



Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet, Halgazdálkodási Tanszék
2100 Gödöllő, Páter Károly u. 1., telefon: +36 28 522 000/2315, fax: +36 28 522 927
e-mail: Horvath.Akos@mkk.szie.hu

Válasz Dr. Nagy Szabolcs opponensi véleményére „A spermamélyhűtés szerepe egyes természetvédelmi és gazdasági szempontból jelentős halfajok genetikai tartalékainak megőrzésében” című MTA doktori értekezésemről

Tisztelt Professzor Úr!

Először is fogadja őszinte és hálás köszönetemet a disszertációm tárgyilagos és építő jellegű bírálatáért! Nagyon sokat jelent nekem, hogy Professzor Úr vette a fáradságot és elolvasta a munkámat. Válaszomban igyekszem reagálni az összes felmerült problémás részletre.

1. A Bíráló kifogásolta, hogy a táblázatokban közölt $\pm$ értékek, illetve egy kivétellel az oszlopdiagramok hibásávjai esetében elmulasztottam közölni, hogy azok mit jelentenek. Valóban, ezt pótolnom kellett volna, ezek az értékek minden esetben szórást (SD) jelentenek. Mivel mindenhol szórást használok, valószínűleg el is felejtettem, hogy ezt az információt közölnöm kellett volna.

2. Azzal egyet tudok érteni, hogy a sperma inkább sejtszuspenzió, mint szövet (habár amennyiben a vér szövetnek minősül – és bizonyos definíciók szerint annak – akkor szerintem a sperma is), azonban azzal már vitáznék, hogy mélyhűtéskor a spermiumokat hűtjük és nem a spermát. A sperma hígításakor (legalábbis halakban) a spermát nem reszuszpendáljuk, hiszen előtte nem távolítjuk el a szeménális folyadékot. Ilyenkor a spermát csak tovább hígítjuk a különböző mesterséges oldatokkal, de az addig benne lévő anyagok megmaradnak.

3. Egyet értek a Bírálóval abban, hogy a Catsper ioncsatornák felfedezése valóban nagy előrelépést jelentett a Ca^{2+} -transzport jobb megismerésében és ezt valóban ismertetnem kellett volna a dolgozatomban. Ettől függetlenül a Bíráló által kifogásolt mondat a Ca^{2+} -influx következtében lezajló sejttani folyamatokra vonatkozik, nem a Catsper-csatornák által szabályozott kalciumbeáramlásra.

4. Nem tudok egyet érteni a Bíráló azon megjegyzésével, hogy a spermabírálati módszerek pontossága helyett megfelelőbb lett volna precizitást írni. Egyrészt *A magyar nyelv értelmező szótára* (<http://mek.oszk.hu/adatbazis/magyar-nyelv-ertelmezo-szotara/elolap.php>) szerint a precizitás fokozott mértékű, különös gondosság, pontosság, így a két szó jelentése átfedi egymást. Másrészt több esetben egyszerűen rosszul hangzana a precizitás szó, pl. a 15. oldal, 2.2. szakasz, 2. bekezdés 8. mondatában: „A becslés precizitása függhet az azt végző személytől is”.

5. Egyetértek a Bírálóval, hogy a rodamin 123 nevét teljes egészben ki kellett volna írnom első említéskor, illetve szerepeltetnem kellett volna a rövidítések jegyzékében.

6. A Bíráló hiányolja a citométeres mérések során a kétdimenziós reprezentatív dot-plot bemutatását a citométeres régióvizsgálat és kapuzási stratégia illusztrálására. Valóban, ezek kimaradtak a dolgozatból, de biztosíthatom a Bírálót, hogy ezekkel rendelkezem és be is tudom őket mutatni. A dolgozatból azért maradtak ki, mert a dolgozat alapját képező cikkekben sem voltak benne.

7. Valóban, az áramlási citométerben egy 488 nm hullámhosszú, 15 mW-os léghűtéses argon lézer működött.

8. A CASA-mérések esetében valóban csak a progresszív motilitást vettem figyelembe az adatok közlése során. Ennek az az oka, hogy számomra ez a legfontosabb információ a sperma motilitásával kapcsolatban. A progresszív motilitás beállításai lehetővé teszik az olyan sejtek figyelmen kívül hagyását, amelyek csak egy helyben, vagy bizonyos határérték alatti sebességgel



mozognak. Ennek megfelelően a progresszív motilitás értékeit megfelelően reprezentatívnak tartottam az eredmények bemutatására. Az e mellett kapott egyéb adatok (pl. sebesség, illetve a különböző sebességi adatokból számított indexek) a progresszív motilitás nélkül nem informatívak és a jelen dolgozathoz nem tettek volna hozzá releváns információt. Ettől függetlenül, természetesen ezek az adatok is megvannak és szükség szerint a Bíráló rendelkezésére tudom őket bocsátani.

9. A Bírálónak az áramlási citometriával kapott életképesség adatokkal szembeni kifogásával maximálisan egyet értek, szerintem is ez a dolgozatom leggyengébb pontja. Mai tudásom mellett az itt közölt adatokat elvetettem volna, ahogy azt a Bíráló is javasolja. A dolgozatba azért kerültek bele ezek az adatok, mert a tudományos közleményeimben is ebben a formában jelentek meg.

10. Egyetértek a Bírálóval, hogy a mélyhűtés okozta akroszóma-sérülések esetében nem lehet akroszómareakcióról beszélni, ugyanakkor dolgozatomban valószínűleg nem maga a mélyhűtés okozta az akroszómafilamentum megjelenését tokfélékben. Tengerisün-spermában japán kutatók bizonyították, hogy a dimetil-szulfoxid kémiai tulajdonságai révén elindíthat egy olyan folyamatot, ami spontán akroszóma-reakcióhoz vezethet (Mikami-Takei et al., Dev. Growth Differ. 30 (1987) 125–135). Ennek alátámasztására szolgált az általam az eredményeim értékelésekor idézett és kimondottan tokfélék spermáján végzett tanulmány is (Pšenička et al., Cryobiology 56 (2008) 251–253), ahol szintén akroszóma-reakciót említenek a szerzők.

11. Valóban nem foglalkozom a nagyobb térfogatú műszalmák esetében az eltérő térfogat-felszín arány kérdésével. Ennek elsősorban az az oka, hogy saját tapasztalataink alapján a különböző halfajok spermája nagyon eltérő módon reagál a nagyobb térfogatú egységekben való hűtésre. A ponty vagy a lapátorru tok esetében valóban gyengébb termékenyülést eredményezett az 5 ml-es műszalmák használata, mint a 0,5 ml-eseké, ugyanakkor a harcsában kapott – a dolgozatban is idézett – eredményeink szerint (Bokor et al., Aquaculture Research, 2010, 41, 1549–1551) az 5 ml-es műszalmákban mélyhűtött spermával 92–95%-os kelést tudunk elérni. Pénzes pérben is kipróbáltuk ezeket a nagyobb térfogatú műszalmákat, és a legjobb eredmény 5% kelés lett (nem közölt eredmények). Ennyire eltérő termékenyítő képesség mellett nagyon nehéz tárgyalni a felszín-térfogat hatását, mivel a faj hatása nyilvánvalóan sokkal erősebb.

12. A mélyhűtés okozta genomaktiváció esetében nem feltétlenül lett volna hasznos párhuzamot vonni az emlősökben végzett megfigyelésekkel. Ahogy a bíráló is írja, ha a genomkárosodás olyan mértékű, hogy a termékenyítést követő DNS-javító mechanizmusok azt nem tudják helyre hozni, az emlősökben leáll az embrionális fejlődés. Halakban és kételtűekben ugyanakkor a Hertwig-effektus egyfajta analógiája érvényesül és a DNS sérülése elérhet egy olyan mértéket, amikor a spermium genomja már egyáltalán nem vesz részt az utód kialakításában és haploid embrió jön létre. Az embrionális fejlődés tehát nem áll le, hanem lezajlik és a haploid ivadék később, pl. a kikelés után pusztul el.

13. A Bíráló hiányolja az ősvarsejtek átültetése taglalásánál a recipiens állatok saját spermatogóniumainak vagy oogóniumainak eltávolítására alkalmazott buszulfán kezelés említését és értékelését. Valóban, a buszulfán-kezelés alkalmas erre feladatra és többen (elsősorban brazil kollégák, Luiz de França kutatócsoportja) használják is ezt az eljárást. Mindenképpen vitatkoznék ugyanakkor azzal a megállapítással, hogy a buszulfán kezelés lenne a „leggyakrabban” alkalmazott eljárás a recipiens sterilizálására, mivel ezt a kezelést kizárólag a kifejezett egyedekben alkalmazzák. A halakban végzett transzplantációs eljárások nagy részében viszont frissen kikelt ivadékba ültetik be az ősvarsejteket, amelyek sterilizációjára más



módszerek használatosak, pl. a triploidizáció, hibridizáció, illetve a dolgozatban is említett antiszensz oligonukleotid morpholino-kezelés. A buszulfán-kezelés előnye és egyben hátránya az, hogy kifejlett egyedekben használják: a felnőtt egyedekkel végzett munka sok esetben egyszerűbb, azonban nagyobb a recipiensek immunválaszának és a beültetett sejtek kilökődésének az esélye is, különösen egymástól jelentősen távol álló fajok esetében. Megjegyzem, hogy nem tudok olyan tanulmányról, ahol buszulfán-kezelést követően a recipienstől spermát vagy ikrát fejtek volna és azt felhasználták volna termékenyítésre. Kizárólag a beültetett sejtek megtapadását és proliferációját regisztrálták, miközben az embrionális vagy ivadékkorban sterilizált egyedekbe végzett beültetés rendszeresen eredményez sikeres spermatogenezist, oogenezist és donor-eredetű ivadékokat a recipienstől fejt ivarsejtekből.

Abban a reményben, hogy Professzor Úr megfelelően találja a bírálati pontokra adott válaszaimat, még egyszer szeretném megköszönni a dolgozatomra fordított időt és energiát.

Tisztelettel,

Dr. Horváth Ákos
tudományos főmunkatárs

Gödöllő, 2019. június 26.