

Bírálóí vélemény

Dr. Nagy Szabolcs Tamás

„Gazdasági állatok spermaminőség-ellenőrzésének automatizálási lehetőségei” című MTA doktori értekezéséről

A doktori értekezés az MTA vonatkozó követelményrendszerének megfelelő tézises formában került benyújtásra. A dolgozat 76 számozott oldal terjedelemben ismerteti a Jelölt 2004 és 2016 közötti munkásságát az adott témában, és tartalmazza a bemutatott eredeti publikációkat.

A dolgozat a spermiumok egyes membrán-doménjeinek és sejt-organellumainak flow citometriás értékelésével foglalkozik, és a Jelölt ehhez dolgozott ki különböző fluoreszcens tesztek.

A dolgozat címe nem szerencsés, ugyanis Jelölt nem a spermaértékelés automatizálási lehetőségeivel, hanem a spermaminőség a flow citometriás vizsgálatával foglalkozott, így a címben indokolt lett volna ez utóbbi módszert név szerint megnevezni.

A dolgozat gerincét a Jelölt hét publikációja képezi, amelyekben a spermiumok plazmamembrán-állapotát, akroszóma-integritását, mitokondriális membránpotenciál-változásait, illetve a spermium-kromatin mennyiségi és minőségi károsodásait vizsgálta. A közlemények a szakterület vezető folyóirataiban (Animal Reproduction Science, Theriogenology) ill. angol nyelven magyar szakfolyóiratban (Acta Veterinaria Hungarica) kerültek közlésre. A dolgozat részét képezi továbbá a rövidítések jegyzéke és a fent említett hét publikáció listászerű felsorolása is.

A tézises rész igényesen kidolgozott, az eredeti publikációk illusztrációit kiegészítő, (többségében színes) reprezentatív ábrákkal mutatja be az alkalmazott flow citometriai tesztek. Nyelvezete világos, lényegre törő, a szöveg kevés gépelési hibát tartalmaz (pl. 36. oldal: „tesztés mtsaalkalmaztunk”). Az irodalmi áttekintésben ismertetett szakirodalmi adatok megfelelő mélységben tartalmazzák a releváns információkat. Értelemszerűen elsősorban a flow citometriára koncentrált, de (ahogy azt már fentebb is jeleztem) mivel a cím a citometriánál tágabb ismertetést sugall, hiányolom a spermbírálatok egyéb automatizálási lehetőségeinek rövid áttekintését (pl. a CASA, ASMA rendszerek bemutatását) különösen, hogy a CASA-t a Jelölt a citometriás mérések mellett több munkájában is alkalmazta.

Az Anyag és Módszer fejezet az egyes sejtszerv-specifikus vizsgálatok (plazmamembrán-stabilitás, plazmamembrán- és akroszóma-integritás, mitokondriális aktivitás, kromatinállapot) metodikáját ismerteti. Az alkalmazott tesztek, módszerek - a publikációk megjelenése idején – korszerűek, relevánsak voltak. A vizsgálatok egy részét a Jelölt külföldön, a Svéd Agrártudományi Egyetemen, illetve hazai saját laboratóriumában végezte. Az adatelemzés, statisztikai értékelés több esetben eltérnek a szokásosan alkalmazott módszerektől, erre később visszatérek.

Az eredmények és a levont következtetések mértéktartók, elfogadhatók, és úgy az elméleti kutatás, mint a gyakorlat számára hasznosak. Elgondolkodtató az akroszóma-integritás vizsgálatának eredménye, mert közvetlenül felolvasztást követően az élő, sérült akroszómájú spermiumok aránya rendkívül alacsony volt – ezért felmerül a kérdés, van-e egyáltalán szükség akroszóma-értékelésre? Kevesebb munkával ugyanis (egyszerű élő-elhalt sejtértékeléssel) ugyanezt az információt kaphatjuk meg, megspórolva ezzel az akroszóma festését, és a nem specifikus jelölésből adódó esetleges hibákat, stb. Elképzelhető, hogy más állatfajok esetében más lenne a következtetés? Végzett ilyen vizsgálatokat a Jelölt?

A mitokondriális aktivitás-vizsgálatok egy részét a jelölt nem emlősfajon, hanem halak mintáin végezte – mi volt ennek a váltásnak az oka?

A spermium-kromatinállapot értékelése a humán és az alkalmazott állat-andrológiában is egyre hangsúlyosabb terület. Ahogy a Jelölt is említi dolgozatában, a rendellenes kromatin állapot hagyományos spermaértékelési eszközökkel nem detektálható, az ilyen rendellenességek nem

akadályozzák meg a termékenyülést, hanem korai embrióelhalást okozhatnak (aminek a gyakorlati jelentősége főként szarvasmarhában tart érdeklődésre számot). Látható, hogy a Jelölt is – véleményem szerint helyesen - nagy hangsúlyt fektetett kutatómunkájában erre a területre, hiszen a bemutatott hét publikációból három is ezzel a témával foglalkozik.

A kromatinállapot vizsgálatának „gold standard” módszere az úgynevezett Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA). A Jelölt relatíve nagylétszámú bikaállományon végzett vizsgálata azonban a teszt meglepően gyenge diagnosztikai értékét mutatta ki a fertilitás szempontjából. Jelölt eredményei szerint a teszt nem képes megkülönböztetni a szubfertilis és a fertilis egyedeket, ezért joggal merül fel az a kérdés, hogy mi lehet az oka annak, hogy korábban többen is szoros korrelációt közöltek az SCSA eredmények és a fertilitás között.

Az SCSA teszt adatelemzésének bonyolultsága, és a kapott eredmények is indokolják az alternatív tesztek kidolgozását, ill. értékelését. A Jelölt két ilyen módszert is értékelt, amelyek közül az egyik, a TUNEL-teszt az alkalmazott antitestek nem specifikus kötődése miatt hamis pozitív eredményeket adott. Véleményem szerint ez a dolgozat egyik legfontosabb eredménye. A flow citometria ugyanis egy „vak” módszernek tekinthető (hiszen a vizsgáló nem látja a spermiumokat), és mikroszkópos ellenőrzés nélkül semmiképpen sem megbízható. Ugyanakkor a dolgozatban a Jelölt adós marad az észlelt nem specifikus kötődés magyarázatával, és kérdésem az, hogy elképzelhető-e, hogy ez az antitest a mitokondriális DNS fragmentációját jelezte?

A Jelölt által kidolgozott citometriás citogenetikai gyorsteszt kifejezetten hasznos lehet a gyakorlat számára, tekintve, hogy a hagyományos citogenetikai szűrővizsgálatokat vérmintákon végzik, így az import spermaminták nem értékelhetők (és több ízben is így került be kromoszómarendellenesség a hazai szarvasmarha-állományba).

Visszatérve a statisztikai elemzésekre, a jelölt több esetben is olyan statisztikai próbát alkalmaz, amelyek a szakterület nemzetközi irodalmában sem elterjedtek, mint például a ROC-analízis, Bland-Altman teszt, stb. Mi az oka, hogy nem a megszokott elemzési módszereket választotta? Amennyiben ez indokolt, célszerű lenne a nemzetközi szakvélemény mélyebb megismertetése ezekkel a statisztikai módszerekkel, pl. szemleciikk formájában.

A dolgozat és a Jelölt munkásságának fő érdeme, hogy igyekszik az elméleti kutatási eredményeket a gyakorlat számára is elérhetővé tenni. Flow citometriás projektjeiben együttműködött például az ALTA Genetics holland és észak-amerikai spermlaboratóriumaival, valamint az IMV Technologies flow citométer-fejlesztési projektjének tanácsadója volt. Ez utóbbi vállalat termékpalettáján ma már olyan műszereket és teszteket kínál, amelyek a mesterséges termékenyítő állomások rutin spermavizsgálatára lettek optimalizálva, és amelyek kidolgozásában a Jelölt is tevékenyen részt vett. Kérdésem, hogy a Jelölt véleménye szerint a CASA műszerek mennyire felelnek meg a dolgozat bevezetőjében említett ideális in vitro fertilitási teszt feltételeinek, a flow citometriához viszonyítva? A Jelölt új tudományos eredményeit hét pontban ismerteti. Valamennyit elfogadom és nyilatkozom, hogy Nagy Szabolcs Tamás jelen dolgozatban bemutatott eredményei elegendőek az MTA Doktora cím megszerzéséhez, így javaslom a nyilvános vita kitűzését és sikeres védelem esetén az MTA Doktora cím odaítélését.

Budapest, 2020. január 12.

Dr. Gábor György

az állatorvostudomány kandidátusa

Dipl. ECAR

(Európai Szaporodásbiológiai kollégium)