



UNIwersytet JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII

Dr hab. n. med. Ewa Zuba-Surma, Prof. nadzw. UJ  
Zakład Biologii Komórki  
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii  
Uniwersytet Jagielloński  
ul. Gronostajowa 7  
30-387 Kraków  
e-mail: ewa.zuba-surma@uj.edu.pl

Kraków, 5 października 2018r.

**RECENZJA**

**rozprawy doktorskiej mgr Pawła Walczaka**

**pt. „ Generacja ludzkich indukowanych pluripotentnych komórek macierzystych  
oraz ich różnicowanie do komórek produkujących insulinę”**

wykonanej pod kierunkiem promotora prof. dr hab. med. Piotra Rieske

i promotora pomocniczego dr Dawida Grzeli

w Laboratorium Naukowo-Badawczym Celther Polska Sp. Z o.o. w Łodzi

Komórki macierzyste (KM) od kilku dekad stanowią przedmiot zainteresowania licznych zespołów badawczych i klinicznych na świecie ze względu na ich szeroki potencjał do różnicowania się w różne typy komórek dojrzałych i związaną z tym możliwością ich praktycznego wykorzystania w regeneracji tkanek.

Do typów KM o najszerszym dziś spektrum potencjalnych i praktycznych zastosowań klinicznych należą tzw. KM dojrzałych tkanek (z *ang. adult stem cells*) - rezydujące i pozyskiwane z tkanek organizmów w okresie postnatalnym, do których należą m.in. krwiotwórcze KM od lat skutecznie stosowane w hematologii klinicznej, jak również KM mezenchymalne szeroko optymalizowane dziś dla praktycznych zastosowań klinicznych m.in. w ortopedii, kardiologii, neurologii oraz chirurgii plastycznej i oparzeniowej. Komórki te, ze względu na swój ograniczony potencjał do różnicowania, mają jednak dość wąski profil klinicznych zastosowań w sytuacjach wymagających egzogennej regeneracji tkanek i nie mogą być w praktyce źródłem tak wyspecjalizowanych komórek, jak np. funkcjonalne neurony, kardiomiocyty, czy też komórki trzustki odpowiedzialne za produkcję insuliny.

Biorąc pod uwagę szeroki potencjał różnicowania do *de facto* wszystkich typów tkanek, duże zainteresowanie w ostatnich latach budzą KM o charakterze pluripotencjalnym, w tym tzw. indukowane KM pluripotencjalne, czyli komórki iPS (z *ang.* *induced pluripotent stem cells*), które uzyskuje się na drodze genetycznego reprogramowania komórek somatycznych i które mogą być generowane indywidualnie dla danego pacjenta.

Jednym z wyzwań związanych z praktycznym, klinicznym wykorzystaniem tych komórek jest m.in. ich przygotowanie zgodnie z procedurami bezpiecznymi dla pacjenta, a także zgodnie ze standardami przyjętymi w praktyce klinicznej, w tym standardami GMP (*ang.* *good manufactory practice*). W związku z powyższym wiele laboratoriów badawczych na świecie koncentruje swoje działania na optymalizacji bezpiecznych procedur indukcji komórek iPSCs *in vitro*, na opracowywaniu alternatywnych podejść w reprogramowaniu genetycznym oraz hodowli w zdefiniowanych warunkach - również w czasie ich różnicowania w dojrzałe fenotypowo komórki konkretnych tkanek - co przybliżyłoby zastosowania komórek iPS w praktyce klinicznej.

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska wychodzi naprzeciw tym wyzwaniom i wpisuje się we wspomniane najnowsze światowe trendy badawcze. Doktorant podjął się w swojej pracy wyzwania, jakim było zoptymalizowanie metod genetycznego reprogramowania ludzkich komórek somatycznych do stadium komórek iPS z zastosowaniem bezpieczniejszych wektorów episomalnych, jak również ich hodowli i różnicowania w kierunku funkcjonalnych ludzkich komórek trzustki produkujących insulinę - w zdefiniowanych warunkach hodowlanych *in vitro*, pozbawionych również składników odzwierzęcych. Doktorant wykazał w swojej pracy, że takie podejście metodyczne jest możliwe, co znacznie przybliżyło możliwość potencjalnego zastosowania komórek iPS, jako źródła autologicznych komórek dla celów regeneracyjnych, w tym komórek  $\beta$  trzustki produkujących insulinę, co w tym przypadku może znaleźć zastosowania w leczeniu pacjentów cierpiących na cukrzycę typu I.

### **Formalny opis rozprawy**

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska liczy 118 stron i zachowuje układ typowy dla rozpraw doktorskich. Rozprawa rozpoczyna się od spisu treści, spisu rycin, spisu tabel oraz wykazu skrótów, po których następuje dwustronicowe *Streszczenie* pracy w języku polskim oraz dwustronicowy abstrakt w języku angielskim. Kolejnym rozdziałem jest *Wstęp* liczący 24 strony, podzielone na 3 główne podrozdziały i będący merytorycznym wstępem do podejmowanych w pracy aspektów badawczych i zaopatrzone w 3 ryciny odnoszące się do opisywanej tematyki. Po nim następuje zwięzłe przedstawienie *Celów pracy*, a następnie obszerny 29-o stronicowy rozdział *Materiały i Metody*, zawierający opis metod oraz przebieg poszczególnych doświadczeń, które doktorant prowadził w czasie swoich badań, zaopatrzone w 12 tabel odnoszących się do stosowanych w pracy odczynników, pożywek hodowlanych,

a także warunków prowadzenia eksperymentów. Po nim umieszczono 22-u stronicowy rozdział *Wyniki*, zawierający omówienie najważniejszych wyników uzyskanych w pracy, które zostały przedstawione na 19 rycinach. Kolejno w pracy umieszczono 11-o stronicową *Dyskusję* opisanych wcześniej wyników na tle dotychczasowych doniesień naukowych, których spis umieszczono w dalszym rozdziale *Piśmiennictwo*, zawierającym 187 pozycji literaturowych (na końcu rozprawy). Po dyskusji umieszczono 2-u stronicowy rozdział *Wnioski*, gdzie doktorant w punktach podsumowuje najważniejsze osiągnięcia pracy doktorskiej. Na końcu rozprawy po spisie piśmiennictwa, Doktorant umieścił dodatkowe dokumenty m.in. opisujące jego osiągnięcia naukowe, w tym spis publikacji i zgłoszeń patentowych oraz dane bibliometryczne dorobku naukowego Doktoranta.

Przedstawiona do oceny praca doktorska spełnia w pełni wymogi formalne rozprawy doktorskiej.

### **Ocena merytoryczna**

*Streszczenie* pracy, przygotowane zarówno w języku polskim, jak i angielskim, umieszczone na początku rozprawy, zostało przygotowane przez Doktoranta starannie i w sposób informatywny przedstawia zakres rozprawy doktorskiej.

We *Wstępie* Doktorant przedstawił dobrze dobrany zestaw informacji ułatwiający czytelnikowi zrozumienie celów oraz znaczenia badań podejmowanych w rozprawie doktorskiej. Doktorant w sposób systematyczny i staranny omawia zagadnienia dotyczące podstawowych aspektów dotyczących komórek macierzystych, w tym opisuje podstawowe typy KM, wskazując na ich właściwości w kontekście możliwości regeneracji tkanek. Osobne dwa podrozdziały poświęca omówieniu właściwości komórek iPS oraz metodom ich otrzymywania, a także obecnym próbom praktycznych zastosowań tych komórek. W kolejnej części Doktorant omawia procesy towarzyszące organogenezie trzustki, dostarczając stosownej informacji odnośnie czynników molekularnych oraz szlaków sygnalizacyjnych, które biorą udział w tym procesie i mogą być również wykorzystywane w celu ukierunkowanego różnicowania KM w pożądane komórki trzustki, także w warunkach *in vitro*. Wstęp kończy podrozdział poświęcony aspektom związanym z patofizjologią oraz obecnie stosowanymi strategiami w leczeniu cukrzycy typu I.

Podsumowując, w mojej ocenie *Wstęp* jest napisany w sposób wyczerpujący i dostarcza wystarczających informacji w celu uzasadnienia badań podejmowanych przez Doktoranta w jego pracy. Na podkreślenie zasługują również informatywne, przejrzyste ryciny zamieszczone w tej części pracy (Ryc. 1-3).

Do tej części pracy mam nieliczne uwagi, w tym następujące:

- na str. 7, Doktorant wymienia różne typy komórek macierzystych ze względu na ich potencjał do różnicowania (przedstawiając go również w sposób bardzo przejrzysty na Ryc. 1). W tym miejscu sformułowanie "*pluripotencjale embrionalne komórki macierzyste*" wydaje się nieco mylące. Znacznie bardziej czytelne - szczególnie dla osób niezaznajomionych z tematyką KM - byłoby w pierwszej kolejności przedstawienie definicji KM pluripotencjalnych (ogólnie), a następnie wymienienie komórek ESCs, jako jednego z przykładów takich komórek. Przy takim zapisie, jak w pracy powstaje wrażenie, że komórki pluripotencjalne są tożsame z KM embrionalnymi (ESCs).

- na str. 21, Doktorant opisuje proces SCNT i wskazuje, że jego efektem jest powstanie "*prawidłowej zygoty*". Budzi to moje pewne zastrzeżenia, jako biologa komórki, bowiem efektem udanej procedury transferu jądra komórki somatycznej do oocyty, czyli wspomnianego procesu SCNT - jest komórka zwana "klonotą".

W tym miejscu rodzi się również pytanie do Doktoranta: Jakie są znane podobieństwa i różnice na poziomie molekularnym między zygotą, a klonotą? Czy Doktorant może wskazać na podstawie dostępnej literatury takie różnice i podjąć się dywagacji na temat ich potencjalnego wpływu na faktyczny potencjał rozwojowy klonoty w porównaniu do zygoty? Myślę, że od strony molekularnej może być to ciekawy aspekt do dyskusji, zwłaszcza że wiąże się pośrednio z aspektami molekularnymi, które Doktorant podejmuje w pracy.

- na str. 30 i 31, Doktorant przedstawia wyzwania związane z potencjalnym zastosowaniem komórek iPS w praktyce klinicznej, wymieniając m.in. właściwości teratogenne tych komórek. Moją wątpliwość budzi stwierdzenie Doktoranta, że zastosowanie czynnika c-Myc w wektorach integrujących do genomu w reprogramowaniu, a co za tym idzie zwiększone ryzyko mutagenezy insercyjnej, stanowi większe zagrożenie nowotworzeniem niż sama pluripotencja komórek iPS, która prowadzi do powstawania potworniaków *in vivo*.

W mojej ocenie wciąż pluripotencja stanowi większe zagrożenie ze względu na to, że każda komórka iPS ma taką właściwość, ale nie każda komórka uzyskana na drodze reprogramowania wektorem wirusowym niosącym c-Myc ulega mutagenezie. Zgadzam się z Doktorantem, że w porównaniu do innych nowotworów, potworniaki stanowią typowo łagodne guzy nieprzerzutujące, niemniej jednak nie można umniejszać ryzyka związanego z podaniem komórek iPS pacjentowi, które to podanie prowadzić może (w przypadku tych komórek z prawdopodobieństwem graniczącym z pewnością) do powstania "masy" nowotworowej w jego organizmie, zamiast oczekiwanego efektu regeneracyjnego.

W tym miejscu mam również pytanie: Co Doktorant ma na myśli mówiąc, że potworniaki niedojrzałe stanowią "nowotwory złośliwe", skoro Doktorant pisze dalej że rzadko przerzutują oraz efektywnie poddają się chemioterapii? Na czym polega ich "złośliwość"?

- w niektórych miejscach pracy przy istotnych informacjach merytorycznych brak odniesienia do referencji w literaturze (np. str. 31, 32, 34).

*Cel pracy* został sformułowany właściwie i uzasadniony w kontekście wiedzy omówionej we wprowadzeniu.

W części *Materiały i Metody* umieszczono opis materiału biologicznego stosowanego w badaniach, który to stanowiły ludzkie komórki iPS (wyprowadzone w różnych warunkach testowanych przez Doktoranta *in vitro*) z ludzkich fibroblastów oraz komórek nabłonkowych nerki izolowanych z moczu. Doktorant wymienia również stosowne zgody na pozyskiwanie materiału ludzkiego oraz prowadzenie badań z użyciem GMO.

W dalszej części rozdziału Doktorant w sposób bardzo dokładny i wyczerpujący opisał szereg procedur eksperymentalnych, które zastosował w swojej pracy doświadczalnej, co w pełni pozwala na odtworzenie przeprowadzonych eksperymentów.

Ze względu na mnogość zastosowanych metod i protokołów, Doktorant opisał je w 2 obszernych podrozdziałach, jako techniki biologii molekularnej oraz metody zastosowane bezpośrednio w pracy z hodowlami komórkowymi. Każdy z tych dwóch podrozdziałów zawiera szczegółowo i kompleksowe opisy stosowanych procedur i jest zaopatrzone w 12 tabel odnoszących się do stosowanych w pracy odczynników, pożywek hodowlanych, a także warunków prowadzenia eksperymentów.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że Doktorant zastosował w swojej pracy liczne unikatowe metody i techniki biologii molekularnej, bazujące m.in. o wektory episomalne oraz konstrukty zapewniające indukowaną i kontrolowaną ekspresję wybranych czynników transkrypcyjnych, co pozwoliło mu na opracowanie nowej procedury pozyskiwania komórek iPS na drodze episomalnej ekspresji czynników reprogramujących oraz wyprowadzania z nich komórek progenitorowych trzustki oraz komórek produkujących insulinę. Dzięki opracowanym procedurom opisanym w pracy, Doktorant jest jednym z twórców m.in. zgłoszenia patentowego w tym zakresie, opracowanego w grupie Pana Prof. Rieske - Promotora Doktoranta.

Podsumowując, część metodyczna pracy stanowi niewątpliwie jej bardzo wysoki walor i wybitnie świadczy o bardzo zaawansowanym warsztacie pracy Doktoranta oraz całej grupy badawczej, w zakresie prezentowanych badań.

Do nielicznych moich uwag do tej części pracy należą:

- uwaga ogólna: Przy opisie poszczególnych metod badawczych, ze względu na ich mnogość, byłoby mile widziane 1-o zdaniowe wprowadzenie w jakim celu dany krok był wykonywany. Ułatwiłoby to logiczne podążanie za krokami eksperymentalnymi Doktoranta, szczególnie, że w części opisującej wyniki badań - będące efektem często szeregu kroków eksperymentalnych - nie ma miejsca na szczegółowe opisy, co było w danym etapie wykonywane od strony proceduralnej. W niektórych podrozdziałach opisujących metody, takie krótkie wprowadzenie jest uwzględnione.

- *Analiza restrykcyjna DNA* opisana na str. 47, jest przedstawiona w sposób mało szczegółowy, zwłaszcza w porównaniu do szczegółowego formatu przyjętego dla innych metod.

- na str. 60, Doktorant opisuje zoptymalizowaną przez siebie procedurę "*Transfekcji komórek liniową polietyleniminą*" podając ją ogólnie do komórek stosowanych w pracy (tj. nie wskazuje konkretnego typu komórek).

Tu mam pytanie: Czy Doktorant stosował tę samą procedurę transfekcji (tj. stosunek DNA:PEI, ilość plazmidu, liczbę transfekowanych komórek, itp.) w odniesieniu do wszystkich typów transfekowanych komórek? Czy obserwował różnice w efektywności transfekcji różnych komórek, co wymagałoby optymalizacji warunków transfekcji? Czy Doktorant testował może różne warunki transfekcji z PEI dla różnych komórek?

- na str. 64, gdzie Doktorant wymienia typy komórek, które zastosował w pracy, jako ludzkie komórki wyjściowe do reprogramowania (tj. ludzkie neonatalne fibroblasty i pierwotne komórki epitelialne nerki), brak mi nieco krótkiego uzasadnienia dlaczego takie, a nie inne, typy komórek zostały wybrane. Wyjaśnienie pojawia się wprawdzie pośrednio dalej w Dyskusji, ale już na etapie opisu metod taka informacja byłaby istotna dla czytelnika dla interpretacji wyników.

- Nie znalazłam informacji skąd pochodziły linie komórek ESCs, o których Doktorant wspomina m.in. na str. 64, jako komórkach kontrolnych.

Wyniki rozprawy zostały zaprezentowane w 22-u stronicowym rozdziale *Wyniki*, podzielonym na 4 główne podrozdziały, w których Doktorant zwięźle i logicznie opisał wyniki swoich badań prezentując wybrane wyniki na 19 rycinach.

W pierwszej części rozdziału, Doktorant opisał swoje wyniki odnośnie optymalizacji metod generowania komórek iPS z ludzkich komórek pierwotnych, w warunkach umożliwiających ich przyszłe zastosowania kliniczne. Wykazał m.in. możliwość pozyskiwania hodowli komórek epitelialnych z



moczu ludzkiego, co stanowi interesujące i praktyczne źródło autologicznych komórek ludzkich - bez konieczności stosowania inwazyjnych procedur. Komórki iPS uzyskane na drodze reprogramowania wykazywały pełen fenotyp komórek pluripotentnych i co ciekawe ulegały reprogramowaniu z większą efektywnością niż fibroblasty skórne. W tej części badań Doktorant zbadał również wpływ nadekspresji klastra miR302/367 (regulującego pluripotencję) na efektywność reprogramowania i potwierdził, że nadekspresja w/w miRNA z wektora episomalnego, zwiększa prawie 4-o krotnie efektywność reprogramowania w kierunku komórek iPS (zarówno fibroblastów, jak i komórek epitelialnych). Co ciekawe komórki epitelialne znów wykazywały większą efektywność reprogramowania niż fibroblasty. W tej części Doktorant zastosował szereg nowych, niestandardowych narzędzi inżynierii genetycznej, w postaci szeregu wektorów episomalnych niosących informację genetyczną o czynnikach reprogramujących oraz wybranych miRNA. Doktorant wykazał, że użycie takich wektorów, które są znacznie bezpieczniejsze z punktu widzenia m.in. ryzyka ewentualnej mutagenezy, umożliwia uzyskanie komórek iPS - wprawdzie z niższą efektywnością niż w standardowych protokołach, ale w warunkach znacznie bardziej akceptowalnych z punktu widzenia zastosowań klinicznych.

W drugiej części rozdziału *Wyniki*, Doktorant opisuje wyniki związane z optymalizacją pozyskiwania komórek iPS w chemicznie zdefiniowanych warunkach, co stanowi kolejny krok przybliżający praktyczne zastosowanie takich komórek u pacjentów. Doktorant zastosował m.in. ściśle zdefiniowane i pozbawione komponenty odzwierzęcej - pożywki hodowlane do ekspansji komórek wyjściowych do reprogramowania, jak również opracował metodę transfekcji tych komórek z zastosowaniem w pełni zdefiniowanego czynnika transfekującego, w tym przypadku PEI. W tej części badań Doktorant sprawdził również wpływ zdefiniowanych czynników białkowych (białek macierzy zewnątrzkomórkowej) stosowanych do opłaszczania naczyń hodowlanych dla komórek stosowanych w reprogramowaniu. Doktorant wykazał m.in., że w przypadku fibroblastów oraz komórek epitelialnych, zastosowanie odpowiednio lamininy 511 (lub lamininy 521) oraz kolagenu I (lub kolagenu iV) może względnie skutecznie zastąpić stosowanie komercyjnego odczynnika opłaszczającego Geltrex, który jest rutynowo stosowany w reprogramowaniu, a stanowi odczynnik nie w pełni zdefiniowany.

We wszystkich w/w przypadkach, kiedy Doktorant stosował zdefiniowane media hodowlane, własny odczynnik transfekujący oraz zdefiniowane białko ECM opłaszczające podłoże hodowlane - efektywność reprogramowania była niższa niż w warunkach kontrolnych, tj. odpowiednio: w pożywce kontrolnej z surowicą bydlęcą FBS, z zastosowaniem komercyjnego odczynnika transfekującego FuGENE6 oraz przy opłaszczaniu podłoża odczynnikiem Geltrex.

Na podkreślenie zasługuje natomiast fakt, że pomimo tych obserwacji udało się Doktorantowi pozyskać w zdefiniowanych warunkach - wystarczającą liczbę kolonii komórek iPS do dalszych badań, co otwiera

także możliwości potencjalnego wykorzystania takich procedur (opartych o zdefiniowane warunki hodowli i reprogramowania) dla generowania linii komórek iPS dla pacjentów.

W ostatniej części rozdziału Doktorant przedstawił wyniki optymalizacji różnicowania komórek iPS do komórek produkujących insulinę, z pośrednim etapem przeprowadzania komórek iPS do komórek endodermy, w zdefiniowanych warunkach, bez komponenty zwierzęcej. Doktorantowi udało się stworzyć taką kompozycję zdefiniowanej pożywki hodowlanej (bezsurowiczej), która zapewniała porównywalny poziom różnicowania do komórek endodermy, jak w warunkach kontrolnych z FBS. W tej części Doktorant ponownie zastosował strategię modyfikacji genetycznej komórek, umożliwiającą kontrolowaną ekspresję w komórkach iPS czynników transkrypcyjnych Pdx1 i NKX6.1, które pełnią istotną rolę w procesie różnicowania komórek  $\beta$  trzustki. Wykazał, że kontrolowana ekspresja tych czynników na odpowiednim etapie różnicowania komórek, zwiększa ich efektywność przekształcania się w komórki produkujące insulinę.

Należy podkreślić, że Doktorantowi udało się zmodyfikować istniejące już i opublikowane protokoły różnicowania komórek iPS do komórek  $\beta$  trzustki, wprowadzając bardziej zdefiniowane warunki *in vitro*, co zwiększa szanse przyszłych zastosowań takich komórek w klinice.

Podsumowując, wyniki badań zostały przedstawione przez Doktoranta w sposób zwięzły oraz logiczny i spójny. Na podkreślenie zasługuje fakt, że część wyników Doktoranta zostało już opublikowanych w trzech wysokoimpaktowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, a także zostało objęte zgłoszeniem patentowym, co potwierdza wysoką jakość oraz nowatorski aspekt prowadzonych badań, a także ich znaczenie praktyczne.

Do tej części pracy mam następujące drobne uwagi oraz pytania:

- w Podrozdziale 4.1.1.1. (str. 73-74), Doktorant przedstawia hodowlę komórek uzyskaną z moczu, co jest niewątpliwym sukcesem. Brakuje mi nieco dokładniejszej informacji w jaki sposób Doktorant identyfikował komórki w tej hodowli, jako komórki epitelialne lub nabłonkowe. Czy oprócz oceny morfologicznej przeprowadzał może dodatkowe analizy w kierunku identyfikacji markerów epitelium, aby zbadać ilościowo homogenność kultury?

Heterogenność hodowli pierwotnych, w mojej ocenie, nie musi być cechą niepożądaną, ale zawsze wskazanym jest wiedzieć z jakimi subpopulacjami mamy do czynienia w hodowli, co ma najczęściej miejsce przy pozyskiwaniu komórek z tkanek pierwotnych.

- Opisując otrzymywanie komórek iPS z zastosowaniem wektorów episomalnych, Doktorant wskazuje na użycie dodatkowych czynników przy reprogramowaniu, jakimi są białko p53 oraz EBNA-1.



Doktorant jedynie bardzo krótko wskazuje na ich rolę, co jednak nie jest dla mnie przekonujące, zwłaszcza, że wprowadzane są to dodatkowe czynniki w reprogramowaniu, co w mojej ocenie wymaga dokładniejszej argumentacji. Byłoby mile widziane, gdyby Doktorant w czasie obrony przybliżył dokładniej rolę obu białek w przebiegu procesów reprogramowania.

- W Podrozdziale 4.2.2. na str. 83, Doktorant podaje wartości efektywności transfekcji z wykorzystaniem kontrolnego odczynnika FuGENE6 oraz zsyntetyzowanego polimeru PEI. Czy wartości liczbowe przedstawiają średnie z kilku eksperymentów (a Doktorant omyłkowo lub celowo pominął wartości SD), czy też eksperyment ten był wykonany tylko raz?

- na rycinie 14, Doktorant na osi Y wykresów podaje jako jednostkę "*Liczbę kolonii komórek iPS*". Wskazane byłoby umieszczenie informacji, czy była to np. całkowita liczba kolonii na płytce, czy liczba kolonii na pole widzenia w mikroskopie, etc. Prosiłabym o uzupełnienie tych informacji w czasie prezentacji wyników w czasie obrony.

- Moje zastrzeżenie budzi także stosowanie obecności receptora CXCR4, jako markera endodermy. Jest to receptora, którego obecność może zostać zaindukowana w różnych typach komórek pod wpływem różnych czynników, o czym może także świadczyć wysoki rozrzut wyników uzyskanych przez Doktoranta przy detekcji tego receptora w różnych pożywkach hodowlanych indukujących rozwój endodermy. W mojej ocenie stosowniej byłoby wybrać (obok SOX17 i FOXA2) inny czynnik transkrypcyjny typowy dla endodermy, zamiast markera receptorowego.

W rozdziale *Dyskusja* autor krytycznie ocenia własne wyniki na tle innych danych literaturowych oraz wskazuje na potencjalne obszary, gdzie wyniki te mogą być wykorzystane w przyszłości. Dyskusja jest napisana starannie i wskazuje na znajomość tematu.

Rozprawę kończy rozdział *Wnioski*, w którym Doktorant przedstawił w punktach główne osiągnięcia badawcze objęte rozprawą oraz konkluzje płynące z przeprowadzonych przez niego badań. Rozdział pomimo swego tytułu, obok dwóch wyraźnych wniosków, zawiera trzy punkty, w których Doktorant zawarł *de facto* podsumowanie uzyskanych przez siebie wyników.

### **Ocena edytorskiej strony rozprawy**

Pod względem edytorskim praca doktorska jest przygotowana bardzo starannie. Ryciny są czytelne, a zdjęcia wykonane i umieszczone w rozprawie w dobrej jakości i rozdzielczości. W czasie czytania zwracają uwagę jedynie nieliczne, drobne błędy literowe i interpunkcyjne, w tym np. stosowanie słowa

"ilość" zamiast "liczba". Wspomniane drobne błędy edytorskie nie umniejszają jednak w żaden sposób wysokiej jakości rozprawy.

Podsumowując, w przedstawionej mi do recenzji pracy doktorskiej Pana Macieja Walczaka, autor podjął się ważnego wyzwania, jakim jest optymalizacja metod pozyskiwania oraz hodowli ludzkich komórek iPS w warunkach zdefiniowanych, które przybliżają nas do potencjalnych praktycznych zastosowań tych komórek w klinice. Doktorant opracował także zoptmalizowany protokół pozyskiwania komórek endodermy, a następnie komórek produkujących insulinę, z komórek iPS. Osiągnięcie to zostało objęte m.in. zgłoszeniem patentowym, co potwierdza znaczenie, innowacyjność i potencjał aplikacyjny uzyskanych wyników. Uzyskane w pracy wyniki, stanowią ważny, własny wkład Doktoranta w światową wiedzę, jak również niosą wydoki potencjał aplikacyjny, co w mojej ocenie może znaleźć przyszłe zastosowania w leczeniu pacjentów, w tym z cukrzycą typu I.

Rozprawę doktorską Pana Macieja Walczaka oceniam bardzo wysoko zarówno pod względem merytorycznym, jak i formalnym i edytorskim. Przedstawione w recenzji uwagi, w tym merytoryczne, w żadnym stopniu nie wpływają na pozytywną ocenę całej rozprawy doktorskiej, a wręcz przeciwnie, świadczą o tym, że pracę czyta się z dużym zainteresowaniem, a otrzymane wyniki są zachętą do stawiania nowych pytań.

**Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę zatem do Rady Wydziału Nauk Biomedycznych i Kształcenia Podyplomowego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie Pana Macieja Walczaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

**Jednocześnie ze względu na wysoki dotychczasowy dorobek naukowy Doktoranta (który stanowi m.in. 9 publikacji naukowych oraz 4 zgłoszenia patentowe) oraz ze względu na nowatorskie aspekty, wysoką wartość naukową oraz znaczenie aplikacyjne rozprawy, wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału o wyróżnienie rozprawy.**



(Ewa Zuba-Surma)