerenów była indukcja cięcia nici DNA pod wpływem światła (Ikeda i wsp., 2007). Iwamoto i wsp. również zaobserwowali cięcie nici DNA pod wpływem działania funkcjonalizowanych cząsteczek fulerenu C_{60} (Iwamoto and Yamakoshi, 2006). Taka aktywność pochodnych fulerenu może prowadzić, pod wpływem fotowzbudzenia, do uszkodzenia materiału genetycznego zarówno w komórkach

pro- jak i eukariotycznych. W istocie, w badaniach zespołu prof. Sera z Japonii wykazano, że wzbudzone światłem pochodne fulerenu wykazują aktywność mutagenną wobec komórek *Salmonella* TA102, TA104 i YG3003, które stanowią ważny element badań nad mutagennością związków (Sera i wsp., 1996). Badany w niniejszej pracy fotouczulacz wykazał brak produkcji tlenu singletowego w rozpuszczalnikach polarnych, co tłumaczy brak lub niższy od poziomu wykrywania stopień uszkodzenia materiału genetycznego. Uzyskane wyniki nie wykazały indukowania uszkodzeń materiału genetycznego pod wpływem działania fuleropirolidyny, co sugeruje, że związek ten nie powinien wywierać żadnego efektu mutagennego w stosunku do komórek drobnoustrojów oraz komórek gospodarza.

Ponadto, w prezentowanej pracy opisano badania *in vivo* wykorzystujące myszy model rany zakażonej bioluminescencyjnym szczepem MRSA, który jest zmodyfikowaną genetycznie pochodną szczepu ATCC 33591. W opisanym modelu, zakażoną MRSA ranę traktowano fuleropirolidyną, a następnie poddano działaniu światła prowadzącego do wzbudzenia badanego związku. W określonych odstępach czasu monitorowano obciążenie rany drobnoustrojami, poprzez pomiar sygnału bioluminescencyjnego. Uzyskane wyniki potwierdziły skuteczność badanego związku w fotoinaktywacji *S. aureus*. Traktowanie ran zakażonych inaktywacją fotodynamiczną pozwoliło zredukować liczbę bakterii i znacznie spowolnić proces rozwoju zakażenia umożliwiając efektywne działanie odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Niemniej, uzyskane wyniki wykazały, że efekt terapeutyczny inaktywacji fotodynamicznej z użyciem badanego związku ma charakter przejściowy i nie eliminuje rozwoju zakażenia w piątym dniu od traktowania zakażonej rany inaktywacją fotodynamiczną. Uzyskane wyniki dowodzą, że badany fotouczulacz odznacza się wysokim potencjałem w walce z zakażeniami gronkowcowymi, niemniej konieczna jest dalsza modyfikacja chemiczna badanego związku w celu identyfikacji pochodnej fulerenu C_{60} charakteryzującej się zwiększoną aktywnością bakteriobójczą.

Główne osiągnięcia poznawcze

Podsumowując, wyniki uzyskane w tej pracy umożliwiły:

- biofizyczną charakterystykę, wysoce efektywnej w warunkach *in vitro*, kationowej pochodnej fulerenu C_{60} ,
- wykazanie bezpieczeństwa i niskiej toksyczności badanego związku wobec ludzkich komórek skóry, tj. keratynocytów,
- identyfikację podstawowego mechanizmu działania jednokationowej pochodnej fulerenu; związek ten wywiera efekt fototoksyczny głównie poprzez indukcję uszkodzeń błony komórkowej,

- wykazanie braku uszkodzeń materiału genetycznego indukowanych działaniem badanego związku pod wpływem światła, co sugeruje niską mutagenność analizowanego fotouczulacza,
- wykazanie w badaniach *in vivo* istotnego potencjału fuleropirolidyny w walce z zakażeniami gronkowcowymi.

Publikacja 7: M. Grinholc, A. Rodziewicz, K. Forys, A. Rapacka-Zdonczyk, A. Kawiak, A. Domachowska, G. Golunski, Ch. Wolz, L. Mesak, K. Becker, K.P. Bielawski. **Fine-tuning *recA* expression in *Staphylococcus aureus* for antimicrobial photoinactivation: importance of photo-induced DNA damage in the photoinactivation mechanism.** Applied Microbiology and Biotechnology, 2015; 99(21): 9161-76

W pracy przedstawiono wyniki badań, które doprowadziły do określenia istotnej roli indukowanych reakcją fotodynamiczną uszkodzeń materiału genetycznego w mechanizmie śmierci drobnoustrojów. Doświadczenia były prowadzone w ramach kierowanego przeze mnie projektu „*Nanobiotechnologia jako innowacyjne podejście w leczeniu zakażeń ran oparzeniowych*” (grant NCBiR, Lider nr LIDER/32/36/L-2/10/NCBiR/2011) realizowanego w latach 2011-2015. Część finansowania pozyskano z grantu UG nr 538-M036-B430-14 kierowanego przez mgr Aleksandrę Rapacką-Zdonczyk, której jestem promotorem pomocniczym w otwartym przewodzie doktorskim.

Powszechnie przyjmuje się, że uszkodzenia materiału genetycznego w procesie fotoinaktywacji pojawiają się w traktowanych letalnie komórkach drobnoustrojów. Wiele doniesień literaturowych opisuje fotoindukowane uszkodzenia materiału genetycznego w warunkach redukujących liczbę bakterii o ponad 3 jednostki w skali \log_{10} . Stąd, rola DNA, jako celu komórkowego w reakcji fotodynamicznej, jest pomijana na rzecz białek budujących błonę komórkową drobnoustrojów, które w dalszym ciągu uznawane są za pierwszorzędny cel fotoinaktywacji. W prezentowanej pracy podjęto próbę określenia faktycznego udziału uszkodzeń DNA w mechanizmie fotoindukowanej śmierci drobnoustrojów.

Uzyskane wyniki jasno dowodzą, że do uszkodzeń materiału genetycznego dochodzi również u bakterii traktowanych fotoinaktywacją w dawkach sub-letalnych, w których redukcja liczby bakterii nie przekracza $1 - 2 \log_{10}$. Ponadto wykazano, że uszkodzenia DNA indukowane są w reakcji fotodynamicznej bez naruszenia ciągłości i integralności błony komórkowej drobnoustrojów, sugerując, że poprzez aktywację mechanizmów naprawy DNA, bakteria może wyeliminować powstałe uszkodzenia materiału genetycznego i uniknąć śmierci komórki.

W przypadku fuleropirolidyny, opisywanej w poprzedniej publikacji, nie zaobserwowano powstawania uszkodzeń materiału genetycznego. Efekt ten najprawdopodobniej wynika z niskiej penetracji fotouczulacza do wnętrza komórki bakteryjnej, jako że w wyniku jego działania obserwuje się wysoki stopień uszkodzenia oston komórkowych i naruszenie integralności błony komórkowej. Dla pozostałych badanych związków fotouczulających tj. róż bengalski, nowy błękit metylenowy, ftalocyjanina cynkowa, kationowa pochodna protoporfiryny oraz porfiryny endogenne, wykazano indukowanie uszkodzeń materiału genetycznego *S. aureus* w wyniku reakcji fotodynamicznej.

W prezentowanej pracy podjęto próbę oceny istotności fotowzbudzonych uszkodzeń materiału genetycznego w procesie fotoinaktywacji, poprzez analizę odpowiedzi SOS u *S. aureus* na pojawiające się uszkodzenia nici DNA. Uzyskane wyniki dowodzą, że redukując poziom ekspresji genu *recA*, albo prowadząc do jego uszkodzenia, można w znaczny sposób zwiększyć efekt bakteriobójczy fotoinaktywacji. Sugeruje to, że inaktywacja fotodynamiczna indukuje powstawanie istotnych uszkodzeń materiału genetycznego, które w sytuacji zablokowanej odpowiedzi systemów naprawy DNA, są wystarczającym czynnikiem prowadzącym do śmierci komórki. Co więcej wykazano, że w wyniku fotowzbudzonych uszkodzeń DNA dochodzi do zwiększenia ekspresji genu *recA* oraz podwyższenia poziomu białka RecA w komórkach drobnoustrojów. Badając odpowiedź SOS u *S. aureus* wykazano, że aktywność jedynie białka RecA, a nie LexA, jest niezbędna w odpowiedzi bakterii na inaktywację fotodynamiczną. Potwierdzono to badając częstotliwość mutacji u *S. aureus*, która w wyniku fotoinaktywacji pozostaje niezmienna na skutek braku ekspresji *umuC* kontrolowanej aktywnością białka LexA. Obserwowanych zjawisk ponownie nie odnotowano dla bakterii traktowanych fuleropirolidyną. Uzyskane wyniki mają istotną wartość kliniczną. Sugerują one, że poprzez użycie czynników prowadzących do zmniejszonej ekspresji *recA*, np. nowobiocyny, można zwiększyć efektywność bakteriobójczą fotoinaktywacji zarówno w przypadku endo- jak i egzogennych fotouczulaczy.

Mutacje odgrywają ważną rolę w rozwoju i nabywaniu mechanizmów oporności antybiotykowej przez *S. aureus* i inne gronkowce. Pojedyncze mutacje mogą skutkować istotnym poziomem oporności na różne rodzaje chemioterapeutyków takich jak rifampicyna, mupirocyna, kwas fusydowy, czy fluorochinolony. Ponadto, akumulacja mutacji w wielu *loci* może prowadzić do oporności na glikopeptydy. W związku z powyższym, identyfikacja każdego czynnika skutkującego podwyższeniem częstotliwości mutacji ma ogromne znaczenie. Tym samym, ważnym celem prezentowanych badań było stwierdzenie czy inaktywacja fotodynamiczna może prowadzić do zmian w częstotliwości mutacji i rozwoju oporności antybiotykowej. Uzyskane wyniki dowodzą, że mimo powstających w wyniku reakcji fotodynamicznej uszkodzeń DNA i aktywacji białka RecA, inaktywacja fotodynamiczna nie prowadzi do zwiększonej częstotliwości mutacji u *S. aureus*. Najprawdopodobniej jest to

wynikiem braku ekspresji *umuC*, który stanowi element późnej odpowiedzi SOS. Podobnie, wykorzystując test Ames z szczepem *Salmonella Typhimurium* TA98, wykazano, że badane związki fotouczulające i warunki reakcji fotodynamicznej, nie mają aktywności mutagennej. Jest to pierwsze doniesienie opisujące tego typu zjawiska w reakcji fotodynamicznej drobnoustrojów.

Główne osiągnięcia poznawcze

Podsumowując, wyniki uzyskane w tej pracy umożliwiły:

- określenie istotnej roli uszkodzeń DNA w mechanizmie fotoindukowanej śmierci drobnoustrojów,
- wykazanie, że w przypadku aktywności systemów naprawczych w komórkach bakterii, drobnoustroje są w stanie wyeliminować powstałe uszkodzenia materiału genetycznego i uniknąć śmierci,
- wykazanie, że efekt bakteriobójczy fotoinaktywacji zależy od aktywności białka RecA,
- wykazanie, że stosując czynniki hamujące ekspresję genu *recA*, można znacznie zwiększyć aktywność bakteriobójczą inaktywacji fotodynamicznej; podejście to może stanowić alternatywną strategię w walce z fenotypami drobnoustrojów wykazującymi podwyższoną oporność na PDI.

PODSUMOWANIE

Podsumowując, w ramach osiągnięcia naukowego opracowano strategię walki ze zjawiskiem szczepowo-zależnej odpowiedzi drobnoustrojów na inaktywację fotodynamiczną. Proponowane podejście prowadzi do uzyskania bakteriobójczego efektu fotoinaktywacji względem drobnoustrojów wykazujących podwyższoną oporność na inaktywację fotodynamiczną (PDI).

Opracowana strategia zakłada:

1) Identyfikację drobnoustrojów o podwyższonej oporności na inaktywację fotodynamiczną w oparciu o:

- a) badanie genotypu mikroorganizmów,
 - i. w przypadku *S. aureus* oznaczenie kompleksu klonalnego (CC) lub polimorfizmu genu *spa*
- b) badanie polimorfizmu locus *agr*,

- c) badanie *in vitro* dotyczące skuteczności PDI wykorzystującej związki fotouczulające z różnych grup chemicznych,
 - i. w ramach opracowanej strategii proponuje się użycie fotouczulaczy z grup fenotiazyn (np. nowy błękit metylenowy, NMB), ftalocyjanin (np. ftalocyjanina cynkowa, ZnPc), porfiryn (np. 5,10,15,20-tetrakis(4-N-metylopirydilo)-porfiryna, TMPyP), pochodnych fulerenu C₆₀ (np. fuleropirolidyna) oraz różu Bengalskiego.

2) Zastosowanie bardziej rygorystycznych protokołów inaktywacji fotodynamicznej takich jak:

- a) wyższe stężenie fotouczulacza,
- b) zwiększona gęstość mocy napromieniowania,
- c) wykorzystanie mieszaniny związków fotouczulających,
- d) sekwencyjne użycie fotoinaktywacji i nanocząstek srebra,
- e) wykorzystanie czynników hamujących ekspresję genu *recA*; np. aminokumaryn takich jak nowobiocyna.

Opracowana strategia umożliwi eradykację drobnoustrojów o podwyższonej oporności na fotoinaktywację.

Wyniki przedstawione w publikacjach wchodzących w skład osiągnięcia naukowego stanowią nie tylko istotny wkład w wiedzę o mechanizmach inaktywacji fotodynamicznej drobnoustrojów, lecz otwierają także perspektywy nowych badań dotyczących strategii walki z fenotypami drobnoustrojów wykazującymi podwyższoną oporność na fotoinaktywację. Uzyskane wyniki spotkały się z zainteresowaniem społeczności naukowej, czego wyrazem jest ich cytowanie w pracach innych badaczy oraz fakt otrzymania przeze mnie zaproszenia do wygłoszenia wykładu plenarnego na temat mechanizmów fotoinaktywacji wykorzystującej fotouczulacze z grup porfiryn i ftalocyjanin – podczas „**International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (ICPP)**”, Nankin, Chiny, 3-8 lipca 2016 roku.

Realizacja niniejszego osiągnięcia nie byłaby możliwa bez wykorzystania zarówno klasycznych jak i najnowszych metod z zakresu biochemii i biologii molekularnej. Wymagało to ode mnie zorganizowania pracy zespołu zajmującego się przeciwbakteryjną inaktywacją fotodynamiczną – jako pierwszy wprowadziłem tę tematykę do Katedry Biotechnologii Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed – oraz nawiązania szeregu współprac z ośrodkami krajowymi i zagranicznymi. Należy tutaj podkreślić, że zdecydowana większość przedstawionych wyników została uzyskana w Zakładzie Diagnostyki Molekularnej Katedry Biotechnologii MWB UG i GUMed, w którym jestem zatrudniony od października 2009 r.

PLANY NAUKOWE

W nadchodzących latach planuję realizację projektów badawczych dotyczących następujących zagadnień:

- określenie potencjału inaktywacji fotodynamicznej w eradykacji nosicielstwa *Streptococcus agalactiae* w drogach rodnych oraz wyznaczenie takich parametrów reakcji fotodynamicznej, które charakteryzowałyby się dużym bezpieczeństwem wobec komórek gospodarza oraz nie naruszały istniejącej flory fizjologicznej pochwy. Badania te będą miały na celu opracowanie alternatywnej w stosunku do antybiotykoterapii metody profilaktyki okołoporodowych zakażeń noworodków,
- identyfikacja oddziaływań (synergistycznych, addytywnych oraz antagonistycznych) inaktywacji fotodynamicznej z rutynowo stosowanymi chemioterapeutykami oraz poznanie mechanizmów leżących u podstaw wzajemnych oddziaływań. Badania te będą miały na celu poznanie potencjału inaktywacji fotodynamicznej w komplementacji istniejących opcji terapeutycznych zakażeń bakteryjnych oraz spowolnienie tempa narastania lekooporności wśród drobnoustrojów stanowiących najważniejsze czynniki etiologiczne zakażeń,
- identyfikacja molekularna procesów zachodzących zarówno w komórkach prokariotycznych jak i eukariotycznych pod wpływem reakcji fotodynamicznej oraz ocena potencjału genotoksycznego fotoinaktywacji. Badania te będą miały na celu poznanie procesów zachodzących w komórkach traktowanych inaktywacją fotodynamiczną oraz identyfikację celów komórkowych fotoinaktywacji, co będzie pomocne w projektowaniu skutecznych protokołów inaktywacji drobnoustrojów.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.

Osiągnięcia naukowo-badawcze przed uzyskaniem stopnia doktora.

Urodziłem się 16 czerwca 1980 roku w Gdyni. W latach 1995 – 1999 uczęszczałem do Salezjańskiego Liceum Ogólnokształcącego w Rumii, a następnie podjąłem studia na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii, które ukończyłem z wyróżnieniem w 2004 roku. Swoją pracę naukową rozpocząłem realizując projekt badawczy pod opieką dr Julianny Kurlendy, Kierownika Zakładu Bakteriologii Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego w Gdańsku. Przeprowadzone w tych latach badania dotyczyły zakażeń szpitalnych wywołanych metycylinoopornymi szczepami *Staphylococcus aureus*. Treść tych badań była podstawą mojej pracy magisterskiej wykonywanej w Katedrze Biotechnologii Międzyuczelnianego Wydziału

Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Wyniki tych prac opublikowano w czasopismach o zasięgu międzynarodowym:

- **M. Grinholc**, G. Węgrzyn, J. Kurlenda. Evaluation of biofilm production and prevalence of the *icaD* gene in methicillin resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with nosocomial infections and carriers. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 2007 Aug; 50(3): 375-9
- J. Kurlenda, **M. Grinholc**, K. Jasek, G. Węgrzyn. RAPD typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a 7-year experience in a Polish hospital. *Medical Science Monitor*, 2007; 13(6): MT13-18
- J. Kurlenda, **M. Grinholc**, G. Węgrzyn. Presence of *cna*, *emp* and *pls* genes and pathogenicity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008; 24: 591-94

Po ukończeniu pracy magisterskiej, w roku 2004 rozpocząłem realizację kolejnego projektu naukowego kontynuując badania dotyczące metycylinoopornych szczepów *Staphylococcus aureus* w ramach Studium Doktoranckiego na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego pod bezpośrednią opieką pani Prof. dr hab. Anny Jadwigi Podhajskiej. Badania przeprowadzałem we współpracy z prof. Alfredą Graczyk z Wojskowej Akademii Technicznej w Warszawie oraz prof. Janiną Legendziewicz z Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego i skoncentrowałem się na badaniu terapii fotodynamicznej jako alternatywnej metodzie walki z tymi wielolekoopornymi patogenami człowieka. Badania te stanowiły część mojej rozprawy doktorskiej, obronionej z wyróżnieniem, wykonywanej w Zakładzie Diagnostyki Molekularnej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii. Wyniki tych prac zostały opublikowane w czasopismach o zasięgu międzynarodowym oraz prezentowane na kilku konferencjach krajowych i zagranicznych:

- **M. Grinholc**, B. Szramka, K. Olender, A. Graczyk. Bactericidal effect of photodynamic therapy against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain with the use of various porphyrin photosensitizers. *Acta Biochimica Polonica*, 2007; 54(3): 665-70
- **M. Grinholc**, B. Szramka, J. Kurlenda, A. Graczyk, K.P. Bielawski. Bactericidal effect of photodynamic inactivation against MRSA and MSSA is strain-dependent. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2008; 90(1): 57-63
- **M. Grinholc**, A. Kawiak, J. Kurlenda, A. Graczyk, K.P. Bielawski. Photodynamic effect of protoporphyrin diarginate (PPArg₂) on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and human dermal fibroblasts. *Acta Biochimica Polonica*, 2008; 55(1): 85-90

- A. Jurczak, B. Szramka, **M. Grinholc**, J. Legendziewicz, K.P. Bielawski. Photodynamic effect of lanthanide derivatives of *meso*-Tetra(*N*-methyl-4-pyridyl)porphine against *Staphylococcus aureus*. Acta Biochimica Polonica, 2008; 55: 581-5

Będąc w stałej współpracy z dr Julianną Kurlendą, niezależnie od projektu pracy doktorskiej, uczestniczyłem w badaniach dotyczących wszelkiego rodzaju zakażeń szpitalnych. Wyniki zakończonych projektów zostały opublikowane w czasopismach o zasięgu międzynarodowym:

- J. Kurlenda, **M. Grinholc**, J. Krzysztoń-Russjan, K. Wiśniewska. Epidemiological Investigation of nosocomial outbreak of staphylococcal skin diseases in neonatal ward. Antonie Van Leeuwenhoek, 2009; 95: 387-94
- J. Kurlenda, A. Kaminska-Pabich, **M. Grinholc**. Neonatal intrauterine infection with *Neisseria meningitidis* B. Clinical Pediatrics, 2010; 49(4): 388-90

Prowadzone przeze mnie badania doprowadziły ponadto do opisania po raz pierwszy zjawiska szczepowo-zależnej odpowiedzi komórek bakteryjnych na inaktywację fotodynamiczną. Dzięki uzyskanym wynikom udowodniłem, że w obrębie tego samego gatunku, efektywność fotoinaktywacji może różnić się w sposób znaczący, od szczepów wysoce opornych do szczepów bardzo podatnych na inaktywację fotodynamiczną. W związku z powyższym, bardzo istotną tematyką moich badań naukowych oraz prowadzonych prac jest poszukiwanie i próba wyjaśnienia mechanizmów leżących u podstaw szczepowo-zależnej wrażliwości na fotoinaktywację. Identyfikacja takich mechanizmów może przyczynić się do rozwoju strategii prowadzącej do zniesienia obserwowanej oporności na inaktywację fotodynamiczną.

Większość opisanych powyżej badań była finansowana z grantu KBN „Czynniki sprzyjające rozwojowi zakażeń gronkowcowych oraz terapia fotodynamiczna (PDT) jako alternatywna metoda ich leczenia” (Nr N N401237034, realizowany w latach 2008-2010, kierownik: prof. dr hab. Krzysztof Piotr Bielawski), którego byłem głównym wykonawcą. Opublikowane prace zostały wyróżnione w roku 2009 nagrodą zespołową Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego za osiągnięcia naukowe i cykl publikacji dotyczący zastosowania nowoczesnych narzędzi biologii molekularnej w diagnozowaniu i terapii chorób zakaźnych, nowotworowych i metabolicznych.

Osiągnięcia naukowo-badawcze po uzyskaniu stopnia doktora.

Obecnie, pojawiająca się i narastająca wielolekooporność mikroorganizmów stanowi ogromne zagrożenie dla zdrowia i życia pacjentów zarówno w Europie jak i na całym świecie. Stąd, tematyka moich badań naukowych skupiała się głównie wokół prac dotyczących rozwoju i powstania alternatywnych opcji terapeutycznych prowadzących do zmniejszenia stosowania antybiotyków oraz zmniejszenia tempa narastania lekooporności. W swojej pracy koncentrowałem się głównie na zakażeniach dermatologicznych, w tym na ranach oparzeniowych, chronicznych i wrzodziejących, które są ciężkimi urazami. Mogą prowadzić one również do śmierci dotkniętych nimi pacjentów. Powstanie efektywnych, szybko działających i tanich opcji terapeutycznych dla tego rodzaju ran przyniosłoby ogromne korzyści zarówno w poprawie jakości życia pacjentów jak i ze względów ekonomicznych.

Kolejnym innowacyjnym podejściem moich badań jest poszukiwanie efektu synergistycznego terapii fotodynamicznej ze stosowanymi rutynowo antybiotykami. **W ramach tego projektu wykazałem, że takie podejście znacząco wzmacnia efekt bakteriobójczy i że de facto istnieje oddziaływanie synergistyczne między inaktywacją fotodynamiczną a niektórymi antybiotykami rutynowo stosowanymi w leczeniu zakażeń bakteryjnych.** Efekt ten prowadzi do całkowitej eradykacji drobnoustrojów i zapobiega ponownemu wzrostowi drobnoustrojów po 24 godzinach od traktowania.

Po uzyskaniu stopnia doktora kontynuowałem prace związane z projektem KBN „Czynniki sprzyjające rozwojowi zakażeń gronkowcowych oraz terapia fotodynamiczna (PDT) jako alternatywna metoda ich leczenia” (Nr N N401237034). Celem naukowym przedstawianego projektu było opracowanie optymalnych warunków inaktywacji fotodynamicznej wielolekoopornych szczepów *Staphylococcus aureus* przy użyciu protoporfiryny IX oraz zbadanie wpływu takich czynników jak: polimorfizm genu globalnej regulacji *agr*, właściwości proteolityczne badanych szczepów *S. aureus*, czy poziom wolnych rodników produkowanych w czasie reakcji fotodynamicznej na efektywność fotoinaktywacji. Głównym celem tego projektu było poszukiwanie genów mających związek z opornością na terapię fotodynamiczną. **W omawianym projekcie pełniłem rolę głównego wykonawcy oraz pomysłodawcy projektu. Opracowałem całą metodykę i przeprowadziłem interpretację wyników.** Uzyskane w projekcie wyniki zostały opublikowane w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym:

- P. Nastały, **M. Grinholc**. Molecular characteristics of Community Acquired Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* strains for clinical medicine. Archives of Microbiology, 2010; 192: 603-617
- **M. Grinholc**, J. Zawacka-Pankau, A. Gwizdek-Wiśniewska, K.P. Bielawski. Evaluation of the role of the pharmacological inhibition of *S. aureus* multidrug resistance pumps and

the variable levels of the uptake of the sensitizer in the strain-dependent response of *S. aureus* to PPA_{g2}-based photodynamic inactivation. *Photochemistry and Photobiology*, 2010; 86(5): 1118-1126

- J. Kurlenda, **M. Grinholc**. Current Diagnostic Tools for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections. *Molecular Diagnosis and Therapy*, 2010; 14: 73-80
- J. Kurlenda, **M. Grinholc**, P. Szweda. Lack of correlation between X region *spa* polymorphism and virulence of methicillin resistant and methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* strains. *Acta Biochimica Polonica*, 2010; 57: 135-138

W kolejnych latach realizowałem badania dotyczące związku polimorfizmu genu globalnej regulacji (*agr*), chromosomalnej kasety gronkowcowej *mec* (*SCCmec*) oraz obecności leukocydyny Panton-Valentine z zakażeniami gronkowcowymi oraz odpowiedzią *Staphylococcus aureus* na fotoinaktywację farmakologiczną (grant MNiSW nr N N405 165139). Cel projektu skupiał się na wpływie wybranych czynników na efektywność fotoinaktywacji w stosunku do *S. aureus*. Badaniu poddany został polimorfizm genu globalnej regulacji *agr*, oraz grupa gronkowcowej kasety chromosomalnej (*SCCmec*). Na podstawie uzyskanych wyników wyznaczono potencjalny marker genetyczny wyznaczający wrażliwość *S. aureus* wobec fotoinaktywacji. **W projekcie pełniłem rolę kierownika projektu. Opracowałem metodykę projektu i byłem jego pomysłodawcą.** Uzyskane wyniki zostały opublikowane w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym:

- **M. Grinholc**, M. Richter, J. Nakonieczna, G. Fila, K.P. Bielawski. The connection between *agr* and *SCCmec* elements of *Staphylococcus aureus* strains and their response to photodynamic inactivation. *Photomedicine and Laser Surgery*, 2011; 29(6): 413-419
- J. Kurlenda, **M. Grinholc**. Alternative therapies in *Staphylococcus aureus* diseases. *Acta Biochimica Polonica*, 2012; 59(2): 171-184
- J. Nakonieczna, **M. Grinholc**. Photodynamic inactivation requires innovative approach concerning numerous bacterial isolates and multicomponent sensitizing agents. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2012; 9: 359-361

W latach 2010-2013 brałem również udział w badaniach dotyczących identyfikacji czynników warunkujących odpowiedź *Staphylococcus aureus* na farmakologiczną inaktywację z zastosowaniem związków porfiryńowych (grant MNiSW nr N N405164039). Celem projektu było poszukiwanie genów mających związek z opornością na terapię fotodynamiczną. W pierwszej kolejności analizie poddane zostały geny enzymów odpowiadających za poziom reaktywnych form tlenu i geny związane z transportem hemu. Dodatkowo zbadano profil białkowy badanych szczepów *S. aureus* w poszukiwaniu zależności z odpowiedzią na inaktywację

fotodynamiczną. **W projekcie pełniłem rolę wykonawcy.** Uzyskane wyniki zostały opublikowane w czasopismach o zasięgu międzynarodowym:

- J. Nakonieczna, E. Michta, M. Rybicka, **M. Grinholc**, A. Gwizdek-Wiśniewska, K.P. Bielawski. Superoxide dismutase is upregulated in *Staphylococcus aureus* following protoporphyrin-mediated photodynamic inactivation and does not directly influence the response to photodynamic treatment. *BMC Microbiology*, 2010; 10: 323
- Nakonieczna J., Kossakowska-Zwierucho M., Filipiak M., Hewelt-Belka W., **Grinholc M.**, Bielawski K.P. Photoinactivation of *Staphylococcus aureus* using protoporphyrin IX: the role of haem-regulated transporter. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016; 100(3): 1393-405

Ponadto, w ramach projektu NCBiR „*Nanobiotechnologia jako innowacyjne podejście w leczeniu zakażeń ran oparzeniowych*” (grant nr LIDER/32/36/L-2/10/NCBiR/2011) uczestniczyłem w badaniach dotyczących charakterystyki nowych związków wykazujących działanie fotouczulające oraz analizy aktywności przeciwdrobnoustrojowej ekstraktów roślinnych i nanocząstek srebra. Badania były prowadzone w oparciu o patogeny alarmowe tj. szczepy MRSA *Staphylococcus aureus*, wielolekooporne szczepy *Pseudomonas aeruginosa* oraz *Candida albicans*. **W projekcie pełniłem rolę kierownika projektu.** Uzyskane wyniki zostały opublikowane w czasopismach o zasięgu międzynarodowym:

- A. Taraszkiwicz, G. Fila, **M. Grinholc**, J. Nakonieczna. Innovative strategies to overcome biofilm resistance. *BioMed Research International*, 2013; 2013: 150653
- A. Taraszkiwicz, **M. Grinholc**, K. P. Bielawski, A. Kawiak, J. Nakonieczna. Imidazoacridinone derivatives as efficient sensitizers in photoantimicrobial chemotherapy. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013; 79(12): 3692-3702
- M. Krychowiak, **M. Grinholc**, R. Banasiuk, M. Krauze-Baranowska, D. Głód, A. Kawiak, A. Królicka. Combination of silver nanoparticle and *Drosera binata* extract as a possible alternative for antibiotic treatment of burn wound infections caused by resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE*, 2014; 9(12): e115727
- Dodatkowo, owocem w/w projektu jest uzyskanie patentu na rzecz Uniwersytetu Gdańskiego nr 220370 na wynalazek pt. „*Kompozycja farmaceutyczna oraz dezynfekująca zawierająca pochodną imidzoakrydyny jako środek fotouczulający oraz ich zastosowanie.*” Poza mną, twórcami wynalazku są: dr Aleksandra Taraszkiwicz, dr Joanna Nakonieczna oraz prof. dr hab. Krzysztof Piotr Bielawski.

Opublikowane prace zostały wyróżnione w latach 2011 i 2014 nagrodami zespołowymi J.M. Rektora Uniwersytetu Gdańskiego za osiągnięcia naukowe i cykl publikacji dotyczący

poszukiwania i opracowania nowych metod monitorowania i zwalczania lekooporności mikroorganizmów.

Należy nadmienić, że nadal jest kontynuowana i rozwijana współpraca naukowa z zespołami z uniwersytetów w Toronto, Regensburgu, Tubingen i Nottingham oraz ośrodkami krajowymi tj. Narodowy Instytut Leków, czy Wydział Biochemii, Biofizyk i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Na mój dorobek naukowy, poza **7** pracami stanowiącymi opisane powyżej osiągnięcie naukowe, składa się również **19** prac oryginalnych, **5** prac przeglądowych, **1** rozdział w książce, **1** udzielony patent oraz **24** doniesienia zjazdowe. Brałem udział w realizacji **5** grantów finansowanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, Narodowe Centrum Nauki i Narodowe Centrum Badań i Rozwoju, w tym kierowałem trzema z nich.

Badania z moim udziałem zostały dwukrotnie wyróżnione nagrodami J.M. Uniwersytetu Gdańskiego oraz nagrodą Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

6. Dane bibliometryczne.

Łączna liczba publikacji: **32** (przed doktoratem **8**, po doktoracie **24**)

- Jestem pierwszym autorem w **12** pracach (przed doktoratem: **4**; po doktoracie: **8**).
- Jestem autorem do korespondencji w **18** pracach (przed doktoratem: **5**; po doktoracie: **13**).
- Sumaryczny współczynnik oddziaływania czasopism, zgodnie z rokiem opublikowania: **64,734**¹ (prace przed doktoratem: IF = **10,475**; prace po doktoracie: IF = **54,259**).
- Sumaryczna liczba punktów MNiSW: **715** (prace przed doktoratem: MNiSW = **135**; prace po doktoracie: MNiSW = **580**).
- Liczba cytowań (wg bazy Web of Science): **279** (prace przed doktoratem: **152**; prace po doktoracie: **127**)
- Indeks Hirscha (wg bazy Web of Science): **10**

Łączna liczba streszczeń zjazdowych: **24** (**5** przed uzyskaniem stopnia doktora; **19** po uzyskaniu stopnia doktora); **11** na konferencjach zagranicznych i **13** na konferencjach krajowych.

Liczba udzielonych patentów: **1**

¹ Dla prac opublikowanych w roku 2015 wykorzystano ostatnią dostępną w bazach wartość IF₂₀₁₄

Równoległe z działalnością naukową prowadzę również działalność dydaktyczną, komplementarną z moim profilem badawczym. Prowadzę zajęcia w formie wykładów i ćwiczeń laboratoryjnych dla studentów MWB UG i GUMed oraz na podyplomowych studiach Wydziału Biologii UG „Biologia sądowa” (szczegółowa lista w załączniku nr 4). Jestem promotorem 4 prac magisterskich, 8 projektów badawczych (licencjackich), 3 prac dyplomowych oraz promotorem pomocniczym w 2 przewodach doktorskich (załącznik nr 4).

Gdańsk, dnia 29.02.2016

..... Grinholc

PIŚMIENNICTWO

- Dortbudak O**, Haas R, Bernhart T, Mailath-Pokorny G (2001) Lethal photosensitization for decontamination of implant surfaces in the treatment of peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res* 12:104-108
- Embleton ML**, Nair SP, Heywood W, Menon DC, Cookson BD, Wilson M (2005) Development of a novel targeting system for lethal photosensitization of antibiotic-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 49:3690-3696
- Fournier JM**, Boutonnier A, Bouvet A (1989) *Staphylococcus aureus* strains which are not identified by rapid agglutination methods are of capsular serotype 5. *J Clin Microbiol* 27:1372-1374
- Gad F**, Zahra T, Hasan T, Hamblin MR (2004) Effects of growth phase and extracellular slime on photodynamic inactivation of gram-positive pathogenic bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 48:2173-2178
- Grinholc M**, Szramka B, Kurlenda J, Graczyk A, Bielawski KP (2008) Bactericidal effect of photodynamic inactivation against methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* is strain-dependent. *J Photochem Photobiol B* 90:57-63
- Guffey JS**, Wilborn J (2006) In vitro bactericidal effects of 405-nm and 470-nm blue light. *Photomed Laser Surg* 24:684-688
- Hamblin MR**, Zahra T, Contag CH, McManus AT, Hasan T (2003) Optical monitoring and treatment of potentially lethal wound infections in vivo. *J Infect Dis* 187:1717-1725
- Hongcharu W**, Taylor CR, Chang Y, Aghassi D, Suthamjariya K, Anderson RR (2000) Topical ALA-photodynamic therapy for the treatment of acne vulgaris. *J Invest Dermatol* 115:183-192
- Ikeda A**, Doi Y, Hashizume M, Kikuchi J, Konishi T (2007) An extremely effective DNA photocleavage utilizing functionalized liposomes with a fullerene-enriched lipid bilayer. *J Am Chem Soc* 129:4140-4141
- Iwamoto Y**, Yamakoshi Y (2006) A highly water-soluble C60-NVP copolymer: a potential material for photodynamic therapy. *Chem Commun (Camb)* 4805-4807
- Ji G**, Beavis R, Novick RP (1997) Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. *Science* 276:2027-2030
- Lambrechts SA**, Demidova TN, Aalders MC, Hasan T, Hamblin MR (2005) Photodynamic therapy for *Staphylococcus aureus* infected burn wounds in mice. *Photochem Photobiol Sci* 4:503-509
- Leaper DJ** (2006) Silver dressings: their role in wound management. *Int Wound J* 3:282-294
- Lipovsky A**, Nitzan Y, Friedmann H, Lubart R (2009) Sensitivity of *Staphylococcus aureus* strains to broadband visible light. *Photochem Photobiol* 85:255-260
- Maclean M**, McKenzie K, Anderson JG, Gettinby G, MacGregor SJ (2014) 405 nm light technology for the inactivation of pathogens and its potential role for environmental disinfection and infection control. *J Hosp Infect* 88:1-11
- Maisch T**, Bosl C, Szeimies RM, Lehn N, Abels C (2005) Photodynamic effects of novel XF porphyrin derivatives on prokaryotic and eukaryotic cells. *Antimicrob Agents Chemother* 49:1542-1552

Mroz P, Pawlak A, Satti M, Lee H, Wharton T, Gali H, Sarna T, Hamblin MR (2007) Functionalized fullerenes mediate photodynamic killing of cancer cells: Type I versus Type II photochemical mechanism. *Free Radic Biol Med* 43:711-719

Nakoneczna J, Michta E, Rybicka M, Grinholc M, Gwizdek-Wisniewska A, Bielawski KP (2010) Superoxide dismutase is upregulated in *Staphylococcus aureus* following protoporphyrin-mediated photodynamic inactivation and does not directly influence the response to photodynamic treatment. *BMC Microbiol* 10:323

Sera N, Tokiwa H, Miyata N (1996) Mutagenicity of the fullerene C60-generated singlet oxygen dependent formation of lipid peroxides. *Carcinogenesis* 17:2163-2169

Soncin M, Fabris C, Buseti A, Dei D, Nistri D, Roncucci G, Jori G (2002) Approaches to selectivity in the Zn(II)-phthalocyanine-photosensitized inactivation of wild-type and antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*. *Photochem Photobiol Sci* 1:815-819

Tanielian C, Mechin R, Seghrouchni R, Schweitzer C (2000) Mechanistic and kinetic aspects of photosensitization in the presence of oxygen. *Photochem Photobiol* 71:12-19

Tian J, Wong KK, Ho CM, Lok CN, Yu WY, Che CM, Chiu JF, Tam PK (2007) Topical delivery of silver nanoparticles promotes wound healing. *ChemMedChem* 2:129-136

Yamakoshi Y, Umezawa N, Ryu A, Arakane K, Miyata N, Goda Y, Masumizu T, Nagano T (2003) Active oxygen species generated from photoexcited fullerene (C60) as potential medicines: O₂^{-*} versus ¹O₂. *J Am Chem Soc* 125:12803-12809