

Vélemény Ungai Salánki Rita PhD dolgozatáról:

Egyedi sejtek izolálása mind adherens, mind szuszpenzióban tartott sejtek esetén komoly technikai kihívást jelent. Különösen nehéz feladat a procedura megfelelő, kis hibaszázalékkal történő automatizálása. A sejtek egyedi, ideálisan fluoreszcens vagy egyéb jel alapján történő felismerése, válogatása, és kis mintatérfogatban történő kezelése kiemelten fontos az egyre nagyobb hangsúllyal bíró transzkriptomikai, proteomikai és egyéb diagnosztikai vizsgálatok esetén. A jelenleg alkalmazott modern technológiák, mint az áramlási citometria forradalmasították a sejtek markerek alapján történő válogatását és fenotipizálását, de számos megoldatlan probléma maradt. Ezen a területen hoz sok fontos újítást a jelölt kutatómunkája, melyet a témában megjelent publikációi is alátámasztanak. A munka azért is időszerű, mert a közelmúltban az egyedi sejtek vizsgálatán alapuló kutatások egyre inkább fókuszba kerültek és ezen a területen az áramlási citometriás sejtválogatás számos problémába ütközik. Kiemelendő az is, hogy a dolgozatban részletezett vizsgálatok nem álltak meg a sejtválogatási módszerek kidolgozásánál, hanem értékes biológiai információt is sikerült gyűjteni a sejtek adhézis erejének meghatározásával és az ebben szerepet játszó sejtfelszíni receptorok azonosításával.

Észrevételek:

- A dolgozatban a szerző általában többes szám első személyben fogalmaz, ami teljesen érthető, amikor egy kutatócsoport és kollaborátorok együttes munkájáról van szó. Az azonban nem tisztázott a dolgozatban, hogy a mikroszkópos, mikromanipulátoros és szoftveres fejlesztések közül mi konkrétan a jelölt munkája, azaz mit jelent az összefoglalás első mondata: "PhD tanulmányaim alatt részt vehettem egy olyan technika kifejlesztésében, mely....". Köthető a dolgozatban feltüntetett technológiai újítások közül konkrétan valamelyik a jelölt munkájához? Ha igen, próbáltak bármit ezekből szabadalmaztatni, vagy "csak" a publikációs jegyzékben megadott közleményekben írták le a technológiai újításokat? Ez utóbbi eshetőség sem csökkenti természetesen a dolgozat és a benne szereplő újítások értékét, de az alkalmazott technikák iránt minden bizonnyal komoly gyógyszerügyi, valamint ipari érdeklődés is lehet.
- A szerző felületre kitapadt neuroektodermális egér progenitor és humán vérből izolált monocita sejteket használva 15-20 mp/sejt válogatási sebességgel 0,4–0,7 µl térfogatú cseppekben egyedi sejteket tudott automatikusan izolálni. Mik a számítógép-vezérelt mikropipetta előnyei egy hagyományos áramlási citofluoriméterrel szemben? Fontos lett volna a "Ha azonban kisszámú vagy akár egyedi sejtek külön-külön térfogatba történő izolálását célozzuk meg, az ezzel a technikával nem hatékony." mondatok mellett néhány konkrét példát is bemutatni, hogy az új eljárások értékét a szakterületen kevésbé járatos kutatók is fel tudják mérni.
- A dolgozatban említésre kerül, hogy az automatizált sejt válogatási és lerakási folyamat nem befolyásolja a sejtek életképességét korábbi vizsgálatok szerint. Végeztek esetleg olyan vizsgálatokat is, hogy a sejtek aktivitását, sejtfelszíni receptorok expresszióját nem befolyásolja-e a válogatási procedura? Ennek transzkriptomikai, proteomikai vizsgálatok esetén komoly jelentősége lehet, és áramlási citofluorimetriás vagy egyéb módszerekkel

a kérdés jól vizsgálható. Hasonlóképpen, nagyon érdekes lett volna a különféle adhézión erőn mutató monociták, makrofágok és dendritikus sejtek sejt felszíni receptorkészletének vizsgálata áramlási citofluorimetriával, hogy az ismert inegrin láncok és egyéb adhézión molekulák sejt felszíni expressziója tükrözi-e a sejt adhézión paramétereit különféle felületek esetén. A hasonló biológiai vizsgálatok segíthetnek a technológiai újításokat a lehetséges alkalmazással és ígéretes kutatási irányokkal is összekötni. A fenti észrevételt ellensúlyozva, a sejtadhéziónban szerepet játszó receptorok blokkolása remek, biológiai szempontból is érdekes kísérlet. A leukociták migrációját irányító különféle receptorok szerepét vizsgáló kutatásokkal szemben ugyanis nem triviális annak megértése, mely receptorok járszanak szerepet a sejtek adhéziónjának erejében. A CD11c/CD18 receptor szerepének feltárása ezért értékes kutatási eredmény. Számos gyulladásos betegség esetén lehet érdekes, hogy a betegség pathofiziológiájában feltételezhetően szerepet játszó sejt típusok adhézión tulajdonságai milyen receptoroktól függenek, és hogyan változik meg ez gyulladásos mediátorok jelenlétében, vagy a sejtek fenotípusának megváltozása esetén. Ezért a TNF α adhézión fokozó hatásának vizsgálata kifejezetten értékes és jól hasznosítható kísérletnek számít.

- A jelölt azt írja: "A 30 perces mérési időtartam azért volt fontos, mert a mérések szobahőmérsékleten történtek, ugyanakkor a sejtek fenntartásához szükséges optimális környezet a 37°C és 5% CO₂. A sejtek ezt a 30 perces mérési időtartamot szobahőmérsékleten, a pH széndioxiddal történő pufferelése nélkül még túlélnek, maradandó károsodást általában nem szenvednek el." milyen konkrét vizsgálatokkal tudja ezt a kijelentést megerősíteni, végeztek ebben a témában méréseket?
- Furcsa szó a sejt "keménysége", mit jelent, mivel lehetne jobban ezt a szót helyettesíteni?
- "Felületi bevonatokban lévő fehérjék pontos számolására" – helyett lehetett volna szebb kifejezést is találni.
- Az összefoglalás fejezetet kicsit elnagyoltnak érzem. Az eredmények újbóli felidézése helyett, örültem volna olyan kérdéskörök alaposabb vizsgálatának, hogy a jelenlegi technológiákkal szemben melyek az új, a dolgozatban ismertetett eljárások előnyei, milyen biológiai kérdéskörben hozhatnak áttörő eredményeket (konkrét példákkal alátámasztva) és milyen további vizsgálatokat terveznek végezni a beállított módszerekkel. Konkrétan az áramlási citofluoriméteres eljárásokkal összehasonlítható a minta térfogata, a szükséges sejtek száma, a válogatás hibája, stb. Szerencsére a tézispontok között jól sikerült az új eredményeket feltüntetni, így az összefoglalás hiányosságai a dolgozat értékét érdemben nem csökkentik.

Véleményem szerint a jelölt új tudományos eredményei a következők:

- Kifejlesztettek egy új számítógép vezérelt mikropipetta rendszert és egy olyan módszert, mely képes automatikusan felismerni és izolálni egyedi sejteket, kis mintatérfogatban, fluoreszcens jel alapján, mely lehetővé teszi egyes sejt populációk szelektív megjelölését és kiválogatását. Ez a módszer rendkívül nagy szolgálatot tehet az egy sejt alapú vizsgálatoknak és komoly tudományos – ipari jelentősége is lehet.

- Új módszereket dolgozott ki egyedi sejtek folyadékrétegből történő kinyerésére, mely könnyen és gyorsan kivitelezhető akkor is, ha a jelölt sejtek csak kis mennyiségben, illetve sok, nem jelölt sejtrel együtt vannak jelen.

- Az új mikropipetta rendszer használatának előnyeit demonstrálta olyan biológiai rendszerekben, melyeket széles körben használnak világszerte: sikeresen mérték meg a sejtek adhéziós erejét és azonosították különféle leukociták adhéziójában szerepet játszó kulcsfontosságú sejt felszíni receptorokat, valamint ezek szerepét gyulladásos faktorok jelenlétében.

Az értekezés alapjául szolgáló publikációk a formai követelményeknek maximálisan megfelelnek.

Össességében a dolgozatban szereplő új tudományos eredmények értékesek, széles körben felhasználhatók, ezért a jelölt számára a doktori fokozat odaítélését a legnagyobb mértékben támogatom.

Dénes Ádám

Budapest, 2016.06.30.

