36. OTDK Biológia Szekció

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Toll-like receptor 4 bélszakasz-specifikus expressziójának vizsgálata 1-es típusú diabéteszes patkányok myentericus neuronjaiban

Onhausz Benita
biológia-kémia osztatlan tanárszak, VI. évfolyam

Témavezető:

Dr. Bódi Nikolett

-habilitált egyetemi adjunktus-

TARTALOMJEGYZÉK

I. Bevezetés 3

I.1. A bélidegrendszer felépítése, általános jellemzői 3

I.2. Diabétesz mellitusz 6

I.3. Diabétesz és az enterális idegrendszer 8

I.4. Toll-like receptor 4 és az immunrendszer 11

I.5. Toll-like receptor 4 az enterális idegrendszerben és diabétesz során 13

II. Célkitűzések 15

III. Anyagok és módszerek 16

III.1. Állatmodell 16

III.2. Szöveti mintavétel és metszetkészítés 16

III.3. Kvantitatív posztembedding immunhisztokémia 17

III.4. Transzmissziós elektronmikroszkópia 18

III.5. Statisztikai analízis 18

IV. Eredmények 19

IV.1. A kísérleti állatok tömegének és vércukorszintjének változása a kezelés alatt 19

IV.2. TLR4-et jelölő aranyszemcsék denzitásának változása a kontroll állatok bélcsatornájának különböző szakaszaiban 20

IV.3. TLR4-et jelölő aranyszemcsék denzitásának változása a diabéteszes és inzulin-kezelt diabéteszes állatokban 24

V. Összefoglalás 27

VI. Irodalomjegyzék 30

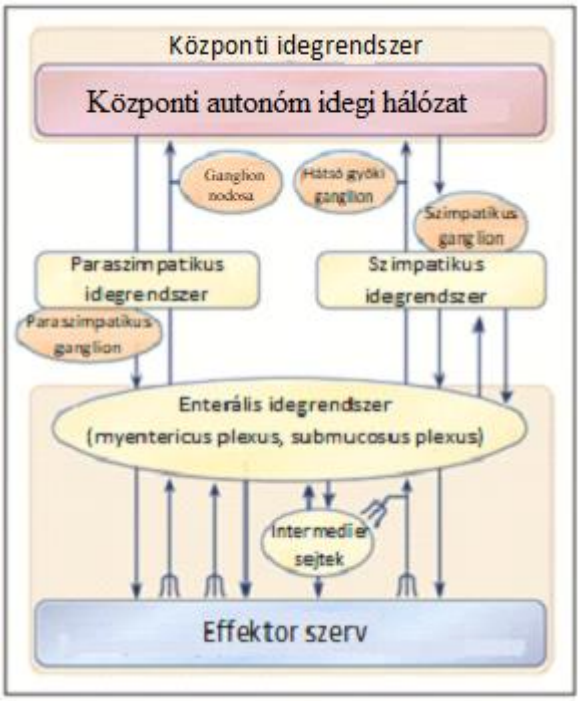
VII. Köszönetnyilvánítás 35

I. BEVEZETÉS

I.1. A bélidegrendszer felépítése, általános jellemzői

A gyomor-béltraktus számos feladatot lát el, többek között a tápanyagok abszorpciójában, szekrécióban, a bél motilitásában is fontos szerepet játszik, amelyek mellett immunológiai funkciókban is részt vesz. A sokrétű feladatok összehangolását az enterális idegrendszer (ENS, enteric nervous system) végzi (Bush és mtsai., 2002). Az ENS az autonóm idegrendszer legnagyobb divíziója a szimpatikus és a paraszimpatikus idegrendszer mellett.

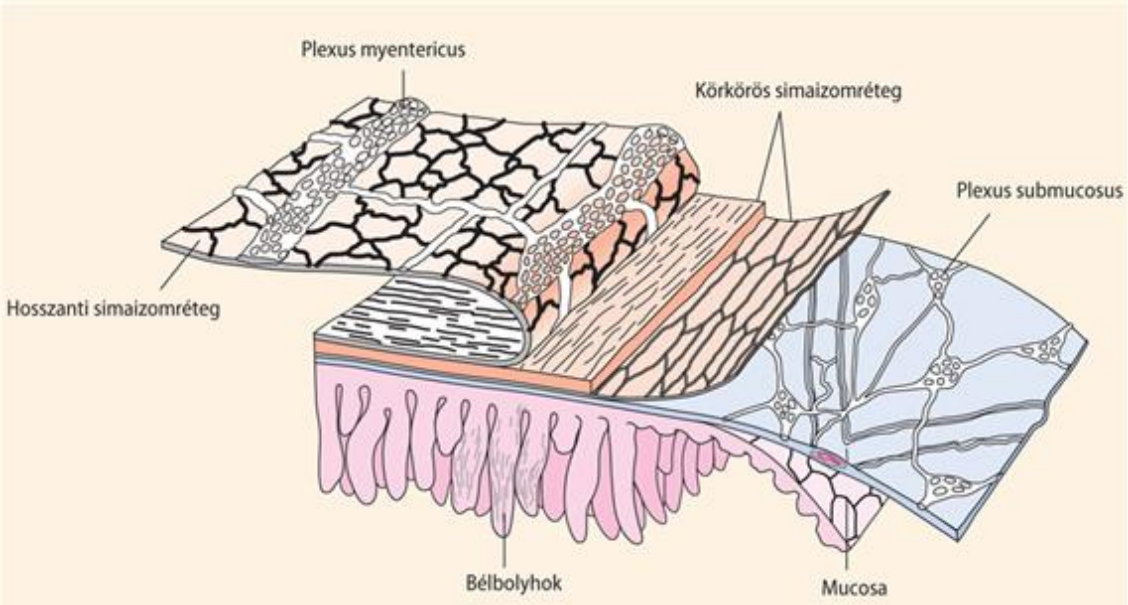
Az enterális ganglionok neuronokat és gliasejteket is tartalmaznak, amelyek a központi idegrendszerben lévő asztrocitákra hasonlítanak (Gershon, 1999). Az entericus neuronok és gliasejtek dúcléc eredetűek, és az egyedfejlődés korai szakaszában vándorolnak az emésztőrendszerbe (Newgreen és Young, 2002). Az entericus neuronok lehetnek afferens neuronok, interneuronok és motoneuronok is. Az ENS-t felépítő neuronok lokális reflexíveket alakítanak ki. A primer afferens neuronok axonjai végig az ENS-ben lokalizálódnak, az efferens végződések egy része az izomsejtek között, a simaizomrétegben helyezkedik el, míg más szenzoros végződések a nyálkahártyában találhatók. Ezáltal jelzik egyrészt a tápcsatorna falának feszülését, míg mások a nyálkahártya deformálódásáról adnak jelzést (Fonyó, 2011). Az ENS nagymértékben képes a központi idegrendszertől függetlenül működni, azonban a központi idegrendszernek is fontos szerepe van abban, hogy koordinálja az ENS különböző funkcióit. Az ENS kapcsolatban van a központi autonóm idegi hálózattal a szimpatikus és a paraszimpatikus rendszer motoros és szenzoros pályái által. Az ENS két módon is kifejtheti a hatását. Az egyik a direkt útvonal, amikor közvetlen hat a bélre, a másik az indirekt útvonal, amely intermedier sejteken keresztül valósul meg (**1. ábra**).



1. ábra A központi idegrendszer és a bélidegrendszer kapcsolata.

Forrás: Goyal és Hirano, 1996

Az ENS a legtöbb emlős állatban több kisebb, nem ganglionált és két nagy ganglionált plexusból áll: a myentericus plexusból (Auerbach-féle plexus) és a submucosus plexusból (Meissner-féle plexus). Ezekben a neuronok ganglionokban helyezkednek el, a ganglionok közötti összeköttetést internodális szegmentek biztosítják (Bagyánszki, 2002). A myentericus plexus a bélfal körkörös és hosszanti simaizomrétegei között helyezkedik el, és a bélperisztaltika szabályozásában fontos (**2. ábra**). A myentericus plexus három részre, a primer, szekunder és tercier plexusra tagolódik (Bagyánszki, 2002). A submucosus plexus a körkörös izomréteg és a nyálkahártya között található, feladata a szekretomotoros működés szabályozása (**2. ábra**). Ebben a plexusban kevesebb neuron található, és a ganglionok közötti szegmensek is vékonyabbak, mint az Auerbach-féle plexusban (Gershon, 1999). A két plexus közötti összeköttetést a nagyszámú axonok teszik lehetővé.



2. ábra A myentericus plexus és a submucosus plexus elhelyezkedése a bélben.

Forrás: Fonyó Attila: Az orvosi élettan tankönyve, 2011.

Az ENS-ben lévő neuronok funkcionálisan, neurokémiailag és morfológiailag is sokfélék lehetnek. Alakjukat tekintve nagy, kerek vagy ovális sejtmaggal rendelkeznek, gyakran egy vagy kettő kisebb magvacskával. Emiatt a morfológiai tulajdonságok miatt a neuronokat jól el lehet különíteni a gliasejtektől. A citoplazma leggyakrabban előforduló alkotói a riboszómák, amelyek vagy endoplazmatikus retikulumhoz kötődnek, vagy rozettákba és spirálokba rendeződnek. Továbbá számos kicsi, ovális mitokondrium és Golgi-készülék található meg a citoplazmában (Gabella, 1972). Az enterális ganglionokat bazális membrán veszi körül, így azok el vannak választva a környező kötőszövettől és a vérerektől (Bagyánszki, 2002).

Az enterális neuronok több mint 30 féle molekulát tudnak felszabadítani, amelyek neurotranszmitterként viselkednek az ENS-ben. Ezek közé tartozik a tachykinin, a szerotonin, az acetilkolin, a nitrogén-monoxid (NO), vagy a kalcitonin gén-rokon peptid (Harrington és mtsai., 2010).

I.2. Diabétesz mellitusz

A diabétesz mellitusz egy olyan anyagcsere betegség, amely következményeként hiba léphet fel az inzulin szekrécióban, az inzulin hatékonyságában vagy mind a kettőben (American Diabetes Association, 2012). A WHO adatai szerint 1980-ban a cukorbetegek száma 108 millió volt, és ez a szám 2014-re 422 millióra nőtt. 2016-ban a diabétesz közvetlenül 1,6 millió halálozásért volt felelős. A cukorbetegség fő típusai: 1-es típusú diabétesz, 2-es típusú diabétesz, terhességi diabétesz. A diabétesznek vannak ezeken kívül más típusai is, amelyeket egyéb okok váltanak ki, mint például gyógyszerek vagy kémiai szerek (American Diabetes Association, 2012).

Az 1-es típusú cukorbetegség (T1DM, type 1 diabetes mellitus) az összes diabéteszes megbetegedés 10%-át jelenti, amelynek oka az inzulin kiválasztás teljes hiánya, amelyet a β-sejtek autoimmun pusztulása okoz. Ez a folyamat addig halad előre, míg a β-sejtek teljesen eltűnnek, és az inzulin elválasztás megszűnik. Minkowski és von Mering jött rá arra, hogy a hasnyálmirigy eltávolításával cukorbetegséget tudtak előidézni (Von Mering és Minkowski, 1889; Fonyó, 2011). Az 1-es típusú diabéteszt inzulinfüggő diabétesz mellitusznak is nevezik, mivel aki ilyen betegségben szenved, az inzulinkezelésre szorul. A betegség kezdete általában tünetmentes szakasz, ekkor a β-sejtek pusztulnak. Mikor legalább már a 60%-uk elpusztult, akkor jelentkeznek a tünetek: szénhidrát fogyasztása után sokkal jobban megemelkedik a vér glükóz szintje, mint normál állapotban. Ezt a szakaszt exogén hiperglikémiának nevezik. Ezek után, ha tovább pusztulnak a β-sejtek, akkor a vér glükóz szintje már szénhidrát fogyasztás nélkül is nőni fog, amelyet endogén hiperglikémiának nevezünk (Fonyó, 2011). A cukorbetegség főbb tünetei közé tartozik még többek között a testtömeg csökkenése, túlzott szomjúság, fáradtság, bő vizelet, a beteg idegkárosodást szenvedhet (neuropátia), amely azokra az idegekre is hathat, amelyek a bél működését irányítják. A mikro- és makroangiopátia, a retinopátia jellegzetes szövődménye lehet az 1-es típusú diabétesznek. A retinopátia során a szem ideghártyájának erei károsodnak, amely a látás romlásához vagy látásvesztéshez is vezethet.

A 2-es típusú diabétesz mellitusz (T2DM, type 2 diabetes mellitus) sokkal gyakoribb formája a cukorbetegségnek. Gyakran felnőtt korban jelentkezik, de genetikai rendellenességek fiatal korban is 2-es típusú cukorbetegséghez vezethetnek. Ennek során a hiperglikémia nem képes a β-sejtekből megfelelő inzulinszekréciót kiváltani, és az inzulin nem képes az optimális vércukorszint fenntartására (Fonyó, 2011). Az T1DM és a T2DM megkülönböztetése nem mindig egyszerű. Habár az T1DM gyakran

gyermekkorban jelentkezik, ezért néha gyerekkori diabéteszként is hivatkoznak rá, felnőtteknél is kialakulhat (Katsarou és mtsai., 2017). A 20. század elején a gyerekkori diabétesz nagyon ritka volt. A 20. század végére azonban a nyugati országokban 1000-ből 3-4 gyerek esetében még 20 éves koruk előtt megjelent az T1DM, és hasonló növekedési rátát mutattak ki a világ többi részén is (Gale, 2002).

A terhességi diabétesz várandós kismamáknál jelentkezhet, és a többi cukorbetegség típushoz hasonlóan itt is a hasnyálmirigy β-sejtjei érintettek, amelyek nem képesek megfelelő inzulintermelésre. A betegség növeli a szövődmények kialakulásának kockázatát mind az anyában, mind a magzatban.

Kísérletes körülmények között a két leggyakrabban alkalmazott diabetogén ágens, amellyel hiperglikémiát indukálnak, az alloxán és a streptozotocin (STZ). Mindkét vegyület toxikus glükóz analóg, amelyet a GLUT2 glükóz transzporteren keresztül vesznek fel a β-sejtek. Az alloxán egy urea-származék, amely a β-sejtek nekrózisát idézi elő (Lenzen, 2008). A STZ-indukált β-sejt halál oka a dezoxiribonukleinsav (DNS) alkilezése (Elsner és mtsai., 2000), amely során egy metil csoport kerül át a STZ-ról a β-sejt DNS-ére, amely végső soron fragmentációt eredményez (Lenzen, 2008).

I.3. Diabétesz és az enterális idegrendszer

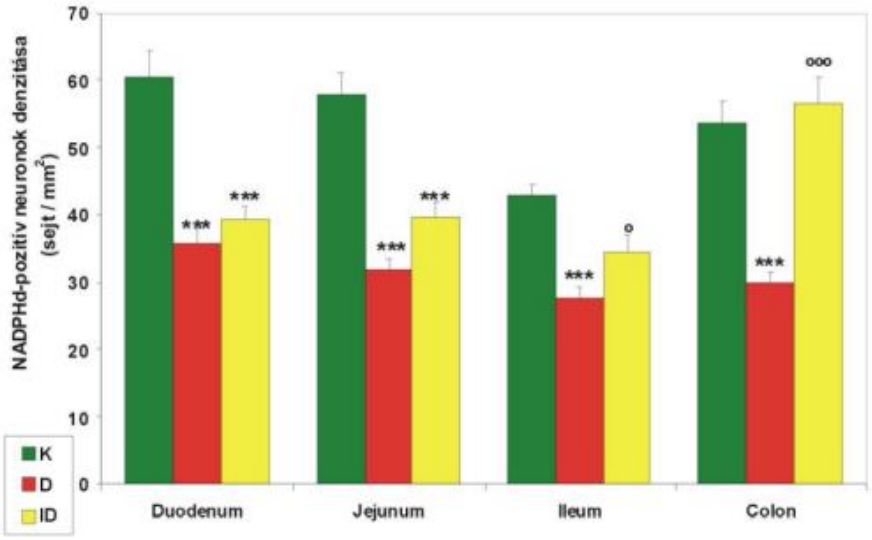
A diabétesz mellitusz gyakran okoz gasztrointesztinális zavarokat, mint például hasmenést, hányingert, hányást vagy éppen székrekedést. Ezek hátterében a myentericus neuronok károsodása, pusztulása meghatározó, ugyanis a diabétesz gyakran indukál változásokat a neuronok méretében, számában, valamint degeneratív változásokat is előidézhet (Chandrasekharan és mtsai., 2011). A myentericus neuronok károsodásában a nitrerg szubpopuláció a leginkább érintett. A myentericus nitrerg neuronok az ENS gátló neuron csoportját alkotják, nem adrenerg, nem kolinerg (NANC, non-adrenergic, non-cholinergic) neuronok, amelyek a NO-ot használják neurotranszmitterként (Bagyánszki, 2002). A neuronális nitrogén-monoxid szintáz (nNOS) által termelt nitrogén-monoxid gátló neurotranszmitter, amely a simaizom relaxációban fontos a gasztrointesztinális traktusban és ezáltal fontos a bélmotilitás szabályozásában (Bult és mtsai., 1990).

Cellek és munkatársai szerint a diabéteszes nitrerg neuropátia két szakaszra különíthető el. A STZ-indukált diabétesz korai szakaszában a nNOS mennyisége csökken, azonban ez egy reverzibilis változás, amely időben megkezdett inzulinkezelés hatására visszafordítható. Emiatt gondolják úgy, hogy ez a nNOS csökkenés nem okoz strukturális károsodást a fehérjékben. Ebben a szakaszban azonban a sejttestek nNOS szintje változatlan marad. Ennek lehetséges magyarázata az, hogy a nNOS axonális transzportja a sejttesttől az axonig megváltozik a diabétesz korai stádiumában (Cellek és mtsai., 2003). A második fázisban a nNOS szintje megnő a sejttestben, mivel nem tud az axonba transzportálódni, ezáltal nő a NO mennyisége. Emiatt előrehaladott glikációs végtermékek halmozódnak fel a vérben és a szövetekben. Ezeknek a végtermékeknek és a NO felhalmozódásának következtében fokozódik az oxidatív stressz a sejttestekben, mely apoptózishoz, a nitrerg neuronok pusztulásához vezet. A nitrerg neuropátia ezen degeneratív fázisa már irreverzibilis folyamat, inzulinkezeléssel sem fordítható vissza (Cellek, 2004).

Myentericus neuronok számának csökkenését mutatták ki diabétesz esetén a gyomorban (Fregonesi és mtsai., 2001), a vakbélben (Zanoni és mtsai., 1997), az ileumban és a proximális colonban (Furlan és mtsai., 2002). Több tanulmány is bebizonyította, hogy diabétesz esetén csökken a nNOS neuronoknak a száma, valamint kutatások bizonyították, hogy a bélcsatorna különböző szakaszaiban lévő myentericus nitrerg neuronok különböző mértékben sérülnek a betegség során (Izbéki és mtsai., 2008; Bagyánszki és Bódi, 2012; Bódi és mtsai., 2012). A diabéteszes patkányok jejunum,

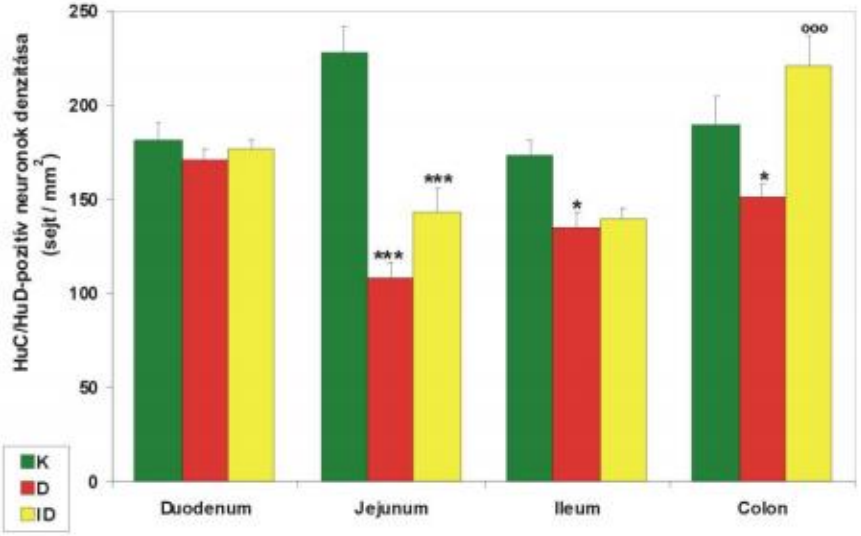
ileum és colon bélszakaszában mind az összneuronszám, mind a nitrerg neuronok száma szignifikánsan csökkent, míg a duodenumban ez a csökkenés csak a nitrerg neuronokat érintette, az összneuronszám változatlan maradt (**3. ábra, 4. ábra**). A duodenum az egyetlen bélszakasz, ahol a myentericus neuronok nem pusztulnak el. Az inzulinkezelés hatása a nitrerg neuronokra és az összneuronszámra is bélszakasz-specifikus változást mutat.

Ennek hatására kutatócsoportunk korábban vizsgálta a különböző bélszakaszok mikrobiális sokféleségét kontroll, kezeletlen diabéteszes és inzulin-kezelt diabéteszes patkányokban. A duodenumban lévő *Lactobacillus* nemzetség nem mutatott változást diabétesz és inzulinkezelés hatására, amely összefüggésben van a korábban említett eredményekkel, mely szerint ez volt az egyetlen olyan bélszakasz, ahol az összneuronszám nem változott. Tehát a duodenum mikrobióta összetétele nem jelzi a gyulladásos mikrokörnyezet kialakulását. Az ileumban azonban jelentős mennyiségű *Klebsiella* nemzetségbe tartozó faj jelent meg diabétesz hatására. Ezek a Gram-negatív baktériumok humánpatogének, amelyek többek között bélgyulladás kialakulásához is vezethetnek. Még nem teljesen tisztázott, hogy a *Klebsiella* invázió oka vagy következménye a diabéteszes betegségnek. Mindenesetre a Gram-negatív baktérium mennyiségének növekedése kapcsolatba hozható a gyulladással (Wirth és mtsai. 2014).



3. ábra Myentericus nitrerg neuronok (NADPHd-pozitív) denzitásának változása a kontroll (K), diabéteszes (D) és inzulin-kezelt diabéteszes (ID) patkányok különböző bélszakaszaiban. $^{***}p<0,001$ (kontrollhoz viszonyítva), $^{o}p<0,05$, $^{ooo}p<0,001$ (D és ID között).

Forrás: Izbéki és mtsai., 2008; Bódi, 2011



4. ábra Myentericus összneuronszám (HuC-HuD-pozitív) változása a kontroll (K), diabéteszes (D) és inzulin-kezelt diabéteszes (ID) patkányok különböző bélszakaszaiban. $^{*}p<0,05$, $^{***}p<0,001$ (kontrollhoz viszonyítva), $^{ooo}p<0,001$ (D és ID között).

Forrás: Izbéki és mtsai., 2008; Bódi, 2011

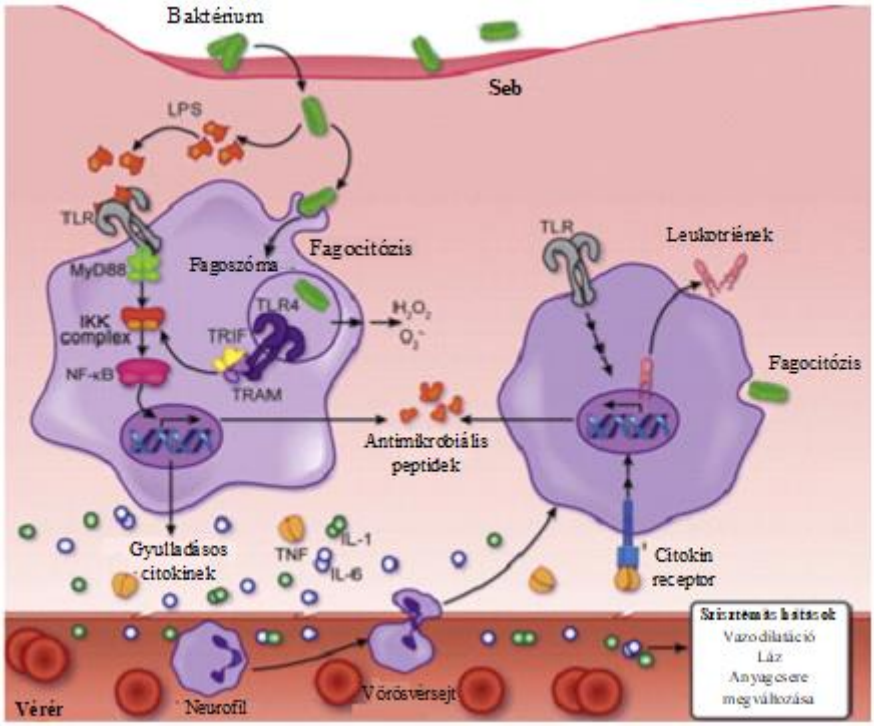
I.4. Toll-like receptor 4 és az immunrendszer

Az immunrendszer két nagy részből áll: a veleszületett és az úgynevezett szerzett immunitásból, és ezek feladata, hogy felismerjék, majd eliminálják a patogén mikroorganizmusokat. A veleszületett immunrendszer ősinek tekinthető, ugyanazok a molekuláris mechanizmusok találhatók meg a növényekben és az állatokban is. Ezzel szemben az adaptív immunrendszer viszonylag újnak mondható, hiszen először az állkapcsosoknál jelenik meg az evolúció során (Flajnik, 2018). Az adaptív immunrendszer az antigén egy-egy epitópját ismeri fel, amelyhez antigén receptorokat használ. Ezek a receptorok a B és T sejtek felszínén expresszálódó T-sejt- és B-sejt receptorok (Takeda és mtsai., 2003). A veleszületett immunrendszer mintázat felismerő receptorokkal (PRR, pattern recognition receptor) azonosítja a veszély jeleket. A veszély jelek lehetnek patogén-asszociált molekuláris mintázatok (PAMP-ok, pathogen-associated molecular patterns), valamint veszély-asszociált molekuláris mintázatok (DAMP-ok, danger-associated molecular patterns). A PAMP-ok a patogének által termelt molekulák, amelyek a mikróba életéhez esszenciálisak. A PAMP-ok nagyon konzerváltak, ezért az őket felismerő PRR-ok esetében is limitált a variabilitás. Olykor a szervezet saját anyagai is veszélyt jelző molekulaként jelenhetnek meg, ezek a DAMP-ok. A PRR-ok lehetnek oldottak vagy sejt-asszociált molekulák. A Toll-like receptorok (TLR-ok) az utóbbi csoportba tartozó mintázat felismerő receptorok, amelyek fontos szerepet játszanak a patogének felismerésében, valamint a gyulladásos és az immunválaszok kiváltásában. A Toll-család első tagját a Drosophilaban fedezték fel. Az ecetmuslica alapvetően érzéketlen a gombás fertőzésekre, azonban a toll gén kiütésével érzékennyé vált. Később rájöttek, hogy a génnek több feladatban is szerepe van, többek között a Drosophila lárváinak dorzo-ventrális fejlődésében is szerepet játszik. Egy évvel később emlősökben is azonosították e gén homológját (Medzhitov és mtsai., 1997). Mivel a felfedezett fehérjecsalád hasonlított a Drosophilaban felfedezett Tollra, innen jött a receptor család elnevezése. Ma már tudjuk, hogy a TLR-ok legfontosabb feladata a PAMP-ok felismerése (Janeway és mtsai., 2002).

A Toll család minden tagja transzmembrán fehérje, amely rendelkezik egy extracelluláris, valamint egy citoplazmatikus résszel. Az extracelluláris doménjük 18-31 leucin gazdag ismétlődéseket tartalmaz, több száz aminosavból épül fel, és a Toll család tagjaiban eléggé különböző (például a TLR2 és TLR4 extracelluláris doménje 24%-ban

azonos), emiatt feltételezhető, hogy különböző ligandok különböző receptorokat aktiválnak (Anderson, 2000).

A leginkább tanulmányozott TLR a TLR4, amelynek legtöbb tulajdonságát makrofágokban és dendritikus sejtekben vizsgálták. Megtalálható a sejtfelszínen és az endoszómákban is, legfőbb receptora a Gram-negatív baktériumok felszínén lévő lipopoliszacharidoknak (LPS). A szignál jelátvitelt tekintve először egy LPS-kötő fehérje (LPB, lipopolisaccharide binding protein) segíti azt, hogy a LPS a receptor komplexhez kötődjön, mint amilyen a TLR4 vagy a myeloid differenciáló faktor 2 (MD2, myeloid differentiation factor 2). A MD2 egy olyan glikoprotein, amely a TLR4 aktivációjában játszik szerepet mint extracelluláris adaptor fehérje. A LPB egy hármas komplexet képez a LPS-dal, illetve a sejtfelszíni molekula 14-gyel (CD14, cluster of differentation 14). A CD14-nek két formája ismert, szolubilisen és membrán-kötött helyzetben található meg. Részt vesz a LPS kötésében, és prezentálja azt a TLR4-nek vagy a MD2-nek. A TLR4 általi citokinek, kemokinek aktivációja két úton történhet. Az egyik, a korai válasz, amelyet myeloid differenciáló faktor 88-függő (MyD88, myeloid differentiation factor 88) útvonalnak is neveznek. Ezen útvonalban a MyD88 és a MyD88 adaptor-szerű fehérje indít el aktivációs utakat, melynek végén a nukleáris faktor kappa B (NF-kB) aktiválódni fog. Ugyanezt a hatást éri el a késői, MyD88-független útvonal is, amely során az interferon-β-t indukáló TIR-domént tartalmazó adaptor fehérje (TRIF) és TRIF-kapcsolt adaptor molekula (TRAM) váltják ki az NF-kB aktivációját. Azonban ez gyengébb aktivációt eredményez, mint a MyD88-függő útvonal esetén (Palsson-McDermott és mtsai., 2004). A gyulladásos citokinek a gyulladás közelében fejtik ki a hatásukat, megnövelik az endothélsejtek permeabiliását, a neutrofil granulociták kikerülnek az érrendszerből, majd antimikrobiális fehérjéket és kis molekulákat, valamint reaktív oxigén gyököket bocsátanak ki magukból (**5. ábra**) (Moresco és mtsai., 2011).



5. ábra A Toll-like receptorok gyulladásos citokin termelésének szignalizációs útvonala.

Forrás: Moresco és mtsai., 2011

I.5. Toll-like receptor 4 az enterális idegrendszerben és diabétesz során

Számos tanulmány bizonyítja, hogy a TLR-ok aktiválása nélkülözhetetlen a bélsérülések esetén, valamint szükséges a bélhám homeosztázisának fenntartásához (Rakoff-Nahoum és mtsai., 2004). A TLR4-et a humán hasnyálmirigy β-sejtjeiben is azonosították (Vives-Pi és mtsai., 2003). A TLR4 kifejeződését különböző bélszakaszokban is vizsgálták. A TLR4 expressziója a myentericus plexus sejtjeiben, valamint a simaizomrétegben magas, míg a jejunum epitélsejtjeiben alacsony volt. (Rumio és mtsai., 2006). Majd később azt is kimutatták, hogy a vékonybél és a vastagbél myentericus és submucosus plexusában is jelen van a TLR4. A receptor jelenléte a disztális colonban erőteljesebb volt, mint a proximális vékonybélben (Barajon és mtsai., 2009). Több kutatás megerősítette, hogy az T1DM egy gyulladásos állapot (Devaraj és mtsai., 2006), amelyben a TLR4 nagy szerepet játszik. A TLR4 gén hiányában csökken a gyulladásos citokinek és kemokinek expressziója, amely a gyulladás csökkenéséhez vezet (Devaraj és mtsai, 2011). Ezen kívül TLR2 és TLR4 up-regulációt figyeltek meg

T1DM betegekből izolált monocitákon (Devaraj és mtsai., 2008). Korábban azt is kimutatták, hogy a TLR4 szerepet játszik a T2DM kialakulásában. A LPS aktiválja a TLR4-et, valamint a β-sejtek inzulin tartalmának csökkenéséhez is vezet. Egyes tanulmányokban már leírták, hogy a TLR4 gén expressziója megnőtt nem elhízott diabéteszes (NOD, non-obese diabetic) egerekben (Mohammad és mtsai., 2006). Molekuláris vizsgálatok is megerősítették, hogy a magas glükóz szint a TLR2 és TLR4 expresszióját és aktivitását is megemelte, amely ezáltal a MyD88-függő útvonalon keresztül gyulladásos citokinek szekréciójához vezetett (Dasu és mtsai., 2008).

Kutatócsoportunk korábban már vizsgálta a gyulladásos citokinek közé tartozó tumor nekrózis faktor α (TNFα) és interleukin-6 (IL6) expresszió változását a különböző bélszakaszokban. Az eredmények alapján megfigyelhető, hogy a TNFα-t jelölő aranyszemcsék denzitása a diabéteszes patkányok duodenumában szignifikánsan megnőtt, a colonban ez az érték csökkent, míg az ileumban nem változott (Mezei, 2017; Barta, 2018; Bódi és mtsai., 2021). Az IL6 expressziója diabéteszes patkányokban kis mértékben magasabb volt a duodenumban, az ileumban és a colonban is, azonban ez a növekedés nem volt szignifikáns. Inzulinkezelés hatására a duodenumban szignifikánsan megemelkedett az IL6-ot jelölő aranyszemcsék denzitása a kontrollhoz képest (Mezei, 2017).

II. CÉLKITŰZÉSEK

Kutatócsoportunk korábban már vizsgálta a különböző bélszakaszok mikrobiális összetételét, amely 1-es típusú diabéteszes patkányokban régió-specifikus változást mutatott. Az ileumban megfigyelhető nagy mennyiségű *Klebsiella* nemzetségbe tartozó fajok jelenléte arra utalhat, hogy ez a Gram-negatív baktérium az 1-es típusú diabétesz biomarkereként szolgálhat. A TLR4 az immunrendszer olyan mintázat felismerő receptora, amely a Gram-negatív baktériumok felszínén található LPS-okat ismeri fel, tehát többek között a *Klebsiella* nemzetségbe tartozó fajokat. Ezért vizsgálataink során a következő kérdésekre kerestük a választ:

1. Milyen a TLR4 szubcelluláris lokalizációja a myentericus ganglionokban?
2. A TLR4 mutat-e bélszakasz-függő különbségeket az egészséges állatok myentericus ganglionjaiban?
3. Hogyan változik a TLR4 expressziója a duodenum, az ileum és a colon myentericus ganglionjaiban STZ-indukált kezeletlen diabéteszes és inzulin-kezelt diabéteszes patkányokban?
4. Van-e összefüggés a TLR4 expressziója és a diabéteszes nitrerg neuropátia között?

III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A kísérleteink során az állatok tartása és felhasználása az Európai Uniós etikai előírásoknak (86/609/EEC) és a magyarországi jelenleg érvényben lévő törvényi szabályozásnak (XXVIII/1998 és 243/1998) megfelelően, a Szegedi Tudományegyetem intézményi etikai bizottságának engedélyével történt (XX./1636/2019.).

III.1. Állatmodell

Kísérleteink során 200-300 g tömegű, hím Wistar patkányokat vizsgáltunk. A patkányokat véletlenszerűen három csoportba osztottuk: kontroll (n=5), STZ-indukált, kezeletlen diabéteszes (n=4) és STZ-indukált inzulin-kezelt diabéteszes (n=4) csoportra. A hiperglikémiát 60 mg/ttkg dózisban egyszeri intraperitoneális STZ (Sigma, Magyarország) injekcióval indukáltuk. 48 órát követően vért vettünk a patkányok farok vénájából. Azokat az állatokat tekintettük diabéteszesnek, amelyek vércukorszint koncentrációja 18 mM feletti értéket mutatott (Accu-Chek® Active vércukormérő). A cukorbeteg állatok egyik részénél azonnali inzulinkezelést kezdtünk el, naponta két alkalommal, délelőtt (2 IU) és délután (2 IU) szubkután injekció formájában (Humulin M3, Eli Lilly, Hollandia). A szúrási stressz kiváltásának érdekében a kontroll és a kezeletlen diabéteszes csoport állatai naponta fiziológiás sóoldatot kaptak. A kísérlet 10 hétig tartott, mely során hetente mértük az állatok vércukorszintjét és testtömegét. Az állatok számára a kísérlet teljes ideje alatt korlátlanul hozzáférhető volt a víz és táplálék.

III.2. Szöveti mintavétel és metszetkészítés

A kísérleti periódus után a patkányokat klorálhidrátos (375 mg/kg) anesztéziának vetettük alá, majd cervikális diszlokációt végeztünk rajtuk. A hasüregüket U-alakban felnyitottuk, a béltraktust kiboncoltuk, és a különböző bélszakaszokat foszfát-pufferben (0,05 M, pH 7,4) alaposan átmostuk. Ezek után mintákat vettünk a vékonybél proximális és disztális részéről, illetve a vastagbél középső területéről.

Az elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz gyűjtött 2-3 mm széles bélmintákat egy éjszakán keresztül fixáltuk 2%-os paraformaldehid és 2%-os glutáraldehid oldatában. Mosás után egy óráig utófixáltunk 1%-os ozmium-tetroxid oldatban. A mintákat ezután foszfát-pufferrel (0,1 M; pH 7,4) mostuk, majd felszálló alkoholsorozatban víztelenítettük, először 50%-os, majd ezután 70%-os alkoholt használva. Ezután a mintákat uranil-acetáttal telített etanollal kezeltük, majd a víztelenítés 96%-os etanolban, abszolút alkoholban és acetonban folytatódott. A víztelenítés után a mintákat Embed812

gyantába raktuk aceton intermédiumon keresztül, a gyantát 60 °C-on polimerizáltattuk. A 70 nm-es ultravékony metszeteket Reichert típusú ultramikrotómmal készítettük.

III.3. Kvantitatív posztembedding immunhisztokémia

Az ultravékony metszeteken posztembeddig immunhisztokémiai festést végeztünk. A nikkel-rostélyokra helyezett metszeteket 1%-os perjódsavban mostuk 9 percig, majd 3x5 perces desztillált vizes mosás következett. Ezután 2%-os nátrium-perjodát oldatra helyeztük a mintákat 10 percig, amit szintén 3x5 perces desztillált vizes mosás követett. Következő lépésként a metszeteket TRIS-pufferes sóoldatra (TBS, TRIS-buffered saline, pH 7,4) helyeztük 3x2 percre. Ezután 30 perces blokkolás következett, amely során a mintákat 1%-os borjú szérum albuminban (BSA, bovine serum albumin) inkubáltuk. Újabb desztillált vizes mosás után a grideket ismét TBS cseppekre helyeztük. Ezt követően a metszeteket elsődleges antitesttel (**1. táblázat**) inkubáltuk egy éjszakán át nedves kamrában, szobahőmérsékleten.

A második nap TBS cseppekre helyeztük a mintákat 2x10 percre, majd 2x5 percig BSA-TRIS puffer oldatára raktuk őket (0,05g BSA + 25 µl Tween-20 + 5 ml TRIS) (pH 7,6). Ezután a metszeteket 3 óráig inkubáltuk 18 nm arany-konjugált másodlagos anitesttel (**1. táblázat**). A grideket ismét desztillált vízzel mostuk, majd szűrőpapírral megszárítottuk őket. A festés során, hogy elkerüljük a mikroszennyeződéseket, az elsődleges és másodlagos antitesten kívül minden oldatot átszűrtünk.

Elsődleges antitest	**Gazda**	**Hígítás**	**Cég**
anti-TLR4	egér	1:100	Sigma, Magyarország
Másodlagos antitest	**Gazda**	**Hígítás**	**Cég**
anti-egér 18 nm-es arany-konjugált antitest	kecske	1:20	Jackson ImmunoResearch, USA

1. táblázat Posztembedding immunhisztokémiai festés során használt elsődleges és másodlagos antitestek.

III.4. Transzmissziós elektronmikroszkópia

A posztembeddig immunhisztokémiai festés után kontrasztfestést végeztünk, amely során a mintákat először uranil-acetát cseppekre helyeztük, amit desztillált vizes mosás követett, majd ólom-citrát oldatba (Merck, Németország) tettük őket (Bódi, 2011.; Mezei, 2017.; Barta, 2018.). Az ultravékony metszeteket JEOL JEM 1400+ típusú transzmissziós elektroszkóppal vizsgáltuk. A különböző bélszakaszokban lévő myentericus ganglionokról képeket készítettünk 20000x-es nagyításon (2 állat/bélszakasz, 5 ganglion/bélszakasz/állat, 5 kép/ganglion). Ezután megszámoltuk a myentericus ganglionokban az egységnyi területre eső TLR4-et jelölő aranyszemcsék számát (ImageJ program).

III.5. Statisztikai analízis

Ahhoz, hogy meg tudjuk állapítani, mutat-e a TLR4 denzitása bélszakasz-specifikus változásokat az egyes állatcsoportok között, adatainkon statisztikai analízist végeztünk. Egyfaktoros varianciaanalízist (ANOVA), Kruskal-Wallis és Newman-Keuls teszteket végeztünk (GraphPad Prism 6.0 program). A szignifikancia szintjét $p<0,05$ értékben határoztuk meg, az adatokat átlag ± SEM formában tüntettük fel.

IV. Eredmények

IV.1. A kísérleti állatok tömegének és vércukorszintjének változása a kezelés alatt

A 10 hetes kísérlet alatt folyamatosan ellenőriztük az állatok testtömegének és vércukorszintjének a változását. A testtömeg mind a három állatcsoportnál gyarapodott, a kezdeti értékhez viszonyítva szignifikánsan megnövekedett. Ez a növekedés a kontroll és az inzulin-kezelt diabéteszes csoportban hasonló mértékű volt. A STZ-indukált, kezeletlen diabéteszes patkányok esetében a súlygyarapodás elmaradt a másik két csoporttól, a kontroll csoport állatainak végső testtömegével összehasonlítva szignifikánsan alacsonyabb volt (382,5±17,69 g vs. 449,6±20,32 g; *p<0,05).

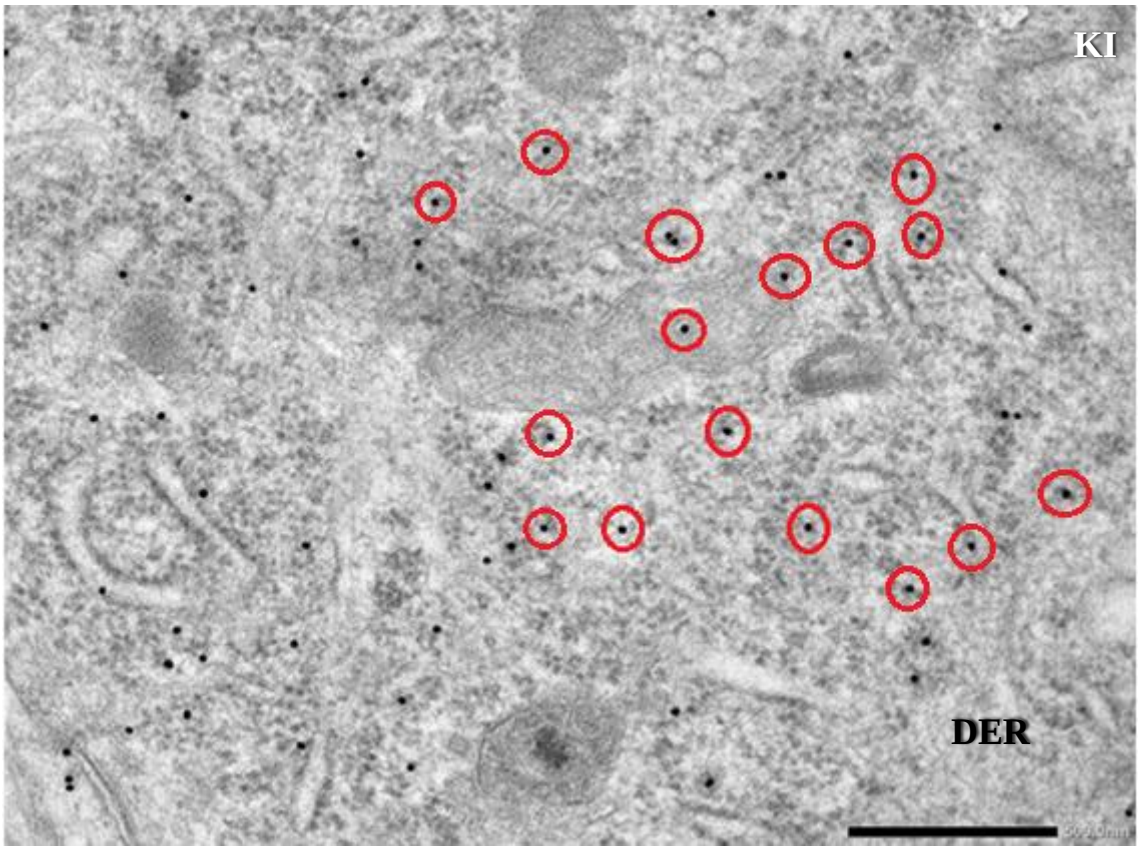
Hasonló kezdeti vércukorszintről indulva a kezeletlen diabéteszes állatcsoport esetén figyelhetünk meg jelentős változást. A diabéteszes állatok vércukorszintje a kontroll vércukorértékekhez képest szignifikánsan magasabb volt (26,23±1,89 mmol/L vs. 6,27±0,32 mmol/L; ****p<0,0001). Az inzulin-kezelt diabéteszes patkányok vércukorszintje a kontroll csoporthoz közelítő értékeket mutatott (7,50±1,87 mmol/L vs. 6,27±0,32 mmol/L) (**2. táblázat**).

Állatcsoport	Testtömeg (g)		Vércukorszint (mmol/L)	
	Kezdeti	Végső	Kezdeti	Végső
Kontroll	266,8±14,63	449,6±20,32$^{\#\#\#\#}$	6,40±0,17	6,27±0,32
Diabéteszes	274,0±17,11	382,5±17,69$^{\#\#\#\ *}$	6,40±0,24	26,23±1,89$^{\#\#\#\#,\ ****,\ oooo}$
Inzulin-kezelt diabéteszes	265,3±17,94	437,3±30,44$^{\#\#\#}$	6,37±0,33	7,50±1,87^{oooo}

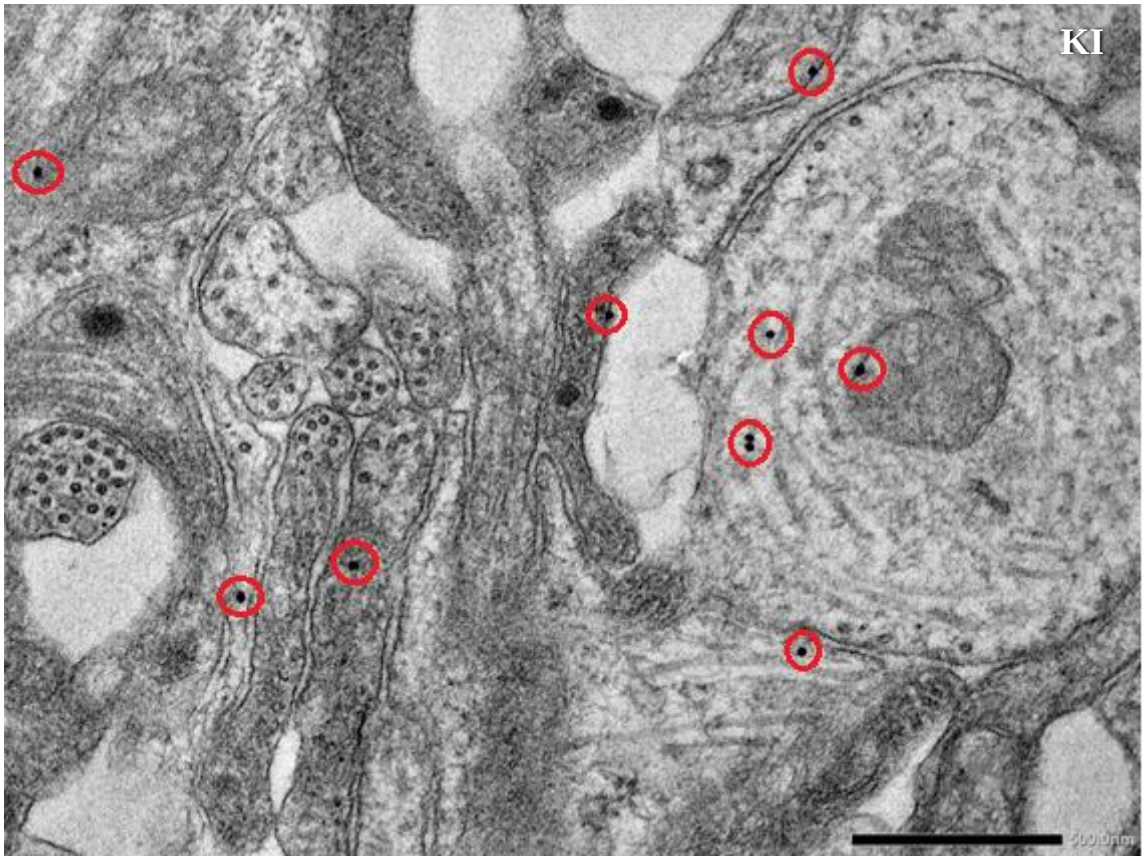
2. táblázat Testtömeg és vércukorszint változása a kontroll, diabéteszes és inzulin-kezelt diabéteszes állatoknál. Az adatokat átlag ± SEM formában tüntettem fel. ###p<0,001, ####p<0,0001 (kiindulási állapothoz viszonyítva); *p<0,05, ****p<0,0001 (kontrollhoz viszonyítva); ^{oooo}p<0,0001 (inzulin-kezelt és kezeletlen diabéteszes csoport között).

IV.2. TLR4-et jelölő aranyszemcsék denzitásának változása a kontroll állatok bélcsatornájának különböző szakaszaiban

A TLR4 expresszióját 18 nm-es aranyszemcsék segítségével követtük nyomon, melyek a myentericus ganglionban a sejttestben (**6. ábra**) és a neuropil régióban (**7. ábra**) is megtalálhatók, azonban a sejttestben sokkal nagyobb mennyiségben fordultak elő.

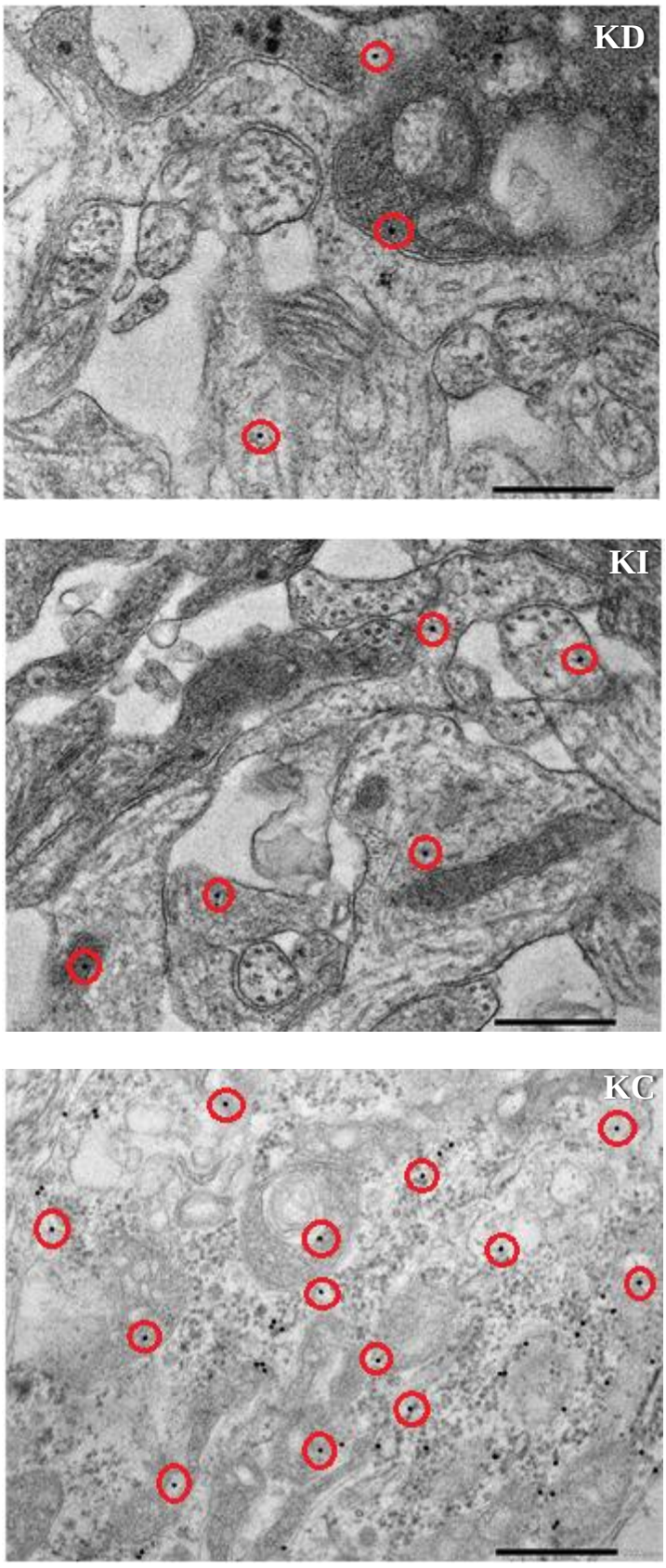


6. ábra: Transzmisszós elektronmikroszkópos felvétel a TLR4-et jelölő aranyszemcsékről kontroll állat ileumából származó myentericus neuron sejttestjében. (A jobb átláthatóság érdekében nem jelöltem minden aranyszemcsét). Piros kör: 18 nm-es aranyszemcse, DER: durva felszínű endoplazmatikus retikulum, KI: kontroll ileum. Lépték: 500 nm.

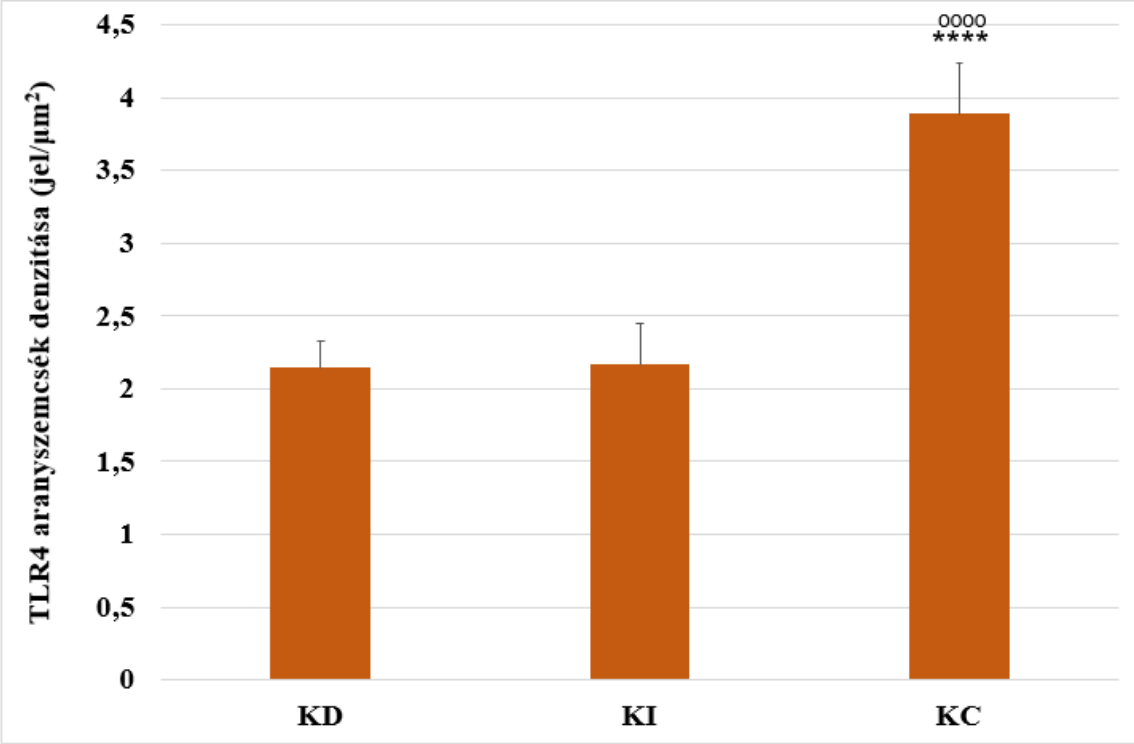


7. ábra: Transzmisszós elektronmikroszkópos felvétel a TLR4-et jelölő aranyszemcsékről kontroll állat ileumából származó myentericus neuron neuropil régiójában. Piros kör: 18 nm-es aranyszemcse, KI: kontroll ileum. Lépték: 500 nm.

Megvizsgálva a különböző bélszakaszokat, megfigyeltük, hogy a kontroll állatok esetében a TLR4 mennyisége a bélcsatorna hossztengelye mentén disztális irányba haladva növekvő tendenciát mutat (**8-9. ábra**). Tehát a TLR4-et jelölő szemcsék száma a duodenumban volt a legalacsonyabb, az ileumban is nagyon hasonló értékeket mértünk (2,14±0,18 jel/µm^2 vs. 2,16±0,28 jel/µm^2), a colonban azonban mind a duodenumhoz, mind az ileumhoz képest szignifikáns, közel kétszer több aranyszemcsét figyeltünk meg (3,89±0,35 jel/µm^2 vs. 2,14±0,18 jel/µm^2, ****p<0,0001; 3,89±0,35 jel/µm^2 vs. 2,16±0,28 jel/µm^2 , ^{oooo}p<0,0001) (**8-9. ábra**).



8. ábra: Transzmisszós elektronmikroszkópos felvétel a TLR4-et jelölő aranyszemcsékről kontroll állat duodenum, ileum és colon bélszakaszából származó myentericus neuron sejttestjében. Piros kör: 18 nm-es aranyszemcse. Lépték: 500 nm.

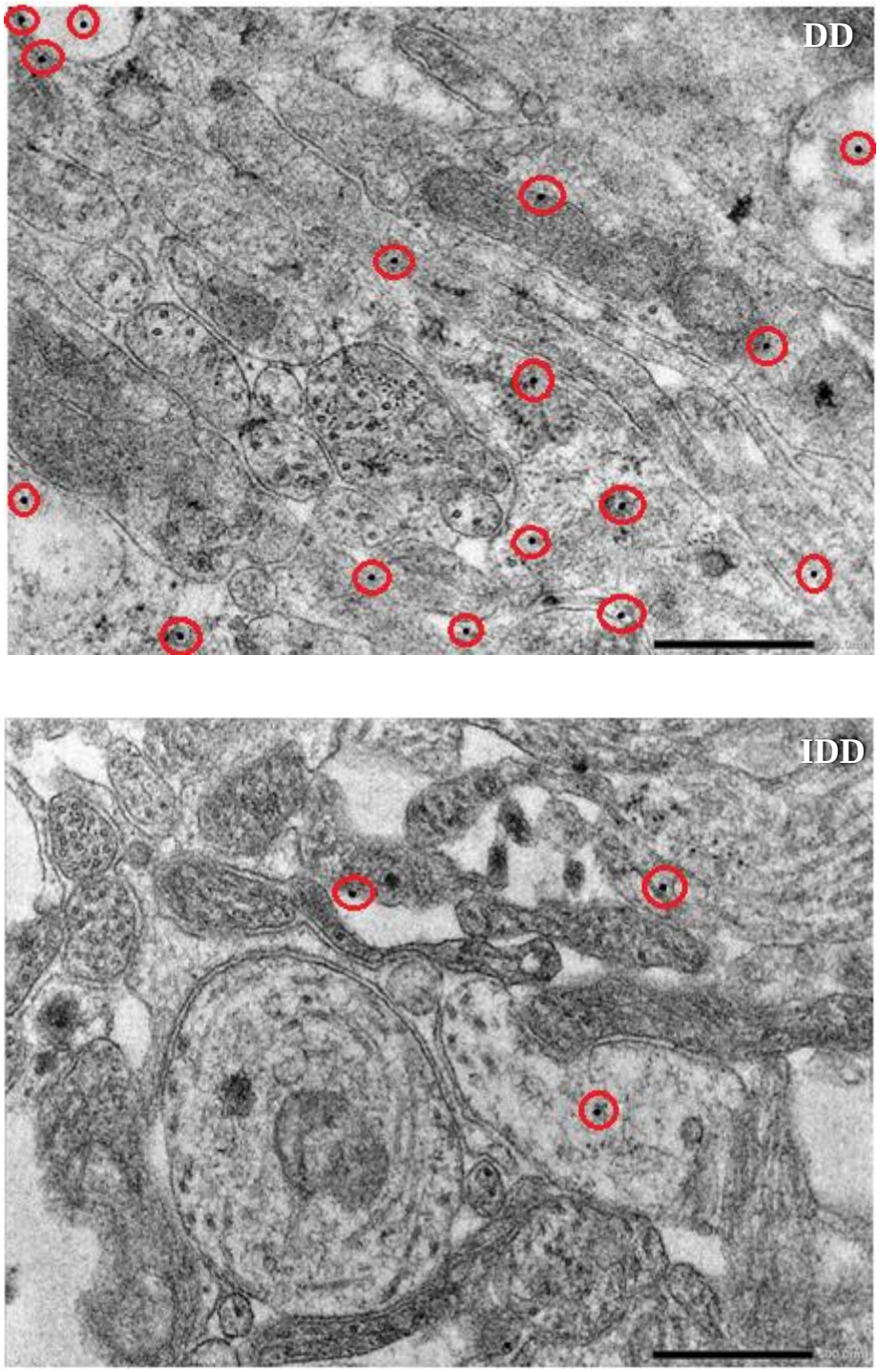


9. ábra: TLR4 aranyszemcsék denzitása kontroll patkány különböző bélszakaszaiban a myentericus ganglionokban. Az adatokat átlag ± SEM formában ábrázoltam. ****p<0,0001; ^{oooo}p<0,0001. KD: kontroll duodenum, KI: kontroll ileum, KC: kontroll colon.

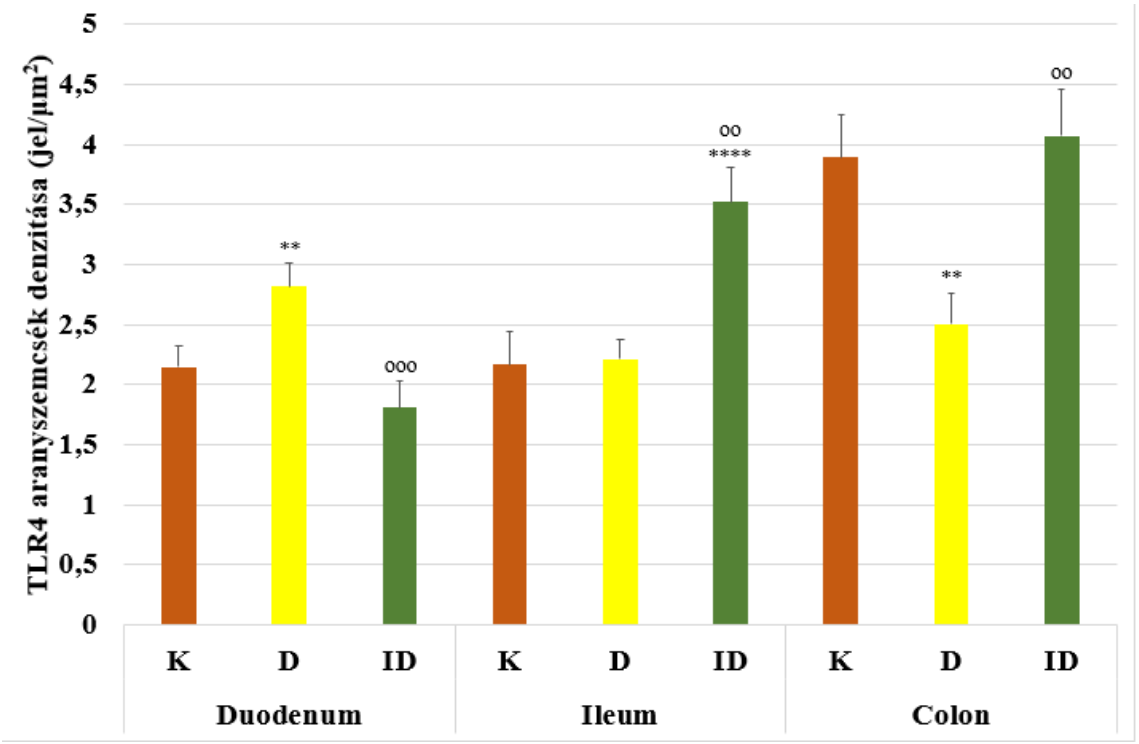
IV.3. TLR4-et jelölő aranyszemcsék denzitásának változása a diabéteszes és inzulin-kezelt diabéteszes állatokban

A diabéteszes patkányokban a TLR4 denzitása bélszakasz-függő változásokat mutatott. A duodenumban szignifikánsan növekedett a TLR4 aranyszemcsék száma (2,81±0,20 jel/μm^2 vs. 2,14±0,18 jel/μm^2; **p<0,01), míg a colonban több, mint 30%-os csökkenést figyeltünk meg (2,51±0,25 jel/μm^2 vs. 3,89±0,35 jel/μm^2; **p<0,01) a kontroll csoporthoz képest. A STZ-indukált kezeletlen diabéteszes patkányok ileumában a TLR4 aranyszemcsék denzitása nem változott (2,21±0,16 jel/μm^2 vs. 2,16±0,28 jel/μm^2) (**10-11. ábra**).

Az azonnali inzulinkezelés is eltérő hatással volt a különböző bélszakaszok TLR4 expressziójára. Az inzulin protektív hatását a duodenumban és a colonban is megfigyeltük. Az aranyszemcsék száma az inzulin-kezelt állatok ezen bélszakaszaiban a kontrollhoz közeli értékeket mutatott (**10-11. ábra**). Azonban az ileumban az inzulinkezelés hatására a TLR4 denzitása körülbelül másfélszeresére növekedett a kezeletlen diabéteszes és a kontroll csoporthoz képest is (3,52±0,29 jel/μm^2 vs. 2,16±0,28 jel/μm^2; ****p<0,0001) (**11. ábra**).



10. ábra: Transzmisszós elektronmikroszkópos felvétel a TLR4-et jelölő aranyszemcsékről STZ-indukált kezeletlen diabéteszes (DD) és inzulin-kezelt diabéteszes (IDD) állatból származó duodenum myentericus ganglionjáról. Piros kör: 18 nm-es aranyszemcse. Lépték: 500 nm.



11. ábra: TLR4 aranyszemcsék denzitása a myentericus ganglionokban kontroll (K), diabéteszes (D) és inzulin-kezelt diabéteszes (ID) állatok különböző bélszakaszaiban. Az adatokat átlag±SEM formában ábrázoltam. **p<0,01, ****p<0,0001 (kontrollhoz viszonyítva); ^{oo}p<0,01, ^{ooo}p<0,001 (D és ID között).

V. Összefoglalás

Korábban kutatócsoportunk bizonyította, hogy a bélcsatorna különböző szakaszaiban lévő myentericus nitrerg neuronok a diabétesz során eltérő mértékben sérültek, ugyanis a diabéteszes patkányok esetén mind az összneuronszám, mind a nitrerg neuronok száma szignifikánsan csökkent a jejunum, ileum és colon bélszakaszokban egyaránt (Izbéki és mtsai., 2008; Bagyánszki és Bódi, 2012; Bódi és mtsai., 2012). Ezzel szemben a duodenumban csak a nitrerg neuronok száma mutatott csökkenést, az összneuronszám nem változott. Továbbá azt is megfigyelték, hogy az inzulinkezelés hatása is bélszakasz-specifikus volt, ugyanis a jejunum és duodenum bélszakaszokban az inzulinkezelés nem akadályozta meg a nitrerg neuronok számának a csökkenését, azonban az ileumban és a colonban hatásosnak bizonyult.

A myentericus nitrerg neuronok régió-specifikus változásán túl a különböző bélszakaszok mikrobiális közösségében is hasonló változást lehetett megfigyelni. Ezek közül kiemelkedő a diabéteszes állatok ileumában megjelenő nagy mennyiségű *Klebsiella* nemzetségbe tartozó fajok, amely arra utalhat, hogy ezek a baktériumok az 1-es típusú diabétesz biomarkereként szolgálhatnak. A TLR4 az immunrendszer olyan mintázat felismerő receptora, amely a Gram-negatív baktériumok felszínén található lipopoliszacharidokat ismeri fel. Mivel a *Klebsiella* is Gram-negatív baktérium, ezért jelen kutatásunkban a TLR4 expresszió változását vizsgáltuk az egészséges, STZ-indukált kezeletlen diabéteszes és inzulin-kezelt diabéteszes patkányok duodenum, ileum és colon bélszakaszaiban.

Eredményeink alapján megfigyelhető, hogy a TLR4 aranyszemcsék a myentericus plexus neuropil régióiban és a neuronok perikarionjaiban is megtalálhatók, viszont jóval nagyobb mennyiségben fordultak elő a sejttestekben. Egészséges állatokban a TLR4-et jelölő aranyszemcsék aránya a bélcsatorna tengelye mentén disztális irányba haladva nőtt: legmagasabb a colonban volt, míg a vékonybél vizsgált szakaszaiban egymással közel azonos értéket mutatott. Ez a megfigyelés megegyezik Barajon és munkatársai által végzett kutatással, ahol szintén azt találták, hogy a bélcsatorna disztális részén intenzívebb a TLR4 festődése, mint a proximális vékonybélben (Barajon és mtsai., 2009).

Korábbi tanulmányokban leírták, hogy az T1DM gyulladásos állapot, és ez részben a TLR szignáltranszdukciós utakon keresztül jöhet létre. Több kutatás is arra jutott, hogy a TLR4 hozzájárul a gyulladásos állapot kialakulásához. A TLR4 gén kiütésével sikeresen csökkent a gyulladásos citokinek és kemokinek termelése, amely

által csökkent a gyulladás mértéke (Devaraj és mtsai., 2011). Ugyanebben a tanulmányban azt figyelték meg, hogy a STZ-indukált diabéteszes állatokban, ahol nem ütötték ki a gént, a TLR4 szintje jelentősen megemelkedett. Kimutatták, hogy az T1DM betegekből izolált monocitákon megemelkedett a TLR2 és TLR4 expressziója, valamint a downstream szignalizációban részt vevő fehérjék esetében is növekedést figyeltek meg (Devaraj és mtsai., 2008). Nem csak a receptorok emelkedett expresszióját figyelték meg, hanem a receptorok ligandjait vizsgálva is arra a következtetésre jutottak, hogy hiperglikémiás állapotban megnő ezeknek a molekuláknak a denzitása is. A ligandok expressziójának növekedése pedig kapcsolatban áll a receptorok számának növekedésével (Devaraj és mtsai., 2009). Azt látjuk, hogy azokban a kutatásokban, amelyeket inzulinnal kezelt betegekből származó makrofágokon és monocitákon végezték, kivétel nélkül emelkedett a TLR4 szintje hiperglikémia hatására.

Kísérletünk során megfigyeltük, hogy az entericus TLR4 expresszióra mind a hiperglikémiának, mind az inzulinkezelésnek bélszakasz-specifikus hatása volt. Krónikus hiperglikémia hatására a duodenumban megnőtt, míg a colonban csökkent a TLR4-et jelölő aranyszemcsék denzitása, azonban ezt az azonnal alkalmazott inzulinkezelés mindkét bélszakaszban kivédte. Mindkét változás összefüggésbe hozható a mukóza-asszociált mikrobióta összetétel változásával. A duodenumban STZ-indukálta kezeletlen diabéteszes patkányoknál megjelentek a *Tenericutes* törzshöz tartozó *Mycoplasma* nemzetség tagjai, amelyek Gram-negatív baktériumok. Az inzulin azonban nagy részben eliminálta ezeket a fajokat, inzulin-kezelt állatok duodenumában már csak 1%-ban volt jelen a *Mycoplasma*. Ezzel korrelál az az eredmény, hogy a diabéteszes állatok esetében növekedett TLR4 expressziót figyeltünk meg, míg inzulin hatására ez az érték kontroll szinten maradt. A *Mycosplasma* megjelenésével egyidejűleg a Gram-pozitív *Clostridium* fajok visszaszorultak (Wirth és mtsai., 2021).

A diabéteszes colonban megfigyelték, hogy a *Proteobacterium* törzsbe tartozó fajok előfordulása közel harmadára csökkent a kontroll mintákhoz képest. Inzulinkezelés hatására pedig ezeknek a Gram-negatív fajoknak az aránya ismét a kontroll szinthez hasonló volt. A TLR4 denzitása a colonban is jól követi ezen törzs változását: a kezeletlen diabéteszes állatoknál csökkent, míg inzulinkezelés hatására a kontroll értékhez hasonló szinten maradt.

Korábban a diabéteszes állatok ileumának béltartalmában nagyarányú *Klebsiella* inváziót figyeltünk meg (Wirth és mtsai., 2014), azonban a mukóza-asszociált mikrobiom vizsgálata során a *Klebsiella* nemzetséget már nem tudtuk kimutatni (Wirth és mtsai.,

2021), s a TLR4 expressziójában sem figyeltünk meg jelentős változást az ileum myentericus ganglionjaiban. Azonban mindenképp fontosnak tartjuk, hogy tovább vizsgáljuk a bélfal többi rétegében is a TLR4 kifejeződését, ezeket a vizsgálatainkat már el is kezdtük. Mindenesetre az inzulinkezelés hatására az ileumban megfigyelt közel másfélszeres TLR4 növekedés a gyulladásos folyamatok fokozódására utalhat.

Eredményeink alapján megállapítható, hogy a TLR4 expressziója bélszakasz-függő változást mutat mind diabétesz, mind inzulinkezelés hatására. S ennek hátterében a bél mikrobióta összetétele, s annak nagyfokú átrendeződése kritikus szerepet tölthet be. Ezek a regionális változások pedig hozzájárulnak a régió-specifikus diabéteszes myentericus neuropátia kialakulásához. Kutatásunk folytatásaként a közeljövőben a TLR4 downstream szignalizációjában megjelenő egyéb molekulák (NF-kB, IL-1β, MyD88) expressziós változásait is tervezzük nyomon követni a bélcsatorna hossztengelye mentén.

VI. Irodalomjegyzék

Anderson K.V. (2000.) Toll signaling pathways in the innate immune response. *Current opinion in immunology,* 13-19.

American Diabetes Association (2012.) Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care,* 64-71.

Bagyánszki M. (2002.) A humán bélidegrendszer és szöveti környezetének embrionális fejlődése, Ph.D. értekezés. Szegedi Tudományegyetem TTIK, Biológia Doktori Iskola.

Bagyánszki M., Bódi N. (2012.) Diabetes-related alterations in the enteric nervous system and its microenvironment. *World of Journal Diabetes,* 80-93.

Barajon I., Serrao G., Arnaboldi F., Opizzi E., Ripamonti G., Balsari A., Rumio C. (2009.) Toll-like receptors 3, 4, and 7 are expressed in the enteric nervous system and dorsal root ganglia. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* , 1013-1023.

Barta B.P. (2018.) A myentericus neuronok és azok mikrokörnyezetének 1-es típusú diabétesszel összefüggő szövettani változásai streptozotocin-indukált diabéteszes patkányban. Szegedi Tudományegyetem, Bsc szakdolgozat.

Bódi N. (2011.) A myentericus plexust ellátó kapillárisok diabétesszel összefüggő strukturális molekuláris és funkcionális változásai streptozotocin-indukált diabéteszes patkányban. Szegedi Tudományegyetem, Ph.D. értekezés

Bódi N., Talapka P., Poles Z.M., Hermesz E., Jancsó Zs., Katarova Z., Izbéki F., Wittmann T., Fekete É., Bagyánszki M . (2012.) Gut region-specific diabetic damage to the capillary endothelium adjacent to the myenteric plexus. *Microcirculation,* 316-326.

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(9):2410.

Bult H., Boeckxstaens G.E., Pelckmans P.A., Jordaens F.H., Van Maercke Y.M., Herman A.G. (1990.) Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature,* 346-347.

Bush T.G. (2002.) Enteric glial cells. An upstream target for induction of necrotizing enterocolitis and Crohn's disease? *Bioessays*, 130-140.

Cellek S., Foxwell N.A., Moncada S. (2003.) Two phases of nitrergic neuropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes*, 2353-2362.

Cellek S. (2004.) Point of NO return for nitrergic nerves in diabetes: a new insight into diabetic complications. *Current pharmaceutical design*, 3683-3695.

Chandrasekharan B., Antiha M., Blatt R., Shahnavaz N., Kooby D., Staley C., Mwangi S., Jones D.P., Sitaraman S.V., Srinivasan S. (2011.) Colonic motor dysfunction in human diabetes is associated with enteric neuronal loss and increased oxidative stress. *Neurogastroenterology and Motility*, 131-138.

Dasu M. R., Devaraj S., Zhao L., Hwang D. H., Jialal I. (2008). High glucose induces toll-like receptor expression in human monocytes: mechanism of activation. *Diabetes,* 3090-3098.

Devaraj S., Glaser N., Griffen S., Wang-Polagruto J., Miguelino E., Jialal I. (2006.) Increased Monocytic Activity and Biomarkers of Inflammation in Patients With Type 1 Diabetes. *Diabetes,* 774-779.

Devaraj S., Dasu R. M., Rockwood J., Winter W., Griffen C. S., Jialal I. (2008.) Increased Toll-Like Receptor (TLR) 2 and TLR4 Expression in Monocytes from Patients with Type 1 Diabetes: Further Evidence of a Proinflammatory State. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism,* 578-583.

Devaraj S., Dasu R. M., Park H. S., Jialal I. (2009.) Increased levels of ligands of Toll-like receptors 2 and 4 in type 1 diabetes. *Diabetologia,* 1665-1668.

Devaraj S., Tobias P., Jialal I. (2011.) Knockout of toll-like receptor-4 attenuates the pro-inflammatory state of diabetes. *Cytokine*, 441-445.

Elsner M., Guldbakke B., Tiedge M., Munday R., Lenzen S. (2000.) Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. *Diabetologia,* 1528-1533.

Flajnik F. M. (2018.) A cold-blooded view of adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology,* 438-453.

Fonyó A. (2011.) *Az orvosi élettan tankönyve.* Medicina Könyvkiadó Zrt.

Fregonesi C.E., Miranda-Neto M.H., Molinari S.L., Zanoni J.N. (2001.) Quantitative study of the myenteric plexus of the stomach of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria,* 50-53.

Furlan M.M., Molinari S.L., de Miranda Neto M.H. (2002.) Morphoquantitative effects of acute diabetes on the myenteric neurons of the proximal colon of adult rats. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria,* 576-581.

Gabella G. (1972.) Fine structure of the myenteric plexus in the guinea-pig ileum. *Journal of Anatomy*, 69-97.

Gale E.A. (2002.) The Rise of Childhood Type 1 Diabetes in the 20th Century. *Diabetes,* 3353-3361.

Gershon M.D. (1999.) The Enteric Nervous System: A Second Brain. *Hospital practice*.

Goyal R.K., Hirano I. (1996.) The Enteric Nervous System. *New England Journal of Medicine,* 1106-15.

Harrington M.A., Hutson M.J., Southwell R.B. (2010.) Cholinergic neurotransmission and muscarinic receptors in the enteric nervous system. *Progress in hystochemistry and cytochemistry,* 173-202.

Izbéki F., Wittman T., Rosztóczy A., Linke N., Bódi N., Fekete É., Bagyánszki M. (2008.) Immediate insulin treatment prevents gut motility alterations and loss of nitrergic neurons in the ileum and colon of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice,* 192-198.

Janeway C.A. Jr., Medzhitov R.. (2002.) Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology,* 197-216.

Katsarou A., Gudbjörnsdottir S., Rawshani A., Dabelea D., Bonifacio E., Anderson B. J., Jacobsen L.M., Schatz D.A., Lernmark A. (2017.) Type 1 diabetes mellitus. *Nature reviews Disease primers,* 1-17.

Lenzen S. (2008.) The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia,* 216-226.

Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Janeway Jr C.A. (1997.) A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 394-397.

Mezei D. (2017.) Gyulladásos citokinek expressziójának bélszakasz-függő változásai streptozotocin-indukált diabéteszes patkányok myentericus ganglionjaiban és azok mikrokörnyezetében. Szegedi Tudományegyetem, MSc diplomamunka.

Mohammad M.K., Morran M., Slotterbeck B., Leaman D.W., Sun Y., Hermann von Grafenstein, Soon-Cheol Hong, McInerney M.F. (2006.) Dysregulated Toll-like receptor expression and signaling in bone marrow-derived macrophages at the onset of diabetes in the non-obese diabetic mouse. *International Immunology*, 1101-1113.

Moresco E.M.Y., LaVine, D., Beutler B. (2011.) Toll-like receptors. *Current Biology*, 488-493.

Newgreen D., Young H.M. (2002.) Enteric Nervous System: Development and Developmental Disturbances - Part 1. *Pediatric and Developmental Pathology*, 224-247.

Palsson-McDermott M.E., O'Neill L. (2004.) Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology*, 153-162.

Rakoff-Nahoum S., Paglino J., Eslami-Varzaneh F., Edberg S., Medzhitov R. (2004.) Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*, 229-241.

Rumio C., Besusso D., Arnaboldi F., Palazzo M., Selleri S., Gariboldi S., Akira S., Uematsu S., Bignami P., Ceriani V., Ménard S., Balsari A. (2006.) Activation of smooth muscle and myenteric plexus cells of jejunum via Toll-like receptor 4. *Journal of Cellular Physiology*, 47-54.

Takeda K., Kaisho T., Akira S. (2003.) Toll-like receptors. *Annual Review of Immunology*, 335-376.

Vives-Pi M., Somoza N. Fernández-Alvarez J., Vargas F., Caro P., Alba A., Gomis R., Labeta M.O., Pujol-Borrell R. (2003.) Evidence of expression of endotoxin receptors CD14, toll-like receptors TLR4 and TLR2 and associated molecule MD-2 and of sensitivity to endotoxin (LPS) in islet beta cells. *Clinical and Experimental Immunology*, 208-218.

Zanoni J.N., de Miranda Neto M.H., Bazotte R.B., de Souza R.R. (1997.) Morphological and quantitative analysis of the neurons of the myenteric plexus of the cecum of streptozotocin-induced diabetic rats. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria* 696-702.

Von Mering J., Minkowski O. (1889). Diabetes mellitus after pancreas extirpation. *Arch Exp Pathol Pharmakol* 26, 111.

Wirth R., Bódi N., Maróti G., Bagyánszki M., Talapka P., Fekete É., Bagi Z., Kovács L. K. (2014.) Regionally Distinct Alterations in the Composition of the Gut Microbiota in Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes. *PLOS one* 9(12), e110440

Wirth R., Bódi N., Szalai Z., Chandrakumar L., Maróti G., Kovács L. K., Bagi Z., Mezei D., Balázs J., Bagyánszki M. (2021.) Perturbation of the mucosa-associated anaerobic gut micro-biota in streptozotocin-induced diabetic rats. *Acta Biologica Szegediensis,* 75-84.

VII. Köszönetnyilvánítás

Nagyon sok embernek tartozom köszönettel azért, hogy ez a dolgozat és az ehhez vezető út létrejöhetett. Elsőként szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Bódi Nikolett habilitált egyetemi adjunktusnak, hogy bevezetett ennek a munkának a rejtelmeibe és útmutatásaival folyamatosan segített, támogatott. A rengeteg szakmai segítség mellett köszönöm, hogy emberileg is sokat tanulhattam tőle.

Köszönöm Sótiné Dr. Bagyánszki Mária habilitált egyetemi docensnek, hogy kurzusaival felkeltette az érdeklődésemet a bélidegrendszer iránt, hogy segített beilleszkedni és elindítani a laboratóriumi munkáimat, és mindig a segítségemre volt.

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

Hálával tartozom továbbá a kutatócsoportunk tagjainak: Bartuczné Dr. Szalai Zitának, Dr. Balázs Jánosnak, Arany Katalinnak, Afnan Al Doghmi-nak és Kiss Szilviának. Köszönöm Mezei Diánának, hogy megtanította nekem, hogyan kell bánni az állatokkal és köszönöm Barta Bence Pálnak a rengeteg segítséget az egész kutatás alatt, és hogy mindig végtelen türelemmel volt felém.

Köszönöm a szüleimnek és testvéremnek, hogy mindvégig támogattak az egyetemi éveim alatt, és bíztatnak és mellettem állnak, bármibe is kezdek bele.

Végül, de nem utolsó sorban pedig hálával tartozom a páromnak, hogy folyamatosan motivál, és túllendít a nehézségeken.