



WYDZIAŁ
BIOLOGII
I OCHRONY
ŚRODOWISKA



Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii
Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej
PRACOWNIA BIOLOGII ZAKAŻEŃ

**RECENZJA OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO i DOROBKU NAUKOWEGO
W POSTĘPOWANIU HABILITACYJNYM**

dr Mariusza Grinholca, adiunkta w Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu
Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Zestaw dokumentów przesłanych w celu dokonania recenzji zawiera:

- Autoreferat opisujący zakres zainteresowań i badań, zestawienie publikacji wchodzących w skład *Osiągnięcia Naukowego* wraz z ich danymi bibliometrycznymi; opis innych osiągnięć naukowych przed i po doktoracie, a także plany badawcze (**zał. 2** - w jęz. polskim i **zał. 3** - w jęz. angielskim).
- Pełny spis publikacji z podanym sumarycznym IF według listy JCR, wraz z danymi dotyczącymi liczby cytowań według bazy Web of Science z podaniem indeksu Hirscha oraz dodatkowe informacje, o których mowa w Rozporządzeniach Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 1 września 2011 i 22 września 2011 (Dziennik Ustaw nr 196/Poz. 1165; nr 204/Poz. 1200) (**zał. 4**),
- Informacje o dorobku dydaktycznym, współpracy z ośrodkami krajowymi i zagranicznymi, odbytych stażach i działalności popularyzującej naukę (**zał. 5**);
- Oświadczenia współautorów publikacji co do ich udziału w realizacji (**zał. 6**)
- Kopie publikacji wchodzących w skład *Osiągnięcia Naukowego* (**zał. 7**).

Dr Mariusz Grinholc wskazuje jako podstawę wszczęcia postępowania habilitacyjnego *Osiągnięcie Naukowe* pt. "Opracowanie strategii prowadzących do skutecznej walki ze zjawiskiem szeregowej odpowiadzi drobnoustrojów na inaktywację fotodynamiczną" złożone z 7 publikacji, których dane bibliometryczne zamieszczono w **Załączniku 2 i 3**. Oświadczenia współautorów określające indywidualny opisowy i procentowy wkład każdego z nich w powstanie tych prac znajdują się w **Załączniku 6**.

1. Przebieg dotychczasowej pracy zawodowej Kandydata

Mariusz Grinholc ukończył studia na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w 2004 r. uzyskując stopień magistra biotechnologii na podstawie pracy dyplomowej pt. "Związek określonych czynników wirulencji i struktury klonalnej szczepów MRSA z wybranymi infekcjami gronkowcowymi", wykonanej w Katedrze Biotechnologii Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biochemii uzyskał na tym samym Wydziale w 2009 r., w oparciu o przedstawioną pracę nt: „Inaktywacja fotodynamiczna jako alternatywna metoda zwalczania wielolekoopornych szczepów *Staphylococcus aureus*”, realizowaną w ramach uczestnictwa w Studium Doktoranckim na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, a wykonywanej w Zakładzie Diagnostyki Molekularnej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii. Promotorem pracy doktorskiej był prof. dr hab. Krzysztof Piotr Bielawski (Kopia Dyplomu - **Załącznik 1**).

Mariusz Grinholc został zatrudniony na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu

Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego dnia 01. 10. 2009 r. na etacie asystenta, a od 01. 08. 2012 r. do chwili obecnej, zajmuje tam stanowisko adiunkta.

2. Ocena habilitacyjnego *Osiągnięcia Naukowego* dr Mariusza Grinholca

Podstawą postępowania habilitacyjnego dr Mariusza Grinholca jest *Osiągnięcie Naukowe* zatytułowane "Opracowanie strategii prowadzących do skutecznej walki ze zjawiskiem szczepowo - zależnej odpowiedzi drobnoustrojów na inaktywację fotodynamiczną". Składa się na nie 7 prac doświadczalnych opublikowanych w latach 2013-2015 w następujących czasopismach: 1). Photodiagn Photodynamic Ther, 2013, **IF - 2,524**; 2). Photochem Photobiol Sci, 2013, **IF - 2,939**; 3). J Photochem Photobiol B: Biology, 2013, **IF - 2,803**; 4). Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2014, **IF - 2,668**; 5). Photomed Laser Surg, 2014, **IF - 1,672**; 6). Appl Microbiol Biotechnol, 2015, **IF - 3,337**; 7). Appl Microbiol Biotechnol, 2015, **IF - 3,337**. W 4 z tych publikacji dr Mariusz Grinholc jest pierwszym autorem, w pozostałych 3 autorem ostatnim, ale w każdym przypadku autorem do korespondencji. Łączny współczynnik oddziaływania czasopism, w których ukazały się publikacje wchodzące w skład *Osiągnięcia naukowego*, zgodnie z rokiem opublikowania wynosi **19,280**; **punkty MNiSW - 195**; **łączna liczba cytowań tych prac wg bazy Web of Science –wynosi 19 (Załącznik 2)**.

Habilitant oszacował swój udział w w/w 7 pracach na: powyżej 50% w 2 publikacjach (55 i 60%), w pozostałych w przedziale 38-44%. Jego rola określona jest w nich jako autora koncepcji pracy i autora do korespondencji, osoby która zaprojektowała i wykonała doświadczenia, przeprowadziła analizę i interpretację wyników, przygotowała ostateczną formę manuskryptów. W załączonych do dokumentacji oświadczeniach współautorów prac podano opisowy zakres ich indywidualnego wkładu w powstanie poszczególnych publikacji oraz określono procentowy udział każdego z nich. Wszyscy autorzy wyrazili zgodę na włączenie tych 7 współautorskich prac w skład *Osiągnięcia Naukowego* kandydata na stopień doktora habilitowanego - dr Mariusza Grinholca oraz zaakceptowali przypisany Jemu i współautorom udział procentowy w realizację badań (**Załącznik 6**).

Prace, które składają się na *Osiągnięcie Naukowe* zostały opublikowane w czasopismach naukowych uznanych w dziedzinie mikrobiologii stosowanej, klinicznej i specjalistycznych czasopismach dotyczących zastosowania fotodynamiki, zostały zatem pozytywnie zweryfikowane przez recenzentów i edytorów. Tym samym, nie widzę konieczności szczegółowej oceny wszystkich wyników poznawczych będących rezultatem badań dr M. Grinholca, przedstawionych w tym cyklu. Chcę natomiast zaznaczyć, iż w świetle analizy całkowitego dorobku naukowego Habilitanta te 7 prac uważam za reprezentatywną, spójną i jego ważną część.

Tematykę badawczą podjętą przez dr M. Grinholca, rozwijaną jak wynika z przedstawionej dokumentacji w całym okresie Jego działalności naukowej, chciałabym przedstawić w kontekście aktualnych trendów badawczych z zakresu poszukiwania opcji leczniczych zakażeń bakteryjnych, alternatywnych do często nieskutecznej antybiotykoterapii. Dokonując takiej ogólnej oceny zamierzam zwrócić uwagę nie tylko na znaczenie poznawcze badań dr M. Grinholca, ale i podkreślić pewną perspektywiczną wartość aplikacyjną uzyskanych wyników.

Nie mam wątpliwości, że zainteresowanie się Habilitanta wiele lat temu badaniami dotyczącymi zwalczania zakażeń, szczególnie szpitalnych, należy uznać za tematykę wtedy ważną i wciąż aktualną z punktu widzenia epidemiologii i skuteczności terapii. Dr M. Grinholc inspirowany przez licznie pojawiające się w latach 2004-2008 prace, w tym autorstwa polskich badaczy, w których stosowano w różnych aspektach inaktywację fotodynamiczną, skierował swoją uwagę na jej wykorzystanie do niszczenia lekoopornych bakterii. Stąd temat rozprawy doktorskiej pt. "Inaktywacja fotodynamiczna jako alternatywna metoda zwalczania wielolekoopornych szczepów *Staphylococcus aureus*". Obiektem badawczym były gronkowce z gatunku *S. aureus*, należące do bardzo ważnej grupy

patogenów alarmowych. Ten gatunek bakterii, aż do chwili obecnej, jest jednym z głównym obiektów badawczych zespołu, w którym działa dr M. Grinholc.

Omówienie zakresu badań prowadzonych przez dr M. Grinholca i wynikających konkluzji dotyczących zbioru danych zawartych w w/w 7 pracach doświadczalnych jest poprzedzone kilkunastostronicowym Wprowadzeniem. Przybliżono w nim historyczne i aktualne złożenia oraz obszary zastosowania fotodynamicznej inaktywacji drobnoustrojów, co dało możliwość określenia i uzasadnienia celów podejmowanych kolejno badań nad wykorzystaniem tej techniki do zwalczania lekoopornych gronkowców. Przedstawiono tam także konfrontację komentarzy innych autorów z własnymi opublikowanymi rezultatami.

Wprawdzie przedmiotem oceny recenzenckiej *Osiągnięcia habilitacyjnego* jest cykl opublikowanych prac a nie ich autorski opis, jednak nie można nie zauważyć pozostawiającego wiele do życzenia pod względem edytorskim opracowania tego dokumentu, jak również przedstawienia tam dość pobieżnych rozważań dotyczących tematyki prowadzonych badań.

Terapia fotodynamiczna (PDT) znana była od dawna głównie z prób ograniczenia zmian nowotworowych. W literaturze tematu wymienia się jej miejscowe zastosowanie w leczeniu np. raka podstawnokomórkowego, kolczystokomórkowego, guzów przerzutowych skóry, mięsaka Kaposiego itp. Aktualnie PDT stosuje się też w leczeniu schorzeń nienowotworowych, takich jak zwyrodnienie plamki żółtej, łuszczyca, reumatoidalne zapalenie stawów, zapalenie kości i szpiku kostnego, trądzik, liszaj płaski. Ponieważ jej skuteczność została w większości w/w przypadków potwierdzona klinicznie, uwaga badaczy skierowała się na badanie również innych możliwości, w tym wykorzystania PDT jako alternatywnej terapii wybranych zakażeń. Wobec stale rosnącej liczby gatunków opornych mikroorganizmów na klasyczne chemioterapeutyki oraz udziału wysoce lekoopornych biofilmów drobnoustrojów w rozwoju zmian patologicznych, PDT jako opcja terapeutyczna, stała się atrakcyjnym tematem licznych badań. Technologię fotodynamicznej terapii skierowanej przeciwko drobnoustrojom określa się skrótowo PACT (*ang. photodynamic antimicrobial chemotherapy*) lub nazywa procesem fotodynamicznej inaktywacji (PDI, *ang. photodynamic inactivation*). Jako tzw. fotouczulacze (PS, photosensitizers) stosowane są pochodne porfirynowe (w tym występujące endogennie u drobnoustrojów metabolity pośrednie szlaku biosyntezy hemu), fenotiazynowe barwniki kationowe (np. błękit toluidynowy O i błękit metylenowy) i wiele innych związków naturalnych i syntetycznych. Tak jak pisze Habilitant, zakłada się dwa podstawowe mechanizmy działania powstających reaktywnych form tlenu (RFT), a tym samym fotodynamicznej inaktywacji drobnoustrojów: uszkodzenie błony cytoplazmatycznej komórek mikroorganizmów prowadzące do wycieku składników wewnątrzkomórkowych, zahamowania transportu przez błonowego i działania enzymów lub/i uszkodzenia (pęknięcia) pojedynczych lub podwójnych nici DNA. Te kwestie są poruszane w kilku z publikacji dr Mariusza Grinholca włączonych do cyklu stanowiącego *Osiągnięcie Naukowe*.

W treści ocenianych tych 7 prac współautorstwa dr M. Grinholca rysują się dwa główne wątki badawcze: **1. poszukiwanie na poziomie fenotypowym i molekularnym przyczyn stwierdzonej w początkowych badaniach nieco mniejszej skuteczności PDI wobec wielolekoopornych szczepów *S. aureus* (MRSA); 2. badanie skuteczności terapeutycznej *in vitro* i *in vivo* nowo opracowanych związków fotouczulających, wraz z pogłębieniem zasobu istniejącej wiedzy na temat mechanizmów ich działania i PDI w ogóle, wobec gronków.**

Dla mnie jako mikrobiologa i immunologa, od lat zajmującego się badaniem patogenyzy zakażeń gronkowcowych nie jest zaskoczeniem i doceniam to, że głównym obiektem badawczym zespołu w którym działa dr M. Grinholc jest *Staphylococcus aureus*. Wynika to z kilku istotnych powodów: z faktu, iż *S. aureus* jest ważnym przedstawicielem grupy patogenów alarmowych środowiska

szpitalnego; częstość występowania wielolekoopornych gronkowców złośliwych w próbach klinicznych jest bardzo wysoka; te bakterie stanowią również poważny problem epidemiologiczny w środowisku pozaszpitalnym, zarówno w medycynie ludzkiej jak i weterynaryjnej; cechują się niezwykle szerokim repertuarem wzajemnie uzupełniających się w działaniu czynników chorobotwórczości i wynikającym z tego szerokim zakresem postaci klinicznych wywoływanych schorzeń - od miejscowych zakażeń skórnych i błon śluzowych, po ciężkie zakażenia, w tym zagrażające życiu infekcje uogólnione. Dlatego też skierowanie uwagi zespołu i dr M. Grinholca w stronę wykorzystania PDI do zwalczania zakażeń o etiologii gronkowcowej było i jest w wysokim stopniu uzasadnione, tym bardziej, że PDI przebiega bardziej efektywnie w stosunku do bakterii Gram-dodatnich, u których porowata struktura osłon komórkowych pozwala na łatwiejsze przenikanie fotouczulaczy w okolice błony cytoplazmatycznej. Wydawało się, że w związku z tym można się spodziewać dobrych efektów działania PDI i założono, że będzie to uniwersalna i skuteczna terapia zakażeń o etiologii gronkowcowej. Niestety, jak pokazują badania Zespołu gdańskiego oraz innych autorów, nie do końca jest to oczywiste.

Dr M. Grinholc zauważa w swoim opisowym opracowaniu, cyt. *"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."* i....*"że w związku z tym, inaktywacja fotodynamiczna drobnoustrojów w bieżącym kształcie nie może stanowić alternatywnej i samowystarczальной opcji terapeutycznej w leczeniu zakażeń bakteryjnych"*. Takie podejście jest jak najbardziej uprawnione i świadczy o dobrej znajomości tematu i właściwie uzasadnia skierowanie uwagi Habilitanta i współpracującego Zespołu na poszukiwanie w ich badaniach strategii mogących zwiększyć bakteriobójczą efektywność PDI. Temu zagadnieniu poświęcone są prace **nr. 2 i 6**.

Nie ulega wątpliwości, że należy jednak docenić wartość poznawczą wyników uzyskanych w tych pierwszych publikacjach przedstawionego cyklu prac składających się na *Osiągnięcie Naukowe* dr M. Grinholca, w tym w publikacji **nr 1**. Potwierdziły one istnienie znanej z wcześniejszej literatury szczepowo-zależnej odpowiedzi gronkowców na PDI i wykazały, że ich odmienna wrażliwość dotyczy niestety działania różnych grup związków fotouczulających, co utrudnia dobór tego właściwego. Co więcej, próba wykazania zależności między zróżnicowanym poziomem endogennych fotouczulaczy u *S. aureus* (MRSA/MSSA) a poziomem inaktywacji fotodynamicznej z użyciem zarówno endo- jak i egzogennych fotouczulaczy, też się nie powiodła. Dlaczego wyciągnięto taki wniosek? dlatego że podobny poziom produkcji wewnątrzkomórkowych porfiryn w badanych szczepach *S. aureus* wskazał na brak jakiegokolwiek korelacji między ich produkcją a wrażliwością na PDI. Dodatkowo, uzyskane wyniki nie wykazały żadnej (statystycznie istotnej) korelacji między badanymi właściwościami fenotypowymi (poziom karotenoidów czy wrażliwość bakterii na stres oksydacyjny indukowany nadtlaniem wodoru) a wrażliwością na inaktywację fotodynamiczną. Jedyny wtedy uzasadniony wniosek to sugestia, iż mechanizm leżący u podstaw opisywanej szczepowo-zależnej odpowiedzi drobnoustrojów na PDI jest niezwykle złożony i wieloczynnikowy. Chociaż taki wniosek wynikał wcześniej z badań innych autorów, to badania Grinholca i wsp. wykonane z użyciem (łącznie w tej i pracach nr 3-5) kilkuset szczepów *S. aureus*, nie pozostawiają w tej kwestii żadnych wątpliwości.

Skoro nie można przewidzieć (z uwagi na wysoce prawdopodobną zależność szczepową) skuteczności PDI w konkretnym przypadku klinicznym, to zasadne może być jednoczesne zastosowanie mieszaniny kilku różnych fotouczulaczy, zwiększenie jego/ich stężenia lub połączenie jednego z nich z innego typu niekonwencjonalnym produktem o aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Tego zagadnienia dotyczy **publikacja nr 2.**, w której wykazano synergistyczne oddziaływania między zastosowaną terapią światłem i użyciem nanocząstek srebra. Co więcej, zaproponowano sekwencyjne użycie

obydwu podejść terapeutycznych, co poskutkowało znacznym wzrostem skuteczności bakteriobójczej *in vitro*. Można domniemywać, że wobec konieczności opracowania alternatywnych do klasycznej antybiotykoterapii opcji leczniczych "trudnych" zakażeń, takie podejście jest perspektywnie zasadne do wprowadzenia *in vivo*. Ten wątek badań zespołu z uczestnictwem dr M. Grinholca mieści się z powodzeniem w trendzie badań światowych nad próbami wzmocnienia działania klasycznych, z różnych względów aktualnie nieskutecznych antybiotyków / chemioterapeutyków, przez łączne zastosowanie naturalnych (zwierzęcych, roślinnych) lub syntetycznych produktów biostatycznych i/ lub biobójczych.

Wprawdzie opisane w tej publikacji wzajemnie wzmacniające się działanie inaktywacji fotodynamicznej z nanocząstkami srebra umożliwiło zaproponowanie alternatywnej i bezpiecznej w stosunku do komórek eukariotycznych opcji terapeutycznej w leczeniu zakażeń dermatologicznych, ale to są to tylko badania na poziomie *in vitro*, w ściśle kontrolowanych warunkach środowiskowych i niemające do końca umocowania w realnej sytuacji klinicznej. W tej bowiem, nie tylko w przypadku bardzo złożonych pod względem patogenezы zakażeń uogólnionych, ale i nie mniej wieloczynnikowych zakażeń miejscowych, duża pokora wobec nieprzewidywalnego przebiegu procesu zakażenia, dużej liczby "partnerów" humoralnych, komórkowych - w tym pochodzących ze strony patogenu i gospodarza, jest wręcz niezbędna dla zachowania wiarygodności interpretacji uzyskanych wrywkowych wyników. Podobnie nieco sceptycznie odnoszę się do wyrażonego przez Habilitanta zdania, iż cyt.... "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". Zbadanie i wykazanie "bezpieczeństwa" zastosowanej „terapii” poprzez ocenę żywotności *in vitro* jednego typu komórek skóry (keratynocytów) to tylko początek badań nad bezpieczeństwem klinicznym. Zakres takich badań określony jest przez stosowne opracowania normatywne i, bardzo ogólnie rzecz ujmując, dąży do ustalenia biozgodności danego produktu (ang. *biocompatibility Index*, BI). Ta sama uwaga odnosi się do entuzjastycznie ocenianych *in vitro* nowoopracowanych i badanych później przez dr M. Grinholca, fotouczulaczy (patrz praca nr 6. i 7.).

W nurcie dociekań naukowych dr M. Grinholca i Zespołu, dotyczących wykrycia przyczyn zróżnicowanej podatności szczepów gronkowców o odmiennym profilu lekowrażliwości, pozostaje tematyka publikacji nr 3 i 4. Uzyskane w nich wyniki sugerują, że polimorfizm, ale również funkcjonalność systemu regulatorowego *agr* wpływa na poziom ich wrażliwości na fotoinaktywację. Niemniej, uzyskane wyniki, mimo wykazanych istotnych statystycznie korelacji porównywanych parametrów, ponownie jasno dowodzą, że mechanizm leżący u podstaw szczepowo-zależnej odpowiedzi na PDI jest wieloczynnikowy i w tym momencie nieustalony. Podobnie, wyniki uzyskane w ramach pracy nr 4. wykazały brak korelacji między typem kasety *SCCmec* a wrażliwością szczepów *S. aureus* na PDI. 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. Po przeprowadzeniu identyfikacji kompleksów klonalnych (ang. *clonal complex*, CC) i ustaleniu sekwencji genu *spa*, kodującego gronkowcowe białko A (ang. *staphylococcal protein A*) wykazano pewien istotny związek z wrażliwością drobnoustrojów na PDI a przynależnością do określonego kompleksu klonalnego CCI. Zespół współpracowników dr M. Grinholca i On sam wnioskuje na podstawie uzyskanych wyników, że opracowanie narzędzi diagnostycznych identyfikujących szczepy drobnoustrojów o podwyższonej oporności na fotoinaktywację jest możliwe w oparciu o badanie tła genetycznego mikroorganizmów. Chociaż powyższe wyniki mają określoną wartość poznawczą, pozostaje jak na razie bez odpowiedzi pytanie czy może się to przełożyć na praktyczne zastosowanie dotyczące wyboru odpowiedniego rodzaju PDI w konkretnej sytuacji klinicznej.

Wyniki badań opublikowane w pracy nr 5. dostarczyły dowodów na niezależność skuteczności PDI od istniejących mechanizmów lekooporności *S. aureus* oraz stopnia lekowrażliwości na stosowane chemioterapeutyki, potwierdzając wcześniejsze dane. Jednym z możliwych wyjaśnień tego zjawiska jakie teoretycznie w tej pracy rozważano, może być różnica w budowie ściany komórkowej szczepów MRSA i MSSA w zakresie występowania np. otoczki polisacharydowej, istotnie częściej obecnej na powierzchni komórek MRSA. Kolejnym możliwym wyjaśnieniem mogłyby być założone różnice w produkcji biofilmu między szczepami MRSA i MSSA. Wiadomym jest, że poziom produkcji biofilmu wpływa na skuteczność PDI, szczególnie istotna jest to rola macierzy zewnątrzkomórkowej budującej strukturę biofilmu oraz zwykle wyższej aktywności pomp zwrotnego wypływu (efluksowych) w populacji osiadłej. Jednak w badanych przez Habilitanta szczepach MRSA i MSSA, rozkład silnych i słabych producentów biofilmu był niemal identyczny. Ponownie więc odpowiedź na zadane pytanie jest negatywna.

Inną przyczyną różnic szczepowych w podatności MRSA/MSSA na PDI jaką Habilitant rozważał wcześniej (praca nr 3.) może być istnienie systemów antyoksydacyjnych w komórkach bakterii, mniej lub bardziej efektywnych w określonych grupach szczepów. W poprzednich pracach dr M. Grinholca i wielu innych autorów wykazano, że szczepy *S. aureus* z inaktywacją dysmutaz ponadtlennokowych charakteryzowały się znaczną wrażliwością na fotoinaktywację i podobne ustalenia dotyczyły szczepów z obniżoną produkcją stafyloksantyny. Na podstawie tych obserwacji, w badaniach zamieszczonych w pracy nr 3. skupiono się na poszukiwaniu czynników genetycznych, mogących warunkować istnienie fenotypów drobnoustrojów o różnej wrażliwości na inaktywację fotodynamiczną. Badany wtedy element genetyczny, gen globalnej regulacji (*agr*) u *S. aureus* stanowi bowiem system regulacji ekspresji genów kodujących większość z czynników wirulencji oraz produkcji biofilmu i kontroluje równowagę oksydacyjną. Jak wspomniano wcześniej, postawiono hipoteza dotycząca wpływu funkcjonalności oraz polimorfizmu genu *agr* na efektywność inaktywacji fotodynamicznej, nie została niestety potwierdzona. Ważne jest jednak, że w pracach współautorstwa dr M. Grinholca wykazano nie tylko bezpośrednią aktywność biobójczą PDI, ale także zdolność inaktywacji wielu czynników wirulencji wydzielanych przez gronkowce do środowiska, co dobrze koreluje ze współczesnymi trendami w rozwoju nowych metod terapeutycznych, mających na celu nie zawsze działanie bakteriobójcze, ale również/lub atenuujące atrybuty chorobotwórczości patogenów.

Od wielu lat przyjmuje się, że przewlekły charakter wielu postaci klinicznych zakażeń o etiologii gronkowcowej, w tym *S. aureus*, wiąże się z wysoce efektywnymi zdolnościami tych bakterii do tworzenia struktur zróżnicowanych przestrzennie oraz funkcjonalnie, czyli biofilmów. Dlatego też, spodziewałam się w rozważaniach dr M. Grinholca rozwinięcia tego wątku, w kontekście skuteczności przeciwbiofilmowej PDI na tle innych opcji terapeutycznych aktualnie badanych w tym zakresie. Tym bardziej, że dociekania naukowe dr M. Grinholca wprowadzie tylko nieznacznie, ale dotyczą tego tematu. Bowiem w pracy nr 5. i nr 6. opisano badania *in vitro* i *in vivo* dotyczące tak naprawdę zwalczania biofilmów terapią PDI. Szczególnie znacząca jest praca nr 6., w której wykorzystując myszy model rany zakażonej bioluminescencyjnym szczepem MRSA traktowanej nowo opracowanym fotouczulaczem (fuleropirolidyną), poddano ją działaniu światła. Otrzymane wyniki potwierdziły pewną skuteczność PDI, gdyż osiągnięto redukcję liczby bakterii i spowolnienie procesu rozwoju zakażenia. Dalszy ciąg wywodów dr M. Grinholca tylko pośrednio jest uprawniony bo stwierdzenie, że cyt.. "umożliwiając efektywne działanie odpowiedzi immunologicznej gospodarza"... jest nie poparte żadnymi parametrami pomiarowymi. Sam autor pisze cyt. "że efekt terapeutyczny inaktywacji fotodynamicznej z użyciem badanego związku ma charakter przejściowy i nie eliminuje rozwoju zakażenia w piątym dniu od traktowania zakażonej rany"....

Istotnie, większość badań prowadzonych *in vitro* i w niektórych modelach *in vivo* wykazuje wyższą (choć nie 100%) skuteczność PDI w eliminacji biofilmów drobnoustrojów w porównaniu do działania

klasycznych programów postępowania medycznego. Niewątpliwie więc jest jeszcze daleko do osiągnięcia sukcesu terapeutycznego. Tego typu rozważań zabrakło w opisie *Osiągnięcia Naukowego* dr M. Grinholca. Między innymi zabrakło przedstawienia poglądu, oczywiście na tle wyników własnych, na temat ograniczeń zastosowania PDI w zwalczaniu biofilmów i nowych możliwości takiej terapii. Szkoda, że Autor nie pogłębił tego tematu w Autoreferacie i nie dotknął głębiej w swoich pracach, bo większość tzw. "trudnych" zakażeń ma tło biofilmowe i na ich zwalczaniu skupione są wysiłki wielu znaczących ośrodków naukowych. Świadczą o tym bardzo liczne prace dotyczące PDI w terapii zakażeń "biofilmowych" o etiologii bakteryjnej i grzybowej (albo mieszanej) nie tylko miejscowych ale i systemowych, opublikowane w końcu 2015 r. i pierwszej połowie 2016 r.

Zwieńczeniem badań dr Mariusza Grinholca, zawartych w cyklu prac Jego *Osiągnięcia Naukowego* jest publikacja nr 7. Przedstawiono w niej model mechanizmu działania inaktywacji fotodynamicznej bakterii. Ważnym elementem tego modelu (graficznego i opisowego) są dane piśmiennictwa tematu i wyniki eksperymentalnych badań własnych dotyczących istotności fotowzbudzonych uszkodzeń materiału genetycznego, poprzez wykonanie analizy odpowiedzi SOS u *S. aureus* na pojawiające się uszkodzenia DNA. Uzyskane wyniki dr M. Grinholca dowiodły faktu, 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. Badając odpowiedź SOS u *S. aureus* wykazano, że aktywność jedynie białka RecA, a nie LexA, jest niezbędna w odpowiedzi bakterii na inaktywację fotodynamiczną. Jak twierdzi Autor, uzyskane wyniki mają istotną wartość kliniczną bo sugerują one, że poprzez użycie czynników prowadzących do zmniejszonej ekspresji *recA*, np. nowobiocyny lub być może jej analogów, można zwiększyć efektywność bakteriobójczą fotoinaktywacji zarówno w przypadku zastosowania endo- jak i egzogennych fotouczulaczy.

Podsumowując, prace badawcze wchodzące w skład habilitacyjnego *Osiągnięcia Naukowego* dr Mariusza Grinholca mają, z jednej strony duże znaczenie poznawcze, gdyż wskazano na możliwe mechanizmy prowadzące do zróżnicowanej podatności danego szczepu *S. aureus* na PDI, z drugiej zaś strony należy podkreślić praktyczne znaczenie tych badań, których wyniki mogą, jeszcze nie taraz ale może w przyszłości, zostać wykorzystane do opracowania nowych strategii terapeutycznych.

3. Ocena pozostałego dorobku naukowego.

Dorobek naukowy dr Mariusza Grinholca oceniam jako wysoki pod względem ilościowym i jako wartościowy pod względem jakościowym. Obejmuje on **32 publikacje łącznie z 7 stanowiącymi *Osiągnięcia Naukowe*** (przed doktoratem 8, po doktoracie 24). Jest pierwszym autorem w 12 pracach (przed doktoratem: 4; po doktoracie: 8). W 18 z nich (przed doktoratem: 5; po doktoracie: 13) jest autorem do korespondencji.

Sumaryczny współczynnik oddziaływania czasopism, w których opublikowano Jego dorobek, wynosi zgodnie z rokiem opublikowania: **64,734** (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** Jego prac (wg bazy Web of Science): **279** (prace przed doktoratem: **152**; prace po doktoracie: **127**). **Indeks Hirscha** (wg bazy Web of Science): **10**. Poza pracami pełnymi, opublikował wiele **streszczeń** zjazdowych: **24** (5 przed uzyskaniem stopnia doktora; 19 po uzyskaniu stopnia doktora); 11 na konferencjach zagranicznych i 13 na konferencjach krajowych.

Analizując tematykę publikowanych prac można stwierdzić, iż działalność naukowa dr M. Grinholca jest stosunkowo jednolita. Ma to swoje odzwierciedlenie w tematyce publikacji z Jego udziałem jako

autora/współautora, w której po uzyskaniu przez Niego stopnia doktora zaznacza się dominacja głównego kierunku zainteresowań badawczych, która przyniosła możliwość wyodrębnienia 7 publikacji stanowiących habilitacyjne *Osiągnięcie Naukowe*. Pozostałe prace dr Mariusza Grinholca opublikowane po doktoracie zostały w większości zrealizowane z udziałem Habilitanta szacowanym w większości przypadków (19) na 40% i powyżej. Dr Mariusz Grinholc jest współautorem 1 patentu.

Elementem ważnym w ocenie aktywności naukowej Habilitanta i pewną miarą wiedzy i odwagi w podejmowaniu ważnych współczesnych wyzwań w dziedzinie nauk biologicznych i medycznych oraz kreatywności naukowej jest zdolność formułowania „nośnej” tematyki projektów badawczych, tym samym umiejętność pozyskiwania środków z różnych źródeł finansowania nauki. Dr Mariusz Grinholc był kierownikiem 3 projektów a w 2 innych był wykonawcą. Wszystkie z nich związane były z tematyką medycznego wykorzystania inaktywacji fotodynamicznej drobnoustrojów. Wynika stąd, że podjęta tematyka badawcza dr Grinholca i współpracującego zespołu znajduje poparcie gremiów decyzyjnych kwalifikujących badania prowadzone w Polsce do finansowania ze środków publicznych (MNiSzW, NCN i NCBiR).

Dr Mariusz Grinholc jest beneficjentem Nagrody zespołowej Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego (2009) oraz Zespołowych Nagród J.M. Rektora Uniwersytetu Gdańskiego (2011, 2014) za osiągnięcia naukowe.

Habilitant prowadzi szeroko zakrojoną współpracę z instytucjami, organizacjami i towarzystwami naukowymi działającymi w kraju i za granicą, czego wynikiem są zazwyczaj publikacje współautorskie. Dotyczy to - m.in. Wojskowej Akademii Technicznej w Warszawie; Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego; Narodowego Instytutu Leków w Warszawie; Wydziału Chemii Politechniki Gdańskiej; Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie; Human Bacterial Pathogenesis, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA; Interfaculty Institute of Microbiology and Infection Medicine Uniwersytetu w Tubingen, Niemcy; Department of Medical Biophysics, Princess Margaret Cancer Centre Uniwersytetu w Toronto, Kanada; Centre for Biomolecular Science, Uniwersytetu w Nottingham, Wielka Brytania.

W Autoreferacie dr Mariusz Grinholc przedstawia plany badawcze na następne lata. Koncentrują się one wokół zagadnień będących kontynuacją prowadzonych dotąd: a) badań nad łącznym działaniem chemioterapeutyków i terapii fotodynamicznej z zamiarem opracowania nowych opcji terapeutycznych; b) badań, które pogłębią/uzupełnią wiedzę na temat celów komórkowych PDI w odniesieniu zarówno do komórek prokariotycznych jak i eukariotycznych. Innym (nowym) zagadnieniem, którym ma zamiar zająć się dr M. Grinholc mają być badania nad zastosowaniem PDI w ograniczaniu nosicielstwa *Streptococcus agalactiae* w drogach rodnych.

3. Ocena działalności dydaktyczno-wychowawczej

Równoległe z działalnością naukową dr M. Grinholc prowadzi działalność dydaktyczną - zajęcia w formie wykładów i ćwiczeń laboratoryjnych dla studentów MWB UG i GUMed oraz na podyplomowych studiach Wydziału Biologii UG „Biologia sądowa”. Był promotorem 4 prac magisterskich, 8 projektów badawczych (licencjackich), 3 prac dyplomowych oraz promotorem pomocniczym w 2 przewodach doktorskich. Poza oczywistym w/w obowiązkiem dydaktycznym, wynikającym z zajmowanego stanowiska dr M. Grinholc jest aktywny w innych przedsięwzięciach na terenie Uczelni i w pozauczelnianych - popularyzujących naukę: Od roku 2012 jest członkiem Wydziałowego zespołu koordynatorów ds. warsztatów, wykładów i pokazów naukowych

organizowanych w ramach Bałtyckiego Festiwalu Nauki. Od roku 2016 jest członkiem zespołu ds. organizacji imprez promocyjnych i edukacyjnych Wydziału Biotechnologii. W jego ramach koordynuje organizację imprez popularyzujących naukę tj. Noc Biologów, czy Targi Akademia. We współpracy z Pomorskim Parkiem Naukowo-Technologicznym wygłasza wykłady popularnonaukowe, udziela wywiadów, inicjuje takie przedsięwzięcia jak tworzenie popularyzujących wiedzę mikrobiologiczną stron internetowych. Dokładne informacje można znaleźć w **Załączniku nr 4** dokumentacji. Pozostałe fakty opisujące Jego aktywność organizacyjną wymienione w Autoreferacie, choć ważne, to nie wykraczają poza obowiązki służbowe pracownika naukowo-dydaktycznego.

Jako inny rodzaj aktywności naukowej dr M. Grinholca można też wymienić fakt powierzenia Mu wykonania recenzji (13) manuskryptów zgłoszonych do publikacji w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym. Świadczy to o zauważeniu Jego osoby w środowisku naukowym.

4. Ocena działalności organizacyjnej

Dr Mariusz Grinholc jest członkiem kilku Towarzystw Naukowych: American Society for Microbiology; International Photodynamic Association); Polskim Towarzystwo Mikrobiologów. Działa też aktywnie na terenie macierzystej Uczelni. Jest członkiem Rady Wydziału Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed (kadencja 2012-2016); był członkiem komisji egzaminu dyplomowego dla studiów pierwszego stopnia na kierunku Biotechnologia (w latach 2012-2015), powołano Go na Członka Uczelnianej komisji wyborczej Uniwersytetu Gdańskiego (kadencja 2016-2020); jest członkiem zespołu ds. organizacji imprez promocyjnych i edukacyjnych na MWB UG i GUMed.

Dr Mariusz Grinholc odbył szereg krótkoterminowych staży w krajowych lub zagranicznych ośrodkach naukowych lub akademickich", podnosząc swoje kompetencje naukowe. W tym zakresie można znaleźć takie kraje poza Polską jak: Hiszpania, Niemcy, Austria, Wielka Brytania.

5. Podsumowanie

Po analizie całości przedstawionej dokumentacji wyrażam pozytywną opinię na temat habilitacyjnego *Osiągnięcia Naukowego* oraz pozostałego dorobku naukowego, dydaktycznego i organizacyjnego dr Mariusza Grinholca. Uważam, że Kandydat jest już w tym momencie swojej kariery naukowej uznanym specjalistą w zakresie biotechnologii, biochemii i mikrobiologii infekcyjnej, przygotowanym do utworzenia i/lub samodzielnego poprowadzenia badań zespołu. Tym samym sądzę, że zarówno *Osiągnięcie Naukowe* dr Mariusza Grinholca zatytułowane "*Opracowanie strategii prowadzących do skutecznej walki ze zjawiskiem szczepowo-zależnej odpowiedzi drobnoustrojów na inaktywację fotodynamiczną*" jak i Jego cały znaczący dorobek naukowy, spełniają wymogi kryteriów osiągnięć osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora habilitowanego. **W związku z powyższym popieram wniosek dr Mariusza Grinholca o nadanie Mu stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk biologicznych w dyscyplinie biochemia.**

Łódź, 15. 06. 2016 r.

Prof. dr hab. Barbara Różalska

PRACOWNIA BIOLOGII ZAKAŻEŃ
w Katedrze Immunologii i Biologii Infekcyjnej UŁ

prof. dr hab. Barbara Różalska