

Warszawa, 20.08.2021

dr hab. Anna Maria Duszewska, prof. Uczelni
Zakład Histologii i Embriologii
Katedra Nauk Morfologicznych
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
ul. Nowoursynowska 159,
02-776 Warszawa
duszewskaanna@hotmail.com

RECENZJA

rozprawy doktorskiej **Pani mgr inż. Natalii Dzięgiel** pt.:

„Opracowanie metody transfekcji zygot królika z zastosowaniem nanocząstek”

wykonanej pod kierunkiem dr hab. Jacka Jury, profesora Instytutu, Instytutu Zootechniki - Państwowego Instytutu Badawczego w Balicach.

Przedstawiona do oceny **Dysertacja** wpisuje się w nurt badań nad transgenezą, mającą już szerokie zastosowanie w medycynie, biotechnologii, ale również i w rolnictwie. Od kilkudziesięciu lat prowadzone są doświadczenia mające celu opracowanie skutecznych technik transfekcji. Spośród wielu z nich największe znaczenie ma: rekombinacja homologiczna przy użyciu matrycy DNA lub też rekombinaza miejscowo-specyficzna, ZFN i TALENS oraz przełomowa technika CRISPR-Cas9. Najczęściej osobniki transgeniczne uzyskuje się dzięki mikroiniekcji, która umożliwia bezpośrednio wprowadzenie transgenu do gospodarza lub klonowaniu z wykorzystaniem transgenicznych linii komórkowych. Należy jednak podkreślić, że efektywność tych metod jest nadal niska.

W tym aspekcie, **Pani mgr inż. Natalii Dzięgiel** skupiła się na „opracowaniu metody transfekcji zygot królika z zastosowaniem nanocząstek”. Nanocząsteczki postrzegane są, jako alternatywa do stosowanych od wielu dekad wirusowych wektorów egzogenego DNA, co pozwala między innymi na tworzenia transgenicznych linii komórkowych oraz zwierząt. Dlatego podjęcie przez **Panią mgr inż. Natalię Dzięgiel** niniejszych badań było ze wszech miar uzasadnione.

Dysertacja Pani mgr inż. Natalii Dzięgiel obejmuje 94 strony maszynopisu, w tym: **Spis skrótów użytych w pracy, Wstęp, Cel pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski** oraz **Streszczenie** w języku polskim i angielskim,. Praca zawiera 9 tabel, 7 fotografii, 5 wykresów i 5 schematów. **Literatura** obejmuje 162 pozycje.



Dysertacja rozpoczyna się obszernym **WYKAZEM SKRÓTÓW**, który jest bardzo pomocny podczas czytania niniejszej **Rozprawy**. W rozdziale **WSTĘP, Doktorantka** wprowadza w zagadnienie, a następnie w sposób przejrzysty omawia metody tworzenia zwierząt transgenicznych. Pracę wzbogaca ocena aplikacyjna poszczególnych metod. Spośród wielu zagadnień poruszanych w tym rozdziale na szczególne uznanie zasługuje podrozdział dotyczący nanocząsteczek, jako nośników transgenów.

W rozdziale **CELE PRACY**, który moim zdaniem powinien być zatytułowany **Założenia i cel pracy, Doktorantka** uzasadniła celowość podjęcia badań oraz sformułowała nadrzędny cel, którym było: opracowanie skutecznej metody transfekcji zygot królika z zastosowaniem kompleksu utworzonego przez nanocząstki i DNA, oraz zbadanie wpływu wysokiego ciśnienia hydrostatycznego, zastosowanego jako czynnik wspomagający rozwój zygot poddanych transfekcji kompleksem nanocząstki/DNA – prekondycjonowanie zygot.

W rozdziale **MATERIAŁY I METODY, Doktorantka** umieściła informację o zgodzie Lokalnej Komisji Etycznej - Uchwała I Komisji Etycznej w Krakowie nr 77/2017 na przeprowadzenie niniejszych badań. Materiał do badań stanowiły zygoty uzyskane od królic rasy nowozelandzkiej białej. Samice pochodziły z hodowli Instytutu Zootechniki PIB nr 010 w rejestrze hodowców na podstawie Art. 2 ust. 1 pkt. 9 ustawy z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. poz. 266).

W swoich badaniach **Pani mgr inż. Natalia Dzięgiel** wykorzystując metodę mikroiniekcji wprowadzała kompleks nanocząsteczka/plazmidowe DNA Pmax FP-Red-N do przestrzeni okołozółtkowej zygot królika. Dodatkowo dla zwiększenia efektywności, zygoty przed transfekcją były prekondycjonowane do rozwoju poprzez zastosowanie wysokiego ciśnienia hydrostatycznego. **Doktorantka** przeprowadziła ocenę zarodków w aspekcie ich rozwoju i ekspresji wprowadzonego transgenu oraz ekspresji kluczowych dla rozwoju zarodków genów (OCT4, BCL2 oraz CASP7).

Doktorantka w sposób bardzo przejrzysty i logiczny przedstawiła sposób realizacji tych skomplikowanych, bo wieloetapowych badań, które obejmowały:

1. wyznaczenie stosunku nanocząstek do użytego plazmidowego DNA Pmax FP-Red-N,
2. ustalenie optymalnego stosunku ilościowego 10nm sferycznych nanocząstek złota z powierzchniową modyfikacją PEI,
3. ocenę efektywności transfekcji zygot królika po zastosowaniu kompleksu nanocząstki/DNA oraz plazmidu Pmax FP-red-N,



4. zastosowanie wysokiego ciśnienia hydrostatycznego (HHP) jako czynnika prekondycjonującego zygoty królika do rozwoju,
5. zastosowanie wysokiego ciśnienia hydrostatycznego (HHP) o wartościach 20 i 40MPa jako czynnika prekondycjonującego zygoty królika przed transfekcją kompleksem nanocząstki/DNA,
6. wpływ transfekcji kompleksem nanocząstki/DNA oraz HHP na ekspresję genów OCT4, BCL2 oraz CASP7 w blastocystach królika.

Na uznanie zasługuje zamieszczenie przez **Doktorantkę** schematów poszczególnych doświadczeń, które umożliwiły zrozumienia tego skomplikowanego układu eksperymentalnego.

W rozdziale **WYNIKI** Doktorantka konsekwentnie analizuje uzyskane rezultaty według schematu przedstawionego w **MATERIAŁACH I METODACH**. Wyniki zostały zaprezentowane w formie schematów, tabel, wykresów oraz fotografii.

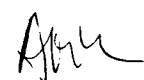
W niniejszym rozdziale pewne zastrzeżenia budzą nieprecyzyjne opisy fotografii, między innymi:

1. Fotografie 1-4 są podpisane jako zarodki transgeniczne, a w rzeczywistości tylko dwie z nich prezentują zarodki pod mikroskopem fluorescencyjnym.
2. Na fotografii 1 i 2 pokazane są dwa zarodki, z tym, że tylko jeden wykazuje fluorescencje, co powinno być zaznaczone.
3. Na fotografii 7, tylko jeden zarodek wykazuje ekspresję, i to tylko w kilku blastomerach, co świadczyłoby, że jest on mozaiką.

W rozdziale **DYSKUSJA**, **Doktorantka** szczegółowo ustosunkowała się do uzyskanych wyników w świetle danych literaturowych. W sposób bardzo klarowny zostały przedyskutowane wszystkie aspekty związane z właściwościami i możliwościami wykorzystania nanocząsteczek, również w kontekście ich modyfikacji powierzchniowych. **Doktorantka** w sposób interesujący przeprowadziła dyskusję odnośnie toksyczności nanocząsteczek. Jak wskazuje **Doktorantka** modyfikacja nanocząsteczki złota poprzez związanie z PEI dawały trwalszy efekt ekspresji w zarodkach. Kolejnym zagadnieniem tej rozbudowanej **Dysertacji** było prekondycjonowanie zygot do mikroiniekcji. O ile **Doktorantka** obserwowała pozytywny wpływ prekondycjonowania zygot przed hodowlą na ich dalszy rozwój, o tyle był on negatywny po mikroiniekcji. Interesującą częścią **Dyskusji** było omówienie w kontekście danych literaturowych, rozwoju zarodkowego po mikroiniekcji oraz ekspresji w nich kluczowych genów, między innymi związanych z pluripotencją komórek oraz rozwojem zarodkowym (Oct4) a także z apoptozą (BCL2 oraz CASP7),

W rozdziale **WNIOSKI**, Doktorantka na podstawie uzyskanych wyników wyprowadziła 8 wniosków:

1. Przy stężeniu 50ng/μl nie odnotowano toksycznego wpływu nanocząstek złota o średnicy 10nm z modyfikacją powierzchniową PEI (polietylenoimina) na rozwój zarodków królika do stadium blastocysty.
2. Stężenie 100ng/μl działa toksycznie na zygoty królika.
3. Na podstawie przeprowadzonych testów retardacji stwierdzono, że optymalne wiązanie pomiędzy nanocząstkami złota z modyfikacją PEI a DNA (plazmid DNA, Lonza) zachodzi w stosunku 2: 1, tj. 50ng/μl nanocząstek: 25ng/μl DNA.
4. Efektywność transfekcji zygot królika z zastosowaniem kompleksu nanocząstki/DNA (50ng/μl:25ng/μl – 2:1) mierzona odsetkiem blastocyst wykazujących ekspresję genu reporterowego (Pmax FP-Red-N) wyniosła 18,7%. Całkowity odsetek blastocyst uzyskanych z zygot po *transfekcji* kompleksem nanocząstki/DNA był na podobnym poziomie, co odsetek blastocyst uzyskanych w grupie kontrolnej (zarodki niemanipulowane) – 44,51 versus 40,75%.
5. Zastosowanie wysokiego ciśnienia hydrostatycznego (HHP) przed hodowlą in vitro niemanipulowanych zygot królika skutkowało uzyskaniem większego odsetka zarodków w stadium blastocysty. W grupie poddanej działaniu HHP o wartości 20MPa stadium blastocysty osiągnęło 65,4% zarodków, natomiast w grupie poddanej HHP o wartości 40MPa 72,9% zarodków. Stadium blastocysty w grupie kontrolnej (zygoty niepoddane działaniu HHP i niemanipulowane) osiągnęło 40,75% zarodków
6. Zastosowanie HHP o wartościach 20 i 40MPa przed transfekcją zygot królika kompleksem nanocząstki/DNA (50ng/μl: 25ng/μl – 2: 1) wpływa negatywnie na rozwój zarodków w hodowli in vitro oraz na efektywności transfekcji. Efektywność transfekcji mierzona odsetkiem blastocyst z ekspresją genu reporterowego RFP, po zastosowaniu HHP o wartości 20MPa przed transfekcją z zastosowaniem nanocząstek wyniosła 13,47 %, natomiast w grupie poddanej przed transfekcją działaniu HHP o wartości 40MPa - 13,67 %. W grupie poddanej wyłącznie transfekcji z wykorzystaniem nanocząstek wartość ta była wyższa i wyniosła 18,7 %.
7. Zastosowanie wysokiego ciśnienia hydrostatycznego o wartościach 20 i 40MPa przed hodowlą in vitro niemanipulowanych zygot królika, spowodowało istotnie wyższą ekspresję genu OCT4 związanego z rozwojem zarodkowym, a także genów BCL2 oraz CASP7 biorących udział w regulacji procesów apoptotycznych. Nie stwierdzono statystycznie istotnego wpływu HHP na ekspresję genu OCT4.

 4

8. W grupie zygot transfekowanych kompleksem nanocząstki/DNA nie wykazano statystycznie istotnego wpływu zastosowanego postępowania na ekspresję badanych genów.

Z wymienionych przez **Doktorantkę** wniosków, wniosek 1 i 2 powinny zostać połączone. Wniosek 8 budzi pewne zastrzeżenie, wynikające ze zbyt daleko idącego uogólnienia. Moim zdaniem wniosek ten powinien brzmieć: Zastosowanie do transfekcji zygot królika kompleksu 10nm sferycznych nanocząstek złota z powierzchniową modyfikacją polietylenoiminy (AuPEI) oraz DNA (plazmid Pmax FP Red-N, Lonza) w stosunku ilościowym 2: 1 (stężenia 50ng/μl: 25ng/μl) pozwala na uzyskanie prawidłowo rozwijających się zarodków wykazujących jednocześnie ekspresję RFP na poziomie 18,7% oraz prawidłową ekspresję kluczowych dla rozwoju zarodkowego genów (OCT4, BCL2, CASP7).

W **Dysertacji Pani mgr inż. Natalii Dziegiel** dostrzegłam pewne niefortunne sformułowania, które opisałam powyżej. Pragnę jednak podkreślić, że w żadnym stopniu nie obniżają one mojej wysokiej oceny niniejszej **Rozprawy Doktorskiej**.

Na szczególne uznanie zasługuje odwaga **Doktorantki**, która podjęła się bardzo ryzykownych badań, a do tego czasochłonnych i pracochłonnych, wymagających ogromnej wiedzy z zakresu biologii molekularnej, embriologii i rozrodu. Na uznanie zasługuje również nowoczesna i zaawansowana metodyka badań, a także niezwykle klarowny i logiczny układ całości pracy oraz poprowadzenie **Dyskusji**.

W kontekście badań **Doktorantki** nasunęły mi się 3 pytania, na które mam nadzieję uzyskać odpowiedź podczas **Obrony**, a mianowicie: 1) Jakiej wielkości transgeny mogą być wprowadzane przy użyciu mikroiniekcji do zygoty z wykorzystaniem nanocząsteczek?; 2) W aspekcie tworzenia zarodków mozaikowych, w jaki sposób kontrolowany był moment replikacji DNA w zygotach króliczych?; 3) Jaka może być przewaga stosowania zmodyfikowanych nanocząsteczek, jako wektorów nad technologią CRISPR-Cas9.

Podsumowując, badania przedstawione przez **Panią mgr inż. Natalię Dziegiel** w **Rozprawie Doktorskiej pt.: Opracowanie metody transfekcji zygot królika z zastosowaniem nanocząstek**, pozwoliły na osiągnięcie wartościowych wyników, wpisujących się w światowe osiągnięcia z zakresu transgenezy. Biorąc pod uwagę dociekliwość naukową oraz walory poznawcze niniejszej **Dysertacji** uważam, że odpowiada ona całkowicie wymogom stawianym rozprawom doktorskim, zgodnie z art.13 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku: o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U., nr 65, z 2003r., poz. 595, z póź.zm) oraz przepisom wprowadzającym ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz.1669 z póź.zm.).



Przedkładam, zatem **Radzie Naukowej Instytutu Zootechniki – Państwowego Instytutu Badawczego** wniosek o dopuszczenie **Pani mgr inż. Natalii Dzięciel** do dalszych etapów przewodu doktorskiego, w celu nadania stopnia **doktora w dyscyplinie zootechnika i rybactwo.**

Anna M. Dżurkiewicz