

Válaszok Dr. Osváth Szabolcs

„Egyedi sejtek automatizált válogatása és manipulációja számítógépes-látás alapján” című doktori (PhD) értekezésem nyilvános vitájához készített opponensi véleményére

Köszönöm Dr. Osváth Szabolcsnak az értekezésem alapos átolvasását és hasznos észrevételeit. Szeretném újra megköszönni a munkahelyi vitára készített előopponensi véleményét is. A bírálatban feltett kérdéseire, megjegyzéseire a következőket válaszolom:

1. kérdés: A pipetta pozicionálásának pontossága befolyásolja az erőmérések pontosságát és reprodukálhatóságát. Hogyan lehetne ezen még javítani?

A dolgozatom 76. oldalán található, hogy: „Az egyedi sejtek adhéziós erejének pontosságát több tényező is befolyásolta. Az egyik tényező a mikropipetta x, y, z irányú pozíciójának pontossága.”

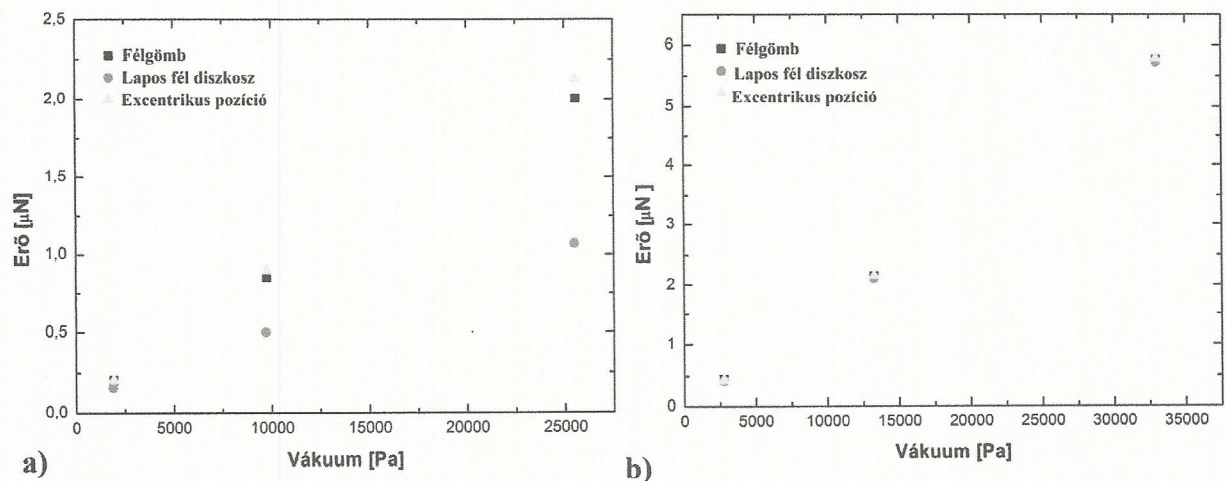
Az erőmérés során a fecskendőben generált kísérleti vákuum értéket az egyedi sejtre ható hidrodinamikai emelő erővé alakítottuk a mikropipettában lévő folyadékáramlás számítógépes szimulációja segítségével. A Petri csésze aljának síkjára merőleges, z irányban a pozicionálási hiba $\pm 1 \mu\text{m}$. Az ebből adódó mérési hiba egy egyszerű becslés alapján 14% a Hagen–Poiseuille egyenletből kiindulva, és $10 \mu\text{m}$ -es pipetta magasságot feltételezve. Ez azonban egyetlen sejt mérése esetén lép fel. De mivel az erőmérések során nem egyetlen sejtet, hanem átlagosan 100 sejtet (vagy ennél többet) mérünk le, így a sejtek átlagos kitapadási erejét ennél sokkal pontosabban tudjuk becsülni. 100 sejt esetén a mért átlag relatív hibája 1,4%.

Ezenkívül a mikropipetta x, y irányú pozíciójának is van hibája. Ez a hiba akkor fordulhat elő, ha a felvenni kívánt sejtet nem pontosan a középpontja fölött találja el a mikropipetta. A sejt alakjának és a mikropipetta pozíciójának emelő erőre gyakorolt hatásának vizsgálatára 3D-s szimulációkat végeztünk.

A numerikus szimulációkat a Petri csésze alján szabadon csúszó peremfeltétellel (1. ábra a) és meg nem csúszó peremfeltétellel (1. ábra b) számolva egy olyan félgömb alakú modellsejttel futtattuk, ahol a mikropipetta a felvenni kívánt sejt középpontját találta el, illetve azt is vizsgáltuk, amikor a mikropipetta a sejtet nem pontosan a középpontja fölött, hanem attól vízszintes irányban $5 \mu\text{m}$ -es távolságban találta el a felvétel során (excentrikus pozíció). Az

eredmények alapján azt mondhatjuk, hogy a mikropipetta xy pozícionálási hibája maximum 4%-os relatív hibát okozott az erőmérésben. (A valóságban az xy pozícionálás pontosabb volt a szimulációban feltételezett 5 mikronos eltérésnél.) 100 sejt mérésekor a 4%-os relatív hiba 0,4%-ra zsugorodik, ha az átlagos kitapadási erő hibáját becsüljük.

A sejt alakjának a hidrodinamikai emelő erőre gyakorolt hatását egy fél diszkosz alakú sejten vizsgáltuk a félgömbbel összehasonlítva. Maximum 2%-os relatív hibát kaptunk a meg nem csúszó peremfeltétel mellett. (A megcsúszó peremfeltétel mellett jelentős eltérést kaptunk a diszkoszra és a félgömbre ható erő között. Ez azonban minden bizonnyal a peremfeltétel nem reális megadásából adódik. A modellsejt határán ekkor ugyanis hirtelen vált a peremfeltétel meg nem csúszóból megcsúszóba.)



1.ábra: A sejt alakjának és a mikropipetta pozíciójának emelő erőre gyakorolt hatásának vizsgálata, 3D-s szimulációkkal, a Petri csésze alján szabadon csúszó peremfeltétellel (a) és meg nem csúszó peremfeltétellel (b) számolva.

Ezeket a hibákat úgy csökkenthetjük, ha a válogatási folyamatot megelőző képkalkotás során, a mikroszkópon nagyon pontosan élesre állítjuk a sejteket a Petri csésze válogatásra szánt területének mind a négy sarkán. Így elkerülhetjük azt, hogy míg a Petri csésze egyes részein lévő sejtek élesre vannak állítva, addig más területeken kevésbé élesek a sejtek. Ugyanis ha a sejtek képét nem állítottuk pontosan élesre a mikroszkópon, akkor a $H=10\ \mu\text{m}$ magasságra beállított mikropipetta sem pontos azokon a területeken, így nem a megfelelő magasságból találja el a sejtet sem.

Mielőtt a válogatási folyamatot elkezdjük, a hegyet a Petri csésze felületétől $H=10\ \mu\text{m}$ magasságra állítjuk be. A felületre kitapadt egyedi sejtek adhézión erejét lépésenként

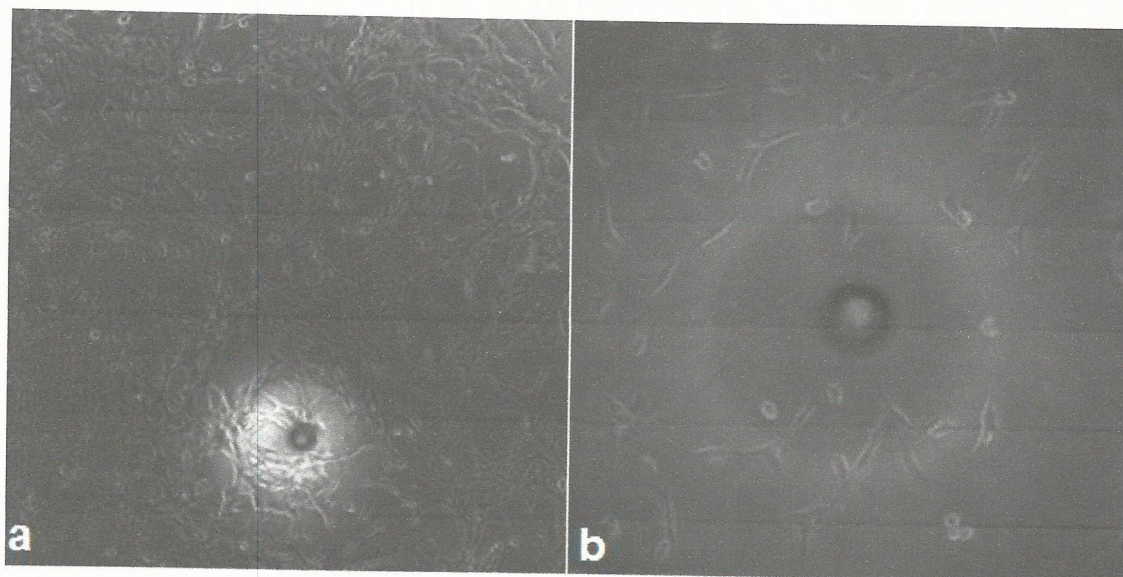
megemelt vákuumot alkalmazva határozzuk meg. Mivel a mikropipetta pontos beállítása nem sok időt vesz igénybe, így célszerű ezt minden válogatási lépés előtt elvégezni, így növelhetjük a mérésünk pontosságát.

Az x, y irányú pozícionálás hibája pontosan mérhető a kísérlet folyamán, ha fényképet készítünk a mikropipetta hegyéről, amikor az adott sejt fölé ér. Ezzel korrigálható a sejtre ható hidrodinamikai erő nagysága. Interferencia mikroszkópia segítségével a sejtek pontos 3D-s alakja meghatározható. Ennek ismeretében elvben minden egyes sejt alakra lefuttatható a szimuláció.

2.kérdés: Lehetséges volna-e a szuszpenzióban lévő sejtek helyét folyamatosan detektálni fényszórás méréssel?

A bíráló ötlete kitűnő, hiszen így az eredetileg válogatásra kijelölt sejteket mindig nyomon tudnánk követni, melynek köszönhetően minden válogatásra szánt sejtet megpróbálhatnánk felvenni, vagyis a felvételből nem zárnánk ki azokat a sejteket, amelyek pl. 100-500 μm -rel arrébb úsztak az eredeti pozíciójukhoz képest (mint, ahogyan azt a jelenlegi megközelítésben tesszük). Azonban a gyakorlatba ezt azért nem tudjuk könnyen átültetni, mert ha a Petri csészében nagyon sűrűn helyezkednek el a sejtek, akkor a célzott sejtek követése nagyon nehéz, ha nincs fluoreszcens képünk. Olyan ez, mintha egy zsák babban az egyes babokat akarnánk követni egy kamerával, miközben a babok ide-oda mozognak. Nem lehetetlen, de praktikusán szinte megoldhatatlan.

A legújabb fejlesztésünk, hogy a mikroszkóp kondenzor lencsájének oszlopát nem kell hátra billentenünk ahhoz, hogy fáziskontraszt képet tudjunk készíteni, így a mikropipettát tartó kar végig a minta fölött helyezkedhet el, lehetővé téve a sejtek folyamatos nyomon követését. A gyűrű alakú LED megvilágítás használatával megteremtettük a sejtek folyamatos detektálásának a lehetőségét, de már most látunk egy technikai nehézséget: a hegy zavarja a képképzést. A hegy közelében, ahol a válogatások során leginkább elmozdulnak a sejtek, nem tudunk jó képet készíteni. Ez a lentebb található két képen is jól látszik, melyek 10x (2. ábra a) és 20x (2. ábra b) objektív mellett készültek 3T3 egér fibroblaszt sejtekről, a LED gyűrűvel való megvilágítást használva.



2.ábra: A bal ill. jobb oldali képen a megvilágító fénykúp palástja az optikai tengellyel 15 ill. 30 fokos szöget (Ph1 ill. Ph2) zárt be.

A fényszórásnál ennél is nagyobb szögben jöhet a fény. Azonban egyrészt a mintatartó (Petri csésze) és az egyéb alkatrészek miatt nehéz nagyobb szögből bevilágítani a mintára, másrészt várható, hogy a hegy ezt is zavarná az üveg mikropipetta reflexiója és eltérő törésmutatója miatt. Valamint azt is figyelembe kell venni, hogy egyszerre mindenképp csak egy maximum ~ 1 mm-es területet tudunk leképezni, és ezen a területen kívül nem lehet a korábban kiválasztott sejteket követni.

3.kérdés: Fluoreszcencia képalkotással nyomon követhető-e a sejtek felületről történő leválásának folyamata?

Adherens sejtek válogatása során, illetve a kitapadt sejtek adhézíós erejének vizsgálatakor is a válogatási folyamat előtt és után fáziskontraszt képet készítettünk a válogatásra szánt sejtekről, így minden egyes válogatási ciklust követően nyomon tudtuk követni, hogy a sejt a felületen maradt vagy pedig levált. Ezzel szemben a szuszpenzióban lévő sejtekkel történő válogatások alkalmával nemcsak a válogatások előtt és után, hanem minden egyes egyedi sejt felvétele előtt és után is fluoreszcens képet készített a szoftverünk, így nyomon tudtuk minden egyes sejt felvételét követni. Egy ilyen kép felvétele a megfelelő minőségű fluoreszcens kép készítéséhez szükséges expozíciós időtől függően általában néhány 100 ms időtartamot vesz igénybe. A sejtek felvétele pedig 10 ms szelepnyitási időt használva történik meg, tehát készíthetnénk arról is képet, amikor éppen a sejt leválása történik a felületről, de ez olyan

gyorsan történik meg, hogy valószínűleg csak annyit látnánk a képeken, hogy egyik pillanatban még a felületen van a sejt, másik pillanatban pedig már felvételre került. Ez a probléma extra erős fluoreszcens jelölés használatával oldható meg.

A válaszom tehát az, hogy igen, érdekes volna a sejtek felületről történő leválásának folyamatát nyomon követni gyors fluoreszcens képalkotással. Ehhez viszont nem a sejt alá, hanem oldalra kellene az objektívet elhelyezni. Hasonló mérést AFM és oldalnézeti fluoreszcensmikroszkóp kombinálásával már végeztek (*Nature Methods* 6, 383-7 (2009)).

Budapest, 2016. 07. 07.



Ungai-Salánki Rita Zsanett