Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
Wydział Biologii i Biotechnologii

mgr inż. Karol Mierzejewski

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

Rozprawa doktorska wykonana
w Katedrze Anatomii i Fizjologii Zwierząt
Promotor: prof. dr hab. inż. Iwona Bogacka
Promotor pomocniczy: dr Aleksandra Kurzyńska

SPIS TREŚCI

STRESZCZENIE *3*
ABSTRACT *5*
WYKAZ PUBLIKACJI SKŁADAJĄCYCH SIĘ NA ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ *7*
1. Wstęp *8*
2. Hipotezy i zadania badawcze *15*
3. Materiały i metody *16*
4. Wyniki *22*
5. Podsumowanie i wnioski *31*
6. Bibliografia *33*
7. Kopie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej *40*
8. Oświadczenia współautorów *41*
9. Krótka charakterystyka dorobku naukowego *42*

STRESZCZENIE

Macica jest wyspecjalizowanym organem zdolnym do stworzenia optymalnych warunków do implantacji zarodka, a następnie jego rozwoju. Aby właściwie przygotować się do tej funkcji, błona śluzowa podlega cyklicznym strukturalnym przemianom podczas każdego cyklu płciowego. Prawidłowy przebieg cyklu menstruacyjnego lub rujowego zależy w dużej mierze od zdolności macicy do rozpoznawania i eliminowania infekcji bakteryjnych prowadzących do stanu zapalnego. Częste infekcje bakteryjne inicjujące ostry lub przewlekły stan zapalny w układzie rozrodczym, u różnych gatunków, przyczyniają się do powstawania polipów endometrium, poronień i nieprawidłowości w tworzeniu łożyska, czy nawet bezpłodności. Zapalenie błony śluzowej macicy u zwierząt gospodarskich jest jedną z najczęstszych chorób stanowiących wyzwanie dla medycyny weterynaryjnej. Aktualne badania sugerują pilną potrzebę opracowania nowych metod leczenia przewlekłego stanu zapalnego w celu poprawy wydajności reprodukcyjnej stada i ogólnego dobrostanu zwierząt. W ostatnich latach, naukowcy poświęcają wiele uwagi badaniom dotyczącym wyjaśnieniu roli receptorów jądrowych aktywowanych przez proliferatory peroksysomów (PPAR) w regulacji procesów zapalnych. Uważa się, że PPARγ wykazują właściwości przeciwzapalne, jednak działanie to nie zostało do tej pory opisane w układzie rozrodczym.

W związku z powyższym, celem niniejszej rozprawy doktorskiej było określenie wpływu ligandów PPARγ – syntetycznego agonisty (pioglitazonu), naturalnego agonisty (prostaglandyny J_2, PGJ_2) oraz selektywnego antagonisty (T0070907) na profil transkryptomiczny błony śluzowej macicy świni z indukowanym przez lipopolisacharyd (LPS) stanem zapalnym w warunkach *in vitro* z wykorzystaniem wysokoprzepustowej metody RNA-Seq. Ponadto, przy użyciu metody Real-time PCR oraz ELISA określono ekspresję głównych pro- i przeciwzapalnych mediatorów stanu zapalnego w dwóch układach doświadczalnych – rozwijającym się oraz trwającym stanie zapalnym.

Uzyskane wyniki badań wykazały, że LPS podczas badanych faz cyklu rujowego zwiększa ekspresję markerów prozapalnych. Ponadto, przy użyciu analiz bioinformatycznych, określono ścieżki sygnałowe, w których działanie zaangażowane są geny o zmienionej pod wpływem LPS ekspresji. Wykazano również wpływ LPS na proces alternatywnego składania genów kluczowych dla prawidłowego funkcjonowania układu rozrodczego. Ponadto stwierdzono, że zablokowanie receptora PPARγ podczas fazy środkowo-lutealnej, zwiększyło liczbę genów o zmienionej ekspresji. Geny te były zaangażowane głównie w odpowiedź immunologiczną o profilu prozapalnym oraz proces chemotaksji granulocytów. Z kolei, podczas fazy pęcherzykowej cyklu rujowego wykazano zależność między ligandami PPARγ a ekspresją genów zaangażowanych w odpowiedź

na uszkodzenia DNA. Ponadto odnotowano, że modulacyjna rola agonistów PPARγ w błonie śluzowej macicy świni podczas procesu zapalnego zależy w większym stopniu od fazy cyklu rujowego niż od układu doświadczalnego (rozwijający się i trwający stan zapalny).

Wyniki przeprowadzonych badań, po raz pierwszy, w sposób kompleksowy opisują wpływ ligandów PPARγ na odpowiedź immunologiczną w błonie śluzowej macicy świni podczas indukowanego *in vitro* stanu zapalnego. Wykazano istotną rolę PPARγ w regulacji stanu zapalnego w błonie śluzowej macicy podczas fazy środkowo-lutealnej oraz pęcherzykowej cyklu rujowego. Oprócz przeciwzapalnych właściwości badania wykazały, że pioglitazon, reguluje ekspresję genów zaangażowanych w mechanizmy naprawcze DNA, w tym aktywację punktu kontrolnego, który zatrzymuje cykl komórkowy w momencie pojawienia się nieprawidłowości.

ABSTRACT

The uterus is a specialized organ that creates optimal conditions for embryo implantation and subsequent development. To prepare for this function, the endometrium undergoes cyclical structural changes during each sexual cycle. The proper progression of the menstrual or estrous cycle depends largely on the ability of the uterus to recognize and eliminate bacterial infections that lead to inflammation. Frequent bacterial infections that cause acute or chronic inflammation in the reproductive system contribute to the formation of endometrial polyps, miscarriages, and abnormalities in placental formation or even infertility in various species. Endometritis in livestock is one of the most common diseases challenging veterinary medicine. Recent research suggests that there is an urgent need for new treatments for chronic inflammation to improve herd reproductive performance and overall animal welfare. In recent years, the role of PPAR in regulating inflammatory processes has become a particularly interesting research topic. It is believed that PPARγ has an anti-inflammatory effect. However, to date, such studies have not been performed on the endometrium.

Therefore, the aim of this dissertation was to determine the effect of PPARγ ligands – a synthetic agonist (pioglitazone), a natural agonist (prostaglandin J_2, PGJ_2), and a selective antagonist (T0070907) – on the transcriptomic profile of porcine endometrium during *in vitro* induced inflammation by lipopolysaccharide (LPS) using the high-throughput RNA-Seq method. In addition, Real-time PCR and ELISA methods were used to determine the expression of pro- and anti-inflammatory mediators in two experimental systems – developing and ongoing inflammation.

The obtained results showed that LPS increased the expression of pro-inflammatory markers during the studied phases of the estrous cycle. In addition, bioinformatic analyzes determined signaling pathways involving genes whose expression was altered under the influence of LPS. The effect of LPS on the process of alternative splicing of genes critical for the proper functioning of the reproductive system was also demonstrated. In addition, blocking the PPARγ receptor during the mid-luteal phase it was shown to affect the largest number of genes with altered expression. These genes were mainly involved in the immune response with a pro-inflammatory profile and the process of granulocyte chemotaxis. In turn, in the follicular phase of the estrous cycle, an association between PPARγ ligands and the expression of genes involved in the DNA damage response was demonstrated. In addition, the modulatory role

of PPARγ agonists in porcine endometrium during the inflammatory process was reported to be more dependent on the estrous cycle phase than on the experimental system (developing and ongoing inflammation).

The results of this study comprehensively describe for the first time the effect of PPARγ-ligands on the immune response in porcine endometrium during *in vitro* induced inflammation. The important role of the PPARγ receptor in regulating inflammation in the endometrium during the mid-luteal and follicular phases of the estrous cycle was demonstrated. In addition to its anti-inflammatory properties, studies have shown that pioglitazone regulates the expression of genes involved in DNA repair mechanisms, including checkpoint activation, which halts cell cycle progression when abnormalities occur in the genome.

WYKAZ PUBLIKACJI SKŁADAJĄCYCH SIĘ NA ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ

Rozprawa doktorska składa się z trzech oryginalnych prac opublikowanych w 2021 oraz 2022 roku, których tematyka obejmuje udział ligandów PPARγ w regulacji stanu zapalnego wywołanego przez bakteryjny lipopolisacharyd (LPS) w błonie śluzowej macicy świni.

1. **Karol Mierzejewski,** Łukasz Paukszto, Aleksandra Kurzyńska, Zuzanna Kunicka, Jan Paweł Jastrzębski, Iwona Bogacka. *Transcriptome analysis of porcine endometrium after LPS-induced inflammation: effects of the PPAR-gamma ligands in vitro*. Biology of Reproduction. 2021. doi: 10.1093/biolre/ioaa200.

   IF[1]= 4,161; MEiN[2] = 200 pkt.

2. **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 doi: 10.1038/s41598-022-07986-8.

   IF[1]= 4,997; MEiN[2] = 140 pkt.

3. **Karol Mierzejewski,** Aleksandra Kurzyńska, Zuzanna Kunicka, Anna Klepacka, Monika Golubska, Iwona Bogacka. *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands regulate the expression of inflammatory mediators in porcine endometrium during LPS-induced inflammation*. Theriogenology. 2022 doi: 10.1016/j.theriogenology.2022.04.030.

   IF[1]= 2,923; MEiN[2] = 140 pkt.

Łączna suma IF wynosi 12,081, natomiast liczba punktów MEiN – 480.

[1] IF - wskaźnik Impact Factor czasopisma w roku publikacji

[2] liczba punktów na podstawie komunikatu Ministra Edukacji i Nauki w sprawie wykazu czasopism naukowych z dnia 21 grudnia 2021 r.

1. Wstęp

Rozmnażanie jest podstawowym procesem biologicznym, który odgrywa kluczową rolę w przetrwaniu i kontynuacji gatunków. Sukces reprodukcyjny zależy od wielu czynników, wymaga integracji procesów fizjologicznych i molekularnych oraz zapewnienia optymalnego dla nich środowiska. W tym celu żeński układ rozrodczy ulega cyklicznym przemianom, w głównej mierze zachodzącym w błonie śluzowej macicy, przygotowującym organizm do implantacji i inicjacji ciąży.

Błona śluzowa macicy, zwana również endometrium, jest wyspecjalizowanym nabłonkiem wyścielającym wnętrze jamy macicy ssaków, w tym ludzi i zwierząt hodowlanych. Endometrium podlega cyklicznym zmianom strukturalnym i funkcjonalnym podczas cyklu menstruacyjnego u kobiet lub rujowego u zwierząt, zapewniając optymalne warunki dla implantacji zarodka, rozwoju płodu oraz utrzymania ciąży (Fazleabas i Strakova, 2002). W przypadku gdy nie dojdzie do implantacji, błona śluzowa macicy ulega złuszczeniu i wydaleniu z organizmu. Następnie, endometrium ulega odbudowie w celu przygotowania macicy do ewentualnego przyjęcia zarodka w kolejnym cyklu. Dynamiczny charakter tych procesów jest precyzyjnie regulowany przez jajnikowe hormony steroidowe, mechanizmy molekularne oraz interakcje z komórkami immunologicznymi. Brak równowagi w środowisku wewnątrzmacicznym przyczynia się do zaburzeń płodności stanowiących rosnący problem zarówno u ludzi jak i zwierząt. Jedną z głównych przyczyn zaburzających funkcjonowanie żeńskiego układu rozrodczego jest stan zapalny.

Stan zapalny błony śluzowej macicy

Stan zapalny jest naturalną reakcją obronną organizmu w odpowiedzi na szkodliwe czynniki takie jak m. in. zakażenie bakteryjne. Podczas fazy ostrej, stan zapalny jest krótkotrwały i niezbędny do usunięcia patogenów. Jednakże, niekontrolowany, przedłużający się stan zapalny zmienia się w stan chroniczny i może prowadzić do poważnych konsekwencji zdrowotnych takich jak uszkodzenia tkanek czy dysfunkcje organów (Schmid-Schönbein, 2006). Odpowiedź zapalna w obrębie błony śluzowej macicy najczęściej związana jest z obecnością lipopolisacharydu (LPS) – endotoksyny stanowiącej składnik zewnętrznej błony komórkowej bakterii Gram-ujemnych np. *Escherichia coli* (*E. coli*) (Herath i wsp., 2006). Działanie LPS na organizm rozpoczyna się wiązaniem z LBP (ang. *lipopolysaccharide binding protein*)

i rozpoznaniem endotoksyny przez receptor TLR4 (ang. *toll-like receptor 4*), co w konsekwencji prowadzi do inicjacji wewnątrzkomórkowych kaskad stymulujących wrodzoną odpowiedź immunologiczną poprzez indukcję syntezy cząsteczek chemotaktycznych i cytokin prozapalnych, takich jak m. in. interleukina-1β (IL-1β), IL-6 i czynnik martwicy nowotworu-α (TNF-α) (Ciesielska i wsp., 2021). LPS wpływa ponadto na zwiększone wydzielanie przez komórki reaktywnych form tlenu (RFT), reaktywnych form azotu (RFA) oraz tlenku azotu (NO). Powstający stres oksydacyjny powoduje uszkodzenie różnych biomolekuł, w tym białek, kwasów nukleinowych, węglowodanów i lipidów (Pálmai-Pallag i Bachrati, 2014). Należy podkreślić również fakt, że podatność błony śluzowej macicy na zakażenia bakteryjne zależna jest od profilu hormonalnego organizmu specyficznego dla fazy cyklu rujowego. Okresem o największej wrażliwości endometrium na zakażania jest faza środkowo-lutealna, która charakteryzuje się wysokim stężeniem progesteronu (P4), hormonu o właściwościach immunosupresyjnych (Cui i wsp., 2020).

Zapalenie błony śluzowej macicy, określane również jako endometritis, jest powszechną i częstą chorobą układu rozrodczego u świń. Towarzyszący temu stan zapalny może przyczyniać się do zaburzeń w przebiegu rui, tworzeniu się polipów w błonie śluzowej macicy, poronień oraz bezpłodności (Drizi i wsp., 2020). Za główną i najczęstszą przyczynę endometritis uważa się zakażenia powodowane przez *E. coli*. Biorąc pod uwagę fakt, że hodowla trzody chlewnej jest jedną z największych gałęzi przemysłu rolniczego, usuwanie ze stada zwierząt z problemami rozrodczymi spowodowanymi stanem zapalnym, powoduje ogromne straty ekonomiczne (Grahofer i wsp., 2020). Brak efektywnego leczenia chorób zapalnych w obrębie układu rozrodczego samic stanowi wyzwanie dla medycyny weterynaryjnej i określa pilną potrzebę opracowania skutecznej terapii.

Przewlekłe zapalenie błony śluzowej macicy jest również częstym problemem wpływającym na płodność u kobiet. Przeprowadzone badania wykazały, że częstość występowania przewlekłego endometritis wynosi 24,4% w populacji ogólnej (Song i wsp., 2018). Ponadto wykazano, że endometritis występuje u około 41% kobiet z powtarzającymi się niepowodzeniami implantacji (Song i wsp., 2018). Chroniczny stan zapalny w endometrium zwiększa również ryzyko powikłań podczas ciąży, w tym utraty ciąży (około 30% więcej poronień u pacjentek z endometritis) (Morimune i wsp., 2021), i występuje u 24–56% kobiet z nawracającymi poronieniami (Bouet i wsp., 2016; Kuroda i wsp., 2021; McQueen i wsp., 2015). Tak jak w przypadku świń, główną przyczyną

endometritis również u kobiet jest zakażenie bakteryjne spowodowane w dużej mierze *E. coli* (Puente i wsp. 2020). Badania wykazały, że LPS indukuje ekspresję cząsteczek prozapalnych w komórkach endometrium, które nasilają naciek komórek plazmatycznych do zrębu błony śluzowej macicy (Kitaya i Yasuo, 2010). Odkrycia te sugerują, że stan zapalny w jamie macicy wyzwala reakcje immunologiczne nietypowe dla ludzkiego endometrium, które zmieniają mikrośrodowisko macicy zaburzając prawidłowe funkcjonowanie układu rozrodczego.

Świnia domowa jako organizm modelowy

Świnia domowa (*Sus scrofa domestica*) zyskała uznanie jako organizm modelowy ze względu na podobieństwo anatomiczne, fizjologiczne i genetyczne do człowieka, dlatego jest obecnie wykorzystywana w wielu badaniach biomedycznych, w tym dotyczących układu rozrodczego (Lorenzen i wsp., 2015). Na uwagę zasługuje również znaczenie tego modelu w kontekście badań mechanizmów odpowiedzi immunologicznej w układzie rozrodczym. Analizy wykazały, że układ odpornościowy świni jest podobny do ludzkiego w ponad 80%, w przeciwieństwie do często wykorzystywanego modelu jakim jest mysz, u której podobieństwo wynosi tylko ok. 10% (Dawson, 2012). Odpowiedź immunologiczna w obrębie układu rozrodczego obejmują czynniki wrodzone takie jak bariery błonowe, związki przeciwdrobnoustrojowe i cytokiny wytwarzane przez komórki nabłonkowe oraz komórki immunologiczne (Mair i wsp., 2014). Wszystkie elementy odpowiedzi immunologicznej są regulowane przez progesteron i estradiol, a zatem ich aktywność zmienia się w zależności od fazy cyklu menstruacyjnego lub rujowego (Hickey i wsp., 2011). Biorąc pod uwagę, że profile hormonalne u obu gatunków są podobne, wyniki uzyskane na modelu zwierzęcym stanowią cenne źródło wiedzy o procesach zachodzących u kobiet (Lorenzen i wsp., 2015).

Receptory aktywowane przez proliferatory peroksysomów

Receptory aktywowane przez proliferatory peroksysomów (PPAR) odkryte w 1990 r. należą do rodziny receptorów jądrowych i pełnią rolę czynników transkrypcyjnych regulujących ekspresję genów docelowych (Issemann i Green, 1990). Mechanizm działania PPAR polega na wiązaniu się receptora ze specyficznym ligandem, a następnie łączeniu się z receptorem retinoidu X (RXR), co określane jest mianem heterodimeryzacji. Tak powstały heterodimer wiąże się z elementem odpowiedzi

proliferatorów peroksysomów (PPRE), specyficznym miejscem na nici DNA, regulując transkrypcję docelowych genów (Chan i Wells, 2009).

Do tej pory zidentyfikowano trzy izoformy receptora PPAR – PPARα, PPARβ/δ i PPARγ. Izoformy te, pomimo wysokiego stopnia homologii, wykazują zróżnicowaną dystrybucję tkankową oraz właściwości wiązania liganda, pełnią również trochę odmienne funkcje w organizmie (Cheng i wsp., 2019). Wszystkie jednak izoformy PPAR biorą udział w regulacji metabolizmu, homeostazy energetycznej oraz rozwoju i różnicowaniu komórek. Wcześniejsze badania Zespołu wykazały, że wszystkie izoformy ulegają ekspresji w błonie śluzowej macicy świni podczas cyklu rujowego oraz wczesnej ciąży. Największą ekspresji PPARα stwierdzono w hepatocytach, kardiomiocytach, enterocytach, komórkach kanalików proksymalnych nerki, jak również w tkankach biorących udział w zwiększonym utlenianiu kwasów tłuszczowych takich jak wątroba, mięśnie szkieletowe czy serce (Bogacka i Bogacki, 2011). Główną funkcją PPARα jest udział w kontrolowaniu metabolizmu lipidów, a ligandy tej izoformy są stosowane w leczeniu dyslipidemii ze względu na obniżanie poziomu triglicerydów w osoczu i zwiększanie stężenia cholesterolu HDL (Mirza i wsp., 2019). PPARβ/δ ulega ekspresji we wszystkich komórkach, przy czym w największym stopniu w mięśniach szkieletowych i makrofagach. Jego aktywacja prowadzi do poprawy wrażliwości na insulinę, zmniejszenia aktywności lipazy lipoproteinowej oraz hamowania stężenia lipoprotein o małej gęstości (Mirza i wsp., 2019). Ponadto bierze udział procesie gojenia się ran, różnicowaniu keratynocytów i angiogenezie (Hamblin i wsp., 2009). Najlepiej zbadaną typem receptora PPAR jest izoforma gamma. Biologiczne funkcje PPARγ są złożone i różnorodne i obejmują udział w: regulacji metabolizmu lipidów i węglowodanów, hamowaniu stanu zapalnego, indukowaniu różnicowania i apoptozy komórek nowotworowych, hamowaniu procesu angiogenezy guza, przeciwdziałaniu zwłóknienia i miażdżycy tętnic, zmniejszaniu zawartości tłuszczu we krwi i ciśnienia krwi, poprawie niewydolności serca i przebudowie komór (Cheng i wsp., 2019; Hallenborg i wsp., 2016; Montaigne i wsp., 2021). W ostatnich latach PPARγ stał się również przedmiotem intensywnych badań w kierunku działania przeciwzapalnego.

Badania wykazały, że aktywacja PPARγ prowadzi do modulacji odpowiedzi immunologicznej poprzez hamowanie ekspresji cytokin prozapalnych, regulację aktywności makrofagów, limfocytów B i T oraz kontrolę procesów metabolicznych związanych ze stanem zapalnym. Badania na zwierzęcych modelach stanu zapalnego, głównie na gryzoniach, wykazały że ligandy PPARγ hamują syntezę cytokin prozapalnych, takich jak IL-1β, IL-6, TNF-α czy TGFβ poprzez hamowanie aktywności jądrowego czynnika kappa B (NF-κB), kluczowego czynnika transkrypcyjnego, który reguluje ekspresję wymienionych cytokin (Martin, 2009). Ponadto wykazano, że aktywacja PPARγ indukuje zmianę fenotypową makrofagów z M1 na M2 w miejscach objętych stanem zapalnym, prowadząc do zmniejszonego wydzielania cytokin prozapalnych i migracji limfocytów (Abdalla i wsp., 2020). Należy podkreślić również fakt, że ligandy PPARγ biorą udział w regulacji stresu oksydacyjnego, procesu współistniejącego ze stanem zapalnym. Wzmagają one odpowiedź antyoksydacyjną poprzez stymulację peroksydazy glutationowej 3 (GPx3), dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), glikoproteiny płytkowej (CD36) oraz syntazy tlenku śródbłonka (eNOS). Równolegle, ligandy PPARγ mogą obniżać odpowiedź prooksydacyjną poprzez hamowanie cyklooksygenazy-2 (COX2) i syntazy tlenku azotu (iNOS) (Vallée i Lecarpentier, 2018). Pomimo badań prowadzonych na wielu tkankach w organizmie, nadal brakuje informacji na temat udziału ligandów PPARγ w regulacji stanu zapalnego w błonie śluzowej macicy. Wykazano, że profil ekspresji wszystkich izoform PPAR ulega zwiększeniu w endometrium krowy pod wpływem LPS w badaniach *in vitro* jak również po podaniu *in vivo* domacicznie *E. coli* (Socha i wsp., 2018). Ponadto wykazano przeciwzapalny wpływ ligandów PPARγ na ekspresję wybranych czynników zapalnych w ludzkich komórkach zrębu endometrium stymulowanych *in vitro* LPS lub komórkach pozyskanych od kobiet z endometriozą (Sharma i wsp., 2011). Wcześniejsze badania Zespołu wykazały natomiast, że ligandy PPARγ regulują ekspresję różnych cytokin tj. IL-1β, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, LIF oraz mediatora prozapalnego (NF-κB) w błonie śluzowej macicy świni podczas cyklu rujowego oraz wczesnej ciąży w warunkach fizjologicznych (Kunicka i wsp., 2019).

Ze względu na znaczącą rolę PPARγ w patofizjologii, identyfikacja agonistów PPARγ stała się celem wielu prac rozwojowych nad lekami. Obecnie znane są związki aktywujące PPARγ, zarówno naturalne jak i syntetyczne. Do grupy syntetycznych agonistów PPARγ należą niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ) takie jak indometacyna, ibuprofen, fenoprofen czy kwas flufenamowy (Sertznig i wsp., 2007). Leki te, wykazują działanie przeciwzapalne, przeciwgorączkowe i przeciwbólowe, działając poprzez hamowanie cyklooksygenaz. Wykazano, że NLPZ aktywują PPARγ w sposób zależny od stężenia, jednak mechanizm działania nie został dotychczas w pełni poznany (Ciavarella i wsp., 2020).

Do najbardziej znanych syntetycznych ligandów PPARγ, o większym powinowactwie do receptora niż NLPZ, należą tiazolidinediony (TZD) m. in. troglitazon, rozyglitazon, pioglitazon czy ciglitazon. Dwa z nich – rozyglitazon i pioglitazon, ze względu na udział w regulacji ekspresji genów zwiększających wrażliwość komórek na insulinę, są stosowane w leczeniu cukrzycy typu II (Abdellatif i wsp., 2019). Liczne badania wykazały również korzystny wpływ pioglitazonu w terapii chorób sercowo-naczyniowych (Dormandy i wsp., 2005; Kernan i wsp., 2016; Lincoff i wsp., 2007). Ponadto wykazano, że pioglitazon koryguje wiele składowych zespołu metabolicznego i jest skutecznym sposobem leczenia niealkoholowej stłuszczeniowej choroby wątroby (DeFronzo i wsp., 2019) . Trwające obecnie badania kliniczne skupiają się również nad możliwością wykorzystania tiazolidinedionów w terapii przeciwnowotworowej (Tilekar i wsp., 2022).

PPARγ może być również aktywowany przez związki naturalne, zarówno endo- jak i egzogenne. Wśród naturalnych ligandów PPARγ, wysokie powinowactwo do receptora wykazują długołańcuchowe wielonienasycone kwasy tłuszczowe i ich pochodne oraz metabolity kwasu arachidonowego. PPARγ może być ponadto aktywowany przez kilka prostanoidów, takich jak kwas 15-hydroksyeikozatetraenowy oraz 15-dezoksy-Δ12, 14-prostaglandyna J_2 (15d-PGJ_2). 15d-PGJ_2 jest jednym z najczęściej badanych naturalnych ligandów PPARγ. Dowiedziono, że aktywacja PPARγ przez 15d-PGJ_2 wykazuje właściwości przeciwnowotworowe, przeciwzapalne oraz antyoksydacyjne. Pomimo endogennej syntezy 15d-PGJ_2, do wywołania wspomnianych efektów konieczne jest jej dostarczenie z zewnątrz (Li i wsp., 2019).

Podsumowując, przedstawione dane literaturowe wskazują na:

1) zaburzone funkcjonowanie układu rozrodczego podczas stanu zapalnego w obrębie błony śluzowej macicy,
2) istotny udział ligandów PPARγ w regulacji stanu zapalnego potwierdzony w badaniach prowadzonych na różnych tkankach,
3) potencjalny udział ligandów PPARγ w regulacji stanu zapalnego w błonie śluzowej macicy świni.

W związku z powyższym, celem niniejszej pracy jest dostarczenie nowych danych na temat roli ligandów PPARγ w modulowaniu odpowiedzi immunologicznej w błonie śluzowej macicy świni podczas indukowanego przez LPS stanu zapalnego w warunkach *in vitro*.

2. Hipotezy i zadania badawcze

Określenie udziału PPARγ w regulacji procesu zapalnego w błonie śluzowej macicy świni nie było dotychczas przedmiotem badań, a dostępne fragmentaryczne dane literaturowe dotyczące ekspresji i funkcji PPARγ w układzie rozrodczym ludzi i zwierząt pozwoliły na sformułowanie następujących hipotez badawczych:

a) ligandy PPARγ uczestniczą w regulacji procesu zapalnego w błonie śluzowej macicy świni,
b) udział ligandów PPARγ w regulacji procesu zapalnego w błonie śluzowej macicy świni jest zależny od fazy cyklu rujowego,
c) udział ligandów PPARγ w regulacji procesu zapalnego w błonie śluzowej macicy świni jest zależny od statusu stanu zapalnego – rozwijający się lub trwający.

W celu weryfikacji postawionych hipotez zaplanowano następujące zadania badawcze:

Zadanie 1. Określenie wpływu naturalnego i syntetycznego agonisty lub antagonisty PPARγ na globalny transkryptom błony śluzowej macicy świni podczas procesu zapalnego indukowanego przez LPS podczas fazy środkowo-lutealnej cyklu rujowego.

Zadanie 2. 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.

Zadanie 3. 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.

3. Materiały i metody

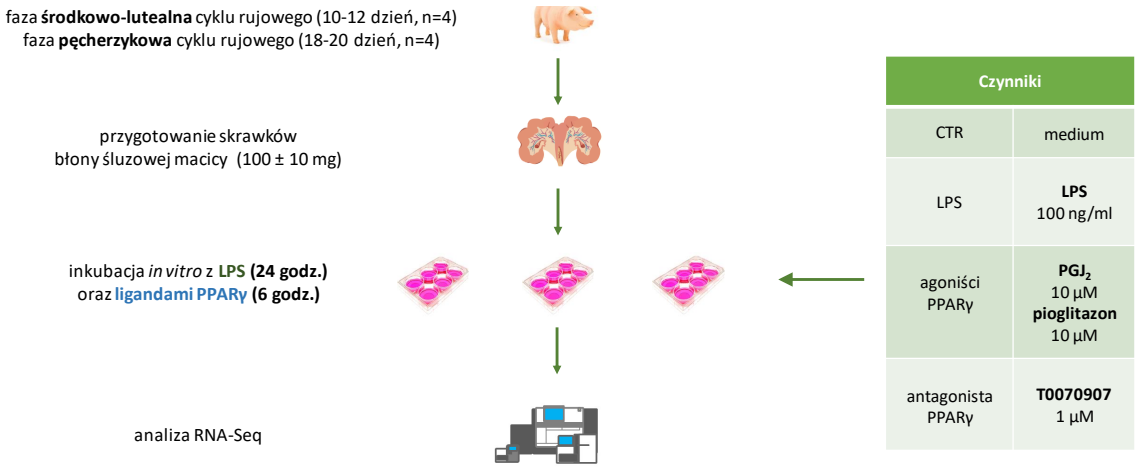
Materiał badawczy

Materiał badawczy stanowiła błona śluzowa macicy pobrana od dojrzałych samic świni domowej podczas fazy środkowo-lutealnej (10-12 dzień cyklu rujowego, n=4; wysokie stężenie progesteronu) lub pęcherzykowej (18-20 dzień cyklu rujowego, n=4; niskie stężenie progesteronu). Zwierzęta mieszańców towarowych ras Polska Biała Zwisłoucha i Wielka Biała Polska (w wieku 7-8 miesięcy i średniej wadze 90-110 kg) pochodziły z prywatnej hodowli i były przeznaczone do uboju komercyjnego i przetwórstwa mięsnego. Wszystkie procedury z udziałem zwierząt zostały przeprowadzone zgodnie z Ustawą z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych oraz Dyrektywą Parlamentu Europejskiego i Rady Unii Europejskiej 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych. Kilka minut po uboju od zwierząt wyizolowano macice i określono fazę cyklu rujowego na podstawie morfologii jajników (Akins i Morrissette, 1968). Tkanki stanowiące materiał badawczy umieszczono w zimnym roztworze sterylnej soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (PBS, pH = 7,4) z dodatkiem 1% roztworu antybiotyczno-antymykotycznego (Sigma Aldrich, USA) i przewieziono do laboratorium Katedry Anatomii i Fizjologii Zwierząt, Wydziału Biologii i Biotechnologii, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie.

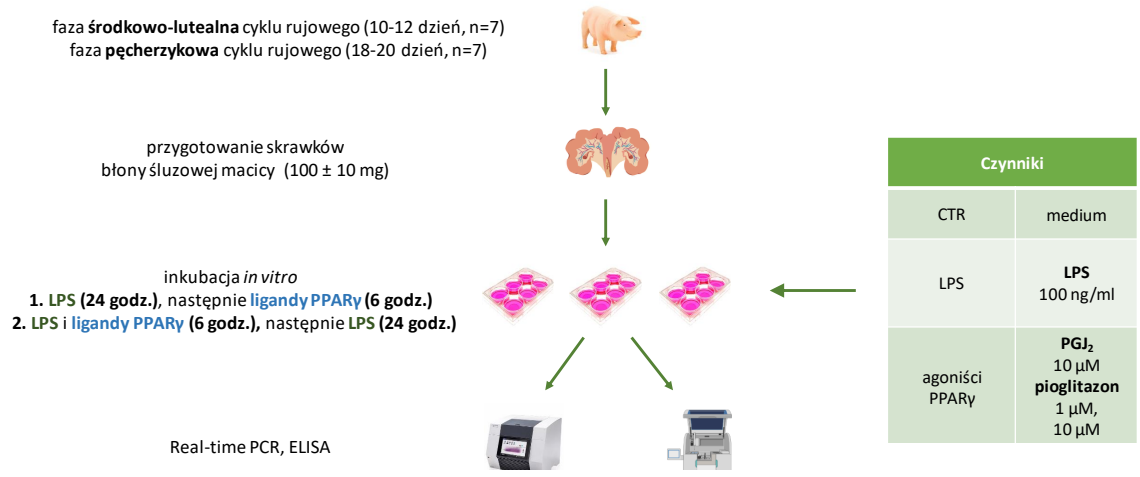
Inkubacja in vitro skrawków błony śluzowej macicy świni

W laboratorium oddzielono błonę śluzową macicy od błony mięśniowej, oczyszczono i umieszczono na lodzie w sterylnych szalkach Petriego. Przygotowano skrawki o masie 100±10 mg, płukano je dwukrotnie w buforze PBS, po czym umieszczono w sterylnych buteleczkach inkubacyjnych w medium M199 z dodatkiem antybiotyków: nystatyny (120 j.m./ml) oraz gentamycyny (40 mg/ml). Skrawki poddano dwu-godzinnej preinkubacji w łaźni wodnej o temperaturze 37°C w atmosferze 95% O_2 i 5% CO_2. Następnie skrawki poddano właściwej inkubacji – 24 godziny bez (kontrola) lub w obecności LPS (z *Escherichia coli*). W kolejnym etapie usunięto pożywkę hodowlaną a skrawki inkubowano w pożywce wolnej od LPS przez 6 godzin z ligandami PPARγ zgodnie ze schematem przedstawionym na Ryc. 1 (**Zadanie 1 i 2**).

W **Zadaniu 3** zastosowano dwa układy doświadczalne. W pierwszym układzie skrawki tkanek inkubowano przez 24 godziny w pożywce zawierającej LPS lub bez (kontrole). Po tym czasie eksplantaty inkubowano przez 6 godzin w obecności agonistów PPARγ. W drugim układzie doświadczalnym skrawki tkanek inkubowano jednocześnie przez 6 godzin w obecności agonistów PPARγ i LPS. Po wymianie pożywki na świeżą, eksplantaty inkubowano przez 24 godzin z samym LPS (Ryc. 2). Po zakończeniu doświadczenia skrawki błony śluzowej macicy zamrożono w temperaturze -80°C.



Ryc. 1 Schemat doświadczenia przeprowadzonego w ramach Zadań 1 oraz 2.



Ryc. 2 Schemat doświadczenia przeprowadzonego w ramach Zadania 3.

Izolacja RNA oraz wysokoprzepustowe sekwencjonowanie transkryptomu

Całkowite RNA ze skrawków błony śluzowej macicy po hodowli *in vitro* wyizolowano przy użyciu komercyjnego zestawu RNeasy Mini Kit (Qiagen, USA). Ilość oraz stopień czystości uzyskanego RNA określono spektrofotometrycznie (Infinite M200 PRO, Tecan, Switzerland), ponadto sprawdzono integralność RNA za pomocą urządzenia Bioanalyzer 2100 (Agilent Technology, USA). Sekwencjonowanie RNA-Seq zostało wykonane przez zewnętrzną firmę Macrogen (Korea Południowa). Próby o współczynniku integralności RNA (RIN) powyżej 7 zostały wybrane do konstrukcji bibliotek cDNA przy użyciu zestawu TruSeq RNA Sample Prep Kit (Illumina, USA). Fragmenty dwuniciowego cDNA oznaczono specyficznymi adapterami dla każdej biblioteki. Następnie, zamplifikowane biblioteki cDNA posłużyły do przeprowadzania sekwencjonowania RNA-Seq z zastosowaniem platformy NovaSeq 6000 (Illumina, USA). Otrzymano sekwencje transkryptów o sparowanych końcach i długości 2 x 151 nukleotydów (nt). Surowe odczyty uzyskane w wyniku sekwencjonowania zdeponowano w Europejskim Archiwum Nukleotydów (ENA) pod nr PRJEB39516 (Zadanie 1) oraz PRJEB45635 (Zadanie 2).

Analiza genów o zróżnicowanej ekspresji pod wpływem LPS oraz ligandów PPARγ oraz analiza funkcjonalna

Jakość surowych odczytów uzyskanych w wyniku sekwencjonowania sprawdzono za pomocą programu FastQC (wersja 0.11.8). Następnie, w programie Trimmomatic (wersja 0.39) zostały usunięte odczyty krótsze niż 120 nt oraz te o niskim współczynniku jakości (Phred < 20), a także regiony adapterowe. Wysokiej jakości odczyty, przycięte do równych długości 120 nt, zostały przyrównane do genomu referencyjnego świni domowej (Sscrofa11.1.99) za pomocą oprogramowania STAR (wersja 2.7.1a) i StringTie (wersja 2.1.1) (Dobin i wsp., 2013; Pertea i wsp., 2015). Zróżnicowana ekspresja genów pomiędzy grupą badaną a kontrolną była oceniana z użyciem oprogramowania statystycznego: edgeR (Robinson i wsp., 2010) i DESeq2 (Love i wsp., 2014). W analizie zmian ekspresji genów zastosowano test dwumianowy i przyjęto próg istotności na poziomie $p \leq 0,05$ oraz $|\log2(\text{krotności zmian})| \geq 1$. Odczyty spełniające podane kryteria zostały uznane za geny o zróżnicowanej ekspresji (DEGs ang. *differentially expressed genes*). Analiza funkcjonalna genów o zróżnicowanej ekspresji została

przeprowadzona w oparciu o bazę danych Gene Ontology (GO), natomiast przypisanie ich do szlaków metabolicznych na podstawie bazy Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) z wykorzystaniem oprogramowania g.Profiler (Ashburner i wsp., 2000; Kanehisa i wsp., 2017). Istotność procesów GO oraz ścieżek sygnałowych KEGG została zweryfikowana na podstawie skorygowanej wartości $p \leq 0,05$. Wizualizacje wyników przygotowano za pomocą oprogramowań: ggplot2 (Wickham, 2009), GOplot (Walter i wsp., 2015) i circlize oraz własnego skryptu w oprogramowaniu R (wersja 3.6.3).

Analiza miejsc alternatywnego składania RNA o zróżnicowanej ekspresji pod wpływem LPS oraz ligandów PPARγ

Różnice w alternatywnym składaniu RNA (DASEs ang. *differential alternative splicing events*) pod wpływem zastosowanych czynników zostały zidentyfikowane przy użyciu oprogramowania SUPPA v.2 (Trincado i wsp. 2018). Przycięte odczyty ze sparowanych końców o równej długości (90 nt) zostały przyrównane do referencyjnego transkryptomu Sus scrofa przy zastosowaniu programu Salmon wer. 1.1.0 (Patro i wsp., 2017) oraz użyte do obliczenia procentowego udziału wtrąceń splicingowych (PSI ang. *percent of splicing inclusion*). Zdarzenia splicingu dla wartości $p \leq 0,05$ i $|\Delta PSI| > 0,1$ zostały sklasyfikowane jako istotne statystycznie. Sklasyfikowano 7 typów zdarzeń alternatywnego splicingu: alternatywne miejsce donorowe (A5SS), alternatywne miejsce akceptorowe (A3SS), wzajemnie wykluczające się eksony (MXE), zatrzymanie intronu (RI), pominięcie eksonu (SE), splicing pierwszego eksonu (AFE) oraz splicing ostatniego eksonu (ALE). Wizualizacje wyników przygotowano za pomocą programu ggsashimi (wersja 0.5.0) (Garrido-Martín i wsp., 2018).

Analiza ekspresji długich niekodujących RNA o zróżnicowanej ekspresji pod wpływem ligandów LPS oraz PPARγ

Długie niekodujące RNA o zróżnicowanej ekspresji (DElncRNA, ang. *differentially expressed long noncoding RNA*) pod wpływem badanych czynników zidentyfikowano zgodnie z metodyką opracowaną przez Paukszto i wsp. (2019). Transkrypty kodujące białko, z pojedynczym eksonem lub długością sekwencji krótszą niż 200 nt zostały usunięte. Potencjał kodowania pozostałych RNA oszacowano za pomocą Coding

Potential Calculator (CPC) (Kang i wsp., 2017), PLEK (Li i wsp., 2014) i FlExible Extraction of lncRNAs (FEELnc) (Wucher i wsp., 2017). Różnice ekspresji zidentyfikowanych lncRNA pomiędzy próbami badanymi i kontrolnymi obliczono za pomocą programu Ballgown, przy założeniach $p \leq 0{,}05$ i $|\log2(\text{krotności zmian})| \geq 1$. Pary skorelowanych DE-lncRNAs oraz DEGs zostały wybrane na podstawie porównania profili ich ekspresji w oparciu o współczynnik korelacji Pearsona oraz odległość euklidesową par ($|r^2| > 0.9$; $p < 0{,}05$). Wizualizacje wyników przygotowano przy użyciu oprogramowania Cytoscape (wersja 3.8.3) (Shannon i wsp., 2003).

Real-time PCR

Analiza ekspresji genów wybranych mediatorów stanu zapalnego

Ekspresja genów kodujących mediatory stanu zapalnego została określona za pomocą metody Real-time PCR. Względną ilość mRNA *NF-κB*, *TLR4*, *IL-1β*, *IL-4, IL-6, IL-10, LIF* i *ACTB* (gen referencyjny) określono przy użyciu TaqMan®RNA-to-CT™ 1-Step Kit firmy Applied Biosystems (USA). Sekwencje starterów i sond TaqMan do analizy badanych genów zostały zaprojektowane przez firmę Applied Biosystems i są one chronione prawem autorskim. Analizę Real-time PCR przeprowadzono z wykorzystaniem urządzenia StepOnePlus™ System (Applied Biosystems, USA), w następujących parametrach:

- jeden cykl w temperaturze 48°C przez 15 min,
- jeden cykl w temperaturze 95°C przez 10 min,
- 40 cykli w temperaturze 95°C przez 15 s, 60°C przez 1 min.

Do analizy zastosowano krzywą standardową, którą stanowiły próby z rozcieńczeniami całkowitego RNA o znanej koncentracji. Uzyskane wyniki zostały znormalizowane w stosunku do poziomu ekspresji genu referencyjnego i przedstawione w jednostkach umownych.

Walidacja wyników analizy RNA-Seq

Powtarzalność wysokoprzepustowej metody RNA-Seq została potwierdzona dla wybranych DEGs za pomocą Real-time PCR z użyciem urządzenia AriaMx Real-time PCR System (Agilent Technology, USA) w następujących parametrach:

- jeden cykl w temperaturze 95°C przez 3 min,

- 40 cykli w temperaturze 95°C przez 15 s, 60°C przez 1 min, 72°C przez 1 min,
- 1 cykl w temperaturze 95°C przez 30 s, 65°C przez 30 s, 95°C przez 30 s.

Sekwencje starterów (Publikacja 1 – Tabela uzupełniająca S5; Publikacja 2 – Tabela uzupełniająca S6) dla wybranych DEGs i genów referencyjnych zaprojektowano przy użyciu oprogramowania Primer Express Software 3 (Applied Biosystems, USA). Mieszanina reakcyjna o końcowej objętości 25 µl zawierała: cDNA (4 ng), 300 µM każdego startera, 12,5 µl Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA) i wodę wolną od RNaz. Każdą reakcję przeprowadzono w dwóch powtórzeniach. Geny *GAPDH* i *ACTB* zostały użyte jako geny referencyjne. Do analizy zastosowano krzywą standardową, którą stanowiły próby z rozcieńczeniami całkowitego RNA o znanej koncentracji. Uzyskane wyniki zostały znormalizowane w stosunku do poziomu ekspresji genu referencyjnego i przedstawione w jednostkach umownych.

ELISA

Koncentrację białek IL-1β, IL-4, IL-6, IL-10 i LIF w pożywkach hodowlanych określono za pomocą komercyjnego zestawu ELISA do oznaczania cytokin (EIAab, Chiny; LIF – Fine Test, Chiny) zgodnie z protokołem producenta. Zakres krzywych wzorcowych dla poszczególnych cytokin przedstawiał się następująco: IL-1β – 7,8-500 pg/mL, IL-6 – 7,8-500 pg/mL, IL-4 – 31,2-2000 pg/mL, IL-10 – 23,44-1500 pg/ml i LIF – 0,156-10 ng/ml. Wartości absorbancji mierzono przy 450 nm przy użyciu czytnika Infinite M200 Pro z oprogramowaniem Tecan i-control (Tecan, Szwajcaria). Wewnątrzseryjny współczynnik zmienności testu ELISA dla poszczególnych cytokin wyniosły: IL-1β – 5,6% i 8,4%, IL-6 – 4,7% i 7,1%, IL-4 – 6,4% i 8,9%, IL-10 – 6,6% i 10,1%, LIF – odpowiednio 8% i 10%.

Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono z użyciem programu Statistica v. 13.0 (StatSoft, USA). Rozkład zmiennych został potwierdzony za pomocą testu Shapiro-Wilka, testem Levene'a sprawdzono wariancje w porównywanych grupach. Następnie, różnice pomiędzy grupami w poszczególnych układach doświadczalnych określono za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) oraz testu post-hoc Dunnetta (Zadanie 3). W przypadku walidacji DEGs z analizy RNA-Seq wykorzystano test t-Studenta (Zadanie 1 i 2). Za istotne statystycznie różnice uznano te, dla których wartość $p \leq 0,05$.

4. Wyniki

Zadanie 1

Szczegółowe wyniki badań oraz ich omówienie zostało przedstawione w Publikacji 1: Mierzejewski i wsp. Transcriptome analysis of porcine endometrium after LPS-induced inflammation: effects of the PPAR-gamma ligands in vitro. Biol Reprod. 2021 doi: 10.1093/biolre/ioaa200.

W wyniku sekwencjonowania RNA-Seq uzyskano łącznie 1 118 471 092 odczytów ze sparowanymi końcami. Po wstępnej obróbce odczyty zostały zmapowane do genomu referencyjnego *Sus scrofa* (Sscrofa 11.1.99) ze średnim wynikiem 94,39% sekwencji unikatowych. Zmapowane odczyty przypisano do sekwencji kodujących (50,6%), intronów (7,2%), regionów niepodlegających translacji (29,7%), regionów międzygenowych (14,3%).

Wpływ LPS na ekspresję genów kodujących białka oraz alternatywne składanie genów w błonie śluzowej macicy świni podczas fazy środkowo-lutealnej cyklu rujowego

Analiza ekspresji genów wykazała, że 222 geny uległy zróżnicowanej ekspresji (DEGs) pod wpływem LPS. Spośród wszystkich DEGs 109 wykazywało wzrost, natomiast 113 obniżenie ekspresji. Analiza ontologii genów (GO) wykazała, że geny te były przypisane do trzech kategorii: procesy biologiczne (104 BP, ang. *biological process*), funkcje molekularne (9 MF, ang. *molecular function*) oraz składniki komórkowe (4 CC, ang. *cellular component*). Najwięcej DEGs zostało przypisanych do procesów takich jak: negatywna regulacja procesów biologicznych (ang. *negative regulation of biological proces*, 76 DEGs), rozwój struktur anatomicznych (ang. *anatomical structure development*, 73 DEGs) oraz odpowiedź komórkowa na substancje chemiczne (ang. *cellular response to chemical stimulus,* 72 DEGs). Ponadto, geny o zróżnicowanej ekspresji były zaangażowane w procesy takie jak m. in.: odpowiedź immunologiczna (ang. *immunological defence*, 34 DEGs), aktywacja leukocytów (ang. *leukocyte activation*, 20 DEGs), regulacja produkcji cytokin (ang. *regulation of cytokine production,* 17 DEGs) czy komórkową odpowiedź na lipopolisacharyd (ang. *cellular response to lipopolysaccharide*, 9 DEGs). Analiza szlaków sygnałowych (KEGG)

wykazała, że 21 DEGs uczestniczyło w 4 ścieżkach. Spośród nich, 9 przypisano do szlaku sygnałowego czynnika martwicy nowotworów (ang. *TNF signaling pathway*) oraz 5 do szlaku związanego z jelitową produkcją immunoglobuliny IgA (ang. *intestinal immune network for IgA production*). *Szczegółowe dane dotyczące DEGs, analizy GO i KEGG dostępne są odpowiednio w uzupełniającej Tabeli 2 i 3 w publikacji 1.*

Analiza alternatywnego składania transkryptów pod wpływem LPS wykazała 78 zdarzeń alternatywnego składania (DASE) obejmujących 61 genów kodujących białka. Wykryte zdarzenia przypisano do odpowiednich kategorii: 1 przypadek A3SS, 2 przypadki A5SS, 37 przypadków AF, 3 przypadki AL, 1 przypadek MXE, 8 przypadków RI oraz 26 przypadków SE. Wykazano, że działanie LPS dotyczyło modyfikacji splicingowych w obrębie np. PTGES (ΔPSI = -0,10; AF), PTGS2 (ΔPSI = -0,28; AF) czy PLAAT3 (ΔPSI = 0,25; AF) Analiza funkcjonalna genów objętych alternatywnym składaniem wykazała, że były one zaangażowane m. in. w szlak sygnałowy metabolizmu kwasu arachidonowego (ang. *arachidonic acid metabolic proces*). *Szczegółowe dane dotyczące DASE w Tabeli uzupełniającej 4 w publikacji 1.*

Wpływ agonistów PPARγ na ekspresję genów kodujących białka oraz alternatywne składanie genów w błonie śluzowej macicy świni podczas procesu zapalnego indukowanego przez LPS podczas fazy środkowo-lutealnej cyklu rujowego

Inkubacja tkanki błony śluzowej macicy z PGJ_2 (naturalny agonista PPARγ) lub pioglitazonem (syntetyczny agonista PPARγ) zwiększyła ekspresję, odpowiednio trzech (*SELE, IL-1β*, *CCL8*) i czterech (*SELE, IL-1β, MUC13, MEOX1*) genów, w porównaniu z grupą kontrolną (Tabela 1, publikacja 1). Analiza GO wykazała, że DEGs pod wpływem PGJ_2 były zaangażowane m. in. w proces chemotaksji granulocytów (ang. *granulocyte chemotaxis*) lub migrację neutrofili (ang. *neutrophil migration*). Ponadto, analiza szlaków sygnałowych (KEGG) wykazała, że geny z zmienionej ekspresji – *SELE* i *IL-1β* – zaangażowane były w ścieżkę sygnałową czynnika martwicy nowotworów (ang. *TNF signaling pathway*). *Szczegółowe dane dotyczące DEGs, analizy GO i KEGG dostępne są w uzupełniającej Tabeli 2 i 3 w publikacji 1.*

Analiza alternatywnego składania transkryptów pod wpływem PGJ_2 wykazała 60 DASE, natomiast pod wpływem pioglitazonu – 52. Wykazano 26 wspólnych DASE dla obu agonistów z wyższym odsetkiem inkluzji. Analiza GO i KEGG nie wykazała przypisania genów ulegających alternatywnemu składaniu pod wpływem agonistów

PPARγ do istotnych procesów. Jednakże, wykazano, różnice np. w zdarzeniu splicingowym w obrębie pierwszego egzonu genu *PTGS2*, który pod wpływem LPS uległ zmniejszeniu (ΔPSI = −0,28; AF), a następnie po inkubacji z pioglitazonem zwiększeniu (ΔPSI = 0,18; AF) (Ryc. 5A, Publikacja 1). *Szczegółowe dane dotyczące DASE w Tabeli uzupełniającej 4 w publikacji 1.*

Wpływ antagonisty PPARγ na ekspresję genów kodujących białka oraz alternatywne składanie genów w błonie śluzowej macicy świni podczas procesu zapalnego indukowanego przez LPS podczas fazy środkowo-lutealnej cyklu rujowego

Analiza ekspresji genów wykazała, że 62 geny uległy zróżnicowanej ekspresji po inkubacji tkanki błony śluzowej macicy z antagonistą PPARγ – T0070907. Spośród wszystkich DEGs, 30 wykazywało wzrost, natomiast 32 obniżenie ekspresji. Analiza funkcjonalna GO wykazała, że 54 DEGs były zaangażowane w 19 procesów biologicznych takich jak m. in.: odpowiedź zapalna (ang. *inflammatory response*), odpowiedź komórkowa na interleukinę-1 (ang. *cellular response to interleukin-1*), migracja komórek (ang. *cell migration*) i chemotaksja granulocytów (ang. *granulocyte chemotaxis*) (Ryc. 4, Publikacja 1). Ponadto, analiza KEGG wykazała, że DEGs były zaangażowane w szlak sygnalizacji TLR (ang. *toll-like receptor signaling pathway*) (Ryc. uzupełniająca S2, Publikacja 1) i infekcję Salmonellą (ang. *salmonella infection*). *Szczegółowe dane dotyczące DEGs, analizy GO i KEGG dostępne są w uzupełniającej Tabeli 2 i 3 w publikacji 1.*

Analiza alternatywnego składania transkryptów pod wpływem T0070907 wykazała 134 DASE obejmujących 106 genów kodujących białka. Wykryte zdarzenia przypisano do odpowiednich kategorii: 4 przypadki A3SS, 4 przypadki A5SS, 39 przypadków AF, 4 przypadki AL, 2 przypadki MX, 19 przypadków RI oraz 62 przypadki SE. Antagonista PPARγ wpływał na proces alternatywnego składania genów uczestniczących m. in. w syntezie prostaglandyn (ang. *prostaglandin biosynthesis process*) np. PTGS2 (ΔPSI = 0,32; AF) lub PTGIS (ΔPSI = 0, 59; AF), procesie steroidogenezy (ang. *steroidogenesis*) – INSR (ΔPSI = 0,21; SE) czy szlaku sygnałowym PPAR (ang. *PPAR signaling pathway*) – ACADM (ΔPSI = 0,48; SE), SCD (ΔPSI = 0,30; SE i ΔPSI = 0,25; A3SS). *Szczegółowe dane dotyczące DASE w Tabeli uzupełniającej 4 w publikacji 1.*

Walidacja uzyskanych wyników

W celu weryfikacji uzyskanych wyników wybrano sześć DEGs (*CCL4, CCL8, IL-1β, OXTR, CSF3*) w grupach poddanych działaniu ligandów PPARγ (agoniści/antagonista vs. LPS) i trzy DEGs (*CCL8, ACKR1, CSF3)* w grupie traktowanej LPS vs. kontrola. Profile ekspresji Real-time PCR były zgodne z wynikami uzyskanymi w wyniku sekwencjonowania RNA-Seq (Ryc. uzupełniające S3 i S4, Publikacja 1).

Zadanie 2

Szczegółowe wyniki badań oraz ich omówienie zostało przedstawione w Publikacji 2: Mierzejewski i wsp. PPARγ regulates the expression of genes involved in the DNA damage response in an inflamed endometrium. Sci Rep. 2022 doi: 10.1038/s41598-022-07986-8.

W wyniku sekwencjonowania RNA-Seq uzyskano łącznie 1 114 235 534 odczytów ze sparowanymi końcami. Po wstępnej obróbce odczyty zostały zmapowane do genomu referencyjnego *Sus scrofa* (Sscrofa 11.1.99) ze średnim wynikiem 93,06% sekwencji unikatowych. Zmapowane odczyty przypisano do sekwencji kodujących (53,64%), intronów (6,58%), regionów niepodlegających translacji (24,67%), regionów międzygenowych (15,11%).

Wpływ LPS na ekspresję genów kodujących białka, długich niekodujących RNA oraz alternatywne składanie genów w błonie śluzowej macicy świni podczas fazy pęcherzykowej cyklu rujowego

Analiza ekspresji genów wykazała, że 169 genów kodujących białka uległo zróżnicowanej ekspresji pod wpływem LPS. Spośród wszystkich DEGs 115 wykazywało wzrost, natomiast 54 obniżenie ekspresji. Analiza GO wykazała, że geny te były przypisane do 36 procesów biologicznych, 14 funkcji molekularnych oraz 4 składników komórkowych. Geny o zróżnicowanej ekspresji były głównie zaangażowane w procesy związane z odpowiedzią obronną (ang. *defense response*, 45 DEGs), odpowiedzią na cytokiny (ang. *response to cytokine*,12 DEGs) i chemokiny (ang. *response to chemikine,* 5 DEGs) czy regulację chemotaksji leukocytów (ang. *leukocyte migration*; 7 DEGs). Analiza szlaków sygnałowych (KEGG) wykazała, że 18 DEGs przypisanych zostało do 4 ścieżek sygnałowych. Spośród nich 9 przypisano do szlaku chemokin (ang.

chemokine signaling pathway) oraz 14 do ścieżki sygnałowej interakcji cytokiny z receptorem (ang. *cytokine-cytokine receptor interaction*). Ponadto, wykazano 24 lncRNAs (DElncRNA) o zmienionym pod wpływem LPS profilu ekspresji. Porównując profile ekspresji wykazano, że jedynie ENSSSCG00000041052 (gen kodujący białko) wykazuje korelację z trzema lncRNA (niedostateczna ekspresja, $r^2 > 0,9$) po inkubacji skrawków błony śluzowej macicy z LPS (Ryc. 2A, publikacja 2). *Szczegółowe dane dotyczące DEGs, analizy GO i KEGG oraz DElncRNA dostępne są w uzupełniającej Tabeli 3, 4 i 5 w publikacji 2.*

Analiza alternatywnego składania transkryptów pod wpływem LPS wykazała 130 zdarzeń alternatywnego składania (DASE) obejmujących 80 genów kodujących białka. Wykryte zdarzenia przypisano do odpowiednich kategorii: 7 przypadków A3SS, 8 – A5SS, 56 – AFE, 2 – ALE, 5 – MXE, 10 – RI oraz 42 – SE. Geny, w obrębie których zidentyfikowano zdarzenia alternatywnego składania należą m. in. do grupy markerów uszkodzeń DNA – PTP4A3 ($\Delta PSI = -0,12$; SE) i DUSP5 ($\Delta PSI = -0,14$; RI) oraz markerów stresu oksydacyjnego PEPD ($\Delta PSI = -0,5$: AF), PDP2 ($\Delta PSI = -0,42$: AF) i BCAR3 ($\Delta PSI = 0,20$; AF). *Szczegółowe dane dotyczące DASE w Tabeli uzupełniającej 6 w publikacji 2.*

Wpływ agonistów PPARγ na ekspresję genów kodujących białka, długich niekodujących RNA oraz alternatywne składanie genów w błonie śluzowej macicy świni podczas procesu zapalnego indukowanego przez LPS podczas fazy pęcherzykowej cyklu rujowego

Inkubacja tkanki błony śluzowej macicy z PGJ_2 lub pioglitazonem zwiększyła ekspresję, odpowiednio 181 i 476 DEGs oraz obniżyła 19 i 126 DEGs. Analiza GO wykazała, że geny te były przypisane do 57 procesów biologicznych, 4 funkcji molekularnych i 1 składnik komórkowyy po inkubacji skrawków błony śluzowej z PGJ_2 oraz 67 procesów biologicznych, 3 funkcji molekularnych i 2 składników komórkowych po inkubacji z pioglitazonem (Ryc. 4 Publikacja 2). Geny o zróżnicowanej ekspresji pod wpływem PGJ_2 były zaangażowane w procesy takie jak odpowiedź obronna (ang. *defense response,* 27 DEGs), produkcja IL-1β (ang. *interleukin-1 beta production*, 7 DEGs) czy szlak sygnałowy IL-17 (ang. *IL-17 signaling pathway*, 8 DEGs). Z kolei, inkubacja skrawków błony śluzowej macicy z pioglitazonem wpłynęła na zmianę ekspresji genów regulujących m. in.: aktywność cytokin (ang. *cytokine activity*, 11 DEGs),

zaangażowanych w proces apoptozy (ang. *apoptotic process,* 70 DEGs) czy szlak sygnałowy p53 (ang. *p53 signaling pathway,* 10 DEGs). Ponadto, wykazano 35 DElncRNAs o zmienionym profilu ekspresji pod wpływem PGJ_2 oraz 109 po inkubacji tkanki z pioglitazonem. Porównując profile ekspresji wykazano, że 22 DElncRNA są skorelowane dodatnio z DEGs w grupie traktowanej PGJ_2 oraz 69 DElncRNA w grupie traktowanej pioglitazonem ($r^2 > 0.9$) (Ryc. 2 B i C, publikacja 2). Tylko w jednym (po inkubacji skrawków z PGJ_2) przypadku ENSSSCG00000051243 (gen kodujący białko) był ujemnie skorelowany ($r^2 < -0,9$) z lncRNA-ENSSSCG00000050854. *Szczegółowe dane dotyczące DEGs, analizy GO i KEGG oraz DElncRNA dostępne są w uzupełniającej Tabeli 3, 4 i 5 w publikacji 2.*

Analiza alternatywnego składania transkryptów pod wpływem PGJ_2 wykazała 172 DASEs obejmujących 114 genów kodujących białka, natomiast pod wpływem pioglitazonu – 211 obejmujących 141 genów kodujących białka. Wykryte zdarzenia przypisano do odpowiednich kategorii: 10 przypadków A3SS, 8 – A5SS, 46 – AFE, 7 – ALE, 6 – MXE, 22 – RI i 73 – SE pod wpływem PGJ_2 oraz 19 – A3SS, 8 – A5SS, 58 – AFE, 10 – ALE, 8 – MXE, 30 – RI i 78 – SE pod wpływem pioglitazonu. Geny, w obrębie których zidentyfikowano zdarzenia alternatywnego składania należą m. in. do grupy genów związanych z regulacją stresu oksydacyjnego – PRDX2 ($\Delta PSI = -0,75$; RI) i SOD2 ($\Delta PSI = 0,24$; MX) pod wpływem pioglitazonu (Ryc. 5, publikacja 2) oraz CLDND1 ($\Delta PSI = -0,36$; SE) i PIGT ($\Delta PSI = 0,42$; SE) po traktowaniu skrawków błony śluzowej macicy PGJ_2. *Szczegółowe dane dotyczące DASE w Tabeli uzupełniającej 6 w publikacji 2.*

Wpływ antagonisty PPARγ na ekspresję genów kodujących białka, długich niekodujących RNA oraz alternatywne składanie genów w błonie śluzowej macicy świni podczas procesu zapalnego indukowanego przez LPS podczas fazy pęcherzykowej cyklu rujowego

Analiza ekspresji genów wykazała, że 557 geny uległy zróżnicowanej ekspresji po inkubacji tkanki błony śluzowej macicy z indukowanym stanem zapalnym z antagonistą PPARγ – T0070907. Spośród wszystkich DEGs, 452 wykazywało wzrost, natomiast 105 obniżenie ekspresji. Analiza funkcjonalna GO wykazała że, geny te były przypisane do 54 procesów biologicznych, 6 składników komórkowych oraz 6 ścieżek sygnałowych w bazie danych KEGG. Geny o zróżnicowanej ekspresji zaangażowane

były m. in. w regulację apoptozy (ang. *apoptotic process,* 58 DEGs) i śmierci komórkowej (ang. *cell death*, 59 DEGs). Jedenaście DEGs o zwiększonej ekspresji było zaangażowanych w szlak sygnałowy czynnika martwicy nowotworów (ang. *TNF signaling pathway*). Ponadto wykazano 115 DElncRNAs o zmienionym profilu ekspresji pod wpływem T0070907. W tej grupie, 81 DElncRNAs było dodatnio skorelowanych z 220 DEGs (Ryc. 2D, publikacja 2). *Szczegółowe dane dotyczące DEGs, analizy GO i KEGG oraz DElncRNA dostępne są w uzupełniającej Tabeli 3, 4 i 5 w publikacji 2.*

Analiza alternatywnego składania transkryptów pod wpływem T0070907 wykazała 200 DASEs. Wykryte zdarzenia przypisano do odpowiednich kategorii: 13 przypadków A3SS, 12 – A5SS, 50 – AFE, 16 – ALE, 4 – MXE, 35 – RI i 70 – SE. Geny, w obrębie których zidentyfikowano zdarzenia alternatywnego składania należą m. in. do grupy genów związanych z regulacją procesu apoptozy – *BCL9* (ΔPSI = - 0,22, AS; ΔPSI = - 0,22, A3) i *PIK3R1* (ΔPSI = 0,02; SE) oraz regulacją uszkodzeń DNA i stresu oksydacyjnego – *HSBP1L1* (ΔPSI = − 0,16; AFE), *MED25* (ΔPSI = -0,11; AFE) i SEC24B (ΔPSI = − 0,75; AFE). *Szczegółowe dane dotyczące DASE w Tabeli uzupełniającej 6 w publikacji 2.*

Walidacja uzyskanych wyników

W celu weryfikacji uzyskanych wyników wybrano cztery DEGs (*CDK1*, *CCNA1*, *CCNG1*, *TNFAIP3*) w grupach poddanych działaniu ligandów PPARγ (agoniści/antagonista vs. LPS) i dwa DEGs (*CCL5, CCL19*) w grupie traktowanej LPS vs. kontrola. Profile ekspresji Real-time PCR były zgodne z wynikami uzyskanymi w wyniku sekwencjonowania RNA-Seq (Ryc. uzupełniające S1, Publikacja 2).

Zadanie 3

Szczegółowe wyniki oraz ich omówienie zostało przedstawione w Publikacji 3: Mierzejewski i wsp. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands regulate the expression of inflammatory mediators in porcine endometrium during LPS-induced inflammation. Theriogenology. 2022 doi: 10.1016/j.theriogenology.2022.04.030.

Wpływ agonistów PPARγ na ekspresję genów i białek cytokin pro- i przeciwzapalnych w błonie śluzowej macicy świni podczas trwającego procesu zapalnego indukowanego przez LPS podczas fazy środkowo-lutealnej lub pęcherzykowej cyklu rujowego

Wykazano, że PGJ_2 oraz pioglitazon (stosowany w koncentracji 1 i 10 μM) stymulowały ekspresję ***IL-1β*** w błonie śluzowej macicy świni z indukowanym przez LPS stanem zapalnym zarówno podczas fazy środkowo-lutealnej jak i pęcherzykowej cyklu rujowego. Nie odnotowano natomiast wpływu ligandów na koncentrację białka IL-1β w pożywce hodowlanej. Stwierdzono, że pioglitazon (stosowany w koncentracji 1 i 10 μM) obniżył ekspresję ***IL-6*** w błonie śluzowej macicy świni z indukowanym przez LPS stanem zapalnym tylko podczas fazy środkowo-lutealnej. Nie odnotowano wpływu ligandów na koncentrację białka IL-6 w pożywce hodowlanej w obu badanych okresach. Wykazano, że PGJ_2 oraz pioglitazon (stosowany w koncentracji 1 i 10 μM) hamowały ekspresję ***TLR4*** w błonie śluzowej macicy świni z indukowanym przez LPS stanem zapalnym tylko podczas fazy pęcherzykowej cyklu rujowego. Hamujący wpływ PGJ_2 oraz pioglitazonu (stosowanego w koncentracji 1 i 10 μM) na ekspresję ***NF-κB*** w błonie śluzowej macicy świni z indukowanym przez LPS stanem zapalnym zanotowano tylko podczas fazy środkowo-lutealnej cyklu rujowego. Stwierdzono, że PGJ_2 oraz pioglitazon (stosowany w koncentracji 1 μM) obniżył ekspresję ***IL-10*** w błonie śluzowej macicy świni z indukowanym przez LPS stanem zapalnym tylko podczas fazy pęcherzykowej cyklu rujowego. Nie odnotowano wpływu ligandów na koncentrację białka IL-10 w pożywce hodowlanej w obu badanych okresach. Nie stwierdzono żadnego wpływu badanych ligandów na ekspresję i koncentrację białka LIF oraz IL-4 w obu fazach cyklu rujowego.

Wpływ agonistów PPARγ na ekspresję genów i białek cytokin pro- i przeciwzapalnych w błonie śluzowej macicy świni podczas rozwijającego się procesu zapalnego indukowanego przez LPS podczas fazy środkowo-lutealnej lub pęcherzykowej cyklu rujowego

Wykazano, że PGJ_2 oraz pioglitazon (stosowany w koncentracji 1 lub 10 μM) podane jednocześnie z LPS stymulowały ekspresję ***IL-1β*** w błonie śluzowej macicy świni podczas fazy środkowo-lutealnej cyklu rujowego. Nie odnotowano natomiast wpływu

ligandów na ekspresję *IL-1β* w fazie pęcherzykowej cyklu rujowego oraz koncentrację białka IL-1β w pożywce hodowlanej w obu badanych okresach. Stwierdzono, że PGJ_2 oraz pioglitazon (stosowany w koncentracji 1 lub 10 μM) podane jednocześnie z LPS obniżyły ekspresję ***IL-6*** w błonie śluzowej macicy świni tylko podczas fazy pęcherzykowej cyklu rujowego. Nie odnotowano wpływu ligandów na koncentrację białka IL-6 w pożywce hodowlanej w obu badanych okresach. Wykazano, że PGJ_2 oraz pioglitazon (stosowany w koncentracji 1 lub 10 μM) podane jednocześnie z LPS hamowały ekspresję ***TLR4*** w błonie śluzowej macicy świni zarówno podczas fazy środkowo-lutealnej jak i pęcherzykowej cyklu rujowego. Hamujący wpływ PGJ_2 oraz pioglitazonu (stosowanego w koncentracji 1 lub 10 μM) podanych jednocześnie z LPS na ekspresję ***NF-κB*** w błonie śluzowej macicy świni zanotowano podczas fazy środkowo-lutealnej cyklu rujowego, natomiast podczas fazy pęcherzykowej obniżenie ekspresji stwierdzono tylko pod wpływem pioglitazonu w koncentracji 1 μM. Nie stwierdzono wpływu badanych ligandów na ekspresję i koncentrację białka LIF, IL-10 oraz IL-4 w obu fazach cyklu rujowego.

5. Podsumowanie i wnioski

Wyniki uzyskane w wyniku przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy doktorskiej badań umożliwiły weryfikację postawionych hipotez oraz dostarczyły po raz pierwszy szerokiego opisu wpływu ligandów PPARγ na odpowiedź immunologiczną w obrębie błony śluzowej macicy świni podczas indukowanego *in vitro* stanu zapalnego. Zastosowanie wysokoprzepustowej metody sekwencjonowania RNA-Seq pozwoliło na określenie kompleksowych zmian transkyptomicznych w endometrium pod wpływem LPS oraz badanych ligandów podczas fazy środkowo-lutealnej oraz pęcherzykowej cyklu rujowego. Analizy bioinformatyczne natomiast umożliwiły wytypowanie procesów oraz ścieżek sygnałowych biorących udział w regulacji stanu zapalnego i jego konsekwencji. Badania wykazały, że 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 (*GADD45β*, *CDK1*, *CCNA1*, *CCNG1*, *ATM*). Badania z użyciem metod Real-time PCR oraz ELISA wykazały, że agoniści PPARγ zmniejszają ekspresję mediatorów prozapalnych (*NF-κB, TLR4, IL-6*) oraz zwiększają ekspresję mediatorów przeciwzapalnych (*IL-10*) w endometrium podczas stanu zapalnego. Ponadto, analiza RNA-Seq ujawniła, 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 602 genów pod wpływem pioglitazonu i 200 genów pod wpływem PGJ_2. Z użyciem metody Real-time PCR wykazano również, że ekspresja mediatorów prozapalnych (*IL-1β*, *IL-6*; *NF-κB*, *TLR4*) w większej mierze zależy od fazy cyklu rujowego (statusu hormonalnego) niż od układu doświadczalnego (rozwijający się i trwający stan zapalny; *LIF* i *IL-10*). 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.

Na podstawie uzyskanych wyników sformułowano następujące wnioski:

1. Ligandy PPARγ modulują profil transkryptomiczny błony śluzowej macicy świni z indukowanym stanem zapalnym. Regulują one m. in. ekspresję genów zaangażowanych w odpowiedź immunologiczną oraz procesy wynikające ze szkodliwego działania LPS takie jak uszkodzenia DNA i stres oksydacyjny.
2. Wpływ ligandów PPARγ na ekspresję genów w błonie śluzowej macicy świni z indukowanym stanem zapalnym jest zależny od fazy cyklu rujowego (statusu hormonalnego).
3. Agoniści PPARγ (pioglitazon i PGJ_2) wykazują działanie przeciwzapalne w błonie śluzowej macicy świni zarówno podczas trwającego jak i rozwijającego się stanu zapalnego w warunkach *in vitro*.

Praca finansowana z projektu badawczego Narodowego Centrum Nauki
OPUS 9 Nr 2015/17/B/NZ9/03596

6. Bibliografia

Abdalla, H. B., Napimoga, M. H., Lopes, A. H., de Macedo Maganin, A. G., Cunha, T. M., Van Dyke, T. E., & Clemente Napimoga, J. T. (2020). Activation of PPAR-γ induces macrophage polarization and reduces neutrophil migration mediated by heme oxygenase 1. *International Immunopharmacology*, *84*, 106565. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106565

Abdellatif, K. R. A., Fadaly, W. A. A., Kamel, G. M., Elshaier, Y. A. M. M., & El-Magd, M. A. (2019). Design, synthesis, modeling studies and biological evaluation of thiazolidine derivatives containing pyrazole core as potential anti-diabetic PPAR-γ agonists and anti-inflammatory COX-2 selective inhibitors. *Bioorganic Chemistry*, *82*, 86–99. https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.09.034

Akins, E. L., & Morrissette, M. C. (1968). Gross ovarian changes during estrous cycle of swine. *American Journal of Veterinary Research*, *29*(10), 1953–1957. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5692889

Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., Davis, A. P., Dolinski, K., Dwight, S. S., Eppig, J. T., Harris, M. A., Hill, D. P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J. C., Richardson, J. E., Ringwald, M., Rubin, G. M., & Sherlock, G. (2000). Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genetics*, *25*(1), 25–29. https://doi.org/10.1038/75556

Bogacka, I., & Bogacki, M. (2011). The quantitative expression of peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) genes in porcine endometrium through the estrous cycle and early pregnancy. *Journal of Physiology and Pharmacology : An Official Journal of the Polish Physiological Society*, *62*(5), 559–565.

Bouet, P.-E., El Hachem, H., Monceau, E., Gariépy, G., Kadoch, I.-J., & Sylvestre, C. (2016). Chronic endometritis in women with recurrent pregnancy loss and recurrent implantation failure: prevalence and role of office hysteroscopy and immunohistochemistry in diagnosis. *Fertility and Sterility*, *105*(1), 106–110. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.09.025

Chan, L. S. A., & Wells, R. A. (2009). Cross-Talk between PPARs and the Partners of RXR: A Molecular Perspective. *PPAR Research*, *2009*, 1–9. https://doi.org/10.1155/2009/925309

Cheng, Tan, Low, Marvalim, Lee, & Tan. (2019). Exploration and Development of PPAR Modulators in Health and Disease: An Update of Clinical Evidence. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(20), 5055. https://doi.org/10.3390/ijms20205055

Ciavarella, C., Motta, I., Valente, S., & Pasquinelli, G. (2020). Pharmacological (or Synthetic) and Nutritional Agonists of PPAR-γ as Candidates for Cytokine Storm Modulation in COVID-19 Disease. *Molecules*, *25*(9), 2076. https://doi.org/10.3390/molecules25092076

Ciesielska, A., Matyjek, M., & Kwiatkowska, K. (2021). TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *78*(4), 1233–1261. https://doi.org/10.1007/s00018-020-03656-y

Cui, L., Wang, H., Lin, J., Wang, Y., Dong, J., Li, J., & Li, J. (2020). Progesterone inhibits inflammatory response in E.coli- or LPS-Stimulated bovine endometrial epithelial cells by NF-κB and MAPK pathways. *Developmental & Comparative Immunology*, *105*, 103568. https://doi.org/10.1016/j.dci.2019.103568

Dawson H. (2012). *The Minipig In Biomedical Research* (D. C. A. H. K. Mc Anultiy PA, Ed.; 1st Edition). CRC Press.

DeFronzo, R. A., Inzucchi, S., Abdul-Ghani, M., & Nissen, S. E. (2019). Pioglitazone: The forgotten, cost-effective cardioprotective drug for type 2 diabetes. *Diabetes and Vascular Disease Research*, *16*(2), 133–143. https://doi.org/10.1177/1479164118825376

Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., & Gingeras, T. R. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, *29*(1), 15–21. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635

Dormandy, J. A., Charbonnel, B., Eckland, D. J., Erdmann, E., Massi-Benedetti, M., Moules, I. K., Skene, A. M., Tan, M. H., Lefèbvre, P. J., Murray, G. D., Standl, E., Wilcox, R. G., Wilhelmsen, L., Betteridge, J., Birkeland, K., Golay, A., Heine, R. J., Korányi, L., Laakso, M., … Tatoň, J. (2005). Secondary prevention of macrovascular events in patients with type 2 diabetes in the PROactive Study (PROspective pioglitAzone Clinical Trial In macroVascular Events): a randomised controlled trial. *The Lancet*, *366*(9493), 1279–1289. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67528-9

Drizi, A., Djokovic, D., Laganà, A. S., & van Herendael, B. (2020). Impaired inflammatory state of the endometrium: a multifaceted approach to endometrial

inflammation. Current insights and future directions. *Menopausal Review*, *19*(2), 90–100. https://doi.org/10.5114/pm.2020.97863

Fazleabas, A. T., & Strakova, Z. (2002). Endometrial function: cell specific changes in the uterine environment. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *186*(2), 143–147. https://doi.org/10.1016/S0303-7207(01)00655-4

Garrido-Martín, D., Palumbo, E., Guigó, R., & Breschi, A. (2018). ggsashimi: Sashimi plot revised for browser- and annotation-independent splicing visualization. *PLOS Computational Biology*, *14*(8), e1006360. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006360

Grahofer, A., Björkman, S., & Peltoniemi, O. (2020). Diagnosis of endometritis and cystitis in sows: use of biomarkers. *Journal of Animal Science*, *98*(Supplement_1), S107–S116. https://doi.org/10.1093/jas/skaa144

Hallenborg, P., Petersen, R. K., Kouskoumvekaki, I., Newman, J. W., Madsen, L., & Kristiansen, K. (2016). The elusive endogenous adipogenic PPARγ agonists: Lining up the suspects. *Progress in Lipid Research*, *61*, 149–162. https://doi.org/10.1016/j.plipres.2015.11.002

Hamblin, M., Chang, L., Fan, Y., Zhang, J., & Chen, Y. E. (2009). PPARs and the Cardiovascular System. *Antioxidants & Redox Signaling*, *11*(6), 1415–1452. https://doi.org/10.1089/ars.2008.2280

Herath, S., Fischer, D. P., Werling, D., Williams, E. J., Lilly, S. T., Dobson, H., Bryant, C. E., & Sheldon, I. M. (2006). Expression and Function of Toll-Like Receptor 4 in the Endometrial Cells of the Uterus. *Endocrinology*, *147*(1), 562–570. https://doi.org/10.1210/en.2005-1113

Hickey, D. K., Patel, M. V., Fahey, J. V., & Wira, C. R. (2011). Innate and adaptive immunity at mucosal surfaces of the female reproductive tract: stratification and integration of immune protection against the transmission of sexually transmitted infections. *Journal of Reproductive Immunology*, *88*(2), 185–194. https://doi.org/10.1016/j.jri.2011.01.005

Issemann, I., & Green, S. (1990). Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*, *347*(6294), 645–650. https://doi.org/10.1038/347645a0

Kanehisa, M., Furumichi, M., Tanabe, M., Sato, Y., & Morishima, K. (2017). KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Research*, *45*(D1), D353–D361. https://doi.org/10.1093/nar/gkw1092

Kang, Y.-J., Yang, D.-C., Kong, L., Hou, M., Meng, Y.-Q., Wei, L., & Gao, G. (2017). CPC2: a fast and accurate coding potential calculator based on sequence intrinsic features. *Nucleic Acids Research*, *45*(W1), W12–W16. https://doi.org/10.1093/nar/gkx428

Kernan, W. N., Viscoli, C. M., Furie, K. L., Young, L. H., Inzucchi, S. E., Gorman, M., Guarino, P. D., Lovejoy, A. M., Peduzzi, P. N., Conwit, R., Brass, L. M., Schwartz, G. G., Adams, H. P., Berger, L., Carolei, A., Clark, W., Coull, B., Ford, G. A., Kleindorfer, D., … Winder, T. R. (2016). Pioglitazone after Ischemic Stroke or Transient Ischemic Attack. *New England Journal of Medicine*, *374*(14), 1321–1331. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1506930

Kitaya, K., & Yasuo, T. (2010). Aberrant expression of selectin E, CXCL1, and CXCL13 in chronic endometritis. *Modern Pathology*, *23*(8), 1136–1146. https://doi.org/10.1038/modpathol.2010.98

Kunicka, Z., Kurzynska, A., Szydlowska, A., Mierzejewski, K., & Bogacka, I. (2019). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands affect NF-kB and cytokine synthesis in the porcine endometrium-An in vitro study. *American Journal of Reproductive Immunology*, *81*(1), e13053. https://doi.org/10.1111/aji.13053

Kuroda, K., Ikemoto, Y., Horikawa, T., Moriyama, A., Ojiro, Y., Takamizawa, S., Uchida, T., Nojiri, S., Nakagawa, K., & Sugiyama, R. (2021). Novel approaches to the management of recurrent pregnancy loss: The OPTIMUM (OPtimization of Thyroid function, Thrombophilia, Immunity, and Uterine Milieu) treatment strategy. *Reproductive Medicine and Biology*, *20*(4), 524–536. https://doi.org/10.1002/rmb2.12412

Li, A., Zhang, J., & Zhou, Z. (2014). PLEK: a tool for predicting long non-coding RNAs and messenger RNAs based on an improved k-mer scheme. *BMC Bioinformatics*, *15*(1), 311. https://doi.org/10.1186/1471-2105-15-311

Li, J., Guo, C., & Wu, J. (2019). 15-Deoxy-Δ- ^{12,14} -Prostaglandin J2 (15d-PGJ2), an Endogenous Ligand of PPAR- <math id="M1"> <mrow> <mi>γ</mi> </mrow> </math> : Function and Mechanism. *PPAR Research*, *2019*, 1–10. https://doi.org/10.1155/2019/7242030

Lincoff, A. M., Wolski, K., Nicholls, S. J., & Nissen, S. E. (2007). Pioglitazone and Risk of Cardiovascular Events in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus. *JAMA*, *298*(10), 1180. https://doi.org/10.1001/jama.298.10.1180

Lorenzen, E., Follmann, F., Jungersen, G., & Agerholm, J. S. (2015). A review of the human vs. porcine female genital tract and associated immune system in the perspective of using minipigs as a model of human genital Chlamydia infection. *Veterinary Research*, *46*(1), 116. https://doi.org/10.1186/s13567-015-0241-9

Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, *15*(12), 550. https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8

Mair, K. H., Sedlak, C., Käser, T., Pasternak, A., Levast, B., Gerner, W., Saalmüller, A., Summerfield, A., Gerdts, V., Wilson, H. L., & Meurens, F. (2014). The porcine innate immune system: An update. *Developmental & Comparative Immunology*, *45*(2), 321–343. https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.03.022

Martin, H. (2009). Role of PPAR-gamma in inflammation. Prospects for therapeutic intervention by food components. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *669*(1–2), 1–7. https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2009.06.009

McQueen, D. B., Perfetto, C. O., Hazard, F. K., & Lathi, R. B. (2015). Pregnancy outcomes in women with chronic endometritis and recurrent pregnancy loss. *Fertility and Sterility*, *104*(4), 927–931. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.06.044

Mirza, A. Z., Althagafi, I. I., & Shamshad, H. (2019). Role of PPAR receptor in different diseases and their ligands: Physiological importance and clinical implications. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *166*, 502–513. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.01.067

Montaigne, D., Butruille, L., & Staels, B. (2021). PPAR control of metabolism and cardiovascular functions. *Nature Reviews Cardiology*, *18*(12), 809–823. https://doi.org/10.1038/s41569-021-00569-6

Morimune, A., Kimura, F., Nakamura, A., Kitazawa, J., Takashima, A., Amano, T., Kaku, S., Moritani, S., Kushima, R., & Murakami, T. (2021). The effects of chronic endometritis on the pregnancy outcomes. *American Journal of Reproductive Immunology*, *85*(3). https://doi.org/10.1111/aji.13357

Pálmai-Pallag, T., & Bachrati, C. Z. (2014). Inflammation-induced DNA damage and damage-induced inflammation: a vicious cycle. *Microbes and Infection*, *16*(10), 822–832. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2014.10.001

Patro, R., Duggal, G., Love, M. I., Irizarry, R. A., & Kingsford, C. (2017). Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nature Methods*, *14*(4), 417–419. https://doi.org/10.1038/nmeth.4197

Paukszto, L., Mikolajczyk, A., Szeszko, K., Smolinska, N., Jastrzebski, J. P., & Kaminski, T. (2019). Transcription analysis of the response of the porcine adrenal cortex to a single subclinical dose of lipopolysaccharide from Salmonella Enteritidis. *International Journal of Biological Macromolecules*, *141*, 1228–1245. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.067

Pertea, M., Pertea, G. M., Antonescu, C. M., Chang, T.-C., Mendell, J. T., & Salzberg, S. L. (2015). StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. *Nature Biotechnology*, *33*(3), 290–295. https://doi.org/10.1038/nbt.3122

Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, *26*(1), 139–140. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616

Schmid-Schönbein, G. W. (2006). ANALYSIS OF INFLAMMATION. *Annual Review of Biomedical Engineering*, *8*(1), 93–151. https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.8.061505.095708

Sertznig, P., Seifert, M., Tilgen, W., & Reichrath, J. (2007). Present concepts and future outlook: Function of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) for pathogenesis, progression, and therapy of cancer. *Journal of Cellular Physiology*, *212*(1), 1–12. https://doi.org/10.1002/jcp.20998

Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., & Ideker, T. (2003). Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Research*, *13*(11), 2498–2504. https://doi.org/10.1101/gr.1239303

Sharma, I., Dhawan, V., Saha, S. C., & Dhaliwal, L. K. (2011). In vitro effects of peroxisome proliferator–activated receptor-γ ligands on gene expression in lipopolysaccharide-induced endometrial and endometriotic stromal cells. *Fertility and Sterility*, *95*(2), 829-831.e5. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.09.008

Socha, B. M., Łada, P., Szczepańska, A. A., Łupicka, M., & Korzekwa, A. J. (2018). The influence of experimentally induced endometritis on the PPAR expression profile in the bovine endometrium. *Theriogenology*, *122*, 74–83. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.09.013

Song, D., Feng, X., Zhang, Q., Xia, E., Xiao, Y., Xie, W., & Li, T. C. (2018). Prevalence and confounders of chronic endometritis in premenopausal women with abnormal bleeding or reproductive failure. *Reproductive BioMedicine Online*, *36*(1), 78–83. https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2017.09.008

Tilekar, K., Shelke, O., Upadhyay, N., Lavecchia, A., & Ramaa, C. S. (2022). Current status and future prospects of molecular hybrids with thiazolidinedione (TZD) scaffold in anticancer drug discovery. *Journal of Molecular Structure*, *1250*, 131767. https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.131767

Vallée, A., & Lecarpentier, Y. (2018). Crosstalk Between Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma and the Canonical WNT/β-Catenin Pathway in Chronic Inflammation and Oxidative Stress During Carcinogenesis. *Frontiers in Immunology*, *9*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00745

Walter, W., Sánchez-Cabo, F., & Ricote, M. (2015). GOplot: an R package for visually combining expression data with functional analysis. *Bioinformatics*, *31*(17), 2912–2914. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv300

Wickham, H. (2009). Scales, axes and legends. In *ggplot2* (pp. 91–113). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-0-387-98141-3_6

Wucher, V., Legeai, F., Hédan, B., Rizk, G., Lagoutte, L., Leeb, T., Jagannathan, V., Cadieu, E., David, A., Lohi, H., Cirera, S., Fredholm, M., Botherel, N., Leegwater, P. A. J., Le Béguec, C., Fieten, H., Johnson, J., Alföldi, J., André, C., … Derrien, T. (2017). FEELnc: a tool for long non-coding RNA annotation and its application to the dog transcriptome. *Nucleic Acids Research*, gkw1306. https://doi.org/10.1093/nar/gkw1306

7. Kopie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

8. Oświadczenia współautorów

9. Krótka charakterystyka dorobku naukowego

Studia ukończyłem na kierunku *Biotechnologia farmaceutyczna* na Wydziale Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko Mazurskiego w Olsztynie. Pracę magisterską pt. „*Receptory aktywowane przez proliferatory peroksysomów gamma w regulacji syntezy cytokin prozapalnych (IL-1β i IL-8) podczas fazy pęcherzykowej cyklu rujowego w błonie śluzowej macicy świni (Sus scrofa domestica L.) stymulowanej endotoksyną bakteryjną*" obroniłem z wyróżnieniem w lutym 2019 roku (jej promotorem była prof. dr hab. inż. Iwona Bogacka). W październiku 2019 r. rozpocząłem kształcenie w Szkole Doktorskiej, podczas którego pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Iwony Bogackiej oraz dr Aleksandy Kurzyńskiej realizowałem badania do pracy doktorskiej.

Mój dorobek naukowy obejmuje łącznie 9 oryginalnych artykułów w czasopismach naukowych (łączny IF równy 35,525), w tym 6 artykułów, w których jestem pierwszym autorem oraz 3 artykuły, w których jestem współautorem:

Mierzejewski K, Paukszto Ł, Kurzyńska A, Kunicka Z, Jastrzębski JP, Bogacka I. *Transcriptome analysis of porcine endometrium after LPS-induced inflammation: effects of the PPAR-gamma ligands in vitro*. Biol Reprod. 2021. doi: 10.1093/biolre/ioaa200.

Mierzejewski K, Paukszto Ł, Kurzyńska A, Kunicka Z, Jastrzębski JP, Makowczenko KG, Golubska M, Bogacka I. *PPARγ regulates the expression of genes involved in the DNA damage response in an inflamed endometrium*. Sci Rep. 2022 doi: 10.1038/s41598-022-07986-8.

Mierzejewski K, Kurzyńska A, Kunicka Z, Klepacka A, Golubska M, Bogacka I. *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands regulate the expression of inflammatory mediators in porcine endometrium during LPS-induced inflammation*. Theriogenology. 2022 doi: 10.1016/j.theriogenology. 2022.04.030.

Mierzejewski K, Stryiński R, Łopieńska-Biernat E, Mateos J, Bogacka I, Carrera M. *A Complex Proteomic Response of the Parasitic Nematode Anisakis simplex s.s. to Escherichia coli Lipopolysaccharide.* Mol Cell Proteomics. 2021 doi: 10.1016/j.mcpro.2021.100166.

Mierzejewski K, Kurzyńska A, Gerwel Z, Golubska M, Stryiński R, Bogacka I. *PPARβ/δ Ligands Regulate Oxidative Status and Inflammatory Response in Inflamed Corpus Luteum-An In Vitro Study.* Int J Mol Sci. 2023 doi: 10.3390/ijms24054993.

Mierzejewski K, Gerwel Z, Kurzyńska A, Golubska M, Bogacka I. *In vitro effects of PPAR gamma ligands on gene expression in corpus luteum explants in non-pregnant pigs*

– *Transcriptome analysis*. Theriogenology. 2023 doi:10.1016/j.theriogenology. 2023.03.003.

Kurzyńska A, Kunicka Z, **Mierzejewski K**, Golubska M, Bogacka I. *PPARγ ligands modulate the immune response mediators in the pig myometrium - An in vitro study*. Anim Reprod Sci. 2021 doi: 10.1016/j.anireprosci.2021.106866.

Kunicka Z, **Mierzejewski K**, Kurzyńska A, Stryiński R, Mateos J, Carrera M, Golubska M, Bogacka I. *Analysis of changes in the proteomic profile of porcine corpus luteum during different stages of the oestrous cycle: effects of PPAR gamma ligands*. Reprod Fertil Dev. 2022 doi: 10.1071/RD21248.

Kunicka Z, Kurzynska A, Szydlowska A, **Mierzejewski K**, Bogacka I. *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands affect NF-kB and cytokine synthesis in the porcine endometrium-An in vitro study*. Am J Reprod Immunol. 2019 doi: 10.1111/aji.13053.

Dodatkowo, byłem autorem prezentującym 6 doniesień naukowych oraz współautorem w 5 doniesieniach naukowych, przedstawionych w formie prezentacji ustnych lub plakatów na konferencjach naukowych (międzynarodowych oraz krajowych).

Jestem również laureatem konkursów organizowanych przez Narodowe Centrum Nauki:

PRELUDIUM 18 „*Receptory aktywowane przez proliferatory peroksysomów beta/delta w regulacji procesów zapalnych w ciałku żółtym świni domowej*”.

OPUS 24 „*Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe jako mediatory komunikacji międzykomórkowej w organizmie eksponowanym na mikroplastik PET - badania multi-omiczne na modelu świni domowej*”.

Ponadto, odbyłem 1 krajowy oraz 3 zagraniczne staże naukowe:

Staż krajowy:

Pracownia Immunologii Doświadczalnej i Translacyjnej, **Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego**, 2 tygodnie, (12-23.10.2020)

Staże zagraniczne:

Department of Food Technology, **Marine Research Institute, Spanish National Research Council**, Vigo, Spain; 1 miesiąc (01.01.-31.01.2023)

Department of Veterinary Medicine, **University of Milan**, Italy; 3 tygodnie (09.05-29.05.2022)

Department of Food Technology, **Marine Research Institute, Spanish National Research Council**, Vigo, Spain; 2 tygodnie (08.03.-21.03.2020)