

## Bírálat

Dr. Horváth Ákos

### „A spermamélyhűtés szerepe egyes természetvédelmi és gazdasági szempontból jelentős halfajok genetikai tartalékainak megőrzésében”

című MTA Doktori értekezéséről

Dr. Horváth Ákos doktori értekezése 84 nyomtatott oldalon, 10 táblázattal és 16 ábrával mutatja be a 2003 – 2014 között elért tudományos eredményeit. A dolgozat alapját a Szerző 2005 és 2015 között, szakterülete vezető folyóirataiban megjelent közleményei adják. Ez részben megkönnyíti, részben megnehezíti a bíráló dolgát, hiszen az eredmények már szigorú tudományos szűrésen estek át. Az alábbiakban a benyújtott dolgozatra vonatkozó észrevételeimet közlöm.

A Szerző tudományos pályáján egy rendkívül időszerű témán, a spermamélyhűtés *ex situ* génmegőrzésre való alkalmazhatóságán dolgozott, több, gazdasági, illetve természetvédelmi szempontból jelentős halfaj vizsgálatával. Koherensen egymásra épülő projektjeiben korrekt metodikát használt, eredményei mind a tudomány, mind a gyakorlat számára közvetlenül használható információkat szolgáltatnak. A dolgozat szerkesztése megfelel a szokásos formai elvárásoknak, nyelvezete világos, szabatos, jól követhető. Nem mentes azonban kisebb hiányosságoktól, bizonytalan pontoktól, amelyeket az alábbiakban részletesen ismertetek.

A dolgozat táblázataiban közölt +/- értékek és az oszlopdigramok hibásávjai esetében a Szerző elmulasztja közölni, mit jelentenek (SD? SEM?), egyedül a 4. ábra alatt olvasható, hogy a hibásávok szórást jeleznek.

A 11. oldalon a Szerző azt írja: „A sperma volt az első szövettípus” amelyet mélyhűtve tároltak – ez több szempontból is kritizálható állítás, egyrészt a sperma szerintem nem szövet, hanem sejtsuszpenzió, másrészt nem a spermát, hanem a spermiumokat, azaz a sejteket mélyhűtjük, mesterséges hígító közegben reszuszpendálva.

A 14. oldalon a Szerző a spermiumok aktivációját nem teljesen feltárt, ismert folyamatként tárgyalja – az utóbbi években azonban a sejtszintű folyamatok mélyebb megértésében nagy

lépések történtek, így pl. az emlősspermiumok kapacitációjának fontos elemeként megismert Catsper csatornák halak esetében is lényeges szerepet játszanak az intracelluláris kalciumion-szint változásban a spermiumaktiváció során (Sun et al. *Reproductive Biology and Endocrinology* (2017) 15:65). Ennek ismertetését hiányoltam a dolgozathoz.

A Szerző a 15. oldalon – és több más helyen is – az alkalmazott spermabírálati módszerek pontosságáról ír. Mivel sajnos egy teszt esetében sem áll rendelkezésünkre „gold standard”, helyesebb lenne a pontosság helyett precizitást írni.

A 16. oldalon szereplő Rh123 festék teljes neve rodamin 123, ez nem szerepel sem a szövegben, sem a rövidítések jegyzékében.

A saját vizsgálatok ismertetése során, a citométeres mérések kapcsán (25. oldal) hiányoltam egy reprezentatív kétdimenziós dot-plot bemutatását, a citométeres régióanalízis és kapuzási stratégia illusztrálására, ennek szükségességére az eredmények kapcsán még visszatérek.

A citométeres mérések módszertani ismertetésénél hiányolom a lézer leírását (valószínűleg 488 nm-es léghűtéses, 15 mW-os Ar ion lézer volt).

A 32. oldalon ismertetett CASA mérések kapcsán felmerül bennem a kérdés, miért csak a progresszív motilitást vette figyelembe a Szerző? A CASA számos, biológiai szempontból különböző, de egyaránt informatív paramétert rögzít.

Az eredmények ismertetése során a 37. oldalon valóban igen szoros összefüggést látunk az elméleti élősejt-arány és a citométeres mérések eredményei között ( $r^2 = 0,9979$ ), de a közölt lineáris regressziós egyenlet optimális esetben  $y = 1X + 0$  kellene, hogy legyen. Látható, hogy az elméletileg 100% élő sejtet tartalmazó minták valójában kevesebb, mint 70%-ot tartalmaztak. Saját – nagyon limitált – tapasztalataim szerint friss halspermamintákban flow citométerrel, és a Szerző által is használt fluoreszcens festékekkel értékelve közel 100% élősejt-arányt mérhetünk.

A citométeres mérések kapcsán azért is érdemes elidőzni, és ezért is hiányoltam a fentiekben a reprezentatív ábrák közlését, mert a 2., 3. és 5. táblázatokban (38.-39. és 40. oldalak), valamint a 4. ábrán (41. oldal) a 10% metanolkoncentráció esetében magasabb motilitási, mint élősejt-arányt közöl a Szerző. Ez nehezen értelmezhető, mivel elvileg minden mozgó spermium él, de nem minden élő sejt mozog, tehát a kapott eredményekhez képest pont

fordítva várnánk, magasabb élősejt, mint motilitási %-ot (a jelenséget részletesen vizsgáltuk egy korai cikkünkben – Nagy et al., *Theriogenology*. 1999 Nov;52(7):1153-9.). A Szerző maga is jelzi a problémát, és magyarázatként (58. oldal) módszertani hibát feltételez, amelyek véleménye szerint a „kísérletek körültekintőbb végrehajtásával kiküszöbölhetők”. Ha valóban így látja, célszerű lett volna a nem megbízható módszerrel gyűjtött adatokat elvetni, és nem közölni. Feltételezhető, hogy a flow citométeres vizsgálatok beállításaiban kereshető a magyarázat, a citometria gyenge pontja, hogy a méréseket „vakon” végezzük, a kapott fluoreszcenciaintenzitási értékek forrását nem látjuk, így nem megfelelően beállított metodika esetén nagyon precíz, de fals eredményeket kapunk.

Az 5. – 8. és a 11 – 12. ábrák a szövegbeli hivatkozásokhoz képest előre csúsztak, itt a dolgozat követhetősége kicsit nehézkesebb.

A Szerző az 58. oldalon a tokfélék akroszóma-reakciójáról ír. A mélyhűtés okozta akroszómasérülések kapcsán nem helyes akroszóma-reakcióról írni, mivel ezt a kifejezést csak a fiziológias jelre adott válaszreakcióra használjuk, minden egyéb esetben az akroszóma sérüléseiről beszélünk.

Az 1,2 illetve 5 ml térfogatú műszalmák kapcsán (59. oldal) a Szerző nem foglalkozik az eltérő felület/térfogat arány kérdésével, ami a fő oka annak, hogy általánosságban a kisebb térfogatú műszalmák kedvezőbbek a mélyhűtés szempontjából. Az olyan emlősfajok esetében, ahol nagy mennyiségű termékenyítő adagra van szükség (sertés, ló) használnak 5 ml-es műszalmákat is, illetve sertés esetében sikerrel alkalmazták a különböző térfogatú lapos kapillárisokat is (Flatpack, pl. Saravia et al., *Theriogenology*. 2005 Mar 15;63(5):1320-33.). Igaz, a gyakorlatban nem terjedt el alkalmazásuk széles körben.

A mélyhűtés okozta genominaktiváció kapcsán érdekes lett volna párhuzamot vonni az emlősfajokon rendelkezésre álló információval, ugyanis jelenlegi ismereteink szerint a spermiumok DNS-károsodásai nem akadályozzák meg a petesejt megtermékenyülését, hanem a penetrációt követően a petesejt DNS-javító mechanizmusai aktiválódnak a károsodás jellegétől, mértékétől függően, illetve leáll az embrionális fejlődés, ha a károsodás nem javítható mértékű (pl. Olsen et al., *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005 Sep 1;207(2 Suppl):521-31.).

A Szerző dolgozata végén a jövőbeli kutatások irányait jelöli ki. Említést tesz az ősvarsejtek transzplantációjáról, amely valóban izgalmas és rendkívül aktuális téma. Hiányoltam azonban

a vonatkozó részből a recipiens állatok saját spermatogóniumainak eltávolítására leggyakrabban alkalmazott kezelés (buszulfán) említését, pro és kontra értékelését. Ezt a kezelést halak esetében is alkalmazták (Nóbrega et al., PLoS One. 2010 Sep 20;5(9). pii: e12808.).

A dolgozat mellett bírálatra kaptam egy magyar nyelvű téziszüzetet is, amely 23 számozott oldalon ismerteti a Szerző vonatkozó munkásságát. A téziszüzet a dolgozathoz hasonló igényességgel készült, egyetlen kritikai észrevételem az, hogy a SYBR 14 festék nagybetűkkel írandó (7. oldal) – a dolgozatban ez egyébként helyesen szerepel.

A dolgozat hat új tudományos eredményt sorol fel, amelyek mindegyikét **elfogadom**, és ezúton is **nyilatkozom, hogy Dr. Horváth Ákos doktori munkája, a dolgozatban ismertetett tudományos eredményei véleményem szerint elegendőek az MTA Doktora cím megszerzéséhez, és javaslom a nyilvános védés kitűzését, illetve az MTA Doktora cím odaítélését.**

Keszthely, 2019. 05. 02.



Dr. Nagy Szabolcs Tamás

egyetemi tanár

PE-GK Állattudományi Tanszék