

***Inzulin-immunreaktív myentericus neuronok és
glükagonszerű peptid-1-immunreaktív enteroendokrin sejtek
vizsgálata 1-es típusú diabéteszes patkánymodellben***

Doktori értekezés

Egyed-Kolumbán Abigél

Témavezető:

Sótiné Dr. Bagyánszki Mária

habilitált egyetemi docens

Biológia Doktori Iskola

Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék

Természettudományi és Informatikai Kar

Szegedi Tudományegyetem



2025

Szeged

Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK.....	3
I. Bevezetés	5
I.1. Az enterális idegrendszer felépítése	5
I.2. A diabétesz fő típusai és jellemzői	8
I.3. Neuropátia az enterális idegrendszerben.....	9
I.4. Az inzulin szerepe és jelátviteli útvonala	11
I.5. Inkretinek jelentősége a bélrendszerben	14
I.6. Az enterális neuronok és az enteroendokrin sejtek közötti kapcsolatok	17
II.Célkitűzések	19
II.1. Inzulin-immunreaktivitás vizsgálata.....	19
II.2. Glükagonyszerű peptid 1 és receptorának vizsgálata	19
III.Anyagok és vizsgálati módszerek.....	20
III. 1. Diabéteszes állatmodellek előállítása	20
III. 2. Minták előkészítése mikroszkópos és molekuláris vizsgálatokhoz.....	20
III. 3. Fluoreszcens immunhisztokémiai vizsgálatok	21
III.3.1 Fluoreszcens immunhisztokémia whole-mount preparátumokon	21
III.3. 2. Fluoreszcens immunhisztokémiai vizsgálatok paraffinos metszeteken	23
III.4. Posztembedding elektronmikroszkópos immunhisztokémiai vizsgálatok	24
III.5. Az inzulin szöveti koncentrációjának meghatározása	26
III.6. mRNS preparálás, reverz transzkripció és polimeráz láncreakció	26
III.7. Statisztikai analízis	27
IV.Eredmények.....	28
IV.1. Akut és krónikus hiperglikémiás állatok jellemzése	28
IV.2. Inzulin-immunreaktív myentericus neuronok.....	30
IV.2.1.Az inzulin-immunreaktív myentericus neuronok fluoreszcens vizsgálata akut hiperglikémiás patkányokban.....	30
IV.2.2. Az inzulin-immunreaktív myentericus neuronok fluoreszcens vizsgálata krónikus diabéteszes patkánymodellben	32
IV.2.3. Az inzulin-immunreaktív nitrerg myentericus neuronok fluoreszcens vizsgálata akut és krónikus diabéteszes patkánymodellben	34
IV.2.4. Az inzulint jelölő arany szemcsék denzitása és szubcelluláris lokalizációja krónikus diabéteszes patkányokban	37
IV.2.5. Az inzulin fehérje koncentrációja krónikus diabéteszes patkányok különböző bélszakaszaiban	40

IV.2.6. Az inzulin mRNS expressziójának vizsgálata a bélszöveti és hasnyálmirigy homogenizátumokban krónikus diabéteszes állatmodellben	42
IV.3. A glukagonszerű peptid-1 és a glukagonszerű peptid-1 receptor vizsgálata.	43
IV.3.1. A glukagonszerű peptid-1-immunreaktív enteroendokrin sejtek vizsgálata akut és krónikus hiperglikémiás patkánymodellben	43
IV.3.2. A glukagonszerű peptid-1 receptor szubcelluláris lokalizációjának és eloszlásának vizsgálata krónikus diabéteszes patkányok különböző bélszakaszaiban	46
IV.3.3. A glukagonszerű peptid-1 és a glukagonszerű peptid-1 receptor eloszlásának vizsgálata a pancreasban fluoreszcens immunhisztokémiával	49
V. Eredmények megbeszélése.....	51
VI. Összefoglalók	57
VII.1. Magyar nyelvű összefoglaló	57
VII.2. Summary.....	60
VII. Doktori értekezés tézisei.....	63
VII. Irodalomjegyzék	64
IX. Köszönetnyilvánítás	76
X. Közlemények listája.....	77

RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

BSA	borjú szérum albumin (bovine serum albumin)
DPP-IV	dipeptidil-peptidáz-4 (dipeptidyl peptidase-4)
ELISA	enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálat (enzyme-linked immunosorbent assay)
ENS	enterális idegrendszer (enteric nervous system)
GABAerg	gamma-amino vajsav neurotranszmittert használó sejtek
GAPDH	glicerinaldehyd-3-foszfát dehidrogenáz (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)
GIP	glükózdependens inzulinotróp polipeptid (glucose-dependent insulinotropic polypeptide)
GIPR	glükózdependens inzulinotróp polipeptid receptor (glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor)
GLP1	glükagonszerű peptid 1 (glucagon-like peptide 1)
GLP1R	glükagonszerű peptid 1 receptor (glucagon-like peptide 1 receptor)
Glut	glükóz transzporter protein
HO	hemoxigenáz
IDF	Nemzetközi Diabétesz Szövetség (International Diabetes Federation)
IL1 β	interleukin 1 béta (interleukin 1 beta)
IR	immunreaktív (immunoreactive)
mRNS	hírvivő ribonukleinsav (messenger ribonucleic acid)
mTOR	emlős rapamicin (mammalian/mechanistic target of rapamycin)
NADPH-d	nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát-diaforáz (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase)
NF κ B	nukleáris faktor kappa B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B)
nNOS	neuronális nitrogén-monoxid szintáz (neuronal nitric oxide synthase)
NO	nitrogén-monoxid (nitric oxide)
OsO ₄	ozmium-tetroxid
PB	foszfát-puffer (phosphate-buffer)
PCR	polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)
PI3K	foszfoinozitol-3-kináz (phosphoinositide 3-kinase)

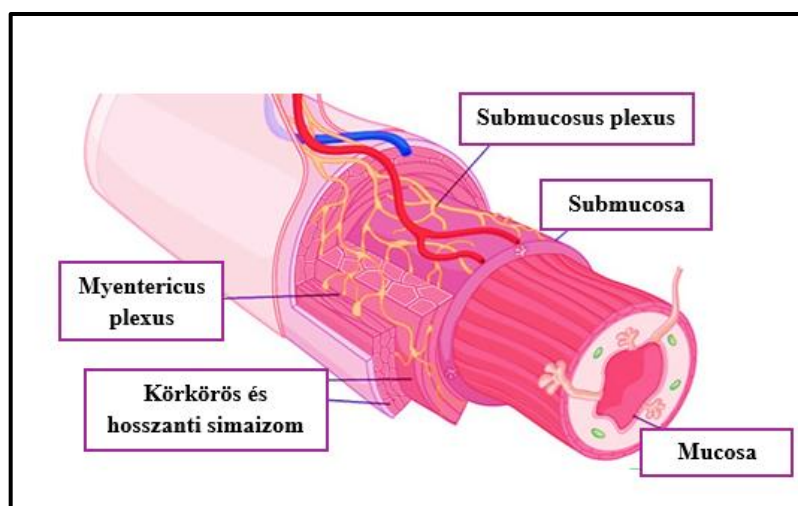
RT-PCR	reverz transzkripció polimeráz láncreakció (reverse transcription polymerase chain reaction)
SEM	standard hibaérték (standard error of mean)
STZ	streptozotocin
TBS	TRIS-pufferes sóoldat (TRIS-buffered saline)
TLR4	Toll-like receptor 4
TRIS	2-amino-2-(hidroximetil)-propán-1,3-diol
WHO	Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization)

I. Bevezetés

I.1. Az enterális idegrendszer felépítése

A gasztrointesztinális rendszer sokrétű feladatainak összehangolásáért, mint az abszorpció, a szekréció és a motilitás szabályozása, az enterális idegrendszer (ENS; enteric nervous system) vagy más néven bélidegrendszer felel. A bélidegrendszert a 20. század elején John N. Langley a szimpatikus és paraszimpatikus idegrendszertől különválasztotta és az autonóm idegrendszer harmadik részeként írta le (Furness, 2012).

Az ENS-t alkotó neuronok és gliasejtek hálózata a bélcsatorna teljes hosszában, a nyelőcsőtől a belső anális záróizomig húzódik a bélfalban, de az epehólyag falában és a hasnyálmirigyben is megtalálható (Furness, 2006; Di Nardo és mtsai., 2008). A humán ENS kb. 200-600 millió neuronból áll, melyek két fő idegi plexusban helyezkednek el: a nagyobb ganglionokat tartalmazó myentericus (Auerbach plexus) és a kisebb ganglionokkal rendelkező submucosus (Meissner plexus) plexusban. A myentericus plexus a bélfal hosszanti és körkörös simaizomrétege között található és fő feladata a bél motilitásának szabályozása, míg a submucosus plexus a submucosa rétegben található és a szekretomotoros működések szabályozásában játszik fontos szerepet (1. ábra). A ganglionok közötti kapcsolatot az internodális szegmensek biztosítják, így kialakítva a neuronhálózatokat a bélfal különböző szöveti rétegeiben. Emlősök esetében a myentericus plexus a gasztrointesztinális rendszer teljes hosszában megtalálható, viszont a submucosus plexus a nyelőcsőben hiányzik (Timmermans és mtsai., 2001).

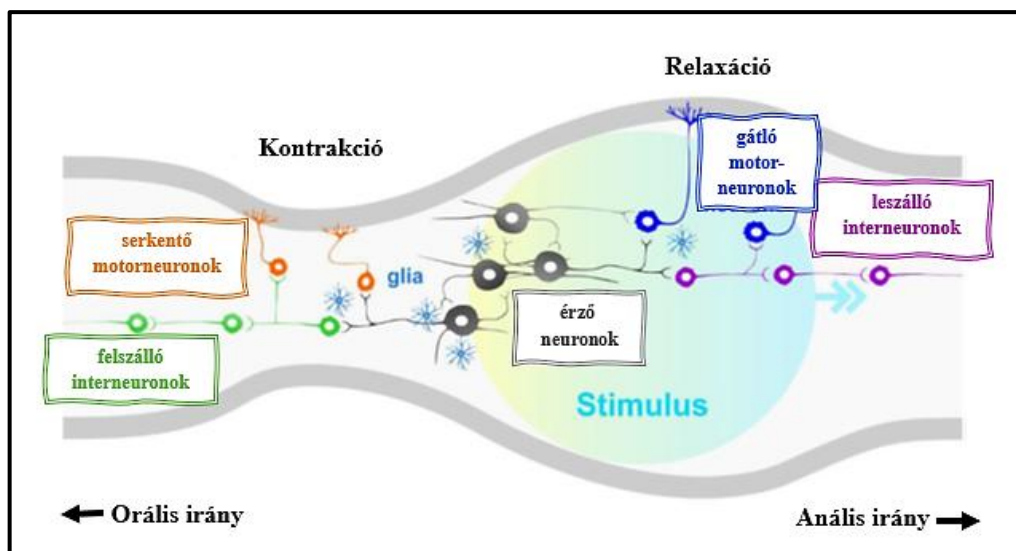


1. ábra: A myentericus és a submucosus plexus elhelyezkedése a bélfalban (Shahrestani és Das, 2023 nyomán).

Az enterális neuronokat morfológiailag először Alexander Dogiel (1896) csoportosította dendritjeik alakja és hossza alapján. Eredetileg három idegsejttípust különített el. A Dogiel I-es típusú neuronok általánosságban kis méretűek, uniaxonálisak és sok rövid nyúlvánnyal rendelkeznek. Ezek a neuronok funkciójukat tekintve a motorneuronokhoz tartoznak. A Dogiel II-es típusba tartozó idegsejtek nagyobbak, több hosszú nyúlvánnyal rendelkeznek és általában itt rövid nyúlványok nem találhatók. Ezek funkcionálisan a szenzoros és szekretomotoros idegsejtekhez sorolhatók. A Dogiel III-as típusú neuronok hasonlítanak az I-es típusú neuronokra, de számottevően kevesebb dendritjük van és hosszú az axonjuk. Ezeknek az idegsejteknek a funkcióját ekkor még nem sikerült egyértelműen azonosítani.

A fejlődő immunhisztokémiai és elektrofiziológiai módszerek lehetővé tették további neurontípusok azonosítását is (Brehmer és mtsai., 1999; Clerc és mtsai., 1998). A plexusokban elhelyezkedő neuronokat ma már több mint 20 funkcionális csoportba sorolhatjuk, ezek között vannak intrinsic primer afferens érző neuronok, interneuronok és különböző motorneuronok (serkentő, gátló, szekretomotoros, vazomotoros) is (Furness, 2006).

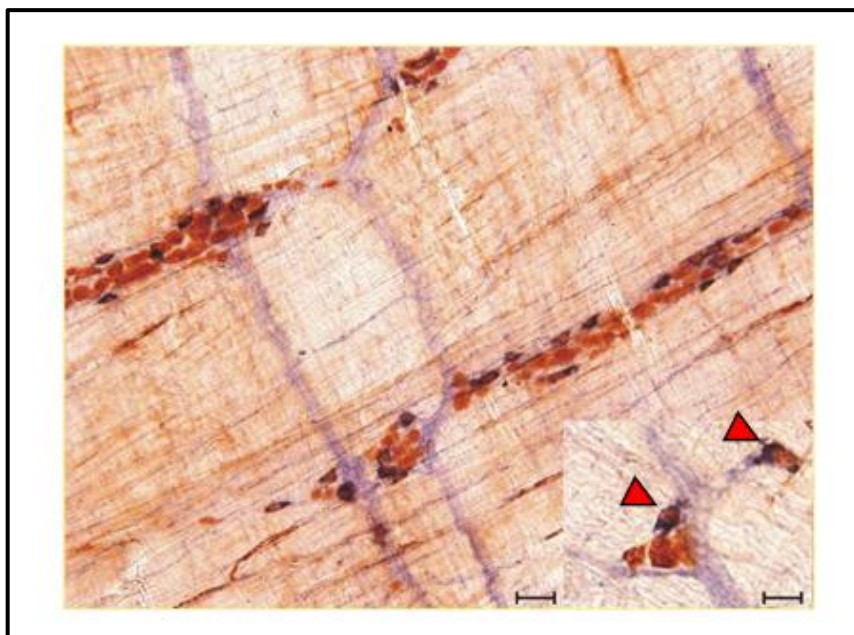
Az enterális reflexívek szabályozzák a motilitást, a mirigyszekréciót és a bélfal véráramlását is. A bélperisztaltika a bélfal izomzatának periódikus kontrahálásával, majd relaxálásával valósul meg. A perisztaltikus mozgás első leírói Bayliss és mtsai. (1899), akik kutya vékonybelében végeztek kísérleteket, majd Trendelenburg (1917) *in vitro* tengerimalac vékonybélben folyadékinfundálással idézett elő perisztaltikus mozgást. A perisztaltika a béltartalmat mozgatja előre, aztán a szegmentáció teszi lehetővé ennek keveredését. A perisztaltikus reflexben részt vesznek a felszálló serkentő-, leszálló gátló- és leszálló serkentő idegsejtek. A luminális inger észlelésekor a felszálló interneuronok a serkentő motoros neuronokkal szinaptizálnak és az ingerület helyén közvetlenül orális irányú kontrakciót idéznek elő, míg a leszálló interneuronok a gátló motorneuronokkal kapcsolódva anális relaxációt váltanak ki, annak érdekében, hogy a béltartalmat továbbítsák (Fung és Berghe, 2020; 2. ábra). Az enterális gliasejtek szintén az intesztinális motilitás aktív résztvevői, amelyek a ritmikus kontrakciós hullámokért felelnek a vastagbélben (Spencer és mtsai., 2020).



2. ábra: A perisztaltikus reflex sematikus ábrája. A felfutó interneuronok a serkentő motorneuronokkal kapcsolódva kontrakciót, míg a leszálló interneuronok a gátló motorneuronokkal relaxációt váltanak ki (Fung és Berghe nyomán, 2020).

A bélidegrendszer neuronjaira jellemző, hogy több neurotranszmittet is tartalmaznak, ezek adják az enterális neuronok neurokémiai kódját. A neurokémiai kód megismerése lehetővé teszi a neuronok projekcióinak és funkcióinak pontos meghatározását (Furness és mtsai., 1995). Számos neurotranszmitter jelenlétét bizonyították az ENS-ben, többek között az acetil-kolin, noradrenalin, a nitrogén-monoxid (NO), vazoaktív intestinális polipeptid, szerotonin és a glutamát jelenlétét (Kirchgessner és mtsai., 2001).

Az enterális neuronokból származó NO-nak kiemelt szerepe van a perisztaltikus reflex és a záróizom működésének szabályozásában. Génkiütéses kísérletekkel bizonyították a neuronális nitrogén-monoxid szintáz (nNOS) által termelt NO szerepét a bélcsatorna simaizmának nem-adrenerg nem-kolinerg relaxációjában (Mashimo és mtsai., 1996). A neurotranszmitterek általában vezikulákban tárolódnak, kivételt képeznek a kisebb, gáz típusú neurotranszmitterek, mint például az enterális neuronokból felszabaduló NO, amely csak akkor termelődik, amikor szükséges. A simaizomsejtek membránján nincs receptora sem, hanem a citoplazmában található guanilát-cikláz a célfehérjeje. Az emlős sejtekben 3 NOS izoforma is előfordulhat, az endotheliális NOS, nNOS és az indukálható NOS. A nitrerg neuronoknak magas a redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát-diaforáz (NADPH-d) aktivitása (Nogueira-Campos és mtsai., 2012) és mennyisége összefügg a nNOS mennyiségével, ezért gyakran NADPH-d enzimhisztokémiát használnak a nitrerg neuronok jelölésére (3. ábra).



3. ábra: Myentericus neuronok NADPH-d enzimhisztokémiai (lila) és HuC/HuD immunhisztokémiai (barna) festés után. A nyílhegyek a nitrerg myentericus neuronokat jelölik. Lépték: 50 μ m, inzert: 30 μ m (Izbéki és mtsai., 2008).

I.2. A diabétesz fő típusai és jellemzői

A diabetes mellitus korunk egyik leggyakoribb anyagcsere-betegsége, amelynek fő oka a szénhidrát anyagcsere felborulása, aminek következményeként a zsír- és a fehérje anyagcsere is érintett lesz. A betegséget az inzulin relatív vagy abszolút hiánya jellemzi. A Nemzetközi Diabétesz Szövetség (IDF; International Diabetes Federation) 2024-es adatai szerint megközelítőleg 589 millió embert érint diabéteszes megbetegedés, ami világviszonylatban a népesség 12%-át jelenti és 2030-ra ez a szám elérheti a 643 millió betegséggel élő személyt is (Hossain és mtsai., 2024). A betegségben elhunyt betegek száma is növekvő tendenciát mutat, 2024-ben körülbelül 3,4 millió felnőtt vesztette életét a cukorbetegség során kialakuló szövődmények következményeként, ez az összes haláleset 9,3%-át jelenti. A diabéteszes halálesetek 40%-a a legaktívabb gazdasági csoportban (20-59 év) történt (IDF, link 1, 2025).

A diabetészesnek korábban három fő típusát különítették el, az 1-es típusú, a 2-es típusú és a gesztációs vagy terhességi cukorbetegséget. Az 1-es típusú cukorbetegség leggyakrabban gyermekkorban és korai felnőttkorban jelentkezik. Jellemző az 1-es típusú diabéteszes páciensekre az alacsony testsúly és hogy a β -sejtek 90-100%-os pusztulásából adódóan már a betegség kialakulásának kezdetekor inzulinkezelésre szorulnak. A 2-es típusú diabétesz általában idősebb korban alakul ki, jellemzője a testsúly gyarapodása és az inzulinrezisztencia. Kialakulásának csökkentéséhez jelentősen hozzájárul a rendszeres testmozgás, illetve a kiegyensúlyozott

táplálkozás. Azonban e két fő típus közötti különbségtétel nem egyértelmű, és egy személy esetében az 1-es és a 2-es típusú diabéteszes jellemzők egyaránt előfordulhatnak, egyre gyakoribb például a 2-es típusú diabétesz gyermekkorban. Az Egészségügyi Világszervezet (WHO; World Health Organization) 2019-ben új klasszifikációs rendszert tett közzé, amelyben az 1-es és 2-es típusnak nem altípusait különbözteti meg, hanem azok mellett új típusokat vezet be. Az egyik új típus az ún. hibrid diabétesz (1,5-es típusú diabétesz), amely lényegében a korábbi felnőttkori latens autoimmun diabétesz, illetve a ketózisra hajlamos 2-es típusú cukorbetegség (WHO, 2019). Az előbbieket mellett megjelennek a klasszifikációban a diabétesz egyéb specifikus formái (pl. genetikai rendellenességekhez társítható monogén diabétesz vagy az exokrin pancreasban bekövetkező rendellenességek során kialakuló diabétesz), ill. nem specifikus formái, továbbá a gesztációs diabétesz. A gesztációs diabétesz a cukorbetegség egy átmeneti formája, amelyet az inzulinrezisztencia és a hasnyálmirigy β -sejtjeinek várandósság alatti diszfunkciója idéz elő (Alejandro és mtsai., 2020). Napjainkban a terhesség során kialakuló diabétesz is egyre gyakoribb; a IDF adatai szerint öt várandós nőből legalább egyre jellemző a hiperglikémiás állapot (IDF, link 1, 2025). A betegség következménye lehet a koraszülés és a makroszómia (Antar és mtsai., 2023). A terhességi diabétesz kockázati tényezői az elhízás, az idősebb korban történő gyermekvállalás vagy a policisztás ovárium. A gesztációs diabétesz az esetek döntő többségében szülés után megszűnik.

A diabétesz egyik súlyos szövődménye a diabéteszes neuropátia, amely az egész szervezetet érintheti és jelentősen ronthatja az életminőséget. A diabéteszes neuropátia a perifériás idegrendszer különböző részeit érintheti. A perifériás neuropátia leggyakoribb tünete az alsó végtagokon jelentkező fájdalom, zsibbadás, paresztézia és bizonytalan járás. A szenzomotoros típusban szimmetrikus, kétoldali, disztális panaszok jellemzőek. Ez a forma inkább a hosszabb ideje fennálló cukorbetegségnél fordul elő és összefügg a metabolikus állapottal, illetve együtt jár a perifériás erek autonóm beidegzésének zavarával is (Zhifang és mtsai., 2020).

I.3. Neuropátia az enterális idegrendszerben

Számos humán vizsgálat és állatkísérlet bizonyítja, hogy a diabétesz során az ENS-ben neuropátia figyelhető meg (Bagyánszki és Bódi, 2012; Marathe és mtsai., 2020; Mohamed, 2024). A neuropátia kialakulása nagy mértékben a nitrerg neuronokat érinti és a betegek életminőségét jelentősen befolyásoló gasztrointesztinális szövődmények kialakulását eredményezi. A diabéteszes neuropátiához társuló gyomor-bélrendszeri tünetek közé sorolható a gasztroparézis, a hasmenés, a székrekedés és a nem alkoholos zsírmáj. A gasztroparézis a gyomor késleltetett

ürülése, étkezés utáni teltségérzetet, hányást és gyomortáji fájdalmakat vált ki (Yarandi és Srinivasan, 2014). A diabéteszhez társuló enterális neuropátiát nehéz a klinikumban kimutatni, és csak nemrégiben merült fel a nyálkahártya-biopsziákban az idegrostok sűrűségének értékelésére vonatkozó lehetőség (Uranga-Ocio és mtsai., 2015).

Kutatócsoportunk már régóta vizsgálja az 1-es típusú diabétesz és az entericus neuropátia összefüggéseit állatmodellekben. A nitrerg enterális neuronok a bélperisztaltika leszálló gátló ágának kulcsszereplői, ezért ezen neuronok elvesztése vagy károsodása hozzájárulhat a gasztrointesztinális motilitási zavarok kialakulásához. Egyre több bizonyíték utal arra, hogy az enterális neuronok neuropátia során bekövetkező sérülékenysége szigorúan régió-specifikus, illetve, hogy a két fő enterális plexus és a különböző enterális neuroncsoportok eltérő károsodást mutatnak, ezért munkacsoportunk tanulmányozta a nitrerg enterális neuronok bélszakasz-specifikus változásait streptozotocin (STZ)-indukált diabéteszes patkánymodellben. Eredményeik szerint a nitrerg szubpopuláció arányában, és az enterális neuronok teljes számában bekövetkező változások arra utalnak, hogy a vizsgált bélszakaszokban neurokémiai változások és a neuronok pusztulása is bekövetkezett (Bódi és mtsai., 2019). Ugyanakkor diabétesz során funkcionális elváltozásokat is kimutattak (Izbéki és mtsai., 2008). A hiperglikémia hatására a lecsökkent összneuronszámnak köszönhetően, a vékony- és a vastagbélben is gyorsabb tranzitidő volt jellemző. Az azonnali inzulinkezelés helyreállította a béltranzitot az egészséges állatokéval megegyező gyorsaságúra, tehát az inzulinkezelés hatásos a bélmotilitás szempontjából is.

Cellek és mtsai. (2003) STZ-indukált diabéteszes patkánymodellben tanulmányozták a nitrerg neuronok degeneratív folyamatait. Két fázisra osztották a nitrerg neuropátia kialakulását. Míg első fázisban a nitrerg idegrostok elveszítik a NO-tartalmukat és ezzel funkciójuk egy részét is, addig a második fázisban a nitrerg degeneráció a ganglionokban található neuronok sejtestjeiben megy végbe, ami a nitrerg neuronok pusztulását jelenti. Az első fázisban bekövetkező változások inzulinpótlással visszafordíthatók, míg a második fázisban ezek a folyamatok már visszafordíthatatlanok. A neurodegeneráció a ganglionok apoptotikus pusztulásának köszönhető, amely a nitrerg neuronokat szelektíven érinti.

Kutatócsoportunk a nitrerg neuronok mellett a hemoxigenáz-immunreaktív (HO-IR) neuronok bélszakasz-specifikus változásait is vizsgálta diabéteszes patkánymodellben. Azt találták, hogy diabétesz hatására a nNOS-HO-IR neuronok aránya az ileum és colon bélszakaszokban megemelkedett, vagyis diabétesz hatására ezen neurontípusok nem sérültek és túléltek. Következésképpen a HO-rendszer regionális indukciója meghatározó szerepet játszhat a régió-specifikus nitrerg neuropátia kivédésében (Chandrakumar és mtsai., 2017).

A bélszakasz-specifikus enterális neuropátia kialakulásához nagyban hozzájárulhat a neuronok bélszakaszonként eltérő környezete, mint pl. az enterális gliasejtek, a ganglionok közelében elhelyezkedő kapillárisok vagy akár a lumen mikrobiótája. Kutatócsoportunk megfigyelte a nyálkahártyához kötődő, ill. a lumenális mikrobiom összetételének megváltozását is 1-es típusú diabéteszes patkányokban (Wirth és mtsai., 2014 és 2021). Korábban a bakteriális mintázatfelismerő Toll-like receptor 4 (TLR4) expresszióját is vizsgáltuk diabéteszes patkányok myentericus neuronjaiban, ahol a TLR4 szöveti koncentrációja diabétesz hatására csak a duodenum bélszakaszban nőtt meg, vagyis a bélszakaszok mikrokörnyezete meghatározó lehet hiperglikémiás állapotokban (Bódi és mtsai., 2023).

Az emésztőrendszer működésének elengedhetetlen feltétele a megfelelő oxidatív közeg fenntartása. A diabéteszre jellemző hiperglikémiás állapot növeli az oxidatív stresszt. A tartósan fennálló magas vércukorszint hatására a szérum oxidatív stressz markerei, az előrehaladott glikációs végtermékek is kimutathatók (Koska és mtsai., 2018). Az oxidatív stressz hatására a gyulladást serkentő citokinek szintje is megnő, ami a bélrendszerben gyulladásos folyamatokat indíthat el (Bhol és mtsai., 2024).

Munkacsoportunk a gyulladásos folyamatok különböző markereit is vizsgálta 1-es típusú patkánymodellben. Az interleukin 1 béta (IL1 β) pro-inflammatórikus citokin expressziója diabétesz hatására megnőtt minden bélszakaszban (AL Doghmi és mtsai., 2023). A nukleáris faktor kappa B (NF κ B) p65-ös alegysége esetén csak az ileumban tapasztaltunk növekedést a diabéteszes csoportban (Barta és mtsai., 2024). Az azonnali inzulinkezelés protektívnek bizonyult mindkét marker vizsgálatkor, IL1 β estében minden bélszakaszban, a NF κ B-nél azonban csak az ileumban.

I.4. Az inzulin szerepe és jelátviteli útvonala

Az inzulinnak számos hatása van az egész szervezetre, főként a glükóz homeosztázisban és az energiatárolás szabályozásában vesz részt. Az inzulin a perifériás szövetekben a glükóz metabolizmusát segíti elő, valamint a glikolízisre és a glükoneogenezisre gyakorolt hatásain keresztül szabályozza a glükóz lebontását és szintézisét.

Az inzulin fő forrása a hasnyálmirigy β -szigetsejtei, azonban az inzulin expresszióját már más szövetekben is kimutatták, mint például a májban, a csontvelőben vagy a zsírszövetben (Kojima és mtsai., 2004; Chen és mtsai., 2010). A pancreas és a vizsgált szövetek közötti szöveti szintű hasonlóságot bizonyította, hogy más, pancreas által termelt hormonokat is képesek expresszálni, mint a glükagon vagy a szomatosztatin (Kojima és mtsai., 2004).

Sokáig teljesen figyelmen kívül hagyták az inzulin jelátviteli útvonalainak tanulmányozását az idegrendszerben, mert az izom- és a zsírszövettel ellentétben, a neuronok többsége nem inzulinfüggően veszi fel a glükózt (Patel és mtsai., 1994). Az inzulin képes átjutni a vér-agy gáton. A központi idegrendszer neuronjainak egy része expresszál inzulin receptort (Choeiri és mtsai., 2002).

Margolis és Altsuler (1967) mutattak ki először inzulin-immunreaktivitást kutyák cerebrospinális folyadékában. Ezen kívül Havrankova és mtsai. (1978) inzulinreceptorokat is találtak a patkányok központi idegrendszerében. Az inzulin a vér-agy gáton telíthető transzport mechanizmussal jut át. Az inzulin gén expresszióját és az inzulinszintézist is kimutatták éretlen és érett emlős neuronális sejtekben (Todd és mtsai., 1985), viszont gliasejtekben sem inzulin hírvivő ribonukleinsavat (mRNS; messenger ribonucleic acid), sem inzulin fehérjét nem találtak (Devaskar és mtsai., 1994). Sejtkultúrákban a nestin-pozitivitást vizsgálva, mely az éretlen neuronok és a reaktív gliasejtek markereként ismert, azt találták, hogy a sejtek 10%-os szérumban történő szubkultiválásakor az inzulin mRNS szinten expresszálódott. Ezeket a tényészeteket egy hónapra 1%-os szérumra helyezve, más pancreas hormonok (glükagon, szomatosztatin) is expresszálódtak az inzulin mellett, vagyis a gliasejtek médiuma meghatározhatja a sejtek sorsát (Maria-Engler és mtsai., 2004).

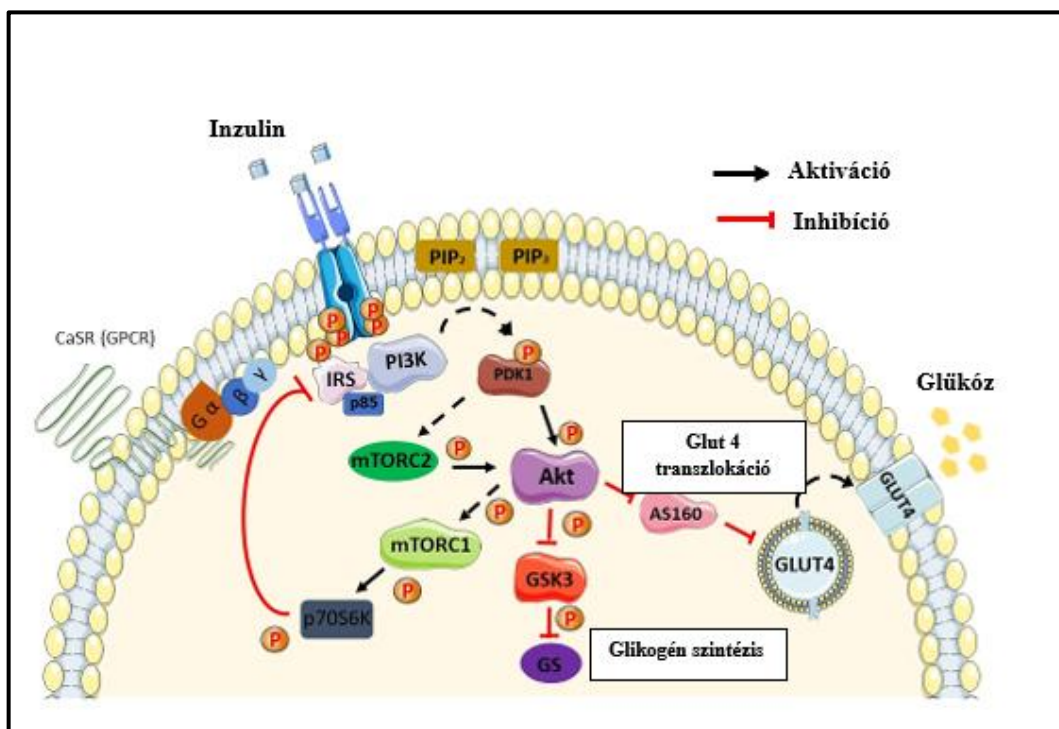
Az inzulin expresszióját patkányok agykérgében található gamma-amino vajsav neurotranszmittert használó (GABAerg) neurogliaform sejtekben is kimutatták. Azt is leírták, hogy a glükóz hozzáadása a neokortikális mintákhoz növelte az inzulinkoncentrációt, illetve a neurogliaform sejtekből történő inzulinszekréciót a dendritikus Ca^{2+} koncentráció határozza meg (Molnár és mtsai., 2014). A glükóz által indukált inzulinexpresszió a glükagonszerű peptid-1 receptor (GLP1R) aktivációján keresztül valósul meg, vagyis az inzulin2 mRNS és a GLP1R mRNS koexpresszálódik a GABAerg interneuronokban és mindkét gén expresszióját magas extracelluláris glükózkoncentráció szabályozza (Csajbók és mtsai., 2019).

Az inzulin expressziója és hatásmechanizmusai az idegrendszerben különösen fontosak a neuroplaszticitás, a memória, a tanulás és az energia-homeosztázis szempontjából. Az inzulin elősegíti az idegsejtek túlélését és a szinaptikus plaszticitást (Lee és mtsai., 2016). A glükóz a neuronok fő energiaforrása, viszont extrém éhezési körülmények között ketontesteket is felhasználhatnak (Kolb és mtsai., 2021).

Az inzulin jelátviteli folyamata főként inzulinreceptorokon keresztül valósul meg és számos jelátviteli útvonalat indít el a sejtben. Emlősökben két inzulinreceptor izoforma keletkezik: az A izoforma, amelyből a 11. exon hiányzik, és a teljes hosszúságú B izoforma. A két izoforma eltérő ligandkötési affinitást mutat, a B csak az inzulin specifikus receptorának tekinthető, míg az

A izoforma az inzulinszerű növekedési faktor II számára is nagy affinitású receptor. A sejtekben mindkét izoforma koexpresszáldhat, előfordulásukat fejlődési stádiumok és szövetspecifikus tényezők szabályozzák. Az inzulinreceptor A inkább magzati és rákos sejtekben fejeződik ki, míg a B izoforma inkább jól differenciált szövetekben. Felnőttkorban az inzulinreceptor A fokozott expressziója szerepet játszhat a rák progressziójában, így az emlő-, vastagbél-, tüdő-, petefészek- és pajzsmirigy daganatos elváltozásában is (Belfiore és mtsai., 2017).

Az inzulinreceptor tirozinkináz aktivitással rendelkezik, mely az inzulin kötődése után aktiválódik. Az inzulinreceptor tartalmaz egy extracelluláris domént, ahová az inzulin kötődik és egy intracelluláris domént, amely elindítja a jelátviteli útvonalat. Ez a jelátvitel három fontos útvonalat tartalmaz: a foszfoinozitol 3-kináz/Akt (PI3-K/Akt), mitogén aktivált protein kináz és az emlős rapamicin (mammalian/mechanistic target of rapamycin, mTOR) jelátviteli útvonalat. Ezek közül a PI3-kináz/Akt útvonal a legfontosabb inzulin által aktivált jelátvitel. Ennek során az inzulinreceptor aktiválja a PI3-kinázt, ami serkenti az Akt enzimet. Az Akt pedig a glükóz transzporterek (Glut 1, 3, 4) transzlokációját segíti elő az intracelluláris térből a sejtmembránba, így a glükóz bejuthat a célsejtbe (Zakaria és mtsai., 2021; 4. ábra).



4. ábra: Az inzulin fő jelátviteli útvonalai. Az inzulin a receptorához kötődik, az foszforilálódik, majd a Glut 4 glükóz transzporter a sejtmembránba transzlokálódik. IRS: inzulin receptor szubsztrát; G α , β , γ : G-protein α , β , γ alegységei; CasR: kalcium-szenzitív receptor; PIP_{2,3}: foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát 2, 3; P: foszforiláció; PI3K: foszfoinozitol-3 kináz; PDK1: 3-foszfoinozitol-függő kináz-1; AS160: az Akt 160 kDa-os szubsztrátja, mTORC1, 2: emlős rapamicin jelátviteli útvonalhoz szükséges komplexek; p70S6K: p70-es riboszóma protein-S6-kináz; GSK3: glikogén szintáz kináz 3; GS: glikogén szintáz (Zakaria és mtsai. nyomán, 2021).

Az inzulinreceptorok endocitózissal jutnak be a célsejtbe, mely klatrin- vagy kaveola-mediált módon valósulhat meg. A mechanizmus módja a célsejttől illetve a szükséges inzulin koncentrációjától függ (Wu és mtsai., 2022). Szövettani vizsgálatok kimutatták, hogy az inzulin a zsírsejtekhez mikroinvaginációval kötődik és az inzulinreceptor a kaveolákban halmozódik fel (Goldber és mtsai., 1987). Ezt a feltevést elektronmikroszkópos vizsgálatok erősítették meg, kimutatva az inzulinreceptor és a kaveolin kolokalizációját (Smith és mtsai., 1998; Parpal és mtsai., 2001). A kaveolinnak az inzulin jelátviteli folyamataiban van szerepe. Feltételezések szerint az inzulinreceptor stabilizációjában játszik fontos szerepet vagy stimulálja az inzulinreceptor működését (Ishikawa és mtsai., 2005).

I.5. Inkretinek jelentősége a bélrendszerben

Az inkretinek olyan peptid természetű hormonok, amelyek az elfogyasztott táplálék hatására, elsősorban szénhidrát komponenseknek az emésztése során, közvetett módon, az evés utáni vércukorszint csökkentéssel vesznek részt a glükóz homeosztázis biztosításában. Az inkretinek termelődéséért az enteroendokrin K- és L-sejtek felelnek, expressziójukat a bél mikrobiom tartalma jelentősen befolyásolja. A baktériumok által szintetizált rövid szénláncú zsírsavak növelik az L-sejtek számát a bélben (Greiner és Bäckhed, 2016). Állatkísérletekben leírták, hogy a diszbiózis fokozza a *Firmicutes* és *Bacteroidetes* fajok arányát, ami pozitívan befolyásolja az inkretinhatást (Martin és mtsai., 2019).

Az inkretinek képviselői a glükózdependens inzulinotróp polipeptid (GIP) és a glükagonszerű peptidek (GLP1 és GLP2). Ezek a molekulák tagjai a glükagon-hormoncsaládnak és aminosavláncuk is hasonlóságot mutat. Az egyezés ellenére, csak a GLP1-nek és a GIP-nek van inzulintermelésért felelős hatása (Asmar M., 2011).

A GLP1-et a nyálkahártya L sejtjei termelik, 30 aminosavból felépülő fehérje, amelyet a proglükagon gén kódol. A gént elsősorban a pancreas α -sejtjei expresszálják, de kimutatható a bélmucosa L-sejtjeiben és az agyban is (Vahl és mtsai., 2003). Bélben a proglükagon expresszió disztális irányba nő, vagyis az ileum és colon bélszakaszokban expresszálódik nagyobb mennyiségben (Davis és Sandoval, 2020).

A humán GLP1 peptidlánca azonosságot mutat a rágcsálókban előfordulóval, míg a GLP2 esetében kisebb aminosav eltérések vannak. A GLP1-nek két változata ismert, az 1-36 és az 1-37 amid tartalmú, melyeknek a metabolikus hatásai különböznek. *In vitro* és *in vivo* kutatások igazolták, hogy a GLP1 hét aminosavval rövidített változatai a GLP1 (7-36; 7-37) egyformán hatékonyak és a keringésben lévő biológiailag aktív GLP1 80%-át a GLP (1-36) amid teszi ki. A

GLP1 féléletideje nagyon rövid, két perc körüli, mert a szervezet ubiquitermolekulája, a dipeptidil-peptidáz-4 (DPP-IV) az N-terminális részén lehasítja és ez a rövidített GLP 1 (9-36) amid mutatható ki leginkább a vérben.

A GIP elválasztásáért a vékonybél nyálkahártyájában található K-sejtek felelnek. Nagyobb mennyiségben a duodenum és jejunum bélszakaszokban mutatták ki, de kisebb mennyiségben az ileumban is megtalálhatók (Kim és Egan, 2008; Mortensen és mtsai., 2003). A GIP receptora (GIPR) a Langerhans-szigetek α - és β -sejtjein található, de ezen kívül további szövetekben, mint a bélfalban, zsírszövetben, mellékvese kéregállományában és agyvelőben is expresszálódhat (Bulum, 2022; Campbell és mtsai., 2022; Fukuda, 2021).

In situ hibridizációs módszerrel kimutatták a GLP1 és a GIP kolokalizációját is, ami ellentmond annak a ténynek, hogy a bél különböző enteroendokrin sejtjei termelik a molekulákat (Mortensen és mtsai. 2003). A GLP1 a hasnyálmirigy β -sejtjeinek inzulintermelését glükóz-függő módon segíti, az inzulinszekréció a magas vércukorszint esetén valósul meg. A GLP1 továbbá a perifériás szövetekben növeli az inzulinérzékenységet, vagyis a sejtek könnyebben felveszik a glükózt és kevesebb inzulin is elegendő a vércukorszint szabályozásához. A GLP1 csökkenti a β -sejtek apoptózist és elősegíti a regenerációjukat is. A védő szerepen kívül képes a hasnyálmirigy α sejtjeiből transzdifferentiáció által új β -szerű sejteket is létrehozni (Lee és mtsai., 2018; Bourgeois és mtsai. 2024). A GLP1 a GLP1R aktiválásán keresztül fejti ki hatását, amely a glükagon receptorok családjába tartozó G fehérjéhez kapcsolt receptor és a család legtöbb tagjához hasonlóan aktiválódás után gyorsan felhasználódik.

A GLP1R és GIPR együttműködése, additív módon korrigálhatja az inzulinérzékenységet, fokozva az inzulinszekréciót. Állatkísérletekben a receptorok koaktiválása csökkentette az állatok testsúlyát és zsírtömegét, humán kísérletekben preklinikai fázisban a fő hatás az inzulinszekréció felerősítése volt (Pelle és mtsai., 2022; Razzaki és mtsai., 2022).

Minden GLP1 mimetikum (a GLP1R agonista, GLP1 analóg és a DPP-IV gátlók) a fiziológias változatnál nagyságrendekkel erősebb, így gyógyszerészeti célokra alkalmas. A GLP1 mimetikumok a cukorbetegség kezelésében biztató tapasztalatokat mutattak, leginkább a 2-es típusú diabéteszben, de már az 1-es típusú diabéteszben is voltak sikeres alkalmazások. Hatásmechanizmusukban közös, hogy fokozzák a posztprandiális (étkezés utáni) szérumszintet vércukorfüggő módon, csökkentve az éhomi és a posztprandiális vércukor- és glükagonszintet. A mimetikumok között vannak hosszú- és rövidtávú hatásúak. A hosszú hatású változatok képesek gátolni a májban a glükóztermelést is (Smits és mtsai., 2016).

Az exendin-4 egy hosszú hatású GLP1R agonista, természetes formáját egy arizonai gyík (*Heloderma suspectum*) nyálából izolálták. A gyíkfajtára jellemző, hogy csak évi néhány

alkalommal táplálkozik és az étkezést követően az exendin-4 a nyálban emelkedett koncentrációban található meg (Yap és Misuan, 2018). Hat hetes állatkísérletekben, az exendin-4 napi kétszeri alkalmazása esetén, megfigyelték a β -sejtek tömegének szignifikáns növekedését. A posztprandiális vércukorszintet mérséklő tulajdonságából adódóan a szintetikus változatát is előállították (Vilsboll és Holst, 2004). Alkalmazása a fázis I. stádiumban biztonságosnak tekinthető, mert az esetek elenyésző részében tapasztaltak enyhe mellékhatásokat mint a fejfájás, az émelygés vagy a hányinger, viszont a dózis emelése a mellékhatások gyakoriságának és erősségének lehetőségét is növelte (Fineman és mtsai., 2003). A GLP1R alkalmazása során a bélmotilitás késleltetett és ez a jelenség a jól kontrollált 2-es típusú diabéteszes betegeknél is megfigyelhető volt. Ez arra utal, hogy a GLP1R agonistákhoz köthető motilitászavar független lehet a glikémiás szabályozástól (Cymbal és mtsai., 2025).

GLP1 analóg vegyületet is előállítottak, melynek első változata a liraglutide. A GLP1 élettani tulajdonságait állatkísérletekben vizsgálták. A liraglutide a szervezetben, miután felszívódott, az albuminhoz kötve található meg, amely stabilizálja a DPP-IV-gyel való ellenállóságot. A liraglutide humán alkalmazását tanulmányozták 2-es típusú diabéteszes betegeken és azt találták, hogy a vércukorértékek jelentősen mérséklődtek már napi egyszeri dózisban is (Degen és mtsai., 2004). A GLP1 gátló hatással van a bélmotilitásra a vékonybélben, viszont a vastagbélre gyakorolt hatása lehet gátló és serkentő is. Van olyan GLP1 analóg (ROSE-010), amely gyorsítja a béltranszítot és irritábilis bél szindrómás egyéneknél még puffadást sem okozott (Camilleri és mtsai., 2012).

Az újabb GLP-1-alapú gyógyszerek GLP1R agonisták, mint például a szemaglutid és a tirzepatid, jobb glükózsabályozást biztosítanak. A diabéteszes terápián túlmutatva testsúly csökkentő hatással is bírnak, így az elhízás kezelésére is engedélyeztették ezeket a készítményeket (Drucker, 2024). A gyógyszerek segítségével történő testsúlycsökkenés elsősorban az éhségérzet és a táplálékfelvétel csökkenésével érhető el, ami elsősorban a GLP1R-t expresszáló hipotalamuszban és agytörzsben található neuronok populációjának köszönhető (Drucker, 2022). A készítmények injekció formában elérhetők, de a Novo Nordisknek van egy szájon át szedhető gyógyszere is, amely nagyobb hatóanyag-tartalom mellett volt kivitelezhető. A szemaglutid testsúly csökkentő hatását először Wilding és mtsai. (2021) bizonyították. A kísérletben közel kétezer elhízott egyén vett részt tizenhat különböző országból, és 68 héten át kellett alkalmazni az injekciót. A kutatás során azt találták, hogy átlagosan 15%-kal csökkent azok testsúlya, akik hetente 2,4 mg szemaglutidot kaptak és a harmaduknál több mint 20%-os csökkenést mértek.

A készítmények leggyakrabban különböző gyomor- és bélrendszeri problémákat okozhatnak, mint pl. a hasi fájdalom, a székrekedés vagy a hasmenés, viszont súlyos

mellékhatásokat is tapasztaltak (hasnyálmirigy-gyulladás, látásproblémák). A nem cukorbetegknél tapasztaltak hipoglikémiás állapotot is. Tehát ezeknek a készítményeknek az alkalmazása kizárólag orvosi felügyelet mellett javasolt, hiszen használatakor akár súlyos egészségkárosodás is bekövetkezhet (Zhao és mtsai., 2021; Ghusn és Hurtado, 2024).

I.6. Az enterális neuronok és az enteroendokrin sejtek közötti kapcsolatok

A hasnyálmirigy és az enterális neuronok közötti kapcsolatot a kolinerg és szerotonerg neuronok nyúlványai biztosítják (Liu és mtsai., 2023; Makhmutova és Caicedo, 2021). Az enteroendokrin sejtek és a hasnyálmirigy β -sejtjei embrionális fejlődés során génexpressziós profiljukban is hasonlóságot mutatnak (Ryu és mtsai., 2018). Egozi és mtsai. (2021) ezt alátámasztották azzal, hogy magas inzulin mRNS expressziót mutattak ki a humán magzati minták enteroendokrin K/L sejtjeiben.

A GLP1R a β -sejtek felszínén is expresszálódik és a GLP1 fokozza a hasnyálmirigy β -sejtjeinek inzulin szekrécióját. (Alavi és mtsai., 2021). A GLP1R a neuronokban is expresszálódik, az ENS-ben és a központi idegrendszerben is, befolyásolva a homeosztázis idegi szabályozását (Drucker és mtsai., 2018).

Az enteroendokrin sejtek fontos szerepet játszanak a bél-agy tengely kommunikációjában is (Lai és mtsai., 2020; Borgmann és mtsai., 2021). A szimpatikus idegek az egér és a humán bélben is szorosan kapcsolódnak az L-sejtekhez. Ren és mtsai. (2024) diabéteszes állatkísérlet során azt találták, hogy a bél adrenerg α_2 receptora közvetíti a szimpatikus jelet, elnyomva a posztprandialis GLP1 felszabadulást, ami viszont vércukorszint emelkedéshez vezetett. A bél adrenerg jelátvitelét gátolva megszűnt a GLP1 szekréció szimpatikus gátlása és így sikerült csökkenteni a diabéteszes állatok vércukorszintjét.

Bohórquez és mtsai. (2015) monoszínaptikus veszettség vírus felhasználásával kimutatták, hogy a vastagbélben található enteroendokrin sejtek szinapszishoz hasonló kapcsolatokat alakítanak ki neuronokkal. Ezek az enteroendokrin sejtek pre- és posztzinaptikus fehérjékkel rendelkeznek, ami arra utal, hogy nem csak jeleket küldhetnek ezeken szinapszisokon keresztül, hanem szinaptikus bemeneteket is kaphatnak neuronoktól. Bellono és mtsai. (2017) immunhisztokémiai módszerrel igazolták, hogy a vékonybél enterokromaffin sejtjei pre- és posztzinaptikus fehérjékkel rendelkeznek és ezek idegvégződésekkel szomszédosak. Ezen kívül leírták, hogy az enteroendokrin sejtek szinaptizálnak hátsógyöki érző ganglionokkal is (Kaelberer és mtsai., 2018).

A GLP1 perifériás hatásmechanizmusai továbbra is tisztázatlanok (Drucker és mtsai., 2018), viszont az egyik lehetőség, hogy az enterális neuronok közvetítik a bélrendszeri szisztémás hatásokat (Holst és mtsai., 2022). Ezt a hipotézist tesztelve, Zhang és mtsai. (2022) azt találták, hogy a bélrendszerben található GLP1 a helyi enterális reflexeken keresztül váltja ki a bél-agy neurális transzmissziót, így a GLP1-gyel kommunikáló enterális neuronok a motilitási zavarok terápiás célpontjai lehetnek. Az érintett neuronpopulációk vizsgálatára is vannak próbálkozások. A NO elősegíti a GLP1 hatását, ezért a nNOS-GLP1-IR enterális neuronoknak lehet közvetítő szerepe a kommunikációban. A nNOS-IR neuronok axonjai a bélfalból kilépve aktiválják a szimpatikus prevertebrális neuronokat és a GLP1-gyel az ileum feszülését idézik elő, ezzel akut étvágycsökkenést okoznak (Zhang és mtsai., 2022).

II. Célkitűzések

Korábban már kimutatták az inzulin expresszióját a központi idegrendszerben, azonban az enterális neuronokban még egyáltalán nem vizsgálták az inzulin jelenlétét, annak ellenére, hogy a vékonybél és a pancreas között szoros együttműködés valósul meg. Ezért kísérletes munkánk elsődleges célja az volt, hogy megvizsgáljuk, kimutatható-e az inzulin jelenléte a myentericus neuronokban. A szakirodalomban kevés adat áll rendelkezésre a GLP1 expressziójával kapcsolatosan diabéteszes állapotban, ezért célul tűztük ki az inzulinnal szorosan összefüggő GLP1 és receptorának régió-specifikus expressziós változásainak vizsgálatát is. Munkánk során kontroll, diabéteszes és inzulinkezelt diabéteszes állatokban a következő kérdésekre kerestük a választ:

II.1. Inzulin-immunreaktivitás vizsgálata

- Előfordulnak-e inzulin-IR myentericus neuronok a kontroll állatok különböző bélszakaszaiban? Ha igen, az összneuronszámhoz képest milyen arányban?
- Megfigyelhető-e változás az inzulin-IR myentericus neuronok arányában akut és krónikus hiperglikémia hatására?
- Hogyan hat az azonnali inzulinkezelés az inzulin-IR neuronok százalékos arányára?
- Hogyan változik az inzulin-IR neuronok aránya a nitrerg myentericus populációban akut és krónikus hiperglikémiás állatokban?
- Hogyan változik az inzulin mennyisége a myentericus ganglionokban, valamint a hasnyálmirigy szigeteiben és exokrin állományában krónikus hiperglikémia hatására?
- Milyen változást mutat az inzulin expressziója a bélszöveti homogenizátumokban, kimutatható-e inzulin mRNS expresszió a patkányok különböző bélszakaszaiban?

II.2. Glükagonszerű peptid 1 és receptorának vizsgálata

- Megfigyelhető-e változás a GLP1-IR enteroendokrin sejtek denzitásában akut és krónikus hiperglikémia hatására?
- Hogyan változik a GLP1R denzitása a myentericus ganglionokban egészséges és diabéteszes állatok esetében?
- Hogyan változik a GLP1-IR és GLP1R-IR sejtek összterülete a pancreas Langerhans-szigeteiben krónikus hiperglikémia hatására?

III. Anyagok és vizsgálati módszerek

A kísérletek során felhasznált állatok tartása az Európai Unió etikai előírásainak (2010/63/EU), illetve a magyar törvényi szabályozásnak (XXVIII/1998, 243/1998) és a Kormány rendeletének (40/2013. II. 14.) megfelelően, a Szegedi Tudományegyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottságának hozzájárulásával, a Megyei Élelmiszerlánc-Biztonsági és Állategészségügyi Igazgatóság engedélyével (XX/1487/2014 és XX/1636/2019) történt.

III. 1. Diabéteszes állatmodellek előállítás

Kísérleteinkhez 200-300 g tömegű, fiatal felnőtt, hím Wistar patkányokat használtunk. A hiperglikémiát egyszeri intraperitoneális STZ-injekcióval (Sigma, USA) 60 mg/testtömeg kg-os dózisban alkalmazva váltottuk ki. Az állatokat két kísérleti periódusban vizsgáltuk: egy hét elteltével (akut modell) és 10 héttel (krónikus modell) a hiperglikémia kiváltása után. Az akut hiperglikémiás patkányokat random módon kontroll (n=6) és STZ-indukált kezeletlen diabéteszes (n=8) csoportokra osztottuk. A krónikus állatkísérlet esetében a kontroll (n=17) és STZ-indukált kezeletlen diabéteszes (n=16) csoportokat kiegészítettük még egy STZ-indukált inzulinkezelt (n=14) állatcsoporttal is. Az állatok vércukor koncentrációját a STZ kezelés után 48 óra elteltével vércukormérővel (Accu-Check® Active, Roche Diabetes Care GmbH, Németország) ellenőriztük. Az állatokat akkor tekintettük diabéteszesnek, ha a vércukor-koncentrációjuk 18 mmol/L fölé emelkedett. Ekkor az inzulinkezelt csoportban azonnali inzulinkezelést alkalmaztunk. Az inzulint (Humulin M3, Eli Lilly, Hollandia) szubkután injekció formájában napi két alkalommal (reggel 3 NE és délután 3 NE) kapták.

Ezt az inzulinmennyiséget a vércukorkoncentráció rendszeres ellenőrzése mellett állítottuk be, figyelembe véve az állatok napi aktivitását is. A kontroll és a kezeletlen diabéteszes csoportok azonos mennyiségű fiziológiás sóoldatot kaptak szintén szubkután formában. A patkányok vércukor koncentrációját és tömegét naponta monitoroztuk az akut, és hetente a krónikus modell esetében. Az állatoknak standard laboratóriumi tápot és vizet biztosítottunk, melyet egyéni igényeknek megfelelő mennyiségben fogyaszthattak (Egyed-Kolumbán és mtsai., 2025).

III. 2. Minták előkészítése mikroszkópos és molekuláris vizsgálatokhoz

Az akut és a krónikus kísérleti periódus leteltével az állatokat intraperitoneális klorál-hidrát (375 mg/kg) adagolásával túlaltattuk és cervikális diszlokáció után a hasüregüket U-alakban

felnyitottuk. A bélcsatornát teljes hosszában kiboncoltuk, majd foszfát pufferrel (PB, phosphate buffer, 0,05 M, pH 7,4) átmostuk.

Kísérletekhez a bélmintákat a duodenum esetében a pylorustól 1 cm-re disztálisan, az ileumból az ileo-coecalis junctiotól 1 cm-re proximálisan, illetve a vastagbél középső területéről vettük, míg a pancreasnak a feji részét használtuk. A szövetmintákat ezután fluoreszcens, elektronmikroszkópos és molekuláris biológiai vizsgálatokhoz készítettük elő.

A fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatokhoz a bélmintákból whole-mount (bélnyúzat) preparátumokat és paraffinos metszeteket készítettünk. A whole-mount preparátumokhoz a különböző bélszakaszokat a mesenterium mentén felvágtuk, a béltartalmat kimostuk PB-rel (0,05 M, pH=7,4) majd a szövet könnyebb praparálása érdekében balzafa lemezekre feszítettük. A kifeszített bélmintákat 4%-os pufferelt formalin oldatban (Molar Chemicals Kft., Magyarország) 24 óráig 4 °C-on fixáltuk. A paraffinos metszetekhez 2-3 mm-es béldarabokat (teljes keresztmetszet) és ugyanekkora pancreas darabokat 4%-os pufferelt formalin oldatban (Molar Chemicals Kft., Magyarország) fixáltuk egy éjszakán át szobahőn.

Az elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz 3-5 mm-es bél darabokat (teljes keresztmetszet) 2%-os paraformaldehid és 2%-os glutáraldehid oldatában (0,05 M PB-rel hígított oldat) fixáltunk 4 °C-on egy éjszakán keresztül. Aztán a mintákat PB-ben (0,05 M, pH 7,4) mostuk és 1 órán keresztül 2% ozmium-tetroxidban (OsO_4) utófixáltuk (Tizro és mtsai., 2019).

A molekuláris vizsgálatokhoz a bélmintákat a mesenteriumot követve felvágtuk, kiterítettük, majd sztereomikroszkóp alatt jégen dolgozva, RNáz gátlóval tisztított eszközök segítségével szétválasztottuk a mucosa réteget és az alatta elhelyezkedő submucosa réteget a többi szövettani rétegtől és a továbbiakban a bélfal simaizomrétegeit is tartalmazó myentericus plexust használtuk fel a vizsgálatokhoz. A pancreas minták esetében az esetleges felszíni zsírréteget eltávolítottuk. A bélmintákat és a pancreast folyékony nitrogénben fagyasztottuk és -80 °C-on tároltuk a felhasználásig.

III. 3. Fluoreszcens immunhisztokémiai vizsgálatok

III. 3.1 Fluoreszcens immunhisztokémia whole-mount preparátumokon

Fixálás után a bélmintákat eltávolítottuk a balzafa lemezekről és PB-ben (0,05 M; pH 7,4) mostuk (5x10 perc), majd a preparálásig PB-ben (0,05 M; pH=7,4) 4 °C-on tároltuk. Ezekből a bélmintákból bélnyúzat preparátumokat készítettünk csipesz és spatula segítségével sztereomikroszkóp alatt: először eltávolítottuk a nyálkahártya és a submucosa réteget, majd a

körkörös simaizom réteget is, így a hosszanti simaizom felszínén vizsgálhatóvá vált a myentericus plexus (Izbéki és mtsai., 2008).

Ahhoz, hogy megállapítsuk, hogy vannak-e inzulin-IR myentericus neuronok, a whole-mount preparátumokon egyes, kettes és hármas jelöléses fluoreszcens immunhisztokémiai festéseket végeztünk. A whole-mount preparátumokat 0,025% Triton-X-100-at tartalmazó 2-amino-2-(hidroximetil)-propán-1,3-diol (TRIS) pufferes sóoldatban (TBS) mostuk (2x5 perc), majd 2 órán át blokkoltuk 1%-os borjú szérum albumint (BSA) és 10%-os normál kecske szérumot tartalmazó TBS oldatban. A blokkolást követően a mintákat elsődleges antitestekkel (1. táblázat) inkubáltuk egy éjszakán át 4 °C-on.

1. táblázat: Whole-mount preparátumokon végzett fluoreszcens immunhisztokémia során használt elsődleges antitestek.

Elsődleges antitest	Gazda	Hígítás	Gyártó
anti-periferin	nyúl	1:400	EMD Millipore Corporation, USA
anti-nNOS	tengerimalac	1:500	Synaptic Systems GmbH, Németország
anti-inzulin	egér	1:100	Sigma-Aldrich, Magyarország
anti-inzulin	egér	1:200	ImmunoGenes Ltd, Magyarország
anti-inzulin	nyúl	1:200	Proteintech ChromoTek GmbH, Németország
anti-inzulin	tengerimalac	1:100	Abcam, UK

Ezt követően tritonos TBS-es mosás (2x5 perc) következett, majd a mintákat másodlagos antitestekben (2. táblázat) inkubáltuk 1 órán át, szobahőmérsékleten. Az inkubációs idő letelte után a mintákat TBS-ben (pH=7,4) mostuk (3x5 perc). A fluoreszcens immunhisztokémiai vizsgálatok során használt másodlagos antitestek specificitását minden esetben ellenőriztük, mely során a mintákat az elsődleges antitestek elhagyásával csak a másodlagos antitestekkel inkubáltuk. A próbák során a mintákon nem volt megfigyelhető immunreaktivitás. A megfestett whole-mount preparátumokat Fluoromount™ Aqueous 32 Mounting Mediummal (Sigma-Aldrich, Magyarország) lefedtük, végül Axiocam 506 mono kamerával rendelkező Zeiss Imager Z.2 fluoreszcens mikroszkóppal (Carl Zeiss AG, Németország) 200-szoros nagyításon digitális felvételeket készítettünk. Minden bélszakasz és kísérleti csoport esetében 50-80 ganglion vizsgálatára került sor az akut és krónikus modellek tanulmányozásakor. Az elkészült felvételek alapján meghatároztuk az inzulin-IR és az inzulin-nNOS-IR neuronok arányát az

összneuronszámhoz képest, illetve az inzulin-nNOS-IR neuronok arányát a nNOS-IR myentericus neuronokhoz viszonyítva.

2. táblázat: Whole-mount preparátumokon végzett fluoreszcens immunhisztokémia során használt másodlagos antitestek.

Másodlagos antitest	Gazda	Hígítás	Gyártó
anti-nyúl Alexa Fluor [®] 488	kecske	1:200	Invitrogen, USA
anti-tengerimalac Cy5 [®]	kecske	1:200	Abcam, UK
anti-egér Cy TM 3	kecske	1:200	Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA

III. 3. 2. Fluoreszcens immunhisztokémiai vizsgálatok paraffinos metszeteken

A mintákat felszálló koncentrációjú alkoholsorozatban (70%, 90%, 96%) és xilolban víztelenítettük, aztán alacsony olvadáspontú (56 °C) paraffinban (Paraplast, Sigma-Aldrich, Magyarország) inkubáltuk egy éjszakán át (Leica TP1020 Szövetfeldolgozó automata, Németország), majd az infiltrálódott mintákat paraffinba ágyasztuk (Leica HistoCore Arcadia H+C Paraffinozó állomása, Németország).

Az akut és krónikus állatkísérletekből származó paraffinba ágyazott bélminták és pancreasok blokkjaiból 5 µm vastagságú metszeteket készítettünk mikrotóm (Leica RM2245 rotációs mikrotóm, Németország) segítségével, majd ezeket deparaffináltuk (xilol és leszálló koncentrációjú alkoholsorozatban; Leica ST2010 Autostainer XL festőautomata, Németország). A paraffin eltávolítása után, a mintákat hidrofób tollal (ImmunEdgeTM Pen, USA) körberajzoltuk és száradni hagytuk 5 percig. Ezután a metszeteket 0,025%-os Triton-X-100-at tartalmazó TBS-ban mostuk (2x5 perc), majd 2 órán át blokkoltuk 1%-os BSA-t és 10%-os normál kecske szérumot tartalmazó TBS oldatban (Sigma-Aldrich, Magyarország). A blokkolási lépést követően a metszeteket elsődleges antitestekkel inkubáltuk egy éjszakán át 4 °C-on (3. táblázat).

3. táblázat: Paraffinos metszeteken végzett fluoreszcens immunhisztokémia során használt elsődleges antitestek.

Elsődleges antitest	Gazda	Hígítás	Gyártó
anti-GLP1	nyúl	1:800	Abcam, UK
anti-GLP1R	egér	1:200	Santa Cruz Biotechnology Inc., USA

Másnap ismét tritonos TBS mosás (2x5 perc) következett, majd a metszeteket másodlagos antitestekben (2. táblázat) inkubáltuk (1 órán át, szobahőmérsékleten), melyeket 0,1% BSA-t és 10% normál kecske szérumot tartalmazó TBS-oldattal hígítottunk ki. Végül a mintákat TBS-ben mostuk (3x5 perc). Az immunreakció specititását ebben az esetben is az elsődleges antitest elhagyásával ellenőriztük.

A megfestett metszeteket FluoroshieldTM DAPI (Sigma-Aldrich, Magyarország) fedőanyaggal fedtük le. Ezt követően AxioCam 506 mono kamerával felszerelt Zeiss Imager Z.2 fluoreszcens mikroszkóppal (Zeiss, Németország) 200-szoros nagyításon digitális felvételeket készítettünk a bél keresztmetszetéről a nyálkahártya rétegére összpontosítva (15-20 db/minta) és a pancreas Langerhans szigeteiről (8-10 sziget/minta).

A bélmetszetek digitális felvételein a GLP1-IR enteroendokrin sejteket megszámloltuk a nyálkahártya régióban. A GLP1-immunreaktivitást az egységnyi területre eső sejtek számában (sejtszám/mm²) fejeztük ki. A pancreas esetében azt vizsgáltuk, hogy a GLP1- illetve a GLP1R-IR sejtek a hasnyálmirigy endokrin részén mekkora területet foglalnak el a különböző kísérleti csoportokban a szigetek összterületéhez viszonyítva (%).

III. 4. Posztembedding elektronmikroszkópos immunhisztokémiai vizsgálatok

A különböző bélszakaszokból és pancreasból származó mintákat fixálás és mosási lépések után 1%-os OsO₄ oldatban (0,1 M PB-rel készült oldat) egy óráig utófixáltuk, majd PB-ben mostuk (0,1 M, pH 7,4), aztán felszálló alkoholsorozatban víztelenítettük. Az 50%-os, majd 70%-os alkohol oldattal való kezelés után a mintákat 5 percre uranil-acetáttal telített 70%-os etanolba tettük, ezt követően 96%-os etanolban, abszolút alkoholban és acetonban folytattuk a víztelenítést, majd a mintákat Embed812 gyantába ágyaztuk (Electron Microscopy Sciences, USA). Az elkészült blokkokból Leica típusú ultramikrotómmal 70 nm-es ultravékony metszeteket készítettünk, melyeket nikkel-rostélyokra tettünk (EMS Slot Grids, Oval Hole, 2x1 mm, 2000x1000, 27 µm ± 5 µm; Electron Microscopy Sciences, USA). A krónikus állatkísérletekből származó ultravékony metszeteken posztembedding immunhisztokémiai festéseket végeztünk mindegyik bélszakaszban és kísérleti csoportban. Az immunreakció lépéseit humid légkörű Petri-csészében, parafilmre helyezett cseppeken végeztük.

A nikkel-rostélyokra helyezett metszeteket először 1%-os perjódosavas cseppekre (9 perc) helyeztük, majd desztillált vizes mosás (3x5 perc) után 2%-os nátrium perjodát cseppeken (10 perc) inkubáltuk. A desztillált vizes mosást követően (3x5 perc) a mintákat TBS-cseppekre (pH 7,4) helyeztük át (3x2 perc), majd 30 percig 1%-os BSA-ban (TBS-ben oldott) inkubáltuk. A

metszeteket desztillált vízzel ismét mostuk (2x5 perc), majd TBS-ben való kezelés (2x3 perc) után a grideket az elsődleges antitesttel (4. táblázat) inkubáltuk szobahőmérsékleten egy éjszakán át. Az elsődleges antitesteket 1%-os BSA-t tartalmazó TBS oldattal hígítottuk ki.

4. táblázat: Posztembedding immunhisztokémia során használt elsődleges antitestek.

Elsődleges antitest	Gazda	Hígítás	Gyártó
anti-inzulin	egér	1:100	Sigma-Aldrich, Magyarország
anti-GLP1R	egér	1:200	Santa Cruz Biotechnology Inc., USA

Ezt követően a grideket ismét TBS-cseppekre (2x10 perc) raktuk át, aztán BSA-TRIS puffer oldatában (0,05 g BSA, 25 µl Tween-20, 5 ml TRIS pH 7,6; 2x5 perc) inkubáltuk. Aztán a metszeteket anti-egér 18 nm-es arany szemcsével konjugált másodlagos antitesttel (1:20; Jackson ImmunoResearch, USA) inkubáltuk 3 órán keresztül, szobahőmérsékleten. Végül a metszeteket desztillált vízben alaposan átmostuk (3x5 perc), aztán szűrőpapírral óvatosan leitattuk.

A folyamat során létrejövő szennyeződések csökkentésének érdekében a vizsgálat során felhasznált elsődleges és másodlagos antitestek kivételével minden felhasznált oldatot átszűrtünk (Millipore Express® PES Membrane Filter Unit 0,22 µl; Sigma-Aldrich, Magyarország). Az immunreakció során használt másodlagos antitest specifikását minden esetben ellenőriztük az elsődleges antitestek elhagyásával, mely során nem figyeltünk meg immunreaktivitást.

Az elektronmikroszkópos vizsgálathoz kontrasztfestést végeztünk, mely Reynolds-féle módszerrel történt (Reynolds, 1963). A mintákat 20 percre uranil-acetát (Merck, Németország) oldatcseppekre helyeztük, desztillált vízzel mostuk, ezután 3 percre ólom-citrát (Merck, Németország) oldatba tettük és ismét mostuk. Az ultravékony metszeteket a továbbiakban JEOL JEM 1400+ típusú transzmissziós elektronmikroszkóppal (TEM Center software, JEOL, Japan) vizsgáltuk. 50-80 digitális felvételt készítettünk 7-10 myentericus ganglionról bélszakaszonként és kísérleti csoportonként, illetve 60-80 felvétel készült 5-6 Langerhans szigetről 20000x-es nagyításon és ugyancsak 60-80 felvételt készítettünk a pancreas exokrin régiójáról 15000x-es nagyításon. Az arany szemcsék számolását ImageJ software (Wayne Rasband; National Institutes of Health) segítségével végeztük. Az inzulint jelölő arany szemcsék denzitását a vizsgált struktúrák egységnyi területére vonatkoztatva (db/µm²) fejeztük ki.

III. 5. Az inzulin szöveti koncentrációjának meghatározása

A szövetek összfehérje tartalmának meghatározásához a pancreasból és különböző bélszakaszokból származó fagyasztott mintákat dörzsmozsárban porítottuk, majd homogenizáltuk [500 µl proteáz inhibitor koktél (Sigma-Aldrich, USA) 20 ml 0,05 M PB-ben (pH=7,4)]. Az így kapott homogenizátumokat 5000 rpm-en 20 percig 4 °C-on centrifugáltuk és a mérésekhez a felülúszót használtuk. A mintákat 10 percet inkubáltuk szobahőmérsékleten Bradford-reagenssel, majd Benchmark készülékkel (Bio-Rad Laboratories, USA) 595 nm-en optikai denzitást mértünk. A minták összfehérje tartalmát mg fehérje/ml formában fejeztük ki.

Az inzulin szöveti szintjét a bél simaizomzatát és myentericus plexust tartalmazó szöveti homogenizátumából határoztuk meg kvantitatív enzimhez kötött immunszorbens módszer (ELISA) segítségével a gyártó utasításait követve (GA-E0715RT; GenAsia Biotech Co. Ltd., Kína). A minták optikai denzitását Benchmark készülékkel (Bio-Rad Laboratories, USA) 450 nm-en mértük. Az inzulin szöveti koncentrációját mIU/mg fehérjében kifejezve ábrázoltuk.

III. 6. mRNS preparálás, reverz transzkripció és polimeráz láncreakció

Folyékony nitrogénben fagyasztott kontroll és diabéteszes állatokból származó bél (duodenum, ileum, colon) és pancreas mintákat TRIzol reagensben (Thermo Fischer Scientific, USA) homogenizáltuk és a gyártó által javasolt protokollt követve össz-RNS-t izoláltunk. Az RNS koncentrációjának és tisztaságának meghatározásához az RNS minták abszorbanciáját mértük 260 és 280 nm-en NanoDrop ND-1000 UV/VIS spektrofotométerrel (Thermo Scientific, USA). Egyszálú cDNS-ek szintéziséhez templátként 2 µg össz-RNS-t használtunk és a TaqMan Reverse transzkripció reagens segítségével (Thermo Fischer Scientific, USA) random hexamer primerekkel szintetizáltunk, a gyártó protokollja szerint. A primer szekvenciákat az 5. táblázat tartalmazza.

Az inzulin mRNS esetleges expressziójának vizsgálatához a polimeráz láncreakciót (PCR) poolozott mintákon végeztük 25 µL reakció térfogatban 95 °C-on 5 percig (kezdeti denaturáció). A kezdeti denaturáció után, 35 ciklust futattunk 10 másodpercig 95 °C-on, majd 20 másodpercig 62 °C-on és 30 másodpercig 72 °C-on.

Az RT-PCR reakciókat minden egyes minta esetében háromszor végeztük el a mérések megbízhatóságának érdekében. A PCR termékeket 2%-os agaróz gélen futattuk és SYBR Safe DNS Gel Stain segítségével vizualizáltuk (Thermo Fischer Scientific, USA). A glicerinaldehid 3-foszfát dehidrogenázt (GAPDH) belső kontrollként használtuk a PCR reakciók során. Az inzulin primereket a Primer3 software segítségével terveztük és a Merck Millipore-tól (Németország)

szereztük be. A GAPDH primereket Dr. Gáspár Renátától (Szegei Tudományegyetem) kaptuk ajándékba.

5. táblázat: A polimeráz láncreakció során felhasznált primerek.

Célmolekula	Forward primerek (5'-3')	Reverz primerek (5'-3')
Inzulin	GCCCTAAGTGACCAGCTACA	TAGAAGAATCCACGCTCCCC
GAPDH	GAAGGGCTCATGACCACAGT	GGATGCAGGGATGATGTTCT

III. 7. Statisztikai analízis

Annak érdekében, hogy meghatározzuk, milyen hatással van a hiperglikémia és az azonnali inzulinkezelés az inzulin-IR myentericus neuronokra, illetve a nyálkahártya GLP1-IR enteroendokrin sejtjeire és ennek receptorára az adatokat statisztikai analízisnek vetettük alá.

Két csoport összehasonlítása esetében (akut állatkísérlet) a Mann-Whitney-féle T-tesztet alkalmaztuk, míg több csoport elemzése esetében (krónikus állatkísérlet) Kruskal-Wallis és Dunn-féle többszörös összehasonlítási tesztet használtunk.

Az eredményeket GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, USA) segítségével elemeztük és oszlopdiagramokon ábrázoltuk, az értékeket átlag $\pm$ standard hibaérték (SEM) formában jelöltük. A szignifikanciát a $p < 0,05$ érték alapján határoztuk meg.

IV. Eredmények

IV.1. Akut és krónikus hiperglikémiás állatok jellemzése

Az akut állatkísérlet egy hetes időtartama alatt a kontroll és a hiperglikémiás állatok testtömege egyaránt gyarapodott a kezdeti testtömeghez viszonyítva (kontroll: $275 \pm 9,21$ g vs. $219 \pm 7,18$ g; $p < 0,05$; diabéteszes: $256,3 \pm 8,19$ g vs. $216,5 \pm 4,98$ g; $p < 0,05$; 6. táblázat).

A STZ-nal indukált hiperglikémiás állatok vércukorszintje ötszörösére emelkedett a kiindulási értékekhez képest ($29,1 \pm 1,01$ mmol/L vs. $5,91 \pm 0,19$ mmol/L; $p < 0,0001$; 6. táblázat). A patkányok mindkét csoportjára jellemző volt a jó fizikai aktivitás és a külső ingerekre való megfelelő reakció. A kísérlet során a hiperglikémiás állatok esetében fokozódott a folyadékbevitel és a vizeletürítés a kontroll csoporthoz képest. A hiperglikémiás állatok vércukorszint-koncentrációja a kísérlet folyamán végig magas volt, így nem kellett állatot kivonni a kísérletből.

6. táblázat: Az akut kísérleti állatok testtömege és reggeli vércukor-koncentrációja. * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$ vs. kezdeti; ° $p < 0,05$ vs. végső kontroll. Az adatokat átlag $\pm$ SEM formában tüntettük fel.

Akut állatmodell	Testtömeg (g)		Vércukor-koncentráció (mmol/L)	
	Kezdeti	Végső	Kezdeti	Végső (Átlag)
Kontroll (n=6)	$219 \pm 7,18$	$275 \pm 9,21^*$	$6,83 \pm 0,26$	$6,39 \pm 0,12$
Diabéteszes (n=8)	$216,5 \pm 4,98$	$256,3 \pm 8,19^*$	$5,91 \pm 0,19$	$29,1 \pm 1,01^{****,°}$

A krónikus állatkísérlet folyamán az állatok testtömegét és vércukor-koncentrációját hetente monitoroztuk. A kontroll és az inzulinkezelt állatok testtömege több mint duplájára gyarapodott a kísérlet végére a kezdeti értékekhez képest ($432,2 \pm 10,3$ g vs. $203,9 \pm 3,17$ g és $446,8 \pm 13,83$ g vs. $206,5 \pm 4,77$ g; $p < 0,0001$), míg a kezeletlen diabéteszes csoportban az állatok testtömege kisebb mértékben gyarapodott ($318,5 \pm 11,94$ g vs. $206,8 \pm 4,27$ g; $p < 0,05$; 7. táblázat).

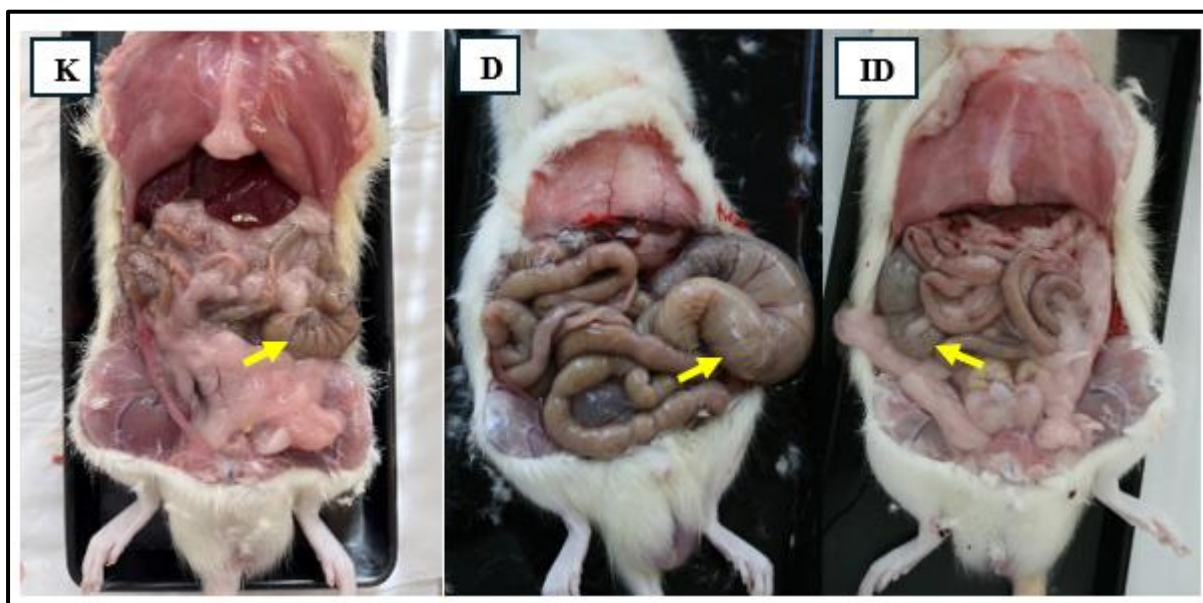
A diabéteszes állatok átlagos vércukorszintje kb. ötször nagyobb volt a kontroll értékeknél ($27,88 \pm 1,2$ mmol/L vs. $5,61 \pm 0,11$ mmol/L; $p < 0,0001$). Az inzulinkezelt diabéteszes csoport esetében a napi kétszeri inzulinkezelés a normoglikémiáshoz közeli tartományba csökkentette a vércukor-koncentrációt, viszont a reggel mért értékek magasabbak voltak a kontroll állatokhoz viszonyítva ($13,66 \pm 0,91$ mmol/L vs. $5,61 \pm 0,11$ mmol/L; $p < 0,05$; 7. táblázat). A tíz hét alatt a diabéteszes állatok vércukor-koncentrációja nem normalizálódott, így a kísérletből nem vontunk ki állatokat.

7. táblázat: A krónikus kísérleti csoportok testtömege és reggeli vércukor-koncentrációja. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ vs. kezdeti; ° $p < 0,05$; °°°° $p < 0,0001$ vs. végső kontroll. Az átlagokat átlag $\pm$ SEM formában tüntettük fel.

Krónikus állatmodell	Testtömeg (g)		Vércukor-koncentráció (mmol/L)	
	Kezdeti	Végső	Kezdeti	Végső (Átlag)
Kontroll (n=17)	203,9 $\pm$ 3,17	432,2 $\pm$ 10,3****	5,09 $\pm$ 0,31	5,61 $\pm$ 0,11
Diabéteszes (n=16)	206,8 $\pm$ 4,27	318,5 $\pm$ 11,94*	5,38 $\pm$ 0,4	27,88 $\pm$ 1,2****, °°°°
Inzulin-kezelt diabéteszes (n=14)	206,5 $\pm$ 4,77	446,8 $\pm$ 13,83****	5,08 $\pm$ 0,40	13,66 $\pm$ 0,91****, °

A kontroll és az inzulinkezelt diabéteszes állatok a krónikus kísérlet teljes időtartama alatt aktívak voltak, igényesen tisztogatták magukat és kiegyensúlyozottan fogyasztották a folyadékot, táplálékot. A kezeletlen diabéteszes patkányok csoportjára azonban jellemző volt a levertség, gyengeség, illetve elhanyagolták szőrüket. A diabétesz következményeként jelentősen megnövekedett a folyadékfogyasztásuk és a vizeletürítésük is. Néhány állatnál a diabéteszes retinopátia jeleit is észleltük.

Az állatok hasüregét feltárva a coecum is látványos különbségeket mutatott a vizsgált csoportok között az akut és a krónikus modellben is. A diabéteszes állatoknál ez sokkal nagyobb méretű volt, illetve a teljes bélrendszer is puffadt és kékes-lilás színezetű volt (5. ábra).



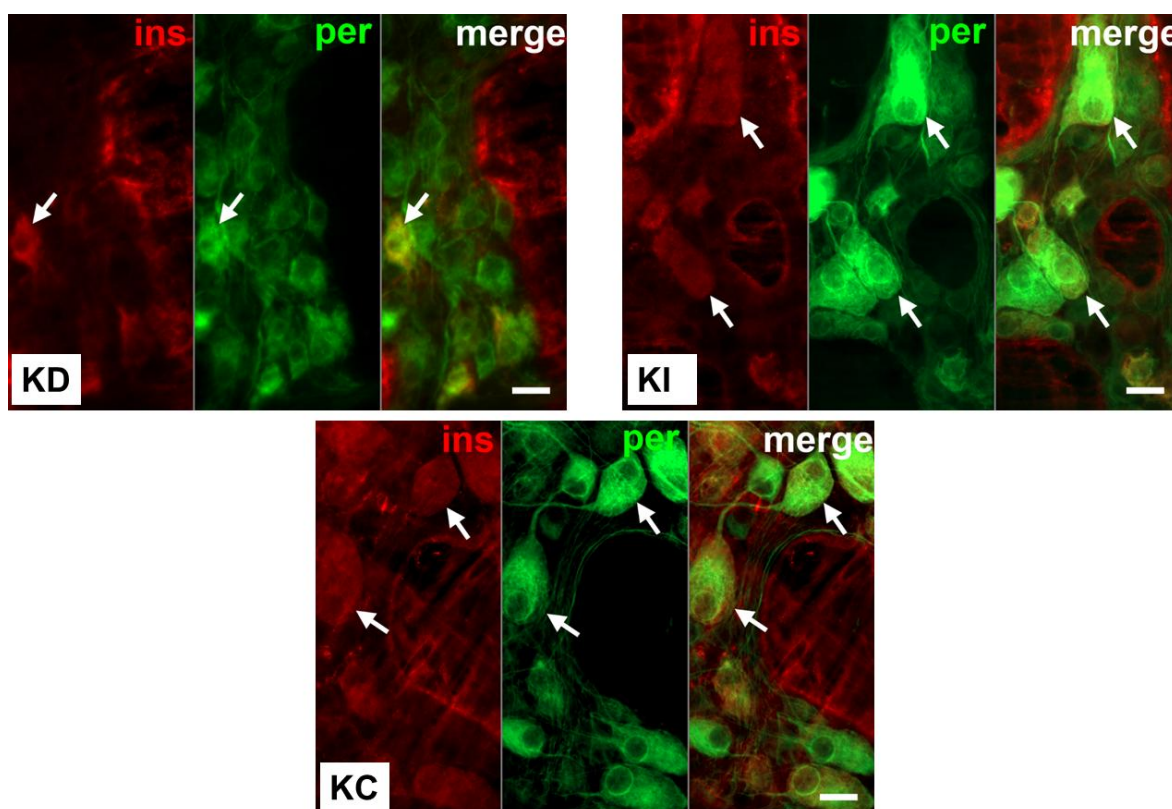
5. ábra: Reprezentatív makroszkópos felvételek kontroll (K), kezeletlen diabéteszes (D) és inzulinkezelt diabéteszes (ID) állatok hasüregéről. A diabéteszes állatok coecuma megnagyobbodott, bélrendszerük puffadt és kékes-lilás színezetű volt. Nyíl: coecum.

IV.2. Inszulin-immunreaktív myentericus neuronok

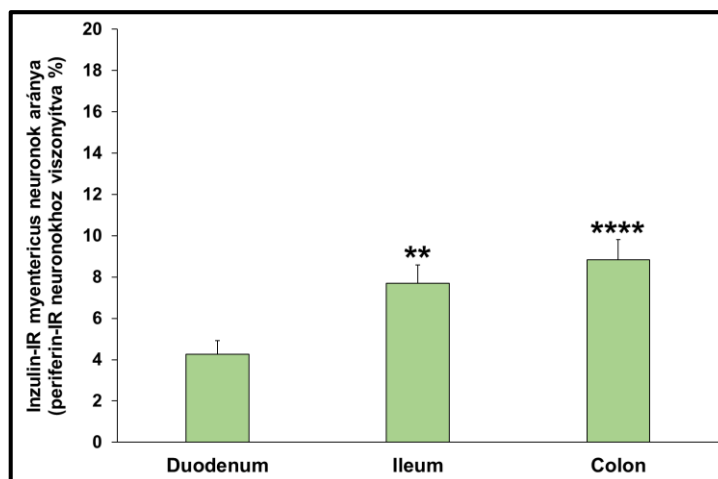
IV.2.1. Az inszulin-immunreaktív myentericus neuronok fluoreszcens vizsgálata akut hiperglikémiás patkányokban

Ahhoz, hogy megvizsgáljuk az inszulin jelenlétét a myentericus neuronokban, kettős jelöléses fluoreszcens immunhisztokémiát végeztünk. Periferin pan-neuronális markert használtunk a myentericus neuronok jelölésére és anti-inszulin elsődleges antitestet az inszulin-IR neuronok azonosítására (6. ábra).

Fluoreszcens vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy a myentericus neuronok egy része inszulin-immunreaktivitást mutat (6. ábra). Az inszulin-IR neuronok aránya bélszakasz-függő különbségeket mutatott a kontroll állatokban. Ezeknek a neuronoknak az aránya az összneuronszámhoz viszonyítva a duodenumban volt a legalacsonyabb (4%), míg disztális irányba haladva a duplája volt (ileum: $7,7 \pm 0,89\%$, $p < 0,01$; colon: $8,83 \pm 0,98\%$, $p < 0,0001$; 7. ábra).

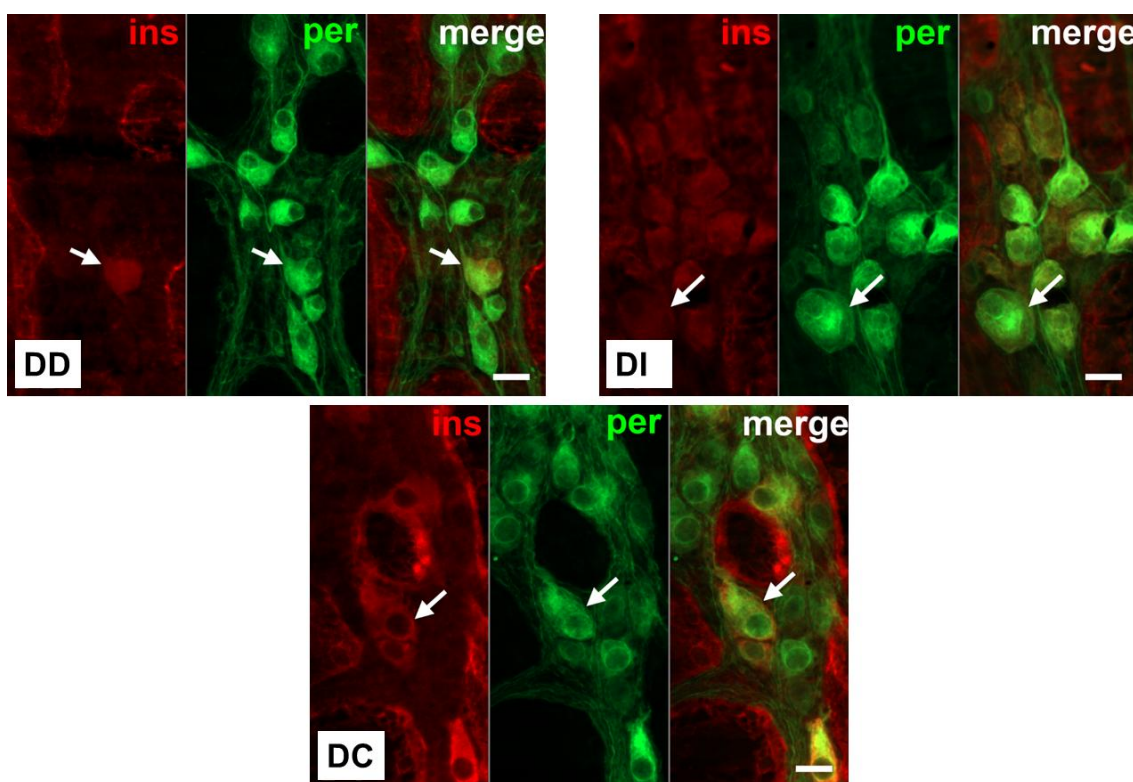


6. ábra: Reprezentatív fluoreszcens mikroszkópos felvételek myentericus ganglionokról inszulin-periferin immunhisztokémiai festés után. KD: kontroll duodenum, KI: kontroll ileum, KC: kontroll colon, ins: inszulin, per: periferin, merge: inszulin és periferin. Nyilak: inszulin-periferin kettősjelölt myentericus neuronok. Lépték: 20 μm .

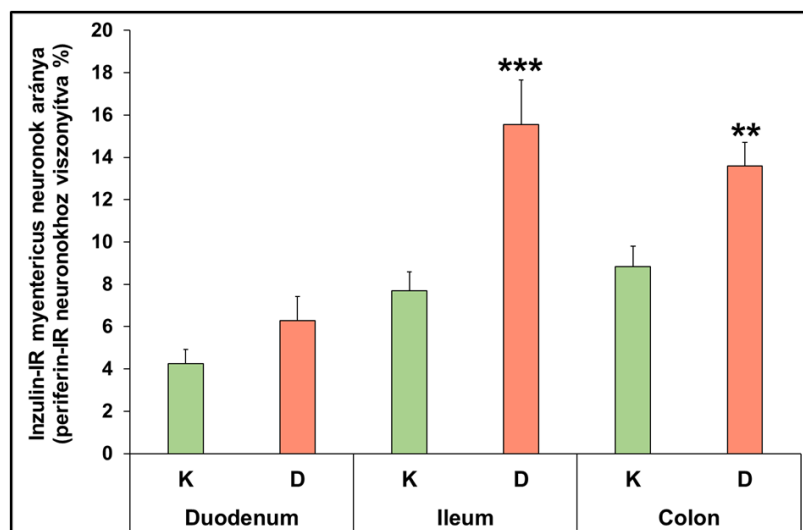


7. ábra: Inzulin-immunreaktív (inzulin-IR) myentericus neuronok aránya a kontroll patkányok különböző bélszakaszaiból származó myentericus ganglionokban. Az inzulin-IR neuronok aránya disztális irányba haladva növekvő tendenciát mutat. ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ (a duodenumhoz viszonyítva). Az adatokat átlag $\pm$ SEM formában tüntettük fel.

Akut hiperglikémia hatására az inzulin-IR neuronok aránya az ileumban és colonban szignifikánsan megemelkedett a kontrollhoz viszonyítva (ileum: $15,56 \pm 2,08\%$ vs. $7,7 \pm 0,89\%$, $p < 0,001$ és colon: $13,6 \pm 1,12\%$ vs. $8,83 \pm 0,98\%$, $p < 0,01$), viszont a duodenumban nem változott (8-9. ábra).



8. ábra: Reprezentatív fluoreszcens mikroszkópos felvételek myentericus whole-mount preparátumokról inzulin-periferin immunhisztokémiai festés után. DD: diabéteszes duodenum, DI: diabéteszes ileum, DC: diabéteszes colon, ins: inzulin, per: periferin, merge: inzulin és periferin. Nyilak: inzulin-periferin kettősjelölt myentericus neuronok. Lépték: 20 μm .



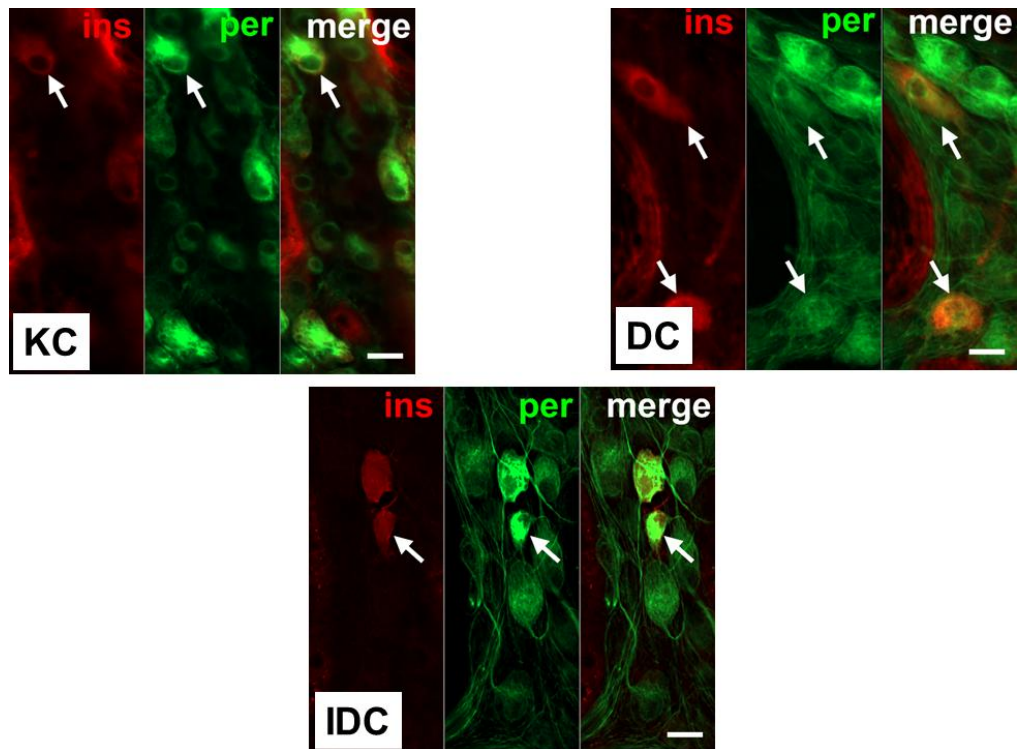
9. ábra: Inzulin-immunreaktív (inzulin-IR) neuronok aránya kontroll (K) és diabéteszes (D) patkányok különböző bélszakaszaiból származó myentericus ganglionokban. Akut hiperglikémia hatására az inzulin-IR neuronok aránya az ileum és colon bélszakaszokban szignifikánsan megnőtt a kontroll csoporthoz viszonyítva, a duodenumban változatlan maradt. ** $p < 0,01$ és *** $p < 0,001$ (a kontrollhoz viszonyítva). Az adatokat átlag $\pm$ SEM formában tüntettük fel.

IV.2.2. Az inzulin-immunreaktív myentericus neuronok fluoreszcens vizsgálata krónikus diabéteszes patkánymodellben

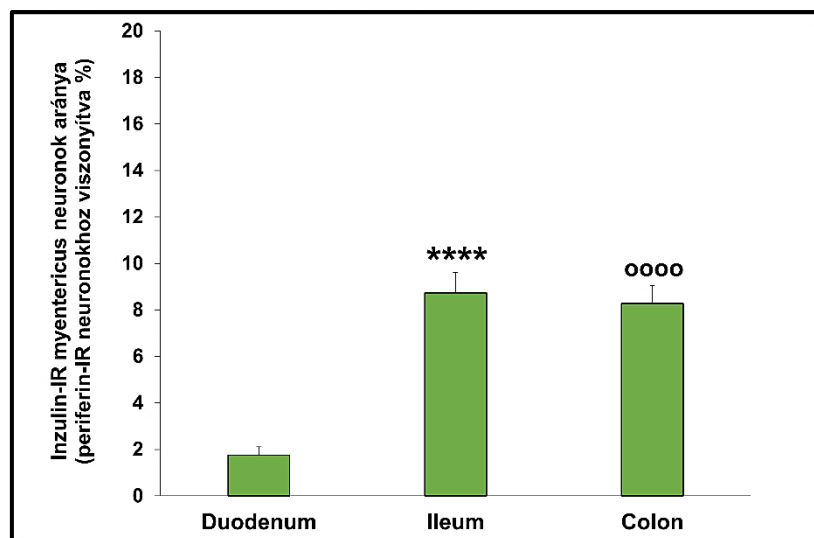
Az inzulin-IR myentericus neuronok jelenlétét a krónikus állatkísérletünkben is igazoltuk (10. ábra).

Az inzulin-IR neuronoknak az összneuronszámhoz viszonyított aránya a krónikus állatmodellben is a kontroll állatok ileum és colon szakaszaiban magasabb (8-9%), míg a duodenumban lényegesen alacsonyabb volt (2% alatt; 11. ábra).

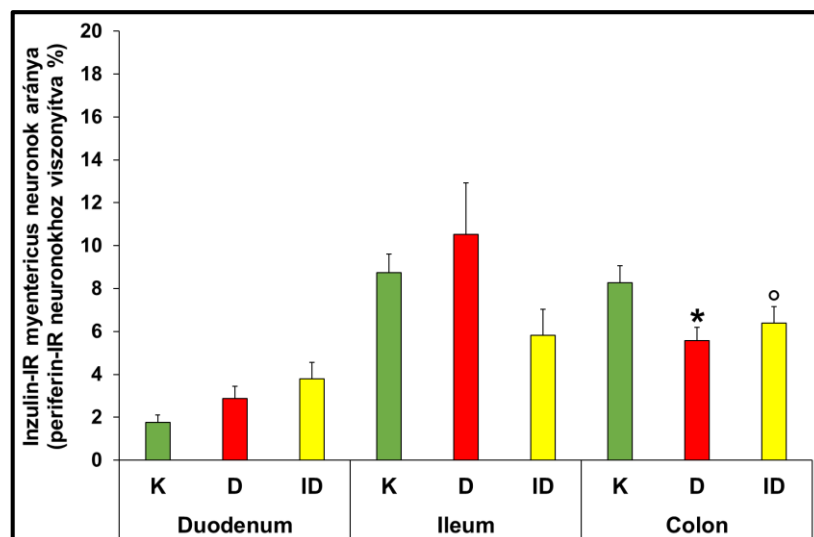
Krónikus hiperglikémia hatására az inzulin-IR neuronok aránya a colonban szignifikánsan lecsökkent ($5,58 \pm 0,61\%$ vs. $8,27 \pm 0,78\%$, $p < 0,05$), míg a duodenumban és az ileumban nem változott. Az azonnali inzulinkezelés a vastagbélben bekövetkező diabéteszes változásokat csak részben védte ki (12. ábra).



10. ábra: Reprezentatív fluoreszcens mikroszkópos felvételek myentericus whole-mount preparátumokról inzulin-periferin immunhisztokémiai festés után. KC: kontroll colon, DC: diabéteszes colon, IDC: inzulinkezelt diabéteszes colon, ins: inzulin, per: periferin. Nyilak: inzulin-immunreaktív myentericus neuronok. Lépték: 20 μ m.



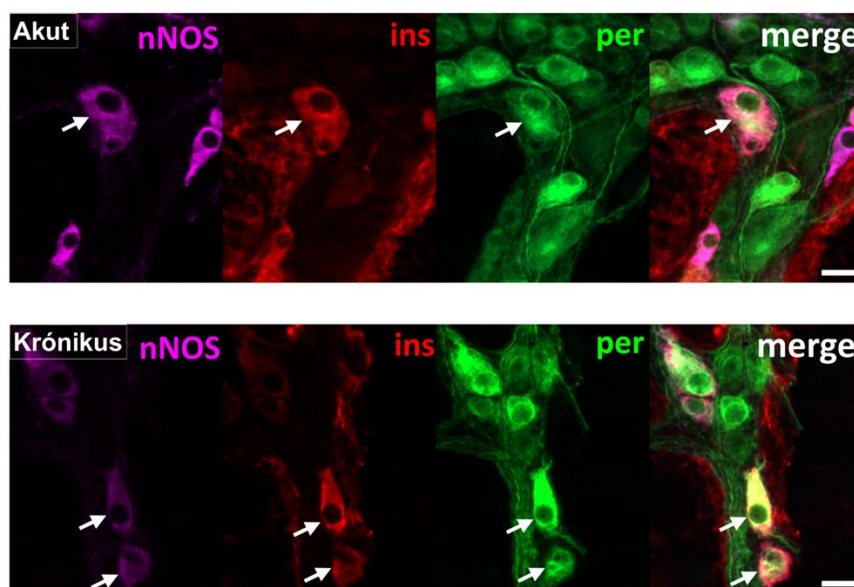
11. ábra: Inzulin-immunreaktív (inzulin-IR) neuronok aránya kontroll patkányok különböző bélszakaszaiból származó myentericus ganglionokban. Az inzulin-IR neuronok aránya a duodenumban volt a legalacsonyabb, az ileumban és colonban ennek több mint négyszeresét detektáltuk. **** $p < 0,0001$ (a kontrollhoz viszonyítva); oooo $p < 0,0001$ (duodenumhoz viszonyítva). Az adatokat átlag $\pm$ SEM formában tüntettük fel.



12. ábra: Insulin-immunreaktív (inzulin-IR) neuronok aránya kontroll (K), diabéteszes (D) és inzulinkezelt diabéteszes (ID) patkányok különböző bélszakaszaiból származó myentericus ganglionokban. Krónikus hiperglikémia hatására az inzulin-IR neuronok aránya a colonban szignifikánsan lecsökkent, melyet az inzulinkezelés részlegesen kivédett. * $p < 0,05$ (a kontrollhoz viszonyítva); ° $p < 0,05$ (D és ID között). Az adatokat átlag $\pm$ SEM formában tüntettük fel.

IV.2.3. Az inzulin-immunreaktív nitrerg myentericus neuronok fluoreszcens vizsgálata akut és krónikus diabéteszes patkánymodellben

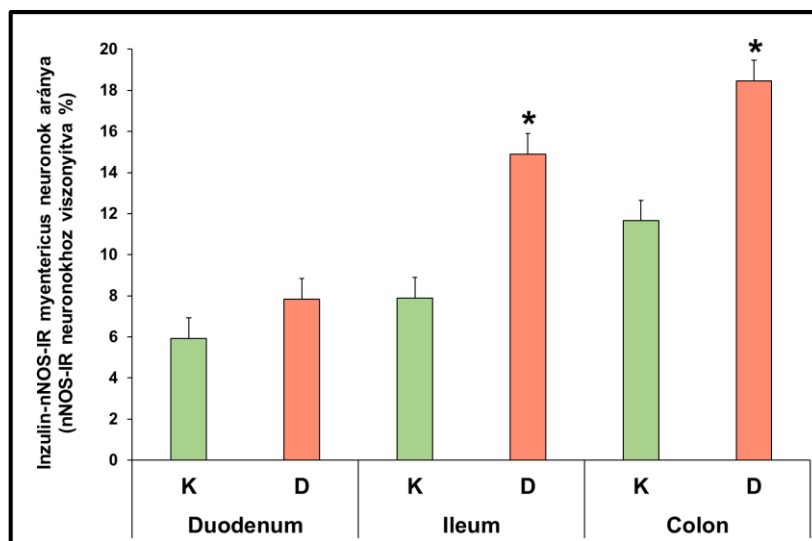
Fluoreszcens vizsgálataink során az inzulin jelenlétét a myentericus neuronok nitrerg szubpopulációjában külön is megvizsgáltuk (13. ábra).



13. ábra: Reprezentatív fluoreszcens mikroszkópos felvételek akut és krónikus állatkísérletből származó kontroll colonok myentericus ganglionjairól nNOS-inzulin-periferin immunhisztokémiai festés után. nNOS: nitrerg, ins: inzulin, per: periferin. Nyilak: inzulin-nNOS-immunreaktív myentericus neuronok. Lépték: 20 μ m.

Az inzulin-nNOS-IR neuronok aránya szintén regionális különbségeket mutatott. Az akut kísérlet kontroll állataiban az inzulin-nNOS-IR neuronok aránya az összes nNOS-IR neuronhoz viszonyítva a colonban volt a legmagasabb (közel 12%).

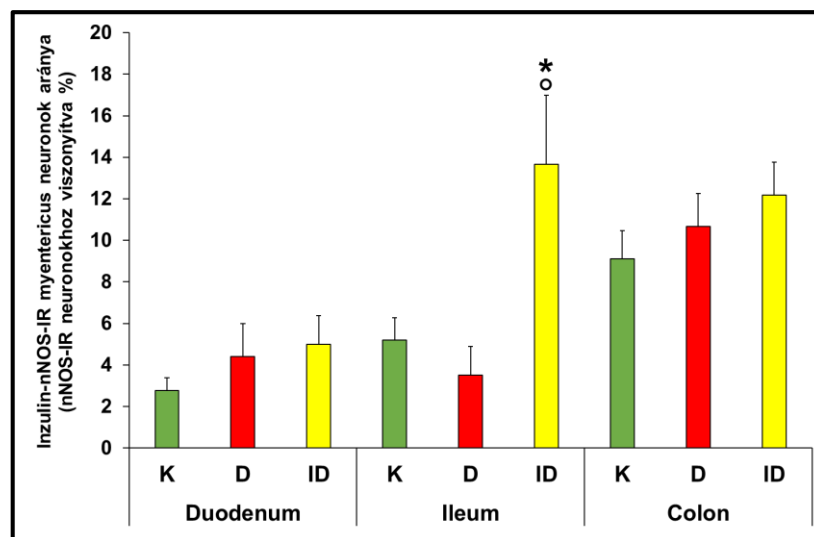
Akut hiperglikémia hatására ez az arány a duodenumban változatlan maradt, az ileumban és a colonban viszont jelentősen növekedett a kontrollhoz képest (ileum: $14,9 \pm 2,73\%$ vs. $7,89 \pm 1,29\%$, $p < 0,05$; colon: $18,46 \pm 2,04\%$ vs. $11,65 \pm 1,65\%$, $p < 0,05$; 14. ábra).



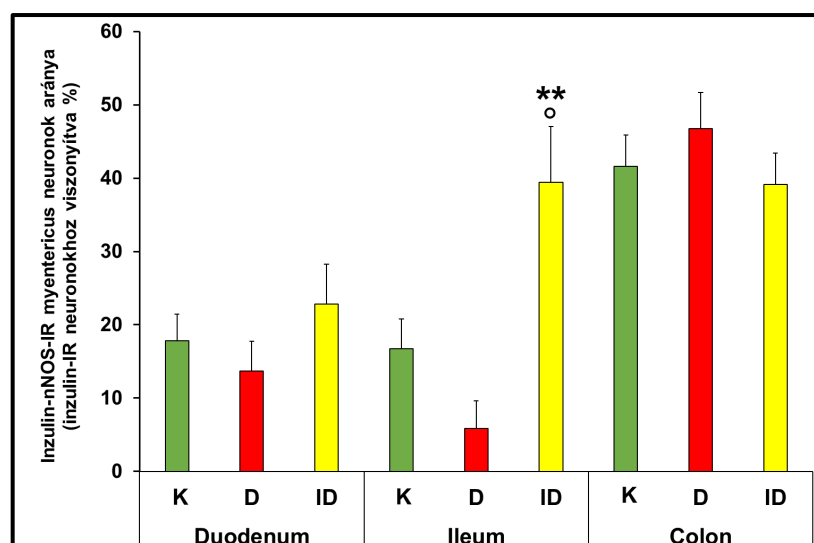
14. ábra: Inzulin-nNOS-immunreakív (IR) myentericus neuronok aránya (nNOS-IR neuronok számához viszonyítva) kontroll (K) és akut hiperglikémiás (D) patkányok különböző bélszakaszaiból származó myentericus ganglionokban. Akut hiperglikémia hatására az inzulin-nNOS-IR neuronok aránya az ileumban és a colonban szignifikánsan megnőtt. * $p < 0,05$ (a kontrollhoz viszonyítva). Az adatokat átlag $\pm$ SEM formában tüntettük fel.

A krónikus állatkísérlet során szintén azt figyeltük meg, hogy az inzulin-nNOS-IR neuronok aránya az összes nNOS-IR neuronhoz viszonyítva a vastagbélben volt a legmagasabb ($9,12 \pm 1,36\%$), míg a vékonybélben ez az arány jóval alacsonyabb volt (duodenum: $2,78 \pm 0,62\%$, ileum: $5,21 \pm 1,06\%$). A krónikus hiperglikémia hatására nem tapasztaltunk szignifikáns változást a vizsgált bélszakaszokban. Az inzulinkezelt állatok ileumában az inzulin-nNOS-IR neuronok aránya jelentősen megnőtt (15. ábra).

Más szempontból vizsgálódva, az összes inzulin-IR neuron több mint 40%-a inzulin-nNOS-IR volt a vastagbélben, míg ez az érték 20% alatt maradt a vékonybélben (16. ábra). Diabétész hatására ez a paraméter egyik vizsgált bélszakaszban sem mutatott szignifikáns változást (16. ábra).

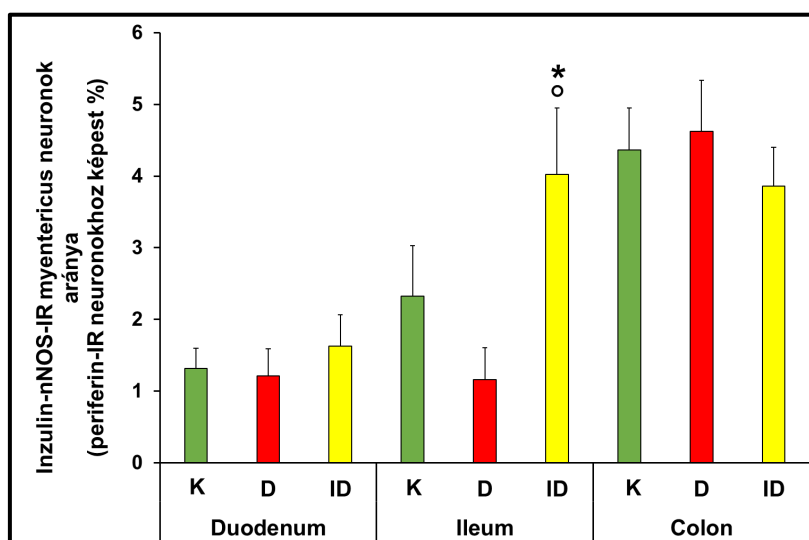


15. ábra: Inzulin-nNOS-immunreaktív (IR) myentericus neuronok aránya (nNOS-IR neuronokhoz viszonyítva) kontroll (K), diabéteszes (D) és inzulinkezelt diabéteszes (ID) patkányok különböző bélszakaszaiból származó myentericus ganglionokban. Krónikus hiperglikémia hatására az inzulin-nNOS-IR neuronok aránya nem változott a vizsgált bélszakaszokban. Az azonnali inzulinkezelés az ileumban növelte ezen neuronok arányát. * $p < 0,05$ (a kontrollhoz viszonyítva); ° $p < 0,05$ (D és ID között). Az adatokat átlag $\pm$ SEM formában tüntettük fel.



16. ábra: Inzulin-nNOS-immunreaktív (IR) myentericus neuronok aránya (inzulin-IR neuronok számához viszonyítva) kontroll (K), diabéteszes (D) és inzulinkezelt diabéteszes (ID) patkányok különböző bélszakaszaiból származó myentericus ganglionokban. A vastagbélben az inzulin-IR neuronok 40%-a volt nNOS-immunreaktív, ez az arány diabétesz hatására nem változott. ** $p < 0,01$ (a kontrollhoz viszonyítva); ° $p < 0,05$ (D és ID között). Az adatokat átlag $\pm$ SEM formában tüntettük fel.

Ugyanakkor az összneuronszámhoz viszonyítva, az inzulin-nNOS-IR neuronok nagyon kis mennyiségben voltak jelen (duodenum: $1,32 \pm 0,28\%$, ileum: $2,32 \pm 0,71\%$, colon: $4,36 \pm 0,59\%$), mely a diabéteszes állatokban szintén nem változott (17. ábra).



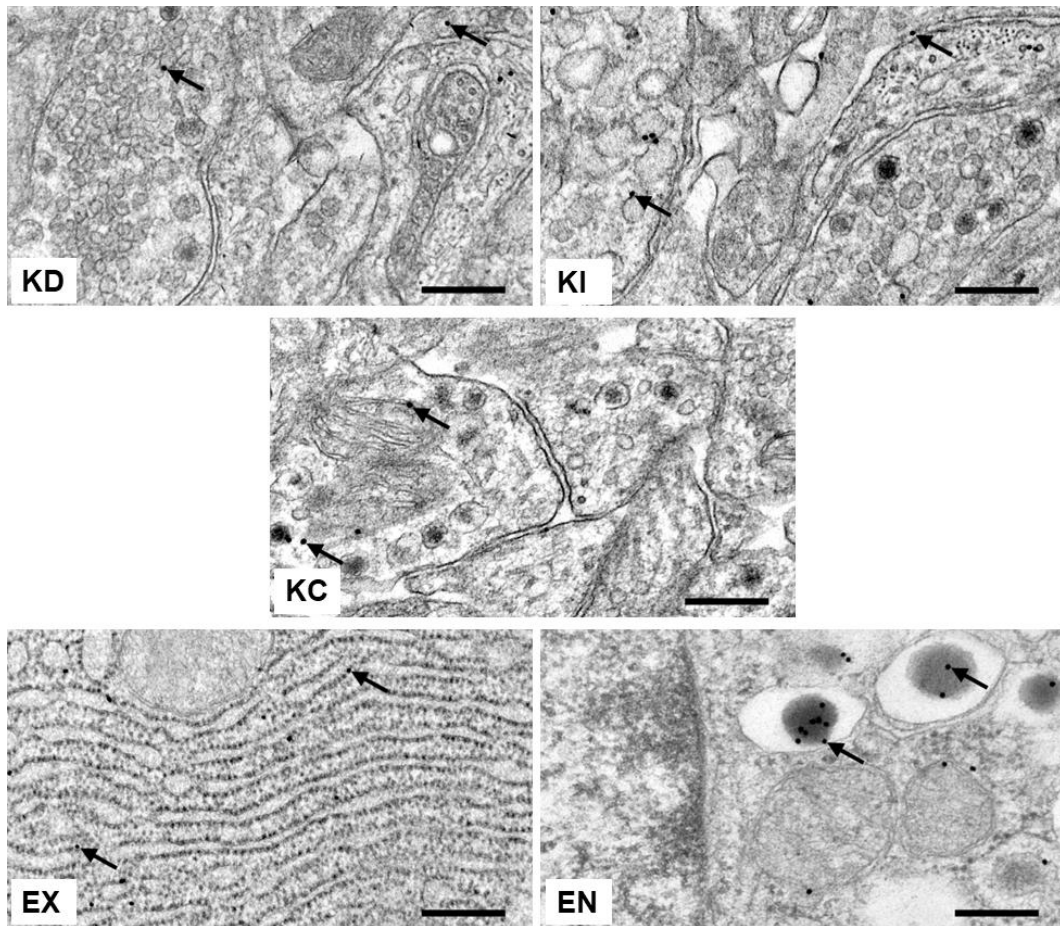
17. ábra: Insulin-nNOS-immunreaktív (IR) neuronok aránya (myentericus összneuronszámhoz viszonyítva) kontroll (K), diabéteszes (D) és inzulinkezelt diabéteszes (ID) patkányok különböző bélszakaszaiból származó myentericus ganglionokban. Az insulin-nNOS-IR neuronok aránya kevesebb mint 5% volt minden vizsgált bélszakaszban és diabétesz hatására nem történt változás egyik bélszakaszban sem. * $p < 0,05$ (a kontrollhoz viszonyítva); ° $p < 0,05$ (D és ID között). Az adatokat átlag $\pm$ SEM formában tüntettük fel.

IV.2.4. Az inzulint jelölő arany szemcsék denzitása és szubcelluláris lokalizációja krónikus diabéteszes patkányokban

Az inzulin szubcelluláris lokalizációját aranyjelöléses módszerrel transzmissziós elektronmikroszkóp segítségével vizsgáltuk a myentericus ganglionokban, a pancreas exokrin állományában és a Langerhans-szigetekben.

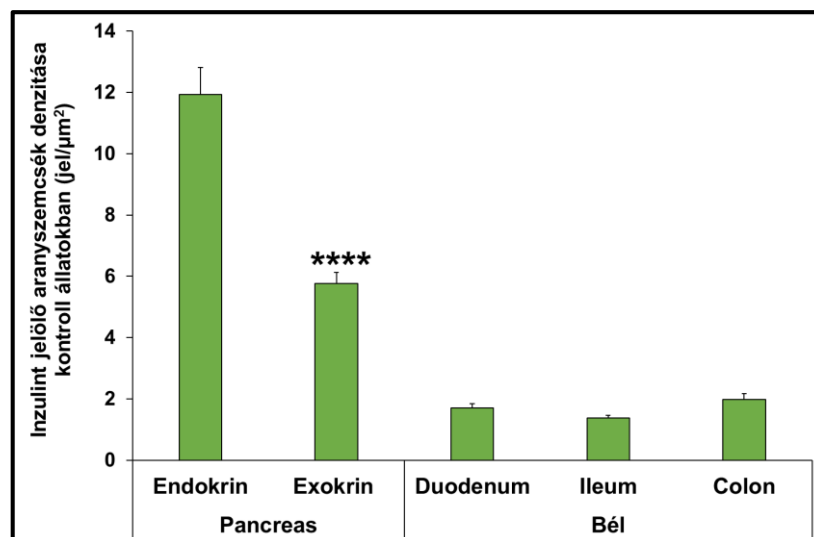
Az inzulint jelölő arany szemcsék többsége vezikulákban vagy plazmamembránhoz kötve helyezkedett el a myentericus ganglionokban, de a citoplazmában is megfigyeltünk arany szemcséket (18. ábra).

A pancreas endokrin részében a β -sejtekben a legtöbb szemcsét a szekréciós vezikulákban ill. azok környékén találtuk (18. ábra).

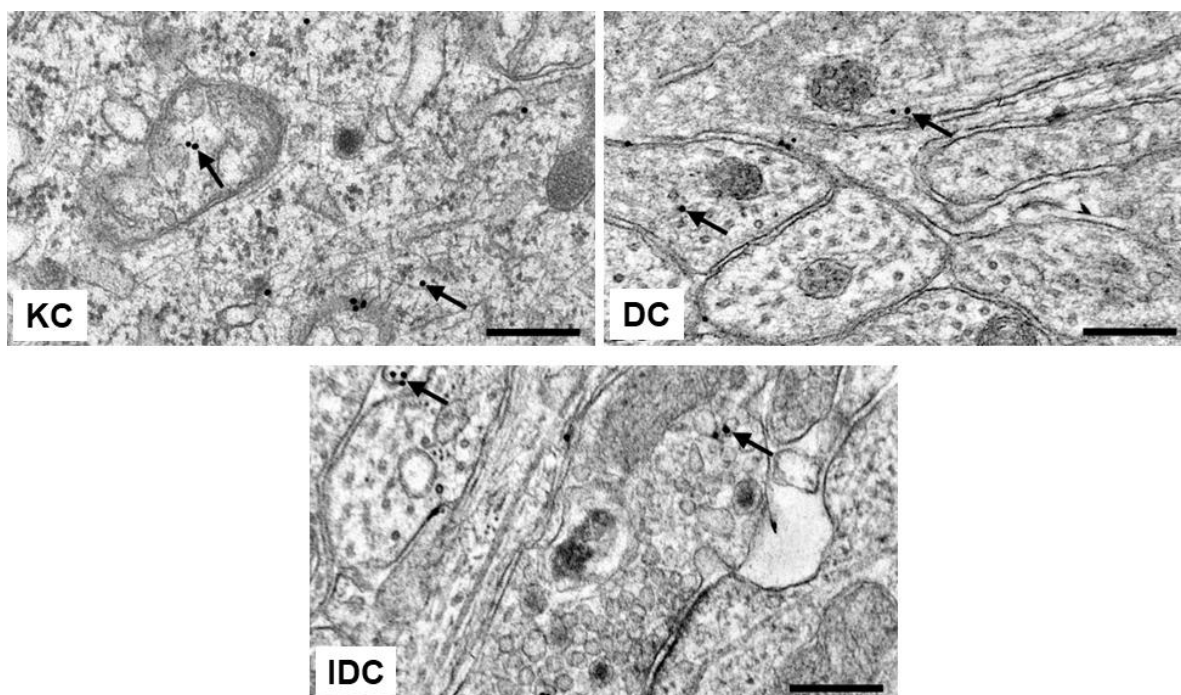


18. ábra: Reprezentatív elektronmikroszkópos felvétel kontroll állatok különböző bélszakaszaiból származó myentericus ganglionokról, illetve a hasnyálmirigy exokrin és endokrin részéről inzulin posztembedding immunhisztokémia után. A myentericus ganglionokban az inzulint jelölő aranszemcsék elsősorban vezikulákban vagy a plazmamembránhoz kötve helyezkedtek el, de megfigyeltünk aranszemcséket a citoplazmában is. A β -sejtekben a legtöbb szemcsét a szekréciós vezikulákban és azok környékén találtuk. Nyilak: 18 nm-es inzulint jelölő aranszemcsék. KD: kontroll duodenum, KI: kontroll ileum, KC: kontroll colon, ex: hasnyálmirigy exokrin része, en: hasnyálmirigy endokrin része. Lépték: 100 nm.

A kontroll állatok bélmintáiban az inzulint jelölő aranszemcsék denzitása minden bélszakaszban alacsony volt. A pancreas mintákkal összevetve, a bélben az aranszemcsék denzitása 6-8-szor kisebb volt mint a pancreas szigeteiben és 3-4-szer kevesebb mint az exokrin pancreasban (18-19. ábra).



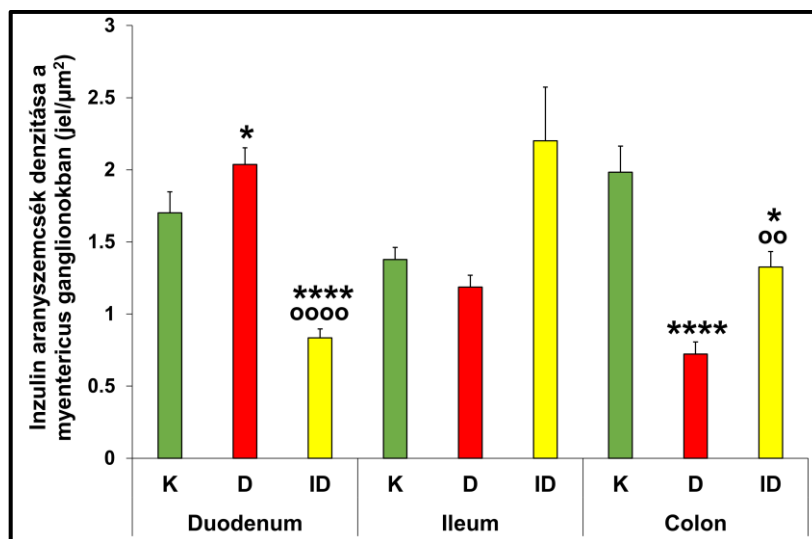
19. ábra: Insulint jelölő arany szemcsék denzitása a kontroll állatok különböző bélszakaszaiból származó myentericus ganglionokban és a pancreas endokrin illetve exokrin részén. Az insulint jelölő arany szemcsék a bélmintákban jóval alacsonyabb denzitást mutattak, mint a pancreasban. **** $p < 0,0001$ (a pancreas endokrin és exokrin része között). Az adatokat átlag $\pm$ SEM formában tüntettük fel.



20. ábra: Reprezentatív elektronmikroszkópos felvételek kontroll, diabéteszes és inzulinkezelt diabéteszes patkányok vastagbéléből származó myentericus ganglionokról inzulin posztembedding immunhisztokémia után. Nyilak: 18 nm-es insulint jelölő arany szemcsék. KC: kontroll colon, DC: diabéteszes colon, IDC: inzulinkezelt diabéteszes colon. Lépték: 100 nm.

Krónikus hiperglikémia hatására az insulint jelölő arany szemcsék denzitása szignifikánsan megnőtt a duodenumban ($2,03 \pm 0,11$ jel/μm² vs. $1,70 \pm 0,14$ jel/μm², $p < 0,05$), míg a colonban

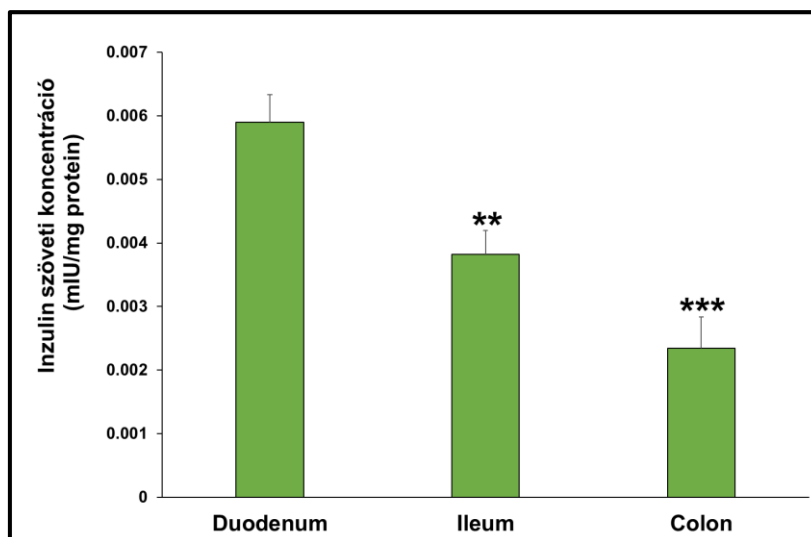
szignifikáns csökkenést figyeltünk meg ($0,72 \pm 0,08 \text{ jel}/\mu\text{m}^2$ vs. $1,98 \pm 0,18 \text{ jel}/\mu\text{m}^2$, $p < 0,0001$) a kontrollhoz viszonyítva. Az azonnali inzulinkezelés részben volt protektív a colonban, ezzel szemben az inzulint jelölő arany szemcsék denzitása a duodenumban a kontroll érték alá csökkent ($0,83 \pm 0,06 \text{ jel}/\mu\text{m}^2$ vs. $1,70 \pm 0,14 \text{ jel}/\mu\text{m}^2$, $p < 0,0001$; 20-21. ábrák).



21. ábra: Inzulint jelölő arany szemcsék denzitása kontroll (K), diabéteszes (D) és inzulinkezelt diabéteszes (ID) állatok különböző bélszakaszaiból származó myentericus ganglionokban. A diabéteszes állatokban az inzulint jelölő arany szemcsék denzitása a duodenumban növekedett, míg a colonban jelentősen lecsökkent a kontrollhoz viszonyítva. * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$ (a kontrollhoz viszonyítva); oo $p < 0,01$; oooo $p < 0,0001$ (D és ID között). Az adatokat átlag $\pm$ SEM formában tüntettük fel.

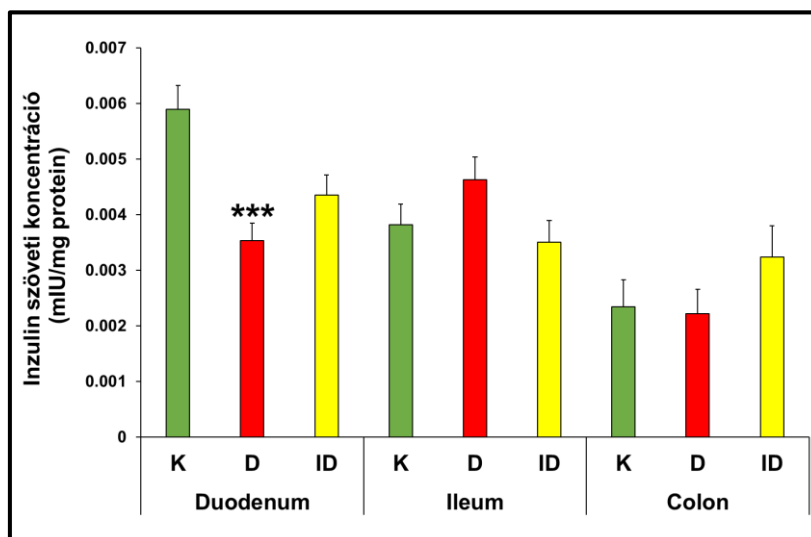
IV.2.5. Az inzulin fehérje koncentrációja krónikus diabéteszes patkányok különböző bélszakaszaiban

Az inzulin szöveti koncentrációját a bél simaizomzatát és myentericus plexusát tartalmazó szöveti homogenizátumokban határoztuk meg. Kontroll állatok esetében az inzulin szöveti koncentrációja a pancreashoz legközelebbi bélszakaszban, a duodenumban volt a legmagasabb. A kontroll állatok ileumában mintegy 30%-kal, a colonban pedig 60%-kal alacsonyabb volt a szöveti inzulinszint, mint a duodenumban (22. ábra).



22. ábra: Az inzulin fehérje szöveti koncentrációja a kontroll állatok különböző bélszakaszaiból készített szöveti homogenizátumokban. Az inzulin szöveti szintje a duodenumban volt a legmagasabb, míg disztális irányba csökkenő tendenciát mutatott. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (a duodenumhoz viszonyítva). Az adatokat átlag $\pm$ SEM formában tüntettük fel.

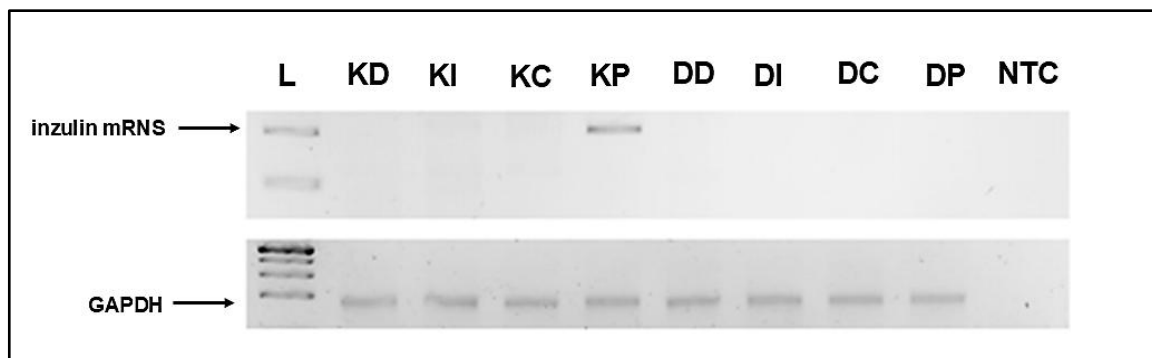
A krónikus hiperglikémia hatására az inzulin szöveti koncentrációja csak a duodenumban változott, ahol szignifikánsan lecsökkent a kontrollhoz képest ($0,0035 \pm 0,0003$ mIU/mg protein vs. $0,0059 \pm 0,0004$ mIU/mg protein, $p < 0,001$; 23. ábra). Az azonnali inzulinkezelés nem tudta teljes mértékben kivédeni a diabéteszes változást.



23. ábra: Az inzulin fehérje szöveti koncentrációja a kontroll (K), diabéteszes (D) és inzulinkezelt diabéteszes (ID) patkányok különböző bélszakaszaiból készített szöveti homogenizátumokban. Az inzulin koncentrációja hiperglikémia hatására szignifikánsan lecsökkent a duodenumban a kontrollhoz képest, ezt az inzulinkezelés részben védte ki. *** $p < 0,001$ (kontrollhoz viszonyítva). Az adatokat átlag $\pm$ SEM formában tüntettük fel.

IV.2.6. Az inzulin mRNA expressziójának vizsgálata a bélszöveti és hasnyálmirigy homogenizátumokban krónikus diabéteszes állatmodellben

Az inzulin mRNA jelenlétét PCR reakció segítségével tanulmányoztuk a duodenum, ileum, colon és pancreas mintákban. Mintegy pozitív kontrollként, inzulin mRNA expressziót mutattunk ki egészséges állatok hasnyálmirigyében. Inzulin mRNA-t egyik vizsgált bélszakaszban sem találtunk, sem egészséges, sem diabéteszes állatok mintáiban, ahogyan a diabéteszes pancreasban sem (24. ábra).

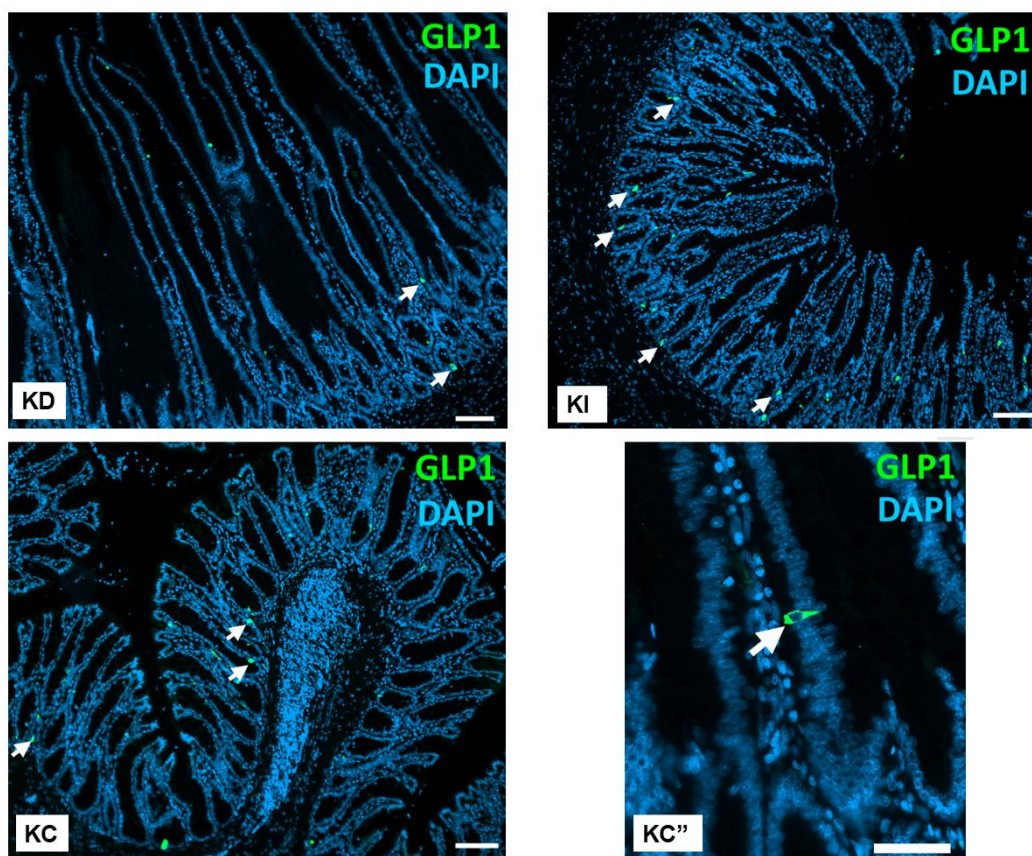


24. ábra: Inzulin és gliceraldehyd-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) mRNA expresszió bélből és hasnyálmirigyből származó szöveti homogenizátumokban, kontroll és diabéteszes patkányokból vett mintákban. Inzulin mRNA-t csak a kontroll pancreas mintában detektáltunk, melynek nagysága 206 bp volt. A kontrollként használt GAPDH minden szöveti mintában megtalálható volt. L: DNS létra, KD: kontroll duodenum, KI: kontroll ileum, KC: kontroll colon, KP: kontroll pancreas, DD: diabéteszes duodenum, DI: diabéteszes ileum, DC: diabéteszes colon, DP: diabéteszes pancreas, NTC: minta kontrollja (non-template control).

IV.3. A glükagonszerű peptid-1 és a glükagonszerű peptid-1 receptor vizsgálata

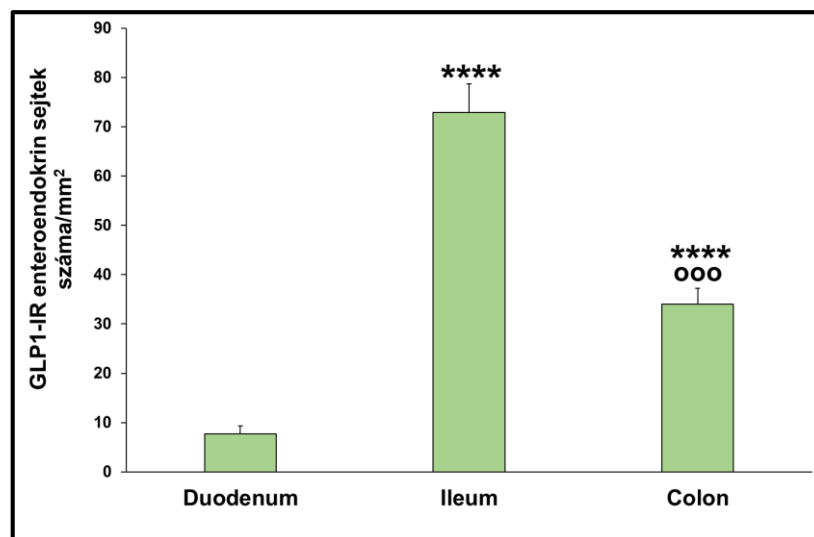
IV.3.1. A glükagonszerű peptid-1-immunreaktív enteroendokrin sejtek vizsgálata akut és krónikus hiperglikémiás patkánymodellben

Az enteroendokrin sejtek GLP1 expressziójának tanulmányozásához duodenum, ileum és colon területéről származó paraffinos metszeteken fluoreszcens immunhisztokémiát végeztünk (25. ábra). A sejtmagok jelölésére DAPI-t használtunk. A GLP1-IR sejtek számát a bél nyálkahártyájának egységnyi területére vonatkoztattuk (sejt/mm²).



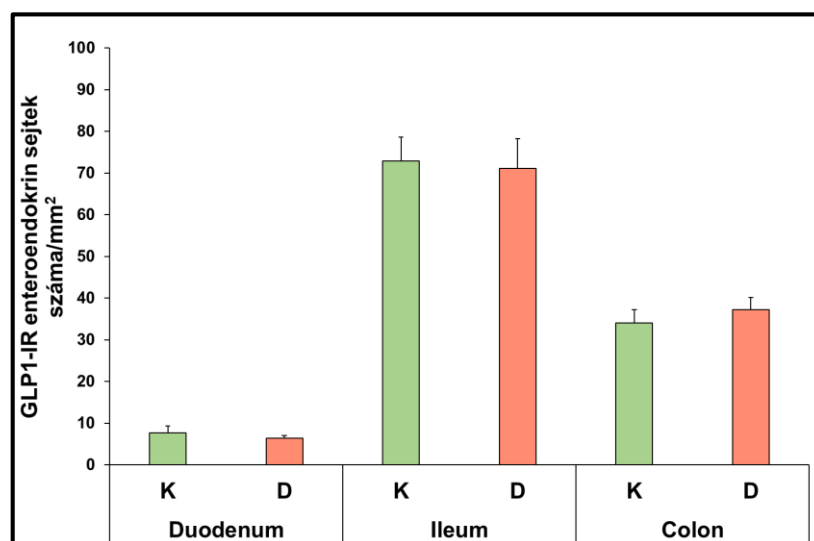
25. ábra: Reprezentatív fluoreszcens mikroszkópos felvételek kontroll állatok duodenum (KD), ileum (KI) és colon (KC, KC'') bélszakaszaiból készült paraffinos metszetekről GLP1 immunhisztokémiai festés után. A sejtmagok jelölésére DAPI-t használtunk. Nyilak: GLP1-immunreaktív enteroendokrin sejtek. Lépték: 100 μ m, inzert: 50 μ m.

Az akut állatkísérletünkben a GLP1-IR sejtek denzitása az ileumban volt a legmagasabb ($72,90 \pm 5,74$ sejt/mm²), mely több mint kétszerese volt a colonban levő GLP1-IR sejteknek ($34,05 \pm 3,21$ sejt/mm²) és tízszerese a duodenumban levő sejtek denzitásának ($7,70 \pm 1,65$ sejt/mm²; 26. ábra).



26. ábra: GLP1-immunreaktív (IR) enteroendokrin sejtek denzitása kontroll állatok különböző bélszakaszaiból származó paraffinos metszeteken. A GLP1-IR sejtek száma az ileumban volt a legmagasabb. **** $p < 0,0001$ (a duodenumhoz viszonyítva), *** $p < 0,001$ (az ileumhoz viszonyítva). Az adatokat átlag $\pm$ SEM formában tüntettük fel.

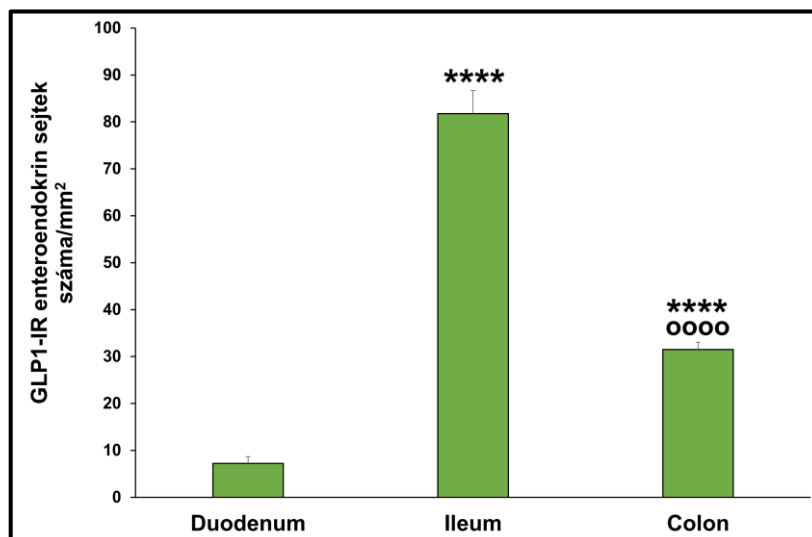
Akut hiperglikémia hatására, a GLP1-IR enteroendokrin sejtek denzitása egyik vizsgált bélszakaszban sem változott szignifikánsan a kontrollhoz viszonyítva (27. ábra).



27. ábra: GLP1-immunreaktív (IR) enteroendokrin sejtek denzitása kontroll (K) és hiperglikémiás (D) állatok különböző bélszakaszaiból származó nyálkahártya területén. Akut hiperglikémia hatására nem történt változás a GLP1-IR enteroendokrin sejtek számában a vizsgált bélszakaszokban. Az adatokat átlag $\pm$ SEM formában tüntettük fel.

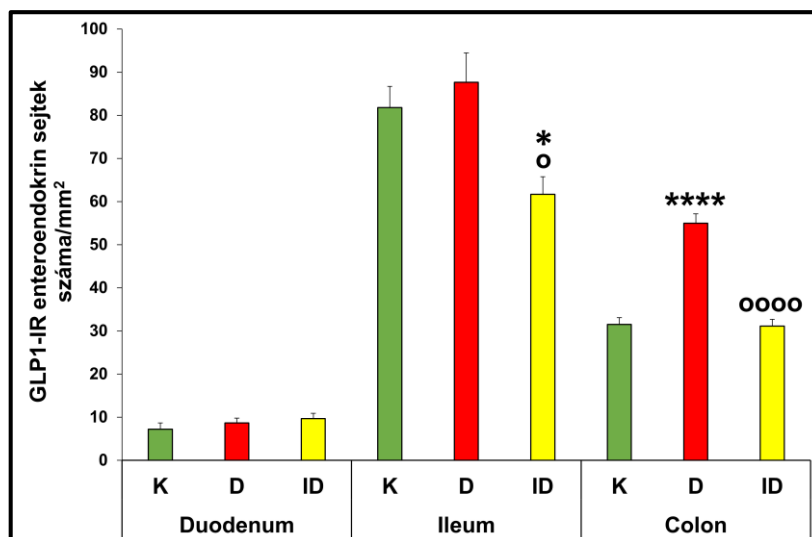
Krónikus állatkísérletünk során is azt figyeltük meg, hogy a GLP1-IR sejtek denzitása az ileumban volt a legmagasabb ($81,78 \pm 4,89$ sejt/mm²). Ez a denzitás, az akut állatkísérlet

eredményéhez hasonlóan, több mint tízszerese a duodenumban levő sejtek számának ($7,21 \pm 1,48$ sejt/mm²) és több mint kétszerese a colonban levő sejtek számának ($31,52 \pm 1,53$; 28. ábra).



28. ábra: GLP1-immunreaktív (IR) enteroendokrin sejtek száma kontroll állatok különböző bélszakaszaiból származó nyálkahártya területén. A GLP1-IR sejtek száma az ileumban volt a legmagasabb. **** $p < 0,0001$ (a duodenumhoz viszonyítva), ^{OOOO} $p < 0,0001$ (az ileumhoz viszonyítva). Az adatokat átlag $\pm$ SEM formában tüntettük fel.

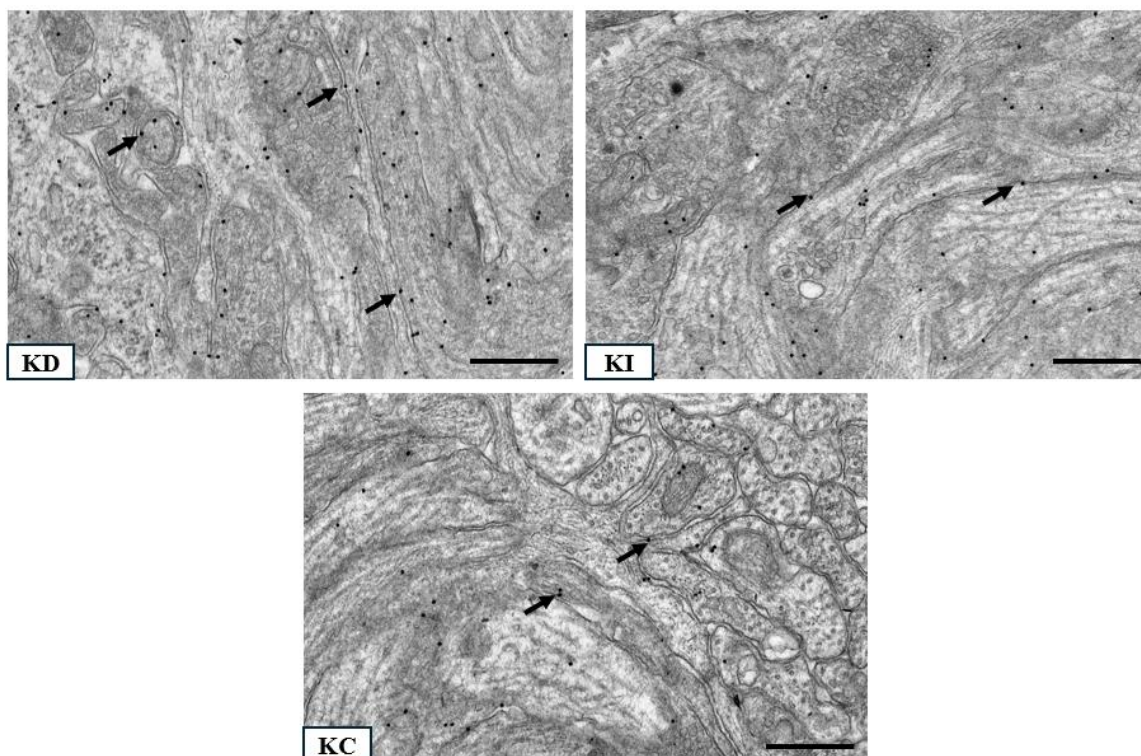
Krónikus hiperglikémia hatására a GLP1-IR sejtek denzitása a vastagbélben szignifikánsan megnövekedett ($54,97 \pm 2,19$ vs. $31,52 \pm 1,54$ sejt/mm², $p < 0,0001$), míg a duodenumban és az ileumban nem történt változás. Az azonnali inzulinkezelés teljesen kivédte a diabéteszes változásokat a colonban, emellett jelentősen csökkentette a GLP1-IR sejtek denzitását az ileumban (29. ábra).



29. ábra: GLP1-immunreaktív (IR) enteroendokrin sejtek denzitása kontroll (K), diabéteszes (D) és inzulinkezelt diabéteszes (ID) állatok különböző bélszakaszaiból származó nyálkahártya területén. Krónikus hiperglikémia hatására csak a colonban nőtt meg szignifikánsan a sejtek denzitása, a duodenumban és az ileumban nem tapasztaltunk változást a kontrollhoz viszonyítva. * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$ (a kontrollhoz viszonyítva), ° $p < 0,05$; °°°° $p < 0,0001$ (D és ID között). Az adatokat átlag $\pm$ SEM formában tüntettük fel.

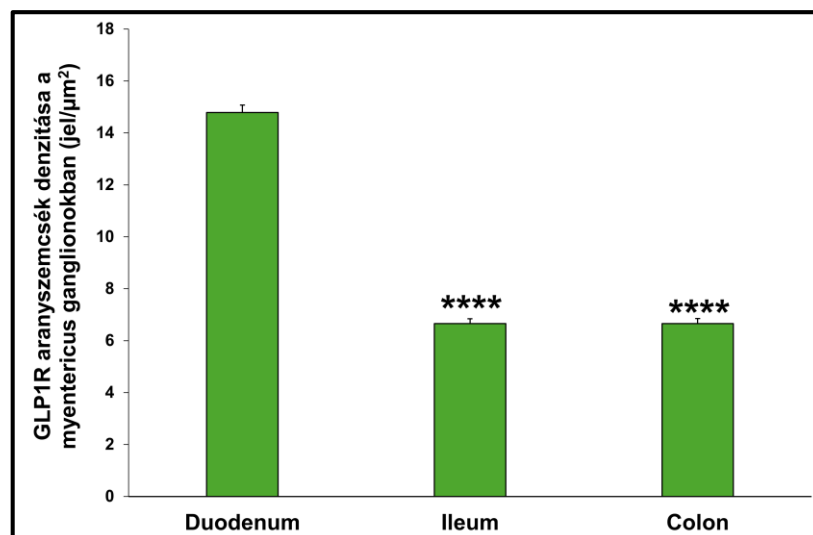
IV.3.2. A glükagonszerű peptid-1 receptor szubcelluláris lokalizációjának és eloszlásának vizsgálata krónikus diabéteszes patkányok különböző bélszakaszaiban

A GLP1R szubcelluláris lokalizációját ultravékony metszeteken transzmissziós elektronmikroszkóppal vizsgáltuk. A GLP1R-t jelölő 18 nm-es arany szemcsék többsége a myentericus ganglionok plazmamembránjához kötődve helyezkedett el (30. ábra).



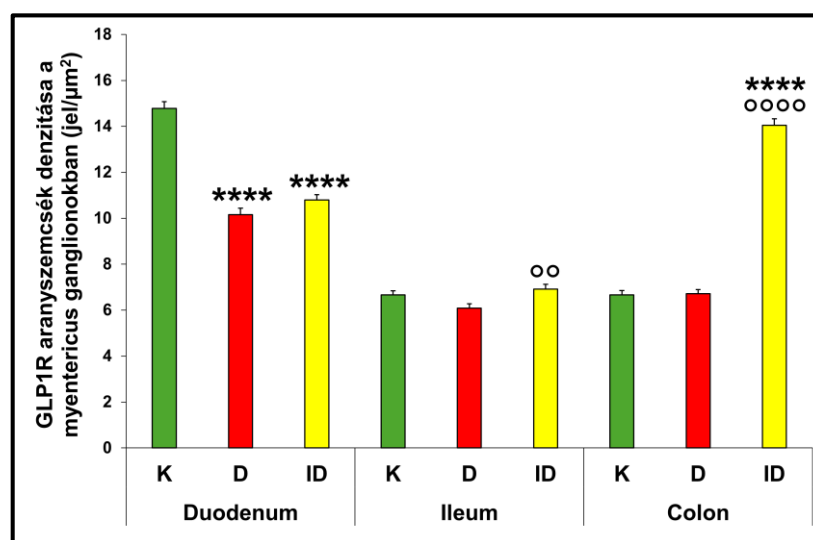
30. ábra: Reprezentatív elektronmikroszkópos felvételek kontroll állatok különböző bélszakaszaiból származó myentericus ganglionokról GLP1R posztembedding immunhisztokémia után. Nyilak: 18 nm-es GLP1R-t jelölő arany szemcsék. KD: kontroll duodenum, KI: kontroll ileum, KC: kontroll colon. Lépték: 100 nm.

A GLP1R-t jelölő arany szemcsék denzitása a myentericus ganglionokban a kontroll állatok duodenumában volt a legmagasabb ($14,78 \pm 0,29$ jel/ μm^2), míg az ileumban és a colonban ez az érték csak feleakkora volt (ileum: $6,65 \pm 0,18$ jel/ μm^2 ; colon: $6,66 \pm 0,19$ jel/ μm^2 ; $p < 0,0001$; 31. ábra).



31. ábra: GLP1R-t jelölő aranysemcsék denzitása kontroll állatok különböző bélszakaszaiból származó myentericus ganglionokban. A GLP1R-t jelölő aranysemcsék denzitása a duodenumban kétszer magasabb volt mint a többi vizsgált bélszakaszban. **** $p < 0,0001$ (a duodenumhoz viszonyítva). Az adatokat átlag $\pm$ SEM formában tüntettük fel.

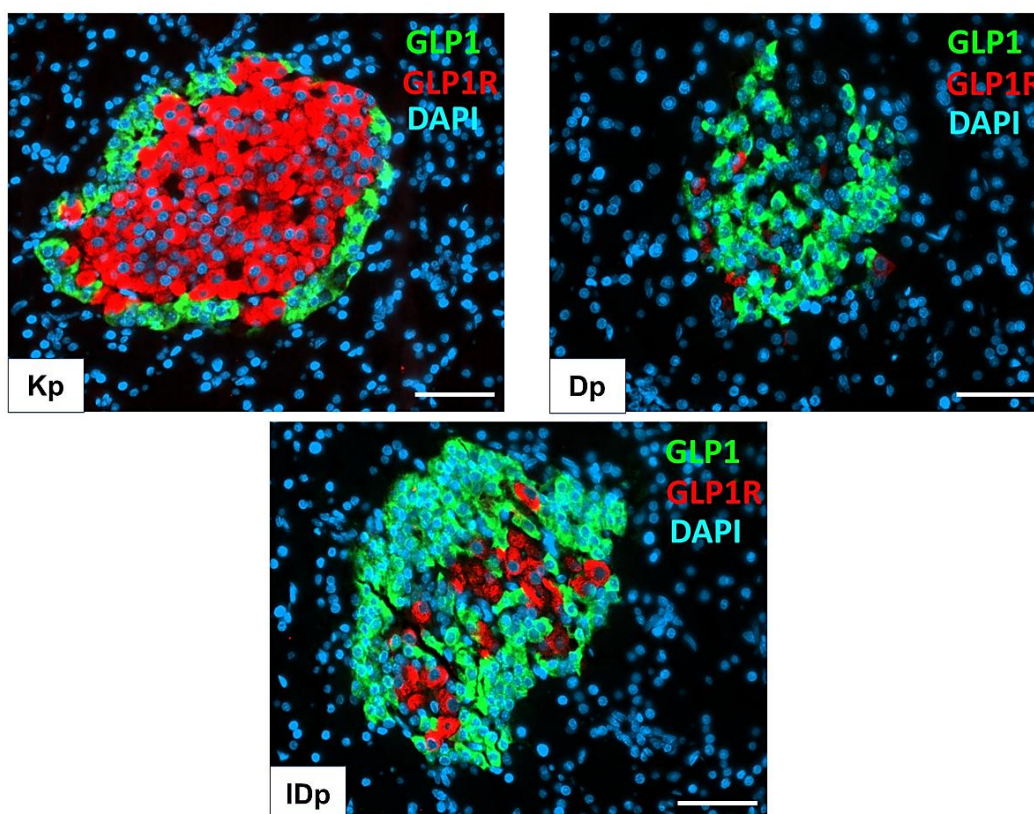
A diabéteszes állatokban a GLP1R-t jelölő aranysemcsék denzitása a duodenumban szignifikánsan lecsökkent ($10,15 \pm 0,29$ jel/μm² vs. $14,78 \pm 0,29$ jel/μm², $p < 0,0001$), míg a többi bélszakaszban változatlan maradt. Az azonnali inzulinkezelés a GLP1R denzitásának változását nem tudta kivédeni a duodenumban és szignifikánsan megemelte azt a colonban ($14,05 \pm 0,27$ jel/μm² vs. $6,71 \pm 0,17$ jel/μm², $p < 0,0001$; 32. ábra).



32. ábra: GLP1R-t jelölő aranysemcsék denzitása kontroll (K), diabéteszes (D) és inzulinkezelt diabéteszes (ID) állatok különböző bélszakaszaiból származó myentericus ganglionokban. A diabéteszes állatokban a GLP1R-t jelölő aranysemcsék denzitása a duodenumban szignifikánsan lecsökkent a kontrollhoz viszonyítva, melyet az azonnali inzulinkezelés nem védett ki. **** $p < 0,0001$ (a kontrollhoz viszonyítva); °° $p < 0,01$; °°°° $p < 0,0001$ (D és ID csoportok között). Az adatokat átlag $\pm$ SEM formában tüntettük fel.

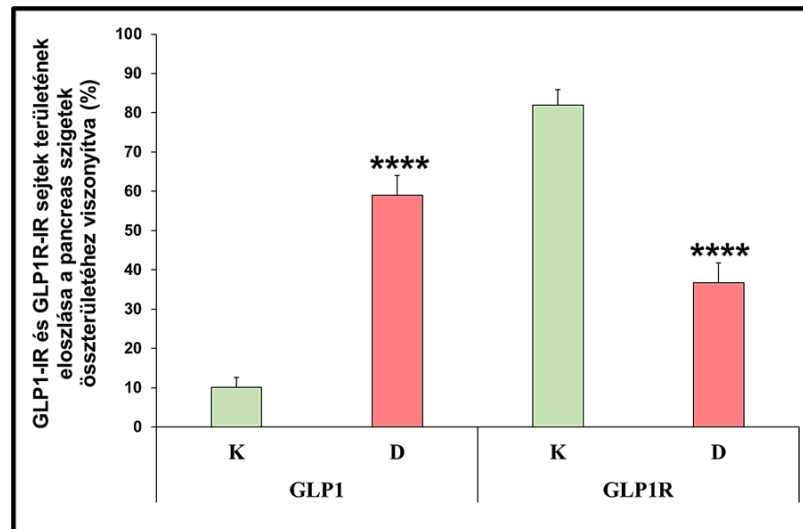
IV.3.3. A glükagonszerű peptid-1 és a glükagonszerű peptid-1 receptor eloszlásának vizsgálata a pancreasban fluoreszcens immunhisztokémiával

A GLP1 és a GLP1R expresszióját a pancreas szigetsejtekben paraffinos metszeteken is tanulmányoztuk. A vizsgálatok során kettős jelölésű fluoreszcens immunhisztokémiát végeztünk (33. ábra).



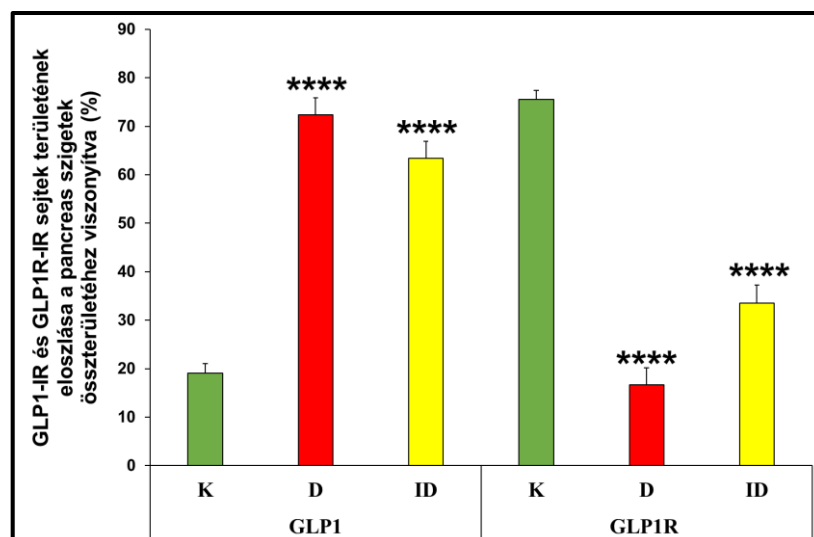
33. ábra: Reprezentatív fluoreszcens mikroszkópos felvételek pancreas paraffinos metszetekről glükagonszerű peptid-1 (GLP1) és glükagonszerű peptid-1 receptor (GLP1R) immunhisztokémiai festés után kontroll (Kp), diabéteszes (Dp) és inzulinkezelt diabéteszes (IDp) állatok hasnyálmirigyéből. Zöld szín jelöli a GLP1-immunreaktív sejteket, piros szín a GLP1R-immunreaktív sejteket és kék szín a DAPI-val jelölt sejtmagokat. Lépték: 50 μ m.

A GLP1-IR és a GLP1R-IR sejtek területeit az akut és a krónikus kísérleti modellünkben is meghatároztuk. Az akut állatkísérlet során a GLP1R-IR sejtek kontroll állatok esetében nagyobb területet foglaltak el, mint a GLP1-IR sejtek a szigetek összterületéhez viszonyítva (GLP1R: $81,95 \pm 3,88\%$ vs. GLP1: $10,11 \pm 2,51\%$). A diabéteszes mintákban ez az arány megfordult: a GLP1-IR sejtek területe lett nagyobb (GLP1: $59,05 \pm 4,99\%$ vs. GLP1R: $36,71 \pm 5,05\%$). Akut hiperglikémia hatására a GLP1R-IR sejtek területe szignifikánsan lecsökken ($36,71 \pm 5,05\%$ vs. $81,95 \pm 3,88\%$, $p < 0,0001$), míg a GLP1-IR sejtek területe szignifikánsan megnőtt ($59,05 \pm 4,99\%$ vs. $10,11 \pm 2,51\%$, $p < 0,0001$; 34. ábra).



34. ábra: GLP1-IR és GLP1R-IR sejtek területének eloszlása a pancreas szigetek összterületéhez viszonyítva. Kontroll állatok esetében a GLP1R-IR sejtek nagyobb területet foglaltak el, mint a GLP1-IR sejtek a szigetek összterületéhez viszonyítva, diabéteszes mintákban ez az arány megfordult **** $p < 0,0001$ (a kontrollhoz viszonyítva). Az adatokat átlag $\pm$ SEM formában tüntettük fel.

A krónikus állatkísérlet során azt tapasztaltunk, hogy a GLP1R-IR sejtek területe nagyobb volt, mint a GLP1-IR sejtek által elfoglalt terület. Krónikus hiperglikémia hatására a GLP1R-IR sejtek területe szignifikánsan lecsökkent ($16,63 \pm 3,53\%$ vs. $75,52 \pm 1,86\%$), míg a GLP1-IR sejteké szignifikáns növekedést mutatott a kontroll csoporthoz viszonyítva ($72,42 \pm 3,46$ vs. $19,05 \pm 2,03$). Az azonnali inzulinkezelés megemelte a GLP1-IR sejtek arányát a kontrollhoz viszonyítva ($63,35 \pm 3,60\%$ vs. $19,05 \pm 2,03\%$, $p < 0,0001$; 35. ábra).



35. ábra: GLP1-IR és GLP1R-IR sejtek területének eloszlása a pancreas szigetek összterületéhez viszonyítva. Krónikus hiperglikémia hatására a GLP1R-IR sejtek területe szignifikánsan lecsökkent, míg a GLP1-IR sejteké szignifikáns növekedést mutatott a kontroll csoporthoz viszonyítva **** $p < 0,0001$ (a kontrollhoz viszonyítva). Az adatokat átlag $\pm$ SEM formában tüntettük fel.

V. Eredmények megbeszélése

Állatkísérletek esetében az 1-es típusú diabétesz indukciójára több módszer is létezik, ezek között ismert a kémiai, genetikai és a spontán mutációval kialakítható modell. A kémiai ágensek közül a STZ és az alloxán a legelterjedtebbek és mindkettő a hasnyálmirigy β -sejteire van toxikus hatással. Ezek a Glut 2 transzmembrán proteinen keresztül jutnak be és néhány nap alatt hiperglikémiás állapotot eredményeznek az adott szervezetben (Athmuri és Shiekh, 2023). A STZ injektálására több módszer létezik és az adagolási ajánlások is eltéréseket mutathatnak (Deeds és mtsai., 2011; Graham és mtsai., 2011). Kísérleteinket a korábban is sikeresen alkalmazott STZ-nal kiváltott 1-es típusú diabéteszes patkánymodellen végeztük, mely az egyik legelterjedtebb és leginkább preferált modell a diabéteszes kutatásokban (Ghasemi és Jeddi, 2023).

Korábban kutatócsoportunk kimutatta, hogy a STZ által kiváltott 1-es típusú diabétesz során az enterális neuronok sérülése területenként eltérő mintázatot mutat (Izbéki és mtsai., 2008). Az elmúlt körülbelül tizenöt évben munkacsoportunk azt vizsgálta, milyen tényezők magyarázhatják ezeket a régió-specifikus eltéréseket. A kutatás során megvizsgálták a bél luminális és nyálkahártyához kötött mikrobiális közösségének összetételét (Wirth és mtsai., 2021), a mesenterialis kapillárisok sérülését (Bódi és mtsai., 2012; 2021), az antioxidáns védelmi vonal sérülését (Jancsó és mtsai., 2015; Chandrakumar és mtsai., 2017) és bizonyos gyulladások keltő fehérjék (pl. tumor nekrosis faktor alfa, IL1 β , NF κ B) expressziójának változásait is (Bódi és mtsai., 2021; AL Doghmi és mtsai., 2023; Barta és mtsai., 2024) a bélcsatorna tengelye mentén.

Korábban már kimutatták az inzulin expresszióját az enteroendokrin sejtekben (Egozi és mtsai., 2021) illetve a központi idegrendszerben is (Dakic és mtsai., 2023), azonban az enterális neuronokban még egyáltalán nem vizsgálták az inzulin jelenlétét, annak ellenére, hogy a vékonybél és a pancreas között szoros együttműködés valósul meg. Továbbá az inzulin szerepe az idegszövetben jelentős lehet neuroplaszticitás szempontjából is, ezért figyelmünk az inzulin jelenlétének kimutatása felé fordult a továbbiakban.

Tudomásunk szerint az inzulin jelenlétét az enterális neuronokban először mutattuk ki. Eredményeink alapján a myentericus neuronok egy része tartalmaz inzulint és ez bélszakasz-specifikus változatosságot mutat. A fluoreszcens immunhisztokémiai vizsgálataink alapján a myentericus neuronok 8-9%-a volt inzulin-IR a disztális bélszakaszokban, míg ez az arány a vékonybél proximális részén ennek kevesebb mint a fele volt. Ennek magyarázata további vizsgálatokat igényel, de egyik oka lehet a disztális bélszakaszokban nagyobb eséllyel kialakuló oxidatív stressz lehetősége (Circu és Aw, 2011). A magasabb inzulintartalomnak ezekben a

régiókban esetlegesen protektív szerepe lehet. Hasonlóan régió-specifikus különbségeket mutattak ki az agyban is, ahol a hipotalamuszban és a szaglógumóban magasabb inzulinkoncentrációt mértek, mint az agy egyéb területein (Baskin és mtsai., 1983).

Az inzulin-IR neuronok arányát a patkányok hiperglikémiás állapota jelentősen befolyásolta, illetve a hiperglikémia időtartama is meghatározó volt. Az akut hiperglikémiás modellünkben az inzulin-IR neuronok aránya szignifikánsan megemelkedett a patkányok ileumában és colonjában, viszont hosszabb hiperglikémiás állapot esetén az inzulin-IR neuronok aránya az ileumban nem változott, míg a colonban szignifikánsan lecsökkent a diabéteszes állatokban. Érdekes módon, a duodenumban megfigyelt legalacsonyabb inzulin-IR neuron arány mind az akut, mind a krónikus diabéteszes modelljeinkben változatlan maradt. Ezek a megfigyelések megerősítik a korábbi tapasztalatainkat, miszerint a bél disztális szakaszai sérülékenyebbek diabétesz során, mint a proximális részek (Bagyánszki és Bódi, 2023; Belai és mtsai., 1996; Shotton és Lincoln, 2006).

Továbbá megfigyeltük, hogy a duodenumból készült szöveti homogenizátumokban volt a legmagasabb az inzulinszint, ami hozzájárulhat hiperglikémiás állapotban a duodenumban egy kedvezőbb környezet kialakulásához a többi bélszakaszhoz képest. A szövetminták a myentericus ganglionok mellett a legnagyobb részben a bélfal simaizomzatát tartalmazták. A bélfal simaizomzata jól vaszkularizált, így figyelembe véve a pancreas közelségét is, a mért szöveti inzulin koncentráció vaszkuláris eredetű is lehet. Az inzulin felvételének fontos szerepe lehet egyrészt a bél simaizomzatának relaxációjában, másrészt serkenti a glükóz transzportot a NO/ciklikus guanozin monofoszfát útvonalon keresztül (Altan és mtsai., 1989; Bergandi és mtsai., 2003).

Másrészt, a disztális bélszakaszokban megfigyelhető időfüggő változások arra utalhatnak, hogy a hiperglikémia akut fázisában gyors védekező mechanizmusok aktiválódhatnak, melynek során egy kompenzációs mechanizmusnak köszönhetően az inzulin-IR myentericus neuronok száma gyorsan megnövekedett. Abidov és mtsai. (2023) az 1-es és 2-es típusú diabéteszes patkányokból származó májmintákban az inzulin-pozitív sejtek emelkedett számát szintén a cukorbetegség kompenzációjának tulajdonították. Ezek az inzulin-pozitív sejtek a diabéteszes gyulladások csökkentésében lehetnek alkalmas terápiás célpontok (Abidov és mtsai., 2023).

Vizsgálataink során az inzulin mRNS expresszióját a bélben nem tudtuk kimutatni, ami arra utal, hogy az inzulin nem a bélben termelődik. Ezért az inzulin-IR neuronok számának növekedése a környezetből történő inzulinfelvétel eredménye lehet. Ugyanakkor, korábban humán mintákban kimutattak inzulin mRNS-t standard PCR segítségével a gyomorban és a duodenumban, nested (fészkes) PCR-rel a jejunum, ileum és coecum mintákban is, viszont a

vastagbélben és az agyban nem találtak inzulin mRNS expressziót (Bell és mtsai., 2014). Továbbá patkányok duodenumának nyálkahártyájában, a duodenumot és a pancreast összekötő régióban, a hasnyálmirigyhez hasonló szigeteket is azonosítottak és igazolták a pancreas szigetsejtek jelenlétét is bennük (Bendayan és mtsai., 1991). Mindemellett a bélben az enteroendokrin sejtek is szintetizálhatnak inzulint a szacharóz stimuláció eredményeként, amely jelátviteli molekulaként szolgálhat az enterális neuronok számára (Snyder és mtsai., 2025). Más kutatások az inzulin lokális szintézisét az agykéreg neurogliaform interneuronjaiban (Molnár és mtsai., 2014), illetve diabéteszes retina mintákban mutatták ki (Jones és mtsai., 2022). Érdekes módon Kojima és mtsai. (2004) inzulin mRNS-t detektáltak májban különböző diabéteszes egér- és patkánymodellekben, viszont egészséges állatok májában nem volt inzulin mRNS expresszió.

Az inzulin a receptorához kötődve anyagserejelátviteli kaszkádokat indít el és endocitózissal jut be a sejtbe, ami az inzulin felvételében és kiürülésében is fontos (Hall és mtsai., 2020). Az inzulin az agy különböző régióiban vagy a mikroerekben klatrin- vagy caveola-mediált receptor endocitózissal transzportálódik (Jaldin és mtsai., 2018; Pemberton és mtsai., 2022). Munkánk során mi is megfigyeltük, hogy az inzulint jelölő aranszemcsék többsége vezikulákban helyezkedett el a myentericus neuronokban. Az inzulin receptorok széles körben expresszálódhatnak különböző sejtípusokban, például az endotélsejtekben, bélhámsejtekben és az agyban található idegsejtekben is, ahol a glükóz anyagcserében és az intracelluláris jelátvitelben vesznek részt (Andres és mtsai., 2013; Andres és mtsai., 2014; Gralle, 2017).

A krónikus állatkísérletünkben az elektronmikroszkópos vizsgálataink megerősítették a fluoreszcens immunhisztokémiai eredményeket, mely szerint az inzulin a kontroll mintákban a bél disztális régióiban nagyobb mennyiségben van jelen. Az inzulint jelölő aranszemcsék denzitása diabétesz hatására a duodenum myentericus ganglionjaiban szignifikánsan megnőtt, annak ellenére, hogy az inzulin-IR neuronok száma nem változott. Ezt a megfigyelést magyarázhatja a neuronok, vagy az enterális neuronokat támogató gliasejtek fokozott inzulinigénye (Spielman és mtsai., 2015). Természetesen kontroll állatok esetén a pancreasban az inzulint jelölő aranszemcsék denzitása jóval nagyobb volt, mint az enterális ganglionokban. Azonban eredményeink így átfogóbb képet nyújtanak a különböző bélszakaszokban levő inzulin mennyiségéről összehasonlítva azt a Langerhans-szigetek és a hasnyálmirigy exokrin régiójának inzulinmennyiségével. Irodalmi adatok szerint az exokrin részre is hatással vannak a szigetsejtek hormonjai (Sans és mtsai., 2020).

Az inzulin-IR nitrerg neuronok aránya akut hiperglikémia hatására a duodenumban változatlan maradt, az ileumban és a colonban viszont szignifikánsan megnőtt a kontrollhoz képest, míg a krónikus hiperglikémiás modell esetében ezen neuronpopuláció aránya változatlan

maradt minden bélszakaszban. Cellek és mtsai. (2003) kimutatták, hogy a nitrerg neuronok sérülésének mértéke eltérhet a betegség korai és későbbi szakaszaiban. Mivel a nitrerg neuronok sérülése az előrehaladott diabétesz egyik jellemzője (Izbéki és mtsai., 2008), ezért azt feltételezzük, hogy az inzulin segíthet megvédeni azokat a neuronokat, melyek inzulin- és nNOS-immunreaktivitást is mutatnak. Az inzulin a nitrerg entericus neuronokban akár módosíthatja is a NO szintézisét, ahogyan azt a hipotalamuszban található idegsejtekben is megfigyelték (Canabal és mtsai., 2007a). Hiperglikémia esetén az inzulinterápia az enterális neuronokban visszafordítja a nNOS kimerülését, javítva a NO szintézist és ezáltal helyreállítja a bélmozgást (Watkins és mtsai., 2000).

Az inzulinszekrécióban kiemelkedő szerepe van a GLP1-nek, mivel segíti a β -sejtek túlélését és regenerációját (Kaneto és mtsai., 2021; Wei és mtsai., 2023). Kísérleteink során a bélfal nyálkahártya régiójában tanulmányoztuk a GLP1-IR enteroendokrin sejtek eloszlását. Fluoreszcens immunhisztokémiai vizsgálataink során azt találtuk, hogy kontroll körülmények között az akut és a krónikus modell esetében is az ileumban volt a legtöbb GLP1-IR enteroendokrin sejt, a colonban ennek a mennyiségnek a felét, míg a duodenumban csak a tizedét találtuk. Korábban szintén az ileumban azonosították a legtöbb GLP1-IR enteroendokrin sejtet kontroll rágesálók bélrendszerében, míg egészséges humán mintákat vizsgálva, a colonban volt a legtöbb immunpozitív sejt (Eissele és mtsai., 1992). A GLP1-IR enteroendokrin sejtek denzitása akut hiperglikémia hatására nem változott egyik bélszakaszban sem, míg krónikus diabétesz hatására a colonban szignifikánsan megnőtt ezeknek a sejteknek a denzitása. Ezt a változást az azonnali inzulinkezelés sikeresen kivédte. Más tanulmányban is kimutatták, hogy a bél GLP1 tartalma jelentősen megnövekedhet diabétesz során, amelyet az L sejtek kompenzációs mechanizmusának tulajdonítottak (Jin, 2008). Crohn-betegek esetében a GLP1 expressziója megnőtt a colonban, viszont a betegek szérum szintjét mérve a GLP1 csökkenését tapasztalták az egészségesekéhez viszonyítva (Zatorski és mtsai., 2021). Irritábilis bél szindrómás betegek esetében a GLP1 szérum szintjének csökkenése mellett a GLP1R szintje is lecsökkent a colonban és a motilitást is gyorsította. A szérum GLP-1 szintjének csökkenése összefüggésbe hozható a hasi fájdalommal (Li és mtsai., 2017). A GLP1 szint emelkedése az enteroendokrin L sejtek különböző ingerekre adott válaszként jelentkezhethet, mint pl. zsírsavak, aminosavak és glükóz fogyasztásának hatására, a bélgyulladás vagy a bélfal károsodása esetén, valamint az ösztrogénszint fokozódása miatt (Lebrun és mtsai., 2017).

Az enterális neuronok a bélfal lamina propriájában végződő axonjukon keresztül kapcsolatba tudnak lépni a GLP1-et termelő enteroendokrin sejtek neuropodjával (Bohórquez és mtsai., 2015; Bellono és mtsai., 2017). A bélből evés után felszabaduló GLP1 aktiválja a

GLP1R-t. A GLP1 a vagális afferensekre is hat és szerepet játszik a táplálékfelvételben, illetve a glükóz homeosztázisában. A GLP1R spinális és vagális afferenseken történő aktiválása befolyásolja az agyba küldött jeleket, hozzájárulva a jóllakottság érzéséhez (Hankir és Lutz, 2024). Irodalmi adatok szerint a GLP1R expresszáldhat a myentericus neuronokban is (Grunddal és mtsai., 2022), ezért munkánk során tanulmányoztuk a GLP1R eloszlását a myentericus ganglionokban. A krónikus állatkísérletünk során a legtöbb GLP1R-t jelölő arany szemcsét a duodenum ganglionjaiban találtuk, ahol korábban a nyálkahártya régiót vizsgálva a legkevesebb GLP1-IR enteroendokrin sejtet figyeltük meg. Másik tanulmány is igazolta, hogy patkányok bélrendszerében a legtöbb GLP1-IR sejt a vékonybél proximális régiójában található, a duodenum és jejunum területén, s a pozitív sejtek száma fokozatosan csökken az ileum és colon felé haladva (Andersen és mtsai., 2020). A GLP1R expressziójának a duodenumban az a szerepe, hogy a tápanyagokat gyorsan eljuttassa a májhoz és a hasnyálmirigyhez, míg a vastagbélben található, GLP1-et termelő L sejtek szerepe a helyi parakrin hatások megvalósítása (Koehler és mtsai., 2015; Grau-Bové és mtsai., 2022). A GLP1R magas expressziójának és az endogén GLP1 alacsony szintjének magyarázata a duodenumban még nem teljesen tisztázott, de úgy gondolják, hogy a GLP1 peptidet a DPP-4 enzim gyorsan lebontja, így jelenléte többnyire lokalizált és rövid ideig tartó, ezért itt több GLP1R szükséges a GLP1 jelátviteli folyamatokhoz (Yang és mtsai., 2017).

A krónikus hiperglikémia hatására a GLP1R-t jelölő arany szemcsék száma csak a duodenumban változott, szignifikánsan lecsökkent, amelyet az azonnali inzulinkezelés csak részben állított helyre. Mások is beszámoltak arról, hogy diabétesz során a GLP1R expressziója csökken egyes sejtcsoportokban, mint a Langerhans-szigetek vagy a hipotalamusz, és ez az expressziós csökkenés hozzájárul a β -sejtek diszfunkciójához és a glükózsabályozás zavarához (Kulve és mtsai., 2015; Kubo és mtsai., 2016).

A hasnyálmirigy szigetsejtekben a GLP1 és GLP1R eloszlását vizsgálva azt találtuk, hogy kontroll körülmények között a GLP1-IR sejtek foglaltak el nagyobb területet a teljes sziget területéhez képest és megfigyelésünk alapján a pancreas β -sejtek régiójában helyezkedtek el. Egyes szakirodalmi adatok alapján a pancreas szigeteken a GLP1R expresszió kizárólag a β -sejtekre korlátozódik (Campos és mtsai., 1994; Bullock és mtsai., 1996), míg más kutatások szerint minden szigetsejt típusban jelen lehet, a duktális sejteket is beleértve (Kirk és mtsai., 2017; Molin és mtsai., 2015). Az ellentmondó eredmények valószínűleg az alkalmazott kísérleti módszerek közötti különbségekből adódhatnak. Akut és krónikus hiperglikémia hatására is a GLP1-IR sejtek területe megnőtt a Langerhans-szigetek összterületéhez viszonyítva. A hasnyálmirigy α -sejtjei GLP1-et expresszáldhatnak és ennek mértéke cukorbetegség során fokozott (Fava és mtsai., 2016;

Nakashima és mtsai., 2018). Mivel diabétesz során a pancreas szigetek területe csökken a β -sejtek pusztulásának köszönhetően, így az α -sejtek területével átfedő GLP1-IR sejtek területének aránya megnő. A GLP1 a β -sejtek növekedési és túlélési faktoraként működik, illetve diabétesz során még az α -sejtek inzulintermelő sejtekké történő transzdifferentiálódásukhoz is hozzájárulhat (O'Malley és mtsai., 2014; Holter és mtsai., 2022).

A diabéteszes emésztőrendszeri bántalmakat vizsgáló tanulmányok nagy része csak egy adott bélszakaszra összpontosít, ezzel szemben kísérleteink során a duodenum, az ileum és a colon szakaszokat is vizsgáltuk, hogy megismerjük a régióspecifikus eltéréseket. A legtöbb cukorbetegséggel foglalkozó tanulmány csak diabéteszes állatcsoportot vizsgál, míg állatmodellünkben a diabéteszes és kontroll állatok mellett inzulinkezelt diabéteszes állatcsoportot is vizsgáltunk, s ez humán diagnosztikai és terápiás szempontból kiemelkedő fontosságú. Kísérleteinkben az inzulinkezelés nem minden esetben volt protektív a diabéteszes változásokkal szemben. Mindez felhívja a figyelmet, hogy az inzulinkezelés nem tud kivédeni minden diabétesz-okozta elváltozást annak ellenére, hogy a vércukorszintet optimális szinten tartja.

VI. Összefoglalók

VI.1. Magyar nyelvű összefoglaló

Az enterális idegrendszert alkotó neuronok és gliasejtek ganglionokba tömörülve alkotják a myentericus és a submucosus plexust. Az enterális idegrendszer komplexitása révén képes akár a központi idegrendszertől függetlenül is működni, létrehozva saját enterális reflexíveket, melyek szabályozzák az emésztőrendszer működését: a gasztrointesztinális motilitást, a mirigyszekréciót és a bélfal véráramlását is.

Kutatócsoportunk korábbi megfigyelései szerint az 1-es típusú diabéteszes patkányok különböző bélszakaszaiból származó myentericus neuronok eltérő sérülékenységet mutatnak, melyben a bélperisztaltika leszálló gátló fáziséért felelős nitrerg neuronok különösen érintettek. A duodenum kivételével minden bélszakaszban jelentős myentericus összneuronszám csökkenést tapasztaltak, amelyet a nitrerg neuronok számának csökkenése is követett. Azt feltételezzük, hogy ennek hátterében a nitrerg neuronok neurokémiai karakterének változása állhat, hiszen a duodenumban nem történt neuronpusztulás, csupán a sejtek nitrerg jellege veszett el.

A hasnyálmirigy β -sejtjein kívül más sejtípusokban is expresszáldhat inzulin, többek között a központi idegrendszer neuronjaiban is. Az inzulin jelátvitelt a perifériás szövetekben sokkal szélesebb körben tanulmányozták mint az agyban, annak ellenére, hogy az agyban található inzulinnak meghatározó szerepe van a neuronok túlélésében. A glükagonszerű peptid-1 (GLP1) képes fokozni az inzulin szekrécióját glükóz-függő módon a β -sejteken található glükagonszerű peptid-1 receptor (GLP1R) aktiválásán keresztül. Ezen kívül a GLP1 segíti a β -sejtek növekedését és túlélését is.

Ezért doktori munkám során elsőként azt vizsgáltam, jelen van-e az inzulin a bélidegrendszerben, mutatnak-e a különböző bélszakaszokban levő enterális neuronok inzulin immunreaktivitást. Kíváncsiak voltunk arra is, hogy az inzulin-immunreaktivitás megfigyelhető-e a diabéteszben különösen sérülékeny nitrerg neuronpopulációban. Emellett az inkretin hatásáról ismert GLP1 és receptorának bélszakasz-specifikus változásait is vizsgáltuk. Kísérleteinket kontroll, diabéteszes és inzulinkezelt diabéteszes patkányokon végeztük, munkánk során az akut (1 hetes) és krónikus (10 hetes) hiperglikémia hatását is vizsgáltuk. Duodenumból, ileumból és colonból származó mintákból whole-mount preparátumokon és paraffinos metszeteken fluoreszcens immunhisztokémiai festéseket, szöveti homogenizátumok felhasználásával molekuláris vizsgálatokat (ELISA, RT-PCR) és ultravékony metszeteken posztembedding immunhisztokémiát végeztünk.

Vizsgálatainkban a myentericus neuronokat peripherin pán-neuronális markerrel azonosítottuk. Inzulin-immunreaktív (IR) myentericus neuronokat mutattunk ki, tudomásunk szerint elsőként. Eredményeink alapján a myentericus neuronok egy csoportja tartalmaz inzulint és ezek összneuronszámhoz viszonyított aránya bélszakasz-specifikus változatosságot mutat. A myentericus neuronok 8-9%-a volt inzulin-IR az ileum és colon bélszakaszokban, míg a duodenumban ez az arány kevesebb mint 4% volt. Akut hiperglikémia hatására az inzulin-IR neuronok aránya szignifikánsan megnőtt az ileumban és a colonban, míg a krónikus hiperglikémia hatására ez az arány szignifikánsan csökkent a colonban, míg a duodenumban nem változott. Az azonnali inzulinkezelés a colonban csak részben védte ki a diabéteszes változásokat.

A nitrerg neuronok azonosítására neuronális nitrogén-monoxid szintáz (nNOS) antitestet alkalmaztunk és inzulin-nNOS-periferin hármass jelöléses fluoreszcens immunhisztokémiai festéseket végeztünk. Az inzulin-nNOS-IR neuronok aránya az akut és krónikus állatkísérlet esetében is a vastagbélben volt a legmagasabb (9-12%). Akut hiperglikémia hatására az inzulin-nNOS-IR neuronok aránya az ileumban és a colonban is szignifikánsan megnőtt, míg a krónikus hiperglikémia hatására minden vizsgált bélszakaszban változatlan maradt.

Az inzulin szubcelluláris lokalizációját aranyjelöléses transzmissziós elektronmikroszkópos módszerrel vizsgáltuk a myentericus ganglionokban, valamint a pancreas exokrin és endokrin régióiban. Az inzulint jelölő aranyszemcsék többsége vezikulákban vagy plazmamembránhoz kötődve helyezkedett el a myentericus ganglionokban. A kontroll állatokban az inzulint jelölő aranyszemcsék denzitása minden vizsgált bélszakaszban alacsonyabb volt, mint a pancreas mintákban. A diabéteszes állatokban az inzulint jelölő aranyszemcsék denzitása a duodenumban megnőtt, az ileumban változatlan maradt, míg a colonban szignifikánsan lecsökkent a kontrollhoz viszonyítva. Az inzulinkezelés részben védte ki a diabéteszes változásokat a colonban, míg a duodenumban a kontroll érték alá csökkent.

Az inzulin szöveti koncentrációja a myentericus plexust és bél simaizmot tartalmazó homogenizátumokban csökkenő tendenciát mutatott a kontroll patkányok bélcsatorna tengelye mentén. A diabéteszes patkányokban az inzulin szöveti koncentrációja csak a duodenumban változott, ahol szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a kontroll csoporthoz képest. Inzulin mRNS expressziót nem detektáltunk sem a kontroll, sem pedig a diabéteszes állatokból származó duodenum, ileum és colon mintákban.

A GLP1-IR enteroendokrin sejteket a bél nyálkahártyájában, fluoreszcens immunhisztokémiával tanulmányoztuk paraffinos metszeteken. A legtöbb GLP1-IR enteroendokrin sejtet a kontroll állatok ileumában találtuk. Akut hiperglikémia hatására a GLP1-

IR enteroendokrin sejtek denzitása egyik vizsgált bélszakaszban sem változott, míg krónikus hiperglikémia hatására a colonban szignifikánsan megnőtt ezeknek a sejteknek a denzitása.

A GLP1R immunreaktivitást aranyjelölés posztembedding immunhisztokémiával vizsgáltuk a myentericus ganglionokban. A legtöbb GLP1R-t jelölő arany szemcsét a duodenum ganglionjaiban találtuk. Krónikus hiperglikémia hatására a GLP1R-t jelölő arany szemcsék denzitása szignifikánsan lecsökkent a duodenumban, a többi bélszakaszban nem tapasztaltunk változást.

A GLP1-IR és a GLP1R-IR sejteket a hasnyálmirigy szigeteiben is tanulmányoztuk. Kontroll állatok esetében a GLP1R-IR sejtek az akut és a krónikus állatkísérletben is nagyobb területet foglaltak el a szigetek összterületéhez képest, mint a GLP1-IR sejtek. Megfigyelésünk alapján a GLP1R-IR sejtek a pancreas β -sejtek régiójában helyezkedtek el. Akut és krónikus hiperglikémia hatására a GLP1-IR sejtek területe volt a nagyobb a szigetek teljes területéhez képest.

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy munkánk során először azonosítottunk inzulin-IR myentericus neuronokat, ezen kívül az inzulin jelenlétét a nitrerg szubpopulációban is kimutattuk. A hiperglikémia hatására az inzulin-IR és az inzulin-nNOS-IR neuronok aránya is bélszakasz- és idő-függő változásokat mutatott. Az inzulin mRNS hiánya a bélmintákban arra utal, hogy a myentericus neuronok nem maguk termelik, hanem a környezetükből vehetik fel az inzulint. Az inzulin génexpressziót és bioszintézisét elősegítő GLP1 és ennek receptora is hasonló változatosságot mutatott.

Tehát a munkánk során azonosított inzulin tartalmú myentericus neuronok jelenléte és ezek diabétesz során bekövetkező változásai, illetve a GLP1 expressziót mutató enteroendokrin sejtek és a GLP1R-IR enterikus neuronok régió-specifikus változásai hozzájárulhatnak a különböző bélszakaszokban levő myentericus ganglionokban található neuronok túléléséhez.

VI.2. Summary

The neurons and glial cells that make up the enteric nervous system are clustered into ganglia, forming the myenteric and submucosal plexuses. Due to the complexity, the enteric nervous system is capable of functioning independently of the central nervous system. Enteric neurons creating its own enteric reflexes regulate the functions of the digestive system: gastrointestinal motility, glandular secretion, and blood flow in the intestinal wall.

According to previous observations of our research group, myenteric neurons from different gut regions of rats in type 1 diabetes show varying degrees of vulnerability and the nitrergic neurons responsible for the descending inhibitory phase of intestinal peristalsis being particularly affected. With the exception of the duodenum, a significant decrease in the total number of myenteric neurons was observed in all intestinal segments, which was accompanied by a decrease in the number of nitrergic neurons. We assume that this may be due to a change in the neurochemical character of nitrergic neurons, as there was no neuronal loss in the duodenum, only the nitrergic nature of the cells was lost.

Insulin can be expressed in cell types other than pancreatic β -cells, including neurons in the central nervous system. Insulin signalling has been studied much more extensively in peripheral tissues than in the brain, despite the fact that insulin plays a crucial role in neuron survival in the brain. Glucagon-like peptide-1 (GLP1) can increase insulin secretion in a glucose-dependent manner by activating the glucagon-like peptide-1 receptor (GLP1R) found on β -cells. In addition, GLP1 also promotes the growth and survival of β -cells.

Therefore, in my doctoral work, I first examined whether insulin is present in the enteric nervous system and whether enteric neurons in different segments of the intestine show insulin immunoreactivity. We were also curious to see if insulin immunoreactivity could be observed in the nitrergic neuron population. In addition, we examined the intestinal segment-specific changes of GLP1, known for its incretin effect, and its receptor. For our experiments control, diabetic, and insulin-treated diabetic rats were used, and we also examined the effects of acute (1 week) and chronic (10 weeks) hyperglycemia in our work. We performed fluorescent immunohistochemical stainings on whole-mount preparations and paraffin sections taken from the duodenum, ileum, and colon, molecular analysis (ELISA, RT-PCR) using tissue homogenates, and post-embedding immunohistochemistry on ultrathin sections. In our studies, myenteric neurons were identified by using peripheral pan-neuronal markers.

We demonstrated insulin-immunoreactive (IR) myenteric neurons for the first time, to our knowledge. Based on our results, a group of myenteric neurons contains insulin, and their proportion relative to the total number of neurons shows intestinal segment-specific variation.

Eight to nine percent of myenteric neurons were insulin-IR in the ileum and colon, while in the duodenum this proportion was less than 4%. Acute hyperglycemia significantly increased the proportion of insulin-IR neurons in the ileum and colon, while chronic hyperglycemia significantly decreased this proportion in the colon, but did not change it in the duodenum. Immediate insulin treatment only partially protected against diabetic changes in the colon.

To identify nitroergic neurons, we used neuronal nitric oxide synthase (nNOS) antibody and performed triple labelling fluorescent immunohistochemical staining with insulin, nNOS, and peripherin. The proportion of insulin-nNOS-IR neurons was highest in the colon in both acute and chronic animal experiments (9-12%). Acute hyperglycemia significantly increased the proportion of insulin-nNOS-IR neurons in both the ileum and colon, while chronic hyperglycemia left it unchanged in all intestinal segments examined.

The subcellular localization of insulin was observed using gold labelling transmission electron microscopy in the myenteric ganglia, in the exocrine and endocrine regions of the pancreas. Most of the gold particles labelling insulin were located in vesicles or bound to the plasma membrane in the myenteric ganglia. In control animals, the density of gold particles labelling insulin was lower in all intestinal segments than in pancreatic samples. In diabetic animals, the density of insulin-labelling gold particles increased in the duodenum, remained unchanged in the ileum, and decreased significantly in the colon compared to the controls. Insulin treatment partially protected against diabetic changes in the colon, while it decreased below the control values in the duodenum.

The tissue concentration of insulin showed a decreasing trend in homogenates containing the myenteric plexus and intestinal smooth muscle along the intestinal axis of control rats. In diabetic rats, tissue insulin concentration changed only in the duodenum, where we observed a significant decrease in it compared to the control group. We did not detect insulin mRNA expression in duodenum, ileum, and colon samples from either control or diabetic animals.

GLP1-IR enteroendocrine cells were studied in the intestinal mucosa using fluorescent immunohistochemistry on paraffin sections. The most of GLP1-IR enteroendocrine cells were found in the ileum of control animals. Acute hyperglycemia did not alter the density of GLP1-IR enteroendocrine cells in any of the intestinal segments examined, whereas chronic hyperglycemia significantly increased the density of these cells in the colon.

GLP1R immunoreactivity was examined in the myenteric ganglia using gold labelling post-embedding immunohistochemistry. Most GLP1R-labelling gold particles were found in the ganglia of the duodenum. Chronic hyperglycemia significantly reduced the density of GLP1R-

labelling gold particles in the duodenum, while no changes were observed in other intestinal segments.

We also studied GLP1-IR and GLP1R-IR cells in the islets of the pancreas. In control animals, GLP1R-IR cells occupied a larger area of the total islet area than GLP1-IR cells in both acute and chronic animal experiments. It was shown that GLP1R-IR cells are located in the β -cell region of the pancreas. GLP1-IR cells occupied a larger area compared to the total area of the islets in acute and chronic diabetic rats.

In summary, we can say that in our work we first identified insulin-IR myenteric neurons, and we also demonstrated the presence of insulin in the nitrergic subpopulation. The ratio of insulin-IR and insulin-nNOS-IR neurons showed changes in diabetic rats that were dependent on the intestinal segment and the duration of hyperglycemia. The absence of insulin mRNA in intestinal samples suggests that myenteric neurons do not produce insulin themselves, but rather take it up from their environment. The distribution of GLP1, which promotes insulin gene expression and biosynthesis, and its receptor also showed similar variability.

To sum up, the presence of insulin-containing myenteric neurons identified in our work and their changes during diabetes, as well as the region-specific changes in GLP1-expressing enteroendocrine cells and GLP1R-IR enteric neurons, may contribute to the survival of neurons in the myenteric ganglia located in different gut segments.

VII. Doktori értekezés tézisei

- Fluoreszcens immunhisztokémiai festéssel és posztembedding elektronmikroszkópos vizsgálattal is kimutattuk az inzulin jelenlétét a kontroll, illetve akut és krónikus hiperglikémiás patkányok myentericus neuronjaiban.
- Az inzulin-IR myentericus neuronok összneuronszámhoz viszonyított aránya bélszakasz-specifikus különbségeket mutatott, a kontroll állatokban a duodenumban alacsonyabb (2%), az ileumban és a colonban magasabb volt (8-9%). Ez az arány akut hiperglikémia hatására a duodenum kivételével megnőtt, krónikus hiperglikémia hatására pedig a colonban lecsökkent.
- Az inzulin-nNOS-IR myentericus neuronok a kontroll állatokban legnagyobb arányban a colonban fordultak elő. Akut hiperglikémia hatására ez az arány a duodenumban változatlan maradt, az ileumban és a colonban viszont jelentősen növekedett. Krónikus hiperglikémia hatására ezen kettősjelölt neuronok aránya minden bélszakaszban változatlan maradt.
- Fluoreszcens immunhisztokémiai festéssel megfigyeltük, hogy a bél nyálkahártya rétegében lévő GLP1-IR enteroendokrin sejtek denzitása az ileumban volt a legnagyobb. Akut hiperglikémia hatására egyik bélszakaszban sem mutatott változást ezeknek a sejteknek a denzitása, míg krónikus hiperglikémia hatására a vastagbélben szignifikáns növekedést figyeltünk meg.
- Elektronmikroszkópos módszerrel igazoltuk, hogy a GLP1R-t jelölő arany szemcsék denzitása a kontroll állatok duodenumában a legmagasabb, amely krónikus diabétesz hatására szignifikánsan lecsökkent, míg a többi bélszakaszban változatlan maradt.

VIII. Irodalomjegyzék

Alavi SE, Ebrahimi Shahmabadi H. GLP-1 peptide analogs for targeting pancreatic beta cells. *Drug Discov Today*, **2021**; 26(8):1936-1943.

AL Doghmi A, Barta BP, Egyed-Kolumbán A, Onhausz B, Kiss S, Balázs J, Szalai Z, Bagyánszki M, Bódi N. Gut Region-Specific Interleukin 1 β Induction in Different Myenteric Neuronal Subpopulations of Type 1 Diabetic Rats. *International Journal of Molecular Sciences*, **2023**; 24(6):5804.

Alejandro, EU, Mamerto, TP, Chung, G, Villavieja, A, Gaus, NL, Morgan, E., Pineda-Cortel, M.R.B. Gestational Diabetes Mellitus: A Harbinger of the Vicious Cycle of Diabetes. *International Journal of Molecular Sciences*. **2020**; 21(14):5003.

Altan VM, Oztürk Y, Yildizoğlu-Ari N, Nebigil C, Lafçi D, Özçelikay AT. Insulin action on different smooth muscle preparations. *General Pharmacology*, **1989**; 20(4):529-35.

Andersen DB, Grunddal KV, Pedersen J, Kuhre RE, Lund ML, Holst JJ, Ørskov C. Using a reporter mouse to map known and novel sites of GLP-1 receptor expression in peripheral tissues of male mice. *Endocrinology*, **2020**; 162(3):bqaa246.

Andres SF, Simmons JG, Mah AT, Santoro MA, Van Landeghem L, Lund PK. Insulin receptor isoform switching in intestinal stem cells, progenitors, differentiated lineages and tumors: evidence that IR-B limits proliferation. *Journal of Cell Science*, **2013**; 126(Pt 24):5645-56.

Andres SF, Santoro MA, Mah AT, Keku JA, Bortvedt AE, Blue RE, & Lund PK. Deletion of intestinal epithelial insulin receptor attenuates high-fat diet-induced elevations in cholesterol and stem, enteroendocrine, and Paneth cell mRNAs. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, **2014**; 308(2):G100–G111.

Antonino B, Roberta M, Veronica V, Michael C L, Laura S, Francesco F, Andrea M, Riccardo V, Insulin Receptor Isoforms in Physiology and Disease: An Updated View, *Endocrine Reviews*, **2017**; 38(5):379–431.

Athmuri, DN, Shiekh, PA. Experimental diabetic animal models to study diabetes and diabetic complications. *MethodsX*, **2023**; 11:102474.

Baeyens L, De Breuck S, Lardon J, Mfopou JK, Rooman I, Bouwens L. In vitro generation of insulin-producing beta cells from adult exocrine pancreatic cells. *Diabetologia*, **2005**; 48(1):49-57.

Bagyánszki M, Bódi N. Key elements determining the intestinal region-specific environment of enteric neurons in type 1 diabetes. *World Journal of Gastroenterology*, **2023**; 29(18):2704-2716.

Barta BP, Onhausz B, Egyed-Kolumbán A, AL Doghmi A, Balázs J, Szalai Z, Ferencz Á, Hermes E, Bagyánszki M, Bódi N. Intestinal Region-Dependent Impact of NFκB-Nrf Crosstalk in Myenteric Neurons and Adjacent Muscle Cells in Type 1 Diabetic Rats. *Biomedicines*, **2024**; 12(10):2347

Baskin DG, Porte D Jr, Guest K, Dorsa DM. Regional concentrations of insulin in the rat brain. *Endocrinology*, **1983**; 112(3):898-903.

Belai A, Calcutt NA, Carrington AL, Diemel LT, Tomlinson DR, Burnstock G. Enteric neuropeptides in streptozotocin-diabetic rats; effects of insulin and aldose reductase inhibition. *Journal of the Autonomic Nervous System*, **1996**; 58(3):163–169.

Bell GD, Reddy S, Sun X, Yang Y, Krissansen GW. Distribution of insulin mRNA transcripts within the human body. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2014**; 451(3):425–430.

Bellono NW, Bayrer JR, Leitch DB, Castro J, Zhang C, O'Donnell TA, Brierley SM, Ingraham HA, Julius D. Enterochromaffin Cells Are Gut Chemosensors that Couple to Sensory Neural Pathways. *Cell*, **2017**; 170(1):185-198.

Bendayan M, Park I. Presence of extrapancreatic islets of Langerhans in the duodenal wall of the rat. *Diabetologia*, **1991**; 34(8):604–606.

Bergandi L, Silvagno F, Russo I, Riganti C, Anfossi G, Aldieri E, Ghigo D, Trovati M, Bosia A. Insulin stimulates glucose transport via nitric oxide/cyclic GMP pathway in human vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **2003**; 23(12):2215-21.

Bhol NK, Bhanjadeo MM, Singh AK, Dash UC, Ojha RR, Majhi S, Duttaroy AK, Jena AB. The interplay between cytokines, inflammation, and antioxidants: mechanistic insights and therapeutic potentials of various antioxidants and anti-cytokine compounds. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **2024**; 178:117177.

Bódi N, Szalai Z, Bagyánszki M. Nitroergic Enteric Neurons in Health and Disease—Focus on Animal Models. *International Journal of Molecular Sciences*, **2019**; 20(8):2003.

Bohórquez DV, Shahid RA, Erdmann A, Kreger AM, Wang Y, Calakos N, Wang F, Liddle RA. Neuroepithelial circuit formed by innervation of sensory enteroendocrine cells. *Journal of Clinical Investigation*, **2015**; 125(2):782–786.

Borgmann D, Ciglieri E, Biglari N, Brandt C, Cremer AL, Backes H, Tittgemeyer M, Wunderlich FT, Brüning JC, Fenselau H. Gut-brain communication by distinct sensory neurons differently controls feeding and glucose metabolism. *Cell Metabolism*, **2021**; 33(7):1466-1482.e7.

Bouchi R, Foo KS, Hua H, Tsuchiya K, Ohmura Y, Sandoval PR, Ratner LE, Egli D, Leibel RL, Accili D. FOXO1 inhibition yields functional insulin-producing cells in human gut organoid cultures. *Nature Communication*, **2014**; 5:4242.

Bullock BP, Heller RS, Habener JF. Tissue distribution of messenger ribonucleic acid encoding the rat glucagon-like peptide-1 receptor. *Endocrinology*, **1996**; 137(7):2968–2978.

Bulum T. Nephroprotective Properties of the Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide (GIP) and Glucagon-like Peptide-1 (GLP-1) Receptor Agonists. *Biomedicines*, **2022**; 10(10): 2586.

Bourgeois S, Coenen S, Degroote L, Willems L, Van Mulders A, Pierreux J, Heremans Y, De Leu N, Staels W. Harnessing beta cell regeneration biology for diabetes therapy. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, **2024**; 35(11):951-966.

Camilleri M, Vazquez-Roque M, Iturrino J, Boldingh A, Burton D, McKinzie S, Wong BS, Rao AS, Kenny E, Månsson M, Zinsmeister AR. Effect of a glucagon-like peptide 1 analog, ROSE-010, on GI motor functions in female patients with constipation-predominant irritable bowel syndrome. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, **2012**; 303(1):G120–G128.

Campbell J.E, Beaudry JL, Svendsen B, Baggio LL, Gordon AN, Ussher JR, Wong CK, Gribble FM, D'Alessio DA, Reimann F, Drucker DJ. GIPR Is Predominantly Localized to Nonadipocyte Cell Types Within White Adipose Tissue. *Diabetes*, **2022**; 71(5):1115–1127.

- Campos** RV, Lee YC, Drucker DJ. Divergent tissue-specific and developmental expression of receptors for glucagon and glucagon-like peptide-1 in the mouse. *Endocrinology*, **1994**; 134(5):2156–2164.
- Canabal** DD, Song Z, Potian JG, Beuve A, McArdle JJ, Routh VH., Glucose, insulin, and leptin signaling pathways modulate nitric oxide synthesis in glucose-inhibited neurons in the ventromedial hypothalamus. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **2007**; 292(4):R1418-28.
- Cellek** S, Foxwell NA, Moncada S. Two phases of nitrenergic neuropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes*, **2003**; 52(9):2353-62.
- Chandrakumar** L, Bagyánszki M, Szalai Z, Mezei D, Bódi N. Diabetes-Related Induction of the Heme Oxygenase System and Enhanced Colocalization of Heme Oxygenase 1 and 2 with Neuronal Nitric Oxide Synthase in Myenteric Neurons of Different Intestinal Segments. *Oxidative medicine and cellular longevity*, **2017**, 2017:1890512.
- Chen** X, Larson CS, West J, Zhang X, Kaufman DB. *In Vivo* Detection of Extrapancreatic Insulin Gene Expression in Diabetic Mice by Bioluminescence Imaging. *PLOS ONE*, **2010**; 5(2): e9397.
- Circu** ML, Aw TY. Redox biology of the intestine. *Free Radical Research*, **2011**; 45(11-12):1245-66.
- Cymbal** M, Naseem Z, Hoxha D, Garg S. Impact of GLP-1 Receptor Agonists on Whole-Gut Gastrointestinal Motility Using Wireless Motility Capsule: A Descriptive Single-Center Case Series. *The American College of Gastroenterology Reports Journal*. **2025**; 12(8):e01789.
- Csajbók** ÉA, Kocsis ÁK, Faragó N. Expression of GLP-1 receptors in insulin-containing interneurons of rat cerebral cortex. *Diabetologia*, **2019**; 62(4):717–725.
- Dakic** T, Jevdjovic T, Lakic I, et al. The Expression of Insulin in the Central Nervous System: What Have We Learned So Far? *International Journal of Molecular Sciences*, **2023**; 24(7):6586.
- Davis** EM, Sandoval DA. Glucagon-Like Peptide-1: Actions and Influence on Pancreatic Hormone Function. *Comprehensive Physiology*, **2020**; 10(2):577-595.
- de Koning** EJP, Carlotti F. Human stomach tissue as alternative source of insulin-producing cells. *Nature Reviews Endocrinology*, **2023**; 19(9):503-504.

Deeds MC, Anderson JM, Armstrong AS, Gastineau DA, Hiddinga HJ, Jahangir A, Eberhardt NL, Kudva YC. Single dose streptozotocin-induced diabetes: considerations for study design in islet transplantation models. *Journal of Laboratory Animal Research*, **2011**; 45(3):131-40.

Devaskar SU, Giddings SJ, Rajakumar PA, Carnaghi LR, Menon RK, Zahm DS. Insulin gene expression and insulin synthesis in mammalian neuronal cells. *Journal of Biological Chemistry*, **1994**; 269(11): 8445-54.

Du W, Wang J, Kuo T, Wang L, McKimpson WM, Son J, Watanabe H, Kitamoto T, Lee Y, Creusot RJ, Ratner LE, McCune K, Chen Y, Grubbs BH, Thornton ME, Fan J, Sultana N, Diaz BS, Balasubramanian I, Accili D. Pharmacological conversion of gut epithelial cells into insulin-producing cells lowers glycemia in diabetic animals. *Journal of Clinical Investigation*, **2022**; 132(24).

Drucker DJ. GLP-1 physiology informs the pharmacotherapy of obesity. *Molecular Metabolism*, **2021**; 57:101351.

Drucker, D. J. Efficacy and safety of GLP-1 medicines for type 2 diabetes and obesity. *Diabetes Care*, **2024**; 47(11):1873-1888.

Egyed-Kolumbán A, Onhausz B, Barta BP, Szalai Z, Huliák I, Kiricsi M, Bagyánszki M, Bódi N. Insulin in myenteric neurons: Time-Dependent and Regional Changes in Type 1 diabetic rats. *Cells*, **2025**; 14(11):809.

Egozi A, Llivichuzhca-Loja D, McCourt BT, Halpern KB, Farack L, An X, Wang F, Chen K, Konnikova L, Itzkovitz S. Insulin is expressed by enteroendocrine cells during human fetal development. *Nature Medicine*; **2021**; 27(12):2104–2107.

Eissele R, Göke R, Willemer S, Harthus HP, Vermeer H, Arnold R, Göke B. Glucagon-like peptide-1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man. *European Journal of Clinical Investigation*, **1992**; 22(4):283-91.

Eleazu CO, Eleazu KC, Chukwuma S, Essien UN. Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders*, **2013**; 12(1):60.

Fava GE, Dong EW, Wu H. Intra-islet glucagon-like peptide 1. *Journal of Diabetes and its Complications*, **2016**; 30(8):1651-1658.

- Fukuda M.** The Role of GIP Receptor in the CNS for the Pathogenesis of Obesity. *Diabetes*, **2021**; 70(9):1929-1937.
- Ghasemi A, Jeddi S, Kashfi K.** The laboratory rat: Age and body weight matter. *EXCLI Journal*, **2021**; 20:1431-1445.
- Ghasemi A, Jeddi S.** Streptozotocin as a tool for induction of rat models of diabetes: a practical guide. *EXCLI Journal*, **2023**; 22:274-294.
- Ghusn W, Hurtado MD.** Glucagon-like Receptor-1 agonists for obesity: Weight loss outcomes, tolerability, side effects, and risks. *Obesity Pillars Journal*, **2024**; 12:100127.
- Goldberg RI, Smith RM, Jarett L.** Insulin and alpha 2-macroglobulin-methylamine undergo endocytosis by different mechanisms in rat adipocytes: I. Comparison of cell surface events. *Journal of Cellular Physiology*, **1987**; 133(2):203-12.
- Graham ML, Janecek JL, Kittredge JA, Hering BJ, Schuurman HJ.** The streptozotocin-induced diabetic nude mouse model: differences between animals from different sources. *Comparative Medicine*, **2011**; 61(4):356-60.
- Gralle M.** The neuronal insulin receptor in its environment. *Journal of Neurochemistry*, **2017**; 140(3):359-367.
- Greiner TU, Bäckhed, F.** Microbial regulation of GLP-1 and L-cell biology. *Molecular metabolism*, **2016**; 5(9):753-758.
- Grunddal KV, Jensen EP, Ørskov C, Andersen DB, Windeløv JA, Poulsen SS, Rosenkilde MM, Knudsen LB, Pyke C, Holst JJ.** Expression profile of the GLP-1 receptor in the gastrointestinal tract and pancreas in adult female mice. *Endocrinology*, **2021**; 163(1):bqab216.
- Hall C, Yu H, Choi E.** Insulin receptor endocytosis in the pathophysiology of insulin resistance. *Experimental & Molecular Medicine*, **2020**; 52(6):911-920.
- Hankir, M. K., & Lutz, T. A.** Novel neural pathways targeted by GLP-1R agonists and bariatric surgery. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*. **2025**; 477(2):171-185.
- Holter MM, Saikia M, Cummings BP.** Alpha-cell paracrine signaling in the regulation of beta-cell insulin secretion. *Frontiers in Endocrinology*, **2022**; 13.

Hossain MJ, Al-Mamun M, Islam MR. Diabetes mellitus, the fastest growing global public health concern: Early detection should be focused. *Health Science Reports*, **2024**; 7(3):e2004.

Izbéki F, Wittman T, Rosztóczy A, Linke N, Bódi N, Fekete E, Bagyánszki M. 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*, **2008**; 80(2):192-8.

Ishikawa Y, Otsu K, Oshikawa J. Caveolin; different roles for insulin signal? *Cell Signaling*, **2005**; 17(10):1175-82.

Jaldin-Fincati JR, Pereira RVS, Bilan PJ, Klip A. Insulin uptake and action in microvascular endothelial cells of lymphatic and blood origin. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, **2018**; 315(2):E204-E217.

Jin T. Why diabetes patients are more prone to the development of colon cancer? *Medical Hypotheses*, **2008**; 71(2):241–244.

Jones MA, Jadeja RN, Flandrin O, Abdelrahman AA, Thounojam MC, Thomas S, Dai C, Xiao H, Chen JK, Smith SB, Bartoli M, Martin PM, Powell FL. Autonomous regulation of retinal insulin biosynthesis in diabetes. *Neuropeptides*, **2022**; 94:102258.

Kaneto H, Kimura T, Shimoda M, et al. Favorable Effects of GLP-1 Receptor Agonist against Pancreatic β -Cell Glucose Toxicity and the Development of Arteriosclerosis: "The Earlier, the Better" in Therapy with Incretin-Based Medicine. *International Journal of Molecular Sciences*, **2021**; 22(15):7917.

Kim W, Egan JM. The role of incretins in glucose homeostasis and diabetes treatment. *Pharmacological Reviews*, **2008**; 60(4):470-512.

Kiss É. Diabéteszes neuropátia. *Diabetes*, **2023**/6.

<https://diabetes.hu/cikkek/diabetes/2306/diabéteszes-neuropatia>

Kirk RK, Pyke C, Von Herrath MG, Hasselby JP, Pedersen L, Mortensen PG, Knudsen LB, Coppieters K. Immunohistochemical assessment of glucagon-like peptide 1 receptor (GLP-1R) expression in the pancreas of patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obesity and Metabolism*, **2017**; 19(5):705–712.

Kojima H, Fujimiya M, Matsumura K, Nakahara T, Hara M, Chan L. Extrapaneatic insulin-producing cells in multiple organs in diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2004**; 101(8):2458-63.

Koska J, Saremi A, Howell S, Bahn G, De Courten B, Ginsberg H, Beisswenger PJ, Reaven PD, VADT Investigators. Advanced Glycation End Products, Oxidation Products, and Incident Cardiovascular Events in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes care*, **2018**; 41(3):570–576.

Kubo F, Miyatsuka T, Sasaki S, et al. Sustained expression of GLP-1 receptor differentially modulates β -cell functions in diabetic and nondiabetic mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2016**; 471(1):68-74.

Kulve JST, Van Bloemendaal L, Balesar R, IJzerman RG, Swaab DF, Diamant M, La Fleur SE, Alkemade A. Decreased hypothalamic Glucagon-Like peptide-1 receptor expression in Type 2 diabetes patients. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **2015**; 101(5):2122–2129.

Lebrun LJ, Lenaerts K, Kiers D, Pais de Barros JP, Le Guern N, Plesnik J, Thomas C, Bourgeois T, Dejong CHC, Kox M, Hundscheid IHR, Khan NA, Mandard S, Deckert V, Pickkers P, Drucker DJ, Lagrost L, Grober J. Enteroendocrine L Cells Sense LPS after Gut Barrier Injury to Enhance GLP-1 Secretion. *Cell Reports*, **2017**; Oct 31;21(5):1160-1168.

Lee SH, Rhee M, Kim JW, Yoon KH. Generation of Insulin-Expressing Cells in Mouse Small Intestine by Pdx1, MafA, and BETA2/NeuroD. *Diabetes and Metabolism Journal*, **2017**; 41(5):405-416.

Lee YS, Lee C, Choung JS, Jung HS, Jun HS. Glucagon-Like Peptide 1 Increases β -Cell Regeneration by Promoting α - to β -Cell Transdifferentiation. *Diabetes*, **2018**; 67(12):2601-2614.

Lee SH, Zabolotny JM, Huang H, Lee H, Kim YB. Insulin in the nervous system and the mind: Functions in metabolism, memory, and mood. *Molecular metabolism*, **2016**; 5(8):589–601.

Li Z, Zhang N, Wen S, Zhang J, Sun X, Fan X, Sun Y. Decreased glucagon-like peptide-1 correlates with abdominal pain in patients with constipation-predominant irritable bowel syndrome. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, **2017**; 41(4), 459–465.

Li Z, Lei X, Xu B, Wang S, Gao T, Lv H. Analysis of risk factors of diabetes peripheral neuropathy in type 2 diabetes mellitus and nursing intervention. *Experimental and Therapeutic Medicine*, **2020**; 20(6):127.

Link 1: <https://diabetesatlas.org/resources/idf-diabetes-atlas-2025/>

Liu J, Meyer L, Chung P-E, Tao Y, Owen B & Murphy K. Investigating the pancreas-projecting enteric neurons in the regulation of metabolic homeostasis. *Endocrine Abstracts*, **2023**

Lombardo C, Perrone VG, Amorese G. Update on Pancreatic Transplantation in the Management of Diabetes. In: Feingold KR, Ahmed SF, Anawalt B. *Endotext* (Internet). **2021**; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278979/>

Makhmutova M & Caicedo A. Optical Imaging of Pancreatic Innervation. *Front Endocrinology*, **2021**; 12:663022.

Marathe CS, Jones KL, Wu T, Rayner CK, Horowitz M. Gastrointestinal autonomic neuropathy in diabetes. *Autonomic Neuroscience*, **2020**; 229:102718.

Maria-Engler SS, Corrêa-Giannella MLC, Labriola L, Krogh K, Colin C, Lojudice FH, Aita CAM, de Oliveira EMC, Corrêa TCS, da Silva IC, Genzini T, de Miranda MP, Noronha IL, Vilela L, Coimbra CN, Mortara RA, Mares Guia M, Eliaschewitz FG, Sogayar MC. Co-localization of nestin and insulin and expression of islet cell markers in long-term human pancreatic nestin-positive cell cultures. *Journal of Endocrinology*, **2004**; 183(3):455-467.

Martin AM, Sun EW, Rogers GB, et al. The influence of the gut microbiome on host metabolism, through the regulation of gut hormone release. *Frontiers in Physiology*, **2019**; 10:428.

Mohamed, M. Enteric Neuropathy in Diabetes: Implications for Gastrointestinal Function. *World Journal of Gastroenterology*, **2024**; 30:2852–2865.

Molin, M. D., Kim, H., Blackford, A., Sharma, R., & Goggins, M. Glucagon-Like peptide-1 receptor expression in normal and neoplastic human pancreatic tissues. *Pancreas*, **2015**; 45(4):613–619.

Molnár G, Faragó N, Kocsis ÁK, Rózsa M, Lovas S, Boldog E, Báldi R, Csajbók É, Gardi J, Puskás LG, Tamás G. GABAergic neurogliaform cells represent local sources of insulin in the cerebral cortex. *Journal of Neuroscience*, **2014**; 34(4):1133-7.

Mortensen K, Christensen LL, Holst JJ, Orskov C. GLP-1 and GIP are colocalized in a subset of endocrine cells in the small intestine. *Regulatory Peptides*, **2003**; 114(2-3):189-96.

Nakashima K, Kaneto H, Shimoda M, Kimura T, Kaku K. Pancreatic alpha cells in diabetic rats express active GLP-1 receptor: Endosomal co-localization of GLP-1/GLP-1R complex functioning through intra-islet paracrine mechanism. *Scientific Reports*, **2018**; 8(1).

Nicole YL, Melissa AM, Felipe APR, Pankaj B, Amanda J, Pingchuan Ma, David EP, Zuoja C, Donggi P, Salima S, Yiqing Y, Aditya M, Kaitlin G, Valentina NL, Anja N, Kisha NS, Antonia W, Vijay KK, Roni N, Michael NS, Hailian S, Neeraj KS, Dingding A, Chuan W, Jun R. Huh, Meenakshi R, Isaac MC. Gut-Innervating Nociceptor Neurons Regulate Peyer's Patch Microfold Cells and SFB Levels to Mediate Salmonella Host Defense. *Cell*, **2020**; 180(1):33-49.e22.

Nogueira-Campos AA, Finamore DM, Imbiriba LA, Houzel JC, Franca JG. Distribution and morphology of nitrergic neurons across functional domains of the rat primary somatosensory cortex. *Frontiers in Neural Circuits*. **2012**; 6:57.

O'Malley TJ, Fava GE, Zhang Y, Fonseca VA, Wu H. Progressive change of intra-islet GLP-1 production during diabetes development. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, **2014**; 30(8):661–668.

Parpal S, Karlsson M, Thorn H, Strålfors P. Cholesterol depletion disrupts caveolae and insulin receptor signaling for metabolic control via insulin receptor substrate-1, but not for mitogen-activated protein kinase control. *Journal of Biological Chemistry*, **2001**; 276(13):9670-8.

Pelle MC, Provenzano M, Zaffina I. Role of a dual glucosedependent insulintropic peptide (GIP)/glucagon-like peptide-1 receptor agonist (twincretin) in glycemic control: from pathophysiology to treatment. *Life (Basel)*, **2022**; 12:29.

Pemberton S, Galindo DC, Schwartz MW, Banks WA, Rhea EM. Endocytosis of insulin at the blood-brain barrier. *Frontiers in Drug Delivery*, **2022**; 2:1062366.

Razzaki TS, Weiner A, Shukla AP. Tirzepatide: does the evidence to date show potential for the treatment of early stage type 2 diabetes? *Therapeutics and Clinical Risk Management*, **2022**; 18:955–964.

Ren W, Chen J, Wang W, Li Q, Yin X, Zhuang G, Zhou H, Zeng W. Sympathetic nerve-enteroendocrine L cell communication modulates GLP-1 release, brain glucose utilization, and cognitive function. *Neuron*, **2024**; 112(6):972-990.e8.

Rerup CC. Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. *Pharmacological Reviews*, **1970**; 22(4):485-518.

Ryu GR, Lee E, Kim JJ, Moon S-D, Ko S-H, Ahn Y-B, et al. Comparison of enteroendocrine cells and pancreatic β -cells using gene expression profiling and insulin gene methylation. *PLoS ONE*, **2018**; 13(10): e0206401.

Sans, M. D., Bruce, J., & Williams, J. Regulation of pancreatic Exocrine Function by Islet Hormones [Internet]. *Pancreapedia: The Exocrine Pancreas Knowledge Base*, **2020**.
<https://pancreapedia.org/sites/default/files/Sans-Bruce-Williams-Regulation-of-Pancreatic-Exocrine-Function-By-Islet-Hormones-F.pdf>

Shotton HR, Lincoln J. Diabetes only affects nitric oxide synthase-containing myenteric neurons that do not contain heme oxygenase 2. *Brain Research*, **2005**; 1068(1):248–256.

Smith RM, Harada S, Smith JA, Zhang S, Jarett L. Insulin-induced protein tyrosine phosphorylation cascade and signalling molecules are localized in a caveolin-enriched cell membrane domain. *Cell Signaling Technology*, **1998**; 10(5):355-62.

Snyder JR, Ahmed M, Bhawe S, Hotta R, Koppes RA, Goldstein AM, Koppes AN. Enteroendocrine Cells Sense Sucrose and Alter Enteric Neuron Excitability via Insulin Signaling. *Advanced Biology (Weinh)*, **2025**; 9(3):e2300566.

Spielman LJ, Bahniwal M, Little JP, Walker DG, Klegeris A. Insulin Modulates In Vitro Secretion of Cytokines and Cytotoxins by Human Glial Cells. *Curr Alzheimer Res*. **2015**; 12(7):684-93.

Tizro P, Choi C, Khanlou N. Sample preparation for transmission electron microscopy. *Methods in Molecular Biology*, **2019**; 417–424.

Todd S, Yoshida MC, Fang XE, McDonald L, Jacobs J, Heinrich G. Genes for insulin I and II, parathyroid hormone, and calcitonin are on rat chromosome 1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **1985**; 131(3):1175-80.

Uranga-Ocio JA, Bastús-Díez S, Delkáder-Palacios D, García-Cristóbal N, Leal-García MÁ, Abalo-Delgado R. Enteric neuropathy associated to diabetes mellitus. *Revista Espanola de Enfermedades Digestivas*, **2015**; 107(6):366-73.

Vahl, T, D'Alessio, DA. Enteroinsular signaling: perspectives on the role of the gastrointestinal hormones glucagon-like peptide 1 and glucose-dependent insulintropic polypeptide in normal and abnormal glucose metabolism. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, **2003**; 6:461-468.

Zatorski H, Salaga M, Zielińska M, Mokrowiecka A, Jacenik D, Krajewska WM, Małecka-Panas E, Fichna J. Colonic inflammation induces changes in glucose levels through modulation of incretin system. *Pharmacological Reports*, **2021**; 73(6):1670–1679.

Zhao Z, Tang Y, Hu Y, Zhu H, Chen X, Zhao B. Hypoglycemia following the use of glucagon-like peptide-1 receptor agonists: a real-world analysis of post-marketing surveillance data. *Annals of Translational Medicine*, **2021**; 9(18):1482.

Zhang T, Perkins MH, Chang H, Han W, de Araujo IE. An inter-organ neural circuit for appetite suppression. *Cell*, **2022**; 185(14):2478-2494.e28.

Watkins CC, Sawa A, Jaffrey S, Blackshaw S, Barrow RK, Snyder SH, Ferris CD. Insulin restores neuronal nitric oxide synthase expression and function that is lost in diabetic gastropathy. *Journal of Clinical Investigation*, 2000; 106(3):373–384.

Wei T, Cui X, Jiang Y, Wang K, Wang D, Li F, Lin X, Gu L, Yang K, Yang J, Hong T, Wei R. Glucagon acting at the GLP-1 receptor contributes to B-Cell regeneration induced by glucagon receptor antagonism in diabetic mice. *Diabetes*, **2023**; 72(5):599–610.

Wilding JP, Batterham RL, Calanna S, Davies M, Van Gaal LF, Lingvay I, McGowan BM, Rosenstock J, Tran MT, Wadden TA, Wharton S, Yokote K, Zeuthen N, Kushner RF. Once-Weekly Semaglutide in Adults with Overweight or Obesity. *New England Journal of Medicine*, **2021**; 384(11):989–1002.

Wu J, Park SH, Choi E. The insulin receptor endocytosis. *Prog Mol Biol Transl Sci*. **2023**; 194:79-107.

Yang M, Wang J, Wu S, Yuan L, Zhao X, Liu C, Xie J, Jia Y, Lai Y, Zhao AZ, Boden G, Li L, Yang G. Duodenal GLP-1 signaling regulates hepatic glucose production through a PKC- δ -dependent neurocircuitry. *Cell Death and Disease*, **2017**; 8(2):e2609.

Yarandi SS, Srinivasan S. Diabetic gastrointestinal motility disorders and the role of enteric nervous system: current status and future directions. *Neurogastroenterology and Motility*, **2014**; 26(5):611-24.

IX. Köszönetnyilvánítás

Először szeretném megköszönni témavezetőmnek, **Dr. habil. Bagyánszki Mária** egyetemi docensnek, aki a csoportunk vezetőjeként 2021-ben szeretettel befogadott az Enterális Idegrendszer Kutatócsoportba, valamint **Dr. habil. Bódi Nikolett** egyetemi docensnek, hogy laboratóriumi munkám során végig irányított és utat mutatott. Mindketten segítettek beilleszkedni az új környezetbe, valamint szakmai tapasztalatuk által és emberileg is rengeteg segítséget nyújtottak.

Szeretném hálámat kifejezni **Dr. Szalai Zitának** is, aki molekuláris vizsgálataink során útbaigazított és oktatási tevékenységem során is bátran fordulhattam hozzá kérdésekkel. Köszönettel tartozom a munkatársaimnak is; **Dr. Barta Bencének**, aki tanulmányaim elején a laboratóriumi munkákra betanított és rengeteg hasznos tanáccsal ellátott; **Onhausz Benitának**, akitől a precizitást elsajátíthattam és mindig bátorító tanácsaival halmozott el. Egykori munkatársaimnak (**Dr. Afnan AL Doghmi, Dr. Balázs János, Kiss Szilvia, Buza-Arany Katalin**) is köszönöm, hogy mindig baráti légkörben, igazi csapatmunkában segítették a laboratóriumi tevékenységeket.

Köszönettel tartozom **Huszár Lászlóné Dr. Fehér Evelinnek és csapatának** az állatok gondozásában nyújtott folyamatos segítségért.

Köszönöm **Dr. habil. Varga Csaba** tanszékvezető egyetemi docensnek, hogy lehetővé tette, hogy a SZTE TTIK Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszéken végezhessem doktori munkámat, valamint a Tanszék minden munkatársának a támogatást és segítséget, melyet munkám során biztosítottak.

Köszönöm a SZTE Patológiai Intézet munkatársainak, **Dr. Szilágyi-Szőgi Titanillának** és **Németh Erikának**, hogy az elektronmikroszkópos munkák során kiváló szakmai tudásukkal mindig segítettek.

Végtelenül hálás vagyok a családomnak, hogy tanulmányaim során szeretetteljesen támogattak. Köszönöm **édesanyámnak**, aki mindig ott volt mellettem, tartotta bennem a lelket és nem hagyta, hogy elcsüggedjek soha. Hálás vagyok **édesapámnak**, aki bölcs útmutatásaival megerősített. Köszönöm szépen a **testvéremnek**, aki legjobb barátomként mindig meghallgatott és bátorított. Végül, de nem utolsó sorban hálás köszönettel tartozom a **férjemnek**, aki kitartott mellettem és motivált sokszor, amely doktori tanulmányaim során sok erőt és kitartást adott.

X. Közlemények listája

Doktori értekezés alapjául szolgáló közlemények listája:

Egyed-Kolumbán A., Onhausz B., Barta B.P., Szalai Z., Huliák, I.; Kiricsi, M.; Bagyánszki, M.; Bódi, N. (2025): Insulin in Myenteric Neurons: Time-Dependent and Regional Changes in Type 1 Diabetic Rats; Cells, 14(11):809.

doi:10.3390/cells14110809

IF: 5,2

Bódi N., **Egyed-Kolumbán A.**, Onhausz B., Barta B.P., Doghmi A.A., Balázs J., Szalai Z., Bagyánszki M. (2023): Intestinal Region-Dependent Alterations of Toll-Like Receptor 4 Expression in Myenteric Neurons of Type 1 Diabetic Rats; Biomedicines; 11(1):129.

doi:10.3390/biomedicines11010129

IF: 3,9

A doktori értekezés alapjául szolgáló közlemények összesített impakt faktora: 9,1

Doktori értekezéshez közvetlenül nem kapcsolódó közlemények listája:

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.

doi: 10.3390/biomedicines12102347

IF: 3,9

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 1β Induction in Different Myenteric Neuronal Subpopulations of Type 1 Diabetic Rats; Int. J. Mol. Sci., 24, 5804.

doi:10.3390/ijms24065804

IF: 4,9

Összesített impakt faktor: 17,9

MTMT azonosító: 10079792

Doktori értekezés alapjául szolgáló magyar és nemzetközi konferenciák:

Egyed-Kolumbán A., Barta B. P., Onhausz B., AL Doghmi A., Szalai Z., Bódi N., Bagyánszki M.: Identification of insulin immunoreactivity in myenteric neurons and their nitrergic subpopulation in an acute model of type 1 diabetes; 49th FEBS Congress; Isztambul, Törökország, 2025. július 5-9.

Egyed-Kolumbán A., Barta B. P., Onhausz B., AL Doghmi A., Szalai Z., Bódi N., Bagyánszki M.: Insulin-immunoreactive neurons and their gut region-dependent alterations in a type 1 diabetic rat model; 11th Congress of the European Academy of Neurology; Helsinki, Finnország, 2025. június 21-24.

Egyed-Kolumbán A., Barta B. P., AL Doghmi A., Onhausz B., Szalai Z., Bagyánszki M., Bódi N.: Inzulín-immunreaktív myenterikus neuronok vizsgálata 1. típusú diabéteszes patkánymodellben; XXVII. Tavaszi Szél Konferencia; Budapest, Magyarország, 2024. május 3-5.

Egyéb nemzetközi konferenciák:

Barta B. P., Onhausz B., **Egyed-Kolumbán A.**, Nagy V., Dobó S., Szalai Z., AL Doghmi A., Balázs J., Bagyánszki M., Bódi N.: Gut region-dependent expression of NFκB p65 and its translocator protein, importin α3 in streptozotocin-induced type 1 diabetic rats; 49th FEBS Congress; Isztambul, Törökország, 2025. július 5-9.

Barta B. P., Onhausz B., **Egyed-Kolumbán A.**, Nagy V., Dobó S., Szalai Z., AL Doghmi A., Balázs J., Bagyánszki M., Bódi N.: Gut region-dependent expression of NFκB p65 and its translocator protein, importin α3 in streptozotocin-induced type 1 diabetic rats; 24th FEBS Young Scientists' Forum; Sapanca, Törökország, 2025. július 2-5.

Barta B. P., Onhausz B., **Egyed-Kolumbán A.**, Gulyás R., Nagy N., Dobó S., Szalai Z., AL Doghmi A., Balázs J., Bagyánszki B. and Bódi N.: Nuclear Factor Kappa-B Signaling In The Myenteric Ganglia Of Duodenum In Type 1 Diabetic Rats; 2025 PNS Annual Meeting; Edinburgh, Egyesült Királyság, 2025. május 17-20.

Onhausz B., Barta B. P., **Egyed-Kolumbán A.**, Szalai Z., Bódi B., Bagyánszki M.: Gut Region Specific Alterations In Enteric Glial Cells And Neurons Of Type 1 Diabetic Rats; 2025 PNS Annual Meeting; Edinburgh, Egyesült Királyság, 2025. május 17-20.

Onhausz B., Barta B. P., **Egyed-Kolumbán A.**, AL Doghmi A., Szalai Z., Bódi N., Bagyánszki M.: Regionally distinct alterations in the proportion of enteric glial cells in myenteric and submucous ganglia of type 1 diabetic rats; 48th FEBS Congress; Milánó, Italy; 29 June - 03 July 2024.

Bódi N., Barta B. P., Onhausz B., AL Doghmi A., **Egyed-Kolumbán A.**, Szalai Z., Balázs J., Bagyánszki M.: Diabetes-related alterations in the expression of NFκB and its negative regulator in the myenteric ganglia and neighbouring muscular environment of rat duodenum; 48th FEBS Congress; Milánó, Olaszország, 2024. június 29-július 3.

Barta B.P., Onhausz B., AL Doghmi A., **Egyed-Kolumbán A.**, Kiss S., Szalai Z., Balázs J., Bagyánszki M. and Bódi N.: Gut region-specific expression of nuclear factor kappa B p65 in the myenteric ganglia and its microenvironment of streptozotocin-induced diabetic rats; International Conference on Antioxidants; Barcelona, Spanyolország, 2023. május 10-12.

AL Doghmi A., Barta B.P., **Egyed-Kolumbán A.**, Onhausz B., Kiss S., Szalai Z., Balázs J., Bagyánszki M., Bódi N.: Intestinal segment-specific alterations of interleukin-1β expression in the myenteric neurons of streptozotocin-induced diabetic rats; 30th United European Gastroenterology Week 2022; Bécs, Ausztria, 2022. október 8- 11.

Egyéb magyar nyelvű konferenciák:

Barta B. P., Onhausz B., AL Doghmi A., **Egyed-Kolumbán A.**, Szalai Z., Balázs J., Bagyánszki M. és Bódi N.: Az NFκB p65 expresszió változása 1-es típusú diabéteszes patkányok myentericus ganglionjaiban és azok mikrokörnyezetében elhelyezkedő simaizomsejtekben; Magyar Élettani Társaság (MÉT) 86. Vándorgyűlése és a Magyar Mikrocirkulációs és Vaszkuláris Biológiai Társaság 2024. Évi Konferenciája; Debreceni Egyetem; Élettudományi Központ, Debrecen; 2024. május 29–31.

Barta B. P., Onhausz B., AL Doghmi A., **Egyed-Kolumbán A.**, Szalai Z., Balázs J., Bagyánszki M. és Bódi N.: Az NFκB p65 és az Nrf2 expresszió változásai 1-es típusú diabéteszes patkányok duodenumában található myentericus ganglionokban és azok mikrokörnyezetében elhelyezkedő izomsejtekben Magyar Mikroszkópos Társaság Konferencia 2024 (MMT 2024); Siófok; 2024. május 15-17.

Bagyánszki M., AL Doghmi A., Barta B.P., **Egyed-Kolumbán A.**, Onhausz B., Kiss Sz., Balázs J., Szalai Z., Bódi N.: Interleukin 1β expresszió bélszakasz-specifikus indukciója különböző

myentericus neuronpopulációkban 1-es típusú diabéteszes patkánymodellben; Magyar Gasztroenterológiai Társaság 65. Nagygyűlés; Siófok; 2023. június 01-04.