

ВІДЗИВ

офіційного опонента на дисертаційну роботу

Лесняка Юрія Івановича

«ТРАНСФЕКЦІЯ СПЕРМАТОЗОЇДІВ ТА ЕМБРІОНАЛЬНИХ КЛІТИН ЯПОНСЬКОГО ПЕРЕПЕЛА (*Coturnix Japonica*)», представлену на здобуття наукового ступеня кандидата сільськогосподарських наук за спеціальністю 03.00.15. – генетика.

Розвиток сучасної біологічної науки, зокрема молекулярної генетики та біотехнології, демонструє величезні досягнення людства у різних сферах діяльності. За останні роки в біології отримано велику кількість значних результатів, а досягнення сучасної науки широко використовуються в багатьох галузях народного господарства.

Актуальність теми. Прикладну біологію можна віднести до однієї з галузей високих технологій, що швидко розвиваються. Крім високого економічного потенціалу, вона має потужний вплив на якість життя населення через нові лікарські препарати, нові медичні біонанотехнології, нові харчові продукти та засоби захисту навколишнього середовища. Важлива роль сучасної біології, зокрема біотехнології та молекулярної генетики, у забезпеченні національної безпеки, це й життєво важливі фармпрепарати (вакцини, діагностичними, лікувальні протимікробні препарати, інсулін й т. ін.), протидія біотероризму і застосуванню мікробіологічної зброї, реалізація продовольчого самозабезпечення, збереження біологічного різноманіття.

У відносно невеликий проміжок часу після відкриття молекулярних основ спадковості, вченими було розроблено принципи і підходи щодо виділення з геному окремих генів та їх штучного синтезу на базі функціонуючих генних конструкцій, методи введення чужорідних генів у геном інших організмів. Це

ознаменувало початок ери трансгенезу.

Введення чужорідних генів тваринам з використанням рекомбінантних конструкцій дозволяє отримати трансгенні особини, у яких введені гени можуть покращувати породні властивості тварин, підвищувати стійкість їх організму до різних інфекційних захворювань, або отримувати тварин-продуцентів фізіологічно активних продуктів, необхідних в медицині, ветеринарії, тваринництві.

У зв'язку з цим актуальність дисертаційної роботи Лесняка Ю.І. «Трансфекція сперматозоїдів та ембріональних клітин японського перепела (*Coturnix Japonica*)» не викликає сумніву, оскільки спрямована на розроблення технологій введення чужорідного гену за допомогою сперматозоїдів на прикладі японського перепела, що в свою чергу відкриває широкі можливості у використанні біологічного матеріалу даного виду птаха для продукції фармацевтичних білків.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційну роботу виконано в рамках плану науково-дослідних робіт відділу молекулярно-діагностичних досліджень Української лабораторії якості та безпеки продукції АПК Національного університету біоресурсів і природокористування України за фундаментальною темою «Розробка імуноферментних діагностикумів для виявлення та ідентифікації генетично модифікованих гербіцидостійких сільськогосподарських рослин» (№ державної реєстрації 0113U003826).

Частина експериментальної роботи було виконано на базі відділення генетики та репродуктології при Лос-Анджелеському інституті The Fertility Institutes (США); генетичної лабораторії Reproductive Genetechs Institute (США); Columbia University in the City of New York (Anatomy and Cell Biology Department) (США); The Rockefeller University (США).

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і

рекомендацій. Наукові положення, висновки і рекомендації, що висвітлені у дисертації, є обґрунтованими і повністю підтверджуються отриманими результатами експериментальних досліджень. Автором проаналізовано вітчизняні і світові наукові літературні джерела за темою дисертаційної роботи, визначено методику та виконано експериментальні дослідження.

Висновки наукових досліджень і рекомендації виробництву впливають з одержаних результатів експериментальних даних, достовірність яких обґрунтовано результатами статистичних методів аналізу.

Результати дисертаційної роботи неодноразово доповідались автором на конференціях, наукових семінарах та звітах. За результатами досліджень автором опубліковано 15 наукових праць, із них 6 статей у фахових виданнях, 5 тез наукових доповідей, 2 патенти на винахід та 2 патенти на корисну модель.

Наукова новизна одержаних результатів. Автором відпрацьовано та запропоновано до використання комплексний підхід щодо отримання трансфікофаних сперматозоїдів за допомогою генно-інженерної конструкції та продемонстровано експресію цільового гену. Вперше отримано генетично трансформовані ембріони перепелів за допомогою інтрацитоплазматичної ін'єкції сперматозоїдів в комплексі з Triton X 100, екстрактом сперми та CRISPR/Cas-GFP вектором. Визначено оптимальні режими трансфекції гену GFP в сперматозоїдах перепела за допомогою ліпосом, диметилсульфоксиду і Triton X-100. Проведено культивування ембріональних (ЕК) клітин на моношарі STO (мишачі ембріональні фібробласти), розроблено протокол тривалого культивування ЕК з метою їх подальшого використання для трансфекції.

Отримані дані сприятимуть більш комплексному підходу щодо процедури отримання генетично трансформованих перепелів з метою використання їх біологічного матеріалу для продукції фармацевтичних білків.

Структура та обсяг дисертаційної роботи. Дисертація складається із вступу, огляду літератури, матеріалів та методів дослідження, результатів

експериментальних досліджень та їх узагальнення, висновків, списку використаних джерел літератури.

Дисертаційну роботу викладено на 174 сторінках комп'ютерного тексту. Робота вміщує 25 таблиць та 31 рисунок. Список використаних літературних джерел налічує 309 робіт, з яких 180 іноземних авторів.

Розділ 1. «Огляд літератури» викладено на 27 сторінках тексту, він складається з 6 основних глав. В огляді літератури висвітлено питання сучасного стану використання генетично трансформованих тварин в якості біореакторів, охарактеризовано процес включення в клітини їхніх організмів генів, які викликають у них синтез нових білків, як правило, фармакологічного або технологічного напрямків.

Розглянуто сучасні погляди на проблему введення чужорідних генів тваринам з метою отримання тварин-продуцентів фізіологічно активних продуктів, необхідних в медицині, ветеринарії, тваринництві. Також приводяться деякі літературні посилання з різних питань, пов'язаних зі специфікою експериментальних робіт. Автор акцентує увагу на недостатньому висвітленні в сучасних наукових джерелах проблеми трансфікування сперматозоїдів та ембріональних клітин японського перепела (*Coturnix japonica*).

На основі здійсненого аналізу обґрунтовано актуальність і перспективність проведених досліджень.

Розділ 2. Матеріали и методи досліджень. Робота виконувалась на базі науково-дослідного відділу молекулярно-діагностичних досліджень Української лабораторії якості і безпеки продукції АПК Національного університету біоресурсів і природокористування України. В основу дисертаційної роботи було покладено результати власних експериментальних досліджень, проведених протягом 2012-2016 років, а обробку отриманих матеріалів, їх осмислення і написання дисертації було завершено у 2017 році.

Експериментальним матеріалом слугували 46 самок і 70 самців японського

перепела (*Coturnix japonica*), сперматозоїди та ембріональні клітини.

Даний розділ дуже ретельно та детально описаний, зокрема, умови утримання птахів, процеси отримання сперми від самців та проведення штучного осіменіння самок японського перепела. Надається вичерпна інформація щодо методики виділення ДНК, підготовки генно-інженерних конструкцій та проведення процедур трансфекції сперматозоїдів та ембріональних клітин. У роботі було використано генно-інженерну конструкцію pEGFP-N1 («Clontech», США) яка несла у своєму складі маркерний зелений флуоресцентний білок – EGFP (англ. Enhanced green fluorescent protein).

Статистичне опрацювання експериментальних даних проводили за використання пакетів програмного забезпечення MS Excel 2010, PowerStats v. 12 (Promega), Cervus v. 3.0.3, GENALEX 6.5.

Розділ 3. «Результати досліджень та їх обговорення» містить 4 основні підрозділи, його викладено на 43 сторінках тексту та він нараховує 20 таблиць і 23 рисунки.

В підрозділі 3.1 «Отримання трансфікованих ембріональних клітин» описано результати трансфекції генно-інженерними конструктами первинних зародкових клітин і бластодермальних клітин перепелів, а також вплив допоміжних речовин (ліпосоми, DMSO) на результативність і ефективність процесу трансфікування. Досліджено методи трансфекції ембріональних клітин (ЕК) на прикладі первинних зародкових клітин (ПЗК) та бластодермальних клітин (БК). Здійснювалося вивчення методів введення генно-інженерних конструкцій шляхом ін'єкції трансфікованих ПЗК та БК в ембріони перепелів.

Отримані результати дозволи дисертанту зробити висновок про те, що використання стабільних ліній ЕК дозволить істотно підвищити ймовірність отримання генетичної трансформації в досліджуваному об'єкті з огляду на те, що в процесі культивування з наступною трансфекцією можна отримати культуру клітин із стійкою інтеграцією чужорідної ДНК.

Підрозділ 3.2 «Методичні підходи роботи з генеративними клітинами та основні аспекти репродуктивної функції японського перепела (*Coturnix japonica*)» присвячено відпрацюванню більш ефективних підходів до відбору еякуляту самців японського перепела та порівняльній характеристиці якості відібраних зразків сперми. Досліджено вплив кріоконсервації еякуляту на життєздатність та рухливість сперматозоїдів.

Автором показано, що стимуляція самців з використанням самок давала можливість отримувати еякулят з максимально якісними показниками: великим об'ємом сперми, високою концентрацією та великою кількістю живих, морфологічно нормальних та активних сперматозоїдів.

Здійснено порівняльну оцінку ефективності природного та штучного осіменіння самиць японського перепела. Найуспішнішим, з точки зору отримання яєць та життєздатності потомства, був метод внутрішньоматкової інсемінації із використанням розчинів для розріджування еякуляту з вмістом альбуміну та антибіотиків.

Підрозділ 3.3 «Отримання трансфікованих сперматозоїдів японського перепела за допомогою генно-інженерної конструкції у складі плазмиди pEGFP-N1» присвячено підготовці генно-інженерного конструкту, що несе у своєму складі ген GFP, для проведення процедури трансфекції та отримання трансфікованих сперматозоїдів. Автором було показано, що сперматозоїди можуть бути використані в якості природних векторів для переносу екзогенної ДНК у ядро яйцеклітини. На ефективність проведення процедури штучного осіменіння та якість процесу трансфекції істотно впливають як кількісні, так і якісні характеристики сперматозоїдів в порції еякуляту.

Здійснено порівняльну характеристику впливу різних трансфікуючих речовин на отримання генетично трансформованих ембріонів перепелів. Отримані дані дозволили дисертанту зробити висновок щодо застосування ліпофектаміну та DMSO, що дозволяє досягти рівня ефективності трансформації у 71,4 та 65,2 % відповідно.

У підрозділі 3.4. «Отримання трансфікованих сперматозоїдів японського перепела за допомогою генно-інженерної конструкції CRISPR/CAS-GFP в комплексі з Triton X-100 та подальше їх використання для інтрацитоплазматичної ін'єкції в ооцит» автором представлено результати досліджень щодо запровадження нових методичних підходів в трансгенезі перепелів шляхом використання інтрацитоплазматичної ін'єкції сперматозоїдів (ICSI). Вивчено здатність до запліднення і трансфекції ооцитів за допомогою мікроін'єкції сперматозоїдів оброблених Triton X-100 та ліпофектаміном із використанням генно-інженерної конструкції CRISPR/Cas-GFP.

Автором показано, що застосування методу ICSI в комплексі із TX-100, ES та CRISPR/Cas-GFP вектором забезпечувало високий рівень активації та запліднення ооцитів, значно підвищувало ефективність переносу генетичної інформації, покращувало життєздатність ембріонів.

В процесі ознайомлення з роботою виникли деякі **зауваження та побажання**.

1. Загальне позитивне враження роботи знижують окремі необов'язкові помилки технічного характеру, зокрема на сторінках 33, 43, 48 та інші;
2. В тексті зустрічаються не досить вдалі або перевантажені вирази, котрі потребують редакторської правки, зокрема на сторінках 42 «...Одним з найпоширеніших класів маркерних генів...», 46 «...Перші спроби використовувати ембріональні клітини...», 47 «...І тільки недавно у зв'язку з досягненнями в галузі молекулярної і клітинної біології ...» та ряді інших;
3. Латинські назви організмів та назви генів зазвичай подаються курсивом;
4. У ряді випадків бажано навести посилання на літературні джерела, зокрема на сторінках 31 «...застосування ретровірусів як засобу доставки чужорідної ДНК...», 36 «...Успішне перенесення екзогенної ДНК за допомогою сперматозоїдів було показано...», 50 «...Здатність сперматозоїдів переносити чужорідну ДНК ...»;

5. У пункті 1.1 «Основні напрямки використання генетично трансформованих організмів» автор стверджує, що однією з альтернатив отримання лікарських білків є яйце перепела. Чи не варто було б з економічної точки зору проводити подібного роду дослідження на інших промислових птахів (кури, гуси, качки)? Так, наприклад, кури виробляють трохи менше, близько 250, яєць на рік, але таке яйце в п'ять разів більше за перепелине;
6. У розділі «Матеріали і методи досліджень» одні й ті ж назви розчинів та хімічних сполук наведено різними мовами (сторінки 67, 69, 70, 71, 73, 81). Бажано було б зупинитися на одній з них, англійській або українській. Не припустимо вживання аббревіатури типу - sgРНК, або мовою оригіналу (single guide RNA, sgRNA) або українською (єдина гідова / химерна направляюча РНК, егРНК, гідРНК, хгРНК);
7. У підрозділі 2.6 розділу «Матеріали і методи досліджень» наведено загальну інформацію щодо системи CRISPR/Cas9, якій місце у розділі «Огляд літератури». Також в цьому підрозділі бажано надати більш детальну інформацію щодо методу виділення плазмідної ДНК та процедури секвенування;
8. В деяких підрозділах другого розділу не наведено інформацію щодо моделей, назв фірм виробників та країн походження окремих приладів та реагентів;
9. В таблицях підрозділу 3.1 «Отримання трансфікованих ембріональних клітин» третього розділу відсутня інформація щодо статистичної обробки результатів досліджень;
10. Висновок 3 до підрозділу 3.3 «Результативність трансфекції сперматозоїдів японського перепела за допомогою генно-інженерної конструкції рEGFP-N1 в комплексі з розчином DMSO» не є результатом досліджень дисертанта, а носить суто інформативний характер;
11. Висновок № 1 має дещо декларативний характер.

В цілому, оцінюючи дисертаційну роботу **Лесняка Юрія Івановича**, хочеться відмітити її комплексність, насиченість та направленість. Дисертацію характеризує високий рівень проведених досліджень. В ході виконання роботи встановлено низку нових наукових положень. Вона є самостійною і завершеною науковою працею і за змістом відповідає спеціальності 03.00.15. – генетика.

Вважаю, що дисертаційна робота **Лесняка Ю.І.** відповідає рівню дисертаційних робіт згідно пункту 11 «Порядку присудження...», а її автор заслуговує присудження наукового ступеня кандидата сільськогосподарських наук за спеціальністю 03.00.15. – генетика.

Старший науковий співробітник
Науково-виробничої лабораторії
молекулярно-генетичних досліджень
Центру 172 ДП „Укрметртестстандарт”,
к.б.н., с.н.с.



Р.В. Облап

Підпис Р.В. Облапа завіряю:
Заступник начальника відділу
управління персоналом
ДП «УКРМЕТРТЕСТСТАНДАРТ»



Н.І. Солошенко