

Opponensi vélemény

Dr. Nagy Szabolcs Tamás

Gazdasági állatok spermaminőség-ellenőrzésének automatizálási lehetőségei

című MTA doktori (DSc) értekezéséről

Az MTA doktori cím elnyerésére benyújtott disszertáció terjedelme 76 oldal, amelynek végén - függelékként hozzáfűzve - a dolgozat alapját képező 7, nemzetközi folyóiratban publikált angol nyelvű tudományos közlemény is található. Ez a szerkezet a tézises és a hagyományos disszertációs forma keveréke, amely szerencsésen ötvözi a két struktúra előnyeit. Maga a disszertáció magyar nyelven ismerteti a jelölt kísérleteit és eredményeit, tehát a témában valamennyire jártas azon olvasók számára is követhető, akik a publikációkat egyébként nem ismerik. Ugyanakkor a végéhez fűzött és *peer review* értékelési folyamaton átment eredeti közlemények azt támasztják alá, hogy mind a kísérleti elrendezés, mind az eredmények értékelése teljes mértékben kielégíti a tudományos művekkel szemben támasztott minőségi követelményeket. Ebből a szempontból tehát a doktori értekezés opponense abban a szerencsés helyzetben van, hogy a munka tudományos értékéről nem kell külön tanakodnia, mert az egyes szakfolyóiratok független bírálói által igazolt véleményekre támaszkodhat.

A dolgozat elején, közvetlenül a részletes *Tartalomjegyzéket* követően, két oldal terjedelmű *Rövidítések jegyzéke* szerepel. Itt megjegyzendő, hogy miközben a szerző – helyesen - sok triviális rövidítést (CASA, EDTA, IVF, TUNEL, stb) szerepeltet, ugyanakkor viszont más, talán kevésbé ismert rövidítést (pl. DAPI /20.oldal/, MFI csökkenés /54.oldal/) nem old fel, ami a szöveg olvasását helyenként kissé megnehezíti. Egyébként egy ilyen rövid és tömör dolgozatnál megkérdőjelezendő, mennyire van szükség rövidítésekre.

Ez után jön a rövid *Bevezetés és célkitűzések* fejezet, amelyből világosan kiderül a szerző deklarált célja az elvégzett kísérletekkel: a mesterséges termékenyítésre használt sperma domén-specifikus minőségellenőrzésének automatizálása. Ezt a célt az áramlási sejtanalízis (flow cytometry) néven ismert módszerrel kívánta elérni. A szakmai körökben már ismert eljárás meghatározásakor a hibrid szóhasználat (flow citometria) helyett szerencsésebb lett volna végig és következetesen a magyar definíciót (áramlási sejtanalízis) használni, de ennek kizárólag a magyar tudományos kifejezések meghonosítása miatt van jelentősége. Ugyanide kívánczó megjegyzés, hogy miközben mind a közvélekedés, mind a tudományos közösség a mélyhűtött-felolvasztott bikasperma használatát a gyakorlatban problémamentesnek tartja, épp a dolgozatban ismertetett kísérletek mutatnak rá, hogy ezt a szarvasmarha-tenyésztésnél kiterjedten alkalmazott eljárást milyen nagy mértékben terhelik a fagyasztás-felolvasztás, vagy a használt médiumok által okozott különböző sejtkárosodások. Ez a megállapítás még inkább érvényes a többi háziállatfaj spermamélyhűtésére, amelyek gyakorlati hasznosítása messze el is marad a szarvasmarháétól.

A 11 oldal hosszúságú *Irodalmi áttekintés* fejezet a fellelhető és a szerző által legfontosabbnak tartott tudományos közlemények alapján összefoglalja a spermaminőség objektív értékelésére (is) használható számítógépes motilitásvizsgálat által kínált egyes lehetőségeket, köztük a mélyhűtött-felolvasztott bikaspermiumok plazmamembrán-stabilizációjának értékelését fluoreszcens festékkombinációk segítségével. Ezt követően a plazmamembrán- és akroszóma-integritás változásainak nyomon követését ismerteti multikolor áramlási citometriával, majd a mitokondriumok aktivitásának értékelési lehetőségét egy másik festés alkalmazásával. Bár ez egyáltalán nem zavaró,

de az irodalmi áttekintés 1.2 és 1.3 alfejezetének végén ide keverednek a saját vizsgálatok is, amennyiben a szerző itt írja le, mit és hogyan értékelték, illetve vetettek össze az üzemi termékenyítési eredményekkel. Ugyanez vonatkozik az 1.4 alfejezetre, ahol a magas környezeti hőmérséklet hatását ismerteti egy – az eddigiektől távoli – állatfajcsoport, a hal spermiumainak plazmamembrán integritására és mitokondriális aktivitására, noha itt a leírás (az eredmények részletes ismertetése nélkül) csak a vizsgálat céljára korlátozódik. Az 1.5 alfejezet a spermium kromatin-szerkezetének és morfológiájának kapcsolatát részletezi a fertilitással, de ehelyütt megelégszik a saját kísérletek céljának leírásával. Az 1.6 alfejezet két alternatív DNS-károsodási tesztet hasonlít össze egymással: a TUNEL és Nicoletti tesztet. Végezetül az irodalmi áttekintés 1.7 alfejezete tenyészbikák spermájának gyors citogenetikai szűrővizsgálatát írja le DNS-tartalmuk alapján a spermiumok áramlási citometriás hisztogram-analízise segítségével.

A 20 oldal terjedelmű *Anyag és módszer* fejezet (21-41. oldal) 7 alfejezetre bomlik, többé-kevésbé lefedve az *Irodalmi áttekintés*-ben ismertetett témákat. A bírálóban mindjárt a kiindulásnál fölmerült a kérdés, vajon miért a közismerten nem megbízható 60 napos Non-Return Rate (NRR) szolgált a termékenyítés eredményességének megállapítására? Igaz, hogy a két paraméter közötti korreláció utólag az ellési arányokkal összevetve elfogadhatónak bizonyult, de egy ilyen korszerű technikát feldolgozó disszertációban mégis szerencsésebb lett volna a fogamzási arányt NRR helyett rectalis- és ultrahang diagnosztikával alátámasztani. Ebben a részben egy új fogalom is előkerül: a SYBR 14/PE-PNA/PI kombinált differenciál festés, amely az élő és elhalt sejteket hivatott elkülöníteni festődésük alapján. Itt egyes sejtek mindkét színnel megfestődnek – ezeket nevezi a szerző „haldokló” sejteknek.

Feltehetően a szövegszerkesztő hibája miatt a 30. oldal utolsó 3 sora összekeveredett és értelmetlen szöveget eredményezett, amit a dolgozatban megjelöltem. Hasonló jelenség tapasztalható a 36. oldal 2.5.8 alfejezet 3. sorában. Lehet, hogy ugyanezen ok következtében került a 2.1.3. alfejezet (22. oldal) 5. sorába egy (13), amelynek jelentésére nem sikerült rájönnöm. Szintén szerkesztési pontatlanságnak tűnik a 29. oldalon a 2.3.5 alfejezet 4. sorában hivatkozott 1. táblázat, amelynek a motilitásvizsgáló berendezés beállításait kéne tartalmaznia, ám az említett táblázatot nem találtam.

A 42. oldalon kezdődő *Eredmények* fejezet 7 oldal terjedelmű, benne az egyes kísérletek során kapott eredmények felsorolásával, illetve a kísérletek kitűzött célja szerinti értékelésükkel. A bírálóban a 3.1.1. alfejezet olvasásakor felmerül a kérdés, vajon miért lett magasabb az intakt plazmamembránú ondósejtek aránya magasabb a 7 éves korcsoportban, mint a 3 és 5 évesek csoportjában? Egyébként a szöveg tömören és jól adja vissza az egyes kísérletek végén mért értékeket, de egy esetben (3.2. fejezet, 44. oldal 11. sor, talán a bíráló járatlanságából fakadóan) hibásnak gondolom a leírtakat. Az idézett szövegnek ugyanis (*éles csökkenést észleltünk az élő, intakt akroszómájú alpopuláció (DI) esetében*) logikusan a következőnek kellene lennie: *...éles csökkenést észleltünk az elhalt, intakt akroszómájú alpopuláció (DI) esetében...*

A 49. oldaltól kezdődő *Következtetések* fejezet 10 oldalon keresztül magyarázza az előzőekben ismertetett kísérletek eredményeit, valamint a belőlük levonható következtetéseket.

Általánosságban elmondható, hogy a megállapítások mértéktartóak és elfogadhatók, azokat a kapott eredmények jól megalapozzák. Egy helyütt (50. oldal, 4.2 fejezet) a mondatot javasolom átfogalmazni, mivel 2019-ben nem tartom szerencsésnek új eredményként hivatkozni a kapacitáción átesett ondósejtek 2000-ben publikált viselkedésére. Ugyanebben a részben (4.5 fejezet, 57., 58. és 62. oldal) ismételten előfordul a *hamis pozitív* és *hamis negatív* eredmény, amit – tekintettel a szó pejoratív jelentéstartalmára a magyar nyelvben – inkább téves(en) pozitív vagy téves(en) negatív eredményként kellene definiálni.

A disszertáció érdemi részét tömör, mindössze egyetlen oldalas *Összefoglalás* zárja, amely után az *Új tudományos eredmények* leírása következik 7 pontban, és természetesen a részletes *Irodalomjegyzék*. Ez utóbbi 10 oldal terjedelmű és értelemszerűen felsorolja azokat a legfontosabb tudományos közleményeket, amelyek a dolgozat témájához kapcsolódnak. A bírálónak hiányzik az áramlási citometriával végzett és a gyakorlatban széles körben elterjedt sperma szexálás egyik úttörőjének, Lawrence Johnsonnak alapvető cikkeire történő hivatkozás, mivel az áramlási citometria rutinszerűen használt eredménye a kereskedelmi forgalomban is kapható ivarszelektált sperma. Az irodalomjegyzék olvasásakor egyébként feltűnő, hogy az idézett legfrissebb idegen publikáció 2013-ban jelent meg, eltekintve a szerző saját munkái között felsorolt három saját közleménytől (közülük egy 2015-ös, két másik pedig 2016-os megjelenésű). A benyújtott disszertáció alapjául szolgáló lényeges saját közlemények fele ugyancsak 2003-2006 közötti. Ebben az értelemben egy „túlhordott” munkáról beszélhetünk, amelynek főbb elemei már több mint egy évtizede készen voltak, tehát az értekezés korábban összeállítható és beadható lett volna. Nyilván jó oka lehet annak, hogy miért nem így történt és ez a ténymegállapítás a benyújtott disszertáció tudományos értékét nem csökkenti.

A szerző saját új tudományos eredményeit 7 pontban foglalja össze (61-62. oldal). Közülük az 1,2,3,4 és 7. pontban leírtak kétségtől új eredménynek tekinthetők, az 5 és 6. pontban megfogalmazott állítások azonban némi pontosításra, esetleg törlésre szorulnak. Az 5. pontban leírt swim up kezelést ugyanis már évtizedekkel korábban publikálták és ma már az in vitro embrióelőállítási protokollok szerves része. Más kérdés, hogy a szerző ennek a közismert eljárásnak a hatásait hármas fluoreszcens festékkombinációval értékelte. A 6. pontban tett azon megállapítás, miszerint a swim up kezelés hatására megnő az intenzív motilitást, illetve magas mitokondriális aktivitást mutató spermiumok aránya a termékenyítő adagban, ugyancsak köztudott, hiszen épp ebből a célból végeznek swim up kezelést (vagy grádiens centrifugálást) az IVF részeként. Azonban a szerző itt is kombinálja a swim up eljárást egy új festési módszerrel.

Mindezek alapján Nagy Szabolcs Tamás „Gazdasági állatok spermaminőség-ellenőrzésének automatizálási lehetőségei” című doktori munkáját (DT.58.041/19/04), illetve az abban foglalt tudományos eredményeket elegendőnek tartom az MTA doktora cím megszerzéséhez és a nyilvános védelem kitűzését javaslom.

Javasolt kérdések:

1. Hogy látja az ivarszelektált sperma használatának jövőjét annak fényében, hogy magas költségeit a termékenyítési technika módosításával próbálják csökkenteni?
2. Van-e tudása arról, hogy az állattenyésztő (spermatermelő) állomások az áramlási citometriát használják-e rutinszerűen és ha igen, milyen célokra?
3. Mivel magyarázza, hogy egyes hímek spermájának mélyhűthetősége jelentősen eltér a többiekétől? Lehet-e ezen a problémán szelekcióval segíteni?

Budapest, 2020 március 1.

Solti László
az MTA r. tagja
hivatalos bíráló

