

Opponensi bírálat

Urbányi Béla: „*Egyes gazdasági haszonhalaink hímivartermékeinek mélyhűtése, a technológia standardizálásának kidolgozása és gyakorlati alkalmazása*” című MTA doktori értekezéséről

A halak mesterséges szaporításának módszerei sokrétűek, a kezdeti próbálkozások több, mint száz évre nyúlnak vissza, de a leginkább elterjedt módszer a Woynarovich-féle hipofizálás és mesterséges megtermékenyítés, majd Zuger-üvegekben történő keltetés sorozatban történik, miután az ikra ragadósságát kémiai úton megszüntették. Ez a technika a világon a leginkább elterjedt és széles körben alkalmazott. Az eljárás tökéletesítésére, az egyes lépések módosítására világszerte számos próbálkozás történt, s a jelen értekezés beillik ezek sorába.

Az értekezés nem igazán követi a klasszikus felépítést. Ennek két oka lehet: egyrészt logikusan átgondolt rövidítés, azaz szöveg-tömörítés, vagy annak leplezése, hogy a pályázó is kevésnek tartja saját munkásságának eredményeit a doktori fokozat elnyerése céljából. Ez az értekezés olvasásakor ki fog derülni.

A **119** számozott oldal terjedelmű értekezés – amint a címe is mutatja -, egy elméleti kérdés gyakorlati megvalósításának **9** évi kísérletezést lezáró tanulságait összegzi. Az értekezéshez pályázó 33 oldal terjedelmű téziseket csatolt. A disszertáció elolvasásakor az alábbi megjegyzéseket

A „**Bevezetés**”-ben (6-10. oldal) igen impresszíven összegzi azokat a háttér-ismereteket, melyekkel a téma választását indokolja. Meg kell állapítanom, hogy a téma választása kétség nélkül aktuális.

Az „**Irodalmi áttekintés**” (11-44. oldal) a fölvetett témakör igen alapos áttekintését, értékelését nyújtja, s az összes hozzáférhető fontosabb ismeretanyagra építve, bemutatja a mesterséges halszaporítás egy újonnan követett eljárásának elemeit. Központi problémaként szerepel a különböző halfajok hímivartermékének mélyhűtése és mesterséges halszaporításban való felhasználása. Mostanáig mintegy 200 halfaj spermájának mélyhűtését dokumentálták. Ebben a fejezetben az alapismeretekkel ötvözve ír saját eljárásáról, vagyis külön „**Anyag és módszerek**” fejezet nem része a disszertációnak. Ennek a fejezetnek a hiánya kissé nehézkessé teszi az alkalmazott módszerekkel kapcsolatos tisztánlátást, mert azokat az irodalmi ismeretekkel ötvözve közli. Opponensként úgy vélem, ez a fejezet az értekezés teljes terjedelméhez képest terjengős.

Az értekezésben szerző a hagyományos mélyhűtési módszereket követi, azaz védőanyag és optimális hígítási arány mellett alkalmazta a fagyasztást és felolvasztást. személyesen nem követte a mélyhűtött spermából kelt ivadék vitalitását, túlélését, mert ezekkel a munkacsoportjában más foglalkozott. A mélyhűtés okozta DNS-károsodások felderítésére élő-halott fluoreszcens festést alkalmazott citométeres vizsgálattal kombinálva. Elemzi a mélyhűtés hatását az oldatokra, az élő sejtekben és szövetekben végbemenő

folyamatokra, a védőanyagok hatásmechanizmusára, a mélyhűtött sejtek tárolására. Kifejti, hogy a mélyhűtött anyag elhanyagolható károsodás mellett, folyékony nitrogénben korlátlan ideig eltartható.

A 2.3. alfejezet a halak hím ivarszerveinek és ivarsejtjeinek részletes bemutatásával foglalkozik, leírja a here két fő típusát (csöves, lebenyes), a here szerkezetét, a halak spermiumát, a spermatogenezis folyamatát. A ciklusosság szerint a pisztrángtípust és a pontytípust különíti el. Megválaszolatlan kérdés marad, hogy az említetteken kívül (pl. hazai haszonhalainknál, vagy éppen a veszélyeztetett, többnyire kistermetű halfajainknál ez a szerkezet (típus) mit mutat?).

A 2.4. alfejezetben tárgyalja a halsperma-mélyhűtés folyamatát, illetve a spermamélyhűtés történetét. Teret ad a sperma kinyerésének és a natív sperma minősítésének külön figyelmet szentel a CASA (*computer assisted sperm analysis*) eljárásnak.

A következő alfejezet a sperma hűtőművi médiummal való hígítását tárgyalja, s értékeli a különböző médiumok összetételének és hatásmechanizmusainak a természetét. Összeveti a cukor- és sóoldatok alkalmasságát. Igazolja, hogy a sperma motilitása szempontjából a cukor oldatokat célszerűbb használni, de alkalmas, alacsony hőmérsékleten (0-4 °C). A fagyásvédő pufferek a hűtés során lejátszódó kristályosodási folyamatok ellen hatnak, ezért célszerű megválasztásuk döntő jelentőségű, különben a hígítástól is függően (a sperma-hűtőművi arányát általában 1:1 és 1:10 között állítanak be), a vízkristályok jelentős mértékben károsíthatják a mélyhűtött sejteket.

Az egyensúly, vagyis a védőanyag-koncentráció kiegyenlítődése a extra- és intracelluláris tér között, egy rendkívül fontos lépés, mielőtt a sperma mélyhűtése elkezdődne. A sperma hűtése szárazjég-tömb felületére cseppentve ún. „pellet-módszerrel” megoldható. A másik, elegánsabb eljárás a programozható hűtőgéppel történő mélyhűtés, amikor változó űrtartalmú műszalmákba fagyasztják a halspermát. A mélyhűtés harmadik módszere folyékony nitrogén gőzében való hűtés. Ezt követően tárolásuk -196 °C-on folyékony nitrogént tartalmazó kaniszteres kannákban történik. Ebben a fagyasztott sperma korlátlan ideig eltartható.

Rendkívül fontos kérdés a felolvasztás sebessége, amely speciális médiumban vagy vízfürdőn történhet. Pályázó részletesen áttekinti a termékenyítés menetét és hatékonyságát a különböző halfajoknál, amikor a felolvasztott spermát szárazon adják az ikrához, majd ezt követően adnak hozzá hígító vizet, illetve hígító és fagyásvédő folyadékot. Az optimálisnak tekintett arány: 0,25 ml fagyasztott sperma/0,5 ml ikrához 1 ml víz.

Disszertáns a következő, 2.5. fejezetben körbejárja a spermamélyhűtés gyakorlati alkalmazását. Az opponensnek kétségei támadnak a „filozófiai megközelítéssel” felsorolt kritériumokat illetően, mert a felsorolt tényezők nyilván nem azonos módon hatnak a különböző halfajokra. Továbbá olyan általános sablonokat látunk, amelyek – a látvány mellett – nem sok új ismerettel szolgálnak. Mindaz, amit korábban leírt, a 12. sz. ábrán összegződik.

Következő alfejezet a spermamélyhűtés alkalmazását taglalja a halgazdálkodásban, amikor kiderül, hogy a mélyhűtött spermával való termékenyítésnek. A termékenyítés hatásfoka messze elmarad a friss spermával való termékenyítéstől, s a mélyhűtött sejtek inkább ún. spermabank létesítésére alkalmasak. Igaz, a donorok génkészlete így hosszú időre megőrizhető. A fagyasztott spermával való termékenyítés hatásfoka a sperma mennyiségének jelentős növelésével sem növelhető szembetűnő mértékben. A következő alfejezet a mélyhűtésből származó ivadék életképességét elemzi, s az olvasó számára eléggé meglepő konklúzióval zár. A legkülönbözőbb halfajok ilyen szaporításával kapott eredmények azt mutatták, hogy nincs szignifikáns különbség a hagyományos módszerrel és a fagyasztott sperma használatával történt halszaporításában létrejött ivadék túlélésében. Nyilván a tartási és nevelési körülmények ezt az eredményt alapvetően befolyásolják. Így a mélyhűtött sperma használatának előnyei nem igazolhatóak!

A **2.6.** alfejezet a sperma mélyhűtés eddigi eredményeit és problémáit rendszertani csoportok (tokfélék, pontyfélék, harcsaalakúak, sügéralakúak) szerint tárgyalja, ismerteti a nagyszámú kísérlet eredményeit, de újabb szempontok itt nem merültek fel.

A **„3. Eredmények tárgyalása”** (45-99. oldalak) lényegében a saját munkásság ismertetése. Csupán a terjedelem alapján az az opponens benyomása, hogy az értekezés nem igazán arányos, mert ennek a fejezetnek „illik” a legnagyobb terjedelemben foglalkoznia a kítűzött célokkal és tudományos eredményekkel. Az anyagot olvasva azonban meggyőződhetünk arról, hogy a pályázó az adott kérdéskörben jelentős tevékenységet fejtett ki, s eredményei kellően magas színvonalúak. Pályázó felhívja a figyelmet, hogy az értekezésben összegzett vizsgálati eredményeknek csak kisebb hányadát közli a „terjedelmi korlátok” miatt. Erre hivatkozni – enyhén szólva – vicces, mert ez azt a gyanút ébreszti, hogy a disszertáció írója nem képes tevékenységének lényegét összegezni. Szembetűnő

Az **„Általános információk”** alatt megtudjuk, hogy az értekezés anyaga a 2001-2010. évtizedben végzett saját és kooperációban folyt kutatások/vizsgálatok eredményeit tartalmazza. Összesen 8 faj 1724 egyedét vizsgálta (388 ikrás és 1336 tejes). Célja pedig a mélyhűtési eljárások egységesítése. Kérdés persze, hogy a különböző élettani adottságok miatt lehetséges-e a standardizálás akár a terepen, akár a szaporítás laboratóriumi körülményei mellett.

A **„3.2. Kísérleti munka és eredmények bemutatása ponty fajon”** alfejezetben olvashatjuk a vizsgálatok körülményeit a dinnyési tükrös ponty alkalmazásával. Hormonindukcióhoz nem agyalapi mirigy szuszpenzióját, hanem két adagban a hasüregbe injektált, fiziológiás sóoldatban szuszpendált mGnRH analógot és METOCLORAMID vízdoldékony dopamin receptor antagonistát alkalmazott. Ezt követte az ivartermékek gyűjtése s a sperma mélyhűtése ötféle hígító (1:9) alkalmazásával. A folyékony nitrogénben való mélyhűtést követően 40 °C-os vízfürdőben, 13 másodperces felolvasztás következett. Ezután történ 10 g-os adagokra különített ikrák termékenyítése Woynárovich-féle eljárással. A ragadósság megszüntetését követően Zuger-üveges keltetés, majd a kelési arány megállapítása történt. A megfigyelési adatok értékelésére statisztikai eljárásokat alkalmazott. „A kísérletek eredményei” alfejezetben megtudjuk, hogy míg a friss sperma motilitása $84 \pm 7\%$ volt, addig a

felolvasztott spermáé $63 \pm 9\%$ volt. Megállapította, hogy a legjobb termékenyülés 4-8 sejtes állapotban, metanol védőanyag és glükóz hígító alkalmazásával érte el. A legjobb kelési eredményt ($67 \pm 17\%$) ugyanezen anyagok alkalmazásával érte el. A „Következtetések” cím alatt szerző lényegében megismétli a korábban leírtakat néhány irodalmi tételre utalva, azokat kritizálva. Megtudjuk, hogy az egységesítés lényege a hűtőmedium összetételében és a hűtés metodikájában rejlik. Ezt követően módszertani javaslatait hat pont alatt összegzi, s ezek megegyeznek fontosabb megállapításaival. Általánosságban a cukor-oldat alkalmazását javasolja, amely a sóoldatok alkalmazásához képest újszerű.

A „**3.3. Kísérleti munka és eredmények bemutatása pontyféléken**” c. fejezetben munkáját és megfigyeléseit kiterjeszti több, a Dunából származó (Ercsi) hazai pontyfélése (bodorka, karikakeszeg, dévérkeszeg, márna) szaporítására és keltetésére (TEHAG, Százhalombatta). Az indukált ivarérés, ikra- és sperma kinyerés, termékenyítés és keltetés fajokként kis változtatásokkal, a pontynál is alkalmazott módszerekkel történt. A számszerű adatokat a 3-5. táblázatokban közli. Ezeknek a vizsgálatoknak a jelentőségét természetes vizeink halfaunájának védelme, fenntartása vagy pótlása jelenti. Következtetései és javaslatai is erre utalnak, s szerző ezen a téren úttörőmunkát végzett.

A 65-79. oldalakon a harcával végzett kísérleteit és azok eredményeit mutatja be az eljárás némi változtatásával (hígítási arány, halsperma és ikra arányának változtatása), s igen kedvező eredményekről számol be. Javaslatait itt is 6 pontban sorolja fel.

Következik a fogassüllőn, az attalai keltetőben végzett vizsgálatok és eredmények ismertetése (80-87. oldal). Javaslatait az előzőekhez hasonlóan sorolja fel, de a mélyhűtött spermával végzett termékenyítési kísérletek elég gyenge eredményt adtak, így további vizsgálatokat szorgalmaz.

A 3.6. fejezet a Dunából származó kecsge vizsgálatával foglalkozik (88-94. oldal). Különböző (Tsvetkova-, Jähnichen-féle) féle hígítók alkalmazásával. A kapott eredmények föltöbb eltérők, de a kelés arányáról szerző nem nyilatkozik! Kudarcnak tekinti a kecsgén, mélyhűtött spermával végzett termékenyítési kísérleteket. Javaslati inkább a további kísérletek végzését szorgalmazza, mintsem a standardizálás felé mutatnak.

A „**3.7. A standardizálás lehetőségeinek vizsgálata a kapott eredmények alapján**” alfejezetben pályázó gondolatai a mélyhűtött sperma üzemi szintű alkalmazása körül forognak. Ezek: a nagy volumenű termelés, egyszerű technológia, termékek egységesítése (???), a minőség ellenőrzése és biztonsága, standardizáció és harmonizáció, génbanki tárolási rendszerek.

Mindezek után pályázó közli gondolatait „**A hal ivarsejtmélyhűtés fejlődési lehetőségei**”-ről, amelyekkel nagy vonalakban egyet is lehet érteni. Kivéve a 10. táblázatot, mert itt „borul ki az opponensben a liszteszák” ui. ha a tudományos fejlődést s a kutatási eredmények gyakorlati alkalmazhatóságának feltételeit pályázó a „**Törvényi/politikai szemlélet fejlődés**”-ében látja, akkor gyorsan hagyja abba „tudományos” pályafutását!

Az értekezés 100. oldalán a „**4. Új tudományos eredmények**” fejezete olvasható, ahol pályázó 13. pontban foglalja össze az általa újnak vélt eredményeit, s **ezeket kivétel nélkül új eredményeknek fogadom el én is.** A bíráló azonban az 1. pont harmadik sorának olvasásakor feljajdul, mert olyan bosszantó kifejezés, mint a „...alapjaiban determinálják meg...” rémséges magyartalanság, s ezt az eljárásra bocsátás előtt ki kellett volna szűrni (v.ö. még „maga hol bankol?”, „meghatározásra került” = meghatároztuk, stb. stb).

Az „**5. Összefoglalás**” (101-102. oldalak) fejezet meglehetősen szűkszavúan összegzi a különböző, gazdaságilag jelentős halfajunkon végzett kísérletek eredményeit és azok gyakorlati alkalmazását. Itt kísérleteinek lényegét sorolja fel, melyekkel teljes mértékben egyetértek.

Az „**6. Irodalomjegyzék**” 187 tételt sorol fel, ezek között szerepel a pályázó 19 társszerzős és 6 első szerzős közleménye. Urbányi Béla tudományos tevékenységét a Tézisek 30. oldalán és a tud. életrajz adatai között ismerjük meg.

A disszertációt 2 oldalas **köszönetnyilvánítás** zárja.

A csatolt Tézis-füzet kivonatossan tartalmazza a pályázó disszertációjának lényegét (bár nem a bíráló része, önéletrajzi adataiból, valamint a disszertáció köszönetnyilvánításából – nagy megnyugvással – megtudjuk, hogy jóban van az anyósával, kislányait hercegnőknek tekinti, fradiszurkoló, vadászvizsgával bír, labdajátékokban járatos borszakértő, szeret kártyázni és síelni).

Általánosságban:

A disszertáció azokat a kísérleti eredményeket összegzi, amelyek lényegében a Woynárovich féle mesterséges halszaporítási eljárás Horváth László általi továbbfejlesztésének további finomítását jelentik. Ezen a téren a pályázó úttörőmunkát végzett, nagy mértékben egészítette ki ide vonatkozó ismereteinket, s a gyakorlati alkalmazhatóság irányába komoly lépéseket tett. A dolgozat felépítése nem követi a klasszikus struktúrát: a módszereket, irodalmat és saját eredményeket keverve ismerteti. Ezért gyakran fordulnak elő ismétlések, Fogalmazása tiszta, az anyag olvasmányos, de egy-két esetben bántó magyartalanság is bekerült a szövegbe.

Az elvégzett kísérletek eredményei önálló kutatások, illetve szűkebb team-munkában végzett vizsgálatok eredményei, melyeket pályázó logikusan és korrekten értékel, ezeket statisztikai bizonyításokkal is alátámaszt. Lektorált szakfolyóiratban közölt közlemények száma 66, összesített impakt faktora 42,35 és független idézete 371, iskolateremtő. **Összegzett eredményeit tudományra nézve új eredményeknek fogadom el, azokat elegendőnek tartom az MTA doktori cím megszerzéséhez, s javasolom a nyilvános vitára bocsátását.**

Tihany, 2012. december 12.

Bíró Péter az MTA r. tagja