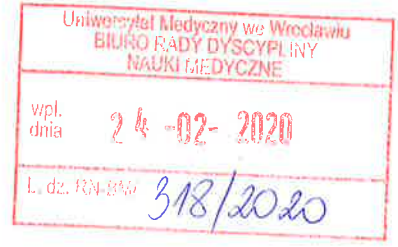


V1011

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
RADA DYSCYPLINY NAUKI MEDYCZNE
Przewodniczący
prof. dr hab. Grzegorz Mazur

Kraków, 15 lutego 2020 r.

Prof. dr hab. n. med. Marek Sanak
Zakład Biologii Molekularnej i Genetyki Klinicznej
II Katedra Chorób Wewnętrznych im. Prof. Andrzeja Szczeklika
Uniwersytet Jagielloński – Collegium Medicum



Recenzja dzieła i dorobku habilitacyjnego dr n. med. Marka Murawskiego oraz opinia w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk medycznych, w dyscyplinie medycyna.

Pan dr Marek Murawski jest absolwentem Wydziału Lekarskiego Akademii Medycznej we Wrocławiu. Z macierzystą uczelnią wiąże się cała kariera naukowa i zawodowa Habilitanta. Po ukończeniu studiów w 1986 r., nastęnie rocznym stażu podyplomowym w Samodzielnym Publicznym Szpitalu Klinicznym we Wrocławiu został zatrudniony w I Katedrze i Klinice Ginekologii na stanowisku asystenta w latach 1987 do 2000. Stopień naukowy doktora nauk medycznych uzyskał w 1998 r. na podstawie pracy eksperymentalnej zatytułowanej „Zastosowanie techniki mikrochirurgicznej w zespoleniach jajowodowych u królików z wykorzystaniem wchłaniających i niewchłaniających nici chirurgicznych”. Promotorem rozprawy był Pan prof. dr hab. Mieczysław Cisło. Od 2000 r. Pan dr Marek Murawski jest zatrudniony na stanowisku adiunkta w I Katedrze i Klinice Ginekologii i Położnictwa Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. W latach 2002 do 2009 był również pracownikiem dydaktycznym Akademii Wychowania Fizycznego we Wrocławiu, zatrudnionym w niepełnym wymiarze godzin. Habilitant jest klinicystą, uzyskał dwa stopnie specjalizacji z Ginekologii i Położnictwa, pierwszy stopień specjalizacji z Chirurgii Ogólnej oraz jest specjalistą Ginekologii Onkologicznej.

Omówienie osiągnięcia habilitacyjnego Pana dr Marka Murawskiego

Jako osiągnięcie habilitacyjne Pan dr Marek Murawski przedstawił monografię zatytułowaną „Badania nad wpływem selenu na integralność chromatyny plemnikowej w przypadkach mężczyzn z upośledzoną płodnością”. Praca została wydana w 2019 r. nakładem Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.

Rozprawa habilitacyjna jest oparta na niepublikowanej pracy eksperymentalnej, przeprowadzonej na materiale klinicznym, której celem była weryfikacja dwóch hipotez.

Pierwsza dotyczyła obecności uszkodzeń DNA jądrowego plemników od mężczyzn z rozpoznaną niepłodnością. W drugiej z hipotez Habilitant postanowił sprawdzić, czy egzogeny selen dodany do nasienia męskiego pozyskanego w ramach procedury badania ejakulatu i przygotowania do wspomaganego zapłodnienia, może zmniejszyć częstość występowania uszkodzeń DNA jądrowego gamety. Koncepcja badawcza, szczególnie w zakresie drugiej hipotezy nie była wcześniej rozważana ani też badana. Jest atrakcyjna ze względu na ograniczone możliwości interwencji w przypadku niezdolności plemnika do zapłodnienia. Ten fizjologicznie złożony proces, wymaga uprzedniej kapacytacji gamety, czyli kaskady molekularnych zjawisk, które pozwalają zwiększyć ruchliwość witki, umożliwić rozpoznanie osłonki przejrzystej oocyta i wyzwolić akrosomalną egzocytozę. Od blisko 30 lat ugruntował się pogląd, że niezbędnym składnikiem procesu kapacytacji jest produkcja reaktywnych form tlenu, w czym uczestniczą mitochondria i enzymy cytoplazmy plemnika. Wybór selenu, niezbędnego kofaktora peroksydazy glutationu i tioredoksyn wydaje się uzasadniony. W świetle publikacji wykorzystanie innych substancji o działaniu antyoksydacyjnym, np. alfa-tokoferolu albo apocyniny powodowało poprawę właściwości plemników w modelach zwierzęcych.

Materiałem do badania było nasienie człowieka badane przed procedurą wspomaganego zapłodnienia w akademickim ośrodku Uniwersytetu Cornell w Nowym Jorku. Badanie uzyskało akceptację uniwersyteckiej komisji bioetycznej. Rekrutacją objęto 50 mężczyzn, spełniających jasno sprecyzowane kryteria włączenia do badania oraz kryteria wykluczające. Byli to mężczyźni z par niepłodnych, zakwalifikowanych do wspomaganego zapłodnienia z powodu niepłodności, przy braku przesłanek do rozpoznania ostrej niepłodności męskiej oraz wykluczeniu niepłodności kobiecej spowodowanej czynnikami anatomicznymi. Na podstawie standardowej oceny morfologicznej nasienia grupa badana została podzielona na 28 mężczyzn z niepłodnością męską oraz 22 mężczyzn, których spermogram nie odbiegał od normy. Technika wykrywania pęknięć lub fragmentacji chromatyny polegała na enzymatycznym znakowaniu wolnych końców jądrowego DNA plemnika w reakcji przyłączania dezoksynukleotydu urydynowego ze znacznikiem fluoresceiny przez terminalną transferazę nukleotydową – TUNEL. Komercyjna wersja tego testu jest standardowo używana do znakowania komórek apoptotycznych w biologii komórki i charakteryzuje się wysoką czułością i swoistością, a także powtarzalnością wyników. W pracy wykorzystano do rejestracji wyników mikroskopię fluorescencyjną, jądra plemników były wybarwiane DAPI, fluorochromem emitującym w zakresie światła niebieskiego. Statystyka wyników była gromadzona na podstawie analizy 200 gamet, dokumentację

ilustrującą zastosowaną technikę detekcji zebrano w postaci mikrofotografii z mikroskopii fluorescencyjnej, przy wykorzystaniu filtrów dla widma emisji fluoresceiny i DAPI. Zebrane dane były analizowane typowymi narzędziami statystycznymi, w postaci nieparametrycznych statystyk porównania międzygrupowego, następnie po stabilizacji wariancji transformacją Boxa-Coxa, również testem t-Studenta. Wyniki pracy zostały przedstawione w formie tabelarycznej, zarówno dla opisowych danych demograficznych, jak i wykrytych komórek z fragmentacją DNA. Eksperymentalna część pracy polegała na ekspozycji nasienia męskiego na trzy różne stężenia seleninu sodu w zakresie 5, 10 i 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Po inkubacji w temperaturze 37°C trwającej 20 min, próbki te były poddane identycznej analizie jak materiał wyjściowy. W rezultacie, Habilitant przedstawił dowód na obecność zwiększonego odsetka plemników z uszkodzeniami chromatyny jądrowej u mężczyzn z niepłodnością kwalifikowaną jako męska. Wykazanie zależności między większym odsetkiem plemników z pęknięciami chromatyny wykrytych testem TUNEL a istotnie zmniejszoną ich ruchliwością lub zmniejszoną frakcją gamet o prawidłowej morfologii było w latach, kiedy wykonano badanie, obserwacją nową i znajdującą potwierdzenie w innych badaniach. Przy tym, w publikowanych pracach z zastosowaniem techniki hybrydyzacji *in situ* (FISH) wykrywającą nieodróżniane zaburzenia genomu, relacja taka była słaba albo nieistotna statystycznie. Warto przy tym zaznaczyć, że technika FISH wykrywała nieodróżniane zaburzenia genomu gamety męskiej – aneuploidie, natomiast nie identyfikowała obecności pęknięć chromatyny. Zbliżone wyniki uzyskiwano natomiast stosując test kometkowy lub cytometryczną analizę DNA plemnika. Wyniki eksperymentu polegającego na inkubacji nasienia męskiego ze związkiem nieorganicznym selenu przyniosły interesujący wynik. Stwierdzono bowiem obniżenie odsetka plemników z obecnością pęknięć chromatyny wyłącznie w grupie mężczyzn z niepłodnością męską. Redukcja odsetka plemników z obecnością uszkodzeń chromatyny osiągnęła istotność statystyczną dla największego zastosowanego stężenia selenianu – 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Po analizie różnic efektu stężenia związku selenu w grupie mężczyzn z niepłodnością męską, z wykorzystaniem bardziej czułego testu parametrycznego wymagającego transformacji wykładniczej surowych danych, różnice były również istotne statystycznie dla stężenia selenu 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Na podstawie uzyskanych wyników Pan dr Marek Murawski postawił konkluzję o ochronnym działaniu selenu *in vitro* na integralność chromatyny plemników oraz zaproponował uwzględnienie tego mikroelementu podczas przygotowania plemników do zapłodnienia w procedurze wspomaganiej prokreacji.

W podsumowaniu recenzowanego osiągnięcia habilitacyjnego, zastosowanie techniki TUNEL do wykrywania uszkodzenia chromatyny jądra plemnika potwierdziło, że jest to zjawisko około dwukrotnie częstsze w przypadku niepłodności męskiej w odniesieniu do niepłodności o nieustalonej przyczynie. Zjawisku temu towarzyszyła zmniejszona ruchliwość plemników i zwiększona teratozoospermia. Podniesieniu stężenia selenu w płynie nasiennym do około 10-20 $\mu\text{g/mL}$ towarzyszy redukcja częstości uszkodzenia chromatyny plemnika, a efekt ten jest zauważalny w grupie z niepłodnością męską.

Przystępując do krytycznego omówienia rozprawy, przede wszystkim Recenzent chciałby skomentować zagadnienie stresu oksydacyjnego i jego roli w biologii męskiego układu rozrodczego. Jest faktem mającym wiele dowodów eksperymentalnych, że płyn nasienny charakteryzuje się wysoką aktywnością enzymów antyoksydacyjnych, szczególnie dysmutazy nadtlenkowej. Habilitant wiąże biodostępność selenu z aktywnością systemów antyoksydacyjnych ejakulatu na podstawie występowania selenocysteiny w takich białkach jak peroksydaza glutationu i tioredoksyny. Przeprowadzone eksperymenty, a następnie ich wyniki, nie upoważniają jednak do postawienia wniosku o antyoksydacyjnym mechanizmie działania selenu w zbadanym modelu *in vitro*. Ta uwaga krytyczna wynika z biologicznym zależności. Selen zastępuje atom siarki w cysteinie i podlega wbudowaniu w syntezowany w rybosomach łańcuch polipeptydowy w postaci reszty selenocysteiny; genetyczny system rozpoznania miejsca wstawienia tego aminokwasu jest dobrze poznany. Jest wątpliwe, by w czasie 20 minutowej inkubacji doszło do edycji mRNA dla selenoprotein, translacji z wykorzystaniem uformowanego po dodaniu egzogenego selenu selenocysteinylo-tRNA, a następnie antyoksydacyjnej aktywności zsyntezowanego enzymu peroksydazy czy tioredoksyn. Obserwowane zmniejszenie częstości plemników ze uszkodzeniami chromatyny oznaczałoby, że w czasie tych samych 20 min. doszło do jej naprawy, w modelu pęknięć popromiennych chromatyny wykazano jednak, że taki proces zajmuje wiele godzin. Jest zatem bardziej prawdopodobne, że proces indukcji uszkodzeń chromatyny jest ciągły w czasie oraz zachodzi nie tylko w plemnikach w czasie ich pobytu w drogach nasiennych, lecz również w ejakulacie. Ta ewentualność jest bardziej prawdopodobna zważywszy dużo większe ciśnienie parcjale tlenu w roztworach wystawionych na działanie powietrza atmosferycznego w porównaniu ze środowiskiem wewnątrz organizmu. Ponadto, w publikacjach opisujących częstość uszkodzeń chromatyny plemnika, była ona niższa w gametach pobranych drogą aspiracji z gonady niż w ejakulacie. Zatem bardziej prawdopodobnym wytłumaczeniem efektu obserwowanego przez Habilitanta w wyniku jego pracy eksperymentalnej jest bezpośredni i nieenzymatyczny efekt antyoksydacyjny związków

selenoorganicznych powstających po domieszkowaniu seleninu sodu do ejakulatu. Działanie antyoksydacyjne peptydomimetycznych związków selenoorganicznych jest dość dobrze poznane, a jeden z nich – ebselen był intensywnie przebadany w farmakologii. Z ostrożności naukowej we wnioskach wynikających z opublikowanej pracy habilitacyjnej pozostawiłbym antyoksydacyjne działanie selenu, bez wskazywania mechanizmu naprawy uszkodzeń DNA.

Omówienie dorobku naukowego, dydaktycznego i organizacyjnego Pana dr Marka Murawskiego

Aktywność naukowa po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych obejmuje 7 publikacji oryginalnych, które się ukazały w czasopismach o zasięgu międzynarodowym i są notowane w bazie Clarivate. Łączny współczynnik oddziaływania (IF) tych czasopism osiągnął 14,885. Pan dr Marek Murawski był współautorem pracy kazuistycznej z genetyki klinicznej (Eur J Pediatr 2007). Jest również współautorem pracy eksperymentalnej, w której na modelu szczurzym zbadano protekcyjny wpływ wieloantygenowej szczepionki RESAN na rozwój endometriozy (Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2009). W kontynuacji tego modelu badawczego zostały zbadane limfocyty Th2 krwi obwodowej szczura oraz produkowane przez nie cytokiny. Praca była opublikowana w BioMed Res Int 2013. Habilitant uczestniczył w badaniach nad rakiem sutka, publikacja dotycząca oceny ekspresji białka NUCKS1 w korelacji z cechami kliniczno-patologicznymi nowotworu ukazała się w Exp Ther Med 2014. Kolejna publikacja, w której Habilitant jest współautorem, ukazała się w Human Cell 2016 i dotyczy markerów apoptozy spermatocytów: fosfatydyloseryny i kaspazy-3 w kontekście sukcesu procedury zapłodnienia *in vitro* albo docytoplazmatycznego wstrzyknięcia plemnika. Pan dr Marek Murawski powrócił do zagadnienia raka sutka, publikując jako pierwszy autor w In J Mol Sci 2016 pracę dotyczącą wykrywania przerzutów nowotworu do węzłów chłonnych na podstawie wykrywania mRNA dla cytokeratyny-19 i immunohistochemicznej detekcji metaloproteinazy błonowej-9. W roku 2017 ukazała się publikacja współautorstwa Habilitanta, dotycząca nowej metody leczenia liszaja płaskiego srom, opartej na fotodynamicznym działaniu kwasu 5-aminolewulinowego.

Pan dr Marek Murawski wykazał również dorobek publikacyjny w czasopismach bez współczynnika oddziaływania. Jest to 9 publikacji oryginalnych jego współautorstwa, które się ukazały w języku polskim. Dotyczą one zagadnień z zakresu ginekologii i położnictwa, za wyjątkiem jednej publikacji alergologicznej z 2006 roku. Pięć publikacji współautorstwa Habilitanta ukazało się w czasopismach wydawanych w języku angielskim, dotyczą one ginekologii oraz problematyki zakażeń. W roku 2007 Habilitant opublikował jako wyłączny

autor pracę przeglądową dotyczącą mikrochirurgii, tematyki w której jest ekspertem. Dorobek naukowy Pana dr Marka Murawskiego obejmuje również 5 monograficznych rozdziałów w podręczniku Ginekologii Onkologicznej (Urban & Partner 2006) oraz dwa rozdziały w Zarysie ginekologii onkologicznej (Termedia 2012). Podsumowując aktywność naukową Pana dr Marka Murawskiego, dotyczy ona tematyki ginekologiczno-położniczej i dominuje w niej praktyczny aspekt badań.

W zakresie współpracy i wymiany międzynarodowej, Habilitant był dwukrotnie stypendystą i prowadził badania na bardzo dobrych uniwersytetach w Stanach Zjednoczonych. Przez 6 mies. w latach 2000-2001 szkolił się w technikach wspomaganego rozrodu na Uniwersytecie im. Rusha w Chicago. Drugi półroczny pobyt w USA miał miejsce na Uniwersytecie Cornella w Nowym Jorku, gdzie wykonał prace eksperymentalne do swojego osiągnięcia habilitacyjnego.

Habilitant prowadzi regularną działalność dydaktyczną, ucząc ginekologii i położnictwa studentów Wydziału Lekarskiego oraz Oddziału w Języku Angielskim. Jest również odpowiedzialny za koordynację tych zajęć oraz ich przygotowanie programowe. Był także opiekunem indywidualnego toku studiów oraz studenckich praktyk wakacyjnych. Współorganizował kursy podyplomowe z ginekologii i położnictwa oraz prowadził autorski kurs z zaawansowanych technik mikrochirurgicznych.

Mocnym elementem działalności organizacyjnej Pana dr Marka Murawskiego jest jego aktywne uczestniczenie w życiu uczelni i w strukturach uczelnianych. Jest wieloletnim przedstawicielem środowiska do Rady Wydziału i obecnym jej sekretarzem, koordynował przebieg przewodów doktorskich i posiedzeń komisji konkursowych. Dowodem zaufania jego koleżanek i kolegów jest członkostwo Habilitanta w licznych stałych komisjach, w tym do Oceny Kadry oraz Zatrudnienia Nauczycieli Akademickich, a także Jakości Kształcenia. Od 8 lat jest nieprzerwanie członkiem Senatu Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu oraz Kolegium Elektorów.

Za swoje osiągnięcia organizacyjne był dwukrotnie nagradzany Indywidualną Nagrodą Rektorską I stopnia.

Opinia w sprawie nadania Panu dr Markowi Murawskiemu stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk medycznych, w dyscyplinie medycyna.

Habilitant przedłożył osiągnięcie naukowe oparte na wynikach eksperymentalnych. Plan tego badania, zastosowana technika biologii molekularnej oraz analiza wyników są poprawne. Nie w pełni zgadzam się z interpretacją i wnioskami końcowymi, jednakże uznaje

nowatorski i praktyczny aspekt osiągnięcia habilitacyjnego i uważam je za dostateczny dla jego przyjęcia. Dorobek naukowy Pana dr Marka Murawskiego jest umiarkowany, są to publikacje oryginalne, w których Habilitant jest współautorem. Pozytywne jest, że ich tematyka dość dobrze skupia się na istotnych zagadnieniach z zakresu ginekologii i onkologii ginekologicznej. Wyższa ocena należy się osiągnięciom dydaktycznym Habilitanta, zwłaszcza, że są poparte autorstwem wielu rozdziałów podręcznikowych oraz organizacją szkoleń podyplomowych. Bez zarzutu jest działalność organizacyjna Pana dr Marka Murawskiego i jego aktywne uczestnictwo w funkcjonowaniu Uniwersytetu Medycznego.

W związku z powyższymi pozytywnymi ocenami cząstkowymi wnioskuję do Przewodniczącego Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich o przyjęcie mojej ogólnej pozytywnej opinii w sprawie nadania Panu dr Markowi Murawskiemu stopnia doktora habilitowanego.


Marek Sanak