

Válaszok Prof. Dr. Panyi György bírálatára

Először is szeretném megköszönni Professzor Úrnak hogy alaposan, minden részletre kiterjedően véleményezte értekezésemet. A bírálat kapcsán számos érdekes felvetése és észrevétele volt mely a dolgozatom elmélyült tanulmányozását bizonyítja. Továbbá külön köszönöm elismerő szavait. A Professzor Úr által feltett észrevételekre, kérdésekre az alábbiakban válaszolnék.

Általános megjegyzések:

1. Professzor Úr megjegyezte, hogy mivel az értekezés jelentős része a CFTR csatorna működésével foglalkozik, érdemes lett volna részletesebben ismertetni a CFTR csatorna elektrofiziológiai szempontból releváns tulajdonságait és specialitásait, a Csanády munkacsoport eredményeire is hivatkozva.

Egyetértek Professzor Úr ezen véleményével. Az értekezés készítése közben bennem is felmerült, hogy a CFTR csatorna egy részletesebb karakterizálásával érdemes lenne kiegészíteni a dolgozatot, azonban mivel nagyon sok területet érint a munkásságom, úgy gondoltam, hogy a kiegészítések nagymértékben növelték volna az értekezés terjedelmét, ami a dolgozat követhetőségének, átláthatóságának rovására ment volna. Ebből adódóan az értekezés végső verziójában arra törekedtem, hogy minél fókuszáltabban mutassam be a munkásságomat. Mindamelllett, ha a doktori titkárság szabályzatával nem ütközik, akkor kiegészítem az értekezés releváns részeit a CFTR csatorna specifikus tulajdonságaival.

2. A Professzor Úr nehezményezi, hogy több téma összefoglalása miatt a diszkusszió messze került az eredmények bemutatásától, amely miatt nehezebben követhetőek az egyes témák.

Köszönöm szépen Professzor Úr javaslatát, egyetértek azzal, hogy érdemes lett volna az egyes témák esetén az eredmények és összefoglalás részt összevonni, ami nagyban megkönnyítette volna az értekezés olvasását.

Formai megjegyzések:

1. A Ca^{2+} felső index néhol elmaradt (pl. 39. oldal)

Köszönöm az észrevételt, való igaz, hogy néhány helyen elmaradt a felső index alkalmazása.

2. Az 5. ábra szövegét szerencsés lett volna részletesebbre készíteni, transzporterek azonosítás, jobb oldal „CF” és „normal” jelentése (gondolom itt a beteg és egészséges összehasonlítása lett volna)

Köszönöm szépen Professzor Úr javaslatát, a rövidítések és transzporterek kiírása, azonosítása valóban nagyban segítené az ábra könnyebb értelmezését.

3. Szerencsés lett volna az ábrák szövegében feltüntetni a disszertáció alapjául származó közleményt, amiből az ábra származik- nagyban segítette volna a disszertáció követését.

Köszönöm szépen Professzor Úr javaslatát. Valóban nagyban segítette volna a disszertáció tanulmányozását, ha feltüntettem, hogy az egyes ábrák melyik közleményből származnak.

Ha a doktori titkárság szabályzatával nem ütközik, akkor az értekezés végleges verziójában Professzor Úr észrevételeit korrigálom.

Szakmai kérdések:

1. módszerek fejezetben írja, hogy nyelőcső biopsziás mintákat is nyertek, melyeket szövettani és PCR vizsgálatokhoz használtak fel. Lehet-e ezekből a mintákból esetleg elektrofiziológiai vizsgálatot végezni? Történt-e erre próbálkozás?

A biopsziás mintákon nem próbáltunk elektrofiziológiai méréseket végezni, ilyen irányú próbálkozások nem történtek. Elképzelhetőnek tartom, hogy ionáramokat lehet mérni a biopsziás mintákon, ehhez azonban a szövetet megfelelően elő kell készíteni. A humán primér sejtek a rágcsló sejtekhez képest sokkal érzékenyebbek nehéz őket sejt kultúrában fenntartani. Arra vonatkozóan voltak próbálkozásaink, hogy enzimatis emésztést követően egyedi sejteket izoláljunk humán nyelőcső biopsziás mintákból, de a viabilitás vizsgálatok azt mutatták, hogy nagyon kevés életképes sejtet tudunk kinyerni. Ezeken aztán fluoreszcens mikroszkópiával próbáltunk különböző sejten belüli paramétereket (pH ill. kalcium változás) detektálni több-kevesebb sikerrel. A többszöri sikertelenség miatt döntöttünk úgy, hogy a funkcionális vizsgálatokat sejt vonalakon végezzük.

A humán mintákon történő patch clamp vizsgálatokra talán az újonnan kifejlesztett organoid vagy sferoid modellek nyújthatnak lehetőséget, melyekben a sejtek megőrzik életképességüket, funkcionálisan aktívak és elképzelhetőnek tartom, hogy a patch clamp technika teljes sejt konfigurációját alkalmazva, alkalmasak lehetnek ionáramok mérésére.

2. Co^{2+} -quench technika: hogyan lehet arról meggyőződni, hogy a sejtek hasonlóan veszik fel a Co^{2+} -t, és a kimutatott különbségek nem a Co^{2+} akkumuláció különbözőségének eredményei? Azaz pl. a 16. ábrán látható különbségek esetén elképzelhető-e hogy a CDCA fokozhatja a sejtek Co^{2+} felvételét, ezért a Co^{2+} quench is hatékonyabb lehet ebben a mintában. Kizárható-ez?

Feltételezem, hogy Professzor Úr a 18. ábrára gondolt. Elképzelhető, hogy a sejtekben eltérőképpen akkumulálódott a kobalt, viszont ez a jelen kísérlet esetében nem befolyásolta a méréseket, ugyanis mindkét csoport (a kontroll és az UDCA kezelt) esetén kaptak CDCA kezelést a sejtek, ezáltal kizárható a CDCA hatásából adódó eltérések a kobalt felvétel tekintetében.

3. Patch-clamp, áram sűrűség: hogyan határozták meg a sejtek kapacitását? Az erősítőn leolvasható C_m értékből, vagy esetleg speciális, C_m meghatározására dedikált

feszültség protokollból? Ez a pA/pF számítások esetén kritikus lehet. Tapasztalatom szerint a whole-cell capacitance compensation áramkör C_m értéke nem minden esetben írja le helyesen a C_m értéket. Mi erről Jelölt véleménye?

A C_m értéket az erősítőről olvastuk le (10 mV-os impulzust alkalmazva és az erősítő belső áramkörét használva a sejtek kapacitásának kompenzálására) és a Professzor Úr által is említett pA/pF egyenlet segítségével határoztuk meg az áramdenzitást. Az így leolvasott C_m érték, bár lehet, hogy nem 100%-ban pontos, de a munkacsoportban (Dr. Mike Gray laboratóriuma, Newcastle-i Egyetem) ahol a patch clamp méréseket végeztem egy korábbi közleményben, (Gray és mtsai, 1993, Am. J. Physiol.) azt találták, hogy az egyedi duktális sejtek kapacitanciája, melyet az erősítővel mértek szinte pontosan megegyezett a sejtek átmérőjéből számított kapacitással.

4. 48. oldal. Az alábbi állítás nem tűnik nagyon megalapozottnak: “100 μ M CDCA a vizsgálatok 20 %-ban (5/26 sejt) volt képes növelni a teljes sejtes áramot, melyből egyedül egy esetben sikerült igazolni a CaCC aktivációját.”. Milyen egyéb bizonyítékok támasztották alá az állítást?

A CaCC aktivációjának a vizsgálatához CsCl tartalmú pipetta oldatot használtunk, ami egyrészt gátolja a K^+ áramokat, másrészt pedig a térfogat szabályozta Cl^- csatornák aktivációját. Emellett a pipetta oldatban lecsökkentettük az EGTA koncentrációját. Annak eldöntésére, hogy az aktivált áram Cl^- szelektív-e az extracelluláris Cl^- -ot glükonát-ra cseréltük (100 mM NaCl helyett 100 mM Na-glükonát-ot tartalmazott a külső oldat) és figyeltük a reverz vagy más néven fordulási potenciálban történő eltolódást. Az említett 5 aktivált áramból egy esetben detektáltunk egy nagyjából 15-20 mV eltolódást a pozitív irányba a Cl^- equilibrium potenciáljához (~ -5 mV) képest, ami arra utalt, hogy a CDCA által aktivált áram Cl^- szelektív volt. Az aktivált áram biofizikai karakterisztikájából következtettünk arra, hogy a CDCA feltehetőleg CaCC csatornát aktivált, ugyanis az aktivált áram jellegzetes időfüggést mutatott, a negatív potenciáloknál inaktiválódott illetve az áram-feszültség (I/V) grafikonon ábrázolva kifelé (outward) irányuló volt. A CFTR csatorna esetében az áram-feszültség karakterisztika közel egyenes, valamint az aktivált áram idő-illetve feszültség független. A maradék 4 esetben a CDCA-által aktivált áram feltehetőleg valamilyen nem-szelektív kation csatorna volt, mivel a Cl^- elvonás hatására nem tapasztaltunk eltolódást a reverz potenciálban. A CaCC jelenlétét pankrász duktális sejteken korábban egérben (Gray és mtsai, 1994, J. Physiol), patkányban (Plant és mtsai., 1993, J. Physiol) emberben (Winterpenny és mtsai, 1998. Pflügers) és tengerimalacban (Gray és mtsai, 1992, Curr. Topics in Membranes) is kimutatták ugyanazon mérési körülményeket alkalmazva. Ezek alapján feltételezzük, hogy a CDCA által aktivált Cl^- áram a CaCC csatorna volt.

5. A 49. oldalon az ábra alatt szerepel ez az állítás: membrán potenciál $25,5 \pm 6,8$ mV-al depolarizálódott (8B ábra). Valószínű valami más paramétert kívánt itt írni mert az ábrán nincs membránpotenciál mérés.

A membrán potenciál helyett a fordulási vagy reverz potenciál a megfelelő, köszönöm az észrevételt.

6. Mennyi volt a szabad Ca^{2+} koncentráció a pipetta töltő folyadékban 0.2 mM EGTA mellett? Tekintve a pipetta töltő folyadék végtelen térfogatát a sejthez képest ez az EGTA koncentráció is igen jelentős puffer kapacitást jelent. Ilyen pipetta töltő oldat mellett mekkora intracelluláris Ca^{2+} koncentráció változás képzelhető el? A KCa1.1 csatorna feszültség- és Ca^{2+} -függése miatt a csatorna működésének nagyon komoly feltételei vannak. Van-e adat arra, hogy CDCA hatására mekkora Ca^{2+} koncentráció változás alakul ki dukális epiteliális sejtekben, ill. hogy esetleg CDCA hatására kialakul-e depolarizáció, ami elősegítené a KCa1.1 aktiválódását. Későbbi (15. ábrán) látható ugyan F340/F380 változás Ca^{2+} mérések során, de kalibráció hiányában nem világos hogy ez mekkora Ca^{2+} koncentráció emelkedést jelent.

A pipetta oldatban általában 5 mM EGTA-t alkalmazunk, melyet a BK csatornák mérésénél 0,2 mM-ra csökkentettünk. Az EGTA jelenlétére a pipetta oldatban azért volt szükség, mert ellenkező esetben a pipetta oldatban túl magas lenne a Ca^{2+} koncentrációja (μM tartományban) mivel a különböző sók révén Ca^{2+} -al szennyeződhet. Mindamelllett 0,2 mM-os EGTA alkalmazása nem mimikálja tökéletesen a sejtben normál körülmények közötti Ca^{2+} puffertelést (részben a citoszólban található fehérjék és transzporterek miatt), de irodalmi adatok alapján számos patch clamp mérés esetén alkalmazták ezt a koncentrációt és ismert, hogy nem szünteti meg teljesen a fiziológiás Ca^{2+} agonisták hatását (Chvanov és mtsai, 2006, Embo J, Ole Petersen, J. Physiol, 1992). Petersen és mtsai. kimutatták, hogy 1 mM EGTA jelenlétében az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció 10^{-9} M azaz nagyjából 1 nM. Az, hogy a CDCA mekkora változást indukál az intracelluláris Ca^{2+} szintben, sajnos kalibráció hiányában nem tudtuk megbecsülni. Azonban Capan-1, pankreász dukális sejt vonalon végzett kísérletek azt mutatták, hogy 0,3 mM CDCA hatására a megnövekedett intracelluláris Ca^{2+} koncentráció 180 nM körüli (Kowal és mtsai, 2015, Cell Commun Signal). Mindemelllett az epesavak képesek depolarizálni a plazmamembránt. (Voronina és mtsai, 2005, J. Biol. Chem) Annak eldöntésére, hogy a CDCA a Ca^{2+} szint emelésén keresztül aktiválja-e a BK csatornákat megvizsgáltuk az intra- és extracelluláris Ca^{2+} elvonás hatását a CDCA aktiváló hatására. A citoplazmatikus Ca^{2+} -ot 5 mM EGTA-tartalmú pipetta oldat alkalmazásával kelátoltuk. Ilyen körülmények között szinte teljes mértékben gátlódott a CDCA BK csatornákra kifejtett aktiváló hatása. Ezt követően megvizsgáltuk az extracelluláris Ca^{2+} elvonás hatását, standard 0,2 mM EGTA-t tartalmazó pipettaoldatot alkalmazva. 0,1 mM CDCA a külső Ca^{2+} hiányában is kisebb mértékben ugyan, de képes volt fokozni a K^{+} konduktenciát, amely 2 mM extracelluláris Ca^{2+} adására további növekedést mutatott. Ezen eredmények arra utalnak, hogy a CDCA maximális aktiváló hatásához mind az intra- mind pedig az extracelluláris Ca^{2+} szükséges, mindazonáltal nem zárható ki, hogy a CDCA hatásában a membrán depolarizáció is szerepet játszik.

7. Ismert, hogy a KCa1.1 β alegységek jelentősen befolyásolják az α alegység működését, feszültség-függését, sőt, gátlószer érzékenységét is. Azt szeretném kérdezni, hogy végeztek-e esetleg β alegység meghatározást, vagy ismer-e esetleg irodalmi adatot erre.

A BK csatornák szerkezetüket tekintve alapvetően 3 alegységből épülnek fel. A pórusképző α alegységből, mely legalább két különálló szabályozó alegység családdal, a β illetve γ alegységekkel áll kapcsolatban. A β és α alegységek száma változó lehet, ami befolyásolja a csatorna fiziológiás sajátosságait. A β alegység családnak 4 tagja ismert ($\beta 1-4$). A β alegységek elsősorban a pórusokat alkotó α alegység N-terminálisán lévő S0 – S2 szegmenseivel lépnek kölcsönhatásba, szabályozva ezáltal a csatorna nyitását. A β alegységek szövetspecifikusan expresszálódnak, befolyásolva ezáltal a csatorna kinetikáját az adott szövetben. A $\beta 1$ alegység tipikusan simaizomban expresszálódik, míg a $\beta 4$ alegység idegi szövetekben fordul elő. Az 1-es, 2-es és 4-es alegységek stabilizálják a csatorna feszültségérzékelő doménjét az aktív konfigurációban, növelve ezáltal a csatorna aktivitását.

Bár mind a 4 β alegységre elérhető ellenanyag jelen tanulmányban csak az α alegység jelenlétét igazoltuk. Irodalmi adatok alapján eddig a $\beta 2$ és $\beta 3$ alegységeket sikerült azonosítani pankrászban (Ohya és mtsai, 2010, J. Pharmacol Sci; Behrens és mtsai, 2000, FEBS Lett; Brenner és mtsai, 2000, J Biol Chem).

8. Mind CDCA mind UDCA esetében mM koncentráció tartományban (1 mM ill. 0.5 mM) vizsgálta a pl. a Ca^{2+} koncentrációra vonatkozó hatást. Mekkora ezen vegyületek koncentrációja *in vivo*?

Az UDCA esetében az általunk vizsgált 0,5 mM-os koncentráció egy nagyságrendel nagyobb mint az epesavak koncentrációja a vérben és néhány nagyságrendel kisebb mint az epesav koncentrációja az epehólyagban (10-100 mM). Az UDCA koncentrációját irodalmi adatok alapján választottuk. Hepatocitákon végzett vizsgálatokban az UDCA védő hatását 0,1-0,5 mM-os koncentrációban tesztelték (Rodriguez C.M. és mtsai, 1998, J. Clin. Invest és Rodriguez C.M. és mtsai., 1999, Cell Death and Diff) találták hatásosnak. A CDCA koncentrációját korábbi vizsgálataink alapján választottuk ki. Epekő okozta obstrukció esetén az epe akár mM-os koncentrációban és elérheti a duktális vezetékrendszert, ezért úgy gondoltuk, hogy az általunk választott 1 mM-os CDCA koncentráció közel áll a patológiás körülményekhez.

9. A 64. oldalon azt írja, hogy “Az EtOH-al ozmotikusan megegyező koncentrációjú mannitol (177 mM)”. AZ EtOH bejut a sejtbe, és ott így dehidrálja a citoszolt, míg a mannitol impermeabilis és extracellulárisan okoz dehidrálást. Hogy lehetett megfeleltetni egymásnak a 177 mM mannitol-t és a sejtmembránon átjutó EtOH-t, főleg annak tükrében, hogy az EtOH metabolizálódik?

Való igaz, hogy az EtOH és mannitol membrán permeabilitása eltérő, ezért nehezen feleltethetőek meg egymásnak. Elméletileg az EtOH könnyen átdiffundál a sejtmembránon és ebből adódóan kiegyenlítődik a sejtben belüli és sejtben kívüli EtOH koncentráció, melynek következtében minimális ozmotikus gradiens alakul ki a vízre. Azonban kísérleteink során a sejtek zsugorodását tapasztaltam az EtOH adását követően, ami feltételezi, hogy még mielőtt az egyensúly kialakul a sejt belseje és az extracelluláris tér között, illetve még mielőtt az EtOH metabolizálódik, az EtOH vizet von el a sejttől. Továbbá a sejtben lévő magas koncentrációjú, jelen esetben 100 mM-os EtOH a normál körülményekhez képest egy hiperozmotikus

környezetet alakít ki, mely feltehetőleg befolyásolja a transzporterek működését. Annak kizárására, hogy az EtOH CFTR csatornára kifejtett hatásában nincs szerepe a megváltozott ozmotikus viszonyoknak, ozmotikusan equivalens mannitol-t alkalmaztunk, amely membrán impermeabilis tulajdonságának köszönhetően vizet von el a sejtől, ezáltal hiperozmotikus környezetet hoz létre. A mannitol adására is hasonlóképpen, zsugorodással reagáltak a sejtek és az alap áram hasonló mértékben emelkedett mint az EtOH esetében, ami alapján feltételezzük, hogy a Cl^- kiáramlással a sejt kompenzálni próbálja a mannitol vagy az EtOH hatására a sejtterefogatban bekövetkező változásokat. A forskolin-stimulált CFTR áram esetében is megfigyelhető volt a mannitol aktiváló hatása, ezzel szemben az EtOH erőteljesen gátolta a stimulált áramokat, ami egy specifikus hatást feltételez.

10. Mi a kórélettani jelentősége a 0.1 M EtOH kezelésnek, ahol a jelentős hatásokat látták a CFTR csatornára? Mennyi alkoholt kell ehhez fogyasztani?

Köszönöm az észrevételt, és egyetértek Professzor Úrral abban a tekintetben, hogy az általunk alkalmazott 100 mM-os EtOH koncentráció kórélettani jelentősége kérdéses, hiszen ilyen magas véralkohol szint akár halálos is lehet. Ezzel szemben vizsgálataink során azt találtuk, hogy az EtOH nagyon magas koncentrációi, akár 100 mM is előfordulhat emberben. Kísérleti körülmények között munkacsoportunk kimutatta, hogy ahhoz, hogy emberben 20 mM véralkohol szint kialakuljon nagyjából 4 dl vodka elfogyasztása szükséges. Ehhez képest idült alkoholisták vérében ennek többszöröse is előfordul, sőt egy esetben 108 mM véralkohol szintet sikerült detektáltunk, aminek eléréséhez nagyjából 2 liter tömény alkohol elfogyasztása szükséges. Ilyen mennyiségű alkohol akár kómát vagy légzésbénulást okozhat azoknál akik nem fogyasztanak rendszeresen alkoholt. Ez alapján feltételezhető, hogy a krónikus alkoholisták szervezete valamilyen mértékben alkalmazkodott nagyobb mennyiségű alkohol elfogyasztásához. Irodalmi adatok alapján az alkoholisták szervezete a 700 mg/dl-es véralkohol szintet is képes tolerálni, ami feltehetőleg a felgyorsult anyagcserével magyarázható. Vizsgálataink során átlagosan 65 mM véralkohol szintet mértünk az alkoholistáknál.

11. A 77. oldalon azt írja, hogy “megvizsgáltuk az epesavak sejtbe jutásának a sebességét is (-J(B-)). A -J(B-)-t az időegység alatti pH változásból számoltuk ($\Delta\text{pH}/\Delta t$) az epesav adását követő 60 másodpercben.” Ez a bíráló számára azt jelenti, hogy az epesavak jelenlétében mért intracelluláris pH változás az epesavak sejtbe jutásával magyarázható, nem pedig pl. az epesavak sav/bázis transzporterekre gyakorolt hatása miatt. Különösen nehezen érthető ez a rész annak tükrében, hogy egy későbbi fejezet az epesavak hatását mutatja az intracelluláris pH szabályzásban résztvevő transzporterekre. Kérem fejtse ki véleményét ezzel kapcsolatosan. Van arra kísérletes bizonyítékuk, hogy az epesavak valóban bejutnak a sejtekbe? Különös tekintettel arra, hogy pl. CDCA pl. hidrofób, nagymolekula (89.oldal), a transzportert pedig nem sikerült azonosítani.

Köszönöm szépen az észrevételt. Az ion transzporter gátlószerekkel végzett kísérleteink alapján egyértelműnek látszik, hogy az epesavak hatására az intracelluláris pH-ban (pH_i) bekövetkező változások, közvetett úton az iontranszporterek aktivitásának a megváltoztatásával valósulnak

meg. Azonban nem zárhatjuk ki azt sem, hogy az epesavak a sejtbe bejutva kémiai tulajdonságaikból adódóan közvetlenül savasodást okoznak. Az epesavak sejtbe történő jutása részben epesav transzportereken keresztül valósul meg, különösen a konjugált epesavak esetén, melyek méretüknél fogva nem képesek áthaladni a sejtmembránon. Ezenkívül az epesavak ionizált állapota is befolyásolja a sejtbe történő felvételt. A nem-konjugált epesavak, mint például a dezoxikólsav, pKa értéke 5,2 és 6,2 között van, ezért neutrális pH-n többnyire ionizált formában van és a membránon nem képes áthaladni. Savas pH-n azonban a nem-konjugált epesavak kevésbé ionizáltak, képesek a sejtbe bejutni és hatásukat kifejteni. Az epesav transzporterek jelenlétét nyelőcső epitél sejteken mi nem vizsgáltuk, azonban Dvorak és mtsai. 3 különböző epesavtranszporter, az apikális Na⁺-függő epesav transzporter (ASBT), az ileális epesav-kötő fehérje (IBABP), és a multidrog-rezistens fehérje 3 (MRP3) jelenlétét azonosították mRNS és fehérje szinten Barrett-es betegekből vett nyelőcsőmintákban (Dvorak és mtsai, 2009, Am. J. Gastroenterol). Mivel kísérleteinket human eredetű diszpláziás (CP-D) és nem-diszpláziás (CP-A) Barrett-es nyelőcső sejteken végeztük, feltételezzük, hogy ezek az epesav transzporterek ezeken a sejteken is megtalálhatóak és elősegítik, hogy a nagy méretű vagy ionizált epesavak transzporter-mediált útvonalon keresztül is a sejtbe jussanak. A pankréász duktális sejtek esetében valóban nem sikerült azonosítani a G-fehérje-kapcsolt epesav receptort, de ez nem zárja ki, hogy esetleg más transzporterrel keresztül jut be az epesav a duktális sejtekbe. Összeségében egyetérték Professzor Úr-ral arra vonatkozóan, hogy az epesavak hatására az intracelluláris pH-ban időegység alatt bekövetkező változás nem feltétlenül az epesavak sejtbe való jutását mutatja, hanem inkább a hatásának a sebességét függetlenül attól, hogy ez közvetett vagy közvetlen úton valósul meg.

12. Extracelluláris Ca²⁺ depléciónál azt tapasztalták, hogy 500 µM BAC hatására kismértékű (Ca²⁺)_i emelkedés volt megfigyelhető, ami arra utal, hogy az epesavak hatására az intracelluláris organellekből szabadul fel a Ca²⁺. A bíráló ebből a kísérletről pont ellenkező következtetést vont volna le. Kérem fejtse ki részletesebben, hogy mi a Ca²⁺ jel forrása.

Annak eldöntésére, hogy az epesavak intracelluláris forrásból szabadítják-e fel a Ca²⁺-ot vagy elősegítik az extracellulárisan lévő Ca²⁺ sejtbe jutását, extracelluláris Ca²⁺ hiányában vizsgáltuk az epesavak hatását a nyelőcső epitél sejtekre. A kísérlet során 10 percen keresztül áramoltattuk a sejteket Ca²⁺-mentes Hepes oldattal, melynek eredményeként az intracelluláris Ca²⁺ szint enyhe csökkenését tapasztaltuk, ami feltehetőleg azzal magyarázható, hogy a külső Ca²⁺ hiányában a sejt Ca²⁺-ot veszít. Ezt követően a sejteket 500 µM epesav koktélt tartalmazó Hepes oldattal perfundáltuk, melynek eredményeként a sejtekben Ca²⁺ felszabadulás volt megfigyelhető, ami bár kisebb volt mint extracelluláris Ca²⁺ jelenlétében mégis azt bizonyítja, hogy az epesavak hatására intracelluláris Ca²⁺ szabadul fel. Mindamellet a gadolinium (Gd³⁺), plazma membrán Ca²⁺ csatorna gátló jelenlétében csökkent az epesavak hatása a (Ca²⁺)_i szintre ami arra utal, hogy amellet, hogy az epesavak indukálják a Ca²⁺ felszabadulását az intracelluláris organellekből, az extracelluláris Ca²⁺ beáramlást is fokozzák.

Végezetül ismét szeretném megköszönni Panyi György Professor Úr értékes bírálatát és releváns kérdéseit. Köszönöm, hogy a nyilvános védés kitűzését javasolta. Bízom benne, hogy Professor Úr válaszaimat megfelelőnek és elfogadhatónak találja.

Tisztelettel és köszönettel:

Dr. Venglovecz Viktória
Tudományos főmunkatárs

Szeged, 2020.06.29