

Prof. dr. hab. inż. Paweł Paszek
Zakład Biosystemów i Miękkiej Materii
Instytut Podstawowych Problemów Techniki PAN (IPPT PAN)
ul. Pawińskiego 5b, 02-106 Warszawa
tel: (+48) 22 826 12 81 wewn.: 161, email: ppaszek@ippt.pan.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Moniki Dźwigońskiej pt: „The role of epigenetic and transcriptomic changes in the hypoxic microenvironment of glioma”

Praca została wykonana pod kierunkiem dr hab. Katarzyny Leszczyńskiej, w Pracowni Hipoksji i Epigenetyk Nowotworów oraz Pracowni Neurobiologii Molekularnej w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN.

Układ rozprawy doktorskiej

Pracę pani mgr. Dźwigońskiej rozpoczyna strona tytułowa i informacje wstępne: podziękowania, informacja o finansowaniu badań (str. 5), spis treści (str. 7-9), streszczenia w języku angielskim (str. 10-11) i polskim (str. 12-13) oraz lista skrótów (str. 14-20). Główna część pracy zaczyna się od wprowadzenia (rozdz. 1) i opisanie celi i hipotez badawczych (rozdz. 2). W kolejnych rozdziałach autorka przedstawia (rozdz. 4) i omawia (rozdz. 5) wyniki prac badawczych, wnioski (rozdz. 6) oraz spis publikacji związanych z rozprawą doktorską (rozdz. 7). Wreszcie autorka przedstawia literaturę wykorzystaną we wprowadzeniu i omówieniu prowadzonych prac badawczych (rozdz. 8). Praca zawiera 124 strony.

Praca doktorska przedstawiona jest w formie klasycznej (monografii), jednakże wszystkie zaprezentowane w niej wyniki zostały opublikowane renomowanych czasopismach naukowych. Wyniki badań przedstawione w podrozdziale 4.1 pochodzą z artykułu *Leszczyńska, Dzwigońska et al, 2023, Molecular Oncology, 17(7), 1173– 1191* natomiast wyniki w podrozdziałach 4.2-4.8 zostały opublikowane w artykule *Dzwigońska et al, 2025, Cell Reports, 44(9), 116222*.

Układ pracy jest standardowy dla prac doktorskich w formie monografii i oceniam go jako poprawny.

Merytoryczna ocena rozprawy

Pani mgr Monika Dźwigońska w przedstawionej dysertacji podejmuje ważny problem zrozumienia wpływu hipoksji (tj. obniżanego tkankowego stężenia O_2) na zmiany epigenomiczne, transkryptomiczne i fenotypowe w mikrośrodku glejaka wielopostaciowego oraz określenie ich roli w modulowaniu interakcji pomiędzy komórkami glejaka oraz mikroglejem/makrofagami wrodzonego układu odpornościowego. Szczegółowe cele pracy uwzględniają:

- charakterystykę zmian chromatyny indukowanych hipoksją w komórkach glejaka,
- opracowanie modelu kokultury glejaka i komórek mieloidalnych zależnego od stężenia O_2 ,
- analiza zmian transkryptomicznych i epigenetycznych w komórkach mieloidalnych pod wpływem hipoksji i interakcji z glejakiem,
- powiązanie tych zmian z fenotypem komórek mieloidalnych.

Cele pracy są ważne, ponieważ hipoksja stanowi istotny czynnik stresowy w mikrośrodku guza, wpływające na agresywność nowotworu oraz oporność na terapię. W przyszłości, wiedza taka może prowadzić do wyprowadzenia nowych celów terapeutycznych.

Wprowadzenie pracy (rozdz. 1) bardzo dobrze przedstawia ogólny kontekst badawczy oraz aktualny stan wiedzy. Autorka opisuje zagadnienie hipoksji nowotworowej, jej znaczenie biologiczne oraz charakterystykę poziomu O_2 w tkankach prawidłowych i nowotworowych. Następnie omawia główne mechanizmy odpowiedzi komórkowej na hipoksję, w tym regulacje transkryptyczną, metaboliczną i epigenetyczną. Kolejne sekcje dotyczą konsekwencji hipoksji dla progresji nowotworu, oporności na terapię oraz modulacji odpowiedzi immunologicznej w środowisku guza. Wprowadzenie zamyka charakterystyka glejaka wielopostaciowego oraz roli związanych z guzem komórek mikrogleju i makrofagów, ze wskazaniem kluczowych luk w wiedzy.

Rozdział 3 opisuje metody badawcze opierające się o wykorzystanie komplementarnych modeli *in vitro* i *in vivo* glejaka. Zastosowano mysie linie komórkowe oraz komórki pierwotne (GL261, BV2, RAW264.7, BMDM), w tym, kokultury komórek glejaka z komórkami mieloidalnymi, umożliwiające analizę ich interakcji w warunkach normoksji i hipoksji. Kluczowym elementem są wysokoprzepustowe analizy *next-generation sequencing* (ATAC-seq, RNA-seq oraz CUT&RUN), prowadzone z zachowaniem utrwalania próbek bezpośrednio w warunkach hipoksyjnych, oraz pełną standaryzowaną analizą bioinformatyczną. Badania uzupełniono o mysie model glejaka, analizy tkanek nowotworowych pacjentów oraz porównania z publicznymi danymi transkryptycznymi.

Zastosowane metody badawcze zostały opisane w sposób szczegółowy, przejrzysty i spójny. Dobór i zakres wykorzystanych technik, od zaawansowanych modeli komórkowych i zwierzęcych po wysokoprzepustowe analizy, świadczą o bardzo dobrym technicznym opanowaniu przez Autorkę szerokiego wachlarza nowoczesnych narzędzi badawczych. Na szczególne uznanie należy łączenie zaawansowanych eksperymentalnych oraz zaawansowanych analiz bioinformatycznych.

W kolejnym rozdziale (rozdział 4) autorka przedstawia wyniki przeprowadzonych badań. Rozdział ten składa się z ośmiu podrozdziałów. Podrozdział 4.1 poświęcony jest analizie komórek glejaka GL261, i pokazuje, że hipoksja indukuje rozległe, zależne od poziomu O_2 przeprogramowanie chromatyny obejmujące zarówno wzrost represyjnych (H3K9me3, H3K27me3) jak i aktywujących (H3K4me3) modyfikacji oraz utratę acetylacji (H3K27ac). Zastosowanie ATAC-seq ujawniło liczne zmiany dostępności chromatyny, nasilone w ciężkiej hipoksji ($<0.1\% O_2$), z preferencyjną utratą dostępności regionów promotorowych genów zaangażowanych w przetwarzanie RNA. Obserwacje te korelowały z obniżeniem ekspresji wybranych genów, w tym czynników związanych z metabolizmem RNA oraz regulacją struktur R-loopów, co zostało potwierdzone dodatkowymi analizami (qPCR, Ivy Glioblastoma Atlas Project). Na podkreślenie zasługuje walidacja kluczowych wyników w mysim modelu glejaka, w którym obniżoną ekspresję DDX5 zlokalizowano w hipoksyjnych rejonach guza, co nadaje przedstawionym danym istotne znaczenie translacyjne.

O ile wyniki badań przedstawionych w podrozdziale 4.1 pochodzą z artykułu Leszczyńska et al, 2023, Molecular Oncology, w którym mgr Dzwigońska jest drugim autorem, pozostała część prezentowanych wyników (podrozdziały 4.2 - 4.8) została opublikowana w prestiżowym artykule Dzwigońska et al, 2025, Cell Reports. Co istotne, w obu przypadkach Autorka przedstawia w rozprawie wyniki uzyskane samodzielnie, natomiast nieliczna współpraca naukowa (udokumentowana w tekście) dotyczy wyspecjalizowanych analiz i nie umniejsza w żaden sposób roli Autorki.

W podrozdziałach 4.2-4.8 Autorka analizuje efekt hipoksji na komórki BV2/BMDM, w kokulturze z komórkami glejaka GL261. W 4.2 Autorka pokazuje, że hipoksja zmienia fenotyp

i funkcje komórek meiloidalnych: zwiększa ekspresję markera Lgals3, oraz jednocześnie obniżając poziomy homeostatycznych komórek mikrogleju (P2ry12 i Tmrm119). Jest to potwierdzono zarówno *in vitro*, jak i w analizach dostępnych danych *in vivo* (scRNA-seq, IvyGAP). W podrozdziałach 4.3-4.4 przedstawiono zmiany transkryptomu w warunkach hipoksji i ko-kultury, wskazując na hamowanie procesów biogenezy rybosomów i przetwarzania RNA. Dane pokazują również przesunięcie procesów komórkowych stronę metabolizmu lipidów oraz fagocytozy. W podrozdziałach 4.5-4.6 przeprowadzono analizę epigenetyczną (ATAC-seq), wykazując, że zmiany dostępności chromatyny, zależne od synergii hipoksji i kontaktu z komórkami glejaka, częściowo tłumaczą obserwowane zmiany ekspresji (umiarkowana, ale istotna zgodność RNA-seq i ATAC-seq) i obejmują kluczowe geny (m. in Lgals3, Gpnmb, P2ry12). W 4.7-4.8 Autorka przeprowadza walidację mechanistyczną i translacyjną; CUT&RUN i modulacja acetylacji (panobinostat) łączą hipoksję z regulacją programów lipidowych, a CODEX na materiałach pacjentów potwierdza, że w regionach hipoksycznych ekspresja TMEM119 spada, natomiast GPNMB i LGALS3 wzrasta, co nadaje wynikom wysoką istotność biologiczną.

We wnioskach (rozdział 5 i 6) Autorka w sposób spójny i syntetyczny porównuje wyniki przedstawionych badań z danymi literaturowymi. Na uznanie zasługuje logiczne powiązanie wyników epidemiologicznych, transkryptomicznych oraz funkcjonalnych oraz prowadzenie narracji od mechanizmów molekularnych do implikacji biologicznych i potencjalnych zastosowań terapeutycznych. Całość sprawia wrażenie dojrzałej syntezy, świadczącej o bardzo dobrym opanowaniu tematu oraz wysokiej samodzielności naukowej Autorki. Należy wyraźnie zaznaczyć, że sformułowane cele badawcze rozprawy zostały w pełni zrealizowane.

Zastosowane piśmiennictwo (we wprowadzeniu, jak i w kolejnych częściach pracy) jest obszerne (184 pozycji), aktualne i właściwie dobrane. Autorka wykazuje dobrą orientację w literaturze przedmiotu, a cytowane prace są adekwatnie wykorzystane do uzasadnienia celów badawczych oraz interpretacji wyników.

Uwagi szczegółowe

Rozprawa jest napisana w języku angielskim, praca jest starannie przygotowana edytorsko oraz dobrze przemyślana. Wyniki pracy są oryginalne i zaprezentowane w przystępny sposób. Pojawiają się tylko bardzo drobne niedociągnięcia w opisie, np.:

- Metody; brakuje opisu analizy densytometrycznej blotów.
- Fig. 4.4: Tytuł błędnie sugeruje analizę komórek BV2.
- Brakuje odnośnika do Fig. 4.20 A w tekście (strona 86/87).
- Fig. 4.24 brakuje informacji o całkowitej ilości genów w grupie związanej z metabolizmem lipidów (w celu porównania z 18 dyskutowanymi genami).
- Fig. 4.28C, brakuje informacji jak została przeprowadzona kwantyfikacja i analiza ekspresji w próbkach klinicznych.

Dodatkowo, mam kilka pytań co do metodologii oraz interpretacji prezentowanych wyników:

Model eksperymentalny hipoksji: W pracy zastosowano porównanie warunków dla 20% oraz <0,1% O₂ (a w części eksperymentów dodatkowo 1%). Warto jednak zaznaczyć, że standardowe warunki hodowli komórkowej (20%) odpowiadają raczej względnej hiperoksji, podczas gdy fizjologiczne stężenie tlenu w tkankach zazwyczaj mieści się w zakresie 3–10%, a w mózgu wynosi około 4-5% (jak zaznaczono we wprowadzeniu rozprawy). Z tego względu interesującym uzupełnieniem interpretacji wyników byłoby dyskusja, w jakim stopniu obserwowane efekty odzwierciedlają przejście z warunków fizjologicznych do hipoksji guza, a w jakim wynikają z porównania do warunków hodowlanej hiperoksji (20% O₂).

Zwiększona wrażliwość ko-kultury na hipoksję: Wyniki ATAC-seq (Figs 4.19/20/22) wskazują, że interakcja BV2 z komórkami glejaka zasadniczo zmienia chromatynę (silny efekt kokultury w PCA), a w warunkach hipoksji ujawnia się wyraźna synergia obu bodźców (większość zmian spowodowanych hipoksją nie pojawia się w monokulturze BV2). Jednocześnie analiza motywów TF sugeruje potencjalny udział osi TGF β /SMAD3 oraz innych regulatorów odpowiedzi stresowej (m.in. KLF, EGR1, SP1). Czy Autorka mogłaby się odnieść do tego, jakie sygnały i mechanizmy (np. cytokiny, sygnały kontaktowe lub mechanotransdukcja, ścieżki sygnalizacyjne) między komórkami glejaka a komórkami BV2 mogą odpowiadać za zwiększoną wrażliwość na hipoksję oraz jakie eksperymenty w przyszłości pozwoliłyby na lepsze zrozumienie tego procesu.

Analiza statystyczna danych: W analizach RNA-seq, jak i ATAC-seq zastosowano dwie repliki biologiczne, podczas gdy standardem w badaniach eksperymentalnych są co najmniej trzy repliki (przynajmniej dla pomiarów populacyjnych). Choć podejście to pozwala na identyfikację silnych i globalnych efektów, ogranicza ono moc statystyczną oraz stabilność estymacji zmienności. W związku z tym uzyskane wyniki często należy interpretować przede wszystkim jakościowo (tj. pod kątem kierunku zmian), a kluczowe obserwacje należy wesprzeć dodatkowymi walidacjami. O ile ogólnie dane wydają się powtarzalne, eksperymenty RNA-seq z panobiostatem charakteryzują się większą zmiennością (Fig. 4.26A i B). W tym kontekście warto zapytać jakimi przesłankami kierowała się Autorka przy projektowaniu eksperymentów omicznych, i do jakiego stopnia interpretacja wyników może być nimi obciążona.

W rozprawie zastosowano testy statystyczne, głównie parametryczne (test t-Studenta oraz ANOVA) do analizy różnych typów danych (m.in. qPCR, Western blot, Chip-qPCR oraz intensywności sygnału fluorescencyjnego). W sekcji „Statistical analysis” nie przedstawiono jednak informacji o weryfikacji założeń stosowanych testów, w tym doborze testów parametrycznych vs nieparametrycznych, w szczególności dotyczących normalności rozkładu danych oraz jednorodności wariancji. Jest to istotne zwłaszcza w kontekście niewielkiej liczby replik biologicznych (często $n=3$), gdzie założenia testów parametrycznych są trudne do spełnienia, a test nieparametryczny wymaga większej liczby replikatów aby uzyskać podobny poziom istotności. Dodatkowo, przy małej liczbie replik stosowanie SEM sugeruje większą precyzję estymacji niż wynika z danych. Bardziej informatywne jest prezentowanie odchylenia standardowego (SD) oraz pojedynczych punktów danych, co ułatwia ocenę rozrzutu biologicznego.

Kilka przykładów, gdzie takie podejście mogłoby dodatkowo wzmocnić przejrzystość oraz interpretację analiz statystycznych:

- w danych qPCR, CHIP-qPCR (Fig. 4.4 oraz Fig. 4.6A–B) przy $n=3$ zastosowano test t-Studenta, interpretacja wyników powinna mieć charakter ostrożny i jakościowy bez weryfikacji założeń testu a prezentacja pojedynczych punktów byłaby pomocna (4.6). Podobne analizy z zastosowaniem testu Studenta są ujęte w Fig. 4.7, 4.8, Fig 25 D, F (przy części danych $n>3$) czy też 4.16F (test na proporcje).
- Fig. 4.6F: przy większej liczbie punktów pomiarowych zastosowano test nieparametryczny, natomiast w podobnej analizie w Fig. 4.18 C, D, czy też 4.27 C, D zastosowano test parametryczny; uzasadnienie wyboru testu zwiększyłoby spójność metodologiczną.
- Fig. 4.11B: nie widzę informacji o liczbie replikacji; zalecane byłoby przedstawienie SD zamiast SEM. Przy analizie wariancji (ANOVA), warto odnieść się do założeń (normalność, homogeniczność wariancji) aby uzasadnić wybór testu.
- Fig. 11D: brakuje informacji o liczbie replikacji; pokazanie indywidualnych punktów danych (nie tylko średniej i słupków błędów) ułatwi ocenę rozrzutu danych.

- Fig. 13A (oraz 4.21A), brakuje testu na normalność rozkładu, który pozwoliłby na użycie testu parametrycznego. Pomiary sygnałów związanych z ekspresją genów często nie mają rozkładu normalnego.
- Fig. 4.23 wybór współczynnika Pearsona lub Spearmana powinien zależeć od rozkładu danych.
- Fig. 4.25B. Niejasny dla mnie sposób użycia testu statystycznego - dane opisują ciągły profil mierzonego sygnału, t test porównuje punktowe estymatory średniej. Zaleca się użycie SD zamiast SEM lub pokazania indywidualnych profili replikatów.

Wnioski końcowe

Mimo powyższych uwag, w mojej opinii rozprawa jest bardzo wartościowa, ma istotne znaczenie poznawcze, gdyż stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego, jakim jest zrozumienie wpływu hipoksji na epigenetyczne i funkcjonalne przeprogramowanie komórek mieloidalnych/makrofagów w środowisku glejaka. Szczególną wartością rozprawy jest wykazanie możliwości farmakologicznej modulacji procesów związanych ze efektem zmian chromatyny oraz wielopoziomowa walidacja wyników w modelach *in vitro*, *in vivo* oraz w materiale klinicznym. O wysokiej randze naukowej i potencjale translacyjnym świadczą publikacje prezentowanych danych w renomowanych czasopismach, w tym *Cell Reports*.

Rozprawa doktorska bardzo dobrze prezentuje wiedzę teoretyczną Autorki w zakresie biologii nowotworów, epigenomiki oraz immunologii nowotworowej związanych z hipoksją i mikrośrodowiskiem glejaka. Praca została solidnie osadzona w aktualnym stanie wiedzy, a Autorka sprawnie porusza się w literaturze przedmiotu, wykorzystując do formułowania hipotez badawczych. Umiejętne łączenie zagadnień z pogranicza biologii molekularnej, epigenomiki i biologii komórkowej świadczy o wysokim poziomie przygotowania merytorycznego w dyscyplinie nauk biologicznych.

Rozprawa w pełni dowodzi umiejętności samodzielnego planowania i realizacji złożonych badań naukowych. Autorka zoptymalizowała zaawansowane modele eksperymentalne, w model bezpośredniej kokultury komórek glejaka i komórek mieloidalnych w warunkach kontrolowanej hipoksji, oraz konsekwentnie przeprowadziła wielopoziomowe analizy molekularne i funkcjonalne. Dobór metod badawczych, ich krytyczne zastosowanie, a także integracja różnych danych omicznych i mikroskopowych świadczą o bardzo wysokim stopniu samodzielności naukowej oraz dojrzałości badawczej Autorki. Należy zaznaczyć umiejętne połączenie umiejętności związanych z „wet-labem” jak i analiz bioinformatycznych.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2024 poz. 1571 z późn. zm.). W związku z powyższym, wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej o dopuszczenie mgr Moniki Dźwigońskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Ze względu na wysoki poziom oryginalności naukowej (potwierdzonych publikacjami w czołowych czasopismach), wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Z poważaniem

Paweł Paszek



Warszawa, 05.02.2026

Recenzja rozprawy doktorskiej

Doctorantka: Mgr. Monika Dźwigońska

Tytuł rozprawy doktorskiej: *The role of epigenetic and transcriptomic changes in the hypoxic microenvironment of glioma*

Promotor: dr. hab. Katarzyna Leszczyńska, prof. Instytutu Nenckiego PAN

Recenzent: dr. hab. Agnieszka Bronisz, prof. IMDiK PAN

Rozprawa Mgr. Moniki Dźwigońskiej dotyczy wpływu hipoksji w mikrośrodowisku glejaka na programy transkrypcyjne i epigenetyczne komórek nowotworowych i mieloidalnych (w tym modeli mikrogleju/makrofagów) oraz ich interakcji z komórkami glejaka. Autorka wykorzystuje podejścia eksperymentalne i -omiczne, a także zestawia wyniki z publicznie dostępnymi danymi. Na podkreślenie zasługuje fakt, że kluczowe rezultaty rozprawy zostały zweryfikowane w niezależnym procesie recenzyjnym i opublikowane w renomowanych czasopismach o wysokiej rozpoznawalności w obszarze biologii molekularnej i badań nad nowotworami.

Szczególnie istotne jest pierwsze autorstwo doktorantki w pracy opublikowanej w Cell Reports (2025) pt. „Hypoxic stress dysregulates functions of glioma-associated myeloid cells through epigenomic and transcriptional programs” (Dźwigońska i wsp.), stanowiącej podstawę i najważniejszy rezultat prezentowanej rozprawy. Ponadto doktorantka jest współautorka publikacji w Cell Reports (2024) oraz Molecular Oncology (2023), co potwierdza jej znaczący wkład w badania realizowane na wysokim poziomie merytorycznym oraz zdolność do generowania wyników spełniających standardy czasopism wiodących w dyscyplinie, którą się zajmuje.

1) ocena ogólnej wiedzy teoretycznej w dyscyplinie

Rozprawa prezentuje wymaganą wiedzę teoretyczną w zakresie biologii nowotworów mózgu, mikrośrodowiska guza oraz mechanizmów regulacji epigenetyczno-transkrypcyjnej zależnych od tlenu. Autorka poprawnie omawia tło dotyczące glejaka, w tym znaczenia heterogeniczności komórkowej oraz stan wiedzy na temat roli hipoksji jako czynnika selekcyjnego kształtującego i regulującego fenotypy komórek guza. Szczególnie cenne jest spójne powiązanie hipoksji z przeprogramowaniem ekspresji genów, metabolizmu i zmianami w krajobrazie chromatyny.

Na plus należy zaliczyć klarowne i systematyczne przedstawienie kluczowych mechanizmów oraz schematu eksperymentalnego, co ułatwia lekturę i śledzenie toku argumentacji. Ze względu na analizę zarówno komórek guza, jak i komórek mieloidalnych, pomocne byłoby bardziej kontrastujące przedstawienie już we wstępie różnic w odpowiedzi na hipoksję pomiędzy tymi populacjami, co jeszcze lepiej „ustawiłoby” odbiorcy logikę dalszej części pracy.

Podsumowując, doktorantka wykazuje umiejętność syntetycznego łączenia zagadnień z pogranicza biologii molekularnej, epigenomiki i immunologii mikrośrodowiska guza, co przekłada się na logiczne sformułowanie celów oraz hipotez badawczych. W konsekwencji należy stwierdzić, że rozprawa spełnia kryterium prezentacji wymaganej wiedzy teoretycznej.

2) ocena umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej

Rozprawa w sposób przekonujący potwierdza umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Autorka zaproponowała spójny program badań obejmujący zarówno modelowanie hipoksji, jak i analizę jej konsekwencji molekularnych oraz fenotypowych. Na uwagę zasługuje konsekwentne stosowanie układów porównawczych (monokultury vs. kokultury) oraz dążenie do rozróżnienia wpływu hipoksji od wpływu samej interakcji komórkowej.

Od strony warsztatowej praca obejmuje szeroki zestaw metod: hodowle komórkowe modeli komórek mieloidalnych (BV2, RAW 264.7, BMDM) i komórek glejaka (GL261) z wykorzystaniem bezpośredniej kokultury, ekspozycję na warunki hipoksji ($<0,1\% \text{ O}_2$) i normoksji, procedury izolacji/sortowania materiału oraz analizy -omiczne (RNA-seq, ATAC-seq, CUT&RUN) wraz z rozbudowanym komponentem bioinformatycznym. Dodatkowym atutem jest udostępnienie danych sekwencyjnych w repozytorium publicznym (GEO), co świadczy o wysokim standardzie badawczym i transparentności.

W kontekście dojrzałości interpretacyjnej warto jednocześnie zaznaczyć, że mimo trafnego podkreślenia znaczenia heterogeniczności komórkowej w glejaku, istotna część analiz opiera się na modelach homogenicznych i mysich. Z tego względu zasadne byłoby wyraźniejsze, wydzielone omówienie ograniczeń wynikających z doboru modeli (linie i układy mysie) oraz ich wpływu na możliwość uogólnienia wniosków na temat komórek mieloidalnych w materiale ludzkim.

Na szczególne uznanie zasługuje również fakt, że realizacja projektu wymagała intensywnej współpracy z licznymi specjalistami, w tym bioinformatykami oraz ekspertami z zakresu immunologii i biologii molekularnej. Doktorantka z powodzeniem koordynowała tę współpracę, świadomie korzystając z ekspertyzy współpracowników i integrując ich wkład w sposób merytoryczny, co przełożyło się na spójność analiz oraz wysoki poziom interpretacji danych.

Podsumowując, praca zawiera liczne elementy świadczące o dojrzałości naukowej autorki: krytyczne odnoszenie wyników do literatury oraz próbę

powiązania obserwacji *in vitro* z danymi pochodzącymi z próbek pacjentów. Całość potwierdza samodzielność i kompetencje doktorantki w prowadzeniu badań.

3) ocena oryginalności rozwiązania problemu naukowego / zastosowania wyników

W ocenie recenzenta rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, ponieważ dokonuje syntezy analiz transkryptomicznych i epigenetycznych w celu wyjaśnienia, w jaki sposób hipoksja przeprogramowuje mikrośrodowisko glejaka, ze szczególnym uwzględnieniem komórek mieloidalnych. Oryginalność pracy wynika nie tylko z zastosowania wielowarstwowych metod, lecz także z konsekwentnego powiązania obserwacji molekularnych z fenotypem komórkowym.

Za szczególnie wartościowe należy uznać wykazanie związków między hipoksją, regulacją epigenetyczną a cechami funkcjonalnymi komórek mieloidalnych, w tym analizę programów związanych z metabolizmem lipidów i akumulacją kropli lipidowych oraz ocenę wpływu modulacji acetylacji (np. z użyciem inhibitora HDAC – panobinostat) na obserwowane zjawiska. Tego typu integracja mechanizmu i fenotypu wnosi istotny wkład do zrozumienia, w jaki sposób hipoksja może sprzyjać propagowaniu stanów komórkowych wspierających progresję guza.

Na oryginalność składają się w szczególności:

- wykazanie, że hipoksja prowadzi do nasilenia kondensacji chromatyny w komórkach glejaka, zwłaszcza w rejonach promotorowych, i że dotyczy to określonych programów biologicznych;
- wykazanie, że hipoksja modyfikuje ekspresję markerów tożsamości GAMs (m.in. wzrost *Lgals3* oraz spadek *P2ry12* i *Tmem119*) oraz że część zmian ekspresji ma odzwierciedlenie w zmianach dostępności chromatyny;
- zidentyfikowanie związku hipoksji z akumulacją kropli lipidowych w komórkach mieloidalnych, sprzężonego z indukcją genów metabolizmu lipidów oraz spadkiem globalnej acetylacji histonów;
- przedstawienie dowodów, że modulacja epigenetyczna (hamowanie HDAC, m.in. panobinostatem) może odwracać wybrane elementy fenotypu hipoksyjnego (przywrócenie acetylacji histonów i ograniczenie akumulacji lipidów), co wskazuje na potencjał aplikacyjny wyników w kontekście przeprogramowania komórek mieloidalnych w TME.

Dla wzmocnienia translacyjnego wydźwięku tej części pracy można by mocniej wyartykułować, w jakim kierunku Autorka widzi praktyczne wykorzystanie przedstawionej wiedzy (np. identyfikacja punktów uchwytu terapeutycznego, biomarkerów stanu hipoksyjnego czy przesłanki dla terapii skojarzonych). Nie zmienia to jednak jednoznacznie pozytywnej oceny oryginalności i wartości poznawczej wyników.

W świetle przedstawionych danych praca wnosi istotny i oryginalny wkład do zrozumienia mechanizmów epigenetyczno-transkrypcyjnych zależnych od

hipoksji w glejaku oraz wskazuje racjonalne kierunki dalszych badań o potencjalnym znaczeniu translacyjnym.

Wnioski końcowe

Pozytywnie oceniam wszystkie trzy wymagane elementy: (1) poziom wiedzy teoretycznej, (2) samodzielność badawczą oraz (3) oryginalność rozwiązania problemu naukowego. Przedłożona rozprawa wyróżnia się wysoką dojrzałością metodologiczną oraz umiejętną integracją danych -omicznych z interpretacją biologiczną, a jej wyniki mają wyraźną wartość poznawczą dla zrozumienia roli hipoksji w mikrośrodkowisku glejaka.

.....

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2024 poz. 1571 z późn. zm.), tj. prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną w dyscyplinie, potwierdza umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej oraz stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. W związku z powyższym wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN o dopuszczenie Pani Moniki Dźwigońskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora, w tym do publicznej obrony.

Jednocześnie z uwagi na wysoki poziom merytoryczny pracy, dojrzałość metodologiczną oraz znaczący wkład w rozwój wiedzy w badanym obszarze, rekomenduję rozprawę do wyróżnienia.

dr. hab. n. med. Agnieszka Bronisz





UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI

Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii

Kraków, 12 lutego 2026

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Moniki Dźwigońskiej

'The role of epigenetic and transcriptomic changes in the hypoxic microenvironment of glioma'

Promotor pracy: dr hab. Katarzyna Leszczyńska, prof. IBD im. Nenckiego PAN

Tematyka rozprawy

Badania Pani mgr Moniki Dźwigońskiej koncentrują się wokół wpływu hipoksji na epigenom i transkryptom komórek glejaka oraz komórek mieloidalnych mikrośrodowiska nowotworowego. W swoich eksperymentach Doktorantka wykorzystała mysią linię komórek glioblastomy GL261 hodowanych w warunkach 21% i 0,1% tlenu oraz przeszczepianych do myszy w syngenicznym modelu ortotopowym. Część analiz przeprowadziła na dostępnych danych RNA-seq od pacjentów onkologicznych. Doświadczenia obejmowały również analizy dostępności chromatyiny i profilu transkryptomicznego komórek mikrogleju BV2 oraz makrofagów różnicowanych z monocytów pochodzenia szpikowego (BMDM). Komórki te były hodowane w modelu mono- lub kokultury z komórkami glejaka. Wyniki przedstawione w pracy doktorskiej Pani Moniki Dźwigońskiej są kopalnią danych omicznych, z których część została zweryfikowana funkcjonalnie oraz – co ma szczególną wartość poznawczą i kliniczną - w próbkach od pacjentów, dlatego stanowią istotny wkład w badania nad patomechanizmami determinującymi biologię glioblastomy i jej mikrośrodowiska.

Wiedza kandydatki

Ocena wraz z uzasadnieniem, czy rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie nauki biologiczne

Praca doktorska Pani mgr Moniki Dźwigońskiej ma układ klasyczny. Została napisana bardzo klarownie. We wstępie Doktorantka precyzyjnie wprowadza czytelnika w tematykę podjętych badań. Cele pracy są jasno określone, brakuje natomiast explicite wyartykułowanej hipotezy badawczej. Opis metod jest szczegółowy i pozwala na niezależne powtórzenie doświadczeń. Wyniki zostały przedstawione na czytelnych rycinach oraz są opatrzone zrozumiałą i interesującą narracją. Dyskusja jest napisana zwięźle, ale dobrze osadza uzyskane wyniki w świetle dotychczasowej literatury. Wskazuje to na bardzo dobre przygotowanie teoretyczne Doktorantki, niezbędne dla uzyskania stopnia doktora.

Samodzielność kandydatki

Ocena wraz z uzasadnieniem, czy rozprawa doktorska wykazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez osobę ubiegającą się o nadanie stopnia doktora

W swoich badaniach Pani mgr Monika Dźwigońska wykorzystała zaawansowane metody biologii molekularnej i omicznej, które pozwoliły odpowiedzieć na zadane w pracy pytania badawcze. Doktorantka pokazała również, że sensem badań omicznych nie jest generacja dużych zbiorów danych, ale następne analizy zidentyfikowanych mechanizmów, w tym ich weryfikacja innymi metodami, analiza pod kątem funkcjonalnym i w odniesieniu do danych klinicznych. Wskazuje to dojrzałość badawczą i samodzielność Doktorantki oraz gotowość do podjęcia dalszych wyzwań naukowych.

Oryginalność rozprawy

Ocena wraz z uzasadnieniem, czy rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, oryginalne rozwiązanie w zakresie zastosowania wyników własnych badań naukowych w sferze gospodarczej lub społecznej

Praca doktorska Pani mgr Moniki Dźwigońskiej wnosi nową wiedzę dotyczącą epigenomiki i transkryptomiki komórek mieloidalnych mikrośrodowiska guza nowotworowego w kontekście oddziaływań z komórkami glejaka w warunkach hipoksji. Dotychczas takie dane były w literaturze bardzo ograniczone. Zastosowanie analiz wielkoskalowych pozwala na kompleksowe zrozumienie procesów biologicznych zachodzących w mikrośrodowisku nowotworowym, co może pozwolić na trafniejszą

interpretację złożonych i heterogenicznych systemów biologicznych. Stanowią one oryginalne rozwiązanie problemu badawczego.

Pytania i inne spostrzeżenia dotyczące treści rozprawy

W trakcie lektury nasunęły mi się następujące pytania, które chętnie przedyskutuję z Doktorantką w trakcie obrony pracy. Zaznaczam, że nie umniejszają one mojej wysokiej oceny przedstawionych badań, a są uzupełnieniem dyskusji:

- Ogólnie przyjmuje się, że bez co najmniej 3, a najlepiej ≥ 4 powtórzeń biologicznych, trudno jest dokładnie oszacować zmienność techniczną i biologiczną w analizach wielkoskalowych. Przedstawione w pracy analizy ATAC-seq i RNA-seq zostały przeprowadzone na dwóch replikatach biologicznych. W każdym przypadku analiza PCA wykazała bardzo dobrą segregację próbek. Na ile taka sytuacja gwarantuje wysokie prawdopodobieństwo, że przyczyną różnic jest zadany warunek biologiczny, a nie że próbki różnicują się pod względem innej zmiennej? Jaka jest wiarygodność i moc analizy statystycznej następczej różnicowej analizy ekspresji genów przy dwóch powtórzeniach biologicznych dobrze odseparowanych na PCA? Jaki procent genów może zostać zidentyfikowany jako odmiennie ekspresjonowany, w porównaniu do analiz wykonanych na większej liczbie powtórzeń biologicznych? Czy ryzyko identyfikacji fałszywie negatywnych/pozytywnych jest wyższe w takiej sytuacji?
- Jaki odsetek genów zidentyfikowanych w analizie różnicowej RNA-seq ma w swoich promotorach sekwencję HRE, a ile z nich regulowana jest pośrednio?
- Jaka jest przyczyna różnej proporcji komórek BV2 i BMDM w kokulturze z GL261?
- Dlaczego immunoprecypitacja chromatyny była wykonywana na komórkach HCT-116?
- Jaki jest efekt reoksygenacji na żywotność komórek GL261?
- Czy podjęto próbę analizy acetylacji H3K27 w czasie dłuższym niż 24 godziny reoksygenacji w celu potwierdzenia proponowanego efektu indukcji tej modyfikacji?
- Jak Doktorantka rozumie użyte w pracy pojęcie 'xenograft' w kontekście przeszczepienia mysich komórek glioblastomy wywodzących się ze szczepu myszy C57Bl6 do myszy tego samego szczepu?

Ocena końcowa

Stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.). W związku z powyższym **wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej o dopuszczenie Pani mgr Moniki Dźwigońskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.** Ze względu na wysoką jakość naukową zaprezentowanych badań oraz ich opublikowanie w renomowanych czasopismach, **wnioskuję o wyróżnienie rozprawy.**

dr hab. Anna Grochot-Przęczek, prof. UJ
Zakład Biotechnologii Medycznej
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
Uniwersytet Jagielloński