Warszawa, 22 sierpnia 2023 r.

Prof. dr hab. Alina Gajewska
Zakład Fizjologii Zwierząt
Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt im Jana Kielanowskiego, PAN
Jabłonna k Warszawy

Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr inż. Karola Mierzejewskiego zatytułowanej **„Udział receptorów aktywowanych przez proliferatory peroksysomów gamma (PPARγ) w regulacji procesu zapalnego w błonie śluzowej macicy świni (*Sus scrofa domestica*)”**, wykonanej pod kierunkiem promotora Pani prof. dr hab. Iwony Bogackiej oraz promotora pomocniczego Pani dr Aleksandry Kurzyńskiej w Katedrze Anatomii i Fizjologii Zwierząt Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie.

I. Ocena formalna pracy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska składa się z: (i) trzech publikacji oryginalnych o łącznym współczynniku oddziaływania (IF) wynoszącym 12,081, które ukazały się w latach 2021-2022 i w których Pan mgr inż. Karol Mierzejewski jest pierwszym autorem oraz (ii) powstałego na podstawie wyników własnych badań opracowania w języku polskim, zawierającego: streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, przyjęte hipotezy i służące ich weryfikacji zadania badawcze, opis zastosowanego schematu eksperymentalnego wraz z charakterystyką użytego materiału i wykorzystanych metod analitycznych, opis wyników uzyskanych w trzech zaplanowanych zadaniach badawczych, podsumowanie i wnioski oraz bibliografię. Opracowanie zawiera także rozdział przedstawiający zwięzłą charakterystykę aktualnego dorobku naukowego Doktoranta uwzględniającą jego dotychczasową aktywność publikacyjną, informację o uzyskanych i zrealizowanych grantach NCN, a także informacje o odbytych stażach krajowych i zagranicznych.

Publikacjami wchodzącymi w skład rozprawy są:

1. Praca oryginalna: **Karol Mierzejewski**, Łukasz Paukszta, Aleksandra Kurzyńska, Zuzanna Kunicka, Jan Paweł Jastrzębski, Iwona Bogacka. „*Transcriptome analysis of porcie endometrium after LPS-induced inflammation:effects of the PPAR-gamma ligands in vitro*”. Biology of Reproduction 2021;104:130-143. IF 4.161. Liczba punktów MEiN: 200.

2. Praca oryginalna: **Karol Mierzejewski,** Łukasz Paukszto, Aleksandra Kurzyńska, Zuzanna Kunicka, Jan Paweł Jastrzębski, Karol Makowczenko, Monika Golubska, Iwona Bogacka. "*PPARγ regulates the expression of genes involved in the DNA damage response in an inflamed endometrium*". Scientific Reports 2022;12(1):4026. IF=4.997. Liczba punktów MEiN: 140.

3. Praca oryginalna: **Karol Mierzejewski**, Aleksandra Kurzyńska, Zuzanna Kunicka, Anna Klepacka, Monika Golubska, Iwona Bogacka**.** "*Peroxisome proliferators-activated receptor gamma ligands regulate the expression of inflammatory mediators in porcine endometrium during LPS-induced inflammation*" Theriogenology 2022;187:195-204. IF=2,923. Liczba punktów MEiN: 140

Wszyscy współautorzy każdej z publikacji dołączyli pisemne oświadczenia, w których szczegółowo określili zakres swego indywidualnego wkładu w wykonanie badań i przygotowanie tekstów do druku. Pan mgr inż. Karol Mierzejewski uczestniczył we wszystkich etapach przygotowania każdej, wchodzącej w skład ocenianej rozprawy, publikacji pracując nad skrystalizowaniem koncepcji oraz dostosowaniem adekwatnej do przyjętych założeń badawczych metodyki, wykonując badania *in vitro* oraz analizy laboratoryjne, opracowując wyniki, a także przygotowując tekst manuskryptu oraz odpowiedzi na recenzje.

Układ ocenianej rozprawy spełnia wymogi formalne stawiane rozprawom doktorskim powstałym na podstawie własnych badań eksperymentalnych. Wszechstronne merytoryczne zaangażowanie Pana mgr inż. Karola Mierzejewskiego w przygotowanie powyższych publikacji w mojej ocenie w pełni uzasadnia ich łączne przedstawienie jako części Jego rozprawy doktorskiej.

II. Ocena merytoryczna rozprawy

Naruszenie integralności barier chroniących organizm umożliwia patogenom wniknięcie do ustroju, w wyniku czego dochodzi do wzbudzenia układu odpornościowego i w konsekwencji indukcji naturalnego procesu jakim jest lokalny stan zapalny. Krótkotrwały stan zapalny jest procesem korzystnym dla organizmu, a jego zadaniem jest ograniczenie rozprzestrzeniania się czynnika prozapalnego, jego neutralizacja i usunięcie. Jednak przedłużające się zapalenie powodując nadmierną stymulację układu immunologicznego, a tym samym długotrwałe zaburzenie homeostazy, może prowadzić do poważnych dysfunkcji w organizmie. Takim stanem jest np. przewlekłe zapalenie błony śluzowej macicy (endometritis), choroba powszechnie i często występująca nie tylko u świni domowej, lecz dotykająca również wielu kobiet. Fizjologiczne i genetyczne podobieństwo organizmu świni do organizmu człowieka czyni ją modelem szczególnie przydatnym w badaniach biomedycznych.

Przystępując do badań transkryptomu endometrium świni domowej w warunkach indukowanego stanu zapalnego Doktorant skupił się na określeniu roli, jaką w procesie regulacji stanu zapalnego w tej tkance pełnią receptory aktywowane przez proliferatory peroksysomów gamma (PPARγ). Należy podkreślić, że promotor rozprawy Pani prof. dr hab. Iwona Bogacka jest uznanym, o międzynarodowej renomie, ekspertem w dziedzinie badań nad receptorami PPAR, a Doktorant, Pan mgr inż Karol Mierzejewski swoje pierwsze szlify w badaniach nad tymi związkami zdobywał przygotowując pod Jej kierunkiem swą pracę magisterską.

Weryfikacja przyjętych hipotez badawczych wymagała od Doktoranta przeprowadzenia serii eksperymentów w układzie in vitro, z użyciem fragmentów endometrium pobranego od czterech dojrzałych samic świni domowej w fazie środkowo-lutealnej (10-12 dzień cyklu) oraz w fazie pęcherzykowej (18-20 dzień cyklu). Po oczyszczeniu i wstępnej preinkubacji, wyizolowane (100±10mg) skrawki błony śluzowej macicy inkubowano przez 24 godziny w obecności lipopolisacharydu (LPS; 100ng/ml), po czym, po jego usunięciu z medium, poddawano je sześciogodzinnej stymulacji w obecności agonistów receptora PPARγ: (i) 15-deoxy-Δ12,14-prostaglandin J_2 (prostaglandyna PGJ_2, 10μM; agonista endogenny), (ii) pioglitazonu (10μM; agonista egzogenny), jak też T0070907 (1μM; antagonista receptora PPARγ). W trzecim eksperymencie *in vitro,* obok powyższego schematu inkubacji został równolegle zastosowany układ dodatkowy, w którym skrawki endometrium poddane uprzedniemu sześciogodzinnemu łącznemu oddziaływaniu LPS (100 ng/ml) i agonistów receptora PPARγ (10μM PGJ_2; oraz 10μM i 1μM pioglitazon) były następnie poddane dalszej 24-godzinnej stymulacji przez sam LPS.

Część analityczna badań obejmowała: izolację RNA ze skrawków eksperymentalnych wraz z oceną jego czystości oraz integralności strukturalnej, którą wykonał Doktorant, wysokoprzepustowe sekwencjonowanie transkryptomu (tę procedurę wykonała firma komercyjna Macrogen, Korea Południowa), a następnie, przeprowadzoną przy współudziale Doktoranta, analizę surowych odczytów uzyskanych w wyniku sekwencjonowania. W dalszej kolejności część analityczna dotyczyła bioinformatycznej analizy danych, identyfikacji miejsc alternatywnego składania RNA o zróżnicowanej ekspresji (DEG) i analizy ekspresji długich niekodujacych RNA (lncRNA) o zróżnicowanej ekspresji, oznaczenia ekspresji genów metodą *RT*-PCR oraz stężenia białek metodą immunoenzymatyczną ELISA.

Rozbudowany i bardzo nowoczesny wachlarz metodyczny zastosowany w badaniach dowodzi wysokich umiejętności Doktoranta w wykonywaniu złożonych, wielokierunkowych analiz.

II.1. Część publikacyjna rozprawy

Publikacja 1 prezentuje wyniki dotyczące wpływu zapalenia i specyficznych ligandów receptora PPARγ na profil transkryptomu endometrium świni domowej w środkowo-lutealnej fazie cyklu. Po zastosowaniu metody RNA-Seq i zsekwencjonowaniu 20 bibliotek cDNA przygotowanych dla wyizolowanego z 20 skrawków endometrium RNA, otrzymano 1 118 471 092 surowych odczytów ze sparowanymi końcami. Po ich wstępnej obróbce i zmapowaniu do genomu referencyjnego świni uzyskano 94,3% sekwencji unikatowych. Odczyty przypisano do sekwencji kodujących (50.6%), intronów (7,2%), regionów nie podlegających translacji (28,7%) i regionów międzygenowych (14,7%). Analiza bioinformatyczna ujawniła, że w porównaniu do obrazu w grupie kontrolnej skutkiem indukcji stanu zapalnego była zróżnicowana ekspresja (DEG) 222 genów kodujących białka (109 wykazało jej wzrost, a 113 spadek). Analizie ontologii genów (GO) poddano 194 geny o zróżnicowanej ekspresji i przypisano je do kategorii: procesy biologiczne (104 geny), funkcje molekularne (9 genów), składniki komórkowe (4 geny) oraz do procesów takich jak: negatywna regulacja procesów biologicznych (76 genów), rozwój struktur anatomicznych (73 geny), odpowiedź komórkowa na substancje chemiczne (72 geny), odpowiedź immunologiczna (34 geny), aktywacja leukocytów (30 genów), regulacja syntezy cytokin (17 genów), komórkowa odpowiedź na lipopolisacharyd (11 genów), regulacja obrony komórki (36 genów) odpowiedź na zapalenie (23 geny), odpowiedź na cytokiny (31genów), aktywacja makrofagów (7 genów), rozwój naczyń (18 genów). Analiza szlaków sygnałowych KEGG wykazała, że 21 genów o zróżnicowanej ekspresji uczestniczy w czterech ścieżkach sygnalizacyjnych, w tym 9 (*NFKBIA*, *TNFAIP3*, *MMP9*, *AMCF-II, CXCL2, MMP3, PTGS2, IL-6, CSF2*) w szlaku sygnalizacyjnym czynnika martwicy nowotworów natomiast 5 (*TGFB1, PIGR, IL-6, CXCL12, ENSSCG0000039500*) należy do szlaku zaangażowanego w jelitową syntezę immunoglobuliny A.

W porównaniu do obrazu otrzymanego po stymulacji tkanki przez sam LPS, obecność PGJ_2 w medium inkubacyjnym spowodowała wzrost ekspresji trzech genów (*SELE, IL-1β, CCL8*), a obecność pioglitazonu zwiększoną ekspresję czterech genów (*SELE, IL-1β, MUC13, MEOX-1*). Analiza ich ontologii ujawniła, że należą one do genów zaangażowanych w chemotaksję granulocytów i migrację neutrofili. Ponadto, geny *SELE* oraz *IL-1β* uczestniczą w regulacji aktywności szlaku czynnika martwicy nowotworów.

Profil zróżnicowanej ekspresji genów uległ zmianie również wtedy, gdy endometrium w stanie zapalnym inkubowane było w obecności antagonisty receptora PPARγ. W takich warunkach zapalnych, zróżnicowanej ekspresji uległy 62 geny, spośród których 30 wykazywało wzrost, a 32

spadek. Analiza ontologii genów wykazała, ze spośród nich 52 geny uczestniczą w 18 procesach biologicznych w tym: odpowiedzi zapalnej, odpowiedzi komórkowej na interleukinę-1 i chemotaksji granulocytów. Największą ekspresje wykazywały geny komórkowej odpowiedź na interleukinę-1: *CCL3L1, CCL4, HPSS* oraz geny odpowiedzi zapalnej *THBS1, IODO1, LBP*, *ACKR1, IL-1β*. Spośród genów o podwyższonej ekspresji cztery (CCL3L1, LBP, CCL4, IL-1β) należą do szlaku sygnalizacji receptora TOLL-podobnego. Wśród genów związanych z regulacją odporności, jedynie geny *THBS1* i *PTGIS* wykazywały zmniejszoną ekspresję.

W stanie zapalnym wykazano 78 zdarzeń alternatywnego składania, które obejmowały 61 genów. Efekt LPS dotyczył składania genów *PTGES, PTGS2 i PLAAT3* zaangażowanych w regulację aktywności szlaku kwasu arachidonowego. Obecność PGJ_2 spowodowała 60 zdarzeń alternatywnego składania, podczas gdy obecność pioglitazonu wywołała 52 takie zdarzenia. Żaden z genów ulegających alternatywnemu składaniu pod wpływem agonistów PPARγ nie należał do grupy istotnych procesów biologicznych. Dynamikę zmian zaobserwowano w genie *PTGS2*, istotnym dla funkcjonowania żeńskiego układu rozrodczego, którego pierwszy ekson uległ w warunkach zapalnych zmniejszeniu, natomiast po inkubacji z pioglitazonem zwiększeniu. W obecności antagonisty receptora PPARγ pojawiły się 134 zdarzenia alternatywnego składania dotyczące 106 genów kodujących białka. Antagonista wpływał na proces alternatywnego składania genów *PTGIS, PTGS2, ACADM, SCD, INSR, HIF1A, ARNT*, *ADAM19*, wśród których są geny uczestniczące w syntezie prostaglandyn (*PTGIS, PTGS2*), steroidogenezie (*INSR*) i szlaku sygnalizacji PPAR (*ACADM*).

Kompleksowa, uwzględniająca łącznie wszystkie porównania między grupami, analiza powiązań białek kodowanych przez geny o zróżnicowanej ekspresji ujawniła sieć ich interakcji z centralną pozycją interleukiny 1β (IL-1β) i białka czynnika wzrostu granulocytów - 2 (*CSF2*). Interakcje obejmowały m.in. aktywację, modyfikacje postranslacyjne, regulację transkrypcji, katalizę, inhibicję aktywności i wiązanie białek.

Publikacja 2 zawiera wyniki dotyczące wpływu zapalenia i specyficznych ligandów receptora PPARγ na profil transkryptomu endometrium świni domowej podczas fazy pęcherzykowej (18-20 dzień cyklu). Po zastosowaniu metody RNA-Seq i zsekwencjonowaniu 20 bibliotek cDNA, przygotowanych dla RNA wyizolowanego z 20 skrawków endometrium w fazie pęcherzykowej, otrzymano 1 114235 534 surowych odczytów ze sparowanymi końcami. Po ich wstępnej obróbce i zmapowaniu do genomu referencyjnego świni uzyskano 93,06% sekwencji unikatowych. Zmapowane odczyty przypisano do: sekwencji kodujących (53.64%), intronów (6.58%), regionów nie podlegających translacji (24,67%), regionów międzygenowych. (15,11%). W stanie zapalnym wywołanym inkubacją tkanki z LPS, zróżnicowaną ekspresję odnotowano

wobec 169 genów, wśród których 115 wykazywało zwiększony, a 54 obniżony poziom ekspresji. Analiza ontologii genów ujawniła ich przypisanie do kategorii: procesy biologiczne (36 procesów), funkcje molekularne (14 funkcji), składniki komórkowe (4 składniki). Geny *CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCL19* oraz *CXCL12* regulują aktywność chemokin, a wraz z 40 genami, w tym *CCL5, CCL19, IL34, IODO1 i CASP1* kodują białka układu immunologicznego. Pod wpływem LPS zwiększonej ekspresji uległo 28 genów regulujących procesy obrony komórkowej, 14 genów uczestniczących w regulacji odpowiedzi zapalnej oraz 12 genów kodujących odpowiedź na cytokiny (*IRF7, ICAM1, ACKRI, .IL34, ISG15, UBD, CXCL10, CXCL11, CASP1, CCR7*, *CCL5, CXCL12*). Zmniejszonej ekspresji uległo 5 genów: *TREM2, PDEZA, SPOCK2, APOA1, ENSSSCG00000006418*. Siedem genów o zróżnicowanej ekspresji uczestniczy w regulacji chemotaksji leukocytów (*ENSSSCG00000006380, IL34, CXCL10, VEGVD, CCR7*, *CCL5*), podczas gdy 41 genów jest zaangażowanych w procesach odpowiedzi na stres. Osiemnaście genów o zróżnicowanej ekspresji zostało przypisanych do znaczących szlaków sygnalizacyjnych, w tym 9 genów do ścieżki sygnalizacji chemokin oraz 14 do ścieżki sygnałowej interakcji cytokin z receptorem. Ponadto, po stymulacji endometrium przez LPS, ujawniła się zróżnicowana ekspresja 24 długich niekodujących RNA (lncRNA). Tylko kodujący białko gen *ENSSSCG00000041052* był jedynym genem ulegającym ekspresji na poziomie podobnym do ekspresji trzech długich niekodujacych RNA.

W obecności PGJ_2 podwyższonej ekspresji uległo 181, a obniżonej 19 genów, natomiast pioglitazon stymulował ekspresję 476 i hamował ten proces w 123 genach. Analiza ontologii genów wykazała, że geny reagujące na PGJ_2 były przypisane do 57 procesów biologicznych, 4 funkcji molekularnych oraz do jednego składnika komórkowego, natomiast geny wrażliwe na pioglitazon do 67 procesów biologicznych, 3 funkcji molekularnych, i 2 składników komórkowych. Zależna od PGJ_2 zróżnicowana ekspresja dotyczyła 27 genów, w tym *IDO1, SERPINE1, ILIA, RSADZ, ADAR, NFKB1A, TNFAIP3, MAP3K14* oraz *TRIM8* uczestniczących w regulacji odpowiedzi obronnej, 7 genów zaangażowanych w syntezę IL-1β (*EGR1, IGF1, ZC3H12A, IL6, TNFAIP3, CCL3L1, G*HSR) oraz 8 genów regulujących szlak sygnalizacji IL-17 (CSF2*, IL1β, NFKB1A, CXCL8, CXCL2, IL6, TNFAP3, CSF3*). Większość tych genów wykazywała nasiloną ekspresję.

Natomiast inkubacja endometrium w obecności pioglitazonu spowodowała zmianę ekspresji 11 genów (*BMP2, CSF2, CSF1*, *ENSSSCG00000024759, EDN1, TNF, IL25, CCL3LI, WNT5A, THPO*) regulujących aktywność cytokin, 70 genów uczestniczących w regulacji apoptozy, jak też 34 genów zaangażowanych w regulację rozwoju naczyń. Ponadto, pioglitazon wpłynął na profil ekspresyjny 10 genów, w tym siedmiu (*PMAIP1,GADD45B, SERPINE1, APAF1, SESN3,*

GADD45G, *ENSSSCG0000010448*) o podwyższonej i trzech (*CCNG1, TP5313, CDK1*) o obniżonej ekspresji, zaangażowanych w regulację szlaku sygnałowego p53. Zmieniony profil ekspresji dotyczył również długich nie kodujących RNA: po stymulacji PGJ_2 takich elementów w transkryptomie było 35, a po pioglitazonie 109. Porównanie profilu ekspresji ujawniło dodatnią korelację 22 lncRNA z genami w grupie traktowanej PGJ_2 oraz 69 lncRNA z genami w grupie stymulowanej przez pioglitazon.

W obecności antagonisty receptora PPARγ zróżnicowanej ekspresji uległo 557 genów. Spośród nich 452 geny wykazywały wzrost, a 195 obniżoną aktywność transkrypcyjną. Analiza funkcjonalna ontologii genów wykazała, że były one przypisane do 54 procesów biologicznych, 6 składników komórkowych oraz 6 ścieżek sygnałowych. 58 genów o zróżnicowanej ekspresji uczestniczyło w regulacji apoptozy (w tym: *RTKN2, CHST11, ZNF473, PTGIS, CD44*), śmierci komórki (*PIK3R1, CSF2, DOCK8, IGF1, GADD45G, DAPK1*) a 11 genów o zwiększonej ekspresji uczestniczyło w regulacji szlaku martwicy nowotworów. W tkance endometrialnej inkubowanej w obecności LPS i antagonisty receptora PPARγ wzrosła ekspresja 89 długich nie kodujących RNA, podczas gdy ekspresja 16 lncRNA zmalała. W grupie DEGlncRNA zidentyfikowano pozytywną korelację 81 transkryptów z 220 genami o zróżnicowanej ekspresji. 32 transkrypty .DEGlncRNA było specyficzne dla tkanki endometrialnej eksponowanej na działanie antagonisty receptora PPARγ.

Po inkubacji tkanki z LPS zidentyfikowano 130 zdarzeń alternatywnego składania RNA obejmujących 86 genów, wśród których były geny należące do grupy markerów uszkodzeń DNA (*PTP4A3, DUSPS*) oraz geny stresu oksydacyjnego (*PEPD, PDP2*, *BCAR3*). Alternatywnemu składaniu podlegały też geny *CFL2, CFL1, GAB2, LIMK1, AKT1* wchodzące w skład szlaku regulującego fagocytozę, jak też geny czynnika indukowanego hipoksją (*HIF1α*) oraz indukowanej cyklooksygenazy 2 (*PTGS2*) zaangażowane w odpowiedź komórki na stymulację przez LPS. Alternatywne składanie RNA dotyczyło takich modyfikacji jak: alternatywne miejsce akceptorowe, alternatywne miejsce donorowe, złożenie (ang. *splicing*) pierwszego eksonu, złożenie ostatniego eksonu, wzajemnie wykluczające się eksony, pominięcie eksonu.

Po inkubacji z PGJ_2, odnotowano 172 zdarzenia alternatywnego składania obejmujące 114 genów kodujących białka, natomiast po inkubacji z pioglitazonem było 211 takich zdarzeń, które dotyczyły 141 genów. Zdarzenia alternatywnego składania RNA dotyczyły m.in. genów związanych z regulacją stresu oksydacyjnego. Po stymulacji przez PGJ_2 były to geny *CLDND1* i *PIGT,* natomiast po inkubacji z pioglitazonem geny *PRDX2* oraz *SOD2*. Obaj agoniści receptora PPARγ indukowali procesy alternatywnego składania RNA dla genów *GJA1, ASS1,*

HIF1A, TTL10 oraz *TATDN1*, które zaangażowane są w kodowanie białek markerowych stresu oksydacyjnego.

Podanie antagonisty receptora PPARγ spowodowało 200 zdarzeń alternatywnego składania RNA, a geny, w których zidentyfikowano takie zdarzenia należą m.in. do grupy genów związanych z regulacja apoptozy: *BCL9, PIK3R1, HSBP1LI,MED25, SEC24B*.

Publikacja 3 prezentuje wyniki badań dotyczących wpływu agonistów receptora PPARγ na ekspresję genów i białek cytokin pro- i przeciwzapalnych podczas fazy środkowo-lutealnej i pęcherzykowej cyklu rujowego w warunkach (i) trwającego stanu zapalnego oraz (ii) rozwijającego się procesu zapalnego.

(i) W trwającym procesie zapalnym zarówno w fazie środkowo-lutealnej jak i pęcherzykowej cyklu, skutkiem inkubacji endometrium z PGJ_2 jak i z pioglitazonem (niezależnie od stężenia) był wzrost ekspresji *IL-1β* mRNA, czemu nie towarzyszyły zmiany stężenia białka w medium poinkubacyjnym. Natomiast od pioglitazonu i fazy cyklu zależała ekspresja *IL-6* mRNA, której poziom obniżył się jedynie w fazie środkowo-lutealnej, podczas gdy stężenie jego białka pozostało niezmienione w obu fazach cyklu. Hamujący wpływ agonistów receptora PGJ_2 na ekspresję TLR4 mRNA oraz .IL-10 mRNA, ujawnił się jedynie .w fazie pęcherzykowej, a taki sam efekt w odniesieniu do .poziom TLR4 mRNA nastąpił tylko w fazie środkowo-lutealnej. W żadnym badanym okresie cyklu rujowego inkubacja endometrium w stanie trwającego stanu zapalnego agonistami receptora PPARγ nie spowodowała zmian w stężeniu białek IL-10, LIF oraz IL-4.

(ii). W stanie rozwijającego się stanu zapalnego skutkiem aplikacji PGJ_2 lub pioglitazonu (w obu stężeniach) i jednoczesnej stymulacji tkanki przez LPS była nasilona ekspresji IL-1β mRNA w endometrium, ujawniona jedynie w fazie środkowo-lutealnej cyklu. W tych samych warunkach zapalnych, lecz tylko w fazie pęcherzykowej, interakcja PGJ_2 lub pioglitazonu (w obu stężeniach) z receptorem PPARγ doprowadziła do spadku poziomu IL-6 mRNA w błonie śluzowej. Podobnie, hamujący wpływ agonistów oddziałujących na receptor PPARγ w obecności LPS, dotyczył .ekspresjiTLR4 mRNA i NF-κB. Choć efekt taki obserwowano w obu fazach cyklu, to w fazie pęcherzykowej spadek poziomu NF-κB mRNA wystąpił tylko po pioglitazonie podanym w stężeniu 1 μM. W stanie rozwijającego się stanu zapalnego nie obserwowano natomiast wpływu agonistów receptora PPARγ na zmiany stężenia białek IL-6, TLR4, NF-κB, LIF, IL-10, IL-4 w medium inkubacyjnym.

Lektura publikacji wchodzących w skład ocenianej rozprawy nasunęła mi następujące pytania:

1. W badaniach wykonanych w układzie *in vitro* stan zapalny był indukowany w wyizolowanym fragmencie endometrium. W warunkach *in vivo*, informacja o obwodowym stanie zapalnym jest przekazywana z aktywowanego układu odpornościowego do ośrodkowego układu nerwowego, który uruchamia wówczas mechanizmy przeciwzapalne takie jak odruch zapalny, którego elementem jest cholinergiczna ścieżka przeciwzapalna, a także aktywacja osi podwzgórze-przysadka-nadnercza (HPA). Czy są dane wskazujące na interakcję receptorów PPAR z układem cholinergicznym i /lub układem HPA w warunkach stanu zapalnego?

2. Jednym ze skutków funkcjonalnego współdziałania układów odpornościowego i nerwowego są wyraźne zmiany w aktywności neurotransmisyjnej (monoaminergicznej i peptydergicznej) w różnych strukturach mózgu. Czy były prowadzone badania nad profilami transkryptomicznymi w strukturach mózgu (np. w podwzgórzu) po indukcji zapalenia w układzie rozrodczym w warunkach *in vivo*?

3. Jakie znaczenie dla aktywności genów mają zaprezentowane w badaniach Doktoranta, sklasyfikowane zdarzenia alternatywnego składania (*splicingu*) RNA? Proszę o krótki komentarz przybliżający ten aspekt badań.

4. W fazie pęcherzykowej cyklu ilościowe i funkcjonalne profile genów o zróżnicowanej ekspresji (DEG) aktywowanych przez endogennego lub egzogennego agonistę .receptora PPARγ wyraźnie się różniły. Czym można wytłumaczyć zaistniałe różnice między efektywnością stymulacji PGJ_2 a stymulacji pioglitazonem? Czy tylko siła oddziaływania z receptorem wynikająca z wyższego niż PGJ_2 powinowactwa pioglitazonu jest odpowiedzialna za taki efekt, czy też mogły nań wpłynąć inne czynniki?

5. W fazie pęcherzykowej cyklu wykazano zależną od agonistów receptora PPARγ regulację aktywności genów odpowiedzialnych za naprawę uszkodzeń DNA. Jak agoniści receptora PPARγ wpływają na aktywność tych genów w fazie środkowo-lutealnej, w której podatność endometrium na zakażenie jest największa?

II.2. Opracowanie w języku polskim

Tekst opracowania rozpoczyna się **Streszczeniem** w języku polskim i **Abstraktem** w języku angielskim. Oba rozdziały zostały przygotowane zgodnie z kanonem opracowania tego typu tekstu naukowego i zawierają syntetycznie ujęte informacje o założeniach badawczych, celu badań, materiałach i metodach, wynikach oraz wnioskach**.**

Wstęp. W sześciostronicowym, podzielonym na sześć podrozdziałów, rozdziale Doktorant syntetycznie zarysował najważniejsze aspekty zagadnień naukowych leżących u podstaw podjętych badań. Rozpoczynając od krótkiej, funkcjonalnej charakterystyki endometrium jako tkanki niezbędnej w procesie implantacji i rozwoju zarodka, przechodzi do zwięzłego omówienia procesów towarzyszących zapaleniu błony śluzowej macicy, wskazując też na zdrowotne konsekwencje, jakie u ludzi i zwierząt wywołuje przewlekły stan zapalny endometrium. Uzasadnia swój wybór świni domowej (*Sus strofa domestica*) jako zwierzęcia modelowego, o wysokim stopniu fizjologicznego podobieństwa do organizmu ludzkiego, i podkreśla jej przydatność w wielu badaniach biomedycznych. Następnie, odnosząc się do wieloletniego doświadczenia Zespołu, w którym prowadził swe badania, wskazuje na wachlarz procesów, w jakich uczestniczą lizoformy receptorów aktywowanych przez proliferatory peroksysomów, ze szczególnym uwzględnieniem funkcji biologicznych w jakie zaangażowane są receptory PPARγ. Osobną uwagę Doktorant poświęca wskazaniu wybranych badań dokumentujących udział receptorów PPARγ w regulacji procesu zapalnego, a następnie prezentuje syntetyczne ligandy tego receptora zwracając uwagę na ich wszechstronną przydatność terapeutyczną. Rozdział kończy trzypunktowe wyodrębnienie najważniejszych z punktu widzenia przyjętych założeń koncepcyjnych obserwacji wypływających z danych literaturowych dotyczących stanu zapalnego w układzie rozrodczym i roli jaką procesie tym pełnią receptory PPARγ".

Rozdział „Wstęp" powstał z wykorzystaniem 42 publikacji, z których 20 stanowią prace opublikowane w ostatnich pięciu latach (2018-2022). Choć jest zwięzłą prezentacją merytorycznego tła rozprawy, to przekonująco dowodzi dobrej znajomości aktualnego piśmiennictwa specjalistycznego i w pełni uzasadnia wybór podjętej przez Doktoranta tematyki badawczej.

Hipotezy i zadania badawcze. Rozdział zawiera trzy, syntetycznie sformułowane, hipotezy badawcze wraz z wyszczególnionymi trzema zadaniami badawczymi, których realizacja służyła weryfikacji przyjętych hipotez.

Uwagi i pytania.

1. Dwie pierwsze hipotezy badawcze klarownie wynikają z przestawionych przez Doktoranta we Wstępie danych z piśmiennictwa specjalistycznego, jednak hipoteza trzecia: „*Udział ligandów PPARγ w regulacji procesu zapalnego w błonie śluzowej macicy jest zależny od statusu stanu zapalnego – rozwijający się czy trwający*" nie znajduje oparcia w prowadzonych przez Doktoranta rozważaniach we Wstępie, w którym nie przytoczono żadnych obserwacji

wskazujących na możliwość takiej zależności. Proszę zatem o komentarz dotyczący możliwych przesłanek wspierających taką hipotezę.

Materiał i Metody. Rozdział liczy sześć stron i zawiera logicznie uporządkowany, precyzyjny opis podporządkowany trzem wyznaczonym zadaniom badawczym. Tekst dostarcza informacji o wykorzystanych zwierzętach, metodzie pozyskiwania i warunkach inkubacji skrawków endometrium, zastosowanych dwóch schematach doświadczalnych wraz z ich graficzną prezentacją uwzględniającą podział na zadanie 1-2 oraz zadanie 3. Następnie tekst podaje usystematyzowane dane o zastosowanych metodach analitycznych: izolacji RNA, wysokoprzepustowym sekwencjonowani transkryptomu, analizie surowych odczytów uzyskanych w wyniku sekwencjonowania, bioinformatycznej analizie danych z wykorzystaniem baz Gene Ontology (GO) oraz Kyoto Encyklopedia of Genes and Genomes (KEGG) wraz z wizualizacją wyników wykonaną przy wykorzystaniu specjalistycznego oprogramowania, w tym własnego skryptu w oprogramowaniu R, analizie miejsc alternatywnego składania RNA o zróżnicowanej ekspresji dokonaną za pomocą oprogramowania SUPPa v.2, i Salmon v.1.1.0, jak też analizie ekspresji długich niekodujacych RNA (lncRNA) o zróżnicowanej ekspresji dokonaną po zastosowaniu opublikowanej w 2019 roku metodyki własnej Zespołu, a także programu Coding Potential Calculation (CPC). Rozdział zawiera również szczegółowe informacje o wykorzystanej metodzie amplifikacji genów w czasie rzeczywistym, (z uwzględnieniem specyficznego profilu reakcji zastosowanego do przeprowadzenia analizy ekspresji genów mediatorów stanu zapalnego oraz specyficznego profilu reakcji dostosowanego do przeprowadzenia walidacji wyników RNA-Seq), jak też o metodzie ELISA wykorzystanej do określenia stężenia białek cytokin w medium poinkubacyjnym. Rozdział kończy informacja o zastosowanych testach statystycznych. Warto podkreślić, że Doktorant zadbał o podanie źródeł specjalistycznych oprogramowań jakie wykorzystał w analizach.

Wyniki. Tę część opracowania Doktorant zawarł na dziewięciu stronach tekstu. Przystępując do referowania wykorzystał podział na poszczególne zadania badawcze i zastrzegł, że szczegółowe wyniki oraz ich omówienie zostały przedstawione w trzech, odpowiadających zadaniom, publikacjach oryginalnych. Dzięki strukturyzacji tekstu w postaci dziewięciu podrozdziałów przedstawił logicznie uporządkowany obszerny zbiór najważniejszych wyników obejmujących wszystkie aspekty przeprowadzonych badań. Mimo złożoności otrzymanych danych tekst jest klarowny i zawiera precyzyjnie podane odnośniki do zamieszczonych w publikacjach tabel uzupełniających.

Podsumowanie i wnioski. Ostatni fragment opracowania jest jednostronicową, nie zawierającą odnośników do danych z piśmiennictwa, rekapitulacją najważniejszych obserwacji płynących

z wykonania trzech zadań badawczych. Rozdział zamykają trzy ogólne wnioski podsumowujące całość wykonanych badań.

Uwagi.

1. W mojej ocenie całość opracowania bardzo zyskałaby na wartości, gdyby Doktorant zdecydował się na przedstawienie dobrze przemyślanego i skonfrontowanego z danymi z piśmiennictwa, kilkustronicowego syntetycznego komentarza do swych wyników, w którym umiejętnie podkreśliłby ich zintegrowane znaczenie fizjologiczne. Brak takiego tekstu nie ułatwia czytelnikowi uchwycenia wagi bardzo spójnej koncepcji badań, a lektura trzech osobnych publikacji w sposób naturalny separuje otrzymane wyniki i w indywidualnym odbiorze sprzyja zamgleniu ich unikalnego, całościowego wyrazu.

Bibliografia. Spis literatury zawiera 57 pozycji, spośród których 37 to prace opublikowane w ostatnich 10 latach (od 2013 roku), w tym 21 ukazało się w ostatnich 5 latach (od 2018 roku).

Uwagi.

1. Bibliografia nie odzwierciedla rzeczywistej liczby prac zacytowanych w tekście opracowania, gdyż w wykazie brak jest następujących pozycji: Puente i wsp. 2020 cytowanej na s. 10 oraz Trincado i wsp. 2018 cytowanej na s. 19.

III. Podsumowanie

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest spójnym, starannie przemyślanym oryginalnym dziełem naukowym, którego powstanie wymagało od Doktoranta nabycia wszechstronnej wiedzy w zakresie teoretycznych podstaw podjętej tematyki, zdolności do precyzyjnego formułowania celów badawczych, opanowania nowoczesnych technik analitycznych wraz z umiejętnością posługiwania się narzędziami bioinformatycznymi i odpowiedniej interpretacji otrzymanych danych, jak też wykazania się zdolnością do opracowania i przygotowania do druku publikacji naukowej.

W błonie śluzowej macicy świni z zaindukowanym *in vitro* stanem zapalnym Doktorant po raz pierwszy ujawnił (i) funkcjonalny związek między aktywnością receptorów aktywowanych przez proliferatory perokysomow gamma (PPARγ) a odpowiedzią immunologiczną komórek endometrium na zapalenie; (ii) zidentyfikował zależne od LPS i ligandów receptorów PPARγ kompleksowe zmiany transkryptomiczne w środkowo-lutealnej i w pęcherzykowej fazie cyklu rujowego; (iii) wytypował procesy biologiczne i szlaki sygnalizacyjne uczestniczące w regulacji procesu zapalnego; (iv) ujawnił udział ligandów PPARγ w regulacji ekspresji genów uczestniczących w mechanizmach naprawczych DNA; (v) wykazał związek miedzy stanem

zapalnym oraz aktywnością ligandów receptorów PPARγ a procesami alternatywnego składania RNA i ekspresją długich, niekodujących RNA o zróżnicowanej ekspresji; (vi) wykazał genowo zmienne i zależne od fazy cyklu rujowego zaangażowanie ligandów PPARγ w regulacji ekspresji genów; (vii) zaobserwował zależną od agonistów PPARγ zmniejszoną ekspresję mediatorów prozapalnych i zwiększoną ekspresję mediatorów przeciwzapalnych; (viii) wykazał, że poziom ekspresji mediatorów prozapalnych w endometrium świni w przeważającym stopniu zależy od statusu hormonalnego (fazy cyklu rujowego).

Zgłoszone przeze mnie uwagi krytyczne do rozprawy dotyczą zauważonych nieścisłości, bądź braków w tekście opracowania w języku polskim i nie wpływają na moją ogólną wysoką ocenę omawianego dzieła naukowego.

Wnioskując na podstawie przekazanej mi do oceny rozprawy doktorskiej oceniam, że Pan mgr inż. Karol Mierzejewski .jest w pełni merytorycznie przygotowany do podjęcia samodzielnej pracy naukowej.

IV. Wniosek końcowy

Oryginalne wyniki badań własnych Pana mgr inż. Karola Mierzejewskiego są zawarte w trzech pracach opublikowanych w czasopismach naukowych indeksowanych w bazie Web of Science Core Collection. Uwzględniając wymóg dokonania oceny indywidualnego wkładu Doktoranta w powstaniu tych prac, po zapoznaniu się z pisemnymi oświadczeniami złożonymi przez wszystkich współautorów każdej z nich, oceniam, że indywidualny, twórczy wkład Pana mgr inż. Karola Mierzejewskiego w zakresie wykonanej pracy koncepcyjnej, eksperymentalnej i edytorskiej jest wystarczający do uznania go za Autora przedłożonej rozprawy doktorskiej.

Reasumując pragnę stwierdzić, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska zatytułowana: **„Udział receptorów aktywowanych przez proliferatory peroksysomów gamma (PPARγ) w regulacji procesu zapalnego w błonie śluzowej macicy świni (*Sus scrofa domestica*)”** spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.2023.742 ze zm.). W związku z powyższym, zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny nauki biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie z prośbą 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.

Pan mgr inż. Karol Mierzejewski przedstawił obszerne, nowatorskie dane, które po raz pierwszy dowiodły specyficznego, zależnego od fazy cyklu rujowego zaangażowania receptorów PPARγ i ich ligandów w regulacji procesu zapalnego w błonie śluzowej macicy świni domowej.

Mając na względzie wyróżniającą, wysoką wartość naukową uzyskanych wyników, które ukazały się w renomowanych czasopismach specjalistycznych o precyzyjnie zdefiniowanych profilach publikacyjnych, wnoszę też o wyróżnienia tej rozprawy.



Prof. dr hab. Alina Gajewska