

Válasz

Dr. Gábor György bírálói véleményére

„Gazdasági állatok spermaminőség-ellenőrzésének automatizálási lehetőségei”

című MTA doktori értekezéséről

Keszthely, 2020. 04. 16.

Szeretném először is megköszönni Bírálómnak a részletes formai és tartalmi értékelést, konstruktív kritikai észrevételeket. Elnézését kérem a dolgozat nyomtatott változatában benn maradt gépelési hibákért, az autokorrektor javított olyan szövegrészt is, amelyet nem kellett volna, és sajnos többszöri átolvasás mellett sem vettem észre.

Bírálóm kritikai megjegyzése jogos a dolgozat címére vonatkozóan – valóban szerencsésebb lett volna pontosan feltüntetni a címben is az alkalmazott metodikát. Ennek fényében jogos az az észrevétel is, hogy a dolgozathoz hiányzik az olyan automatizált spermavizsgálati módszerek ismertetése, mint a CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis) és az ASMA (Automatized Sperm Morphology Analysis), különösen, hogy az előbbi több kísérletben alkalmaztam is – mivel azonban dolgozatom tárgya kifejezetten a citometria, és a spermabírálatokhoz kidolgozott fluoreszcens jelölési technikák bemutatása volt, a fent említett módszerek ismertetése véleményem szerint meghaladta volna a jelen munka kereteit. De valóban, a dolgozatom címválasztása konkrétan lehetett volna.

Bírálóm felteszi a kérdést, tekintve, hogy vizsgálataimban rendkívül alacsony volt az élő, sérült akroszómájú spermium aránya, szükség van-e egyáltalán akroszómavizsgálatokra? Valóban, eredményeim arra engednek következtetni, hogy egy egyszerűbb (és olcsóbb) élő-elhalt festési eljárással gyakorlatilag ugyanazt az információt kaphatjuk meg, mint egy akroszómafestéssel – legalábbis a szarvasmarha faj esetében. Más fajokon fluoreszcens festéssel és citometriával ugyan nem, de klasszikus fénymikroszkópos módszerekkel (Kovács-Foote festés tripánkék és Giemsa festék alkalmazásával) végeztünk vizsgálatokat, és észleltünk faji eltéréseket (pl. kosok esetében sokkal nagyobb arányban találtunk élő, sérült akroszómájú ondósejteket).

A mitokondriális aktivitás-mérések során emlősök helyett halakkal dolgoztam, ennek oka az volt, hogy a méréseket fiziológiai hőmérsékleten igyekeztem elvégezni, ami emlősök esetében a citométer testhőmérsékleten való üzemeltetését jelentette volna, és a vizsgálatok elvégzésekor rendelkezésemre álló műszer nem tette lehetővé a minták mérés közben való inkubációját. Modellként azért választottam a halspermiumokat, mert külső termékenyítő fajok esetében a környezeti hőmérséklet fiziológiásnak tekinthető.

Bírálóm felteszi a kérdést, hogy miért szerepelt vizsgálatomban a Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) gyengébben mások korábbi publikációihoz képest. Ennek oka meglátásom szerint részben az, hogy a korábbi tanulmányok jellemzően kisebb bikapopulációt vizsgáltak, mint mi, másrészt diagnosztikai érték megállapítása helyett korrelációanalízist alkalmaztak, ami nem helyes (erre később visszatérek).

A TUNEL-teszt nem specifikus kötődésének magyarázatával valóban adós maradtam a dolgozatban, azonban ennek mélyebb szintű feltárása meghaladta volna a laboratóriumunk analitikai lehetőségeit (transzmissziós elektronmikroszkóp és immunogold jelölés segítségével lehetne véleményem szerint megvizsgálni). Bennem is felmerült a kérdés, hogy a mitokondriumok jelölődése háttérben nem állhat-e a mitokondriális DNS fragmentációja, azonban a fluoreszcens mikroszkópos értékelés során olyan erős fluoreszcens jelet észleltem a mitokondriális hüvelyen, amely sejtfelszíni kötődésre utal, DNS-fragmentáció esetén sokkal kevésbé lenne intenzív.

Vizsgálataimban valóban több ízben is olyan statisztikai próbát alkalmaztam, amely kevésbé közismert, nem megszokott. Ennek oka az, hogy több olyan statisztikai megközelítés is elterjedt széles körben, amelyek nem tekinthetők korrektnek, például a fertilitás előrejelzésére. RP Amann több évtizede publikál szemleciókat ebben a témában, egyik közleményében (Weaknesses in reports of "fertility" for horses and other species. Theriogenology. 2005 Feb;63(3):698-715.) arra hívja fel a figyelmet, hogy a fertilitásvizsgálatokról szóló, tudományos lapokban megjelent (!) cikkek mintegy háromnegyede rossz statisztikai analízist közöl. A probléma ismeretében 2010-ben vendégszerkesztőként cikksorozatot indítottam a Theriogenology szaklapban „Use and misuse of statistics” címmel (Theriogenology, Volume 73, Issue 9, June 2010, Page 1166). A téma kritikus voltát, érzékenységet jelzi az, hogy a cikksorozat két közlemény után leállt, egyszerűen nem találtam olyan vállalkozó szellemű szerzőt, aki kellően tájékozottnak érezte volna magát a statisztika területén, de a sorozat első cikke e sorok írásakor, 10 évvel megjelenése után is vezeti a Theriogenology legtöbbször letöltött cikkeinek listáját.

Végül Bírálóm felteszi a kérdést, a CASA rendszerek mennyiben felelnek meg az ideális *in vitro* fertilitási teszt követelményeinek a citometriához képest? A személyes tapasztalatom az, hogy a kereskedelmi forgalomban elérhető CASA rendszerek jóval többre lennének képesek, mint amit a gyártók által biztosított használati utasítások, gyári szoftverbeállítások kínálnak, így a felhasználók esetleg nem is ismerik fel és nem használják ki a műszerben rejlő potenciált, továbbá a rendszerek többsége drága és viszonylag bonyolult. A CASA multiparaméteres tesztnek tekinthető – a progresszíven mozgó spermium él, azaz ép a plazmamembránja, a mitokondriumok megfelelően működnek, a spermiumflagellum morfológiája normális, és ami talán a legfontosabb előny a citometriával szemben, látjuk a sejteket, így a spermiumfej morfológiai állapota is értékelhető. Másfelől a flow citometria jóval több sejt értékelését teszi lehetővé mintánként, ami jelentősen növeli a mérési precizitást, és az adatelemzés során olyan klaszteranalíziseket hajtunk végre az egyes spermium alpopulációk azonosítására és értékelésére, amelyre a gyári CASA szoftverek nem képesek (a fent említett statisztikai cikksorozat második közleménye pont erről, a CASA mérések statisztikai problémáiról és mélyebb adatelemzési lehetőségeiről szól). A CASA rendszerek esetében a gyakorlat számára egyszerűen használható, olcsó és robusztus eszközök kifejlesztése lehet a cél (erre jó példa a közelmúltban megjelent ONGO rendszer), másfelől a kutatólaboratóriumokban a fentiek értelmében mélyebb adatelemzésre kell törekedni. Mi például jelenleg a nyers CASA adatsorok flow citométeres adatelemző szoftverbe való exportálásával, és a citométeres analízisek során használt megközelítések (régióanalízis, kapuzás, stb) alkalmazásával próbálkozunk.

Szeretném még egyszer megköszönni Bírálómnak, hogy elfogadta tézispontjaimat, és köszönöm konstruktív kritikai észrevételeit, kérdéseit – bízom abban, válaszaimat elfogadhatónak tartja.

Köszönettel,

Dr. Nagy Szabolcs Tamás

egyetemi tanár

PE-GK Állattudományi Tanszék

Keszthely