

Bolzano/Fiera di Primiero. Dolomiti

Grudzień 2019/styczeń 2020

I. Recenzja osiągnięcia naukowego – pięć prac łącznie- zatytułowanego „Funkcjonalizacja powierzchni stentów wewnątrznaczyniowych jako metoda zapobiegania powikłaniom zabiegów przezskórnej angioplastyki wieńcowej, oraz całkowitego dorobku naukowego dr med. Magdaleny Wawrzyńskiej.

Cykle pięciu prac opisujących metodę funkcjonalizacji powierzchni stalowych stentów wewnątrznaczyniowych nie czyta się łatwo. W istocie są to badania z zakresu bioinżynierii w których założenia eksperymentalne, stosowane metody, interpretacje uzyskanych wyników zawierają szereg pojęć odległych od medycyny klinicznej. O ile więc metodologia prac jest mi nieznana (ufam że poprawna na co wskazuje doświadczenie Autorki i pozostałych członków zespołu badawczego) o tyle cel tych badań jest intelektualnie atrakcyjny dla każdego Kardiologa. I właśnie to przesłanie skłoniło mnie to przebijania się przez zawichość tekstów mimo czytelnej wykładni prac zaprezentowany przez Habilitantkę w języku polskim. Niegdyś byłem zaangażowany w analizę wymiarów miocytów lewej komory i przyznaję, że zdjęcia komórek pokrywających odpowiednio sfunkcjonalizowane stalowe powierzchnie „stentów przyszłości”, wsparte wykresami oceny morfometrycznej robią na mnie nadal wrażenia. Chciałbym pogratulować Habilitantce wytrwałości w pokonywaniu złożonych procedur badawczych.

Jak wspominałem oceniane osiągnięcie naukowe składa się z pięciu prac

1. Photoactivated titania-based nanomaterials for potential application as cardiovascular stent coatings. Boicybern. Biomed. Eng.2014;34:189-197.

2. Stainless steel surface functionalization for immobilization of antibody fragments for cardiovascular applications. J.Biomed.Mater.Res. Part A 2016;104:821-832.
3. Biocompatible carbon-based coating as potential endovascular material for stent surface. BioMed Res.Int. 2018,vol.2018 art.ID2758347 (10 s).
4. Functionalized CD 133 antibody coated stent surface simultaneously promotes EPCs adhesion and inhibits smooth muscle cell proliferation. A novel approach to prevent in-stent restenosis. Colloid Surf. B – Biointerfaces 2019;174:587-589.
5. Functionalization with a VEGFR-2 binding antibody fragment leads to enhanced endothelialization of a cardiovascular stent *in vitro* and *in vivo*. J Biomed. Mater. Res. Part B 2019; 9999B:1-12.

Doktor Magdalena Wawrzyńska była współautorem w pracach pierwszej i drugiej, oraz pierwszym autorem w pracach trzeciej, czwartej i piątej. IF za cykl publikacji wynosi 13,675, punktacja KBN/MNiSW 140,0 Z formalnego punktu widzenia łączna ocena osiągnięcia naukowego nie budzi zastrzeżeń. Jakie wnioski wypływają z tych prac?

- Można uzyskać skuteczną modyfikację chemiczną oraz funkcjonalizację powierzchni stalowych (316 L. Balton) pokrywając je związkami na bazie tlenku tytanu a następnie wolnymi grupami aminowymi i tiolowymi. Co więcej można również stal nierdzewną pokryć warstwą **garfenu**. Zdumiewa fakt, że ta dwuwymiarowa „miodowa struktura” zwiększa adhezję i proliferację komórek śródbłonkowych (enotelializacja), hamując ich transformację w kierunku komórek mezenchymalnych. Jak wiadomo te ostatnie aktywnie partycypują w procesie restenozy.
- Zastosowano po raz pierwszy innowacyjne połączenie fragmentów przeciwciał (scFv) wiążących antygeny powierzchniowe komórek śródbłonkowych: VEGFR2 oraz przeciwciał wiążących CD 133+ uzyskując biofunkcjonalną powierzchnię stentów. Oba przeciwciała powierzchni funkcjonalnej w porównaniu z klasyczną powierzchnią stalową w istotny sposób zwiększyły wiązanie komórek endotelialnych; EPC i HUVEC. Co więcej dodanie przeciwciał anty CD 133 zwiększa liczbę komórek śródbłonka w stosunku do komórek mięśni gładkich aorty. Hamując proliferację tych ostatnich eliminują jeden z mechanizmów sprzyjających powstawaniu restenozy.
- Biofunkcjonalizacja klasycznej powierzchni stalowej (316 L) umożliwia otrzymanie biokompatybilnego implantu o wysokiej selektywności względem komórek EPC i HUVEC (*in vitro*), którego skuteczność potwierdzono w krótkoterminowym badaniu *in vivo* – ostatnia piąta praca.
- Z punktu widzenia bezpieczeństwa, powierzchnie funkcjonalizowane nie zwiększają agregacji płytek krwi (działanie prozakrzepowe) jak i nie zwiększają hemolizy erytrocytów. Nadto u zwierząt eksperymentalnych nie stwierdzono reakcji alergicznej na używany w pracach materiał, toksyczności systemowej oraz nanotoksyczności tytanowych powłok stentu.

- W obserwacji *in vivo* po 5-dniach 93% przęseł stentu było pokrytych neointimą a po 30 dniach 100% zaś grubość neointimy wynosiła około 80 μm .

Wnioski są więc obiecujące. Czy jednak sprawdzą się w badaniach klinicznych u ludzi? Habilitantka prezentuje wyniki badań podstawowych, zaś obserwacja pięcio- i trzydziesto-dniowa Białej Zwisłouchej zapewne spełnia kryteria eksperymentalnej poprawności, to jednak nie wystarcza dla „rozcieńczenia” mojego klinicznego sceptycyzmu. W latach dziewięćdziesiątych ubiegłego stulecia obserwowałem zanik entuzjazmu dla stalowych stentów drucianych (coil stents) na rzecz stentów rurkowych (tubular) z wycinaną różnorako przy użyciu techniki laserowej powierzchnią (slotted tube stents). Gdy 2002 roku w Paryżu zaprezentowano wyniki badania RAVEL (porównanie stentu pokrytego lekiem (DES, sirolimus) z klasycznym stentem stalowym) entuzjaści mówili o końcu chirurgii pomostów aortalno-wieńcowych na rzecz przezskórnej angioplastyki. Ostatnie wytyczne dotyczące rewaskularyzacji (ESC 2018) nie podzieliły powszechnego entuzjazmu dla stentów bioabsorbowalnych - poziom rekomendacji III C, jakkolwiek pozostawiono nadzieję dla dalszych badań klinicznych. Oczywiście powyższe uwagi – wynik moich wieloletnich doświadczeń - nie są wyrazem krytycznej oceny badań prowadzonych przez Habilitantkę. Tym niemniej oboje dobrze wiemy, że 5-cio a nawet 30 dniowa obserwacja Białej Zwisłouchej (przyjemna nazwa) wobec powszechnie już publikowanych 5-cio letnich obserwacji pacjentów z implantowanymi stentami jest dla oceny klinicznej niewystarczające. Nadto wnioski konstruowane w „oparach badawczego entuzjazmu” mogą być błędne. Wiem, że moje sceptyczne stanowisko klinicysty jest wygodne ale i konieczne. Wygodne bo łatwo kontestować niepotwierdzone jeszcze wyniki badań eksperymentalnych, konieczne bowiem uzmysławia obligatoryjność twardej oceny klinicznej.

Prezentowane wnioski pobudzają do dyskusji i stawiania pytań. Jak dobrze rozumiem Autorka wydobywa z zapomnienia stare stenty stalowe rekomendując ich stosowanie pod warunkiem funkcjonalizacji ich powierzchni. W tej postaci mogą stanowić alternatywę dla stentów uwalniających lek (DES). Te sprawdzone klinicznie i powszechnie akceptowane stenty mają również swoje słabe strony. Związane są z rodzajem leku i kinetyką jego uwalniania czy polimerem pokrywającym przęśla stentu i uwalniającym lek (trwały vs absorbowalny). Zbudowane są jednak z rozciągliwego stopu kobaltowo-chromowego umożliwiającego konstrukcję cienkich przęseł (60 μm), co obecnie traktowane jest jako jeden z istotniejszych czynników zapobiegających restenozie. Czy stenty stalowe podążają tym wymogom konstrukcyjnym? Czy powierzchnia stopu kobaltowo-chromowego w równym stopniu podda się procesowi funkcjonalizacji? Gdyby tak było osobiście byłbym skłonny głosować za tym stopem.

Intrygujące są właściwości grafenu. Jego właściwości umożliwiają procedurę funkcjonalizacji (istotnie zwiększona endotelializacja) jednak jest on znacznie mniej rozciągliwy od stali co musi zmienić mechaniczną charakterystykę stentu. Należę do pokolenia kardiologów interwencyjnych, którzy w latach dziewięćdziesiątych ubiegłego stulecia musieli ostrożnie sami ugniatać na balonie stalowy stent Palmaz-Schatz'a. W zależności od średnicy balonu

stent ulegał rozciągnięciu do odpowiedniego rozmiaru. Współczesne technologie wykluczają ręczne nakładanie i zginięcie stentu na balonie, ale czy podwójna warstwa stal + grafen pozwoli rozciągnąć stent do odpowiedniego rozmiaru? Np. profil stentu ORSIRO umocowanego na balonie wynosi 0,99mm i stent może być rozciągany do średnicy 4,0 – 4,5 mm! Umożliwia to odpowiedni *design* tego kobaltowo-chromowego stentu o grubości przęseł około 60 μm. Jak mi się zdaje Autorka nie badała mechanicznych własności takiego „dwuwarstwowego” stentu zarówno *in vitro* jak i *in-vivo*. Właśnie to moje „chałupnicze” doświadczenie z przeszłości nasunęło mi powyższą refleksję. Współczesna - z 2019 roku refleksja jest bardziej prozaiczna. Chodzi mi o praktyczny już upadek spółki Nano Carbon w Warszawie z którą Habilitantka współpracowała. Nie wróży to szybkiego wdrożenia dalszych prac nad tym stentem. A może się mylę?

Przedstawione do oceny prace są interesujące i wartościowe, otwierają bowiem nowe możliwości w poszukiwaniu stentu idealnego - jeżeli taki istnieje. Wysiłki są więc całkowicie uzasadnione. Czego mi brakuje?

Autorka w obszernym omówieniu wyjaśnia ogólny cel zadań badawczych, technik funkcjonalizacji powierzchni stentów, komentuje wyniki badań *in vitro* i *in vivo*. Brakuje mi jednak krytycznych uwag o ograniczeniach metodologicznych. Rozumiem, że przy publikacji pięciu prac do druku Habilitantka musiała uwzględniać uwagi recenzentów w kolejnych czasopiśmie. Jednakże w procedurze habilitacyjnej recenzenci, szczególnie klinicyści nie mający doświadczenia w eksperymencie laboratoryjnym (myślę o sobie), powinni mieć sposobność zapoznania się z opinią Habilitantki na temat potencjalnych ograniczeń metodologicznych. Intuicyjnie wyczuwamy, że w każdej procedurze badawczej jest „słabe ogniwo”. Przedstawiona przez dr med. Magdalenę Wawrzyńską na stronie trzynastej zbiorczego opracowania lista potencjalnych korzyści klinicznych jest długa i rozbijająca entuzjastyczna. Oczekiwałem od dojrzałej badaczki uwag o możliwych zagrożeniach utrudniających realizację klinicznych benefitów. Przy obecnym trybie postępowania habilitacyjnego problem ten został (dawniej: „krytyka metody”, „uwagi do metody”) rozcieńczony w serii prac i jego merytoryczną wartość trudno uchwycić. Powyższa uwaga w niczym jednak nie umniejsza mojej wysokiej oceny osiągnięcia naukowego dr med. Małgorzaty Wawrzyńskiej

II. Recenzja pozostałych osiągnięć naukowych dr med. Magdaleny Wawrzyńskiej.

Zainteresowania naukowe habilitantki nie ograniczają się do medycyny translacyjnej, działu wprowadzającego do praktyki klinicznej nowe technologie i których wyniki są przedmiotem powyższej recenzji. Należy jednak dodatkowo podkreślić że w powyższych zagadnieniach Habilitantka jest współautorem opatentowanych nowych rozwiązań technologicznych. Mnie szczególnie interesują losy zgłoszeń patentowych P.414368 i PCT/PL2016/050048 (EP 16785274.8) dotyczących endotelializacji powłoki grafenowej w stentach endowaskularnych. Za badania te Habilitantka została współlaureatem nagrody zespołowej (medal brązowy) na Międzynarodowych Targach Wynalazczości – Paryż 2016.

Dr. Magdalena Wawrzyńkiewicz jest członkiem międzynarodowych zespołów badawczych zajmujących się zagadnieniem reperfuzji wieńcowej, szczególnie zaś roli MMP-2. Wyniki tych badań były opublikowane w *J Proteomics* 2014 i *J Cell Mol Med.* 2016. W pracach tych wykazano po raz pierwszy że wewnątrzkomórkowe zahamowanie MMP-2 poprawiło kurczliwość kardiomiocytów nadto hamowanie to wiąże się ze zwiększoną aktywnością syntezy ATP.

Do kolejnych sukcesów habilitantki należy zaliczyć badania nad wpływem pola elektromagnetycznego niskiej częstotliwości (LF-EMF) na kurczliwość mięśnia sercowego w warunkach niedokrwienia. Wyniki badań opublikowano w *Bio.Med.Res.Int* 2015 i *Exp.Biol.Med.*2018. W pracach tych wykazano, że ekspozycja mięśnia sercowego w trakcie niedokrwienia na oddziaływanie krótkich cykli LF-EMF działa protekcyjnie na miocyty. Stwarza to możliwość terapeutycznego zastosowania pola elektromagnetycznego w skojarzeniu z leczeniem farmakologicznym. Za wyniki tych badań Habilitantka wraz z innymi badaczami została wyróżniona Srebrnym Medalem na Światowych Targach Wynalazczości, Badań Naukowych i Nowych Technologii BRUSSELS EUREKA 2006.

Inne zainteresowania Habilitantki koncentrowały się wokół technik wykorzystania nanocząsteczek jako substancji o działaniu przeciwbakteryjnym lub jako potencjalnych nośników leków. Trzeba wyraźnie podkreślić że w działalności naukowej Habilitantki uderza szerokie spektrum badań eksperymentalnych oraz umiejętność prowadzenia badań zespołowych. Czytając *dossier* Autorki byłem przyjemnie zaskoczony rozległością prowadzonych badań podstawowych, których zasadniczym celem jest wdrożenie nowych rozwiązań technologicznych do praktyki klinicznej. Fakt ten przeczy powszechnej opinii o „uwiądzie” nauk podstawowych w medycynie w naszym kraju. Napawa to optymizmem.

Nadto Autorka kieruje lub bierze udział jako współautorka w pięciu międzynarodowych projektach badawczych dotyczących: technik nanoszenia warstw grafenu na powierzchnie stentu, terapii fotodynamicznej niestabilnej blaszki miażdżycowej czy opracowania nowej

generacji stentów biodegradowalnych. Dr Magdalena Wawrzynkiewicz brała aktywny udział w 19 konferencjach międzynarodowych i krajowych, zaś wiele z opracowanych przez Autorkę rozwiązań innowacyjnych uległo komercjalizacji przy współpracy z polskimi i międzynarodowymi spółkami (Balton, Vornia Biomaterials, Cook Ireland Ltd.) Szczegółową listę tych osiągnięć dr med. Magdalena Wawrzynkiewicz przedstawiła w obszernym opracowaniu. Habilitantka prowadzi również szkolenia przed-dyplomowe jak i po-dyplomowe oraz zajmuje się pracą dydaktyczną ze studentami. Lista aktywności naukowych jest długa i świadczy o niezwyklej aktywności habilitantki.

Całkowity dorobek naukowy stanowi 31 publikacji pełnotekstowych, w tym 16 w czasopiśmie z „impact factor”, 8 rozdziałów w podręcznikach międzynarodowych i 3 rozdziały w podręcznikach krajowych. Łączna punktacja wynosi IF=40,575 oraz KBN/MNiSW = 456,0 pkt. Liczba cytowań wynosi 108 (bez autocytowań 100) indeksu Hirscha =5 .Po wyłączeniu publikacji wchodzących w skład cyklu habilitacyjnego, łączna punktacja wynosi IF-26.900 oraz KBN/MNiSW = 316,0 pkt. Z formalnego punktu widzenia Habilitantka spełnia więc kryteria upoważniające ją do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego. Z formalnego punktu widzenia Habilitantka spełnia więc kryteria upoważniające ją do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego.

Podsumowując nie mam wątpliwości, że dr Magdalena Wawrzynkiewicz jest wartościowym pracownikiem nauki i w pełni zasługuje na tytuł doktora habilitowanego, którego przyznanie rekomenduję Wysokiej Komisji.

Z wyrazami szacunku i poważania



Prof. dr hab. med. Stefan Grajek