

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék



37. OTDK Biológia Szekció

*Az NFκB p65 transzkripciós faktor expressziójának
belsőszakasz-specifikus változása 1-es típusú diabéteszes
patkánymodellben*

Nagy Vivien
Biológia BSc, III. évfolyam

Témavezetők:

Dr. Bagyánszki Mária és Dr. Bódi Nikolett

TARTALOMJEGYZÉK

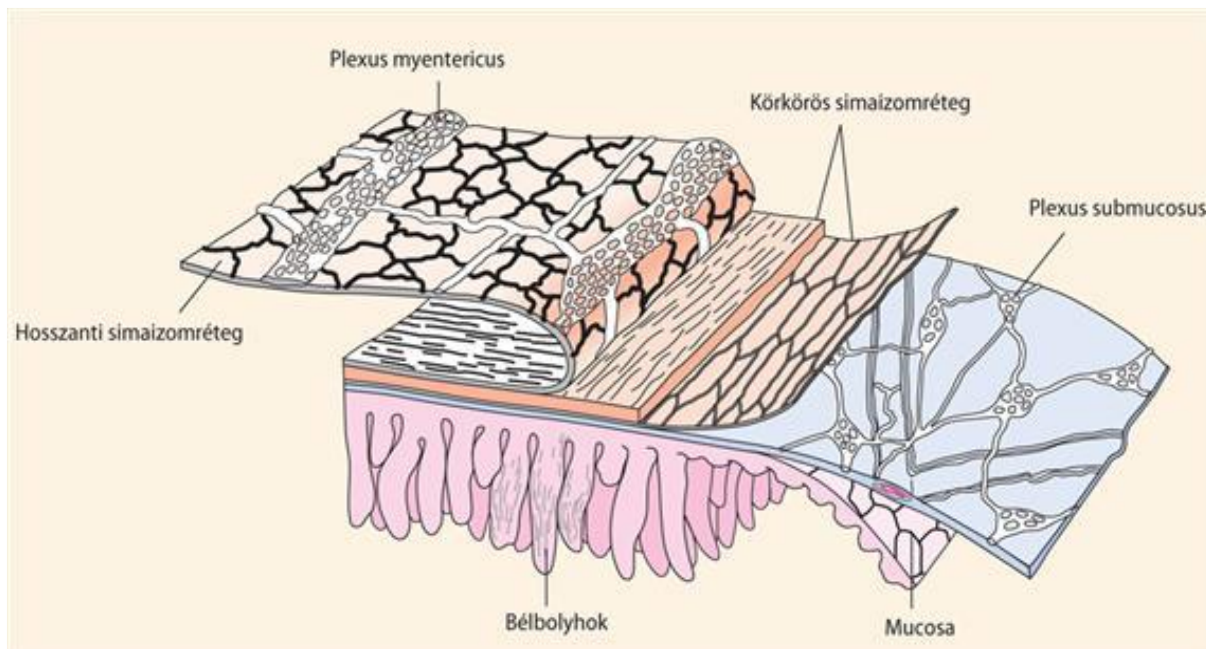
I. BEVEZETÉS.....	2
I. 1. Az enterális idegrendszer felépítése	2
I. 2. A diabétesz általános jellemzése.....	3
I. 3. A diabétesz és az enterális idegrendszer.....	5
I. 4. Az NFκB transzkripció faktor általános jellemzése.....	6
I. 5. Az NFκB és a diabétesz kapcsolata.....	9
II. CÉLKITŰZÉSEK	10
III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	11
III. 1. Állatmodell	11
III. 2. Minták előkészítése	11
III. 3. Posztembedding immunhisztokémiai vizsgálat.....	12
III. 4. Transzmissziós elektronmikroszkópia.....	12
III. 5. Statisztikai analízis	13
IV. EREDMÉNYEK.....	14
IV. 1. A kísérleti állatok tömegének és vércukorszintjének változása	14
IV. 2. Az NFκB p65 fehérjét jelölő arany szemcsék denzitásának változása a vékonybél myenterikus ganglionjaiban.....	15
IV. 3. Az NFκB p65 fehérjét jelölő arany szemcsék denzitásának változása a vékonybél simaizomszövetében.....	18
V. ÖSSZEFOGLALÁS.....	21
VI. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	23
VII. FELHASZNÁLT IRODALOM.....	24

I. BEVEZETÉS

I. 1. Az enterális idegrendszer felépítése

Az enterális idegrendszer (ENS) az autonóm idegrendszer részeként beidegzi a nyelőcső alsó harmadától kezdve a végbélig az egész emésztőtraktust, beleértve az epeutakat és a hasnyálmirigyet is (Fonyó, 2011.). Az ENS fontos feladatai közé tartozik az emésztőtraktus motilitásának, szekréciójának és vérkeringésének szabályozása, amit neurális reflexíveken keresztül koordinál (Hansen, 2003.).

Az ENS az embrionális fejlődés során a dúlcéscsejtekből alakul ki, amelyek a fejlődő bél egészét kolonizálják (Sasseli és mtsai, 2012.). Az ENS-t alkotó neuronok az emésztőtraktus falába ágyazva találhatók meg, ahol az őket segítő gliasejtekkel együtt ganglionokba rendeződve fordulnak elő, melyeket idegelemek kötnek össze egymással. Ezek a ganglionok két jól elkülöníthető idegfonatba tömörülnek a vékonybél és a vastagbél falában, a myenterikus és a szubmukózus plexust létrehozva (1. ábra) (Furness, 2006.). A myenterikus plexus a bélfal külső hosszanti és a belső körkörös izomrétege között található meg a nyelőcsőtől a végbélig (Hansen, 2003.). A szubmukózus plexus a vékonybél és a vastagbél szubmukóza rétegében található meg, általánosságban kisebb neuronok alkotják, mint a myenterikus ganglionokat (Furness, 2006.). A ganglionokban morfológiailag és funkcionálisan is különböző típusú neuronok és gliasejtek találhatók. A ganglionok mérete és a bennük lévő neuronok összetétele bélszakaszonként is változik, régió-specifikusságot mutat a béltraktus mentén (Newgreen és Young, 2002.). Az enterális és a központi idegrendszer közötti kapcsolatot a nyelőcső alsó harmadától a colon transversum első szakaszáig a nervus vagus biztosítja, az emésztőtraktus ettől disztális szakaszait pedig a szakrális paraszimpatikus idegek innerválják (Fonyó, 2011.).



1. ábra A myenterikus és a szubmukózus plexus felépítése (Fonyó, 2011.)

Az ENS-ben található neuronok osztályozhatóak különböző tulajdonságaik alapján, mint például az alakjuk, fiziológiai tulajdonságaik, az általuk innervált struktúrák vagy neurotranszmitterek szerint. Funkció alapján megkülönböztetünk primer intrinsic afferens neuronokat, interneuronokat és motorneuronokat (Furness, 2006.). A primer afferens neuronok a tápcsatorna falának feszülését, a nyálkahártya változását és a tápanyag összetételét érzékelik. Az interneuronok a szenzoros és motoros neuronok közötti kapcsolat létrehozásában vesznek részt (Fonyó, 2011.). A motorneuronok között találunk serkentő és gátló neuronokat is, amelyek a simaizom kontrakciójáért felelősek. Ezen kívül megtalálhatóak még szekretomotoros és vazodilatátor neuronok is az ENS-ben (Furness, 2000.).

Az ENS neurotranszmitterei között találunk peptid és nem peptid jellegű molekulákat is. A simaizom összehúzódást serkentő molekulák elsősorban az acetil-kolin és a tachikininek. A gátló jelátvivő molekulák közé tartozik a vazoaktív intesztinális polipeptid (VIP), a nitrogén-monoxid (NO), és egyes esetekben az adenosin-trifoszfát (ATP) is (Fonyó, 2011.).

I. 2. A diabétesz általános jellemzése

A diabétesz egy olyan anyagcsere betegség, amelyet hosszantartó magas vércukorszint jellemez. A hiperglikémiát okozhatja az inzulin szekréció hiánya vagy a sejtek inzulinnal szembeni érzéketlensége is, mely hosszútávon vesekárosodáshoz, szívelégtelenséghez és a neuronok pusztulásához vezet. Megkülönböztetjük az 1-es típusú diabéteszt, a 2-es típusú

diabéteszt, a gesztációs diabéteszt és a betegség egyéb típusait is (American Diabetes Association, 2014.).

Az 1-es típusú diabétesz egy autoimmun betegség, amely a hasnyálmirigy β -sejtjeinek pusztulásával alakul ki. Az összes diabéteszes megbetegedésnek megközelítőleg az 5-10%-át teszi ki az 1-es típusú diabétesz. Emberekben az 1-es típusú diabétesz kialakulásában genetikai és környezeti tényezők is részt vesznek, azonos génekészlettel rendelkező egypetéjű ikrek között a megbetegedés konkordanciája 50%-os. A betegség tüneteinek megjelenése előtt már kimutathatók az autoimmun folyamatok, az első tünetek a β -sejtek 60%-os pusztulásánál jelentkeznek. A tünetek megjelenését követően először exogén hiperglikémia jelentkezik, mely során a vér glükózsztíjének az emelkedése a normálisnál nagyobb mértékű. Ezt követően a β -sejtek további pusztulása végett kialakul az endogén hiperglikémia, melynek hatására szénhidrát bevitel nélkül is folyamatosan emelkedett a vércukorszint a fokozódó glükoneogenezis hatására. Az 1-es típusú diabétesz tünetei közé tartozik a gyakori nagy mennyiségű vizeletürítés (polyuria), amely gyakran tartalmaz glükózt is (glycosuria). A gyakori vizelés miatt folyadékhiány és elektrolitvesztés alakul ki, mely miatt a beteg sokat iszik. Az 1-es típusú diabétesz súlyos tünete a metabolikus acidózis, ami a ketogenezis során keletkező savak hatására alakul ki. Az acidózis hatására hányás léphet fel, mely tovább növeli a vízvesztést, majd legsúlyosabb esetben diabéteszes kóma alakulhat ki (Fonyó, 2011.). Az 1-es típusú diabétesz diagnózisát az éhgyomri vércukorszint alapján állítják fel, vagy véletlenszerűen vizsgált vércukorszint alapján. Ha az éhgyomri vércukorszint meghaladja a 7 mmol/L koncentrációt vagy a véletlenszerűen vizsgált vércukorszint meghaladja a 11 mmol/L koncentrációt, akkor a betegnél cukorbetegség állapítható meg. Az 1-es típusú diabétesz kezelésére leggyakrabban inzulinpótlást alkalmaznak, melyet injekció vagy inzulinpumpa segítségével juttatnak a szervezetbe, de alkalmaznak már különböző inzulin analógokat is (DiMeglio és mtsai, 2018.).

A 2-es típusú diabéteszben világszerte megközelítőleg 400 millió ember szenved, és a betegek száma a közeljövőben növekedni fog. A 2-es típusú diabétesz szintén hiperglikémiával jár, ami az inzulinra való érzékenység csökkenéséből és a hasnyálmirigy csökkent inzulin termeléséből ered. Az inzulinrezisztencia az inzulin-mediált sejtszintű folyamatok sérüléséhez vezet. A 2-es típusú diabétesz esetében az inzulinrezisztencia a vázizomszövetben, a májban és a zsírszövetben is jelentkezik, emellett a hasnyálmirigyben a glükóz-mediált inzulin szekréció sem működik megfelelően (Javeed és Matveyenko, 2018.).

A gesztációs vagy terhességi diabétesz megközelítőleg a terhes nők 14%-át érinti világszerte a Nemzetközi Diabétesz Szövetség 2017-es felmérése alapján. A gesztációs

diabétész során spontán módon alakul ki hiperglikémia a terhesség alatt. A betegség kialakulására hajlamosító tényezők lehetnek az elhízás, a nyugati típusú táplálkozás, az életkor és a családban előforduló inzulinrezisztencia vagy cukorbetegség. Terhességet követően általában a betegség megszűnik, de a későbbiekben mind az anyánál, mind pedig a gyermeknél sokkal nagyobb valószínűséggel alakulhat ki 2-es típusú diabétész vagy kardiovaszkuláris betegségek (Plows, 2018.).

I. 3. A diabétész és az enterális idegrendszer

A diabétész általános tünetei közé tartoznak a különböző gasztrointesztinális panaszok, mint például a hasmenés, a székrekedés vagy éppen a puffadás. Ezen tünetek a betegek akár 75%-ánál is jelentkezhetnek. A tünetek hátterében a béltraktus motilitásának változása, az oxidatív stressz és a neuropátia áll. A diabétész hatására megváltozik az enterális neuronok mérete és száma, neurodegeneratív folyamatok indulnak be (Chandraseharan és Srinivasan, 2007.). A hiperglikémia miatt autoimmun folyamatok zajlanak le a béltraktusban, melyek hatására megemelkedik a gyulladást kiváltó citokinek mennyisége és a gyulladás hatására sérül az emésztőtraktusban a nyálkahártya integritása is (Abdalla, 2024.).

A béltraktus motilitásáért nagyrészen a serkentő és gátló motorneuronok felelősek. A nitrogén-monoxid (NO) egy fontos nem kolinerg, nem adrenerg gátló neurotranszmitter az ENS-ben, amelyet a neuronális NO szintáz (nNOS) termel, mely a gátló neuronokban expresszálódik (Gangula és mtsai, 2007.). A nitrerg neuronok kísérletesen kiváltott diabéteszes patkánymodellben sérültek, károsodásuk bélszakasz-specifikus különbségeket mutatott. A nitrerg neuronok száma és az összneuronszám az ileumban, a jejunumban és a colonban is szignifikánsan csökkent, míg a duodenumban csak a nitrerg neuronok száma bizonyult kevesebbnek, az összneuronszám nem változott (Bagyánszki és Bódi, 2012.) A diabétész okozta nitrerg neuropátia két szakaszra különíthető el. Az első szakaszban az nNOS mennyisége lecsökken az idegrostokban és ezzel nitrerg diszfunkció alakul ki, amely még inzulinkezeléssel helyreállítható. A második szakaszban a neuronok apoptózisa következik be a felhalmozódott glikációs végtermékek és a sejttestben felgyülemlett NO hatására, ezen hatások már inzulinkezelés hatására sem visszafordíthatók (Cellek és mtsai, 2003.). A diabétész a serkentő neuronok számára is hatással van. A serkentő neuronok acetil-kolin transzferáz enzimet tartalmaznak, amely képes az acetil-kolin serkentő neurotranszmittert hidrolizálni. Diabéteszes egerekben kimutatták, hogy megnőtt a kolinerg innerváció a jejunum és az ileum myentericus

plexusában, míg a duodenumban csak a simaizomszövetben nőtt meg a kolinerg rostok mennyisége (Chandrasekharan és Srinivasan, 2007.).

A hiperglikémia hatására felborul a homeosztázis, mely a reaktív oxigén gyökök (ROS) sejtekben történő felhalmozódásához vezet. Az olyan molekulák, mint a glutation vagy a szuperoxid-dizmutáz és kataláz enzimek tartják fenn a redox egyensúlyt, viszont a hiperglikémia hatására ez az egyensúly oxidatív irányba eltolódik (Srinivasan és mtsai, 2024.). Az oxidatív stressz a sejtek sérüléséhez, neuronpusztuláshoz, valamint gliasejtek által közvetített másodlagos gyulladáshoz vezet. Diabéteszes betegek colonjában kimutatták, hogy a glutation mennyisége lecsökkent és a ganglionok mérete is kisebbnek bizonyult az apoptózis miatt (Chandrasekharan és Srinivasan, 2007.; Srinivasan és mtsai, 2024.).

A diabétesz kialakulásával az emésztőtraktus motilitásában bekövetkező változások a mikrobiomban kialakuló diszbiózissal is párhuzamba állíthatók. Az emésztőtraktus csökkent motilitása megváltoztatja a mikrobiom összetételét, mely nagymértékben befolyásolja a bél-agy tengely működését is. Egyes kutatások szerint a mikrobióta a nervus vaguson keresztül kommunikál a központi idegrendszerrel. A bélben található mikrobák képesek az afferens érzőneuronok szabályozására az érzékenységük növelésével, valamint a motilitást is tudják szabályozni helyileg ható neurotranszmitterek szintézisével. Kutatások alapján a mikrobiomban történő diabéteszes változások bélszakasz specifikusságot mutatnak, a mikrobióta összetétele szegmensenként különböző mértékben sérül (Wirth és mtsai, 2014). Valószínűsíthető, hogy az epithelium integritásának sérülése miatt a baktériumok könnyebben átjutnak az epitheliumon, s ezzel olyan patológiás folyamatokat indítanak el, melyek hozzájárulhatnak a neuropátiához és az 1-es típusú diabétesz kialakulásához is (Horváth és mtsai, 2015.).

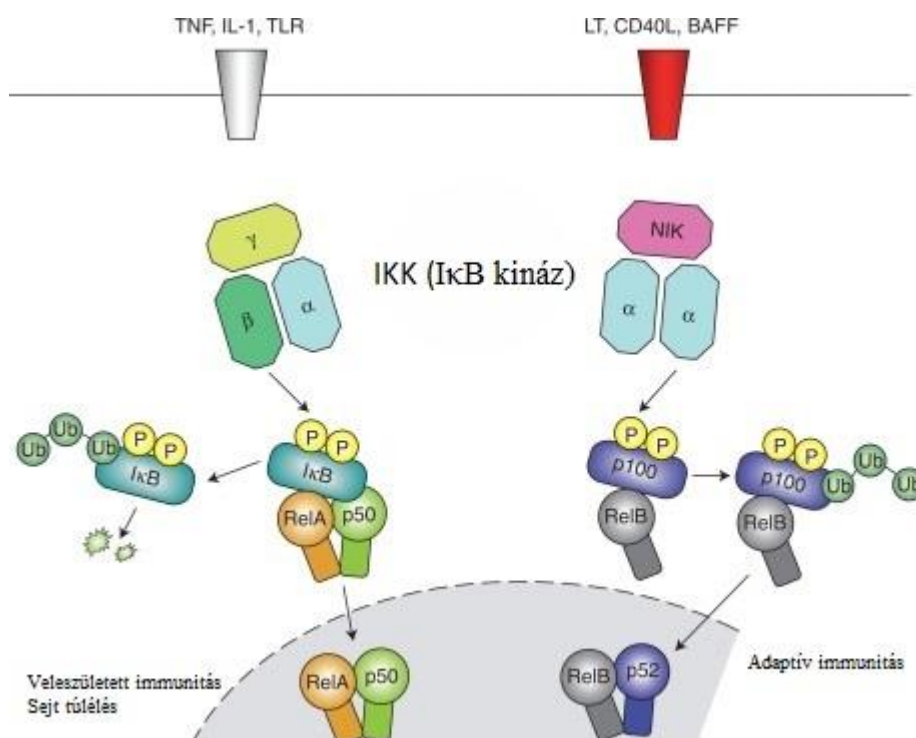
I. 4. Az NFκB transzkripció faktor általános jellemzése

Ranjan Sen és David Baltimore fedeztek fel 1986-ban egy fehérjét, amely az aktivált B-limfocitákban a DNS egy specifikus konzervált szakaszához kötött. A felfedezés helye és sejttípusa alapján nevezték el nukleáris faktornak, amely kötődik a κ-könnyűlánc génjéhez a B-sejtekben, vagyis röviden NFκB-nek nevezik (Zhang és mtsai, 2017.). Az NFκB olyan transzkripció faktorok családja, amelyek szabályozzák a gyulladásos válaszokat, részt vesznek a sejtek differenciációjának és proliferációjának szabályozásában, valamint a sejtek túlélésében. Az NFκB rendszer szigorúan szabályozott, diszregulációja különböző betegségek kialakulásához vezet, mint például a rák vagy különböző gyulladásos- és immunológiai betegségek (Mitchell és mtsai, 2016.).

Az NF κ B transzkripciós faktorok családjába öt fehérje tartozik, a p50 (NF κ B1), p52 (NF κ B2), p65 (RelA), RelB és c-Rel (Rel), melyek mind tartalmaznak egy 300 aminosav hosszú Rel homológ domént (RHD) a fehérje N-terminális oldalán. Az NF κ B fehérjék a sejtekben homo- és heterodimer formában fordulnak elő, amelyek képesek a DNS-hez kötni az RHD-en keresztül. A DNS-hez kötött fehérjének a távoli doménjei koaktivátorok és korepresszorok segítségével képesek a transzkripciót szabályozni. Egyes NF κ B fehérjék rendelkeznek transzaktivációs doménnel, így képesek a transzkripció iniciációjára koaktivátorok toborzásával, ilyen fehérjék a p65, c-Rel és a RelB (Hayden és Ghosh, 2014.). Az NF κ B dimerek inaktív formában a citoplazmában találhatók meg, valamelyik I κ B (Inhibitor of κ B) proteinhez kötött formában, ezzel biztosítják a jelátviteli út indukálhatóságát. Az I κ B fehérjéknek három típusa van, az I κ B α , I κ B β és I κ B ϵ , valamint két prekursor fehérje ismert még, a p100 és a p105 (Hayden és Ghosh, 2008.). Az I κ B proteinek rendelkeznek egy ankirin repeat doménnel, mely a fehérje-fehérje kapcsolatokban vesz részt, mellyel képesek az NF κ B dimerek Rel homológ doménjéhez kötődni (Ghosh és Karin, 2002.).

Az NF κ B jelátviteli útvonal sok különböző módon aktiválódhat, de általánosságban két fő jelátviteli útvonalról szoktak beszélni, a kanonikus (klasszikus) és a nem kanonikus (alternatív) útvonalról (2. ábra). A két útvonalat a résztvevő fehérjealegységek különböztetik meg. A p50-es fehérje, mely a p105-ös prekurból jön létre a kanonikus útvonalban játszik szerepet, míg a p52, mely a p100-as prekursor fehérjéből alakul át, a nem kanonikus útvonal résztvevője (Morgan és Liu, 2011.). Az NF κ B aktiválódásához exogén és endogén ligandok, valamint fizikai és kémiai stressz vezethet (Hayden és Ghosh, 2008.). A jelátvitelben résztvevő receptorok a tumor nekrosis faktor receptor (TNFR) család, Toll-like receptor (TLR) család és az interleukin-1 receptor (IL-1R) család. Ezekhez a receptorokhoz a szöveti sérülés vagy fertőzés hatására felszabaduló gyulladásos citokinek, mint például a tumor nekrosis faktor- α (TNF α) vagy interleukin-1 (IL-1) kötődnek a kanonikus jelátviteli útvonalnál. A nem kanonikus vagy alternatív jelátviteli útvonalnál a TNF citokin családba tartozó limfotoxin β vagy például a CD40 ligand (CD40L) köt be a receptorokhoz (Lawrence, 2009.). Ezeknek a receptoroknak az a közös jellemzője, hogy nem rendelkeznek enzimaktivitással, így adaptor fehérjéken keresztül indítják el a jelátviteli útvonalat (Hayden és Ghosh, 2014.). Mindkét szignáltranszdukciós útvonalnál szükség van az I κ B kináz (IKK) komplexre. Az IKK komplex három alegységből áll, az IKK α -ból (IKK1), az IKK β -ból (IKK2) és az IKK γ -ból (NEMO). Az IKK β alegység szabályozza a kanonikus útvonal aktiválódását az I κ B fehérjék foszforilálásával az IKK γ segítségével, míg az IKK α -ra nincs szükség csak az alternatív jelátviteli útvonalban, mely során a p100-as fehérje foszforilációja és p52-es aktív formába való átalakítása történik

(Lawrence, 2009.). A klasszikus jelátviteli útvonalban a TNFR-on keresztüli szignáltranszdukció az egyik legjobban ismert. A receptorhoz bekötött TNF ligand hatására egy adaptor fehérje megakomplex jön létre a RIP1, TRADD, TRAF2, cIAP, TAB1 és TAK1 fehérjék toborzásával. A fehérje komplex segítségével az IKK foszforilálódik, amely aktiválja a kináz aktivitását (Zhang és mtsai, 2016.). A p105-ös NF κ B alegység a citoplazmában konstitutívan proteoszómálisan átalakul p50 fehérjévé és a p65-tel (RelA) heterodimert alkot. A p50/p65 NF κ B dimer inaktív formában van az I κ B α fehérjékhez kötve a citoplazmában. Az aktiválódott IKK az I κ B α fehérjét foszforilálja és ezzel ubiquitinálódásra jelöli. Az ubiquitinálódás után az I κ B α proteoszómálisan lebomlik. Az I κ B α lebomlását követően a p50/p65 dimer DNS kötőhelye szabaddá válik, szabadon tud a sejtmagba transzlokálódni, és a DNS κ B helyéhez kötve transzkripciót tud kiváltani (Morgan és Liu, 2011.).



2. ábra A kanonikus (klasszikus) és nem kanonikus (alternatív) NF κ B szignáltranszdukciós útvonalak. A kanonikus és nem kanonikus útvonal során a citokinek hatására aktiválódik az IKK komplex, mely a kanonikus útvonal folyamán az I κ B inaktiválásával, a nem kanonikus útvonal esetén a p100 prekursor átalakításával aktiválja az NF κ B heterodimereket. TNF: tumor nekrozis faktor, IL-1: interleukin-1, TLR: Toll-like receptor, LT: limfotoxin, CD40L: CD40 ligand, BAFF: B-sejt aktiváló faktor, I κ B: κ B inhibitor, IKK: I κ B kináz, NIK: NF κ B indukáló kináz (Lawrence, 2009.).

I. 5. Az NFκB és a diabétesz kapcsolata

Az 1-es típusú diabéteszben a hasnyálmirigy β-sejtjeit érintő autoimmun válaszban részt vesznek olyan citokinek, mint az IL-1 vagy interferonok. Az alapállapotú β-sejtekben nem tapasztalható NFκB aktivitás, viszont az IL-1 citokin hatására az NFκB aktív formába kerül és transzlokálódik a sejtmagba, ahol több gén expresszáldásán keresztül a β-sejtek diszregulációjához és apoptózisához vezethet. Az NFκB pro- és anti-apoptotikus kaszkádokat is képes aktiválni, de a β-sejtekben a pro-apoptotikus sejtválasz dominál. Egyes kutatások alapján az NFκB p50 fehérje deficiens egerek rezisztensek voltak a streptozotocin (STZ) β-sejt pusztító hatására, míg más kutatások arra mutattak rá, hogy a hosszútávon akadályozott NFκB szignáltranszdukciós útvonal akadályozta az inzulin szekrécióhoz szükséges gének kifejeződését és csökkentette az endokrin sejtek számát a hasnyálmirigyben (Mabyle és mtsai, 2002; Norlin és mtsai, 2005.; Patel és Santani, 2009). Az NFκB úgyszintén részt vesz a diabétesz okozta retinopátiában és nefropátiában is (Patel és Santani, 2009.).

Kutatócsoportunk már korábban vizsgálta a TNFα gyulladásos citokin és receptorai (TNFR1 és TNFR2) bélszakasz-specifikus eloszlását 1-es típusú diabéteszes patkánymodellben. A TNFα-t jelölő arany szemcsék denzitása a hiperglikémia hatására a duodenum myenterikus ganglionjaiban szignifikánsan megnőtt, a colonban csökkent, míg az ileumban változatlan maradt és az inzulinkezelés nem bizonyult protektívnek (Bódi és mtsai, 2021). Általánosságban a TNFR1 az apoptózisért, a TNFR2 pedig a sejt regenerációért felelős receptorok (Gough és Myles, 2020.). Korábbi kutatási eredményeink azt mutatták, hogy 1-es típusú diabéteszben a TNFR expresszió régió-specifikus változásaiban a TNFR2 jobban érintett, mint a TNFR1 a cukorbeteg állatok duodenumában (Barta és mtsai, 2023.). Mivel ezek a gyulladásos citokinek fontos szerepet játszanak az NFκB jelátviteli útvonal aktiválásában, így az NFκB és negatív szabályozó fehérjéjének (Nrf2) vizsgálata is nélkülözhetetlen a bélcsatorna különböző szakaszaiban.

II. CÉLKITŰZÉSEK

A különböző gyulladásos citokinek bélszakasz-függő expressziós változásai miatt elsődleges célunk az volt, hogy feltérképezzük, milyen hatása van a krónikus hiperglikémiának az NF κ B transzkripciós faktor kifejeződésére 1-es típusú diabéteszes patkányok myenterikus ganglionjaiban. Ehhez transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálataink során a kontroll, diabéteszes és inzulin-kezelt diabéteszes állatok különböző bélszakaszaiban a következő kérdésekre kerestük a választ:

1. Az NF κ B p65 fehérje kifejeződése mutat-e bélszakasz-specifikus különbségeket a kontroll állatok myenterikus ganglionjaiban és a bélfal simaizomszövetében?
2. Megfigyelhető-e valamilyen diabéteszhez köthető változás az NF κ B p65 fehérje denzitásában a myenterikus ganglionokban és a környező simaizomban a STZ-nal indukált diabéteszes patkányok duodenum-ileum tengelye mentén?
3. Milyen hatással van az azonnali inzulinkezelés az NF κ B p65 fehérje denzitására a myenterikus ganglionokban és a bél simaizomszövetében a vékonybél különböző szakaszaiban?

III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A kísérlet során az állatok tartása és felhasználása az Európai Unió etikai előírásainak (2010/63/EU) és a Magyarországon jelenleg érvényben lévő törvényi szabályozásnak megfelelően, a Szegedi Tudományegyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottságának hozzájárulásával, a Megyei Élelmiszerlánc Biztonsági és Állategészségügyi Igazgatóság engedélyével történt (XX./1636/2019.).

III. 1. Állatmodell

A kísérletben 200-300 g tömegű hím Wistar patkányokat (Toxi-Coop Zrt., Balatonfüred, Magyarország) vizsgáltunk, melyeket véletlenszerűen, három csoportra osztottunk: kontroll csoport (K; n = 14), STZ-indukált diabéteszes (D; n = 14) és inzulin-kezelt diabéteszes (ID; n = 13) csoport. Az állatokat 10 hetes krónikus kísérletnek vetettük alá. A hiperglikémiát intraperitoneális STZ (60 mg/testtömeg kg; Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország) injekcióval váltottuk ki. A kísérlet során azokat az állatokat, amelyek vércukorszintje meghaladta a 18 mmol/L koncentrációt diabéteszesnek tekintettük (Accu-Chek® Active vércukormérő). Az inzulin-kezelt diabéteszes csoport állatainak kezelését ekkor rögtön elkezdtük, az állatok napi két alkalommal, reggel (3 NE) és délután (3 NE) kaptak szubkután inzulin (Humulin M3, Eli Lilly, Hollandia) injekciót. A másik két csoport a szűrési stressz kiváltása érdekében fiziológiás sóoldatot kapott, szubkután injekció formájában. Az állatok testtömegét és vércukorszintjét a 10 hetes periódus alatt heti rendszerességgel monitoroztuk.

III. 2. Minták előkészítése

A 10 hetes kísérleti periódust követően az állatok klorálhidrátos (375 mg/kg) anesztézián, majd cervikális diszlokáción estek át. Az állatok hasüregét felnyitottuk és a szükséges bélszakaszokat kiboncoltuk. A mintákat a duodenum proximális és az ileum disztális végéről vettük, majd foszfát pufferrel (0,05 M PB, pH 7,4) alaposan átmostuk a bélszakaszokat.

Az elektronmikroszkópos vizsgálatainkhoz kísérleti csoportonként 4-4 állatot használtunk fel. A 2-3 mm széles bélmintákat egy éjszakán át 2% paraformaldehid és 2% glutáraldehid oldatában fixáltuk, majd ozmium-tetroxidban 1 órán át utófixáltuk. Ezt követően a minták víztelenítésére került sor felszálló alkoholsorban. A mintákat ezután Embed812 (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) gyantába ágyaztuk acetone intermedierrel

keresztül és 60 °C-on polimerizáltuk. A vizsgálatához szükséges 70 nm-es ultravékony metszeteket Reichert típusú ultramikrotómmal készítettük. Az immunfestést követő kontrasztfestéshez uranil-acetátot és ólom-citrátot használtunk.

III. 3. Posztembedding immunhisztokémiai vizsgálat

A különböző bélszakaszokból és kísérleti csoportokból készített ultravékony metszeteket posztembedding immunhisztokémiai festésnek vetettük alá. A nikkel grideken levő mintákat először 1%-os perjódsv cseppre (9 perc), majd desztillált vizes mosást (3x5 perc) követően 2%-os nátrium-perjódát oldatcseppre helyeztük (10 perc), melyet ismét desztillált vizes mosás követett (3x5 perc). Következő lépésben a grideket TBS-cseppekre helyeztük (3x2 perc), majd 30 perc blokkolás következett borjú szérum albuminnal (BSA). Ezt újabb 2x5 perc desztillált vizes mosás, majd 2x3 perc TBS mosás követte. Ezután a mintákat az elsődleges antitesttel (anti-NFκB p65 (F-6) egér monoklonális IgG; 1:25; sc-8008; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) egy éjszakán át inkubáltuk szobahőmérsékleten. Másnap a mintákat 2x10 percet ismét TBS-cseppeken mostuk, majd BSA-TRIS pufferes oldatra (0,05g BSA + 25 µl Tween-20 + 5 ml TRIS (pH=7,6); 2x5 perc) helyeztük. Ezután a mintákat 3 órát az arany szemcsével konjugált másodlagos antitesttel (18 nm arany szemcsével konjugált anti-egér IgG; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) inkubáltuk. A mintákat ismét desztillált vízzel mostuk (3x5 perc), majd a nedvességet szűrőpapírral finoman leitattuk. A festés során a mikroszennyeződések elkerülése érdekében a felhasznált oldatokat, az elsődleges és másodlagos antitestek kivételével átszűrtük. Az immunreakció specifikását az elsődleges antitest elhagyásával mindig ellenőriztük.

III. 4. Transzmissziós elektronmikroszkópia

Az ultravékony metszeteket az immunfestést és kontrasztózást követően JEOL JEM 1400+ típusú transzmissziós elektronmikroszkóp segítségével vizsgáltuk. Ennek során 20000x nagyításon a különböző bélszakaszokból származó myenterikus ganglionokról (50 db kép/10 ganglion/bélszakasz/csoport) és a bél fal simaizomzatáról (30 db kép/bélszakasz/csoport) is digitális képeket készítettünk. A képeket ImageJ program segítségével elemeztük, s meghatároztuk az NFκB p65 fehérjét jelölő arany szemcsék területegységre eső számát.

III. 5. Statisztikai analízis

Az adatok statisztikai analíziséhez a GraphPad Prism 6.0 szoftvert (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) használtuk, amely segítségével az adatainkon varianciaanalízist (ANOVA), Kruskal-Wallis és Newman-Keuls tesztekét végeztünk. A szignifikancia értékét $p < 0,05$ értékben határoztuk meg, az adatokat átlag $\pm$ SEM formában tüntettük fel.

IV. EREDMÉNYEK

IV. 1. A kísérleti állatok tömegének és vércukorszintjének változása

A tíz hetes kísérleti periódus alatt a kísérleti állatok testtömegét és vércukorszintjét folyamatosan figyelemmel kísértük. Az állatok testtömege mindhárom csoportnál növekedett a kiindulási testtömeghez képest. A kontroll csoportnál a kezdeti testtömeghez képest az állatok végső tömege szignifikánsan növekedett ($256,7 \pm 17,68$ g vs. $467 \pm 16,13$ g, $p < 0,0001$; 1. táblázat). A diabéteszes csoport esetében az állatok testtömege csak mérsékelten növekedett a kezdeti értékekhez képest ($223,9 \pm 7,54$ g vs. $320,9 \pm 14,73$ g; 1. táblázat). Míg az inzulin-kezelt diabéteszes csoport esetében - a kontroll csoporthoz hasonlóan - szignifikánsan megnőtt az állatok testtömege a tíz hetes periódus végére ($233 \pm 9,44$ g vs. $463,1 \pm 14,87$ g, $p < 0,0001$; 1. táblázat).

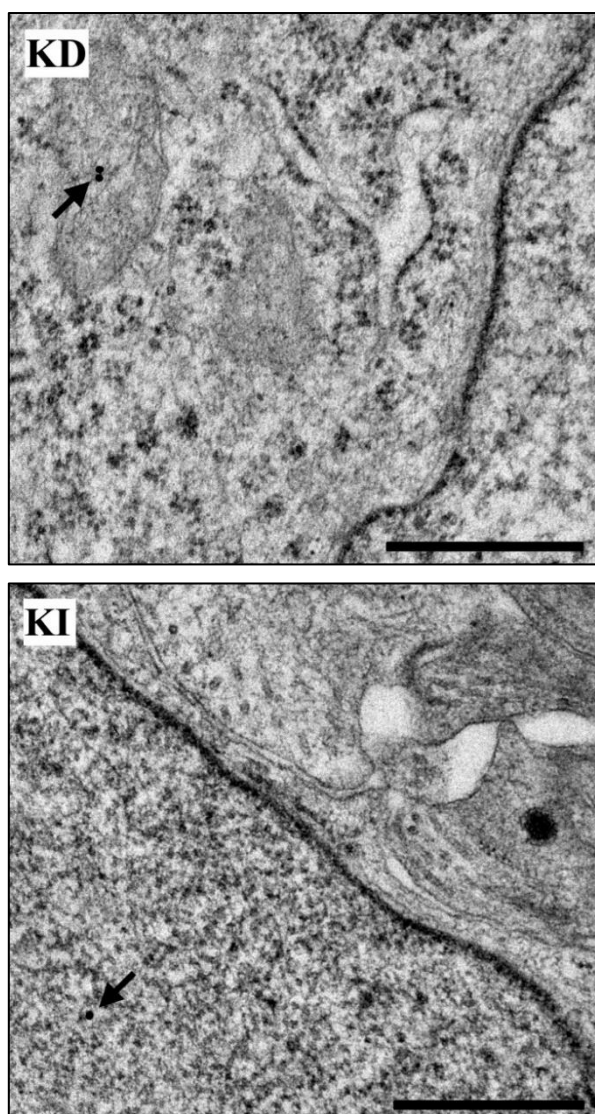
A diabéteszes patkányok vércukorkoncentrációja jelentősen megemelkedett, mintegy négyszer magasabb volt, mint a kontroll állatoké ($29,46 \pm 0,87$ mmol/L vs. $5,92 \pm 0,11$ mmol/L, $p < 0,0001$; 1. táblázat). Az inzulin-kezelt diabéteszes patkányok átlagos vércukor koncentrációja a kontroll értékek közelében maradt ($12,98 \pm 1,5$ mmol/L vs. $5,92 \pm 0,11$ mmol/L; 1. táblázat).

Csoportok	Testtömeg (g)		Vércukorszint (mmol/L)	
	Kezdeti	Végső	Kezdeti	Végső (átlag)
Kontroll	$256,7 \pm 17,68$	$467 \pm 16,13$ ****	$5,96 \pm 0,26$	$5,92 \pm 0,11$
Diabéteszes	$223,9 \pm 7,54$	$320,9 \pm 14,73$	$6,09 \pm 0,37$	$29,46 \pm 0,87$ ****, °°°°
Inzulin-kezelt diabéteszes	$233,7 \pm 9,44$	$463,1 \pm 14,87$ ****	$5,86 \pm 0,35$	$12,98 \pm 1,5$ *, °

1. táblázat A kontroll, diabéteszes és inzulin-kezelt diabéteszes kísérleti állatok testtömegének és vércukorszintjének változása. Az adatokat átlag $\pm$ SEM formában tüntettük fel. A kezdeti és a végső állapot közötti szignifikáns különbséget csillaggal (* $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$), a kontroll csoporthoz viszonyított különbséget körrel (° $p < 0,05$, °°°° $p < 0,0001$) jelöltük.

IV. 2. Az NFκB p65 fehérjét jelölő aranyzemcsék denzitásának változása a vékonybél myenterikus ganglionjaiban

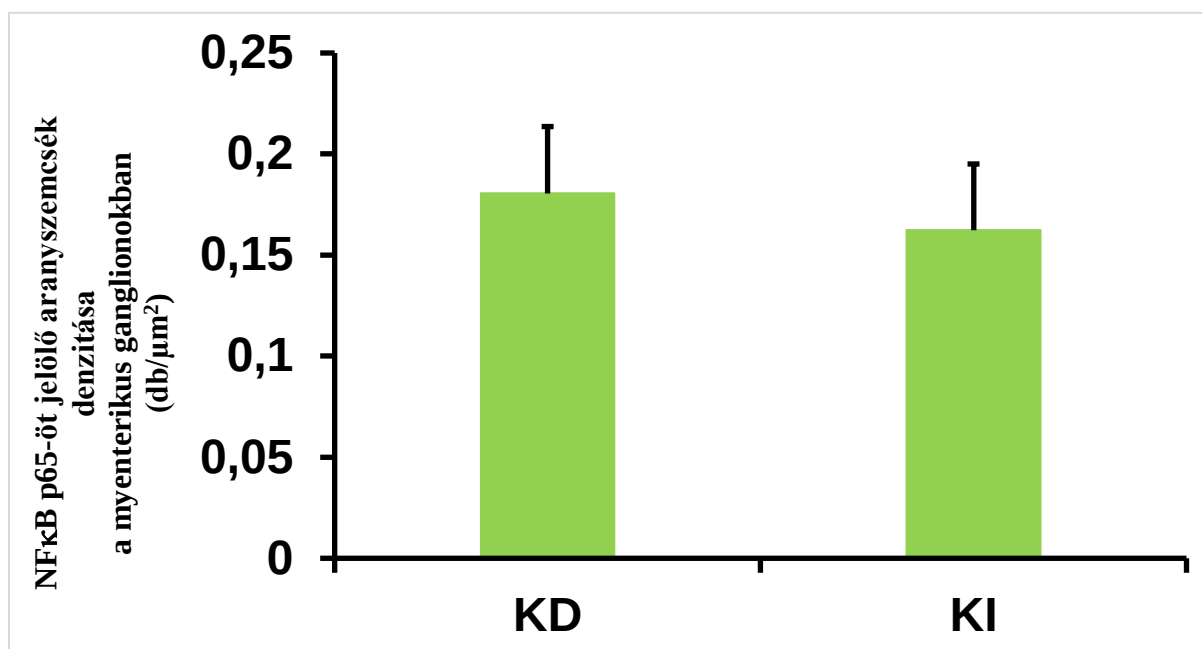
Az NFκB p65 fehérje denzitását a posztembedding immunhisztokémiai festést követően 18 nm-es aranyzemcsék segítségével állapítottuk meg (3. és 5. ábra). Az NFκB p65-öt jelölő aranyzemcsék denzitása a kontroll állatok duodenumában és ileumában nem mutatott különbséget ($0,18 \pm 0,33$ jel/ μm^2 vs. $0,16 \pm 0,04$ jel/ μm^2 ; 4.ábra).



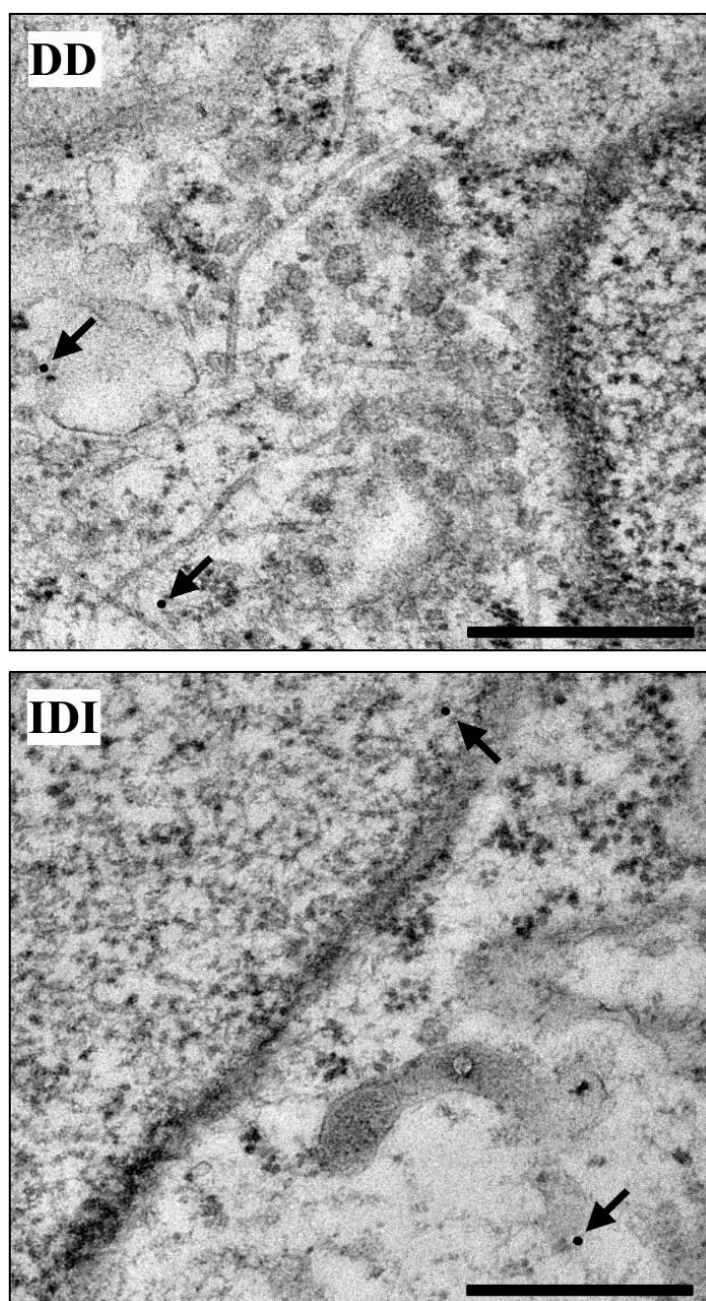
3. ábra Transzmissziós elektronmikroszkópos felvétel az NFκB p65 fehérjét jelölő aranyzemcsékről kontroll állat duodenumából és ileumából származó myenterikus ganglionból. Nyíl: 18 nm-es aranyzemcse, KD: kontroll duodenum, KI: kontroll ileum. Lépték: 500 nm.

A diabéteszes állatok esetében az ileum ganglionjaiban szignifikáns növekedést tapasztaltunk az arany szemcsék számában a kontroll csoporthoz képest ($0,48 \pm 0,09$ jel/ μm^2 vs. $0,16 \pm 0,03$ jel/ μm^2 , $p < 0,05$; 5-6. ábra), míg a duodenumban a szemcsék denzitása egyáltalán nem változott ($0,18 \pm 0,03$ jel/ μm^2 vs. $0,17 \pm 0,03$ jel/ μm^2 ; 5-6. ábra).

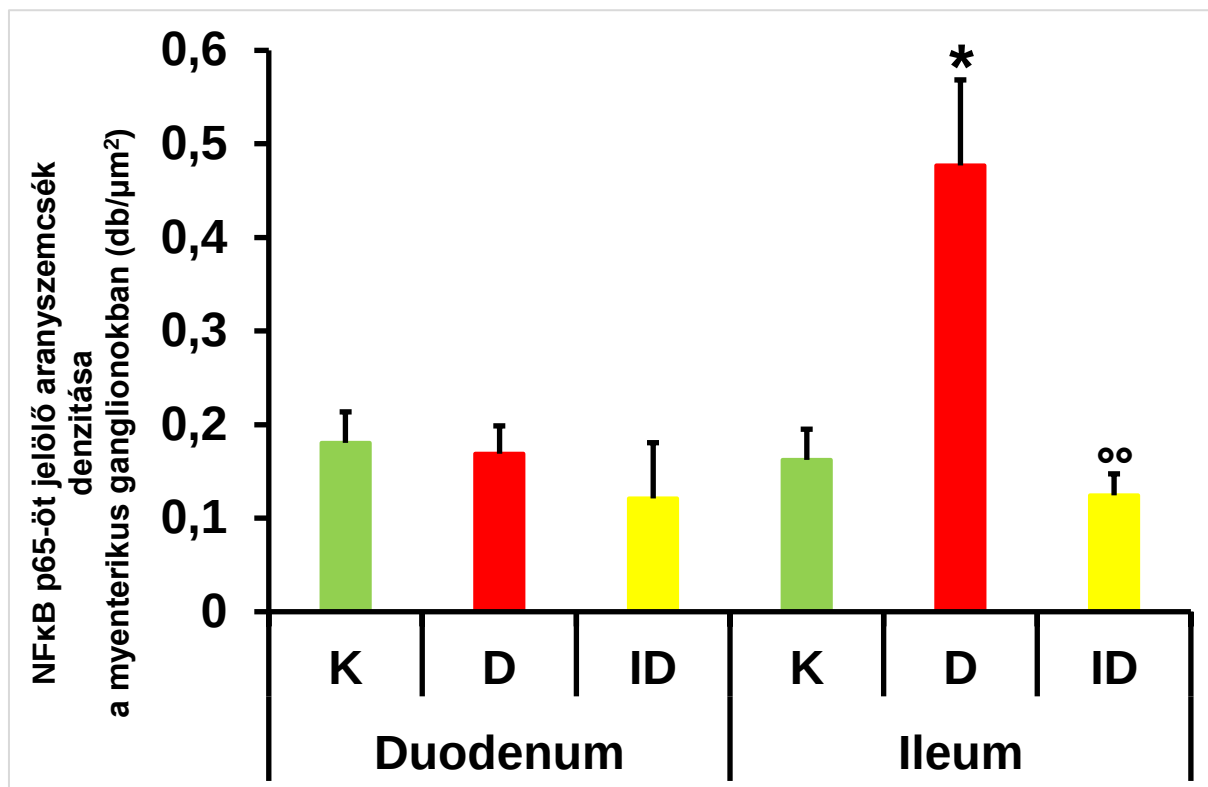
Az inzulin-kezelt diabéteszes állatokban az arany szemcsék denzitása az ileum myenterikus ganglionjaiban a kontroll szinten marad, az inzulinkezelés kivédte a diabéteszes növekedést, s a duodenumban sem eredményezett szignifikáns változást a kontroll értékekhez képest (5-6. ábra).



4. ábra Az NFκB p65 fehérjét jelölő arany szemcsék denzitása a myenterikus ganglionokban kontroll állatok vékonybelének különböző szakaszaiban. Az arany szemcsék denzitása a duodenumban és az ileumban is hasonló. Az adatokat átlag $\pm$ SEM formában tüntettük fel. KD: kontroll duodenum, KI: kontroll ileum.



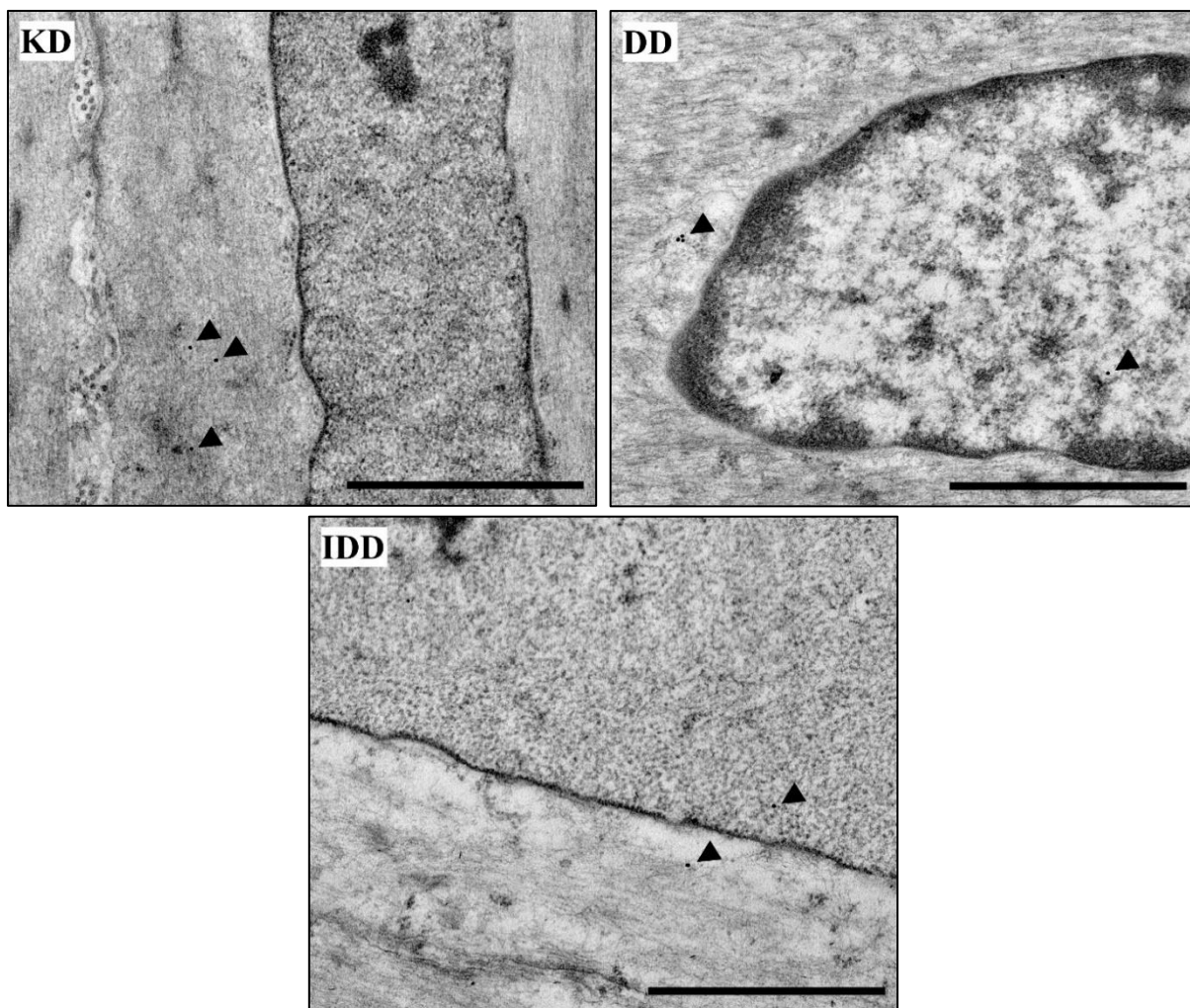
5. ábra Transzmissziós elektronmikroszkópos felvétel az NFκB p65 fehérjét jelölő aranyzemcsékről diabéteszes állat duodenumából és inzulin-kezelt diabéteszes állat ileumából származó myenterikus ganglionból. Nyíl: 18 nm-es aranyzemcse, DD: diabéteszes duodenum, IDI: inzulin-kezelt diabéteszes ileum. Lépték: 500 nm.



6. ábra Az NFκB p65 fehérjét jelölő aranszemcsék denzitása a myenterikus ganglionokban kontroll (K), diabéteszes (D), és inzulin-kezelt diabéteszes (ID) állatok vékonybelének különböző szakaszaiban. A diabéteszes ileumban a myentericus ganglionokban szignifikánsan megnövekedett az aranszemcsék száma a kontrollhoz képest. Az inzulin-kezelt diabéteszes csoportban az ileumban az aranszemcsék mennyisége kontroll szinten maradt. Az adatokat átlag ± SEM formában tüntettük fel. A kontroll és a diabéteszes csoport közötti szignifikáns különbséget csillaggal (* $p < 0,05$), a diabéteszes és inzulin-kezelt diabéteszes csoport között pedig körrel (°° $p < 0,01$) jelöltük.

IV. 3. Az NFκB p65 fehérjét jelölő aranszemcsék denzitásának változása a vékonybél simaizomszövetében

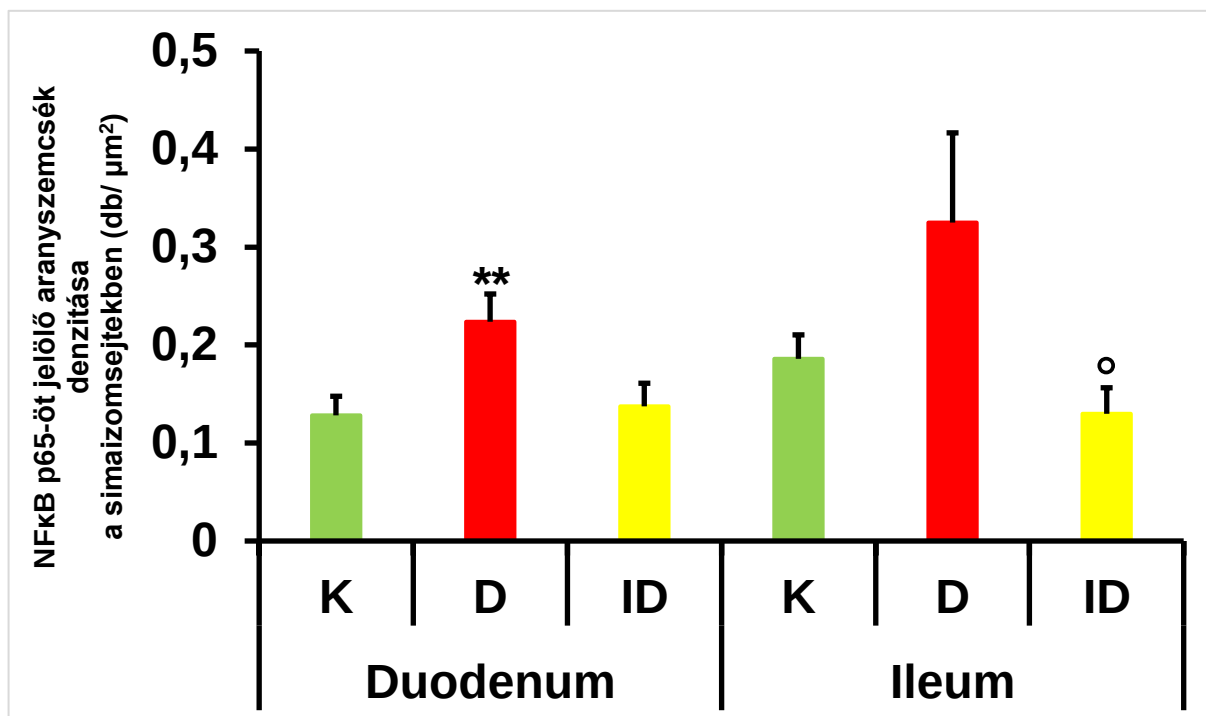
Az NFκB p65 fehérje denzitását a posztembedding immunohisztokémiai festést követően 18 nm-es aranszemcsék segítségével állapítottuk meg a vékonybél falának simaizomzatában is (7-8. ábra). A kontroll állatok vékonybelében az aranszemcsék denzitása nem mutatott különbséget (duodenum: $0,13 \pm 0,02$ jel/μm², ileum: $0,19 \pm 0,02$ jel/μm²; 8. ábra).



7. ábra Transzmissziós elektronmikroszkópos felvétel NFκB p65 fehérjét jelölő arany szemcsékről kontroll, diabéteszes és inzulin-kezelt-diabéteszes állat duodenumából származó simaizomsejtekről. Nyílhegy: 18 nm-es arany szemcse, KD: kontroll duodenum, DD: diabéteszes duodenum, IDD: inzulin-kezelt diabéteszes duodenum. Lépték: 1 μm.

A diabéteszes állatokban az NFκB p65-öt jelölő szemcsék száma a vékonybél mindkét szakaszán emelkedett a kontroll csoporthoz képest. Ez a növekedés a duodenum simaizomsejtjeiben szignifikáns, közel kétszeres volt ($0,22 \pm 0,03 \text{ jel}/\mu\text{m}^2$ vs $0,13 \pm 0,02 \text{ jel}/\mu\text{m}^2$, $p < 0,01$; 8.ábra), de az ileumban is határozottan növekvő tendenciát figyeltünk meg ($0,32 \pm 0,09 \text{ jel}/\mu\text{m}^2$ vs $0,19 \pm 0,02 \text{ jel}/\mu\text{m}^2$; 8.ábra).

Az azonnali inzulinkezelés sikeresen kivédte a diabéteszes változásokat, az inzulin-kezelt diabéteszes állatokban az arany szemcsék száma a kontroll értékek közelében maradt (duodenum: $0,13 \pm 0,02 \text{ jel}/\mu\text{m}^2$ vs. $0,14 \pm 0,02 \text{ jel}/\mu\text{m}^2$, ileum: $0,19 \pm 0,02 \text{ jel}/\mu\text{m}^2$ vs. $0,13 \pm 0,03 \text{ jel}/\mu\text{m}^2$; 8. ábra).



8. ábra Az NFκB p65 fehérjét jelező aranyszemcsék denzitása a bélfal simaizomsejtjeiben kontroll (K), diabéteszes (D), és inzulin-kezelt diabéteszes (ID) állatok vékonybelének különböző szakaszaiban. A diabéteszes duodenumban szignifikánsan, és az ileumban is jelentősen megemelkedett az aranyszemcsék száma a kontrollhoz képest, melyet az azonnali inzulin-kezelés kivédett. Az adatokat átlag $\pm$ SEM formában tüntettük fel. A kontroll és a diabéteszes csoport közötti szignifikáns különbséget csillaggal (** $p < 0,01$), a diabéteszes és inzulin-kezelt diabéteszes csoport között pedig körrel (° $p < 0,05$) jelöltük.

V. ÖSSZEFOGLALÁS

Kutatócsoportunk korábban már vizsgálta a $\text{TNF}\alpha$ és az $\text{IL-1}\beta$ bélszakasz-specifikus eloszlását 1-es típusú diabéteszes patkánymodellben. A $\text{TNF}\alpha$ mennyisége kontroll állatokban disztális irányban növekvő tendenciát mutatott. A diabétesz okozta hiperglikémia hatására csak a duodenumban emelkedett szignifikánsan a $\text{TNF}\alpha$ mennyisége, amit az azonnali inzulinkezelés sem tudott visszafordítani (Bódi és mtsai, 2021.). Az $\text{IL-1}\beta$ denzitása kontroll állatok esetében a colonban magasabb volt, mint a vékonybélben. A diabéteszes állatok esetében minden bélszakaszban megnövekedett az $\text{IL-1}\beta$ mennyisége, mely az azonnali inzulinkezelés hatására visszafordítható volt (Al Doghmi és mtsai, 2023.).

Mivel ezek az $\text{NF}\kappa\text{B}$ transzkripció faktorral szoros kapcsolatban álló citokinek szigorú régió-specifikus expressziót mutatnak, ezért a kutatásunk célja az volt, hogy elektronmikroszkópos vizsgálataink során feltérképezzük az $\text{NF}\kappa\text{B}$ p65 kifejeződését a vékonybél különböző szakaszaiban kontroll állapotban, valamint a diabéteszt kísérő hiperglikémia és az inzulinkezelés hatására.

Eredményeink alapján az ileum myenterikus ganglionjaiban és a környező simaizomszövetben is megemelkedett az $\text{NF}\kappa\text{B}$ p65 fehérjét jelölő arany szemcsék mennyisége a diabéteszes állatokban. Csoportunk korábbi eredményei szerint az $\text{IL-1}\beta$ és a $\text{TNF}\alpha$ mennyisége is megemelkedett az 1-es típusú diabéteszes patkányok ileumának ganglionjaiban (Bódi és mtsai, 2021.; Al Doghmi és mtsai, 2023.). Ez alapján feltételezzük, hogy ezek a citokinek hozzájárulnak az $\text{NF}\kappa\text{B}$ megnövekedett expressziójához és aktivitásához az ileum myenterikus ganglionjaiban és a környező simaizomszövetben, mely a gyulladásos folyamatokban résztvevő gének kifejeződéséhez vezethet (Guo és mtsai, 2024.). Ezzel ellentétben, a duodenumban az $\text{NF}\kappa\text{B}$ p65 fehérjét jelölő arany szemcsék száma nem növekedett a myenterikus ganglionokban, csak a bélfal simaizomzatában. Korábbi vizsgálataink szerint az $\text{IL-1}\beta$ és $\text{TNF}\alpha$ mennyisége is növekedett a duodenalis ganglionokban, azonban itt az $\text{NF}\kappa\text{B}$ jelátviteli útvonal mégsem indukálódott. Ahhoz, hogy feltárjuk milyen folyamatok állnak ennek hátterében, további vizsgálatok szükségesek. Az inzulin-kezelés hatására az $\text{NF}\kappa\text{B}$ p65-t jelölő arany szemcsék száma kontroll szinten maradt mind a myenterikus ganglionokban, mind a bélfal simaizomszövetében, mely azt igazolja, hogy az időben megkezdett inzulinkezelés protektívnek bizonyult.

Ezek az eredmények kutatócsoportunk legújabb publikációjának részét képezik, melyben az $\text{NF}\kappa\text{B}$ p65 mRNS és fehérje expressziós változásai mellett, az $\text{NF}\kappa\text{B}$ negatív regulátorának, a nukleáris faktor eritroid-2 kapcsolt faktor 2-nek (Nrf2) a kifejeződését is

vizsgálták a duodenum-ileum-colon tengely mentén (Barta és mtsai., 2024). Az elektronmikroszkópos vizsgálatok rámutattak, hogy míg a duodenum myenterikus ganglionjaiban az NF κ B p65-t jelölő arany szemcsék száma nem változott, addig az Nrf2 fehérjét jelölő arany szemcsék mennyisége ebben a bélszakaszban megemelkedett a diabéteszes állatokban. A szakirodalom alapján az Nrf2 gátolja az NF κ B-t, védi a gasztrointesztinális traktust az oxidatív stressztől, mivel antioxidáns gének kifejeződését segíti elő (Yanaka, 2018.). Sandireddy és munkatársai (2016.) leírták, hogy az Nrf2 up-regulációja és az NF κ B gátlása protektívnek bizonyult a diabéteszhez köthető neuroinflammációval szemben. Ezek alapján feltételezzük, hogy a diabéteszes állatok duodenumában a fokozott Nrf2 expresszió kivédte az NF κ B jelátviteli útvonal indukálódását (Barta és mtsai., 2024.).

Eredményeink alapján elmondható, hogy 1-es típusú diabéteszes patkányokban az NF κ B transzkripció faktor expressziója a vékonybél különböző szakaszaiban és a bélfal egyes rétegeiben eltérően változik. Az ileum myenterikus ganglionjaiban az NF κ B jelátvitel indukálódását figyeltük meg, mely mögött a különböző gyulladásos citokinek fokozott expressziója állhat. Ezzel szemben a duodenum ganglionjaiban a hiperglikémia hatására változatlan NF κ B expressziót detektáltunk, melyben az Nrf2 fokozott termelődésének is szerepe lehet, s mindez hozzájárulhat az enterikus neuronok régió-specifikus diabéteszes károsodásához.

VI. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetem szeretném kifejezni elsősorban a témavezetőimnek Dr. Bagyánszki Mária habilitált egyetemi docensnek és Dr. Bódi Nikolett habilitált egyetemi docensnek, hogy kutatócsoportjukban írhattam dolgozatom és bármilyen kérdésem volt mindig fordulhattam hozzájuk. Köszönöm, hogy szakmai útmutatásukkal bevezettek a bélidegrendszer és a kutatómunka végeláthatatlan rejtelseibe.

Köszönöm Dr. Varga Csaba tanszékvezető egyetemi docensnek, hogy az SZTE TTIK Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszéken végezhettem tudományos diákköri munkámat.

Továbbá köszönöm a kutatócsoportunk tagjainak: Bartuczné Dr. Szalai Zitának, Afnan AL Doghminak, Onhausz Benitának, Egyed-Kolumbán Abigélnek a rengeteg segítséget és hogy bármilyen kérdéssel fordulhattam hozzájuk, valamint köszönöm Barta Bence Pálnak, hogy segített az anyagok feldolgozásában, és bármikor volt szükségem segítségre mindig rendelkezésemre állt.

Végül köszönöm a családomnak és barátaimnak, hogy végig támogattak és motiváltak és nem hagyták, hogy feladjam.

VII. FELHASZNÁLT IRODALOM

- Abdalla** M. M. I. (2024) Enteric neuropathy in diabetes: Implications for gastrointestinal function. *World J Gastroenterol*; 30(22): 2852-2865.
- Al Doghmi** A., Barta B.P., Egyed-Kolumbán A., Onhausz B., Kiss S., Balázs J., Szalai Z., Bagyánszki M., Bódi N. (2023.) Gut Region-Specific Interleukin 1 Induction in Different Myenteric Neuronal Subpopulations of Type 1 Diabetic Rats. *Int. J. Mol. Sci*, 24, 5804.
- American Diabetes Association** (2014.) Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 37, S81-S90.
- Bagyánszki** M., Bódi N. (2012.) Diabetes-related alterations in the enteric nervous system and its microenvironment. *World of Journal Diabetes*, 80-93.
- Barta** B. P., Onhausz B., AL Doghmi A., Szalai Z., Balázs J., Bagyánszki M., Bódi N. (2023.) Gut region-specific TNFR expression: TNFR2 is more affected than TNFR1 in duodenal myenteric ganglia of diabetic rats. *World of Journal Diabetes*, 14(1): 48-61.
- Barta** B.P., Onhausz B., Egyed-Kolumbán A., AL Doghmi A., Balázs J., Szalai Z., Ferencz Á., Hermes E., Bagyánszki M., Bódi N. (2024.) Intestinal Region-Dependent Impact of NFκB-Nrf Crosstalk in Myenteric Neurons and Adjacent Muscle Cells in Type 1 Diabetic Rats. *Biomedicines*, 12, 2347.
- Berner** H. M. (2003.) The Enteric Nervous System I: Organisation and Classification; *Pharmacology & Toxicology*, **92**, 105–113.
- Bódi** N., Chandrakumar L., al Doghmi A., Mezei, D., Szalai, Z., Barta, B.P., Balázs, J., Bagyánszki, M. (2021.) Intestinal Region-Specific and Layer-Dependent Induction of TNFα in Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes and after Insulin Replacement. *Cells*, 10, 2410.
- Cellek** S., Foxwell N.A., Moncada S. (2003.) Two phases of nitrenergic neuropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes*, 2353-2362.
- Chandrasekharan** B., Srinivasan S. (2007) Diabetes and the enteric nervous system, *Neurogastroenterol Motil* 19, 951–960.

- Cingolani F.**, Balasubramaniam A., Srinivasan S. (2024.) Molecular mechanisms of enteric neuropathies in high-fat diet feeding and diabetes, *Neurogastroenterology & Motility*;00:e14897.
- DiMeglio A. L.**, Evans-Molina C., Oram R. C. (2018.) Type 1 diabetes, *Lancet*; 391: 2449–62.
- Fonyó A.** (2011.) Az orvosi élettan tankönyve, Medicina könyvkiadó Zrt.
- Furness J. B.** (2000.) Types of neurons in the enteric nervous system; *Journal of the Autonomic Nervous System* 81 (2000) 87–96.
- Furness J. B.** (2006.) The enteric nervous system; Blackwell publishing
- Gangula P. R. R.** (2007.) Diabetes induces sex-dependent changes in neuronal nitric oxide synthasedimerization and function in the rat gastric antrum, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292: G725–G733.
- Ghosh S.**, Karin M. (2002.) Missing Pieces in the NF- κ B Puzzle, *Cell, Vol. 109, S81–S96*.
- Guo Q.**, Jin Y., Chen X., Ye X., Shen X., Lin M., Zeng C., Zhou T., Zhang J. (2024.) NF- κ B in biology and targeted therapy: new insights and translational implications. *Sig Transduct Target Ther* 9, 53.
- Harrington M.A.**, Hutson M.J., Southwell R.B. (2010.) Cholinergic neurotransmission and muscarinic receptors in the enteric nervous system. *Progress in histochemistry and cytochemistry*, 173-202.
- Hayden M. S.**, Ghosh S. (2008.) Shared Principles in NF- κ B Signaling, *Cell, Volume 132, Issue 3, 344 – 362*.
- Hayden M. S.**, Ghosh S. (2014) Regulation of NF- κ B by TNF Family Cytokines, *Semin Immunol. 2014 June ; 26(3): 253–266*.
- Horváth V. J.**, Putz Zs. Izbéki F., Körei A. E., Gerő L., Lengyel Cs., Kempler P., Várkonyi T. (2015.) Diabetes-Related Dysfunction of the Small Intestine and the Colon: Focus on Motility, *Curr Diab Rep. 2015 Nov;15(11):94*.
- Javeed N.**, Matveyenko A. V. (2018.) Circadian Etiology of Type 2 Diabetes Mellitus, *PHYSIOLOGY* 33: 138–150.

- Mabley J. G.**, Hasko G., Liaudet L., Soriano F., Southan G. J., Salzman A. L., Szabo C. (2002.) NF κ B1(p50)-deficient mice are not susceptible to multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes. *J Endocrinol*, 173, 457–464.
- Mitchell S.**, Vargas J., Hoffmann A. (2016.) Signaling via the NF κ B system, *WIREs Syst Biol Med*, 8:227–241.
- Morgan M.**, Liu Zg. (2011.) Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Res* 21, 103–115.
- Newgreen D.**, Young H.M. (2002.) Enteric Nervous System: Development and Developmental Disturbances - Part 1. *Pediatric and Developmental Pathology*, 224-247.
- Norlin S.**, Ahlgren U., Edlund H. (2005.) Nuclear factor- κ B activity in β -cells is required for glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes*, 54, 125–132.
- Patel P.**, Santani D. (2009.) Role of NF- κ B in the pathogenesis of diabetes and its associated complications, *Pharmacological Reports* 61., 595-603.
- Plows J. F.** (2018.) The Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus, *J. Mol. Sci.* 19, 3342.
- Sandireddy R.**, Yerra V.G., Komirishetti P., Areti A., Kumar A. (2016.) Fisetin Imparts Neuroprotection in Experimental Diabetic Neuropathy by Modulating Nrf2 and NF- κ B Pathways. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 36, 883–892.
- Sasselli V.**, Pachnis V., Burns A. J. (2012.) The enteric nervous system; *Developmental Biology* 366 64–73.
- Wirth R.**, Bódi N., Maróti G., Bagyánszki M., Talapka P., Fekete É., Bagi Z., Kovács K. L. (2014) Regionally Distinct Alterations in the Composition of the Gut Microbiota in Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes. *PLOS ONE* 9(12): e110440.
- Yanaka A.** (2018.) Role of NRF2 in Protection of the Gastrointestinal Tract against Oxidative Stress. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 63, 18–25.
- Zhang Q.**, Lenardo M. J., Baltimore D. (2017.) 30 Years of NF- κ B: A Blossoming of Relevance to Human Pathobiology, *Cell* 168., January 12.

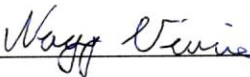
**A 37. OTDK
BIOLÓGIA SEKCIÓ FELHÍVÁSÁNAK
2. SZÁMÚ MELLÉKLETE**

TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS

Alulírott Nagy Vivien nyilatkozom, hogy a 37. OTDK-ra benyújtott: *Az NFκB p65 transzkripciós faktor expressziójának bélszakasz-specifikus változása 1-es típusú diabéteszes patkánymodellben* című pályamunkámban leírtak esetében az alábbi munkafolyamatok elvégzésében vettem részt:

Részfeladat	A részvétel mértéke (ötfokozatú skálán[#] jellemezve)
Állatok gondozása	4
Szöveti mintavétel	4
Metszetkészítés	2
Kvantitatív posztembedding immunhisztokémiai festés	5
Vizsgálat transzmissziós elektronmikroszkóppal, képek készítése	4
Jelszámolás az elektronmikroszkópos képeken, képek szerkesztése	5
Statisztikai analízis elvégzése	5
Adatok feldolgozása, kiértékelése	5

Kelt: Szeged, 2024.11.08.


Nagy Vivien

A nyilatkozatban foglaltak helyességét megerősítem:


Dr. Bódi Nikolett

egyetemi docens, SZTE TTIK Élettani, Szervezettani
és Idegtudományi


Dr. Bagyánszki Mária

egyetemi docens, SZTE TTIK Élettani,
Szervezettani és Idegtudományi Tanszék