

# Csirke thymus dendritikus sejtjei



az Eötvös Loránd Tudományegyetem V. éves biológus hallgatója

## **Témavezetők:**

Dr. Nagy Nándor  
Prof. Dr. Oláh Imre

Semmelweis Egyetem,  
Humánmorfológiai és Fejlődésbiológiai Intézet

## **Konzulens:**

Dr. Réz Gábor  
Eötvös Loránd Tudományegyetem,  
Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék

2008, Budapest

# Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	I.
Rövidítésjegyzék.....	III.
Bevezetés.....	1.
Irodalmi áttekintés.....	2.
<b>1. A thymus morfológiája</b> .....	2.
<b>2. A thymus hisztológiai szerkezete</b> .....	2.
2.1. Lymphoid sejtek.....	3.
2.2. Strómális és myeloid sejtek.....	4.
<b>3. A thymus fejlődése</b> .....	9.
Célkitűzéseink.....	12.
Anyagok és módszerek.....	13.
<b>1. Kísérleti állatok</b> .....	13.
<b>2. Szöveti feldolgozás</b> .....	13.
2.1. Zselatin-szacharózos beágyazás.....	13.
2.2. Májba ágyazott fagyasztott metszetek készítése.....	14.
2.3. Beágyazáshoz használt oldatok.....	14.
<b>3. Metszetek készítése</b> .....	14.
<b>4. Immunhisztokémia és immunfluoreszcencia</b> .....	15.
4.1. Immunhisztokémia.....	15.
4.2. Immunfluoreszcencia.....	16.
4.2.1. Egyszeres immunfluoreszcencia.....	16.
4.2.2. Kettős immunfestés.....	16.
4.3. Az immunfestések során alkalmazott primer ellenanyagok, előhívószerek, oldatok.....	17.
<b>5. Félvékony metszetek készítése</b> .....	17.
<b>6. Metszetek értékelése, fényképezés, képfeldolgozás</b> .....	18.
<b>7. Embryomanipuláció: csirke-fürj kiméra</b> .....	18.
7.1. A csirke-fürj thymus kimérák létrehozása.....	18.
7.2. Az átültetéskor használt oldatok és vegyszerek elkészítése.....	19.
7.3. Felhasznált primer antitestek.....	20.

<b>Eredmények</b> .....	21.
<b>1. A madár thymus sejtjeinek immuncytokémiai karakterizálása</b> .....	21.
<b>2. A madár thymus strómális sejtjeinek karakterizálása</b> .....	26.
<b>3. A 74.3 pozitív sejtek ontogenezisének vizsgálata csirke-fürj thymus         kimérák létrehozásával</b> .....	30.
<b>Összefoglalás és konklúzió</b> .....	35.
<b>Köszönetnyilvánítás</b> .....	38.
<b>Irodalomjegyzék és forráshivatkozások listája</b> .....	39.

## Bevezetés

*A régmúltban a thymusnak sokféle funkciót tulajdonítottak, többek között azt is, hogy az örök fiatalság szérumát termeli. Először Thomas Hewson és Magnus Falconer ismerte fel a 18. században, hogy e szerv tulajdonképpen nyiroksejteket „termel”, pontosabban: „számos részecskét, amelyek a nyirokcsomókban találtakhoz hasonlóak”. Több mint száz évvel később Beard bővítette ki ezt a megfigyelést, aki leírta, hogy a thymusból ered az összes lymphocyta, amely a többi nyirokszervben található. Végül 1961-ben Jacques Miller derített fényt a thymus immunológiai funkciójára. Kísérleteiben thymus eredetű leukocyttákkal foglalkozott, és leírta, hogy újszülött egéren végzett thymectomia az állat immunhiányos állapotát okozta. Robert Good, aki klinikai kutatásokat végzett, megfigyelte, hogy a thymus abnormális fejlődése és szerkezete mindig immunbetegségekkel jár együtt. Ezek a klasszikus megfigyelések képezik a mai modern, thymussal kapcsolatos molekuláris immunológiai kutatásoknak az alapjait. A thymus érleli az immunkompetens T-sejteket, amelyek felismerik és elpusztítják a szervezet számára idegen, vagy idegenné vált sejtes elemeket. A thymusban zajló folyamatokhoz speciális mikrokörnyezet szükséges, mely biztosítja a differenciálódáshoz szükséges megfelelő sejt-sejt kontaktusokat, illetve cytokineket. Ezt a környezetet adják a thymus strómális elemei (dendritikus sejtek, macrophagok, retikuláris epithelium, ganglionléc eredetű kötőszövet), amelyek vizsgálata elvezethet a T-sejtek ontogenezisének és az azt befolyásló faktorok további részletes megismeréséhez.*

*Laboratóriumunkban a madarak nyirokszerveinek fejlődésével foglalkozunk. Kísérleteinkben a klasszikus szövettani technikákat az immuncytokémia módszerével és embryomanipulációs kísérletekkel kiegészítve vizsgáljuk a lymphoid szervek fejlődését és morfogenezisét. A morfológiai metodikák a jelenlegi immunológiai technikákkal együtt napjainkban is jelentősen hozzájárulnak az immunrendszernek, mint egésznek a megértéséhez.*

*A dendritikus sejtek jelenléte a madár thymusban nem ismeret. Eddig csupán egy MHCII+ nyúlványos sejtet izoláltak in vitro, azonban in vivo körülmények között nincs adat a madár thymus dendritikus sejtjeiről. Munkám során a madár thymus dendritikus sejtjeinek karakterizálását és fejlődésének nyomon követését tűztem ki célul.*

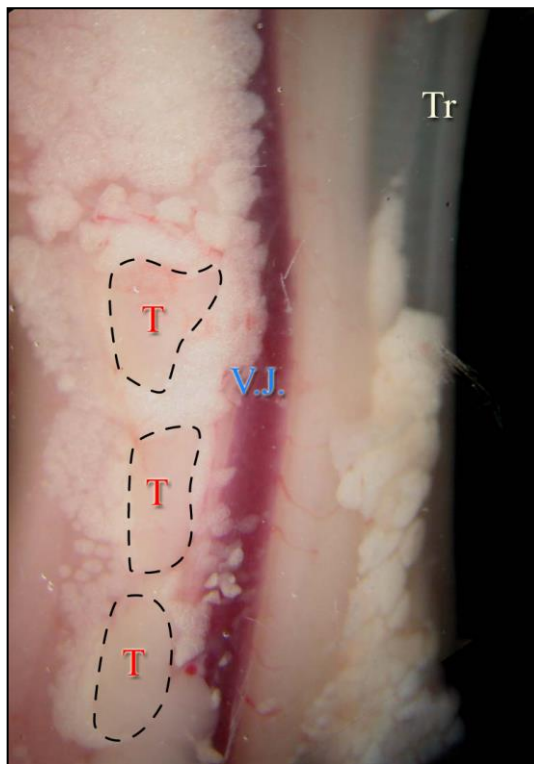
## Irodalmi áttekintés

### 1. A thymus morfológiája

A T-lymphocyták éréséért felelős megtaláljuk, azonban anatómiai elhelyezkedése változatos. A madár thymus – ellentétben az emlőssel - a nyak bőre alatt, két oldalt, a vena jugularist átfonó (**2. kép**) kötőszövetbe ágyazottan helyezkedik el (Kendall, 1980). Ovális, lapos lebenyekből álló láncot alkot, amelyek a fejtől a mellkas bejáratáig egymás mögött helyezkednek el. A lebenyek száma tyúokban 6–8; kacsában és galambban 5–6 darab. Minden egyes lebenyt ganglionléc eredetű kötőszövetes tok (capsula) vesz körül. A hematoxilin-eosinnal festett

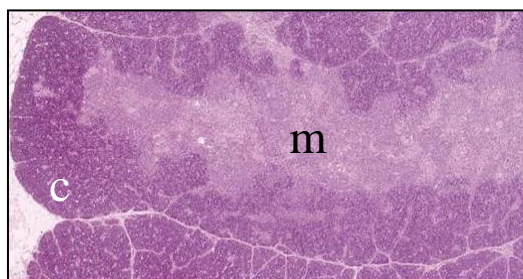
paraffinos metszeten is jól látszik (**3. kép**), hogy a csirke csecsemőmirigy szerkezete alapvetően nem tér el az emlős thymus szerkezetétől – a lebenyek számát és elhelyezkedését kivéve - hiszen itt is megtaláljuk a sötétebb színre festődött kéreg-, illetve a világosabbra festődött velőállományt. A thymus kéreg- és velőállományának stromális alapját az entodermális eredetű hámretikulum alkotja. A tokból származó kötőszöveti sövények (trabeculae) benyúlnak egészen a kéreg-velő határig (corticomedulláris határ) és ezáltal a lebenyt további lebenyekre osztják. A

thymust minden gerinces osztályban



2. kép *20 napos csirke napos embryo thymus lebenyeinek elhelyezkedése a nyakon, a vena jugularis mellett, zsírszövetbe ágyazva.*

T jelöli a thymus lebenyeket, a V.J. vena jugularist, a Tr pedig a tracheát mutatja.



3. kép *Felnőtt 10 hetes csirke thymus hematoxilin-eosinnal festett metszet.*

c –cortex, m -medulla

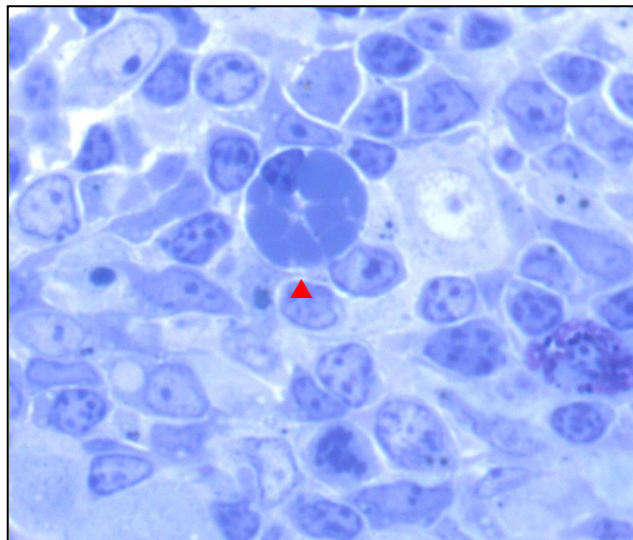
lebenyekék kéregállománya tehát a sövények által van elválasztva, velőállományuk azonban folyamatos egymással. A tok és a sövények sejtjes állományát fibrocyták, hízósejtek, granulocyták, zsírsejtek alkotják, közöttük néha plazmasejtek is megfigyelhetők.

## 2. A thymus hisztológiai szerkezete

### 2.1 Lymphoid sejtek

**T-lymphocyták** fordulnak elő legnagyobb számban a thymusban. Itt érésük, differenciálódásuk során többek között CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD25, CD28 (amely az  $\gamma\delta$  T-sejteken található) felszíni markereket fejeznek ki és egyenletesen töltik ki a kéreg- és velőállományt (Knabel és mtsai, 1993; Koskela és mtsai, 1998). A szubkapszuláris zónában főleg nagy lymphocyták (lymphoblast) foglalnak helyet, amelyek gyakran osztódnak. Sejtmagjuk világos, citoplazmájukban mitokondriumok, Golgi készülék és endoplazmatikus retikulum látható. A többi kéregrészben főleg kis és közepes lymphocytákat találunk. Ezek többnyire nem osztódó sejtek, sötét maggal, amely érésük során egyre kisebb lesz, kromatin tartalma pedig egyre kondenzáltabb állapotba kerül. Cytoplazmájuk mennyisége csökken érésük során. A velőben található nyiroksejtek ultrasrtuktúrája nem mutat különbséget a kis és közepes kérgi lymphocytákéhoz képest. A thymocyták nagy része apoptózissal elpusztul a thymusban az érés során, ezért gyakran láthatók sejtmaradványok a macrophagok cytoplazmájában.

A thymus velőállományában a T-sejtek populációja mellett  $Bulb^+$  **B-lymphocytákat** is előfordulnak, azonban ezek száma elenyésző a T lymphocyták mennyiségéhez képest.

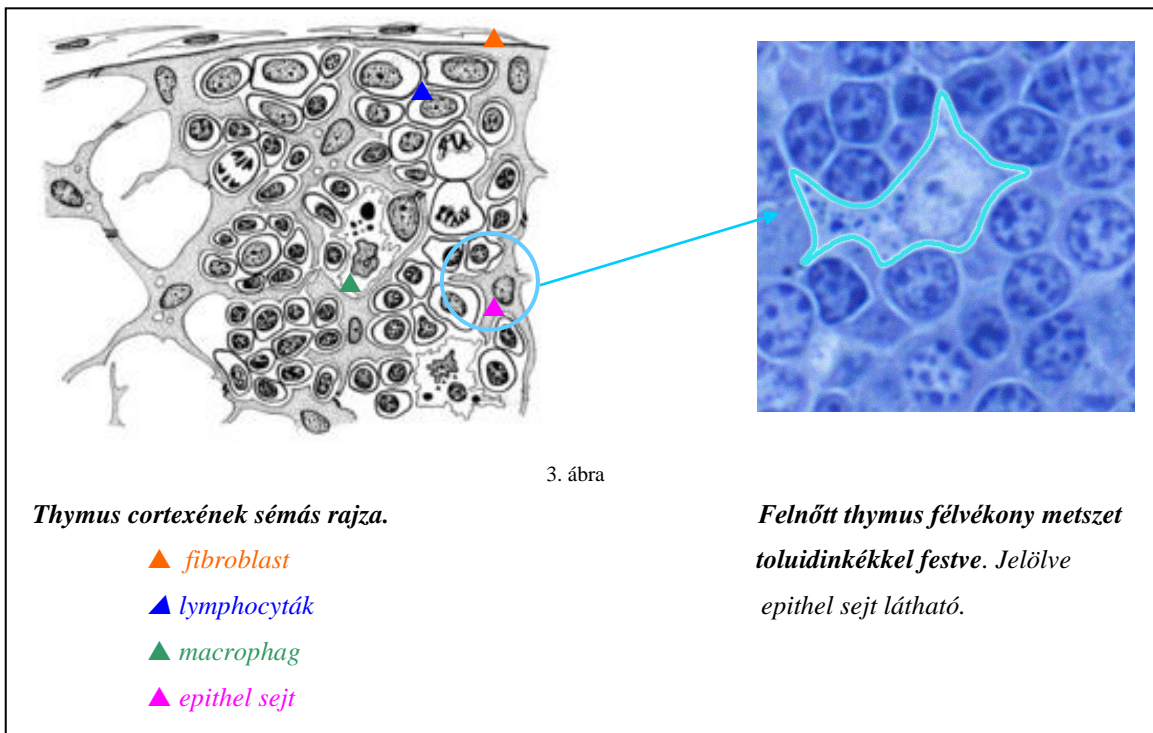


4. kép *Plazmoblast* ▲ a kötőszöveti állományban.

Madárban a lymphocyták 10% -át teszi ki a B-sejtek száma. A B-lympocyták mellett plazmasejteket is leírtak a kötőszöveti állományban. Ezek különböző differenciáltságúak, közöttük nagyobb ún. plazmoblastok is előfordulnak (**4. kép**).

## 2.2 Stromális és myeloid sejtek

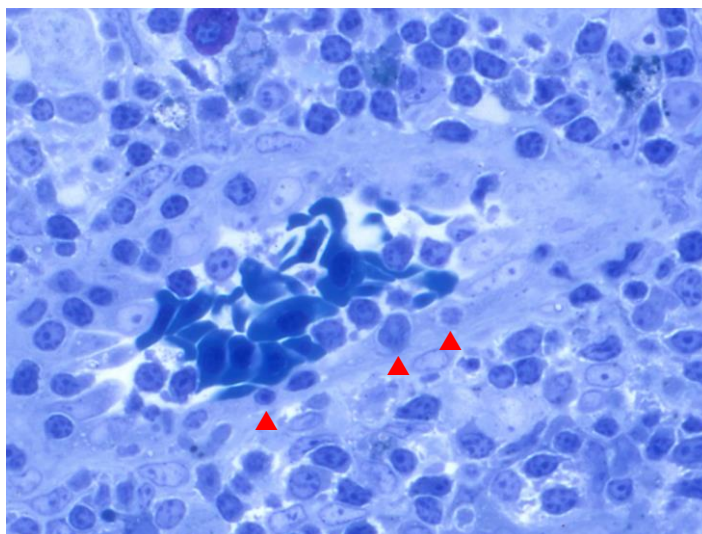
A T-sejtek éréséhez szükséges speciális mikro környezet kialakításában a retikuláris epithel sejtek, granulocyták, macrophagok és dendritikus sejtek vesznek részt. Legnagyobb számban a szerv vázát képező nyúlványos retikuláris epithel sejtek vannak jelen (**3. ábra**).



A kéregállományban laphám jellegű, elnyúlt sejteket találunk, amelyeket a lamina basalis választ el (*subcapsuláris sejtek*) a mélyebb rétegtől. Ez a sejtréteg követi a velő felé haladó sővényeket (*subtrabekuláris sejtek*), illetve a kéregbe lépő ereket (*perivasculáris sejtek*), melyek a thymus-vér gát alkotásában vesznek részt. A thymust ellátó erek a tok kötőszövetes állományában haladnak, majd a sővényekben jutnak el a kéreg-velő határra. Itt három csoportra oszlanak, melyek közül kettő a kéregállományt látja el, egy pedig a velőben kapillárisokra oszlik. Az összeszedődő vénák szintén a



sövények kötőszövetén keresztül hagyják el a thymust. A velóállomány posztkapilláris venuláin keresztül lépnek a lymphocyták a keringésbe (**5. kép**). Az epithel sejtekre a denz cytoplazma jellemző, magjuk világos és a magvacska is jól látható. Egymáshoz desmosomákkal, a lamina basalishoz pedig hemidesmosomákkal kapcsolódnak. A sejtek a kéregállomány felé nyúlványokat képeznek, ezzel kapcsolódnak a hámretikulumhoz.



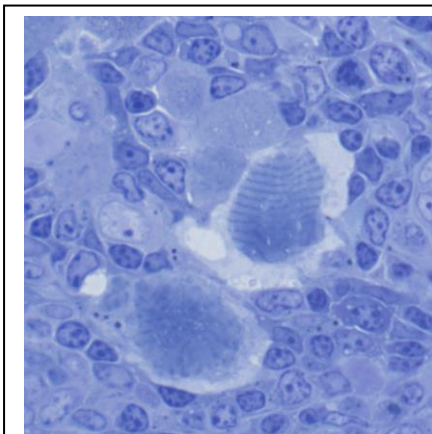
5. kép **Felnőtt csirke thymus félvékony metszet, toluidinkék festés.** Érfalat átlépő lymphocytá **▲**

A **hámretikulum** sejtjei hosszú nyúlványokkal kapcsolódnak egymáshoz, az egyes sejteket éretlen lymphocyták csoportjai veszik körül. In vitro izolált csirke thymus epithel sejtenyészetekben ún. dajka sejteket (thymic nurse cell, TNC) is megfigyeltek (Rieker és mtsai.1995), amelyeknek cytoplazmája T-sejteket tartalmaz (ezeket TNC-L-nek nevezik), és feltehetőleg ezen sejtek érési folyamataiban játszanak szerepet. A hámretikulum sejtjei általában világos magvúak, citoplazmájuk vakuolumokat, vezikulákat tartalmaz. A velőben a hámsejtek nyúlványai rövidebbek, megfigyelhetők szekretoros, illetve szekréciót nem mutató sejtek is. Feltehetőleg az előbbieket termelik a thymus eredetű hormonokat (Kendall és mtsai 1979). A kérgi hámsejtekre jellemző, hogy vakuolumok hiányoznak cytoplazmájukból. A hámsejteket az irodalom többféleképpen osztályozza. Boyd és mtsai. (1993) különböző ultrasztruktúra és monoklonális ellenanyagokkal végzett karakterizálás alapján hatféle csoportot



különböztetnek meg, melyek egy-egy CTES-t (Clusters of thymic epithelial staining) alkotnak.

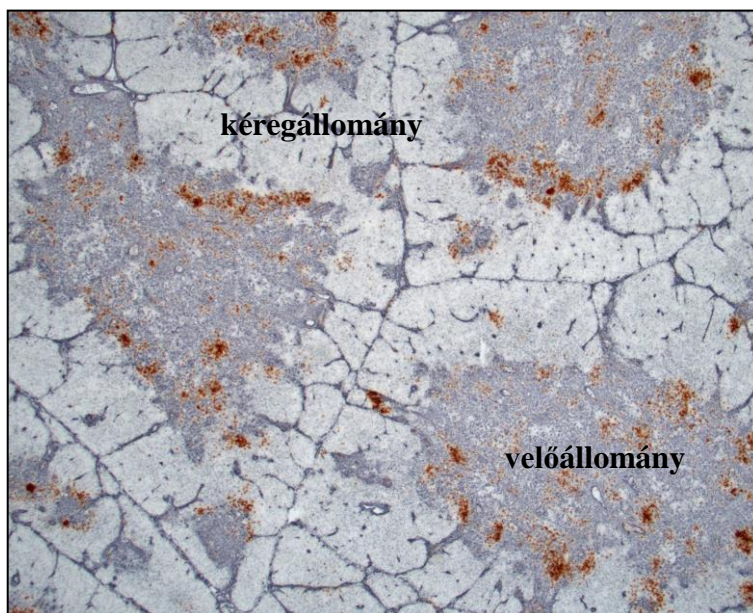
A thymus epithel vázelemei mellett myoid, neuroszekréciós és myeloid (granulocytá, macrophag, dendritikus sejt) sejtek is hozzájárulnak a thymus mikromiliójének kialakításához. A *myoid sejtek* is az izomsejtekhez hasonlóan aktin és miozin filamentumokat tartalmaznak (Raviola és Raviola 1967, Törő és Oláh 1969, Kendall és mtsai. 1981). A filamentumok szabályos szarkomérákba rendeződnek, ezáltal a sejtek harántcsíkolatot mutatnak (**6. kép**). Immuncytokémiai adatok szerint jól festődnek anti-miozinnal. Eredetüket tekintve a prechordalis mesoderma sejtekből differenciálódnak (Seifert és Christ, 1990).



6. kép *Myoid sejtek*

Számos kutatócsoport figyelt meg neuroszekréciós sejteket a thymus állományában. Ezek az ovális vagy megnyúlt morfológiájú sejtek immunpozitivást mutattak különböző neuropeptidek alkalmazásakor: methionin-enkephalin (ENK), neuropeptid-Y (NPY), vasoaktív intestinal peptid (VIP), galanin (Gal), melyek szerepet játszanak a csirke thymusában a sejt-sejt kölcsönhatásban (Sundler és mtsai, 1974; Atoji és mtsai, 1997).

A madarak heterophyl *granulocytái* mellett - amelyek megfelelnek az emlős neutrophil granulocytáinak - megtalálható az eosinophil és a basophil granulocytá is (Daimon és Caxton-Martins 1977). Oláh és mtsai. 1991-ben



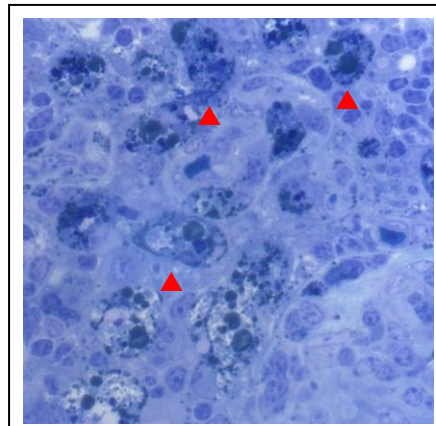
7. kép

8 hetes csirke thymusból készült fagyasztott metszet anti-vimentinnel festett átnézeti képe látható, amelyen diaminobenzidinnel (barna) az endogénperoxidáz sejtek lokalizációja figyelhető meg.

leírtak a csirke thymus corticomedullaris határán egy endogenperoxidáz és vimentin pozitív sejtpopulációt (**7. kép**). A sejtek csoportokba tömörülnek, lebonyozott struktúrával rendelkeznek, cytoplazmájukban szabálytalan alakú granulomok találhatóak. A sejt lebonyozottsága miatt hasonló szerkezetű, mint a basophil granulocytá, azonban peroxidáz aktivitása az eosinophil granulocytákkal mutat hasonlóságot. A myeloperoxidáz pozitív sejtek nem festődnek a granulocytá, monocytá, thrombocytá specifikus Gr11 és Gr12 ellenanyagokkal (Thomas és mtsai, 1993).

A thymus jellemző képződményei a **Hassall testek**, amelyek a velőállományban helyezkednek el (Onyeanusi és mtsai, 1994; Khalil 2003). Funkciójuk egyelőre még nyitott kérdés a kutatók előtt. Bizonyos vélemények szerint elkeratinizálódott epithel sejt aggregátumoknak tekinthetőek, illetve az elpusztult T-sejtek, úgymond „temetőjeként” foghatók fel. (Olah és Vervelde, 2008). Más irodalmi adatok szerint biológiailag aktív anyagokat termel, például leukoaminopeptidázt (D’Anna és mtsai, 1981), citokineket expresszál úgy, mint például IL-7-et, vagy növekedési faktorokat (TGF- $\alpha$ ) (Zaitseva és mtsai, 2002, Annunziato és mtsai, 2000).

**Macrophagok (8. kép)** elsősorban a kéregben és a corticomedullaris határon fordulnak elő. Alakjuk változó, magjuk kromatinszerkezete laza. Cytoplazmájukban gyakran található bekebelezett lymphocytákat tartalmazó fagoszómák. A velőállományban számuk kevés, fagoszómákat általában nem tartalmaznak. Az elpusztult, kisselektálódott lymphocyták eltakarításában vesznek részt. A csirke macrophagjainak kimutatására különböző ellenanyagokat sikerült előállítani, mint pl. a Kul01 (Mast és mtsai, 1998) és 74.2 (Jeurissen és mtsai, 1992) monoklonális ellenanyagokat. Az MHCII molekulára specifikus TAC1 (Guillemot és mtsai, 1984; Le Douarin és Oliver, 1984), 2D5 (Uni és mtsai, 1994) ellenanyagok is jelölik a csirke macrophagokat.



8. kép

**10 hetes csirke thymus félvékony metszet, toluidinkék festés.**

A piros nyilak a kéreg-velő határon elhelyezkedő macrophag populációt jelölik.

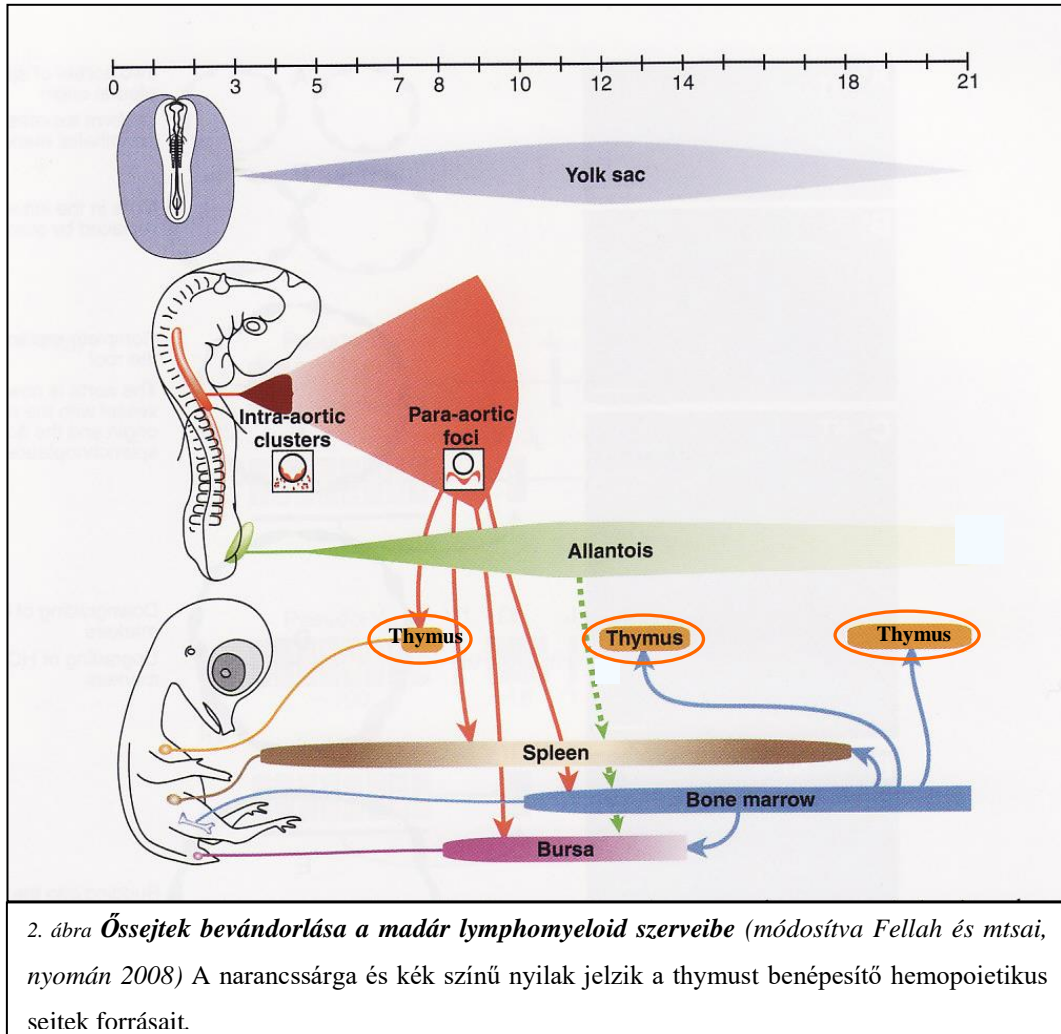
A madarak B-sejtes primér nyirokszervében (bursa Fabricii), valamint a perifériás nyirokszervekben (coecalis tonsilla, oesophagus tonsilla, pylorus tonsilla, lép és bőr) mindenhol megtalálhatóak és megbízhatóan azonosíthatóak a *dendritikus sejtek* (Oláh és mtsai, 1992; Nagy és mtsai, 2004, 2005, 2007; Igyartó, 2007).

Ezzel szemben a madár thymus dendritikus sejtjei nem ismertek, cytológiai karakterizálásuk, funkciójuk és ontogenezisük is tisztázatlan. Guillemot és mtsai. (1984), valamint Le Douarin és Oliver (1984) MHC II pozitivitásuk alapján határozták meg in vivo felnőtt állatban és embryóban, illetve thymus sejttenyészeteken végzett vizsgálatok alapján a macrophagokat, az epithel sejteket és a dendritikus sejteket. Számos kutatócsoport tett további lépéseket a madár thymus dendritikus sejtjeinek kimutatására, elkülönítésére. Ciriaco és kutatócsoportjának a neurotrophin receptorcsalád (TRKa, TRKb, TRKc) fehérjéinek kimutatásakor, a bursán és thymuson kapott eredményekben elkülönített egy a medulláris dendritikus sejtet és egy corticalis macrophagot (Ciriaco és mtsai, 1996). A c-Rel transzkripció faktor szintén kifejeződik a macrophagokban, T-lymphocytákban, epithel sejteken, valamint egy dendritikus sejt típusban (Huguet és mtsai, 1998). Mivel az MHCII, vimentin, c-Rel, KUL01, 74.2 és TRK receptor fehérjéket thymusban megfigyelt dendritikus sejtek mellett, epithel, fibroblaszt, lymphocyta, macrophag sejteken is leírták, ezért nincs madár thymus dendritikus sejtekre specifikus marker. Ehhez a hiányhoz az is hozzájárul, hogy a madár thymus dendritikus sejtjeit igazoló funkcionális vizsgálatokat eddig nem végeztek.

### **3. A thymus fejlődése**

A madarak thymusa az embrionális fejlődés 4. napján a harmadik és negyedik garattasak ventrális részéből fejlődik (Le Douarin és Jotereau, 1975; Lièvre és Le Douarin, 2004). Fejlődését a garathártya képződésekor a tasak entodermájával érintkező ectoderma indukálja. Az entoderma hámja a vena jugularis közelében sarjadzó hámkötegeket képez, amelyek összeköttetése a tasakkal a keltetés 5–6. napján megszűnik (Venzke, 1952; Ackerman és Knouff, 1964). Ez az entodermális hámtelep később több részre tagolódik és a későbbiekben ezek a részek adják a nyak két oldalán elhelyezkedő lebenyek hámretikulumát. A thymus fejlődésében fontos szerepet játszanak a ganglionlécből kivándorolt sejtek (Le Lievre és Le Douarin, 1975; Kuratani és Bockman, 1990; Kuratani és Bockman, 1991). A ganglionléc eredetű (ektomesenchimális) sejtek benépesítik a garattasak területét, körülövik az epithelialis sejtek tömegét és a későbbiek során belőlük differenciálódnak a thymus telepének kötőszöveti elemei (Bockman, 1997).

A véreredetű őssejtek először a fejlődés hetedik napján jelennek meg a csirke thymus hámtelepében (Owen és Ritter, 1969). Az őssejtek több hullámban népesítik be a thymust. A csirke-fürj kimerák segítségével bebizonyosodott, hogy a madár thymust az embryogenezis folyamán három erőteljes hullámban (a fejlődés hatodik, tizenkettedik és tizennyolcadik napján) népesítik be a progenitor őssejtek (Le Douarin és Jotereau, 1975; Dunon és mtsai, 1999) (**2. ábra**). Az egyes kolonizációs időszakokat 5-6 napos ún. refrakter (kolonizáció mentes) stádiumok választják el. Az őssejtek lassú beáramlása folytatódik a születés utáni időszakban, sőt felnőtt korban is. A hemopoietikus előalakok származási helye az adott embrionális kortól függ. Legkorábban a dorzális aortában jelennek meg vérképző szigetek a három napos embryóban (Le Douarin és mtsai, 1984). Későbbiekben a paraaortikus régió, az allantois, majd a csontvelő veszi át az embrionális vérképzés szerepét (Fellah és mtsai, 2008).



Az T-sejtek progenitorai már az első sejtbevándorlás alkalmával kimutathatóak a thymusban (Cormier, 1993; Vainio és Imhof, 1995; Dunon és mtsai, 1999). Már a thymusba érkező pre-T-sejtek felszínén kimutatható néhány molekula, melyek közé tartozik a c-kit, HEMCAM, BEN, CD44, MHC II, c128, thrombomucin,  $\alpha\text{II}\beta 3$  integrin (Dunon és mtsai, 1998; Ody és mtsai, 2000). Megfigyelték, hogy a fejlődés 12. napján jelennek meg a T-lymphocyták felszínén a T-sejt receptor molekulák (TCR) – ekkor válnak immunkompetens érett sejté (Desidero és mtsai, 1984). A  $\gamma\delta$  T-sejtek (TCR1) három nappal korábban jelennek meg, mint az  $\alpha\beta$  T-sejtek (TCR2) (Cui és mtsai, 2004). Az első beáramlást követő 5. napon, vagyis a fejlődés 12. napján kezdik el expresszálni felszínükön a  $\gamma\delta$  thymocyták a CD3 molekulát, majd további differenciálódás alkalmával a CD4, illetve CD8 molekulákat (Coltey és mtsai, 1987). A cortex expanziója után a kétszeresen pozitív,  $\text{CD4}^+\text{CD8}^+$  sejtek a medullába történő vándorlás alkalmával a sejtek klonális szelekción, illetve érési folyamatokon mennek keresztül és egyszeresen pozitív,  $\text{CD4}^+$  vagy  $\text{CD8}^+$  T-sejtek jelennek meg (Davidson és

Boyd, 1992). A CD4<sup>+</sup> segítő T-sejtek az MHC II, míg a CD8<sup>+</sup> citotoxikus T-lymphocyták az MHC I molekulával asszociált peptidet ismerik fel. A thymusból távozó, a perifériára kerülő sejtek is CD4 vagy CD8 pozitívak.

Míg a T-lymphocyták thymuson belüli differenciálódása jól követhető monoklonális ellenanyagokkal és modern molekuláris biológiai módszerekkel, addig a mikrokörnyezetet adó stromális és myeloid sejt vonal prekursorokra vonatkozóan csak néhány adat ismert. Emlősökben a relB és FoxN1 (whn) géneknek fontos szerepe van a hámretikulum, illetve a dendritikus sejtek differenciálódásakor és a thymocyták fejlődésében (Wu és mtsai, 1998; Guerin és mtsai, 2002; Balciunaite és mtsai, 2008), de ezek madár megfelelőit nem tanulmányozták az eddigi tudományos munkákban. A korai csirke embryo thymus hámsejtei a Pax1 és Pax9 transzkripció faktorokat expresszálják. Feltételezik, hogy a T lymphocyták proliferációjáért felelős mikrokörnyezeti tényezők (stromális sejtek differenciálódása, mátrix szekréciója, kompartmentalizációja) fenntartásába vesznek részt (Peters és mtsai, 1995).

## Célkitűzéseink

Laboratóriumunk fő profilja a madarak lymphoid szerveinek fejlődésének és morphogenezisének kutatása.

Szakterületemben bemutatott munkában a csirke thymus dendritikus sejtjeinek karakterizálását kívántam tanulmányozni.

Célul a következőket tűztem ki:

1. A madár thymus lymphomyeloid sejtjeinek és stromális elemeinek karakterizálása.
2. A bursai szekréciós és folliculáris dendritikus sejt specifikus marker, (74.3-as monoklonális ellenanyag) alkalmazása a thymus dendritikus sejtjeinek tanulmányozására.
3. A thymus 74.3 pozitív nyúlványos sejtek embryonális fejlődése.



## **Anyag és módszer**

### **1. Kísérleti állatok:**

Kísérleteinkhez csirke (*Gallus gallus*, White Leghorn SPF, Phylaxia-sanophi, Magyarország) és fürj (*Coturnix coturnix japonica*) embryokból, valamint kikelt állatokból nyert szerveket használtunk. A madártojásokat laboratóriumunk keltetőgépeiben forgatórácon inkubáltuk 38°C hőmérsékleten, 60%-os páratartalom mellett. A kísérletek során fontos szerveket, így a thymust sztereomikroszkóp alatt, mikropreparációra alkalmas eszközökkel (mikroolló, csipeszek, rovartűk, embryospatula) távolítottuk el. Az állatkísérletek a Semmelweis Egyetem Etikai Bizottságának jóváhagyásával történtek (engedélyszám: 779-000-2005).

### **2. Szöveti feldolgozás:**

A kísérletek során embryonális és felnőtt állatok thymusát használtuk fel, továbbá kontroll szövetek céljából lépükből, bursa Fabricijükből, májükből is mintát vettünk. A kivett szervekből immuncytokémiai és immunfluoreszcens vizsgálatokra májba ágyazott-, vagy zselatinos - fagyasztott blokkot készítettünk.

#### **2.1. Zselatin-szacharózos beágyazás:**

A szerveket pufferelt 4%-os paraformaldehidben 1 óráig fixáltuk, majd PBS-ben (foszfáttal pufferelt sóoldat) háromszor 5 percig mostuk. Következő lépésben 15%-os szacharóz (Reanal puris, Mw: 342,30) PBS oldatában (pH 7,2) hűtőszekrényben 4°C-on egy éjszakán át inkubáltuk, majd 37°C-on 1 órára, 15% szacharózt és 7,5% zselatint (Fluka, kat. szám: 04055) tartalmazó PBS-be helyeztük. Az így impregnált szerveket zselatin ággal előkészített tálkákba kiöntöttem, 4°C-on 3 percig szilárdulni hagytam, majd körbevágással kialakítottam a kívánt méretű blokkokat. Az így nyert zselatin blokkokat Shandon Cryomatrix-szal (Anatomical Pathology Ind., 67690006) kartonpapírokra rögzítettem. A kapott blokkokat folyékony nitrogénben előhűtött, -60°C-os 2-metilbután-izopentánban (Fluka, 59075) lefagyasztottam, majd felhasználásig -80°C-on tároltam.

## **2.2. Májba ágyazott fagyasztott metszetek készítése:**

A kivett szerveket foszfáttal pufferelt sóoldatban (PBS, pH=7,2) tartottuk a blokk elkészítéséig. A beágyazás során egy májszeletet 1,5x1,5 cm-es kartonpapírra helyeztünk, erre tettük a szerveket, majd vékony májdarabokkal teljesen befedtük, így elkerülhető azok kiszáradása. Az így előkészített mintát folyékony nitrogénben -198°C-on lefagyasztottuk. A későbbi felhasználásig a blokkokat -80°C-on tároltuk.

## **2.3. Beágyazáshoz használt oldatok:**

PBS: 1 liter oldat összetétele: NaCl 8g, KCl 0,2g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O 1,42g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2g, desztillált víz.

A szacharóz tartalmú PBS puffert (15m/V%) 4°C-on, a szacharózt (15m/V%) és zselatint (7,5m/V%) tartalmazó PBS-t -20°C-on tároljuk.

Pufferelt 4%-os paraformaldehid, pH=7,4 (PFA): 700ml desztillált vizet bemérünk egy 1000ml-es lombikba és 60°C-ra felmelegítjük. Hozzáadunk 40g paraformaldehidet és mágneses keverőre helyezzük. A keletkezett csapadékot cseppenként hozzáadott 20%-os (5M-os) NaOH-dal feloldjuk. Az oldatot megsűrjük, majd 250ml 0,24M PBS-t adunk hozzá. Még mindig mágneskeverőn beállítjuk a pH-t, majd az oldatot átöntve 1000ml-es mérőhengerbe, térfogatát desztillált vízzel kiegészítjük 1000ml-re. Végül sejttenyésztő flaskákba kiöntve -20°C-on fagyasztva tároljuk felhasználásig.

## **3. Metszetek készítése:**

Metszésre Shandon gyártmányú kriótómot használtunk, amelyet zselatinos blokk esetén -24°C, májba ágyazott blokk esetén -19°C munkahőmérsékletre állítottunk be. A blokkokat metszés előtt a kriosztátba helyeztük, hogy átvegyék annak hőmérsékletét. A mintákból 8-12 µm vastag metszeteket készítettünk, amelyeket poly-L-lysine-nel (Sigma, P8920) bevont

tárgylemezre vettünk fel. Az így elkészült metszeteket felhasználásig tékába rendezve - 20°C-on tároltam.

#### **4. Immunhisztokémia és immunfluoreszcencia:**

##### **4.1. Immunhisztokémia:**

Immunhisztokémiai vizsgálatainkat fagyasztott metszeten végeztük, az alábbi protokoll szerint:

A metszeteket először 37°C-on PBS-be helyeztük a zselatin kioldása és a minták rehidrációja céljából. Ezután ráértük a primer ellenanyagot [1. táblázat] (40-80 µl / metszet) a metszetre, és szobahőmérsékleten, nedves kamrában 60 percig inkubáltuk.

Szekunder ellenanyagként biotinnal konjugált lóban termelt anti-egér, ill. anti-nyúl IgG-t használtunk (Vector Laboratories BA-2000 és ; 1:200 hígításban alkalmaztuk 1%-os BSA-t és Na-azidot tartalmazó PBS-ben -PBS-BSA- feloldva), amellyel további 60 percig inkubáltunk. Mosás következett PBS-ben (3x5 perc). A szöveti endogén peroxidázok aktivitásának blokkolására küvettaiba töltött, PBS-ben 3%-osra hígított H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ba (Sigma-Aldrich, H1009) merítettük a tárgylemezeket 8-10 percre, majd újabb mosás következett PBS-ben (3x5 perc). A szekunder ellenanyagok kötődésének előhívására avidin-biotin-peroxidáz komplexet használtunk (Vectastain Elite PK-6100; Vector Laboratories). Az oldatot a cég által megadott hígításban készítettük el (1:100 arányban, PBS-ben). PBS-be kimérjük az avidin-, majd a biotinilált peroxidáz tartalmú oldat megfelelő mennyiségét, alaposan felkevertük, majd fél óra állás után használtuk fel. A metszeteket fél óráig inkubáltuk ABC-komplex-el. A következő lépés: mosás PBS-ben (3x5 perc). Előhívásra, kromogén anyagként 25 mg 4-chloro-1-naftol (Sigma; C8890) használtam 100 ml PBS-ben oldva, 500 µl 3%-os H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> jelenlétében. A feloldott kloronaftol előzetesen kimértük, PBS-be vittük, és sötétben mágneses keverőn legalább fél órát kevertettük. Kevertetés után szűrőpapíron leszűrtük és közvetlenül a felhasználás előtt hozzáadtuk a 3%-os H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-t. 25 perc inkubálás után, a kellő színreakciót elérve a metszeteket PBS-sel mostuk (3x5 perc), végül vízdékvény fedőanyaggal (Poly-Aqua Mount, Polyscience Inc., Warrington PA, USA; 18606) lefedtük. A metszeteket ezután 4°C-on, hűtőben tároltuk.

## **4.2. Immunfluoreszcencia:**

### **4.2.1. Egyszeres immunfluoreszcencia:**

A metszetek előkészítését, primer ellenanyaggal való inkubálását az immunhisztokémia fejezetben leírtakkal azonos módon végeztük. Ezt követően 40-80 $\mu$ l / metszet streptavidinnel konjugált fluorokrómot (streptavidin-Alexa, Molecular Probes, Oregon, USA; Alexa-488 cat.No.: A31619, Alexa-594 cat.No.: A32623; 1:200 PBS-BSA-ban oldva) mértünk a metszetekre, majd szobahőmérsékleten fénytől védve 45 percig inkubáltuk. A sejtmagok feltüntetésére a tárgylemezeket DAPI-val (4,6 diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride, Invitrogen, D1306) további 20 percig inkubáltuk. Mosás után (3x5 perc PBS-ben) vízdékony lefedőanyagot használtunk, majd a metszeteket 4°C-on, hűtőben, fénytől védve tároltam.

### **4.2.2. Kettős immunfestés:**

A metszetek előkészítésekor és primer ellenanyaggal való inkubálásakor a korábbi pontokban leírtakkal megegyezően jártunk el. Ezt követően a primer ellenanyaghoz igazodó faj, ill. immunoglobulin izotípus specifikus, biotinnal jelzett szekunder ellenanyaggal inkubáltunk 45 percig (anti-egér IgG1 és IgG2a: Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, AL, anti-nyúl IgG: Vector Laboratories;). Ezután a rendszerhez megválasztott színű, streptavidinhez kapcsolt fluorokrómot adtunk ( fluoreszcencia  $\lambda= 488\text{nm}$  ,vagy  $\lambda= 594\text{nm}$ ), 40-80 $\mu$ l-t metszetenként, amellyel további 45 percet inkubáltunk fénytől védve. A munkafolyamatok további lépéseit ettől a ponttól mindvégig a metszeteket fénytől óvva végeztük. A szekunder ellenanyag szabadon maradt kötőhelyeit avidin-biotin blokkoló reagens ( SP-2001, Vector Laboratories) hozzáadásával telítettük. Mosás után a tárgylemezekre felmértük a következő primer ellenanyagot, amellyel 45 percig inkubáltunk, majd az ehhez alkalmazható faj / izotípus specifikus biotinált szekunder ellenanyaggal újabb 45 percet. A kettesszámú szekunder ellenanyag kötődéseinek kimutatására a korábitól eltérő fluoreszcenciájú streptavidin-Alexát mértünk a metszetekre, majd ismételt 45 perc inkubáció következett. A sejtmagok kimutatására DAPI-t használtam, amelyet 20 percig adtam a metszetekhez. Mosás után a tárgylemezeket vízdékony lefedőanyaggal fedtem le, majd hűtőben, 4°C-on tároltam.

**4.3. Az immunfestések során alkalmazott primer ellenanyagok, előhívószerek, oldatok:**

1%-os PBS-BSA: 1g BSA-t (Bovine Serum Albumin, Sigma A9647), 100ml PBS-ben feloldunk. Szűrés után 0,1 %-ban  $\text{NaN}_3$ -at adunk hozzá.

Chloronaphthol készítése: törzsoldat készítéséhez 500mg 4-chloro-1-naphtol (Sigma, C8890) oldunk fel 2ml abszolút ethanolban, majd  $-20^\circ\text{C}$ -on tároljuk. Előhíváskor a törzsoldatból hígítunk, hogy a végtérfigat 25mg/100ml PBS legyen.

Vízoldékony lefedőanyag készítése:

2,4g Moviol 4-88 (poly-vinil-alkohol) és 6g Glicerín elegyét alaposan összekeverjük, majd 6ml desztillált vizet adunk hozzá, és szobahőmérsékleten állni hagyjuk. Ezután 12ml 0,2 M Tris puffert (pH:8,5) adunk hozzá és a keveréket  $80^\circ\text{C}$ -os vízfürdőbe helyezzük, míg teljesen homogén oldat nem lesz. A lefedő anyagot lecentrifugáljuk 15'-ig 6900-as percnkénti fordulatszámra, hogy az esetleges szennyeződések eltávolítsuk. A felülúszót szemcseppentőkbe töltjük.

**5. Félvékony metszetek készítése:**

A kivett szerveket 4%-os Millonig pufferes glutáraldehidben fixáltuk fél órán át, majd feldaraboltuk a szerveket a megfelelő méretre és tovább fixáltuk legalább két órán át ugyanilyen összetételű oldatban. Ezután Millonig pufferrel mostuk (3x5 perc), majd 12%-os osmiumtetroxiddal utófixáltuk két órán keresztül. (Az osmiumos fixálásra a további elektronmikroszkópos felhasználás miatt volt szükség.) Újabb mosás után felszálló alkoholsorban (50%, 70%, 80%, 90% és abszolút etanol), minden esetben 10 percig dehidráltuk a szövetet. Ezt az intermediummal (propilén-oxid), majd propilén-oxidban oldott műgyantával (Araldit 6005 + Polybed;Polysciences) való átítatás követte. Az átítatott szerveket műgyantába ágyasztuk, és egy éjszakán át  $4^\circ\text{C}$ -on tartottuk, majd másnap  $56^\circ\text{C}$ -on, termosztátban inkubáltuk a teljes keménység eléréséig. Az így elkészített blokkokból ultramikrotómmal készítettünk 2  $\mu\text{m}$  vastagságú metszeteket, amelyeket 1%-os toluidinkékkel festettük. A metszeteket araldittal fedtük.

## **6. Metszetek értékelése, fényképezés, képfeldolgozás:**

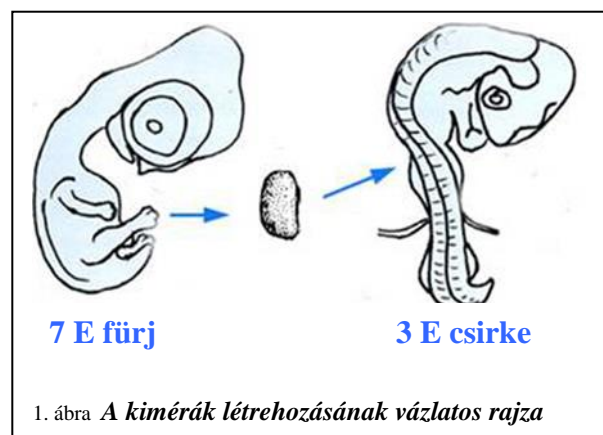
Metszeteket Zeiss Axiophot mikroszkóppal tekintettük át, és a hozzácsatlakoztatott Zeiss AxioCam HRC kamerával digitális fényképeket készítettünk különféle nagyításokon. Konfokális lézermikroszkópiát BioRad Radiance 2001 Rainbow LCM típusú mikroszkóppal végeztünk. Képek további feldolgozására, szerkesztésére Adobe Photoshop CS és Confocal Assistant programokat használtunk.

## **7. Embryomanipuláció: csirke-fürj kiméra:**

A csirke-fürj kiméra olyan élőlény, amely szervezetét mindkét fajból származó sejtek alkotják. A kimérák létrehozása során egyik fajból a másikba sejteket, szöveteket transzplantálunk. A két faj sejtjei mikroszkóp alatt immunfestés nélkül is elkülöníthetők a kromatinállomány szerkezete alapján – a fürjsejtek heterokromatinja egy rögbe kondenzálódik, míg a csirke heterokromatin finoman hálózatszerű. A kiméra szövet összetétele tehát egyszerűen nyomon követhető, mivel a magok szerkezete mindvégig magán viseli az adott faj jellegzetességéit. Mára már a különböző eredetű sejtek azonosítására számos faj- és sejtspecifikus ellenanyag elérhető. Így például QCPN antitesttel a fürj sejtek magja, 8F3 ellenanyaggal a csirke sejtek cytoplasmája jelölhető.

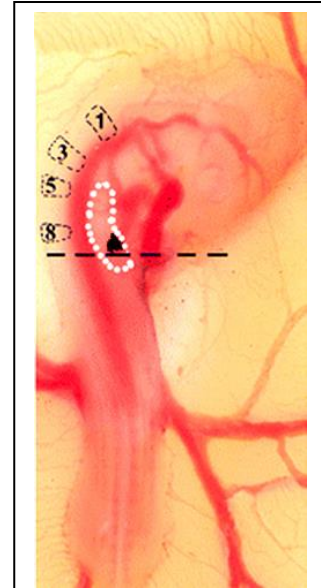
### **7.1. A csirke-fürj thymus kimérák létrehozása:**

A thymus kimérák létrehozásakor hét napos fürj embryok thymusát ültettük át három napos csirke embryok testüregébe, ami optimális környezetet biztosít a graft megtapadásához, továbbfejlődéséhez. (1. ábra) Az embryomanipulációs kísérleteket steril eszközökkel, Penicillin-Streptomycin-t tartalmazó steril PBS-be (röv: PenStrep-PBS) oldattal végeztük.



A kísérlet során 7 napos fürj embryok thymusát használtunk donorként. A kiemelt fürjeket PenStrep-PBS-be helyeztük. Az embryok fejlődő thymus-ait sztereomikroszkóp alatt

alkalmas csipeszek, ollók, injekciós tűk segítségével eltávolítottuk, majd a beültetésig PenStrep-PBS-be helyeztük. A recipiens szervezetek háromnapos csirke embryo voltak, amelyek fejlettsége a 18. és 20. stádium között volt Hamburger-Hamilton szerint. A tojások tompa végén bevezetett fecskendőn keresztül 2ml albumint távolítottunk el, hogy az embryo lesüllyedjen. Ezután a fejlődő csirke felett 2cm átmérőjű ablakot vágunk a tojáshéjon, majd a héjhártya megnyitásával láthatóvá tettük az embryo-t. A megnyitott tojásba 2-3 alkalommal PenStrep-PBS-t cseppentettünk. Wolfram szálból készített késsel metszést ejtettünk a recipiens embryo ektodermáján és az így képzett, testüregbe nyíló sebet üvegbottal kitágítottuk, hogy a graft könnyedén behelyezhető legyen. A transzplantációra szánt thymus telepet szénszemcsékkel megjelöltük, a fogadó embryo helyezettük, üvegbot segítségével orientáltuk. Az optimálisan behelyezett



1. kép

*Három napos recipiens csirke embryo fotója, az átültetett, megjelölt thymus grafttal*

transzplantátum a jobb tüdő-szív-aorta-májtelep által határolt testüreg részletben fejlődött tovább (**1. kép**). Végezetül a tojáshéjat átlátszó ragasztószalaggal zártuk le, és a kimérákat további 12-14 napig visszahelyeztük a keltetőbe. Az inkubációs idő lejárta után a kimérákban finom preparációval eltávolítottuk a szénnel megjelölt graft thymusokat, csipeszek és injekciós tű segítségével megtisztítottuk a környező szövetelemektől, majd a korábbi pontokban leírtaknak megfelelően szövettani feldolgozásukat kezdtük meg.

## **7.2. Az átültetéskor használt oldatok és vegyszerek elkészítése:**

PenStrep-PBS: Penicillin-G porból (Sigma; P-4687; 1594 UI/mg) 60 mg-t 10 ml fiziológiás sóoldatban feloldunk. Streptomycin porból (Sigma; S-1277; 735 UI/mg) 1g-t 5 ml desztillált vízben feloldunk. Ebből 50 µl hozzámérünk a 60 mg / 10 ml-es Penicillin-G oldathoz. Az így készült keveréket 1l, előzőleg sterilizált PBS-hez hozzámérjük.



### 7.3. Felhasznált primer antitestek

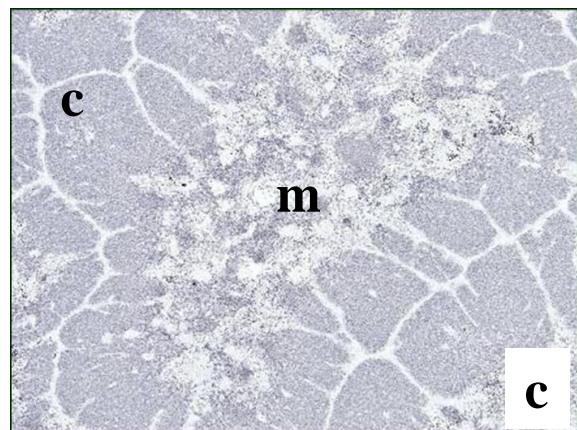
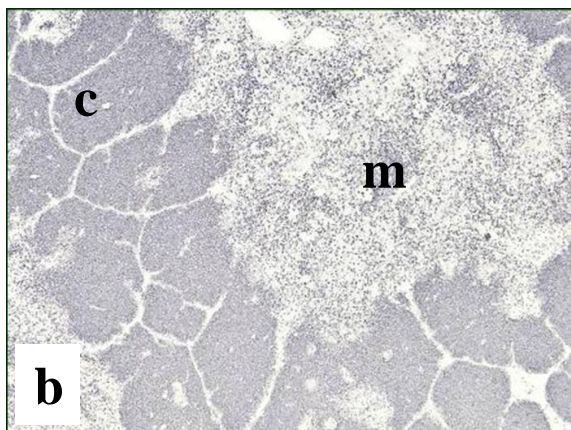
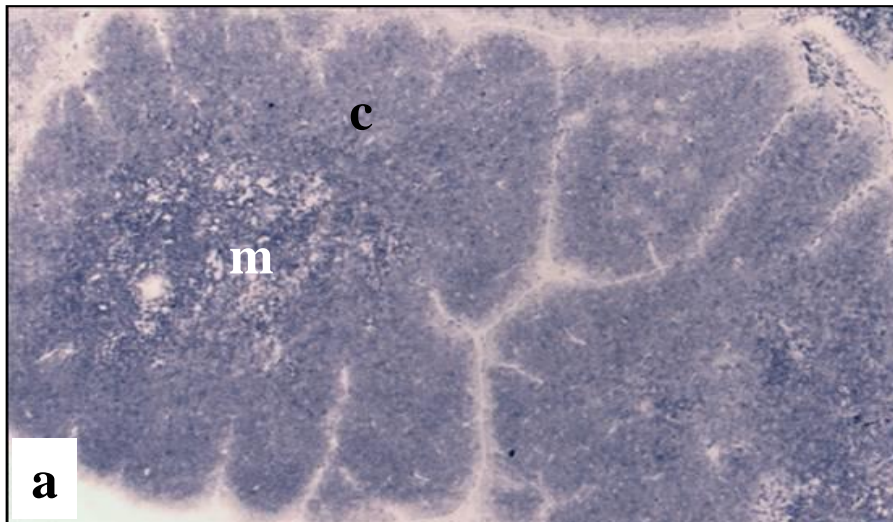
Primer antitest	Antigén specificitás	Felismert sejt típusok	Beszerezés forrása / Forgalmazó:	Izotípus
<b>CT3</b>	CD3	minden T-sejt	Chen-lo H. Chen (Birmingham, USA) szívességéből	IgG1
<b>CT4</b>	CD4	T <sub>h</sub> -sejtek	Chen-lo H. Chen (Birmingham, USA) szívességéből Forgalmazó: Southern Biotechnology	IgG1
<b>CT8</b>	CD8	T <sub>c</sub> -sejtek	Chen-lo H. Chen (Birmingham, USA) szívességéből Forgalmazó: Southern Biotechnology	IgG1
<b>B7H6</b>	Bu-1a + Bu-1b	B-sejtek (és macrophagok egy alcsoportja)	saját laboratóriumunkban előállított antitest	IgG1
<b>GRL1</b>	Membrán glikoprotein	csirke thrombocyták és granulocyták	DSHB	IgG1
<b>GRL2</b>	Membrán glikoprotein	csirke thrombocyták, granulocyták és myeloid progenitorok	DSHB	IgG3
<b>2D5</b>	MHCII	exogén antigént prezentáló sejtek	DSHB	IgG2b
<b>TaP 1</b>	MHC II	exogén antiént prezentáló sejtek	DSHB	IgG2a
<b>TaC1</b>	MHC II	exogén antigént prezentáló sejtek	DSHB	IgG3
<b>CVI-ChNL-74.2</b>	Ismeretlen	érett macrophagok	CEDI-Diagnostics	IgG1
<b>KUL01</b>	Ismeretlen	csirke monocyták, macrophagok, interdigitáló sejtek és aktivált microglia	Bruno M. Goddeeris (Leuven, Belgium) szívességéből	IgG1
<b>CVI-ChNL-74.3</b>	Ismeretlen	follicularis dendritikus sejtek és prekurzoraik	CEDI-Diagnostics	IgG1
<b>Amf-17b</b>	Vimentin	madár dendritikus sejtek,	DSHB	IgG1
<b>Lu-5</b>	Cytokeratin	madár hámsejtek	BMA, Biomedicals AG Augst, Switzerland	IgG1
<b>8F3</b>	Cytoplasmátikus csirke sejt marker	valamennyi csirke sejt	DSHB	IgG1
<b>QCPN</b>	Fürj sejt mag marker	valamennyi fürj sejt	DSHB	IgG1

## EREDMÉNYEK

### 1. A madár thymus sejteinek immuncytokémiai karakterizálása

Munkánk során a csirke thymus morfogenezisét vizsgáltuk a hagyományos immuncytokémia módszerét ötvözve a modern embryomanipulációs technikákkal. Első lépésben a thymust alkotó sejtek immuncytokémiai karakterizálását végeztük el.

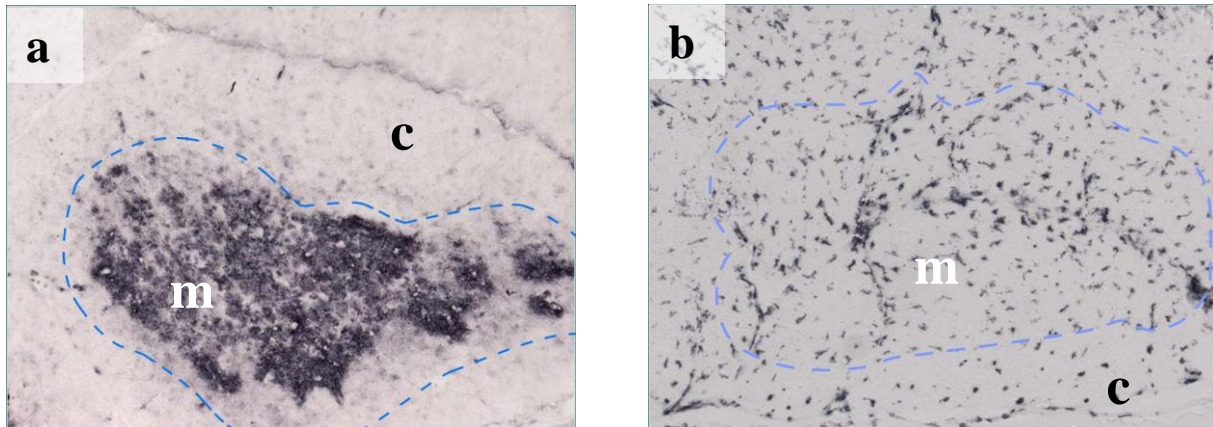
Az emlősökben leírt T lymphocytá populációnak megfelelően, a madarakban is a T-sejtekre specifikus CD3 membránantigén intenzív festődést mutatott a thymus kéregállományában (**9/a kép**). Az érés során ezek a sejtek elveszítik CD4/CD8 dupla pozitivitásukat, és a velőállományba már, mint CD4 (**9/b kép**) vagy CD8 (**9/c kép**) pozitívan érkeznek.



9. kép 8 hetes csirke thymus T-sejt populációjának elrendeződés. **a:** CD3 pozitív sejtek lokalizációja a thymus állományában. **b:** CD3/CD8 pozitív sejtek elrendeződése a csirke thymusban. **c:** CD3/CD4 pozitív sejtek elrendeződése a csirke thymusban. c-cortex, m- medulla

A thymus velőállományában a T lymphocyták között nagyszámú Bu1b<sup>+</sup> B lymphocytát is azonosítottunk (10/a kép).

Csirke macrophagok azonosítására számos monoklonális ellenanyag (74.2, KUL01, 68.2, K1) áll rendelkezésünkre. A csirkében széles körben használatos, 74.2 macrophag specifikus markerrel jelölt sejtek, a thymus egész állományát behálózzák (10/b kép).



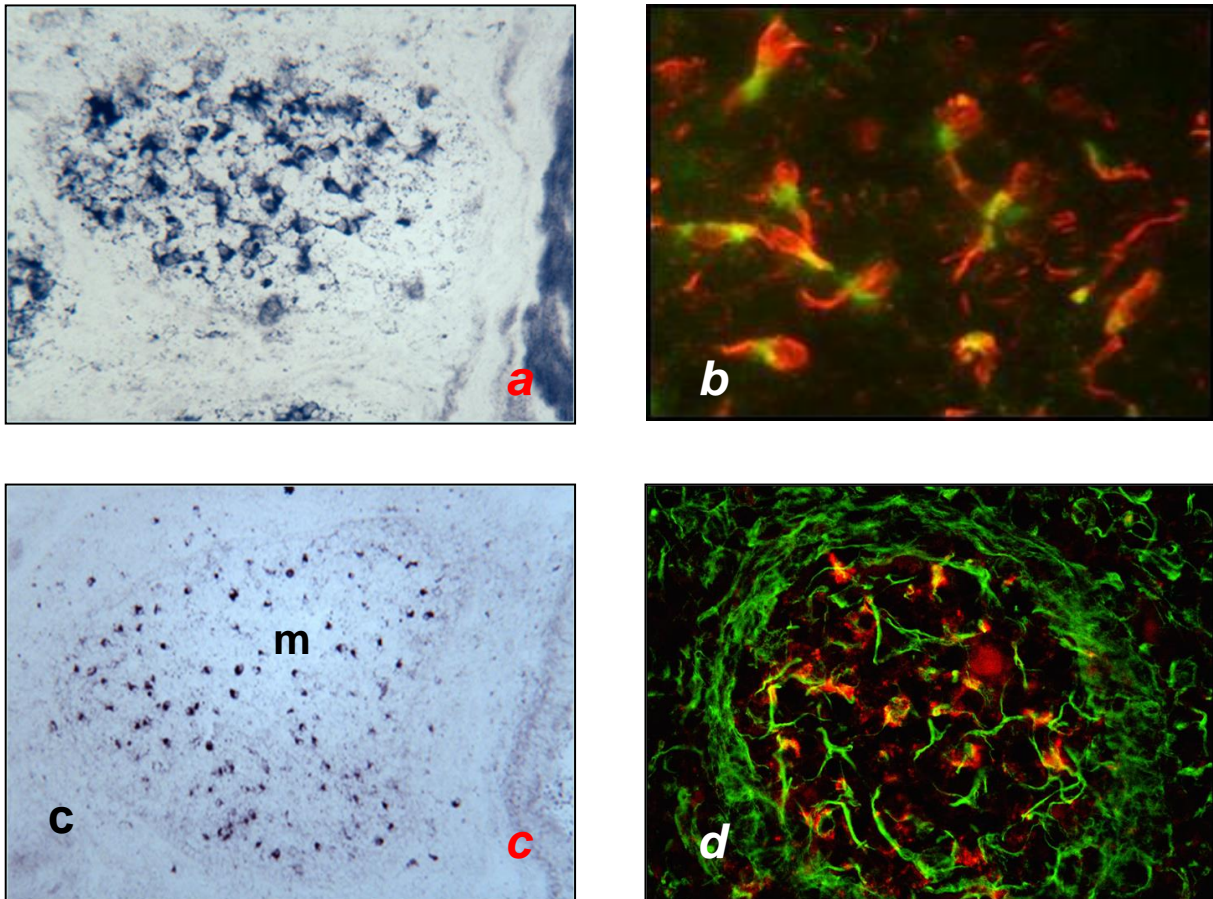
10. kép 8 hetes csirke thymus. a: Bu1b<sup>+</sup> lymphocyták lokalizációja a thymus velőállományában. b: 74.2<sup>+</sup> macrophagok hálózatos elhelyezkedése a thymus egész területén. c-cortex, m-medulla

A lymphocyták és macrophagok mellett, néhány Grl-1, K1, Grl-2 pozitív thrombocyta és granulocyta is előfordul a thymus velőállományában (nincs kép).

További vizsgálataink fókuszában a csirke thymus dendritikus sejtjei álltak. Mivel e sejtek ismeretlenek a csirke thymusában, ezért olyan markert használtunk, ami más nyirokszervekben (bursa Fabricii, coecalis tonsilla, lép, pylorus tonsilla, oesophagus tonsilla) is dendritikus sejtet jelöl. A 74.3 csirkespecifikus monoklonális ellenanyag a lép csíracentrumaiban follicularis dendritikus sejteket, míg a bursa Fabricii-ben bursai szekréción dendritikus sejteket festi (Jeurissen és mtsai. 1992, Nagy és mtsai. 2004). A csíracentrumok és bursa folliculusok dendritikus sejtjeit a mesenchymális sejtekre jellemző vimentin intermedier filamentum expressziója alapján is lehet azonosítani (Oláh és mtsai. 1992, Oláh és Glick 1994, Nagy és mtsai. 2004). Mivel, szemben a vimentinnel, a 74.3 marker kizárólag a dendritikus sejteken van jelen, ezért ezt az ellenanyagot választottuk a thymus dendritikus sejtjeinek tanulmányozására. Felnőtt csirke coecalis tonsilla folliculusaiban a 74.3 ellenanyag follicularis dendritikus sejteket jelöl (11/a kép). Hasonló reakció figyelhető meg a lép csíracentrumában is, amit a 74.3 antitesttel és vimentinnel való kettős immunfluoreszcens festés is mutat (11/b kép). A képen látható, hogy a piros színnel jelölt 74.3 kolokalizál a

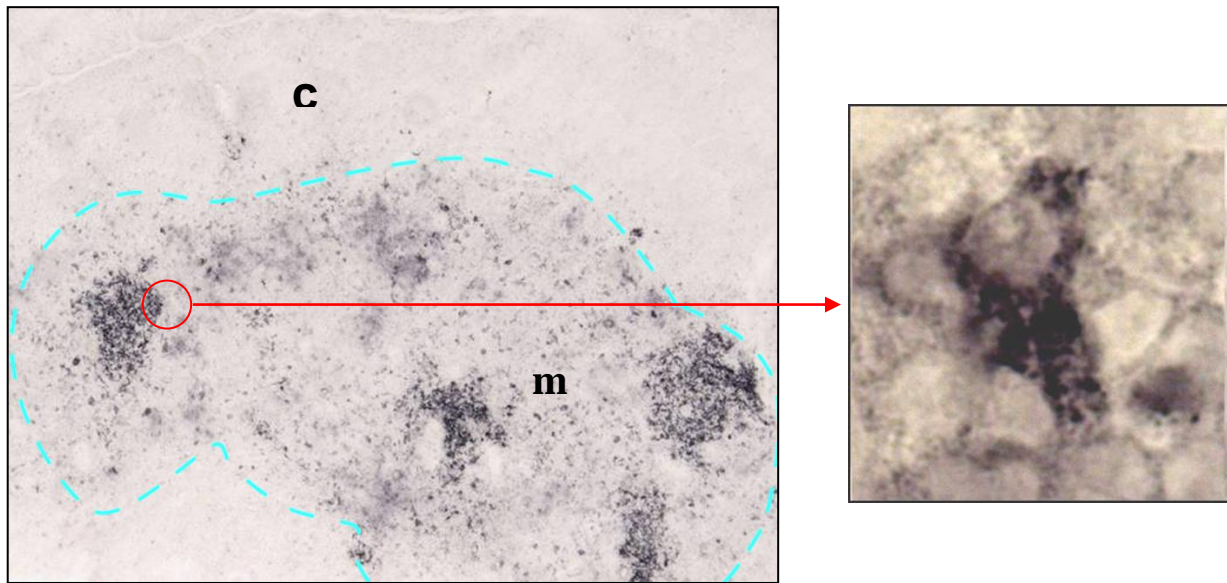


vimentinnel. Ugyanezt a kettős immunfluoreszcens festést alkalmazva a bursában, hasonló festődést kapunk ahol a 74.3 a bursai dendritikus sejteket jelöli a velőállományban, illetve e festés is mutatja a vimentin és a 74.3 kolokalizációját.



11. kép *8 hetes felnőtt csirke nyirokszervei*. a: coecalis tonsilla (74.3) b: lép csíracentruma (74.3/Vim) c: bursa Fabricii (74.3) d: bursa Fabricii (74.3/Vim) c: cortex, m: medulla

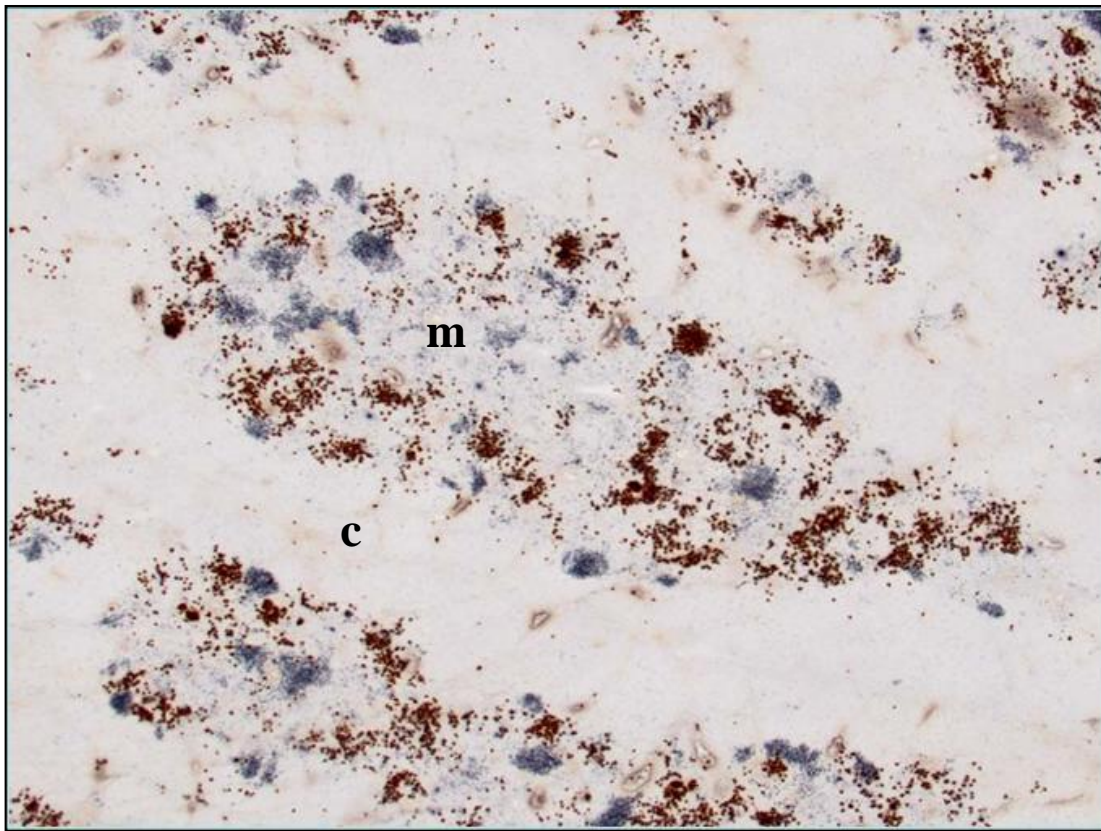
A 74.3 pozitív ellenanyag a thymusban is egy nyúlványos sejtípust jelölt, amely a kéreg-velő határon lokalizálódik és nagy számban mutat csoportos elrendeződést. Nagyobb nagyítással vizsgálva jól látható, hogy a 74.3 pozitív sejtek nyúlványos sejtek cytoplazmája granuláris szerkezetet mutat (**12. kép**). Hasonló granuláris expressziót ad a bursai szekréción dendritikus sejtek, illetve a follicularis dendritikus sejtek 74.3 intracytoplazmatikus pozitivitása (Nagy és mtsai. 2004, Nagy és mtsai. 2005, Nagy és Oláh, 2008).



12. kép **74.3 pozitív sejtek előfordulása 8 hetes csirke thymusának velőállományában.** A bal oldali képen a thymus számos 74.3 pozitív sejt található a velőállományban csoportokba tömörülve. A jobb oldali képen nagyobb nagyítással egy 74.3 pozitív nyúlványos sejt látható. c-cortex, m-medulla

Az immuncytokémiai karakterizálás során a 74.3 pozitív sejtek csoportjai mellett egy másik sejtípust is találunk, amely szintén csoportokat alkot a thymus corticomedullaris határán. Ez utóbbi sejtek magas endogénperoxidáz aktivitást mutatnak, amit a peroxidáz hisztokémiai reakciójával, diaminobenzidin (DAB) chromogén szubsztrát felhasználásával lehet kimutatni. A DAB pozitivitás vörösés-barna színnel jelöli a peroxidáz pozitív sejteket.

A két sejtpopuláció – 74.3 pozitív sejtek és az ún. myeloperoxidáz pozitív sejtek- elkülönítésére kettős immunhisztokémiai festést használtunk. Jól látható a thymusról készült metszeten, hogy a kék színnel festődő, kloronaftollal előhívott 74.3 pozitív sejtek a thymusban a kéreg-velő határon csoportokba rendeződnek. A 74.3 pozitív sejtek csoportjai mellett a barna színnel jelölt diaminobenzidinnel előhívott, szintén csoportokba rendeződött myeloperoxidáz pozitív sejtek tömörülését láthatjuk. A két populáció nem mutat kolokalizációt (**13. kép**).



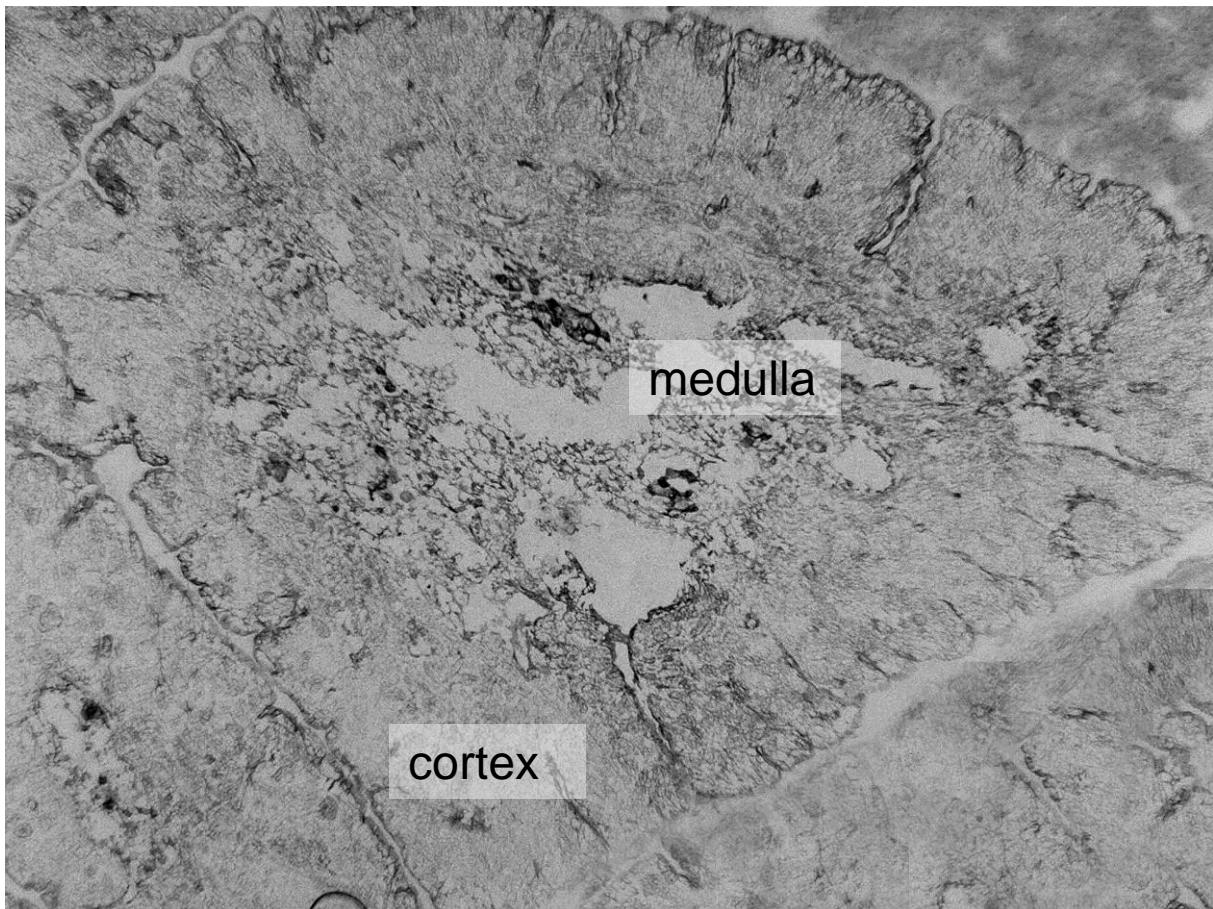
13. kép **8 hetes csirke thymusból készített fagyasztott metszet.** Vöröses-barna színnel a diaminobenzidinnel előhívott myeloperoxidáz pozitív sejtek csoportosulása látható a kéreg-velő határon. A kék színnel jelölt 74.3 pozitív sejtek csoportjai a DAP pozitív sejtek csoportja mellett helyezkedik el. c: cortex, m: medulla

A dendritikus sejtekre jellemző MHC II kimutatására számos specifikus monoklonális ellenanyagot alkalmaztunk. Ezek között volt amely külföldi laborokkal való kollaborációból származik (P2M11) vagy kereskedelemben elérhető (TAP1, TAC1, 2D5). Guillemot és mtsai. 1984-ben leírták, hogy csirkében az MHC II pozitív sejtek dendritikus sejtet, macrophagot és az epithel sejteket mind jelöli. Mi is hasonló festést kaptunk valamennyi tesztelt ellenanyaggal (nincs kép). A thymus hámsajtjei és hemopoiotikus sejtjei is MHC II pozitívak voltak. A 74.3 és MHCII kolokalizációjának meghatározását kettős immunfluoreszcens festéssel és konfokális mikroszkópiával szeretném a jövőben kideríteni.



## 2. A madár thymus stromális sejtjeinek karakterizálása

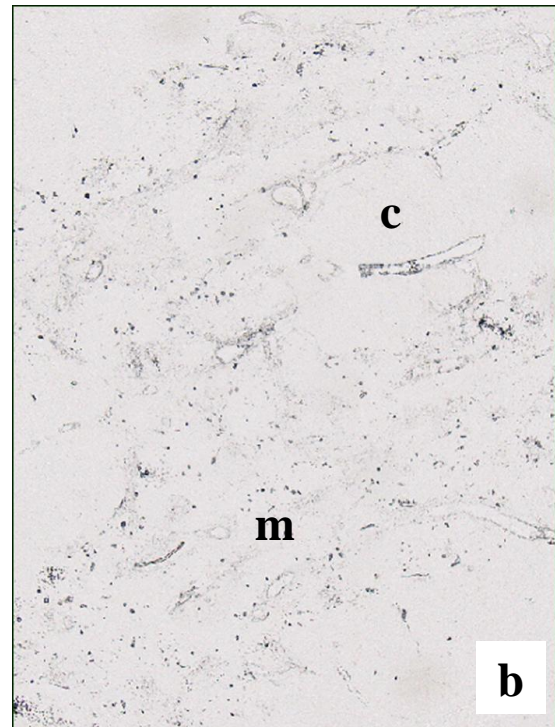
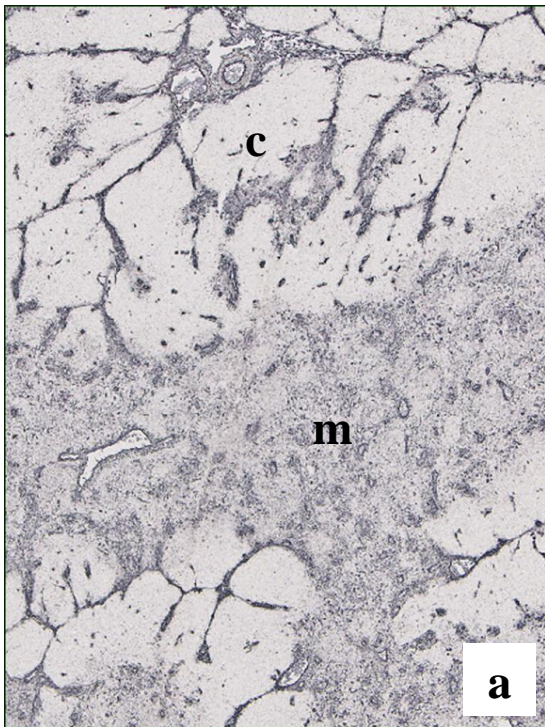
A thymus stromális elemei (hámsejtek és kötőszövet sejtek) hozzájárulnak a T-sejtek éréséhez szükséges speciális mikrokörnyezet kialakításához. A thymus jellegzetessége, hogy stromális alapvázát nem mesenchymalis eredetű reticulumsejtek, hanem endodermalis eredetű hámsejtek hálózata képezi. A thymus epithel sejtjeinek jelölésére anti-cytokeratint használtunk. A subcapsularis hám jól festődik a kéregben. A tokból benyúló sővények mentén, egészen a kéreg-velő határig követhetőek ezek a sejtek. Itt, az eddig sima felszínű hám retikulárisává válik, mintha a subcapsularis hám felszakadozna, és ez a keratin pozitív retikularis hám jellemzi a kéreg- és velőállományt egyaránt. A homogén festődést mutató kéreggel ellentétben, a velőállományban cytokeratin pozitív és negatív területek váltakoznak. A kiterjedt keratin mentes területek folyamatosak a tokból kiinduló és a velőben kitáguló kötőszövetes sővényekkel (**14. kép**).



14. kép 8 hetes felnőtt csirke thymusból készült fagyasztott metszet anti-humán cytokeratinnal festett átnézeti képe. A kéreg homogén keratin festődése, a velőállományban pedig a keratin pozitív és negatív területek láthatóak.

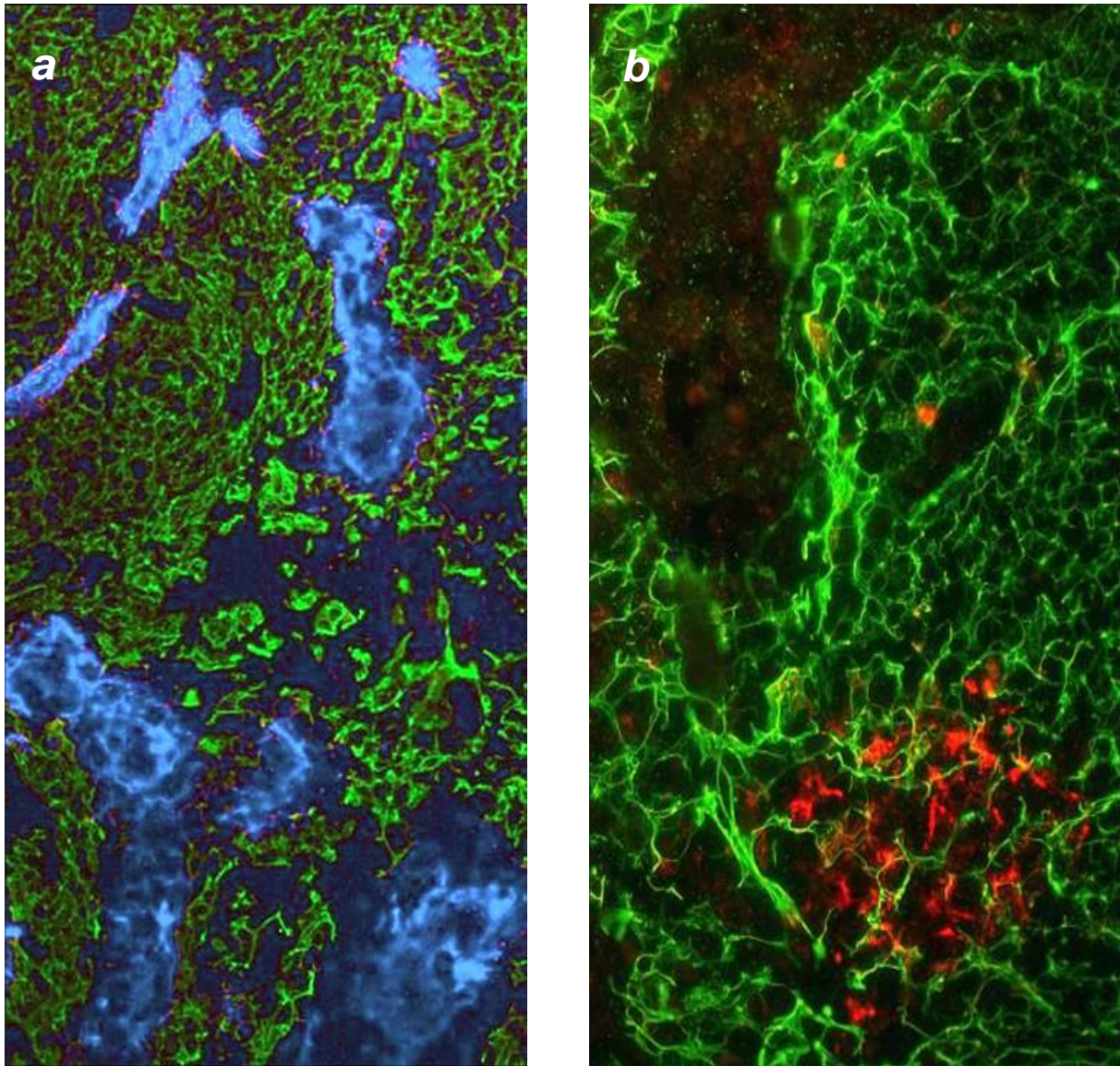


A csirke thymusában a hámretikulum mellett a kötőszövet vimentin, dezmin és III. típusú kollagén pozitív területei figyelhetőek meg. Vimentinnel festett thymusban a klasszikus kéreg-velő tagozódását kapjuk. A kéregállományban elszórtan található csak néhány pozitív sejt, azonban a szerv tokja és a sövények kötőszöveti állománya erősen festődik. A kéreggel ellentétben, a velőállományban csaknem minden sejt expresszálja a vimentint (**15/a kép**). Ezzel szemben a dezmin csak bizonyos területeken mutat pozitivitást (**15/b kép**). A dezmin pozitív sejtek: kötőszöveti sejtek, myoid sejtek és az erek simaizom sejtjei. A III. típusú kollagén a vimentinhez hasonlóan a sövényeket jelöli és a hámmentes területek kötőszövetes szigeteit tölti ki (**15/a kép**).



15. kép *Felnőtt csirke thymusból készült sorozatmetszet vimentinnel és dezminnel festve.* Az anti-vimentin (**a**) a kéregállományt és a kötőszöveti sövényeket is jelöli, illetve az egész velőállományban kimutatható, szemben az anti-dezminnel, (**b**) ami csak bizonyos területeken (a velőállományban elszórtan, myoid sejtekben) ad pozitivitást. c-cortex, m-medulla

Kettős immunfluoreszcens technikát alkalmazva, kimutattuk, hogy a madarak thymusára keratinmentes, de kollagén pozitív terület és kollagén negatív, de keratin pozitív területek, azaz hámsejtes és hámsejtmentes területek figyelhetőek meg (**16/a. kép**).



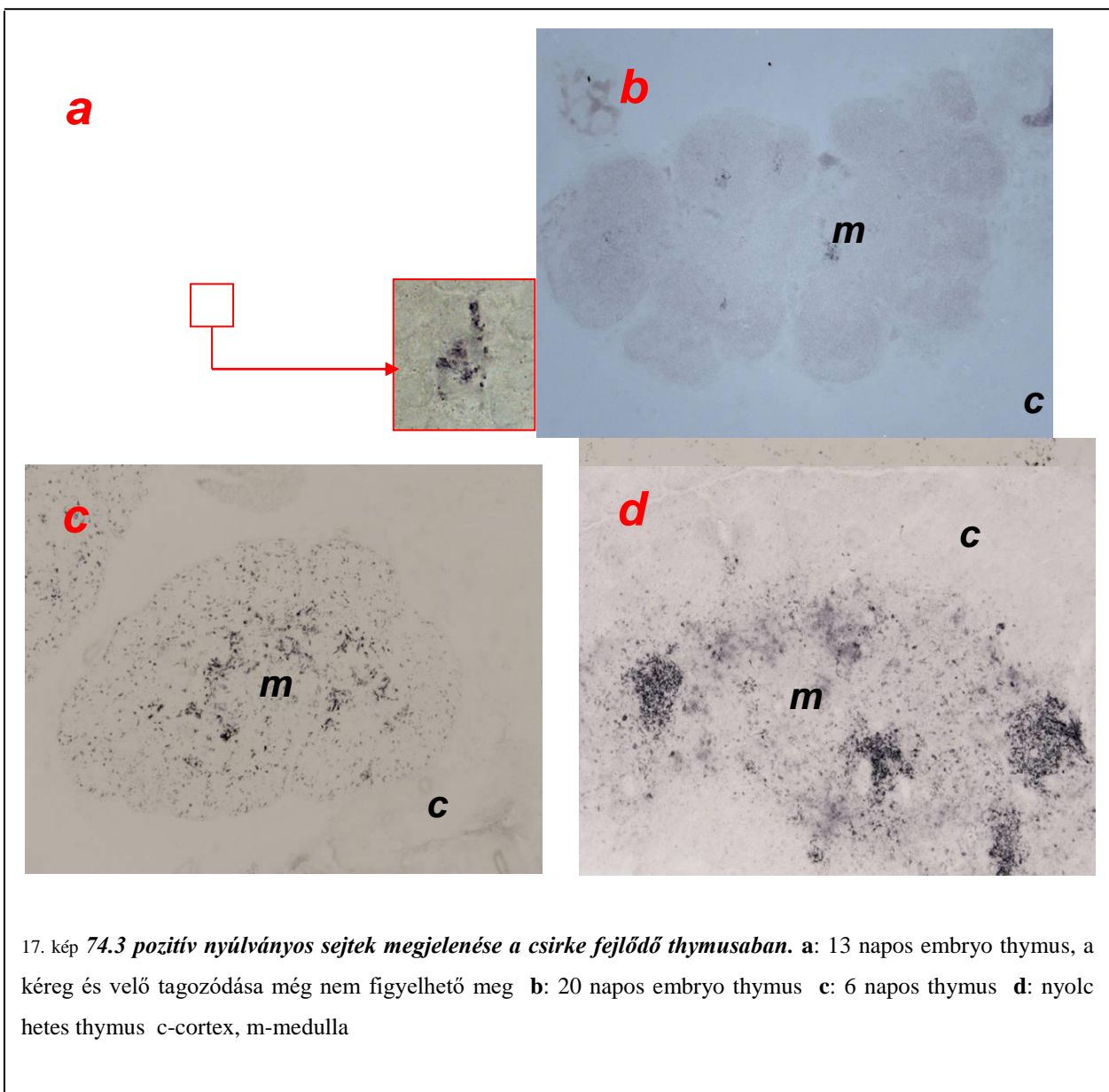
16. kép *8 hetes felnőtt csirke thymus fagyasztott metszeten kettős immunfluoreszcens festés.* A kollagén pozitív kötőszövetes területek a velőállományban kitöltik a keratin pozitív sejtek által szabadon hagyott mezőket (a), ahol a 74.3 pozitív sejtek lokalizálódnak. **a: kollagén/cytokeratin b: 74.3/cytokeratin**

Szintén kettős immunfluoreszcenciával, a számunkra érdekes 74.3 pozitív nyúlványos sejtek thymuson belüli előfordulását is megvizsgáltuk. Eredményeink azt mutatják, hogy cytokeratin pozitív, hámsejtes területen lokalizálódnak a 74.3 pozitív pirosan világító nyúlványos sejtek (**16/b. kép**).



### 3. A thymus 74.3 pozitív nyúlványos sejtjeinek embrionális megjelenése

Embrionális vizsgálataink során a 74.3 pozitív sejtek megjelenését követtük nyomon a fejlődő csirke thymusában. Az első 74.3 pozitív sejtek a fejlődés 13. napján jelennek meg a thymus centrális részében, a leendő kéreg-velő határon (**17/a kép**). A következő napokban a 74.3 pozitív sejtek felszaporodnak és a 20 napos embryo thymusában már jól kivehetően a thymus egész területét elszórtan benépesítik (**17/b kép**), azonban csoportokat még nem alkotnak. A kikelést követő 6. napon már egyfajta tömörülés jellemző a sejtekre, azonban igazi csoportos elrendeződést csak felnőtt korban mutatnak (**17. kép**).



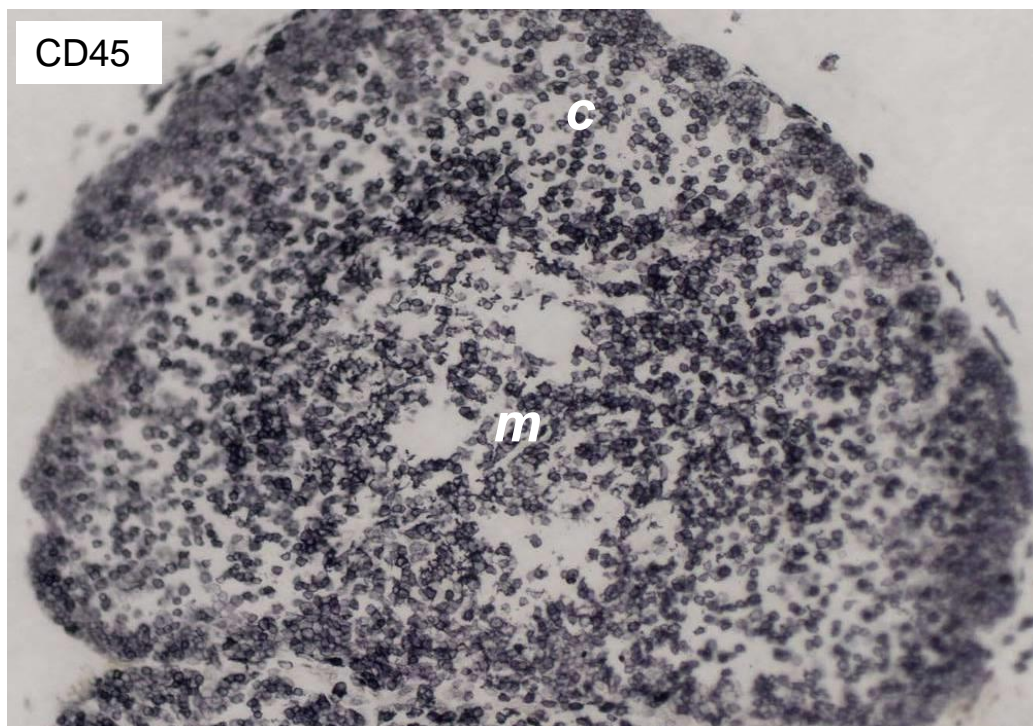
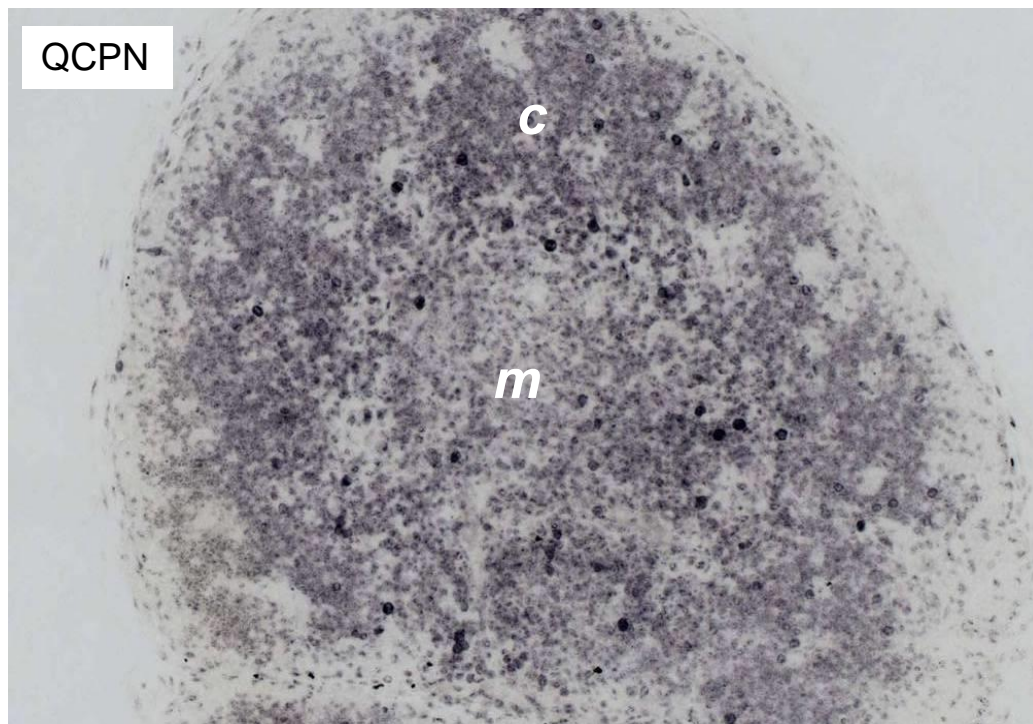
### 3. A 74.3 pozitív sejtek ontogenezisének vizsgálata csirke-fürj thymus kimérák létrehozásával

A kimérák segítségével kimutatható, hogy a 74.3 pozitív nyúlványos sejtek a thymusba bevándorló véreredetű sejtek vagy *in loco* képződő stromális eredetű sejtek. E kérdések megválaszolására embryomanipulációs technikák alkalmazásával csirke-fürj thymus kimérákat hoztunk létre.

Kísérleteink során hét napos embryok thymus lebenyek kezdeményeit transzplantáltuk három napos csirke embryok testüregébe a szív mögé, a tüdő és a vese előtelepe közé, majd 10 napig inkubáltuk. Azért választottuk a 7 napos embryo thymusát a transzplantációhoz, mert így a vérsejtek által egyáltalán nem vagy alig voltak kolonizálva. A fogadó embryo testüregé ideális környezetet jelent a graftok továbbfejlődésére azáltal, hogy a vaszkularizáció révén biztosítja a graftok tápanyag ellátását, valamint lehetőséget teremt a véreredetű sejtek kolonizációjára.

*10 darab transzplantációt végeztünk, melyekből 7 életben maradt kiméra embryot nyertünk (70%), melyek szövettani feldolgozásra kerültek.*

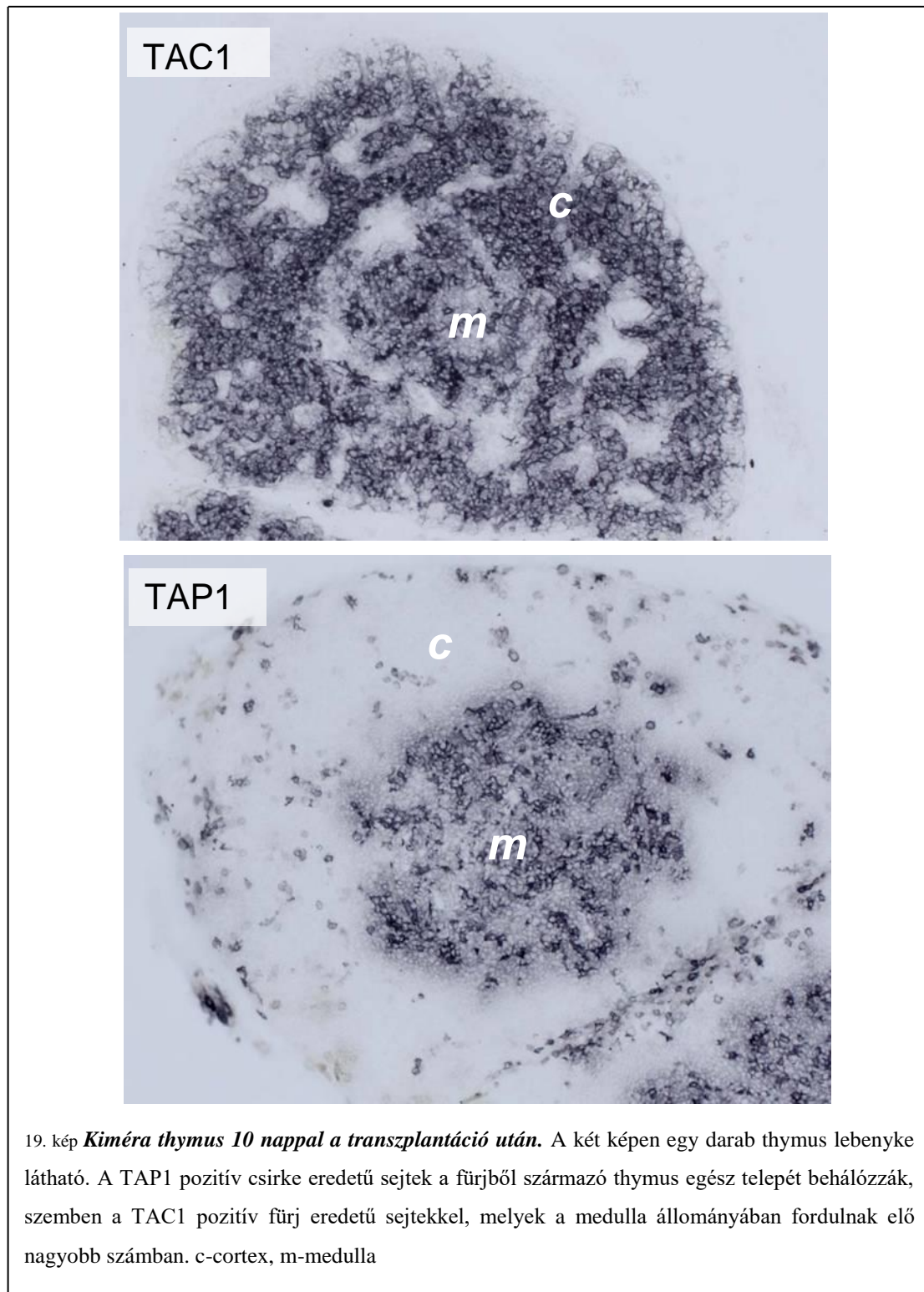
A fürjből csirke embryoba ültetett thymus kezdemények megfelelően fejlődtek, méretük közel megegyezett az azonos korú (17 napos) embryok thymusával. A kiméra szervek tanulmányozása során a graftokat izoláltuk, belőlük metszeteket készítettünk és az immunjelölések során csirke, illetve fürj specifikus ellenanyagokat használtunk a két fajból származó sejtek elkülönítésére a thymus grafton belül. A QCPN jelölés valamennyi fürj sejtmagot kimutat, így láthatóvá válnak a graft sejtjei. A QCPN pozitív sejtek elszórtan szigeteket alkotnak és közöttük jelentős QCPN negatív területek találhatóak (**18. kép**). CD45 festéssel valamennyi csirke eredetű sejt megjelenik, amelyek infiltrálták a graftot. (**18. kép**) A CD45 pozitív sejtek a QCPN negatív területeknek megfelelő helyeken koncentrálnak. Thymus graft eredetű sejtek nem kolonizálták a fogadó embryo szerveit (nincs kép).



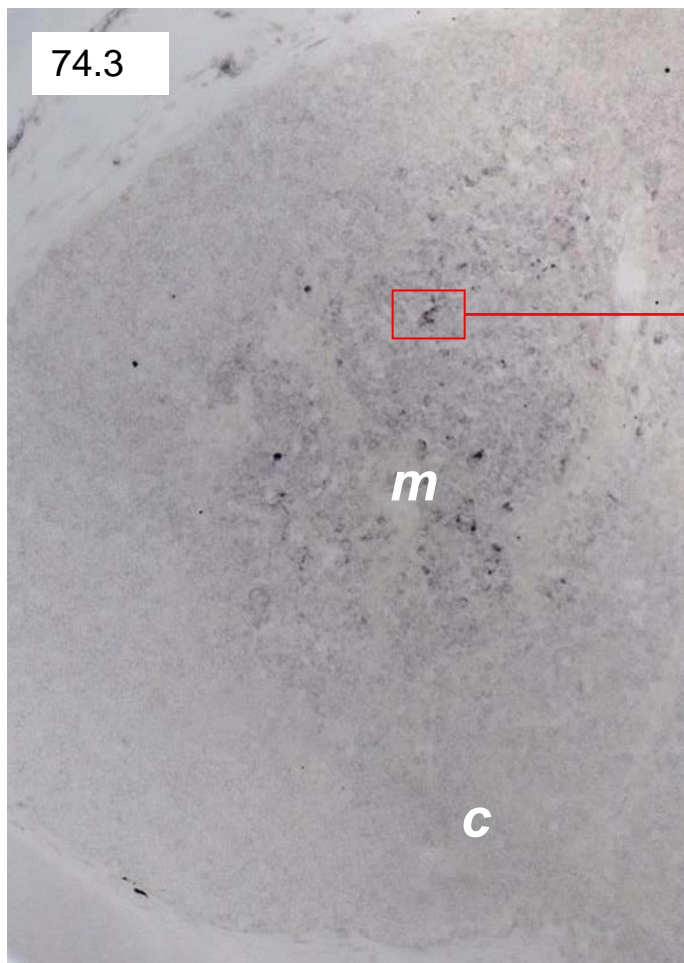
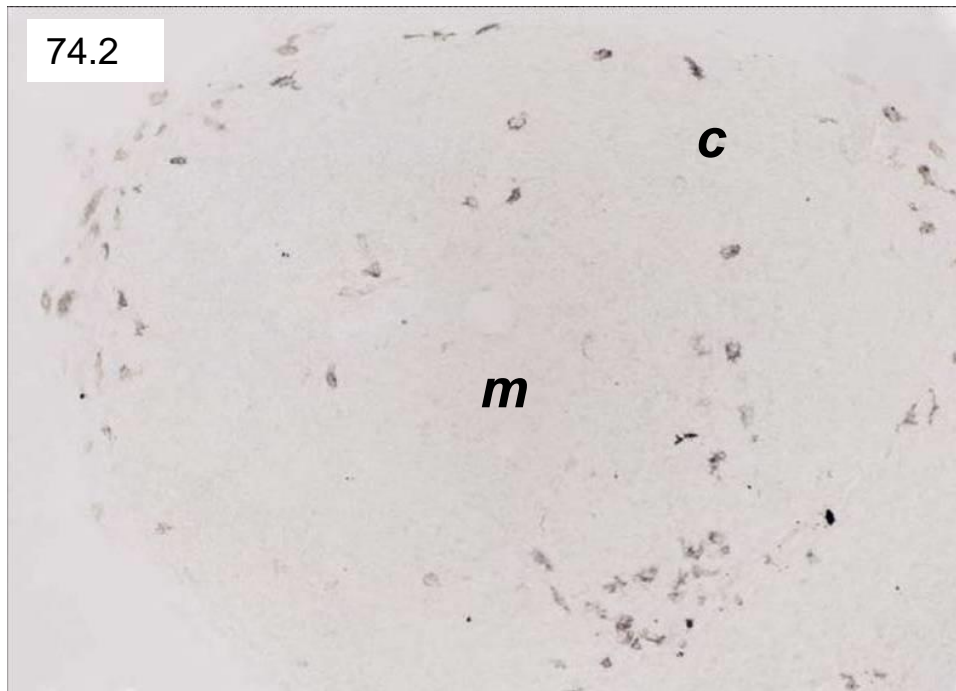
18. kép *Chimaera thymus* 10 nappal a transzplantáció után. A két képen egy-egy thymus lebenyke látható. A QCPN marker a fűj eredetű sejtmagokat jelöli, melyek a thymus egész területén elszórtan megtalálhatók. A CD45 pozitív csirke eredetű sejtek a fűj thymus lebenkében a QCPN negatív területekre koncentrálnak. c-cortex, m-medulla



A TAP1 csirke specifikus ellenanyag a csirke MHC II molekulát jelöli, a TAC1 fürj specifikus marker pedig a fürj MHC II molekulához kapcsolódik (19. kép). A sorozat metszeteken jól látható, hogy a thymus megtartotta szöveti integritását. A graftba bevándoroltak a csirke eredetű MHC II pozitív sejtek, amit a TAP1 csirke specifikus monoklonális ellenanyag jelöl (19. kép).



19. kép *Kiméra thymus 10 nappal a transzplantáció után.* A két képen egy darab thymus lebenyke látható. A TAP1 pozitív csirke eredetű sejtek a fürjből származó thymus egész telepét behálózzák, szemben a TAC1 pozitív fürj eredetű sejtekkel, melyek a medulla állományában fordulnak elő nagyobb számban. c-cortex, m-medulla



20. kép **Kiméra thymus 10 nappal a transzplantáció után.** A 74.2 pozitív csirke eredetű macrophagok leginkább a fűj eredetű thymus subcapsularis zónájában, illetve elszórtnan a velőállományban figyelhetőek meg. A 74.3 pozitivitást mutató sejtek kevés számban fordulnak elő a thymus velőállományában. A kinagyított kép egy 74.3 pozitív csirke eredetű szemcsés festődést adó nyúlványos sejtet ábrázol a fűj eredetű thymus graftban. c-cortex, m-medulla

A csirke eredetű CD45 pozitív sejtek egyik alpopulációját a 74.2 csirke macrophagokra specifikus markerrel lehet elkülöníteni (**20. kép**). A csirke macrophagok elszórt mintázatot mutatva, a fürj thymus leendő kéregállományában lokalizálódnak.

A 74.2 pozitív csirke eredetű sejtek mellett a kiméra thymus centrális területén nyúlványos 74.3 pozitív csirke eredetű sejteket is találtunk (**20. kép**). Nagyobb nagyítással vizsgálva, látható válik, hogy valóban egy granuláris szerkezetű cytoplazmával rendelkező nyúlványos sejt vándorolt be a transzplantációkor beültetett fürj thymusba.

A kimérás kísérletekből kapott eredmények azt mutatják, hogy a graft 74.3 pozitív nyúlványos sejtjei csirke hemopoietikus eredetűek, azaz prekursorai a csirke testüregébe transzplantált fürj thymusba a véráram útján jutottak.



## **Összefoglalás és konklúzió**

Szaktervezési munkámban a csirke thymus fejlődésének és morfogenezisének vizsgálatával foglalkoztunk. Célunk volt, immuncytokémiai technikák alkalmazásával a thymus lymphomyeloid, illetve stromális elemeinek karakterizálása, különösképpen az eddig nem jellemzett thymus dendritikus sejtek meghatározása. A lymphoid és stromális thymus elemek képviselik azt a mikrokörnyezetet, amelynek kitüntetett szerepe lehet a T lymphocyták differenciálódásának koordinálásában.

A thymus szöveti szerkezetének tanulmányozása során megfigyeltük, hogy a velőállományt nem egy egységes hámrétikulum szervezi. A korábbi leírások szerint ugyan a thymus velő- és kéregállományra osztható, mégis a különböző hám és kötőszöveti markereket felhasználva azt találtuk, hogy a velőállomány immunhisztokémiai tulajdonságai alapján további kompartmentekre tagolódik. Eredményeink szerint két elkülönülő területre oszlik a thymus állománya: egy entodermális hámmal rendelkező és egy hámmentes, kötőszövetes részre. A velőállomány hámmentes területei topográfiaileg összefüggnek a lebenyközi sővényekkel. A velőállomány mesenchymális eredetű szigetei által termelt extracelluláris mátrix, együtt a hámrétikulum sejtekkel, izgalmas kutatási területnek ígérkezik a velőállomány T sejt érést irányító szerepének megismerésében.

A madarak nyirokszövetében mindenhol megtalálhatóak a dendritikus sejtek, így megbízható hisztológiai azonosításának is fontos szerepe lehet a B és T-lymphocyták fejlődését befolyásoló mikrokörnyezet, valamint az immunrendszert érintő betegségek tanulmányozásakor (Oláh és Vervelde, 2008). A thymus dendritikus sejtekre specifikus marker nem ismert, ezért citológiai karakterizálásuk és ontogenezisük is kevésbé tisztázott. Laboratóriumunk és más munkacsoportok bursa Fabricii, illetve különböző tonsillákon, továbbá lépén végzett immuncytokémiai tanulmányaiban már korábban megfigyelték, hogy 74.3 festéssel, vagy vimentin, MHCII, TRK receptorokra specifikus ellenanyagokkal dendritikus morfológiájú sejtek jelölődnek. (Jeurissen és mtsai, 1992, Oláh és mtsai, 1992, Ciriaco és mtsai, 1996, Nagy és mtsai, 2004). A 74.3 sejtek macrophag markereket nem expresszálnak. Mivel az MHCII, vimentin, c-Rec, KUL01, 74.2 és TRK receptor fehérjéket thymus dendritikus sejtek mellett, epithel, fibroblast, lymphocytá, macrophag sejteken is leírták, ezért a többi nyirokszervben mutatott

konklúzió

szelektív dendritikus festés alapján a 74.3 tekinthető specifikus markernek a thymus dendritikus sejtek esetében is. Ez a 74.3 pozitívítás a thymusban is nyúlványos dendritikus típusú sejteket jelölt. Továbbá, hasonlóan a többi nyirokszerv dendritikus sejtjeihez, a 74.3 a thymusban is intracytoplazmatikus lokalizációt valamint granuláris kifejeződést mutatott. Mindezek ellenére mégis a thymusban leírt hámsejttípusok felvetik annak a lehetőségét, hogy az a sejt, amely 74.3 ellenanyaggal thymusban festődik, megfelelhet a szekrécións granulomokat tartalmazó epithel sejteknek.

Annak eldöntésére, hogy a 74.3 pozitív sejtek a thymus telepében *in loco* képződő szekrécións epithel sejtek, vagy a bursai 74.3 pozitív dendritikus sejtekhez hasonlóan, hemopoiitikus eredetű dendritikus sejtek, csirke-fürj thymus kimérát készítettünk. Madár fejlődésbiológiai vizsgálatok alapján, a csirke-fürj kimérák megfelelő eszköznek bizonyultak a kérdéses sejtek eredetének, sorstérképének elkészítésére. Ezzel a módszerrel lehetett tisztázni például, a ganglionléc sejtek eredetét, a vérképző őssejtek differenciálódását, a bursai dendritikus sejtek származását myoblastok eredetét, stb.,(Nagy és mtsai, 2004, Nagy és Goldstein, 2006) Embryomanipulációs kísérleteinkben, fürj thymus telepeket csirke testüregébe ültetettük. A kiméra szövet tanulmányozásakor fontos támpont, hogy a 74.3 ellenanyag csak a csirkébe jelöli a dendritikus sejteket, a fürjekben viszont nem. A kapott eredmények azt mutatták, hogy a beültetett fürj thymusokban kimutatott 74.3 pozitív sejtek csirke eredetűek voltak. Ez a kísérlet azt igazolja, hogy a 74.3 sejtek bevándorolnak a thymus telepébe és nem az epitheliumból differenciálódnak, mint 74.3 szekrécións hámretikulum sejtek. Eredményeink alapján először igazoltuk, hogy a madarak thymusának 74.3 pozitív dendritikus sejtjei az embryonalis élet során bevándorolt, hemopoiitikus prekursorokból származnak. Ezt az eredményt alátámasztja az a hasonlóság is, hogy a bursa Fabriciben és a lépben leírt 74.3+/CD45+/vimentin+ dendritikus sejtek szintén a hemopoiitikus szervekbe bevándorolt sejtekből differenciálódnak

*Hansell és munkatársai 2007-ben jelentették, hogy sikerült csirke specifikus CD83 ellenanyagot előállítani, amely jelöli a bursa Fabricii dendritikus sejtjeit. Az ellenanyag beszerzésére már felvettük a kapcsolatot az említett laboratóriummal.*

**Konklúzió:** Morfológiai módszerekkel meghatároztuk a csirke thymus stromális és lymphomyeloid elemeit. Kimutattuk, hogy az epitheliális és kötőszövetes területek váltakozva alkotják a velőállományt. Igazoltuk, hogy a csirke dendritikus sejtekre specifikus 74.3 monoklonális ellenanyaggal, szelektíven kimutatható egy nyúlványos sejt típus, amely megfelelhet a thymus dendritikus sejtjeinek. Ezek a sejtek a velőállomány hámretikulum sejtjei között csoportosulnak. Experimentális embryológiai módszerrel bizonyítottuk, hogy a fejlődő thymust az embryonális élet folyamán 74.3 pozitív nyúlványos dendritikus sejtek kolonizálják.

*Jövőbeni terveink között szerepel, hogy a thymus dendritikus sejtjeit elektronmikroszkópos szinten is tanulmányozzuk, felszíni markereiket tovább karakterizáljuk, differenciálódásukat és funkciójukat meghatározzuk, valamint újabb embryomanipulációs technikákkal (chorioallantois membrán transzplantációval, parabiózissal) is tisztázzuk eredetüket.*

**Irodalmi jegyzék**

Ackerman G. A. and Knouff R. A. (1964) Lymphocyte formation in the thymus of the embryonic chick. *Anat Rec.* **149**:191-215.

Annunziato F., Romagnani P., Cosmi L., Beltrame C., Steiner B. H., Lazzeri E., Raport C. J., Galli G., Manetti R., Mavilia C., Vanini V., Chantry D., Maggi E. and Romagnani S. (2000) Macrophage-derived chemokine and EB11-ligand chemokine attract human thymocytes in different stage of development and are produced by distinct subsets of medullary epithelial cells: possible implications for negative selection. *J. Immunol.* **165**: 238-246.

Atoji Y., Yamamoto Y., Komatsu T. and Suzuki Y. (1997) Localization of neuropeptides in endocrine cells of the chicken thymus. *J. Vet. Med. Sci.* **59**: 601-603.

Bockman D. E. (1997) Development of the thymus. *Microsc Res Tech.* **38**: 209-215.

Boyd R.L., Tucek C.L., Godfrey D.I., Izon D.J., Wilson T.J., Davidson, N.J., Bean, A. G. D., Ladyman H. M., Ritter M. A. and Hugo P. (1993) The thymic microenvironment. *Immunol. Today* **14**: 445-459.

Ciriaco E., Dall'Aglio C., Hannestad J., Huerta J. J., Laurà R., Germanà G. and Vega J. A. (1996) Localization of Trk neurotrophin receptor-like proteins in avian primary lymphoid organs (thymus and bursa of Fabricius). *J Neuroimmunol.* **69**: 73-83.

Coltey M., Jotereau F. V. and Le Douarin N. M. (1987) Evidence for a cyclic renewal of lymphocyte precursor cells in the embryonic chick thymus. *Cell Differ.* **22**: 71-82.

Cormier F. (1993) Avian pluripotent haemopoietic progenitor cells: detection and enrichment from the para-aortic region of the early embryo. *J. Cell Sci.* **105**: 661-666.

Cui J., Sofer L., Cloud S. S., Burnside J. (2004) Patterns of gene expression in the developing chick thymus. *Dev Dyn.* **229**: 480-488.

Daimon T. and Caxton-Martins A. (1977) Electron microscopic and enzyme cytochemical studies on granules of mature chicken granular leucocytes. *J. Anat.* **123**: 553-562.

D'Anna F., Rossi F. and Arbicò R. (1981) Hassall's corpuscle: a regressive formation. *Basic Appl. Histochem.* **25**: 169-181.

Davidson N. J. and Boyd R. L. (1992) Delineation of chicken thymocytes by CD3-TCR complex, CD4 and CD8 antigen expression reveals phylogenically conserved and novel thymocyte subsets. *Int. Immunol.* **4**: 1175-82.

Desiderio S. V., Yancopoulos G. D., Paskind M., Thomas E., Boss M. A., Landau N., Alt F.W., Baltimore D. (1984) Insertion of N regions into heavy-chain genes is correlated with expression of terminal deoxytransferase in B cells. *Nature* **311**: 752-755.

Dieterlen-Lièvre F. and Le Douarin N. M. (2004) From the hemangioblast to self-tolerance: a series of innovations gained from studies on the avian embryo. *Mech. Dev.* **121**: 1117-1128.

Dunon D., Allioli N., Vainio O., Ody C. and Imhof B. A. (1998) Renewal of thymocyte progenitors and emigration of thymocytes during avian development. *Dev Comp Immunol.* **22**: 279-287.

Dunon D., Allioli N., Vainio O., Ody C. and Imhof B. A., (1999) Quantification of T-cell progenitors during ontogeny: thymus colonization depends on blood delivery of progenitors. *Blood.* **93**: 2234-2243.

Fellah J. S., Jaffredo T. and Dunon D. (2008) In: *Avian Immunology*, Ed.: Fred Davison, Bernd Kaspers and Karel A. Schat, Elsevier, PP: 51-66.

Guerin S., Baron M. L., Valero R., Herrant M., Auburger P. and Naquet P. (2002) RelB reduces thymocyte apoptosis and regulates terminal thymocyte maturation. *Eur. J. Immunol.* **32**: 1-9.

Guillemot F. P., Oliver P. D., Peault B. M. and Le Douarin N. M. (1984) Cells expressing Ia antigens in the avian thymus. *J. Exp. Med.* **160**: 1803-1819.

Huguet C., Bouali F., Enrietto P. J., Stehelin D., Vandebunder B. and Abbadie C. (1998) The avian transcription factor c-Rel is expressed in lymphocyte precursor cells and antigen-presenting cells during thymus development. *Dev. Immunol.* **5**: 247-261.

Igyártó B. Z., Magyar A. and Oláh I. (2007) Origin of follicular dendritic cell in the chicken spleen. *Cell Tissue Res.* **327**: 83-92.

Jeurissen S. H., Claassen E. and Janse E. M. (1992) Histological and functional differentiation of non-lymphoid cells in the chicken spleen. *Immunology*. **77**: 75-80

Kendall M. D. and Frazier J. A. (1979) Ultrastructural studies on erythropoiesis in the avian thymus. I. Description of cell types. *Cell Tissue Res*. **199**: 37-61.

Kendall M. D. (1980) Avian thymus glands. *Dev. Comp. Immunol*. **4**: 191-209.

Kendall M. D. (1981) The cells of the thymus. In: *The thymus gland*. Ed. by: M. D. Kendall, Academic Press, London pp. 63-83.

Khalil M., Khan Z. I., Khalil M. and Islam R. (2003) A prospective study of prenatal and postnatal development of thymus of Deshi chicken. *Mymensingh Med. J*. **12**: 20-24.

Knabel M. and Lösch U. (1993) Characterization of new monoclonal antibodies identifying avian T lymphocyte antigens. *Immunobiology*. **188**: 415-429.

Koskela A., Arstila T. P. and Lassila O. (1998) Costimulatory function of CD28 in avian gammadelta T cells is evolutionarily conserved. *Scand. J. Immunol*. **48**: 635-641.

Kuratani S and Bockman D. E. (1990) The participation of neural crest derived mesenchymal cells in development of the epithelial primordium of the thymus. *Arch. Histol. Cytol*. **53**: 267-273.

Kuratani S. and Bockman D. E. (1991) Capacity of neural crest cells from various axial levels to participate in thymic development. *Cell Tissue Res.* **263**: 99-105.

Le Douarin N. M and Jotereau F. V. (1975) Tracing of cells of the avian thymus through embryonic life in interspecific chimeras. *J. Exp. Med.* **142**: 17-40.

Le Douarin N. M., Dieterlen-Lièvre F. and Oliver P. D. (1984) Ontogeny of primary lymphoid organs and lymphoid stem cells. *Am. J. Anat.* **170**: 261-299.

Le Lièvre C. S. and Le Douarin N. M.(1975) Mesenchymal derivatives of the neural crest: analysis of chimaeric quail and chick embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **34**:125-54.

Mast J., Goddeeris B. M., Peeters K., Vandesande F. and Berghman L. R. (1998) Characterisation of chicken monocytes, macrophages and interdigitating cells by the monoclonal antibody KUL01. *Vet Immunol. Immunopathol.* **61**: 343-357.

Nagy N and Goldstein A. M. (2006) Intestinal coelomic transplants: a novel method for studying enteric nervous system development. *Cell Tissue Res.* **326**: 43-55.

Nagy N. and Oláh I.(2007) Pyloric tonsil as a novel gut-associated lymphoepithelial organ of the chicken. *J.Anat.* **211**: 407-411.

Nagy N., Igyártó B., Magyar A., Gazdag E., Palya V. and Oláh I. (2005) Oesophageal tonsil of the chicken. *Acta. Vet. Hung.* **53**: 173-188.



---

**Irodalmi jegyzék**

Nagy N., Magyar A., Tóth M. and Oláh I. (2004) Origin of the bursal secretory dendritic cell. *Anat. Embryol.* **208**: 97-107.

Ody C., Corbel C., Dunon D., Vainio O. and Imhof B. A. (2000) MHC class II and c-kit expression allows rapid enrichment of T-cell progenitors from total bone marrow cells. *Blood* **96**: 3988-3990.

Olah I., Kendall C. and Glick B. (1992) Anti-vimentin monoclonal antibody recognizes a cell with dendritic appearance in the chicken's bursa of Fabricius. *Anat. Rec.* **232**: 121-125.

Oláh I. and Vervelde L. (2008) In: *Avian Immunology*, Ed.: Fred Davison, Bernd Kaspers and Karel A. Schat, Elsevier, PP: 13-51.

Olah I., Kendall C. and Glick B. (1991) Endogenous peroxidase- and vimentin-positive cells accumulate at the corticomedullary border of the chicken thymus. *Poult. Sci.* **70**: 1144-1152.

Onyeausi B. I., Onyeausi J. C., Emma A. N. and Ezeokoli C. D. (1994) The thymus of the guinea fowl from the eighteenth day of incubation until maturity. *Anat. Histol. Embryol.* **23**: 320-329

Owen J. J. and Ritter M.A. (1969) Tissue interaction in the development of thymus lymphocytes. *J. Exp. Med.* **129**: 431-442.

Peters H., Doll U. and Niessing J. (1995) Differential expression of the chicken Pax-1 and Pax-9 gene: in situ hybridization and immunohistochemical analysis. *Dev. Dyn.* **203**: 1-16.

Raviola E. and Raviola G. (1967) Striated muscle cells in the thymus of reptiles and birds: An electron microscopic study. *Amer. J. Anat.* **121**: 623-645.

Rieker T., Penninger J., Romani N. and Wick G. (1995). Chicken thymic nurse cells: an overview. *Dev. Comp. Immunol.* **19**: 281-289.

Seifert R. and Christ B. (1990) On the differentiation and origin of myoid cells in the avian thymus. *Anat. Embryol.* **181**: 287-298.

Sundler F., Carraway R. E., Håkanson R., Alumets J. and Dubois M. P. (1974) Immunoreactive neurotensin and somatostatin in the chicken thymus. A chemical and histochemical study. *Cell Tissue Res.* **194**: 367-376.

Thomas J.L., Pourquie O., Coltey M., Vaigot P. and Le Douarin N. M. (1993) Identification in the chicken of GRL1 and GRL2: two granule proteins expressed on the surface of activated leukocytes. *Exp. Cell. Res.* **204**: 156-166.

Törő I., Oláh I., Röhlich P. and Virágh Sz. (1969) Electron microscopy observation on myoid cells of the frog's thymus. *Anat. Rec.* **165**: 329-342.

Uni, Z., Pratt, W. D., Miller, M. M. and Schat, K. A. (1994) Syngeneic lysis of reticuloendotheliosis virus-transformed cell lines transfected with Marek's disease

virus genes by virus-specific cytotoxic T cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **44**: 57-69

Vainio O. and Imhof B. A. (1995) The immunology and developmental biology of the chicken. *Immunol Today.* **16**: 365-370.

Venzke W. G., (1952) Morphogenesis of the thymus of chicken embryos. *Am. J. Vet Res.* **13**: 395-404.

Wu L., D'Amico A., Winkel K. D., Suter M., Lo D. and Shortman K. (1998) RelB is essential for the development of myeloid-related CD8alpha- dendritic cells but not of lymphoid-related CD8alpha+ dendritic cells. *Immunity.* **9**: 839-847.

Zaitseva M., Kawamura T., Loomis R., Goldstein H., Blauvelt A. and Golding H. (2002) Stromal-derived factor 1 expression in the human thymus. *J Immunol.* **168**: 2609-2617.

## **Köszönetnyilvánítás**

Köszönettel tartozom témavezetőimnek Prof. Dr. Oláh Imre Tanár Úrnak és Dr. Nagy Nándornak, a Semmelweis Egyetem Humánmorfológiai és Fejlődésbiológiai Laboratórium vezetőinek, akik munkám során mindvégig támogattak és mellettem álltak.

Köszönettel tartozom továbbá laboratóriumunk valamennyi munkatársának, Ph.D. hallgatóknak, asszisztenseknek, TDK-soknak egyaránt, akik elméleti és gyakorlati tudásukkal, barátságukkal mindvégig a segítségemre voltak.

Köszönettel tartozom konzulensemnek Dr. Réz Gábornak, az Eötvös Loránd Tudományegyetem Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék docensének dolgozatom elkészítéséhez nyújtott segítségéért.

Végül hálás vagyok családomnak és barátaimnak, hiszen oly nagy türelemmel álltak mindvégig mellettem, buzdítottak és támogattak.