Dr hab. Agnieszka Rak, prof. UJ
Pracownia Fizjologii i Toksykologii Rozrodu
Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych
Wydział Biologii
Ul. Gronostajowa 9, 30-387 Kraków
Tel. 012 664 50 03
agnieszka.rak@uj.edu.pl

Kraków, dn.07.08.2023 r.

RECENZJA PRACY DOKTORSKIEJ MGR INŻ. KAROLA MIERZEJEWSKIEGO

pt. „Udział receptorów aktywowanych przez proliferatory peroksysomów gamma (PPARγ) w regulacji procesu zapalnego w błonie śluzowej macicy świni (Sus scrofa domestica)"

Recenzja została przygotowana na wniosek Rady Naukowej Dyscypliny nauki biologiczne Uniwersytetu Warmińsko – Mazurskiego w Olsztynie. Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została wykonana w Katedrze Anatomii i Fizjologii Zwierząt, Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko – Mazurskiego w Olsztynie, pod opieką naukową Pań promotorek Profesor Iwony Bogackiej i promotorki pomocniczej Doktor Aleksandry Kurzyńskiej. Podstawą rozprawy doktorskiej są trzy spójnie tematycznie publikacje naukowe, które ukazały w się w prestiżowych, recenzowanych, międzynarodowych czasopismach z listy *Journal Citation Reports*: *Biology of Reproduction (IF 4.161), Scientific Reports (IF 4.997)* i *Theriogenology (IF 2.923)* w latach 2021 i 2022. Czasopisma te znajdują się również w wykazie czasopism naukowych Ministerstwa Edukacji i Nauki z przyznanymi odpowiednio punktami 200, 140 i 140. Łączny IF czasopism stanowiących podstawę do ubiegania się o nadania stopnia doktora nauk biologicznych wynosi 12.081, a liczba punktów MEiN to 480. Publikacje są współautorskie (6 - 8 autorów) i we wszystkich pracach Pan mgr inż. Karol Mierzejewski jest pierwszym autorem, a Jego wkład w powstanie tych prac jest znaczący i obejmuje m.in. udział w opracowaniu koncepcji badań oraz metodyki badań, wykonaniu doświadczeń in vitro oraz analiz laboratoryjnych, opracowanie wyników, przygotowanie tekstu manuskryptu oraz odpowiedzi na recenzje. Badania do pracy doktorskiej wykonano w oparciu o środki finansowe pochodzące z Narodowego Centrum Nauki (NCN), projekt OPUS 9: 2015/17/B/NZ9/03596, kierownictwa Pani Profesor Iwony Bogackiej.

Przedstawione do analizy opracowanie polskojęzyczne obejmuje 44 strony na które składają się streszczenie w języku polskim i angielskim, informacja o opublikowanych oryginalnych pracach stanowiący podstawę doktoratu, wstęp, hipotezy i zadania badawcze, materiał i metody, wyniki, podsumowanie i wnioski, 57 pozycji literatury, kopie oryginalnych publikacji, oświadczenia

współautorów oraz krótka charakterystyka dorobku naukowego Doktoranta. W mojej opinii dorobek Pana mgr inż. Karola Mierzejewskiego jest wartościowy, ponieważ obejmuje łącznie 9 oryginalnych artykułów w czasopismach naukowych, w tym 6 artykułów z pierwszym autorstwem oraz 3 artykuły współautorskie. Na uwagę i moje duże uznanie zasługuje także fakt, że Doktorant pełnił/pełni funkcję kierownika w projektach Preludium 18 i Opus 24 finansowanych ze środków NCN. Wyniki prowadzonych badań Doktorant prezentował w postaci 11-tu doniesień naukowych/prezentacji ustnych podczas konferencji krajowych i zagranicznych. Kilkukrotnie przebywał na krótkoterminowych stażach naukowych w laboratorium Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego oraz *Spanish National Research Council* w Hiszpanii.

Ocena merytoryczna

Tematyka rozprawy doktorskiej dotyczy określenia roli ligandów receptora aktywowanego przez proliferatory peroksysomów gamma (PPARγ) w modulowaniu odpowiedzi immunologicznej w błonie śluzowej macicy świni podczas indukowanego przez lipopolisacharyd (LPS) stanu zapalnego w warunkach in vitro. Przedmiotem zainteresowania Doktoranta są receptory PPAR, które były i są intensywnie badane m.in w kontekście znaczącej roli w regulacji procesów zachodzących w układzie rozrodczym zarówno kobiet jak i samic wielu gatunków zwierząt. Od kilku lat prowadzone są także badania nad ekspresją receptorów PPAR oraz ich wpływem na fizjologię komórek jajnika, a prace Zespołu Profesor Iwony Bogackiej przyczyniły się do znacznego poszerzenia i zrozumienia roli PPAR w rozrodzie świń. Wcześniejsze badania Zespołu wykazały także, że wszystkie izoformy PPAR ulegają ekspresji w błonie śluzowej macicy świni podczas cyklu rujowego oraz wczesnej ciąży. Co ciekawe, aktywacja PPARγ prowadzi do modulacji odpowiedzi immunologicznej w innych tkankach poprzez hamowanie ekspresji cytokin prozapalnych, regulację aktywności makrofagów, limfocytów B i T oraz kontrolę procesów metabolicznych związanych ze stanem zapalnym. Zapalenie błony śluzowej macicy, jest powszechną i częstą chorobą układu rozrodczego u świń, a towarzyszący temu stan zapalny może przyczyniać się do zaburzeń w przebiegu rui, tworzeniu się polipów w błonie śluzowej macicy, poronień czy bezpłodności. Stąd, pozytywnie oceniam wybór tematyki pracy doktorskiej, jest on logiczną konsekwencją wcześniejszych obserwacji, zmierzającą do pełnego zrozumienia mechanizmów udziału ligandów PPARγ w modulowaniu odpowiedzi immunologicznej w błonie śluzowej macicy świni podczas stanu zapalnego. Jest to niezmiernie ważne ponieważ obecnie obserwuje się olbrzymie straty ekonomiczne związane z usuwaniem samic z problemami rozrodczymi ze stada. W mojej ocenie, kolejnym ważnym elementem potwierdzającym bardzo istotny i nowatorski charakter badań prowadzonych przez Pana mgr inż. Karola Mierzejewskiego jest fakt, że jego doktorat finansowany był z projektu badawczego Pani Promotorki Profesor Iwony Bogackiej, który został poddany wnikliwej recenzji i uzyskał finansowanie przez NCN.

Hipoteza badawcza rozprawy doktorskiej zakładała udział ligandów PPARγ w regulacji procesu zapalnego w błonie śluzowej macicy świni, zależnie od fazy cyklu rujowego – fazy środkowo-lutealnej i pęcherzykowej oraz statusu stanu zapalnego – rozwijający się lub trwający. W celu weryfikacji hipotez Doktorant jasno i precyzyjnie opisał zadania badawcze: *i)* określenie wpływu naturalnego (PGJ_2) i syntetycznego (pioglitazon) agonisty lub antagonisty (T0070907) PPARγ na globalny transkryptom błony śluzowej macicy świni podczas procesu zapalnego indukowanego przez LPS podczas fazy środkowo-lutealnej cyklu rujowego, *ii)* określenie wpływu naturalnego i syntetycznego agonisty lub antagonisty PPARγ na globalny transkryptom błony śluzowej macicy świni podczas procesu zapalnego

indukowanego przez LPS podczas fazy pęcherzykowej cyklu rujowego oraz *iii)* określenie wpływu naturalnego i syntetycznego agonisty PPARγ na ekspresję genów i białek cytokin pro- i przeciwzapalnych w błonie śluzowej macicy świni w trakcie indukowanego przez LPS rozwijającego się lub trwającego procesu zapalnego podczas fazy środkowo-lutealnej lub pęcherzykowej cyklu rujowego. W mojej opinii wszystkie trzy zadania badawcze zostały znakomicie i rzetelnie zrealizowane a postawiona hipoteza poprawnie zweryfikowana. Zastosowane w badaniach analizy laboratoryjne (hodowle in vitro, wysokoprzepustowe sekwencjonowanie transkryptomu, real time PCR, ELISA oraz testy statystyczne) zostały prawidłowo dobrane do założonych celów badawczych i wymagały ogromnego nakładu pracy Doktoranta, co zasługuje na uznanie. Na podstawie przeprowadzonych badań uzyskano ogrom oryginalnych, wartościowych i ciekawych wyników badań. Ze względu na bardzo dużą liczbę otrzymanych danych, pozwalam sobie przytoczyć tylko najważniejsze wnioski płynące z prac:

- zastosowanie wysokoprzepustowej metody sekwencjonowania RNA-Seq pozwoliło na określenie kompleksowych zmian transkryptomicznych w endometrium pod wpływem LPS oraz badanych ligandów podczas fazy środkowo-lutealnej oraz pęcherzykowej cyklu rujowego.

- analizy bioinformatyczne umożliwiły wytypowanie procesów oraz ścieżek sygnałowych biorących udział w regulacji stanu zapalnego i jego konsekwencji. Ligandy PPARγ, oprócz przeciwzapalnych właściwości, regulują ekspresję genów zaangażowanych m. in. w mechanizmy naprawcze DNA, w tym aktywację punktu kontrolnego, który zatrzymuje progresję cyklu komórkowego w momencie pojawienia się nieprawidłowości w materiale genetycznym.

- badania z użyciem metod real-time PCR oraz ELISA wykazały, że agoniści PPARγ zmniejszają ekspresję mediatorów prozapalnych oraz zwiększają ekspresję mediatorów przeciwzapalnych w endometrium podczas stanu zapalnego.

- analiza RNA-Seq wskazała, że ligandy PPARγ regulują w różny sposób ekspresję genów podczas badanych okresów cyklu rujowego: podczas fazy środowo-lutealnej, pioglitazon zmienił ekspresję 4 genów, natomiast PGJ_2 – 3. Podczas fazy pęcherzykowej odnotowano zmienioną ekspresję aż 602 genów pod wpływem pioglitazonu i 200 genów pod wpływem PGJ_2.

- z użyciem metody real-time PCR wykazano również, że ekspresja mediatorów prozapalnych w większej mierze zależy od fazy cyklu rujowego niż od układu doświadczalnego.

Oceniana rozprawa doktorska ma charakter opracowania, której zasadniczą część stanowią trzy oryginalne prace naukowe, które zostały już poddane wnikliwej ocenie minimum przez sześciu recenzentów i trzech edytorów czasopism o zasięgu międzynarodowym, zatem moja rola sprowadza się do omówienia ogólnych założeń przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej oraz ewentualnych uwag czy dyskusji z Autorem o wadze prac. Należy dodać, iż Doktorant bardzo dobrze i trafnie wybrał tematycznie czasopisma o wysokich współczynnikach IF i bardzo szerokim zasięgu (cytacje prac w dniu 07.08.2023, 14 razy). Wybór takich czasopism i skuteczność publikowania swoich wyników badań potwierdzają moją wysoką opinię o Doktorancie i jego pracy doktorskiej. Wartość poznawczą wyników otrzymanych przez Pana mgr inż. Karola Mierzejewskiego oceniam również bardzo wysoko, o czym świadczy fakt opublikowania trzech artykułów w prestiżowych czasopismach. Wszystkie prace są spójne tematycznie i metodycznie, a jako całość dostarczają istotnej wiedzy z zakresu udziału PPARγ w regulacji ekspresji genów i białek w błonie śluzowej macicy świni z indukowanym LPS stanem zapalnym i stanowią odpowiedz na założone przez Doktoranta cele badawcze. Prace napisane są zrozumiale, z jasno sprecyzowanymi celami i prawidłowo przeprowadzoną dyskusją. Dokumentacja wyników w postaci tabel oraz figur jest jasna i czytelna. W mojej opinii cała rozprawa doktorska jest przemyślanym,

konsekwentnie realizowanym pomysłem badawczym o dużej wartości poznawczej. Na pochwałę i wyróżnienie zasługuje staranne, jasne i przejrzyste przygotowanie opracowania polskojęzycznego. Bardzo precyzyjnie i skrupulatnie został zaplanowany oraz opisany każdy rozdział dysertacji, dodatkowo wzbogacony rycinami, które bardzo ułatwiają zrozumienie wykonanych eksperymentów, co świadczy o dużej dojrzałości naukowej Doktoranta.

Uwagi i pytania

W ocenianej rozprawie doktorskiej trudno jest wskazać słabe strony czy krytyczne uwagi, ponieważ opracowanie polskojęzyczne zostało przygotowane perfekcyjnie z dbałością o każdy szczegół a prace naukowe Doktorant opublikował w prestiżowych czasopismach o międzynarodowym zasięgu i wysokich wskaźnikach bibliometrycznych. Jednak podczas analizy publikacji i opracowania rozprawy nasunęło mi się kilka pytań i z obowiązku recenzenta chciałabym się nimi podzielić:

- czy w hodowlanych in vitro skrawkach endometrium macicy świni Doktorant sprawdzał ich żywotność podczas inkubacji?

- jak wynika z załączonych publikacji, grupę kontrolną w układzie eksperymentalnym stanowił dimetylosulfotlenek (DMSO) – rozpuszczalnik dla badanych ligandów PPARγ. Czy w swoich doświadczeniach Doktorant sprawdzał wpływ samego podania DMSO na jakiekolwiek parametry funkcjonalności czy ekspresji wybranych genów w błonie śluzowej macicy świni?

- w opracowaniu (str.17) Autor podaje na rycinie 1 stężenie pioglitazonu 10 μM, tymczasem w publikacjach 1 i 2 (analogiczne zadania badawcze 1 i 2) pisze o zastosowaniu stężenia 1 μM dla tego agonisty. W publikacji 3 Doktorant stosuje dwa stężenia 1 μM i 10 μM dla pioglitazonu a jedno 10 μM dla PGJ_2, proszę o komentarz do zastosowanych stężeń agonistów PPARγ i dlaczego rozszerzył zakres stężenia tylko dla jednego agonisty?

- w publikacji 3 Doktorant usunął z układu eksperymentalnego dodawanie antagonisty PPARγ T0070907. Czy przesłanką do tej decyzji były wyniki opublikowane już w pracach 1 i 2, czy może inne czynniki brał pod uwagę w planowaniu tego eksperymentu?

- czy Doktorant rozważał analizę ekspresji białek TLR4 czy NF-κB metodą Western blot w skrawkach endometrium po inkubacji z LPS i ligandami PPARγ (publikacja 3)? W przypadku badań stężenia białka przy użyciu zestawów ELISA dla niektórych mediatorów np. IL-10 Autor nie prezentował wyników ze względu na otrzymane niskie wartości (poniżej limitu wykrywalności), czy w takim przypadku nie rozważał zastosowania innej metody badania zmian na poziomie białka?

- w rezultatach opublikowanych w pracy 3 (Fig.1) Doktorant wykazał odmienne wyniki pomiędzy ekspresją mRNA a stężeniem białka IL-1β w medium (np. LPS stymuluje ekspresję mRNA i jedocześnie hamuje stężenie białka a po łącznym podaniu z ligandami PPARγ podwyższa poziom mRNA bez wpływu na stężenie białka w medium). Proszę o krótki komentarz wyjaśniający otrzymane wyniki.

- jakie eksperymenty wpływu ligandów PPARγ na funkcjonalności endometrium macicy w stanie zapalnym mógłby zaproponować Doktorant w warunkach in vitro czy in vivo? Jakie przełożenie na fizjologię/patologię funkcjonowania macicy mają otrzymane wyniki badań molekularnych?

- w mojej opinii w opracowaniu zabrakło dyskusji wyników lub końcowego schematu podsumowującego trzy zadania badawcze (lub trzy publikacje), np. porównujące odpowiedz pomiędzy dniami cyklu rujowego (publikacja 1 i 2) lub połączenia wyników opublikowanych w publikacji 3 z analizami transkryptomicznymi. Zdaje sobie sprawę, że jest to dość trudne zadanie i wyzwanie dla młodego naukowca, biorąc pod uwagę ogrom otrzymanych danym ale z punktu widzenia dużej wartości naukowej badań niezwykle cenne dla szerszej grupy odbiorców.

- drobna uwaga dotyczy stosowania skrótów w opracowaniu. Skróty wprowadzone za pierwszym razem w pracy powinny być konsekwentnie stosowane, np. Doktorant wprowadził skrót P_4 – progesteron, którego potem już nie używa.

- zainteresowało mnie końcowe zdanie w podsumowaniu opracowania „Wyniki prezentowanych badań otwierają nowe możliwości badań nad mechanizmami, z udziałem PPARγ, kontrolującymi stan zapalny oraz prawidłowy cykl komórkowy podczas warunków stresowych wywołanych przez LPS w błonie śluzowej macicy świni" oraz w publikacjach 1 i 2. Proszę o rozwinięcie jakie molekularne mechanizmy miał na myśli Autor w przyszłych badaniach?

- czy znana jest rola ligandów dla pozostałych izoform PPAR tzn. beta i delta: PPARβ/δ w regulacji procesu zapalnego w błonie śluzowej macicy?

- czy Doktorant może wskazać ograniczenia lub największe wyzwania podczas prowadzenia swoich badań?

- w jaki sposób, uzyskane na świńskim modelu wyniki, mogą być wykorzystane w przyszłości w badaniach patofizjologii rozrodu kobiet? Proszę o krótki komentarz o aplikacji badań uzyskanych w ramach pracy doktorskiej.

Podsumowanie

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr inż. Karola Mierzejewskiego jest wartościowym, oryginalnym dziełem naukowym, zawierającym nowatorskie wyniki, które poszerzają wiedzę z zakresu regulacji mechanizmów funkcjonowania macicy świni w stanie zapalnym. Autor wykazał się doskonałymi umiejętnościami w planowaniu i prowadzeniu badań, wnioskowaniu w oparciu o uzyskane wyniki oraz dużą wiedzą pozwalającą na rzeczową dyskusję z recenzentami publikacji. Przeprowadzone badania wymagały znakomitego przygotowania merytorycznego i warsztatowego. Opublikowane prace, a także opracowanie, będące podstawą rozprawy doktorskiej, zostały bardzo dobrze przemyślane, rzetelnie zrealizowane i starannie przygotowane. Na uwagę zasługuje także całościowy, bogaty dorobek publikacyjny Doktoranta oraz uzyskanie finansowania na realizowanie badań w ramach projektów NCN Preludium i Opus. Zawarte w niniejszej recenzji pytania czy komentarze nie umniejszają wartości merytorycznej ocenianej bardzo wysoko pracy doktorskiej lecz są zachętą do naukowej dyskusji.

Wniosek końcowy

Reasumując stwierdzam, że oceniona praca w pełni odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim i spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023.742 ze zm.) stawianym kandydatom ubiegającym się o uzyskanie stopnia naukowego doktora. W związku z powyższym przekładam Wysokiej Radzie Naukowej Dyscypliny nauki biologiczne Uniwersytetu Warmińsko – Mazurskiego w Olsztynie wniosek o dopuszczenie Pana mgr inż. Karola Mierzejewskiego do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w *dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne*.

Biorąc pod uwagę wysoką wartość naukową pracy doktorskiej, poziom przeprowadzonych analiz, nowatorskie wyniki i ich publikację w postaci trzech oryginalnych prac w prestiżowych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, a także zaangażowanie i pracowitość Doktoranta oraz perfekcyjnie przygotowanie opracowania wnoszę o wyróżnienie dysertacji.

Z poważaniem



Kraków, 7 sierpnia 2023 roku

dr hab. Agnieszka Rak, prof. UJ