

# ***Szakedolgozat***

## ***Hemopoietikus eredetű sejtek a madarak központi idegrendszerében: a microglia***



Készítette:

Molnár Dávid

Semmelweis Egyetem  
ÁOK VI. évf.

Témavezetők:

Dr. Nagy Nándor  
Prof. Dr. Oláh Imre

Semmelweis Egyetem  
Humánmorfológiai és Fejlődésbiológiai Intézet



Budapest, 2008

## Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	I.
Rövidítésjegyzék.....	III.
Bevezetés.....	1.
Irodalmi áttekintés.....	2.
<b>1. Lymphopinealis szövet</b> .....	2.
<b>2. Macrophagok</b> .....	3.
<b>3. A microglia</b> .....	5.
3.1. A microglia sejtek felfedezése.....	6.
3.2. A microglia sejtek morfológiai meghatározása.....	7.
3.2.1. <i>Enzimhisztokémia</i> .....	8.
3.2.2. <i>Lektin-hisztokémia</i> .....	9.
3.2.3. <i>A madarak microglia sejtjeinek immuncytokémiai kimutatása</i> .....	9.
3.3. A microglia sejtek ontogenesisise.....	10.
Célkitűzéseink.....	13.
Anyagok és módszerek.....	14.
<b>1. Kísérleti állatok</b> .....	14.
<b>2. Szövettani feldolgozás</b> .....	14.
2.1. Zselatin-szacharózos beágyazás.....	14.
2.2. Májba ágyazott fagyasztott metszetek készítése.....	15.
2.3. Beágyazáshoz használt oldatok.....	15.
<b>3. Metszetek készítése</b> .....	16.
<b>4. Immunhisztokémia és immunfluoreszcencia</b> .....	16.
4.1. Immunhisztokémia.....	16.
4.2. Immunfluoreszcencia.....	17.
4.2.1. <i>Egyszeres immunfluoreszcencia</i> .....	17.
4.2.2. <i>Kettős immunfestés</i> .....	17.
4.3. Az immunfestések során alkalmazott primer ellenanyagok, előhívószerek, oldatok.....	18.

<b>5. Lektin-hisztokémia</b> .....	20.
<b>6. ATP-áz enzimhistokémia</b> .....	20.
<b>7. Metszetek értékelése, fényképezés, képfeldolgozás</b> .....	21.
<b>8. Embryomanipuláció: csirke-fürj kiméra</b> .....	21.
8.1. A csirke-fürj tobozmirigy kimérák létrehozása.....	21.
8.2. Fürj embryonalis tobozmirigyek kiültetése csirke chorioallantois membránra.....	23.
8.3. Az átültetéskor használt oldatok és vegyszerek elkészítése.....	24.
<b>Eredmények</b> .....	25.
<b>1. A madarak központi idegrendszerében előforduló hemopoietikus eredetű         sejtek osztályozása</b> .....	25.
<b>2. A csirkék microglia sejtjeinek karakterizálása</b> .....	28.
<b>3. A microglia sejtek ontogenezisének vizsgálata</b> .....	34.
3.1. A microglia sejtek megjelenésének tanulmányozása immuncytokémiával.....	34.
3.2. Microglia sejtek eredetének nyomon követése csirke fürj kimérákkal.....	35.
3.3. Fürj tobozmirigy kiültetése csirke chorioallantois membránra.....	39.
<b>Összefoglalás és diszkusszió</b> .....	42.
<b>Köszönetnyilvánítás</b> .....	46.
<b>Ábrák és képek jegyzéke</b> .....	47.
<b>Irodalomjegyzék és forráshivatkozások listája</b> .....	48.

## Rövidítésjegyzék

**ABC:** avidin-biotin-peroxidáz komplex

**APP:** amiloidprekursor fehérje

**ATP:** adenzin-triszfoszfát

**BSA:** Borjú Szérum Albumin

**ChAM:** chorioallantois membrán

**Ch:** chicken = csirke

**cl.:** cerebellum

**CLA:** common leukocyte antigen = közös leukocyta antigén

**coll.:** colliculus

**cp.:** corpus pineale

**CSF:** cerebrospinalis folyadék

**DSHB:** Developmental Studies Hybridoma Bank

**E:** embryonalis nap

**f.á.:** fehérállomány

**GFAP:** glial fibrillaric acidic protein = savanyú fibrilláris glia fehérje

**gv.:** gerincvelő

**HH:** Hamburger-Hamilton szerinti stádiumbeosztás

**i.c.:** intracelluláris

**KIR:** központi idegrendszer

**MHC II:** main histoncompatibility complex = fő hisztonkompatibilitási komplex

**NDP:** nukleotid-diszfoszfát

**PALT:** Pineal-Associated Lymphoid Tissue = Lymphopinealis szövet

**PDGF- $\beta$ :** Platelet Derived Growth Factor  $\beta$

**PBS:** foszfáttal pufferelt sóoldat

**PenStrep PBS:** penicillin-streptomycin tartalmú steril PBS oldat

**PFA:** 4 %-os paraformaldehid oldat

**Q:** quail = fürj

**RCA:** Ricinus Communis Agglutinin

**ret.:** retina

**SMA:** simaizom aktin

**sz.á.:** szürkeállomány

**T<sub>c</sub>:** citotoxikus T-lymphocyta

**T<sub>h</sub>:** helper T-lymphocyta

## **Bevezetés**

Napjainkban élénk érdeklődés övez mindennemű kísérletet, amely célkeresztjében a fejlődő embryo és az őssejtkutatás szerepel. Napról napra jelennek meg tudományos közlemények, amelyek évtizedes dogmák evidenciáit kérdőjelezik meg. A vérképzésért felelős őssejtek egészen változatos differenciálódását írták le, például a klasszikus lymphocyta, macrophag, granulocyta sejtek mellett folliculo-stellate, vese mesangialis, dendritikus, máj ITO sejtek, pericyták hemopoiitikus eredetét megfigyelték. mind in vitro, mind in o körülmények között. Ezen eredmények merőben új ajtókat nyithatnak meg az orvosok előtt eddig kezelhetetlennek hitt kórképek gyógyításakor.

Számos publikáció látott napvilágot igazolva azt, hogy a központi idegrendszert a neuroepithelialis eredetű sejtek mellett vérből származó sejtek is benépesítik: I., Oláh és Glick 1984-ben például beszámoltak lymphoid sejtek jelenlétéről a madarak tobozmirigyében, amelyek nyirokszervet hoznak létre. II., Régóta ismertek a perivascularisan elhelyezkedő macrophagok és pericyták. III., Számos eredmény látott napvilágot, amelyek igazolják, hogy neuronok is képesek csontvelői prekursorokból pótlódni. (Mezey és Chandross, 2000; Crain BJ. et al. 2005) IV., Río-Hortega már 1932-ben hangot adott feltételezésének, hogy az általa leírt és az ő nevét viselő microglia sejtpopuláció mesodermális eredetű. Erről a sejtről a neuroectodermális és a hemopoiitikus származás is felmerült, ezért e glia típusú sejtek eredete a mai napig a legvitatottabb kérdések közé tartozik.

Laboratóriumunkban, melynek profilja a kísérletes embryologia, a hemopoiitikus sejtek morfológiáját, lokalizációját és differenciálódását vizsgáljuk madarakban az embryonalis és a kikelés utáni időszakban. Kísérleteinkben elsősorban csirke és fürj embryokat használunk, mert a két faj kiméra készítésre is alkalmas.

Kísérletes munkámban a madarak központi idegrendszerében előforduló véreredetű sejtek meghatározását és nyomon követését tűztem ki célul, és különösképpen a tisztázatlan eredetű microglia sejtekre fókuszáltam.

## Irodalmi áttekintés

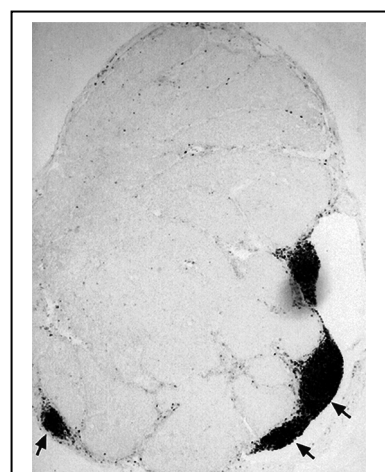
### Hemopoietikus eredetű sejtek a központi idegrendszerben

Hemopoietikus eredetű sejtek jelenléte a központi idegrendszerben régóta ismert. Ide tartoznak a lymphopinealis szövet, a macrophagok, és a feltehetően hemopoietikus eredetű microglia. Ezek a sejtek emlősökben és madarakban is többnyire a mesodermális eredetű struktúrákhoz (agyburkok, erek) asszociáltan helyezkednek el.

#### 1. Lymphopinealis szövet

Oláh és Glick 1984-ben leírta, hogy a csirkék tobozmirigyét az embryonalis élet során hemopoietikus eredetű lymphoid elemek infiltrálják, amelyek csoportokba rendeződve kialakítják a lymphopinealis szövetet (PALT), és ott gyakran csíracentrumokat alkotnak. (1. kép)

A lymphopinealis szövet a tobozmirigy sejtömegének akár 30%-át is adhatja. Összetételét tekintve döntően B- és T-lymphocyták alkotják, de egyaránt megtalálhatóak benne dendritikus sejtek, monocyták, macrophagok és microglia jellegű sejtek. A PALT mérete csirkékben a kikelés utáni 3-4. hónaptól kezdve csökken. A B- és T-sejtek aránya 1:4. A  $T_h$  sejtek 3-4x nagyobb számban képviseltetik magukat a  $T_c$  sejtekhez képest, ez az arány a tobozmirigy egyéb területein 1:1. A corpus pineale T-sejtjeinek száma napszaki ingadozást mutat, ezért feltételezhető, hogy a PALT fontos neuro-immunológiai kapcsolóállomás. (Mosenson JA. & McNulty JA.; 2006)



1. ábra

8 hetes csirke tobozmirigy – CD3 immunfestés. A jelölés során a T-lymphocyták kirajzolják a lymphopinealis szövetet (fekete nyilak). Saját felvétel.

## 2. Macrophagok

A központi idegrendszerben több olyan phagocytosisra képes sejtcsoportot írtak le, melyek morfológiai és funkcionális vizsgálata során megállapításra került, hogy egy-egy *macrophag* szubpopulációt alkotnak. Osztályozásuk alapjául elhelyezkedésük szolgált, ezért megkülönböztethetünk keringő- és meningealis macrophagokat, supraependymalis- és epiplexus sejteket, perivascularis macrophagokat és pericytákat.

A macrophagokról általánosságban elmondható, hogy membránfodrokat, micronyúlványokat, phagosomákat, denz granulumokat tartalmaznak, MHC I. és II. osztályú molekulákat, Fc-receptort expresszálnak, továbbá felszínükön specifikus és nem-specifikus markeret hordoznak. Az intracelluláris kompartmentekben enzimaktivitás mutatható ki (endogén peroxidáz, aryl-szulfatáz, nem specifikus észteráz, savanyú foszfataz). Az egyes alcsoportokba tartozó sejtek kisebb morfológiai és antigénprofil eltéréseket hordoznak.

A csontvelőből a *keringésbe jutó macrophagok* az agyi vasculaturában is megfigyelhetők. Extravasatiojukat figyelték meg pathológiás körülmények között, amikor az agy integritása trauma hatására megbomlik.

A meninxek rezidens phagocytáló sejtejei a subarachnoidealis térségben lokalizálódnak. Többnyire a pia mater felszínén fekszenek, de kisebb számban a cerebrospinalis folyadékkal (CSF) képesek tovaszóródni; feltehetően így jelennek meg a supraependymalis macrophagok (Malloy JJ. és Low FN., 1976).

A *supraependymalis sejtek* nevüket a sejtek típusos lokalizációja alapján kapták. A cerebralis hemispheriumok ventricularis felszínét borító ciliaris epithelium alkotóelemein, az ependyma sejtek luminalis felszínén elhelyezkedő sejteket hívjuk supraependymalis sejteknek. Első leírásukkor a sejtcsoport vegyes összetételét feltételezték, döntően neuronális és gliális alkotókkal. Alaposabb tanulmányozás során számos sejten találtak macrophagokra jellemző rövid nyúlványokat, fodros membrán szakaszokat, endogén peroxidáz aktivitás, vakuólumokat, Fc-receptort. Ezért a supraependymalis sejtek nagy hányadát a macrophagok közé sorolják. (Albrecht RM. & Belier R., 1979; Bleier R. & Albrecht RM., 1980) Eredetüket kapcsolatba hozták a meningealis macrophagok populációjával. Funkciójuk kapcsolatban szintén csak

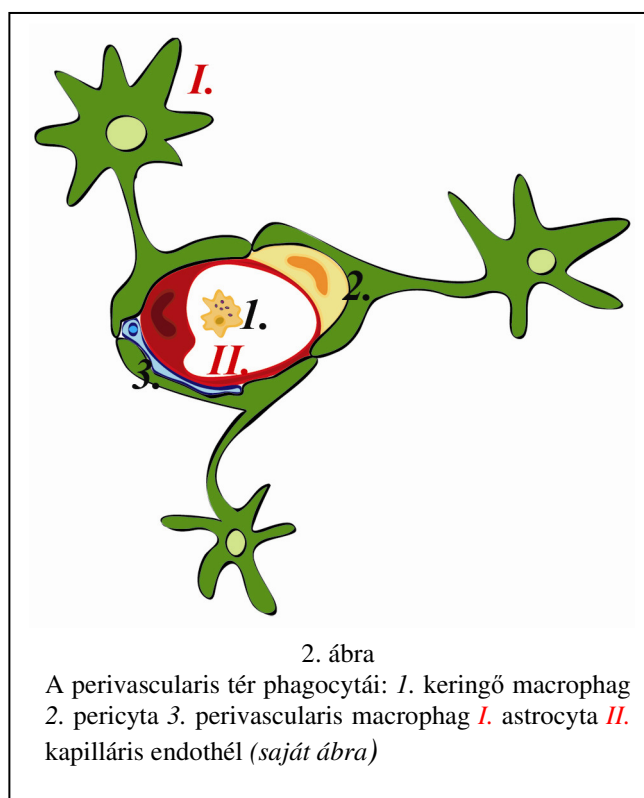


feltételezések vannak. Phagocyták aktivitásuk alapján az ependyma sejtek metabolikus melléktermékeinek eltakarításában, a CSF kontaminációjának megelőzésében játszhatnak szerepet. Egyes kutatók a microglia sejtek prekursorainak tartják ezeket a sejteket.

Az *epiplexus sejteket* Kolmer írta le 1921-ben, azóta is nevezik Kolmer-sejteknek.

Ezek a sejtek megfeleltethetők a supraependymalis sejtek plexus choroideushoz asszociált csoportjának (Kolmer VW., 1921; Chamberlain JG., 1975). Részletes karakterizálásuk, funkcionális analízisük mindeddig nem történt meg.

A perivascularis mező igen változatos sejteket tartalmaz. Megfigyelhető itt is egy olyan phagocytosisra képes sejtpopuláció, amely morfológiáját és immunfenotípusát tekintve a macrophagok közé tartozik.



Fluoreszcens proteinnel transzfektált csontvelőjű állatokkal végzett kísérletek igazolták, hogy a perivascularis macrophagok a vérben keringő macrophagokból származnak, egyúttal azt is bebizonyították, hogy ezek a sejtek egy dinamikus populációt alkotnak, tehát nem rezidens macrophagok. (Bechmann et al.; 2001)

A *pericyta* megnevezést olyan sejtekre használják, amelyek az erek külső falai mentén helyezkednek el. A csoportot lapos, kerekded alakú sejtek alkotják, amelyek mintegy körbefogják az ereket a kapilláris endothelium bazális membránjába ágyazódva. Kevés elágazó nyúlványt viselhetnek. (Bloom W. és Fawcett DW.; 1975) A pericyták karakterizálásakor, a microgliához hasonlóan, még nem találtak ezekre a sejtekre kizárólagosan specifikus markert. Az immunfenotípezálás során több macrophag specifikus antigén expresszióját is leírták. A sejtek simaizom aktint tartalmaznak, valamint felszínükön PDGF- $\beta$  receptor, 3G5 gangliozid és antigénprezentációra

szolgáló fehérjék (MHC I és II) is kimutathatók. A pericyták eredete és funkciója a mai napig nem tisztázott. (Guillemin GJ. és Brew B.J., 2004)

### 3. A microglia

A microglia sejtek phagocytosisra képes, nyúlványos sejtek, amelyek a macrophagokra is hasonlítanak. Számuk az összes glia állomány mintegy 30%-át teszi ki. Már leírójuk, Pío del Río-Hortega is felvetette, hogy olyan ubiquiter idegrendszeri elemek alkotják ezt a sejtpopulációt, amelyek nem a neuroectodermából származnak, hanem mesodermalis eredetűek, azonban az ontogenezisük a mai napig nem tisztázott.

A microgliák aktiválódását és felszaporodását feltehetően bármilyen idegrendszeri károsodás indukálhatja. Neurodegeneratív elváltozások, cerebrovascularis laesiok mellett fertőzőes kórképekben is microgliosis figyelhető meg. A microgliák körülményektől függően biztosítják a védelmet, a regenerációt, máskor viszont citotoxikus hatásúak (Kopper L. & Schaff Zs). Számos kórkép esetén felszaporodásuk nem csupán a regenerációban, hanem a betegség pathogenezisében is szerepet játszhat. A microglia funkció tanulmányozása a neurodegeneratív betegségek megértéshez is közelebb vezethet. Alzeheimer-kórban az *A $\beta$  peptidet* [amiloidprekurzor fehérje (APP) bomlás terméke] tartalmazó plakkok tengelyében tömegesen találhatóak microglia sejtek. Szerepüket az amiloid plakk alkotóinak eliminálása mellett magában az amiloid képzésében is feltételezik. A Sclerosis Multiplex is egy plakk-képződéssel járó demyelinizációs betegség, amelyet microgliosis és vér-agy gát sérülést kísérő lymphoid, valamint monocytás infiltráció jellemez. Egyes hipotézisek szerint a microglia funkció ebben a betegségben sem csupán a „takarításban” nyilvánul meg, hanem egyes elképzelések a microglia-astrocyta homeosztázis meg bomlását tekintik az infiltrációt kiváltó primer eseménynek.

### 3.1. A microglia sejtek felfedezése

Az idegrendszer interstitiumának leírása a XIX. században kezdődött meg. (R. Virchoff, 1846, 1854). Az idegrendszer támasztósejtjeit alkotó glia sejteket először Deiters volt képes izolálni (1865), de ő úgy gondolta, kötőszöveti sejteket talált, mivel számos rostot látott kiindulni az említett sejtek sejttestjeitől a tér különféle irányába. Henle (1871) a glia sejteket az idegszövet interstitiumában lévő szemcseszerű sejtökként írta le, amelyek számos kapcsoló fibrillumot tartalmaznak. Golgi (1885) króm-ezüst, Ramón y Cajal (1913) redukált ezüst-nitrát, majd arany-klorid impregnációs eljárásai segítségével szemléletessé váltak olyan morfológiai különbségek, amelyek alapot szolgáltattak a gliasejtek csoportosításához. Ezek eredményeként Ramón y Cajal (1913) a glia interstitium három típusát írta le:

I., Csillag alakú sejtek, amelyek hosszú nyúlványokkal rendelkeznek, és többnyire a fehérállományban helyezkednek el. (rostos astrocyták)

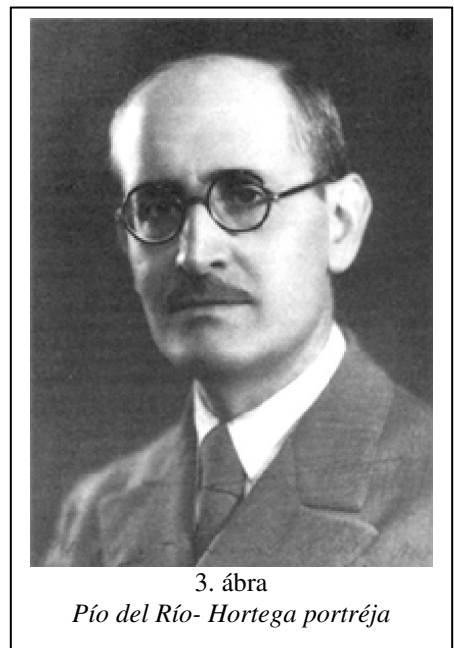
II., Csillag alakú sejtek, amelyek rövid nyúlványokkal rendelkeznek, és a szürkeállományban helyezkednek el. (plazmás astrocyták)

III., Ramón y Cajal a gliasejtek harmadik csoportját csak „harmadik elemnek” nevezte el. Ide eltérő nyúlványokkal rendelkező, vagy éppen nyúlványmentes sejteket sorolt.

Pío del Río-Hortega (2. kép) [1919, 1921] a „harmadik elem”-nek nevezett sejtek tanulmányozásakor további, új sejtípusokat írt le, amelyek eltértek a Ramón y Cajal által korábban leírt astrocytáktól. Megfigyeléseit segítette, hogy új, ezüst-karbonátos impregnációs

szövetteni eljárást dolgozott ki. A megfigyelt sejtek között két jól elkülönülő populációt írt le:

1., Az egyik sejtípusba tartozók az astrocytáknál kisebbek, lymphocytá méretű kerek sejt-maggal bírnak, nyúlványozottságuk szegényesebb, a szürkeállományban vékony, rövid nyúlványokat mutatnak, míg a fehérállományban hosszú, vékony nyúlványaik vannak (Bairati, 1953). Ezek a sejtek a központi idegrendszerben a



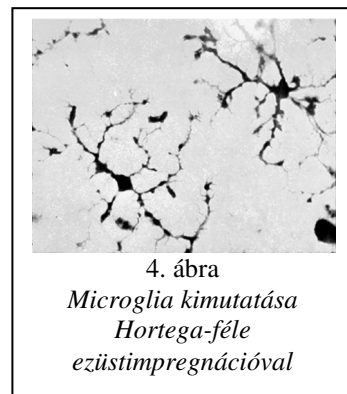
3. ábra  
Pío del Río- Hortega portréja

velőshüvely képzésben játszanak fontos szerepet. Ezt a sejttípust Río-Hortega a morfológiai jegyek alapján oligodendrocytáknak, oligodendroglia-sejteknek nevezte el.

2., A másik sejtcsoportot Río-Hortega *microglia* sejteknek nevezte el. A szövettani képen kis sejteket látott, amelyek kevés, elágazó nyúlvánnyal rendelkeznek töviszerű kiszögellésekkel. Ezek a sejtek először leírójukról kapták a nevüket, így korábban Hortega-féle sejteknek is nevezték őket.

### 3.2. A microglia sejtek morfológiai meghatározása

Río-Hortega szerint a microglia olyan sejt, amely valamivel nagyobb, mint az oligodendroglia-sejtek; hosszúkas, sötét színezetű sejtmag és vékony sejttest jellemző, melynek sarkaiból hosszú, szétágazó és rövid, töviszerű cytoplasma nyúlványok indulnak ki. Microgliák különösen nagy számban fordulnak elő a szürkeállományban, ahol az ereket gyakran hosszú sorokban szegélyezik; gyakran olyan szoros szomszédi



4. ábra  
*Microglia kimutatása  
Hortega-féle  
ezüstimpregnációval*

viszonyba lépnek az astrocytákkal is, hogy egyenesen azok kísérősejtjeiként jelennek meg. A microglia sejtek rendkívüli módon alak- és helyzetváltoztatásra képes idegrendszeri alkotóelemeknek bizonyultak. Vékony cytoplasma nyúlványaik behúzásával hosszúkas bot-, valamint kerek, amőboid formát képesek ölteni. A microgliákról elmondható, hogy normál körülmények között nyúlványos formában vannak jelen a központi idegrendszerben, míg károsító hatások, degeneratív elváltozások következtében amőboid formát vesznek fel.

A microglia sejtek részben változatos morfológiájuk miatt nehezen azonosítható sejtei a központi idegrendszernek. Sokáig, mint különálló sejttípust sem lehetett meghatározni. A microglia sejtek phagocytálni képesek, és ekkor mindig alaki transzformáción esnek át. Ez is hozzájárul ahhoz, könnyedén összetéveszthetők a központi idegrendszerben előforduló, ill. azzal szoros kapcsolatban álló további phagocytosisra képes sejtekkel, így a keringéssel odajutó macrophagokkal (Murabe Y. & Sano Y., 1983; Oemichen M., 1983), a „rezidens”, meningealis macrophagokkal

(Morse D.E. & Low F.N., 1972; Malloy J.J. & Low F. N. 1976) és epilexus sejtekkel (Chamberlain J.G, 1974).

Megingathatatlan bizonyítékokat, amelyek alátámasztják a microgliák valós létezését és külön csoportba sorolását, a kezdeti impregnációs, valamint fény- és elektronmikroszkópos technikákat együttesen felvonultató tanulmányok szolgáltattak (Cammermeyer J., 1966; Mori S. & Leblond C.P., 1969; Vaughn J. E. & Peters A., 1968; Murabe Y. & Sano Y., 1981).

A microglia sejtek azonosítására az alábbi technikákat írták le:

### 3.2.1. Enzimhisztokémia:

Ezen eljárások során, a sejtekben előforduló enzimek jelenlétét vizsgálhatjuk specifikus szubsztrátok hozzáadásával, melyet a rendszerbe juttatott további anyagok következtében színes csapadékképzős kísér. Így azok a sejtek, amelyek felett színreakció következik be intracytoplasmatikusan, vakuolarizáltan, vagy membránhoz asszociáltan tartalmazzák a szubsztrátot átalakító enzimet.

A microglia sejteket több enzimhisztokémiai módszerrel vizsgálták:

- |  |   |              |
|--|---|--------------|
| <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Savanyú-foszfátáz (Ling E. A., 1977)</li> <li>2. Aryl-szulfatáz (Ling E. A., 1977 )</li> <li>3. ATP-áz (Ibrahim M.Z. et al., 1974; Ling E. A., 1977)</li> <li>4. Endogén peroxidáz (Ling E. A., 1977)</li> <li>5. NDP-áz (Glenn et al., 1989; Scnitzer, 1989; Castellano, 1984, 1990; Fujimoto et al., 1987; Cuadros et al. 2006)</li> </ol> | } | -hisztokémia |
|--|---|--------------|

A felsorolt enzimhisztokémiai vizsgálatok eredményei szerint a központi idegrendszeri microglia sejtei, akár a többi szövet phagocytosisra képes sejtei, számos hidrolitikus enzimet tartalmaznak, így savanyú foszfátázt, aryl-szulfatázt, ATP-ázt, NDP-ázt. Endogén peroxidáz jelenlétét az eddigi, irodalomban leírt vizsgálatok nem igazolták. Az előbb említett hisztokémiai vizsgálatok egyike sem bizonyult microglia specifikusnak, mivel valamennyi phagocytát kimutatják.

### 3.2.2. Lektin-hisztokémia:

A lektinek olyan növényi vagy állati eredetű proteinek, amelyek specifikus módon, de nem immunmechanizmussal kötődnek egyes szacharidokhoz, ill. azok N-acetil származékaihoz. A lektinek jelölhetőek fluoreszcens festékkel, peroxidázzal, biotinnal, kolloid arannyal, és így a specifikusan felismert szacharidok kimutathatók, láthatóvá tehetőek. (Bernhard W. és Avrameas S., 1971)

Több adat utal arra, hogy lektinek (pl: Ricinus communis agglutinin I, Lycopericon esculentum <paradicsom> lektin) felismerik a microglia sejteket a központi idegrendszerben.

(Streit, 1990; Kaur & Ling, 1991; Boya & Calvo & Carbonell et al., 1991; Acarin et al., 1994; Wu et al., 1994; Andjelkovic et al., 1998; Angata et al. 2002; Ignácio et al., 2005; Cuadros et al., 2006) Érdekes módon a microglia sejtek aktivációjuk után lektineket kevésbé kötnek. A lektin-hisztokémia sem specifikus eljárás, mivel az említett lektin típusok és több sejtfeleséget is képesek jelölni, így pl.: RCA I az endothel sejtekhez is kötődik.

### 3.2.3. A microglia sejtek immuncytokémiai kimutatása:

A hagyományos szövettani festési és impregnációs eljárások nem voltak alkalmasak a microglia sejtek specifikus kimutatására. Újabban a szövettani vizsgálatok során egyre nagyobb teret nyertek az immunológiai módszereken alapuló sejtfelismerő eljárások. Az ismert alkotóelemeket szelektíven felismerő ellenanyagok révén kimutathatóak az egy-egy sejt által „tetoválásként” viselt molekulák.

A madarak microglia sejtjeinek leírása sem teljesen kidolgozott. Laboratóriumunkban, kísérleteink révén ezt a hiányos ismeretanyagot igyekszünk kibővíteni. Az emlősök microglia sejtjeinek vizsgálata többé-kevésbé a szárnyasok előtt jár. A madarak esetében specifikus, csak microglia sejteket felismerő antitestet eddig nem állítottak elő.

Humán szövetekben és más állatfajokból nyert preparátumokban megfigyelték, hogy microglia sejtek, több más phagocytá sejtjehez hasonlóan, antigénprezentációra képesek. Ezért felszínükön MHC II. osztályú molekulákat is expresszálnak. (Leone C.

et al., 2006) Madarakban a microgliák felszíni MHC II proteinjeinek kifejeződésére nincs adat.

A QH1 monoklonális antitest az endothelt és a hemopoiétikus sejteket jelöli fűrjekben (Pardanaud, 1987). Cuadros és munkatársai leírták (Cuadros et al., 1992), hogy a QH1 antitest a fejlődés valamennyi stádiumában jelöli a microglia sejteket is.

Emlős CD45-t felismerő antitestek microglia jellegű sejteket rajzolnak ki a központi idegrendszerben. Csirkék esetében Cuadros és mtsai. (Cuadros M. A. et al., 2006) publikálták először, hogy csirke CD45-t jelölő antitest (Jeurissen et al., 1988) az intra- és extravasalisán elhelyezkedő, ill. pialis macrophagokon és további leukocytákon kívül a központi idegrendszerben microglia sejtekhez is kötődik. A CD45 fehérje egy membránhoz kötött tirozin-foszfátáz protein, amely valamennyi leukocytán jelen van, és az immunsejtekben az antigén-receptor jelátvitelben játszik szerepet, valamint a proliferációt és differenciációt is befolyásolhatja (Penninger et al., 2001, Irie-Sasaki et al. 2003).

Mosenson és McNulty (2006) a csirkék lymphopinealis szövetét vizsgálták Bu-1b-t, B-sejt felszíni markert felismerős ellenanyaggal (Veromaa T. et al., 1988). A lymphocytá populációk vizsgálatakor a lymphoid sejtek mellett nyúlványos, microglia jellegű sejteket találtak a corpus pineale állományában, de további vizsgálatokat ebben az irányban nem végeztek. *Megjegyzem, hogy a csirke microgliák CD45+ és Bu1+ festődését a fent említett közlemények megjelenése előtt laboratóriumunkban már kimutattuk.*

Emlősökben, így patkányokban, macrophagokra jellemző antigének (pl:CD68, OX41, OX42, OX3, OX6, OX18) kifejeződését figyelték meg a microglia sejteken. (Chen L et al., 2002)

### 3.3. A microglia sejtek ontogenesisise

A microglia sejtek eredetét a mai napig számos megválaszolatlan kérdés övezi. Río-Hortega már 1932-ben felvetette annak lehetőségét, hogy a központi idegrendszer microglia elemei nem az ectodermából származnak, hanem mesodermális előalakokból. Számos tanulmány szerzői vallják azt a nézetet, miszerint a microglia sejtek

neuroectodermális eredetűek (Blakemore, 1969; Caley & Maxwell, 1968; Lewis, 1968; Ling & Tan, 1974; Ling, 1976; Matsuyama et al., 1973). Paterson és mtsai. (1973), továbbá Ling (1976) <sup>3</sup>H-timidint injektáltak fiatal patkány agyába, amelyet autoradiográfiával detektáltak. Megfigyeléseik szerint a microglia sejtek fő forrásai subependymális sejtek, glioblastok.

Rio-Hortega (1932) pialis sejtelemek akkumulálódását figyelte meg a lágyagyhártya kitüntetett pontjain, így tela choroideákban, a pedunculus cerebriket borító piában. Úgy vélte, ezek a „forró pontok” a forrásai a microglia sejteknek, amelyek bevándorolnak a központi idegrendszerbe. Több kortársa és követője osztotta ezt az álláspontot (Penfield, 1932; Kershman, 1939; Boya, 1987&1991), amely több generációnyi szövettan tankönyvbe épült be.

Ashewll (1991) lektin-hisztokémiai tanulmányában amőboid microglia sejteket figyelt meg a telencephalon medialis falán, és a szomszédos piában. Alliot (1999) és munkatársai ezt az eredményt saját munkáikkal összevetve arra a feltételezésre jutottak, hogy a microglia sejtek, vagy előalakjaik az embryonalis élet során a szikhólyagból vándorolhatnak a fejlődő központi idegrendszerbe. A hipotézist támogatja, hogy Cuadros és munkatársai (1993) monocyta / macrophag típusú sejtek központi idegrendszeri megjelenését látták madarakban még a kialakuló embryonalis keringés előtt. Kurz és Christ (1998) a jelenséget tovább követte, és megfigyelték, hogy a monocyta sejtek infiltrálják a központi idegrendszert, ahol microglia típusú sejtek proliferációját indukálják, de csirke-fürj parabiotikus állataikkal végzett kísérleteikben vérkeringés útján érkező microglia sejteket nem tudtak kimutatni.

Felnőtt korban, egereken végzett parabiotikus vizsgálatok szintén kizárják a microgliák vérkeringésből való kilépésének lehetőségét. (Ajami B. et al., 2007)

Mindezek ellenére a nagyszámú, macrophagokra és hemopoiitikus sejtekre jellemző molekulák kifejeződése a microglia sejtek hemopoiitikus eredetét támogatja.

A mai tudományos álláspontok tehát a következő módon származtatják a microgliákat:

a., a microglia sejtek neuroepithelialis eredetűek

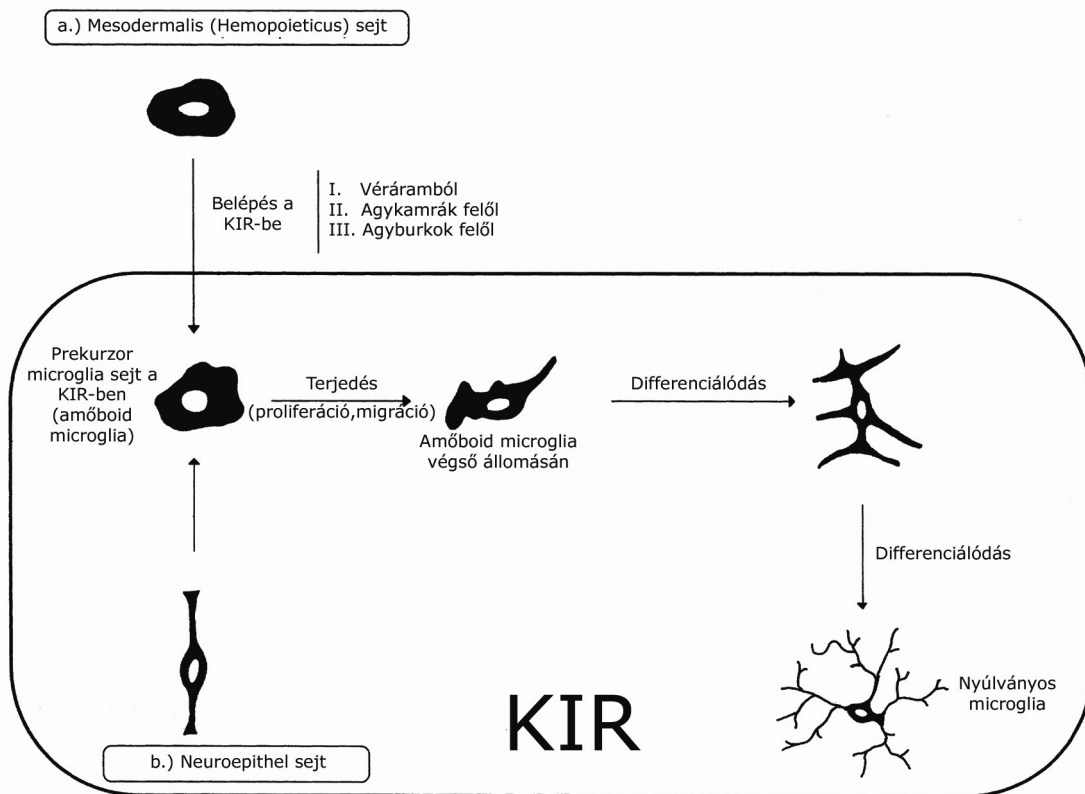
b., a microglia sejtek mesodermális eredetűek



- b/1. a microglia sejtek mesenchymalis transformatio eredményeként jönnek létre
- b/2. a microglia sejtek a monocyta/macrophag rendszer elemeiből alakulnak ki
- b/3. a microglia sejtek primitív hemopoieticus sejtekből származnak

A sejtcsoport eredetének ilyen változatos lehetőségei ugyanakkor felvetik azt a kérdést is, hogy a microgliák, ill. előalakjaik milyen úton vándorolnak a központi idegrendszer területére. Feltételezések szerint az elfogadottnak tekintett mesodermalis prekursor sejtek 3 módon érhetik el a fejlődő központi idegrendszert:

- I., véráramból származó sejtek, melyek átlélik az agyi ereket bélelő endotheliumot
- II., az agy parenchymáját a ventricularis felszín felől infiltráló sejtek
- II., agyburkok felől érkező előalakok



5. ábra

Cuadros MA. & Navascués J .után módosítva  
 [Progress in Neurobiology 56:173-189(1998)]

**Mindezek alapján elmondható, hogy a microglia sejtek eredete még nem tisztázott.**

## Célkitűzéseink

A Semmelweis Egyetem Humánmorfológiai és Fejlődésbiológiai Intézetének Fejlődésbiológiai Laboratóriumában aktuális kutatási területeink közt szerepel a hemopoietikus eredetű sejtek embryonalis megjelenésének, disztribúciójának és differenciálódásának vizsgálata. Hemopoietikus sejtek a vérképzőszervek mellett nagy számban kolonizálják a központi idegrendszert, aminek szerepe lehet a szöveti homeosztázis fenntartásában, a neurodegeneratív betegségek kialakulásában, az immunrendszer helyes működésében.

1., Kísérleteink kezdetén a csirkék tobozmirigyének véreredetű alkotóelemeit vizsgáltuk hemopoietikus sejtekre jellemző markerekkel, mivel ez olyan idegrendszeri struktúra, amelyről ismert, hogy hemopoietikus eredetű sejtek infiltrálják. Továbbá összegzést kívántunk adni a központi idegrendszer egyéb területein is előforduló hemopoietikus eredetű sejtekről.

2., Első kísérletes eredményeink során megfigyeltünk egy nyúlványos microgliaszerű sejtpopulációt, amely CD45 közös leukocita antigént és Bu1, B-sejtes antigént koexpresszál. Morfológiájuk alapján ezek a sejtek megfelelhetnek a microglia sejteknek. Célunk volt tehát ezen sejtek karakterizálása, és megjelenésük vizsgálata az embryonalis fejlődés során lektin-hisztokémiával, immunhisztokémiával és immunfluoreszcenciával.

3., A microglia sejtekről az a feltételezésünk, hogy vérkeringésből származó sejtekből differenciálódnak. Munkám harmadik célkitűzése volt, hogy embryomanipulációs technikákkal (csirke-fürj kiméra, chorioallantois membránra transzplantálás) vizsgáljuk a microglia sejtek származását. Ezekkel a módszerekkel bizonyítani lehet a microgliák mesodermalis, vagy hemopoietikus eredetét.

## **Anyagok és módszerek**

### **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 tobozmirigyeket sztereomikroszkóp alatt, mikropreparációra alkalmas eszközökkel (mikroolló, csipeszek, rovartűk, embriospatula) 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 tobozmirigyzeit, valamint központi idegrendszerük egyéb részeit (agytörzs, kisagy, retina, gerincvelő stb.) használtuk fel, továbbá kontroll szövetek céljából lépükből, bursa Fabricii-jükből, 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, M: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 helyeztem. Az így impregnált szerveket zselatin ággal előkészített tálkába 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 nitrogén gőzében -110 °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 sejtenyésztő flaskákba kiöntve -20°C-on fagyasztva tároljuk felhasználásig.

### 3. Metszetek készítése

Metszésre Shandon gyártmányú kriótómot használtunk, amelyet zselatinos blokk esetén  $-24^{\circ}\text{C}$ , májba ágyazott blokk esetén  $-19^{\circ}\text{C}$  munkahőmérsékletre állítottunk be. A blokkokat metszés előtt a kriosztátba helyeztük, hogy átvegyék annak hőmérsékletét. A mintákból 8-12  $\mu\text{m}$  vastag metszeteket készítettünk, amelyeket poly-L-lysine-nel (Sigma, P8920) bevont tárgylemezre vettünk fel. Az így elkészült metszeteket felhasználásig tékába rendezve  $-20^{\circ}\text{C}$ -on tároltam.

## 4. Immunhisztokémia és immunfluoreszcencia

### 4.1. Immunhisztokémia

Immunhisztokémiai vizsgálatainkat fagyasztott metszeteken végeztük, az alábbi protokoll szerint:

A metszeteket először  $37^{\circ}\text{C}$ -on PBS-be helyeztük a zselatin kioldása és a minták rehidrálása céljából. Ezután ráértük a primer ellenanyagot [1. táblázat] (40-80  $\mu\text{l}$  / metszet) a metszetekre, és szobahőmérsékleten, nedves kamrákban 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 küvetába töltött, PBS-ben 3%-osra hígított  $\text{H}_2\text{O}_2$ -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 peroxidázt tartalmazó 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 vízdékony 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 40-80µl / 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 percre inkubáltuk. A sejtmagok feltüntetésére a tárgylemezeket DAPI-val (4,6 diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride, Invitrogen, D1306) további 20 percre 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 percre (anti-egér IgG1 és IgG2a: Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, AL, anti-nyúl IgG: Vector Laboratories;). Ezután a rendszerhez megválasztott színű, straptavidinhez kapcsolt fluorokrómot adtunk (fluoreszcencia  $\lambda = 488\text{nm}$ , vagy  $\lambda = 594\text{nm}$ ), 40-80µl-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 tárgylemezre 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 strepavidin-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**

Primer ellenanyagok: lásd. 1. táblázat

**1. táblázat: Primer antitestek**

<b>Primer antitest</b>	<b>Antigén specificitás</b>	<b>Felismert sejttípusok</b>	<b>Beszerezés forrása / Forgalmazó:</b>	<b>Izotípus</b>
<b>HIS-C7</b>	csirke CD45	minden csirke leukocyta	Haymo Kurz (Freiburg, Németország) szívességéből Forgalmazó: CEDI-Diagnostics	IgG2a
<b>QH1</b>	α-macroglobulin	minden fűrj hemopoieticus és endothel sejt, kivéve erythrocyták	Thierry Jaffredo (Paris, Franciaország) szívességéből	IgG1
<b>CT3</b>	CD3	minden T-sejt	Chen-lo H. Chen (Birmingham, USA) szívességéből	IgG1
<b>polyclonal rabbit anti-CD3</b>	humán-CD 3	minden human T-sejt keresztreakció csirkével	Dako, Dánia	poliklonális nyúl
<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>M1</b>	IgM	B-sejtek	Chen-lo H. Chen (Birmingham, USA) szívességéből Forgalmazó: Southern Biotechnology	IgG2b
<b>11G2</b>	csirke Bu-1b	B-sejtek (és macrophagok egy alcsoportja)	Olli Vainio (Turku, Finnország) szívességéből	IgG1
<b>L22</b>	fürj Bu-1a	B-sejtek (és macrophagok egy alcsoportja)	Olli Vainio (Turku, Finnország) szívességéből	IgG1
<b>B7H6</b>	Bu-1a + Bu-1b	B-sejtek (és macrophagok egy alcsoportja)	saját laboratóriumunkban előállított antitest	IgG1
<b>P2M11</b>	MHC II	exogén antigént prezentáló sejtek	Hyun Soon Lillehoj (Beltsville, USA) szívességéből	IgG1
<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- 68.1</b>	87 kDa protein	monocyták, interdigitáló sejtek, macrophagok, B- sejt	CEDI-Diagnostics	IgG1
<b>CVI-ChNL- 68.2</b>	45 kDa protein	ellipsoid reticulocyták, macrophagok	CEDI-Diagnostics	IgG1
<b>CVI-ChNL- 74.2</b>	Ismeretlen	érett macrophagok	CEDI-Diagnostics	IgG1
<b>K1</b>	135 kDa protein	macrophagok és thrombocyták	Hyun Soon Lillehoj (Beltsville, USA) szívességéből	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 prekurzorai	CEDI-Diagnostics	IgG1
<b>NIC2</b>	30 kDa protein	madár dendritikus sejtek	saját laboratóriumunkban kifejlesztve	IgG1
<b>CG-106</b>	IgG	dendritikus sejtek	Sigma-Aldrich Magyarország Kft.	IgG1
<b>7B3</b>	transitin-like protein	glia sejtek	James A. Weston (Oregon, USA) szívességéből	IgM
<b>GA-5</b>	GFAP	glia sejtek	Sigma-Aldrich Magyarország Kft.	IgG1
<b>polyclonal rabbit anti- S100</b>	S100 i.c. Ca <sup>2+</sup> kötő fehérje	folliculo-stellate sejtek, dendritikus sejtek	DAKO, Dánia	poliklonális nyúl
<b>Amf-17b</b>	Vimentin	madár dendritikus sejtek, neuroepithel sejtek	DSHB	IgG1
<b>VIM 3B4</b>	Vimentin	madár dendritikus sejtek, neuroepithel sejtek	Progen, Biotechnik GmbH, Heidelberg	IgG2a
<b>Anti-Hu</b>	38 kDa protein	neuronok sejtmagjai	Invitrogen	IgG2a
<b>8D9</b>	Csirke L1-CAM jellegű fehérje	csirke neuron	DSHB	IgG1
<b>8F3</b>	Cytoplasmatikus csirke sejt marker	valamennyi csirke sejt	DSHB	IgG1
<b>QCPN</b>	Fürj sejtmeg marker	valamennyi fürj sejt	DSHB	IgG1



Chloronaphthol készítése: törzsoldat készítéséhez 500mg 4-chloro-1-naphthol (Sigma, C8890) oldunk fel 2ml abszolút ethanolban, majd -20°C-on tároljuk. Előhíváskor a törzsoldatból hígítunk, hogy a végtérfogat 25mg/100ml PBS legyen.

1%-os PBS-BSA: 1g BSA-t (Bovine Serum Albumin, Sigma A9647), 100ml PBS-ben feloldunk. Szűrés után 0,1 %-ban NaN<sub>3</sub>-at adunk hozzá.

Vízoldékony lefedőanyag készítése:

2,4g Moviol 4-88 (poly-vinil-alkohol) és 6g Glicerint 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°C-os vízfürdőbe helyezük, míg teljesen homogén oldat nem lesz. A lefedő anyagot lecentrifugáljuk 15'-ig 6900-as percnkénti fordulatszámon, hogy az esetleges szennyeződésekeltávolítsuk. A felülúszót szemcseppentőbe töltjük.

## 5. Lektin-hisztokémia

A metszeteket az immunhisztokémia pontban megfelelően készítettük elő. Ezután metszetenként 40-80µl fluorokrómmal ( $\lambda = 488\text{nm}$ ) konjugált Ricinus Communis Agglutinin I-t mértünk fel (Vector Laboratories; ). A lektint 1:20 arányban hígítottuk PBS-BSA-ban. Párásító kamrában inkubáltuk a metszeteket, 2 órán keresztül.

## 6. ATP-áz enzimhisztokémia

Az ATPáz festést Robins és Brandon (*Robins és Brandon 1981*) leírása alapján végeztük el. Röviden, a formalinfixált szervrészleteket 0,1 M Tris pufferrel (pH 7,2) mostuk, majd 1 órán keresztül 37 °C-on ATPáz médiumban inkubáltuk (0,1 M tris-maleát puffer pH 7,2, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 6 mM Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 28 mM glükóz és 1,6 mM ATP, dinátrium só). Az inkubálást alapos desztillált vizes mosás követte. Az enzim

aktivitásának helyét 1 %  $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ -dal tettük láthatóvá. Az előhívás 1 percig tartott szobahőmérsékleten.

## 7. Metszetek értékelése, fényképezés, képfeldolgozás

Metszeteket Zeiss Axiophot mikroszkóppal tekintettük át, és a hozzacsatlakoztatott 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.

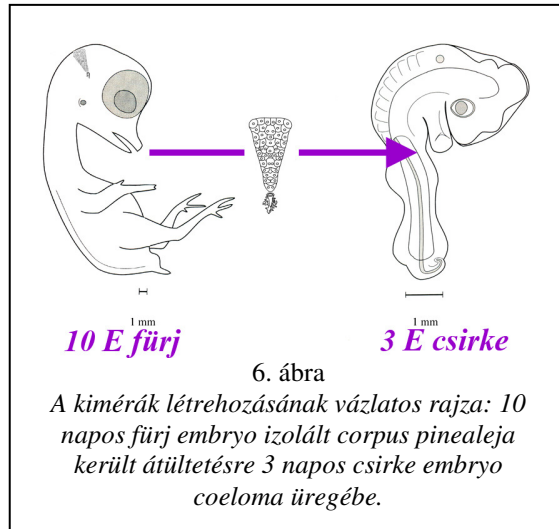
## 8. Embryomanipuláció: csirke-fürj kiméra

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 rögbé kondenzálódik, míg a csirke heterokromatin finoman hálózatszerű. A sejtállomány összetétele egyszerűen nyomon követhető, mivel a magok szerkezete mindvégig magán viseli az adott faj jellegzetességét. A különböző eredetű sejtek azonosítására számos faj- és sejt-specifikus ellenanyag elérhető. QCPN antitesttel a fürj sejtek magja, 8F3 ellenanyaggal a csirke sejtek cytoplasmája jelölhető.

### 8.1. A csirke-fürj tobozmirigy kimérák létrehozása

A kimérák létrehozásakor fürj embryok tobozmirigyeit ültettük át csirke embryok testüregébe, ami optimális környezetet biztosít a graft megtapadásához, továbbfejlődéséhez. (6. ábra) Az embryomanipulációs kísérleteket steril eszközökkel, oldatokkal végeztük.

Munkánk során 10-12 napos fürj embryokat használtunk donor állatokként. A kiemelt fürjeket Penicillin-Streptomycin-t tartalmazó steril PBS-be (röv: PenStrep-PBS) helyeztük. Az embryok fejlődő corpus pineale-it sztereomikroszkóp alatt alkalmas csipeszek, ollók, injekciós tűk segítségével eltávolítottuk, majd a beültetésig PenStrep-PBS-be helyeztük.

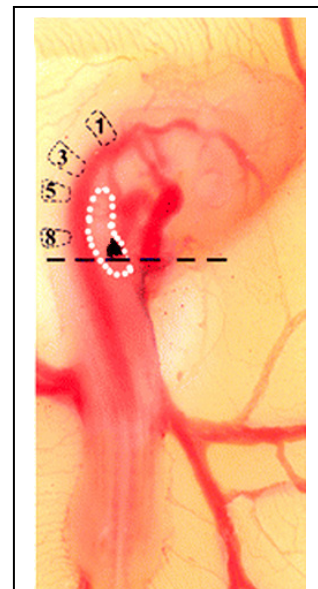


A recipiens szervezetek háromnapos csirke embryok voltak, amelyek fejlettsége megfelelt a Hamburger-Hamilton szerint beosztás 18-20. stádiumának. A fogadónak szánt tojásokat úgy pozicionáltuk, hogy az embryo a felülre eső felszín közelében helyezkedjen el. A tojások tompa végén bevezetett fecskendőn keresztül 2ml sziket 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. Az extraembryonalis ereket óvva wolfram szálból készített késsel metszést ejtettünk a recipiens embryo ektodermáján. Az így képzett, testüregbe nyíló sebet üvegbottal finoman kitágítottuk, hogy a graft könnyedén behelyezhető legyen.

A transzplantációra szánt corpus pinealét szén szemcsékkel megjelöltük, a fogadó embryoba helyeztük, üvegbot segítségével orientáltuk. Az optimálisan behelyezett transzplantátum a jobb tüdő-szív-aorta-májtelep által határolt testüreg részletben fejlődött tovább. (7. ábra)

Végezetül a tojáshéjat ragtapasszal zártuk le, és a kimérákat további 12-14 napig visszahelyeztük a keltetőbe.

Az inkubációs idő lejártá után a kimérákban finom preparációval felkerestük a szénnel vizualizált graft tobozmirigyeket, eltávolítottuk őket, csipeszek és injekciós tű



segítségével megtisztítottuk a környező szövetelemektől, majd a korábbi pontokban leírtaknak megfelelően szövettani feldolgozásukat kezdtük meg.

## **8.2. Fürj embryonalis tobozmirigyek kiültetése csirke chorioallantois membránra**

A chorioallantois membrán technika alkalmas módszer az embryonalis szervek tenyésztésére és a keringésből származó sejtek igazolására is.

Kísérleteink során fürjek tobozmirigyait távolítottuk el a 8. embryonalis napon, és ültettük át nyolcnapos csirke embryo chorioallantois membránjára (ChAM).

A felhasználni kívánt tojásokat állva, tompa felszínükkel felfelé inkubáltuk a transzplantáció időpontjáig. A kísérlet előkészítésekor a tojásokat alkohollal dezinficiáltuk; az átültetést steril eszközökkel, oldatokkal végeztük.

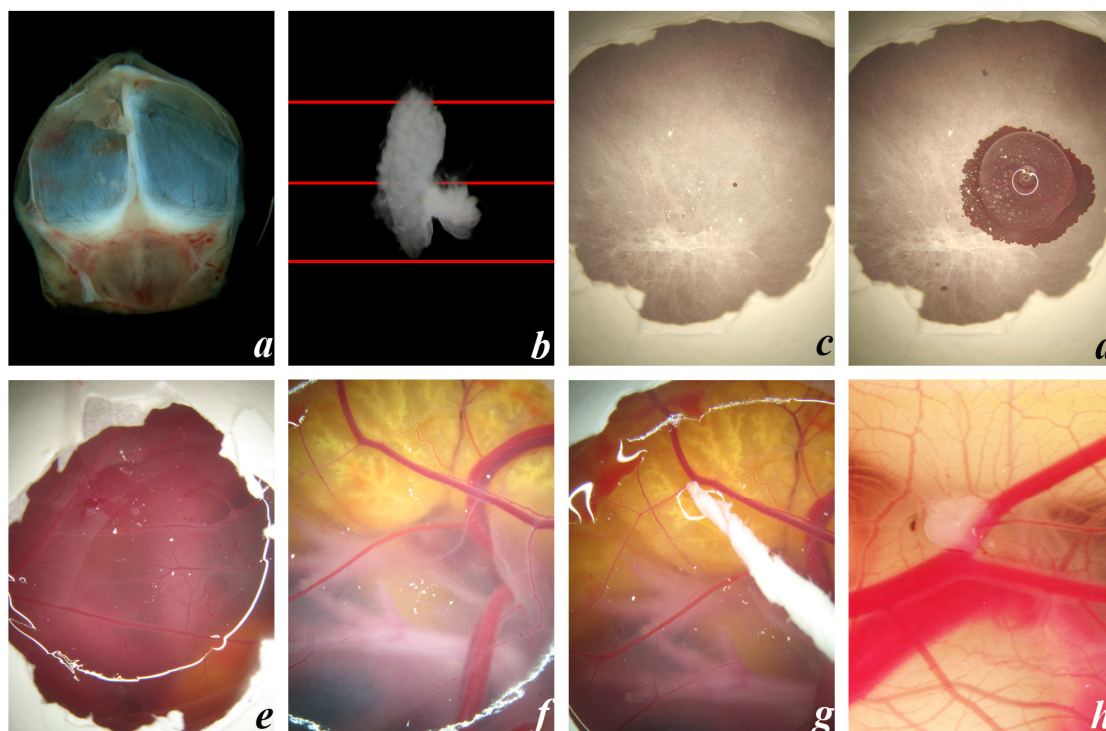
A donor embryo calvariáját eltávolítottuk, látótérbe hoztuk a fejlődő tobozmirigyét, óvatosan eltávolítottuk, végül PenStrep PBS-be helyeztük. (8. ábra/a-b) A fogadó tojás tompa felén kis ablakot képeztünk. Pasteur-pipettával 1 csepp PenStrep PBS cseppentettünk a héjhártyára, amely a nedvesség hatására könnyen levonható a vele összetapadt chorioallantois membránról. (8. ábra/c-d-e-f)

Következő lépésben a feltárt ChAM graftot fogadó területén papírvattából készített „paprikával” finom felületes sérülést okoztunk. (8. ábra/g) Az átültetni kívánt fürj tobozmirigyét embryospatulával, vagy Pasteur-pipettával a felsértett területre helyeztük. (8. ábra/h) Legvégül a csirketojásokat ragtapasszal zártuk, és megfelelő ideig visszahelyeztük a keltetőkbe.

1 hét inkubálás során a ragasztószalagot eltávolítottuk, és a graftot tartalmazó chorioallantois membrán részletet kimetszettük. Steril eszközökkel PenStrep PBS-ben a graftokat kipreparáltuk. Az eltávolított fürj corpus pinealék egy részét paraformaldehiddel lefixáltuk, és szövettani blokkot készítettünk.

Az tobozmirigy graftok másik csoportját az eltávolítás idejében 8 napos csirke embryok chorioallantois membránjára replantáltuk. Az eljárást a fentebb leírt lépések megismétlésével végeztük. Az így létrehozott kimérákat újból egy hétig inkubáltuk

keltetőgépeinkben. Az idő elteltével a kétszeresen inkubált graftokat kipreparáltuk, belőlük zselatin-szacharózos fagyasztott blokkokat készítettünk.



8. ábra

Fürj tobozmirigy graft kiültetése csirke chorioallantois membránra. (magyarázat a szövegben)

A „b” jelű képen a piros vonalak 1mm-es távolságot jelentenek

### **8.3. Az átültetéskor használt oldatok és vegyszerek elkészítése**

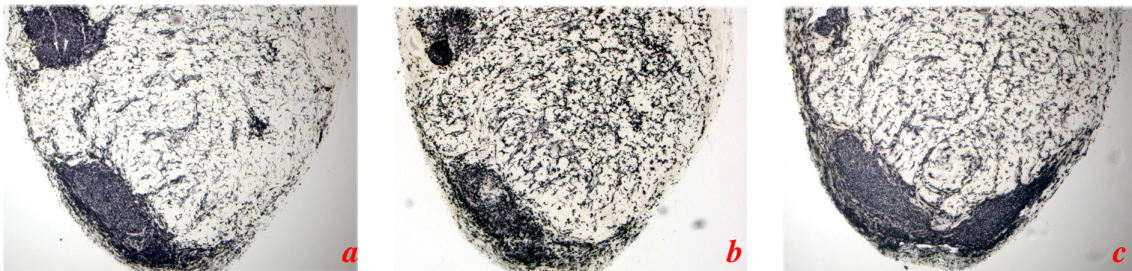
PenStrep-PBS: Penicillin-G porból (Sigma; P-4687; 1594 UI/mg) 60 mg-t 10 ml fiziológiás sóoldatban feloldunk. Streptomycin porból (Sigma; S-1277; 735 UI/mg) 1g-t 5 ml desztillált vízben feloldunk. Ebből 50 µl hozzámérünk a 60 mg / 10 ml-es Penicillin-G oldathoz. Az így készült keveréket 1l, előzőleg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

## Eredmények

### 1. A madarak központi idegrendszerében előforduló hemopoietikus eredetű sejtek karakterizálása

Munkánk kezdetén csirkék tobozmirigyét vizsgáltuk hemopoietikus eredetű sejtekre jellemző markerekkel, mert ez a szerv már a korai embryonalis szakaszban nagyszámú hemopoietikus eredetű sejtekkel infiltrálódik.

A CD45 fehérje egy membránhoz kötött tirozin-foszfátáz protein, amely az erythroid vonalat kivéve valamennyi véreredetű sejten megtalálható, ezért közös leukocita antigénnek hívjuk. Mivel a CD45 expresszióját nagyon korán megjelenő, kevésbé differenciált sejteken is megfigyelték, csirkében megfelelő eszköz a hemopoietikus sejtek vizsgálatára. CD45 specifikus monoklonális ellenanyag immuncytokémiájával erős pozitivitással kirajzolódott a corpus pineale perifériáján lokalizálódó lymphopinealis szövet (PALT), valamint diffúz pozitivitást észleltünk a tobozmirigy parenchymájában. (9./a ábra)



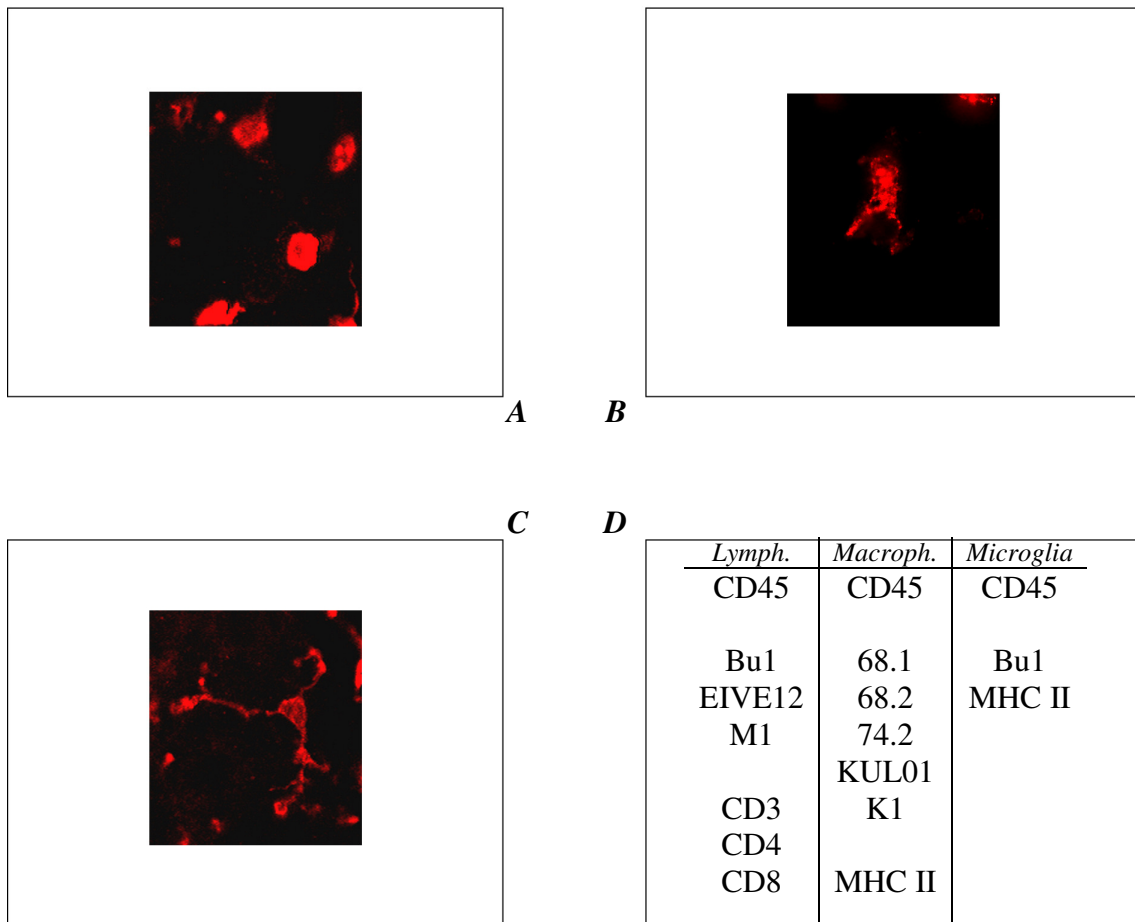
9. ábra

20 napos csirke tobozmirigye: a: CD45; b: MHC II; c: Bu1b immunfestés

A CD45-höz hasonló morfológiájú sejtípusokat azonosítottunk MHC II, valamint Bu1b jelöléssel. (9./b-c ábra) Előbbi molekulát, amely két polimorf láncból áll, az exogén antigének prezentációjára alkalmas sejtek hordozzák a szervezetben (pl: B-lymphocyták, macrophagok, dendriticus sejtek). A Bu1 madár specifikus molekula, mely funkciója eddig tisztázatlan, a B-lymphocyták specifikus membránantigénje. Két

izotípusát írták le, ezeket „a”, illetve „b” jelzéssel különböztetik meg. Fürjek kizárólag Bu1a $\oplus$  B-lymphocytákkal rendelkeznek, míg csirkék között egyaránt vannak Bu1b $\oplus$  és Bu1a $\oplus$  sejteket hordozók. A Bu1 antigént döntően **B-lymphocyták** expresszálják; megjegyzendő azonban, hogy a macrophagok egy szubpopulációján is megfigyelték (Houssaint E. et al., 1989). Munkánk során egyaránt felhasználtunk alloantigén specifikus (Bu1a és Bu1b) és anti-Bu1 ellenanyagokat.

A corpus pinealeban a PALT területén és az interfollicularis kötőszövetben előforduló CD45 pozitív sejteket morfológiájuk alapján 3 csoportba sorolhatjuk (10. ábra): vannak kerek (10./a ábra), amőboid (10./b ábra) és microgliaszerű (10./c ábra) sejtformák.



10. ábra

Így a fent említett három monoklonális antitesttel a következő sejteket lehet megkülönböztetni:

Az első csoportba kis kerek sejtek tartoznak (10./a ábra). Ezek a sejtek nagy mennyiségben koncentrálódnak a tobozmirigyben, azon belül is a lymphopinealis szövetben. Kettős immunfestések során a hasonló kerek sejteket két csoportba sorolhatjuk: egyik csoport Bu1, EIVE12, IgM pozitivitást mutat: B-lymphocyták, míg a másik populáció tagjai CD3 $\oplus$ /CD8 $\oplus$ , vagy CD3 $\oplus$ /CD4 $\oplus$  (T<sub>c</sub> és T<sub>h</sub>) felszíni antigéneket hordoznak: T-lymphocyták. Mindezek alapján elmondható, hogy a CD45 $\oplus$  sejtek első csoportját a szervezet, így a lymphopinealis szövet lymphocytái alkotják.

A CD45 $\oplus$  sejtek második csoportjába viszonylag szabálytalan alakú, apró nyúlványokkal, membrán fodrokkal rendelkező kerekded sejtek alkotják. (10./b ábra) Ilyen sejteket találtunk az erekben, a perivascularis térben és a meninxekben, kisebb számban a PALT-ban is. A sejtek karakterizálásuk során számos csirke macrophag markerrel (pl.: 68.2, 74.2, Kul01, K1) pozitivitást mutattak, továbbá felszínükön MHC II molekulát fejeztek ki. Az MHC II kimutatására kollaboránsainknak köszönhetően számos ellenanyagot próbáltunk ki. PFA fixált szöveteken legintenzívebb jelölést a TAP1 klón adta. Hasonló jelölést kaptunk a fürj MHC II specifikus TAC1 klón fürj tobozmirigyen végzett festésével is. A morfológiai jegyek és az immuncytokémiai, immunfluoreszcens kép alapján ezek a sejtek megfelelnek a központi idegrendszer monocyta / macrophag sejtjeinek.

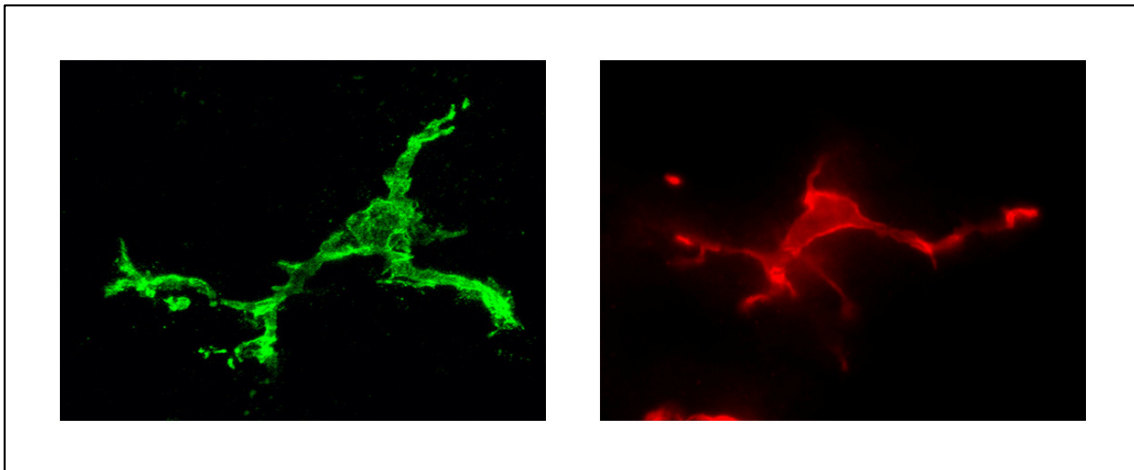
Mindezek mellett CD45 jelöléssel diffúz pozitivitást figyelhattunk meg a tobozmirigyben a PALT-on kívüli területeken is. Ezért a morfológiai képért döntően egy nyúlványos sejtpopuláció volt a felelős, amely tagjai kis ovális sejt-maggal, abból kiinduló 2-3 elágazó nyúlvánnyal rendelkeznek. (10./c ábra) Hasonló sejteket találtunk a központi idegrendszer egyéb területein is, így a cerebrumban, cerebellumban, retinában, gerincvelőben egyaránt (.ábra). A sejtek megjelenése és eloszlása alapján feltételeztük, hogy ezek a CD45 $\oplus$  nyúlványos sejtek megfelelnek a központi idegrendszer microglia sejtjeinek.



## 2. A csirkék microglia sejtjeinek karakterizálása

Bu1b B-lymphocytá jelöléskor csupán kerek sejtek jelölésére számítottunk a tobozmirigyekben, azonban ekkor is a CD45 festéshez hasonlóan nyúlványos sejtekből álló, diffúz pozitivitást találtunk a corpus pinealékban. A Bu1 $\oplus$  sejtek morfológiájuk, számbeli eloszlásuk alapján nagyon hasonlítottak a CD45 $\oplus$  microglia-szerű sejtekhez. (11. ábra)

A microglia sejtek immunfenotípezálása valamennyi fajban szegényes. Általánosan elmondható, hogy nem rendelkezünk microglia-specifikus szelektíven jelölő antitesttel. További célunk volt tehát a csirkék CD45 $\oplus$  valamint Bu1 $\oplus$  microglia-szerű sejtpopuláció karakterizálása.



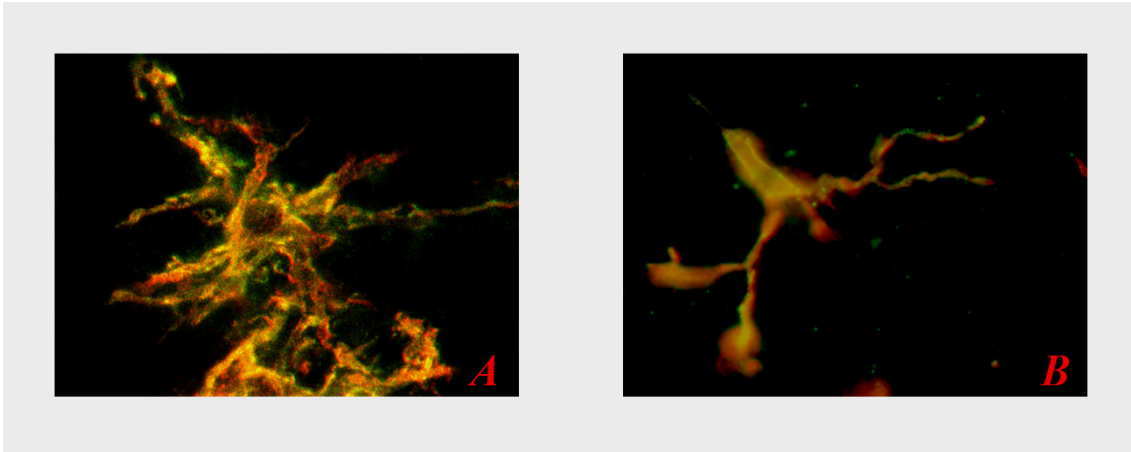
A

B

11. ábra

8 hetes csirke tobozmirigy: A: CD45 jelölés (zöld); B: Bu1 jelölés (piros)  
(630x)

Először is annak igazolására, hogy a két nyúlványos sejtpopuláció egy és ugyanaz, kettős immunfluoreszcenciát alkalmaztunk, CD45 és Bu1 specifikus monoklonális antitestekkel. A kettős festés kimutatta, hogy a két felszíni molekula ugyanazon nyúlványos, microgliaszerű sejteket jelöli. Ugyancsak kolokalizációt figyeltük meg a CD45 és MHC II kettős festése után is. (12. ábra)

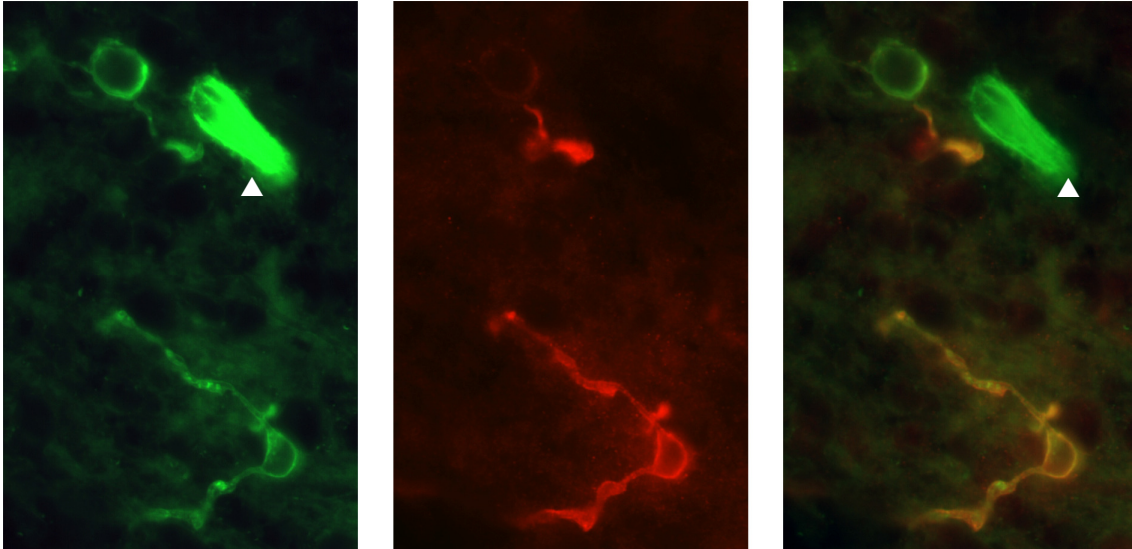


12. ábra

*8 hetes csirke tobozmirigy:*

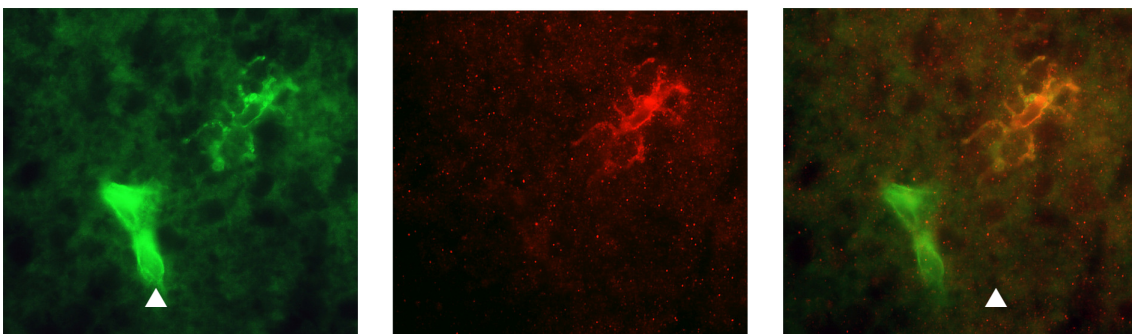
*A: CD45(zöld) és Bu1(piros) festés B: CD45(zöld) és MHC II(piros) festés. A kettős jelölés sárga színű.*

A microgliák karakterizálásakor kimutatták, hogy a lektinek pl: Ricinus communis agglutinin I felismerik a microglia sejteket a központi idegrendszerben. (Cuadros MA. et al., 2006) Rendelkezésünkre álló Alexa-488 fluorokrómmal konjugált RCA I lektinnel és CD45, ill. Bu1 ellenes monoklonális antitesttel kettős jelöléseket végeztünk. (13-14. ábra) A lektin pozitív sejtek között megtaláltuk a nyúlványos, CD45<sup>+</sup>/Bu1<sup>+</sup>/MHC II<sup>+</sup> microglia sejteket. Ez egyértelműen azt mutatja, hogy a CD45<sup>+</sup>/Bu1<sup>+</sup>/MHC II<sup>+</sup> nyúlványos sejtek megfelelnek a csirkék központi idegrendszerének microglia sejtjeinek.



13. ábra

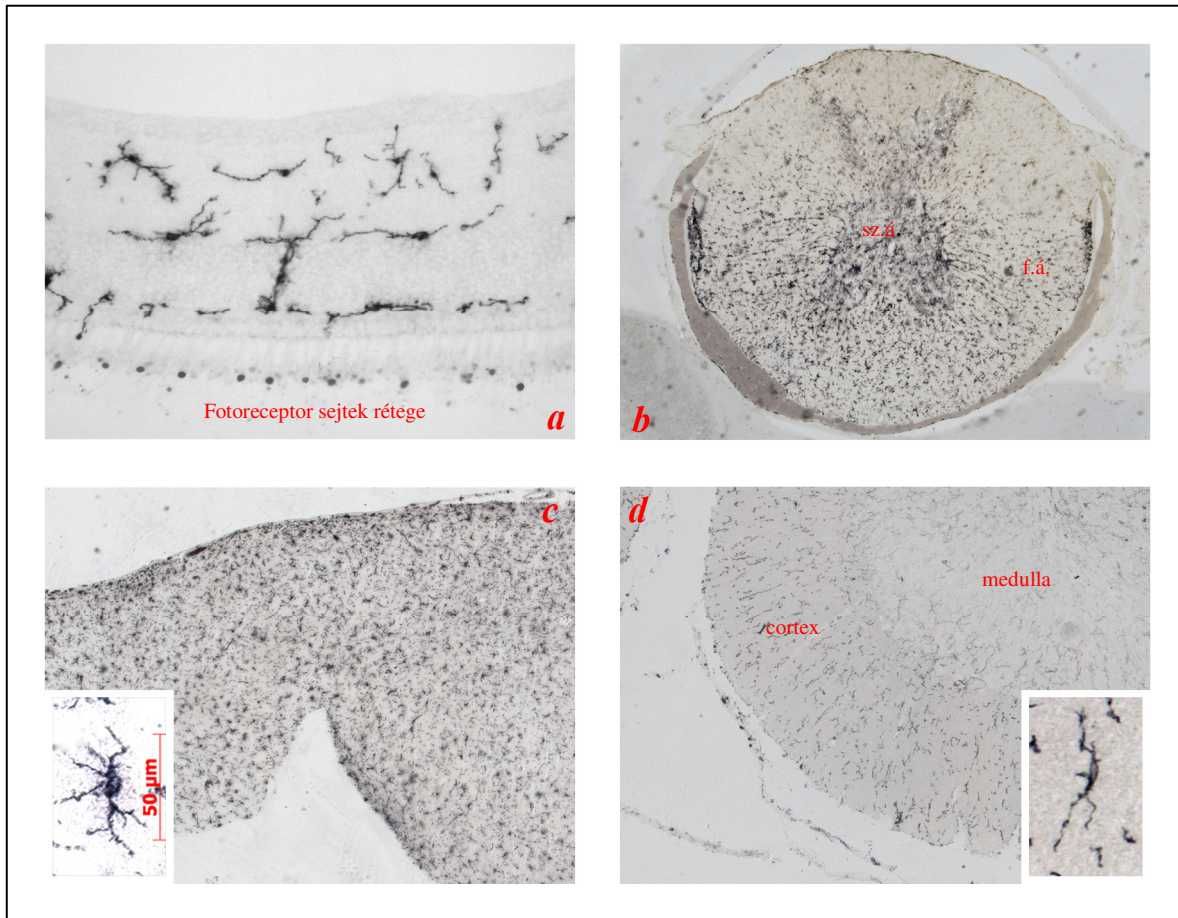
8 hetes csirke kisagy: RCA I lektin jelölés (zöld) és CD45 jelölés (piros) A RCA I lektin a microglia mellett az endothelt is jelöli (fehér nyilak). A microgliák RCA I/CD45 kettősen pozitívak, az endothelium egyedül RCA I $\oplus$ .



14. ábra

8 hetes csirke kisagy: RCA I lektin jelölés (zöld) és Bu1 jelölés (piros) A RCA I lektin a microglia mellett az endothelt is jelöli (fehér nyilak). A microgliák RCA I/Bu1 kettősen pozitívak, az endothelium egyedül RCA I $\oplus$ .

A tobozmirigyen végzett immuncytokémiai megfigyeléseink után CD45 és Bu1 markerekkel igyekeztünk feltérképezni a CD45 $\oplus$  sejtek központi idegrendszeri lokalizációját. A CD45 $\oplus$  sejtek a tobozmirigyen kívüli központi idegrendszeri struktúrák [pl: retina (15./a ábra), gerincvelő (15./b ábra), nagyagy (15./c ábra), kisagy (15./d ábra) mindegyikében előfordulnak, és elsősorban CD45 $\oplus$ /Bu1 $\oplus$ /MHC II $\oplus$  microglia sejtek.



15. ábra

Felnőtt, 8 hetes csirke **a**: retina (Bu 1 jelölés), a  $CD45^{\oplus}/Bu1^{\oplus}$  microglia sejtek legnagyobb számban a külső és a belső plexiform réteget népesítik be; **b**: gerincvelő (CD45 festés; sz.á. = szürkeállomány; f.á. = fehérállomány),  $CD45^{\oplus}/Bu1^{\oplus}$  sejtek egyenletesen fordulnak elő a szürke- és a fehérállományban; **c**: nagyagy (CD45 festés), az indexképen nagyobb nagyításon látható  $CD45^{\oplus}/Bu1^{\oplus}$ , nyúlványos microglia sejtek egyenletesen elosznak a teljes cortexben és a medullában is **d**: kisagy (CD45 jelölés), a kiegészítő képen nagyobb nagyításban látható nyúlványos,  $CD45^{\oplus}/Bu1^{\oplus}$  microglia sejtek mind a kisagyi cortexben, mind a medullában, egyenletesen elszórva helyezkednek el.

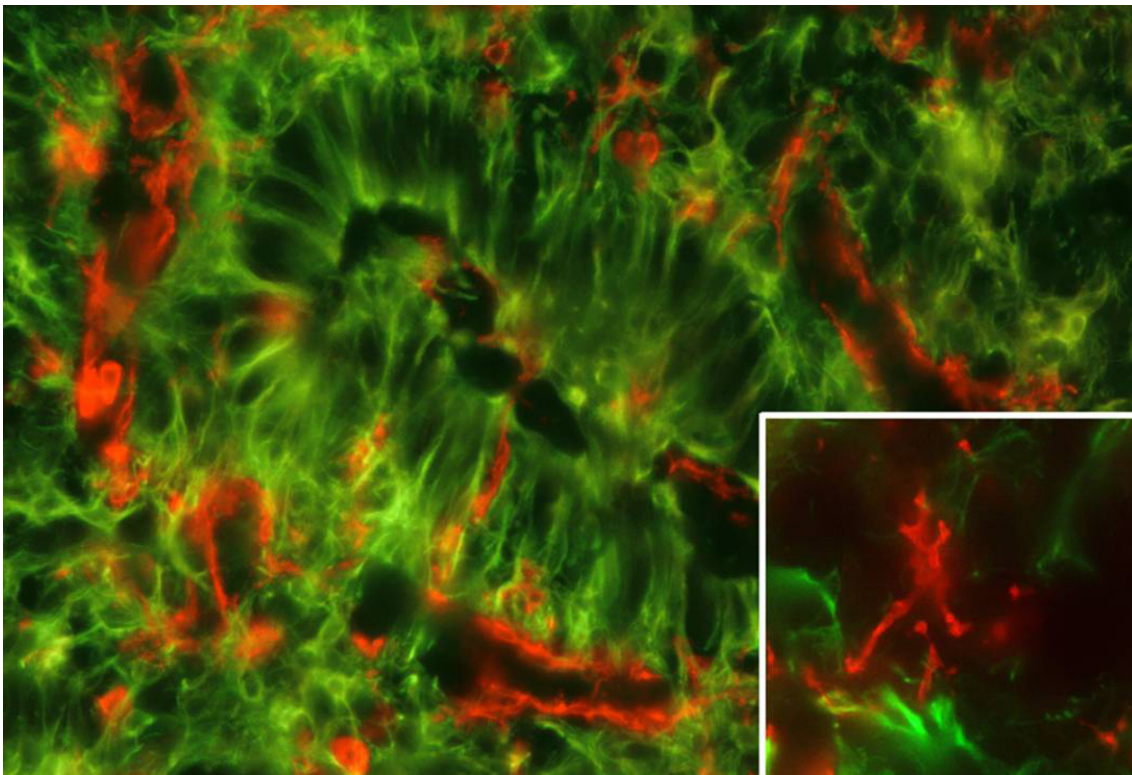
Az idegrendszer további sejtalkotóival történő összehasonlítás céljából glia- és neuron sejtekre specifikus immunfestéseket végeztünk. GFP glia jelölés alkalmazásakor sem a kisagyban, sem a tobozmirigyben nem találtunk kolokalizációt a  $CD45^{\oplus}/Bu1^{\oplus}/MHC\ II^{\oplus}$  sejtekkel (16-17. ábra) A Hu elnevezésű, neuron specifikus egér monoklonális ellenanyag az idegsejtek sejtmagjában található DNS-kötő fehérjét jelöl. Ezzel az ellenanyaggal végzett kisagyi immunfluoreszcens jelölés a  $CD45^{\oplus}$  sejtektől eltérő populációt jelöl. (18. ábra) Az S100 egy intracelluláris  $Ca^{2+}$  kötő fehérje, amelyet dendritikus sejtek, malignus elváltozások, valamint az adenohypophysis

folliculo-stellate sejtjei is expresszálnak. Hypophysisen végzett kettős festésekkel megállapítottuk, hogy a  $CD45^{\oplus}/Bu1^{\oplus}/MHC II^{\oplus}$  microglia sejtek S100-at nem fejeznek ki, így nem azonosak a hypophysisen is előforduló,  $S100^{\oplus}$ , csillag alakú sejtekkel. (19. ábra)



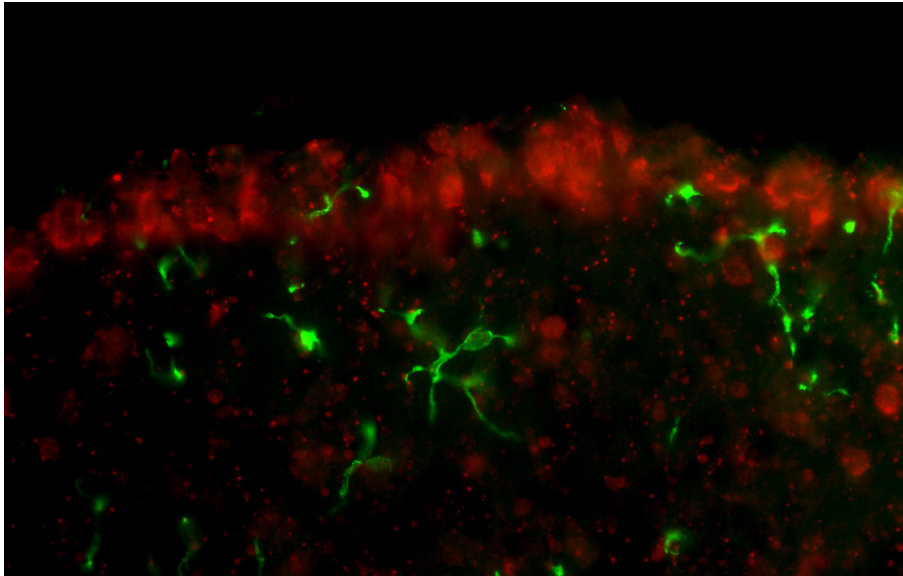
16. ábra

8 hetes csirke kisagy: GFAP: Nova-RED(barna) CD45: chloronaphtol(kék)  
100x / 400x / 1000x



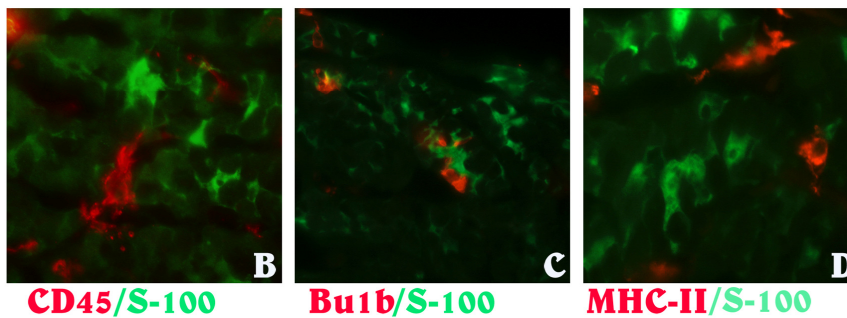
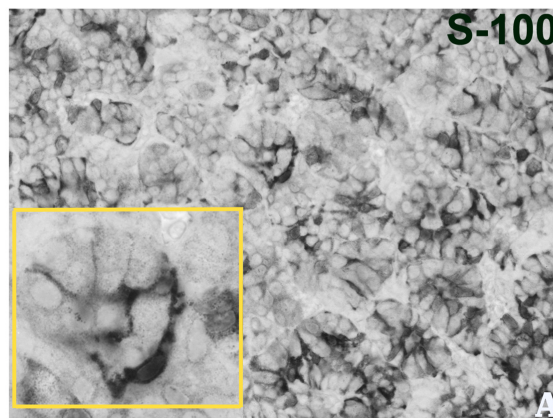
17. ábra.

Felnőtt csirke tobozmirigy: GFAP(zöld) és CD45(piros) immunfluoreszcens festés. A pinealocyták között és az interfollicularis térben  $CD45^{\oplus}$  sejtek helyezkednek el, amelyek közt megtalálhatók a nyúlványos microglia sejtek is (indexkép). A  $CD45^{\oplus}$  sejteken GFAP nem kolokalizál. (400x / 630x)



18. ábra

Felnőtt, 8 hetes csirke kisagykéreg: Hu jelölés (piros), CD45 (zöld). A  $CD45^{\oplus}$  microglia sejtek nem egyeznek meg a Hu pozitív sejtekkel. (400x)



19. ábra

Felnőtt, 2 hónapos csirke adenohypophysise: A: S100 festés (chloronaphtol); B: CD45(piros) és S100(zöld) festés; C: Bu1b(piros) és S100(zöld jelölés); MHC II(piros) és S100(zöld) festés. A kettős

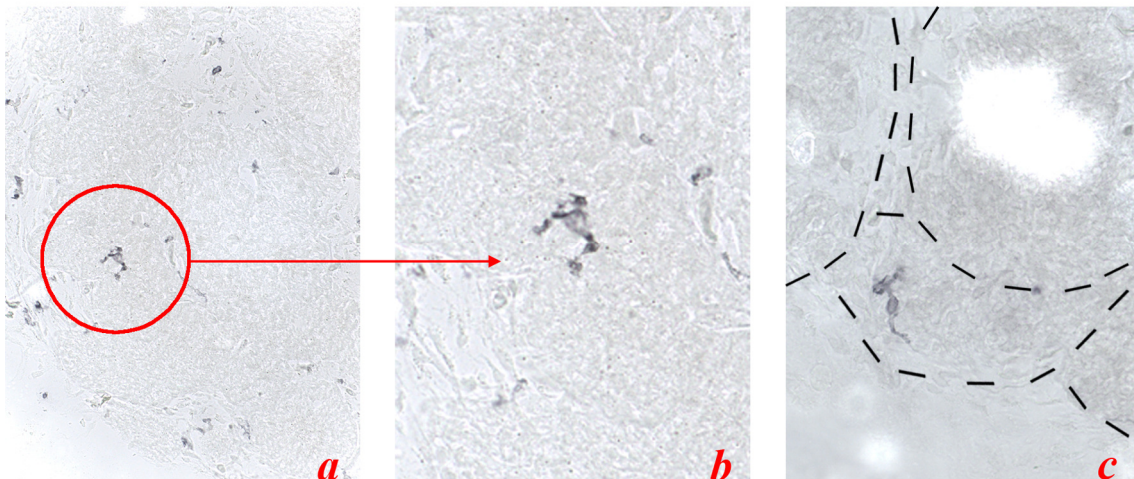
*immunfluoreszcens képeken látszik, hogy az S100 nem fejeződik ki a CD45<sup>+</sup>/Bu1<sup>+</sup>/MHC II<sup>+</sup> nyúlványos sejtekben.*

### 3. A microglia sejtek ontogenezisének vizsgálata

A microglia sejtek eredetével kapcsolatban a kutatók számos kérdőjelbe botlottak megfigyeléseik során. Több állásfoglalás között felmerül, hogy a microglia sejtek ontogenezisük során vérképző őssejtekből származnak. (Cuadros MA. et al., 1993) Vannak, akik a kapcsolatot egyenesen a monocyta-macrophag rendszerhez kötik, és úgy vélekednek, hogy a microgliák megfelelhetnek a központi idegrendszer histiocytáinak, azonban ennek egyelőre több pl: ultrastrukturális különbség ellentmond. Saját vizsgálataink során tapasztaltuk, hogy a microgliák felszínükön olyan antigéneket hordoznak, amely más hemopoietikus eredetű sejtekre jellemzőek. Ez az eredmény arra enged következtetni, hogy a csirkék CD45<sup>+</sup>/Bu1<sup>+</sup>/MHC II<sup>+</sup> microglia sejtjei is véreredetűek. Ennek vizsgálatára először a sejtek megjelenését tanulmányoztuk a fejlődő embryóban, majd embryomanipulációs technikákkal experimentálisan kutattuk a CD45<sup>+</sup>/Bu1<sup>+</sup>/MHC II<sup>+</sup> microglia sejtek ontogenezisét.

#### 3.1. A microglia sejtek megjelenésének tanulmányozása immuncytokémiával

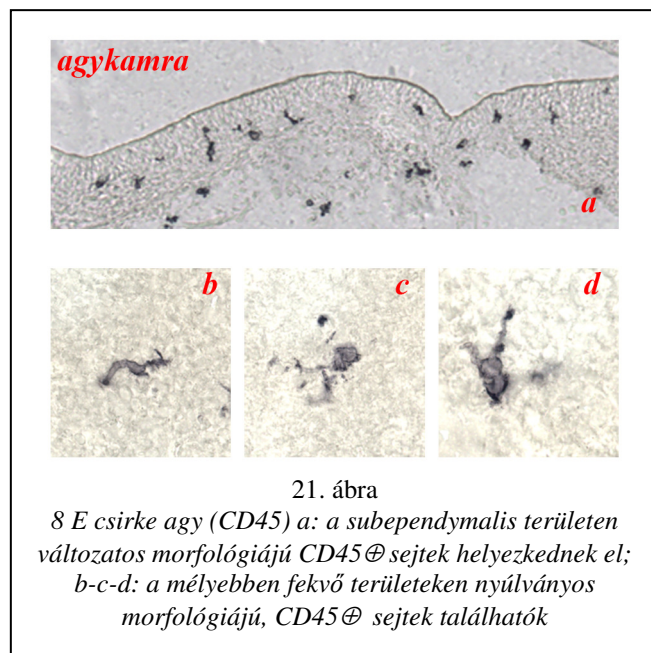
Csirke embryokból fejlődési sort hoztunk létre 1 napos léptéssel. Az embryok tobozmirigyait és további agyterületeket eltávolítottunk. CD45-Bu1-MHC II microgliákat elismerő antitestekkel vizsgálva a metszeteket tanulmányoztuk a microglia sejtek és előalakjaik embryonalis megjelenését. A tobozmirigyben az első CD45<sup>+</sup>, Bu1<sup>+</sup> és MHC II<sup>+</sup> sejtek a 9. embryonalis napon jelentek meg. Ezen sejtek morfológiája többnyire kerek formát mutatott, majd a 11. naptól kezdődően egyre nagyobb számban jelentek meg a nyúlványos morfológiájú microglia sejtek is, mind a pinealocyták közt, mind az interfollicularis kötőszövetben. (20. ábra)



20. ábra

11 E csirke tobozmirigye a-b: CD45; c: Bu1; a szaggattott vonalak a metszési síkba eső folliculusok határait jelölik

A központi idegrendszer egyéb területein (velőcső, agyhólyagok neuroepitheliuma) az első CD45 pozitív sejtek a 4. embryonalis jelentek meg, elsősorban a subependymalis területeken. A nyúlványos morfológiájú sejtek jelenléte a 8. embryonalis napon mutatható ki. (21. ábra)



21. ábra

8 E csirke agy (CD45) a: a subependymalis területen változatos morfológiájú CD45 $\oplus$  sejtek helyezkednek el; b-c-d: a mélyebben fekvő területeken nyúlványos morfológiájú, CD45 $\oplus$  sejtek találhatóak

### 3.2. Microglia sejtek eredetének nyomon követése csirke fűrj kimérékkel

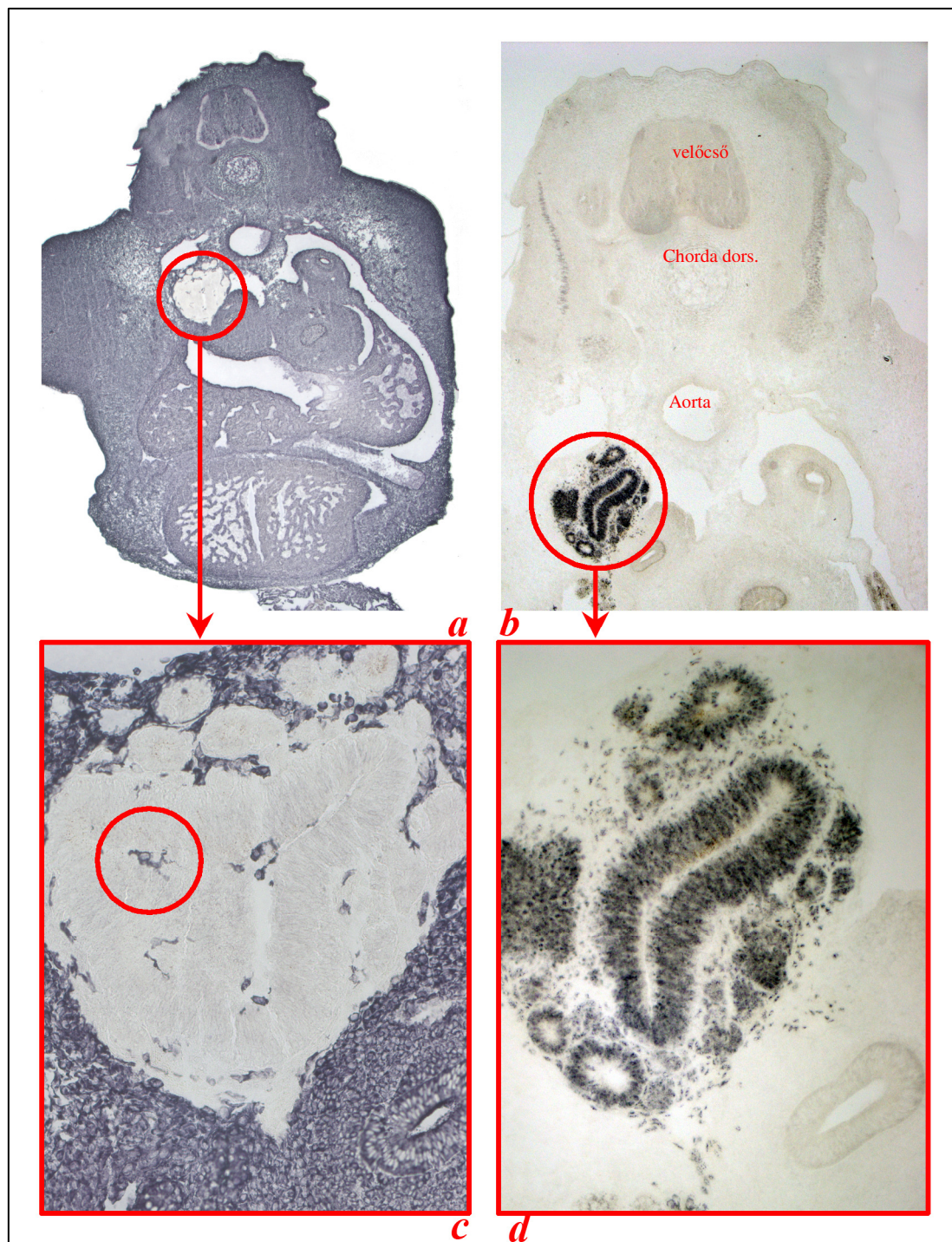
A csirke-fűrj kiméra olyan élőlény, amely szervezetét mindkét fajból származó sejtek alkotják. A különböző kimérékből eltávolított graftokban faj- és sejt-specifikus ellenanyagokkal meghatározható mely sejtek származnak a donor és melyek a fogadó embryoból.



A kísérlet során 10-12 napos fürj embryok tobozmirigyét ültettük át 3 napos csirke embryo (20 HH) testüregébe. A fogadó embryo testüregébe ideális környezetet jelent a graftok továbbfejlődésére azáltal, hogy a vaszkularizáció révén biztosítja a graftok tápanyag ellátását, valamint lehetőséget teremt a véreredetű sejtek kolonizációjára. Közel 30 transzplantációt végeztünk, melyekből 20 életben maradt kiméra embryot nyertünk (66,6%). A 20 embryoból 15 graft került szövettani feldolgozásra (össz: 50%).

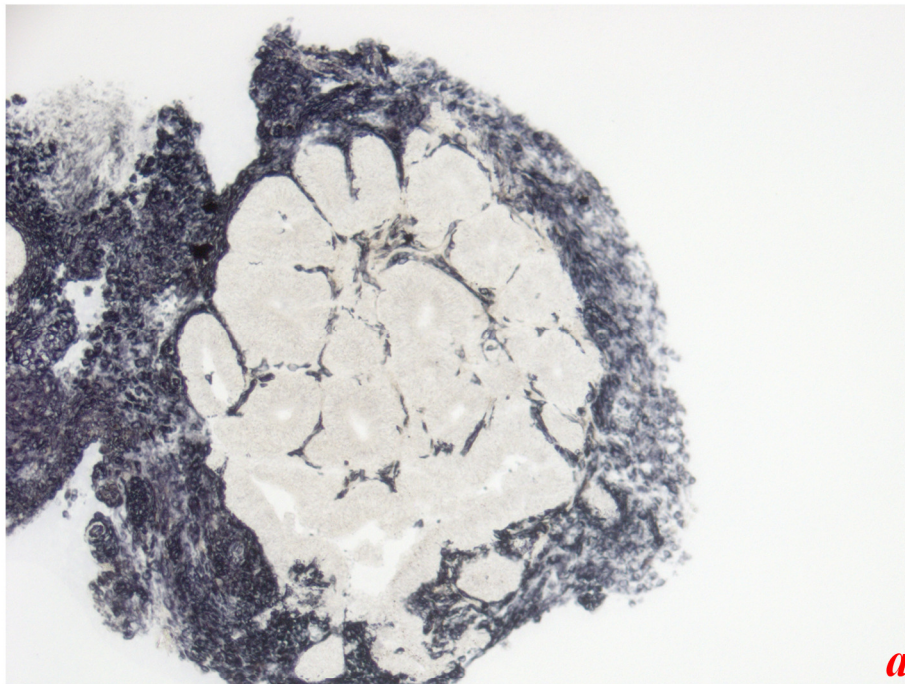
2 nap inkubálás után egy kiméra embryot lefixáltunk. (22. ábra) A 22./a-b képen az embryok keresztmetszete látható a graft feltüntetésével, a 22./c-d képeken pedig a graft látható nagyobb nagyítás alatt. 8F3 csirke cytoplasmikus festéssel (22./a-c kép) valamennyi csirke eredetű sejt láthatóvá vált, így gazdaszervezet olyan sejtjei is amelyek infiltrálták a graftot. A QCPN jelölés (22./b-d kép) valamennyi fürj sejtmagot kimutat, így láthatóvá válnak a graft sejtjei. A graft és a gazdaszervezet közti hisztológiai kapcsolat létrejöttét jelzi, hogy 8F3 $\oplus$ , csirke eredetű sejtek kolonizálták a graftot, és az átültetett tobozmirigyből is QCPN $\oplus$  fürj sejtek vándoroltak a környező csirke szövetekbe. A fürj tobozmirigy graftban már 2 nap inkubálás után megtalálhatóak a csirkéből bevándorló, 8F3 $\oplus$ , microglia megjelenésű nyúlványos sejtek (22./c kép vörös körben).

14 nap inkubálás után a fennmaradó kimérákból a graftokat izoláltuk, és immunhisztokémia vizsgálatokra fagyasztott metszeteket készítettünk. 8F3 csirke specifikus ellenanyaggal való jelöléskor jól látszik, hogy a további inkubálás során a graftba vándorolt csirke eredetű sejtek száma jelentősen felszaporodott, és a graftot is teljesen körülveszik. (23./a kép) A 8F3 $\oplus$  sejtek egy része CD45 $\oplus$  microglia típusú nyúlványos sejt. (23./b. kép)

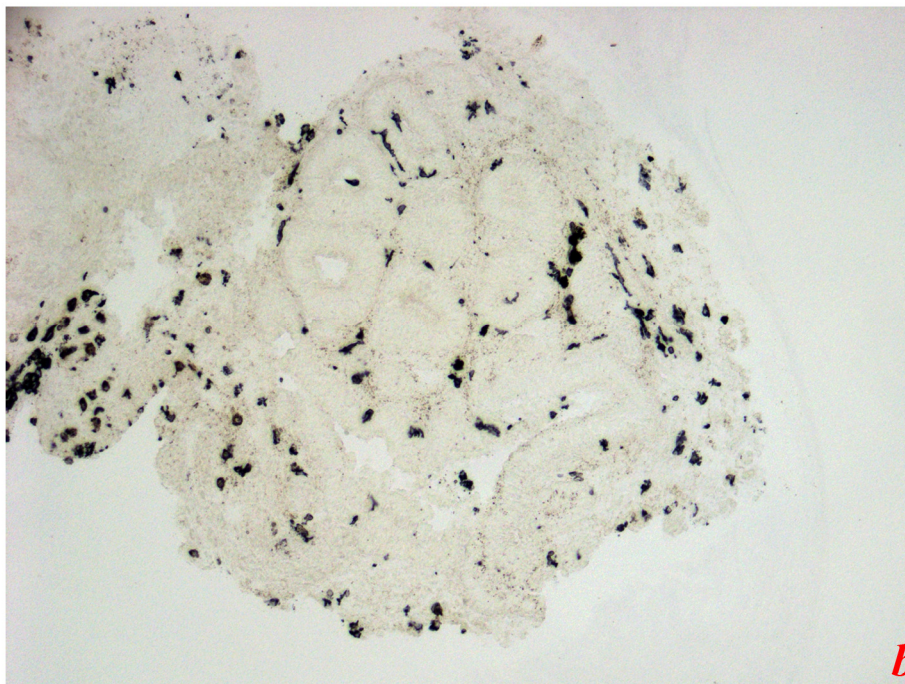


22. ábra

*Kiméra embryo 2 nappal a transzplantáció után: a+c: 8F3 festés; b+d: QCPN festés*



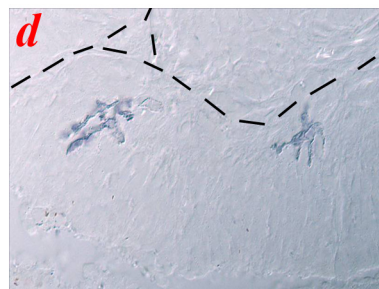
*a*



*b*



*c*



*d*

23. ábra: 2 hétig inkubált kimérából eltávolított graftok: a: 8F3; b: CD45; c-d: CD45 (DIC)

Az itt kapott eredmények azt mutatják, hogy a csirke eredetű 8F3 $\oplus$ /CD45 $\oplus$  nyúlványos sejtek benépesítik a beültetett fűrj tobozmirigy graftot.

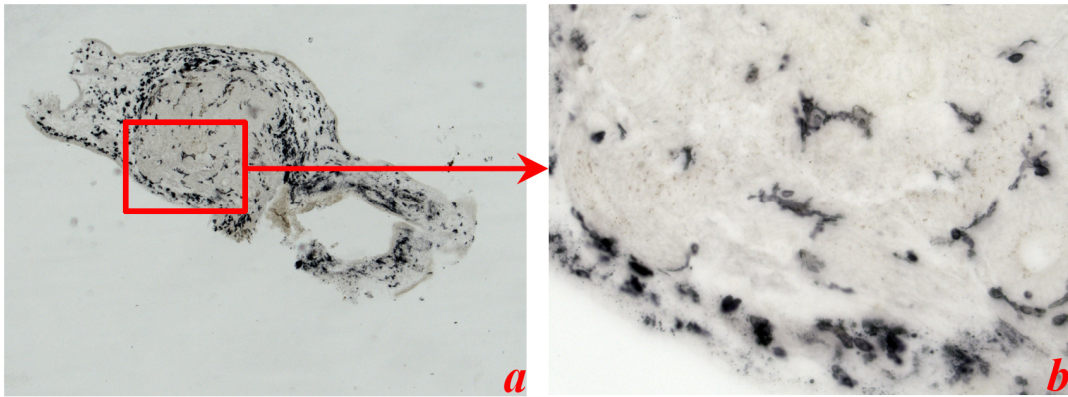
### 3.3. Fűrj tobozmirigy kiültetése csirke chorioallantois membránra

Mivel az előbbi módszer esetében nem zárható ki teljesen, hogy nem a környező mesenchymából vándorolnak be sejtek a graftba, és transzformálódnak át microgliává, ill. a hemopoietikus előalakok útja sem pontosan nyomon követhető, egy újabb kiméra módszert alkalmaztunk. Ezúttal fűrjek tobozmirigyeit távolítottuk el a 8. embryonalis napon, és ültettük át nyolcnapos csirke embryok chorioallantois membránjára (ChAM). A módszert a tumorbiológiában is előszeretettel használják az angiogenesis és áttétképzés modellezésére. Esetünkben a kísérlet specificitása abban áll, hogy a ChAM-ra ültetett corpus pineale graftokat ekkor csak a véráram útján oda jutó sejtek képesek kolonizálni.

Az transzplantációkat két csoportban végeztük: a graftokat 1 hétig inkubáltuk a chorioallantois membránon, majd eltávolítottuk őket. Az így nyert tobozmirigyek egy részét feldolgoztuk, míg másik csoportjukat újabb 1 hetes időtartamra szintén 8 napos csirke embryok ChAM-jára replantáltuk. Összesen 15 átültetést végeztünk: ebből az egyszeresen inkubált és kinyert graftok száma 7 (46%), míg a kétszeresen inkubált tobozmirigyeké 3 (20%).

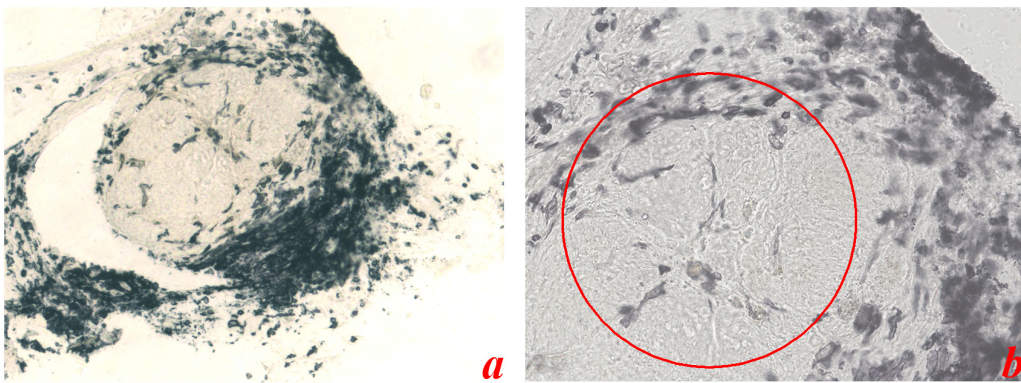
A tobozmirigy graftokba már egy hét után számos 8F3 $\oplus$  csirke eredetű sejt vándorolt, és indult differenciálódásnak. A sejtek közül számos mutat CD45 $\oplus$ -t, és vannak, amelyek tobozmirigy alapállományát is infiltrálták. Ezek közt már találtunk 1 hetes intervallum után is CD45 $\oplus$ /Bu1 $\oplus$ /MHC II $\oplus$  microglia típusú nyúlványos sejteket is. (24. ábra)

A 2x transzplantált graftokban a csirke származású bevándorolt sejtek száma nagyobb volt. A tobozmirigyben ekkor már nagyobb arányban fordultak elő a kitüntetett markerekkel pozitivitást mutató microglia sejtek. (25./a ábra) Néhány CD45 $\oplus$  microglia típusú sejt a folliculusok pinealocytái között is kimutatható. (25./b ábra)



24. ábra

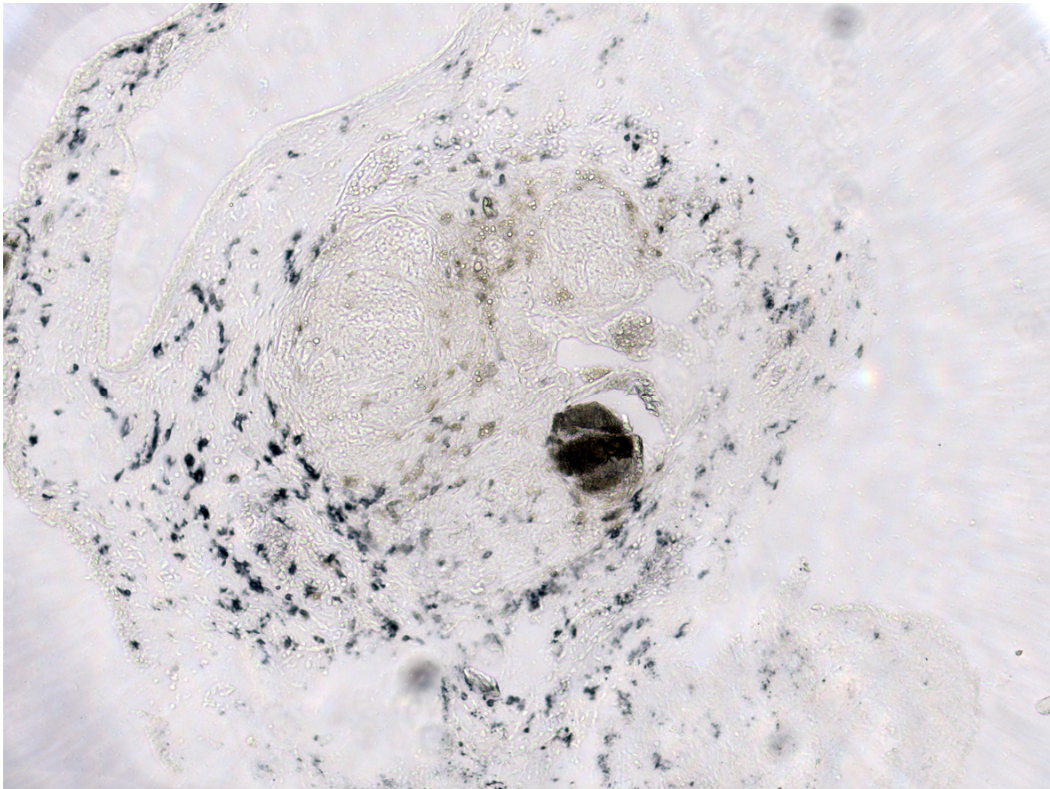
*ChAM kiméra graftok 1 hét inkubálás után – CD45 jelölés a: 100x b: 400x*



25. ábra

*2 hétig inkubált, replantált fűrj corpus pineale graft – CD45 jelölés a: 100x b: 400x*

A 25. ábrán látható graft sorozatmetszeteit macrophag-ellenes antitestekkel is (74.2, 68.1, 68.2, Kul01) megfestettük. (26. ábra) Ezekon a metszeteken jól látható, hogy macrophag markerekkel pozitív sejtek a tobozmirigy állományát diffúzan nem infiltrálták, csak a széli területeken, a kötőszövetben helyezkednek el.



26. ábra

*Kétszeresen inkubált tobozmirigy graft macrophag-ellenes jelöléssel (74.2) 200x*

A chorioallantois membránra graftolás alapján kijelenthetjük, hogy a tobozmirigyét és a központi idegrendszert a véráram útján véreredetű prekursor sejtek kolonizálni képesek, és ott  $CD45^{\oplus}$  microgliává, valamint  $CD45^{\oplus}/74.2^{\oplus}$  szöveti macrophagokká differenciálódhatnak.

## Összefoglalás és diszkusszió

Munkánk során a központi idegrendszer véreredetű sejtekkel történő infiltrációját tanulmányoztuk, és immuncytokémiai, illetve embryomanipulációs technikákkal követtük nyomon a hemopoietikus sejtek differenciálódását, ontogenezisét. Csirke hemopoietikus sejtekre specifikus, CD45-t felismerő antitestekkel vizsgálva az idegszövetben 3 sejtpopulációt azonosítottunk: **a.)** Az első populáció tagjai kis kerek sejtek voltak, amelyek a lymphopinealis szövetet (PALT) alkotó T- és B-lymphocytáknak felelnek meg. **b.)** A második sejtpopuláció tagjai változatos alakot mutattak, melyek felszínükön számos makrofág markert hordoztak. Cytológiai és immunmorfológiájuk alapján ez a heterogén sejtcsoport megfelel a központi idegrendszerhez asszociáltan is előforduló változatos macrophag családnak. Elhelyezkedésüket tekintve elsősorban a perivascularis területeken, a meninxekben és kis mennyiségben a PALT-ban lokalizálódtak. **c.)** A harmadik CD45<sup>+</sup> sejtpopulációt kerekded sejttaggal és elágazó nyúlvánnyal rendelkező sejtek alkották. Ezek a sejtek valamennyi idegrendszeri szövetben (nagy- és kisagy kéreg-, illetve velőállomány, tobozmirigy pinealocyták között, retina plexiform rétegeiben, a hypophysis neuroszekréciós sejtjei között, stb.) elszórtan, nagy számban fordultak elő. A nyúlványos sejtek morfológiájuk alapján megfeleltek a microgliáknak.

A központi idegrendszer (KIR) szövetében mindenhol megtalálhatók a microgliák, így megbízható hisztológiai azonosításuknak fontos szerepe lehet az agy struktúráját károsító, microgliosisal járó degeneratív, demyelinizációs és traumás kórképek tanulmányozásakor. Microglia sejtekre specifikus marker nem ismert, ezért cytológiai karakterizálásuk és ontogenezisük kevésbé tisztázott. Emlősökben korábban megfigyelték, hogy CD45 festéssel, vagy makrofág markerek felhasználásával microglia morfológiájú sejtek is jelölődnek. (Provis JM. et al., 1996) Hasonlóképpen madarakban is, Bhave és kutatócsoportja (1998) csirke CD45 specifikus ellenanyaggal (LT40 klón) microglia-szerű sejteket mutattak ki a madarak belsőfül epithel sejtjei között. Cuadros és munkatársai (2006), szintén egy csirke CD45 molekulát szelektíven jelölő ellenanyaggal (His-C7 klón) microglia sejteket írtak le a csirkék központi

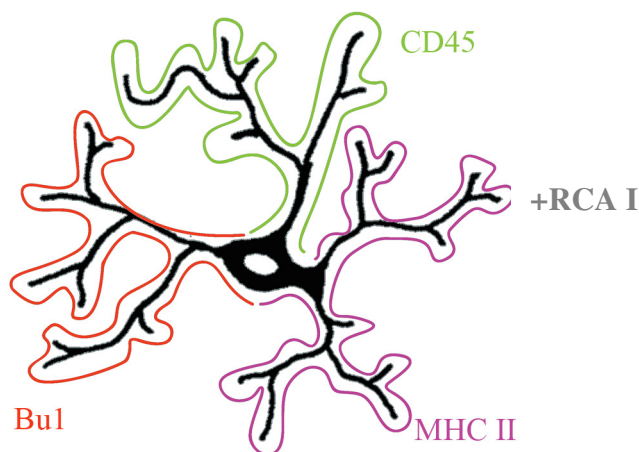
idegrendszerében. Utóbbi sejtek RCA I lektin pozitívak voltak, ami a megerősítette, hogy ezek a sejtek microgliák. (Shin DH. et al., 2003) Mosenson és McNulty 2006-os cikkükben beszámoltak róla, hogy a PALT tanulmányozásakor Bu1 immunfestéssel B-lymphocyták és egy microglia szerű sejt populáció azonosítható. Kísérleteink során MHC-II specifikus ellenanyaggal szintén kimutattunk microglia típusú sejteket. Ezt követően összehasonlítottuk a különböző markereket és így kettős festéssel elsőként igazoltuk, hogy a fentebb felsorolt markerek (CD45, Bu1, MHC II, RCA I) ugyanazt a sejtípust, a microgliát jelölték. A microgliák karakterizálásakor az említett markereken kívül más, hemopoiotikus eredetű sejtekre (macrophag, lymphocyta, dendritikus sejt stb.) jellemző anitgén kolokalizációját nem figyeltük meg. Glia- és neuronspecifikus markerekkel igazoltuk, hogy a CD45/Bu1 pozitív microglia sejtek nem egyeznek meg a központi idegrendszer neuroepithelialis eredetű ideg és glia elemeivel. Ezzel először egyesítettük azokat a markereket, amelyekkel így csirkében biztosan lehet a microgliákat.

A microglia sejtek ontogenesise vitatott. A microgliák felszínén kimutatott hemopoiotikus eredetű sejtekre jellemző markerek támogatják azt a nézetet, hogy a sejteknek ontogenetikai kapcsolata van a hemopoiotikus őssejtekkel. Például felvetődött, hogy e sejtek az érpályán kívülről, a szíkhólyagból származnak. (Kaur C. et al., 2001). A szíkhólyag-elmélet szerint a microglia sejtek prekursorai, a velőcső vaszkularizációja előtt és a definitív vérképzést megelőzve, kolonizálják az idegrendszer telepét. Ezt megerősítette egy csirke-fürj parabiotikus kísérlet is, amely szerint nem lépnek ki microglia prekursor sejtek az 5-12 napos madár embryok keringéséből. (Kurz H. et al., 1998). Ez a kísérlet csak kezdeti embryonális stádiumokat vizsgált, jóval korábban, mint ahogy a differenciált microglia sejtek megjelenének a tobozmirigy telepében, vagy a kisagy idegszövetében. Felnőtt egereken végzett parabiotikus kísérletek szintén cáfolták a microgliák vérkeringésből történő utánpótlását. (Ajami B. et al., 2007) Ez a kísérlet már a postembryonális stádiumokat vizsgálta. Ezzel szemben egy másik adat azt mutatja, hogy besugárzott felnőtt egerek keringésében fluoreszcensen injektált csontvelő eredetű sejtek képesek kisszámú perivaszkuláris makrofággá és microgliává differenciálódni (Vallieres L. és Sawchenko PE., 2003). Mezey Éva és kollégái ugyancsak csontvelőtranszplantált egerekkel végzett kísérletük során megfigyelték, hogy a központi idegrendszerbe az érpályából hemopoiotikus



eredetű sejtek 1-3 %-a neuronokká is differenciálódott (Mezey E. et al., 2000). Vizsgálataink során madár embryokon, mint modellállatokon tanulmányoztuk a microglia sejtek eredetét. A corpus pinealekban az első CD45 $\oplus$  sejtek a 9. embryonalis napon jelennek meg, amelyek a 11. embryonalis napra válnak differenciált microgliává. A központi idegrendszer egyéb területein nyúlványos a CD45 $\oplus$ /Bu1 $\oplus$ /MHC II $\oplus$  microglia sejtek a 8. embryonalis életnapon már azonosíthatók. A csirkék és fürjek alkalmasak a kiméra készítésre, a kimérák pedig megfelelő eszköznek bizonyultak a microglia sejtek sorstérképének elkészítésére. Ezzel a módszerrel lehetett tisztázni a ganglionléc sejtek eredetét, a vérképző őssejtek differenciálódását, a bursai dendritikus sejtek származását, a myoblastok eredetét, stb. (Nagy et al. 2004, Nagy N. és Goldstein AM., 2006). Embryomanipulációs kísérleteinkben fürj tobozmirigy csirke testüregbe ültetett kimérával és chorioallantois membrán (ChAM) kiméra kísérletekkel először igazoltuk, hogy a madarak microglia sejtjei az embryonalis élet során a keringésből kilépett CD45 $\oplus$  prekursorokból származnak.

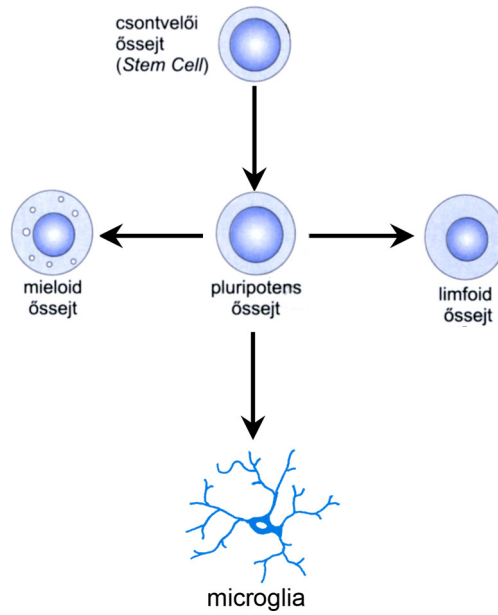
**Konklúzió:** Kísérletes munkánkkal igazoltuk, hogy a csirke microgliák CD45-t, Bu1-t, MHC II-t jelölő antitestekkel és RCA I lektinnel specifikusan kimutathatók. (27. ábra)



27. ábra

*Microglia sejt vázlatos rajza. A különböző színek a különböző felszíni antigéneket jelölik.*

Az experimentális embryologia módszereivel bizonyítottuk, hogy a tobozmirigy, így a központi idegrendszert az embryonalis élet folyamán hemopoietikus eredetű sejtek kolonizálják, és ott microgliává differenciálódhatnak.



28. ábra

*Hemopoieticus őssejtek differenciálódásának lehetséges útjai*

*Jövőbeni terveink között szerepel, hogy a microgliákat, differenciálódásukat tanulmányozzuk in vitro körülmények között is, felszíni markereiket tovább karakterizáljuk, és újabb embryomanipulációs technikákkal tisztázzuk esetleges szikhólyag eredetüket.*

## Köszönetnyilvánítás

Munkám elkészítéséhez hálás köszönettel tartozom témavezetőimnek, a Semmelweis Egyetem Humánmorfológiai és Fejlődésbiológiai Intézet Fejlődésbiológiai Laboratórium vezetőinek, **Dr. Nagy Nándornak** és **Prof. Dr. Oláh Imrének**, akik mindvégig egyengették az utamat, hasznos tanácsokkal láttak el, és lehetőséget teremtettek e munka kivitelezéséhez.

Köszönettel tartozom továbbá laboratóriumunk valamennyi munkatársának, régieknek és jelenlegieknek, Ph.D. hallgatóknak, asszisztenseknek, TDK-soknak egyaránt, akik minden alkalommal önzetlenül segítettek. Álljon itt a nevük ABC-sorrendben: dr. Bíró Éva, Bódi Ildikó, Csikós Gergely, Fügedi Jutka, dr. Hajdú Zoltán, dr. Igyártó Botond-Zoltán, dr. Kocsis Katalin, Lackó Erzsébet, Orbán Edit, Pásti Kamilla, Vidra Györgyné.

Köszönettel tartozom Vích Béla professor emeritusnak, aki mindig hasznos tanácsokkal látott el – nem kizárólag tudományos területen. Köszönöm Pál Margitnak állandó, önzetlen segítségnyújtását.

Végül megköszönném dr. Lukács Ákosnak és dr. Szabó Arnoldnak, hogy a képfeldolgozás terén szerzett tapasztalataikat megosztották velem.

Hálával tartozom a Semmelweis Egyetem Humánmorfológiai és Fejlődésbiológiai Intézet valamennyi munkatársának, akiket külön itt nem soroltam fel, de egy-egy gesztussal rendszeresen megkönnyítették kutatómunkámat.

Természetesen köszönöm családtagjaimnak, barátaimnak is hihetetlen türelmüket, hisz ők igazán megtapasztalták, mennyire nehéz velem.

**2. oldal:**

1. ábra: Csirke tobozmirigy – CD3 immunfestés (saját felvétel)

**4. oldal:**

2. ábra: A perivascularis tér phagocytái (saját ábra)

**6. oldal:**

3. ábra: Pío del Río- Hortega portréja (forrás: Google)

**7. oldal:**

4. ábra: Microglia kimutatása Hortega-féle impregnációval (forrás: Google)

**12. oldal:**

5. ábra Cuadros MA., Navascués J. után módosítva [Progress in Neurobiology 56:173-189(1998)]

**18-19. oldal:**

1. táblázat: Primer antitestek

**22. oldal:**

6. ábra: A kimérák létrehozásának vázlatos rajza

7. ábra: Recipiens csirke embryo fotója (Dr. Nagy Nándor szívességéből)

**24. oldal:**

8. ábra: Fűrj tobozmirigy graft kiültetése csirke chorioallantois membránra. (saját felvétel)

**25. oldal:**

9. ábra: 20 napos csirke tobozmirigye (saját felvétel)

**26. oldal:**

10. ábra (saját felvételek)

**28. oldal:**

11. ábra: 8 hetes csirke tobozmirigy (saját felvétel)

**29. oldal:**

12. ábra: 8 hetes csirke tobozmirigy (saját felvétel)

**30. oldal:**

13. ábra: 8 hetes csirke kisagy (saját felvétel)

14. ábra: 8 hetes csirke kisagy (saját felvétel)

**31. oldal:**

15. ábra: 8 hetes csirke retina, gerincvelő, nagyagy, kisagy

**32. oldal:**

16. ábra: 8 hetes csirke kisagy (saját felvétel)

17. ábra: Felnőtt csirke tobozmirigye (saját felvétel)

**33. oldal:**

18. ábra: Felnőtt, 8 hetes csirke kisagykéreg (saját felvétel)

19. ábra: Felnőtt, 2 hónapos csirke adenohypophysise (saját felvétel)

**35. oldal:**

20. ábra: 11 11 E csirke tobozmirigye (saját felvétel)

21. ábra: 8 E csirke agy (saját felvétel)

**37. oldal:**

22. ábra: Kiméra embryo 2 nappal a transzplantáció után (saját felvétel)

**38. oldal:**

23. ábra: 2 hétig inkubált kimérából eltávolított graftok (saját felvétel)

**40. oldal:**

24. ábra: ChAM kiméra graftok 1 hét inkubálás után (saját felvétel)

25. ábra: 2 hétig inkubált, replantált fűrj corpus pineale graft (saját felvétel)

**41. oldal:**

26. ábra: Kétszeresen inkubált tobozmirigy graft macrophag-ellenes jelöléssel (saját felvétel)

**44. oldal:**

27. ábra Microglia sejt vázlatos rajza. Cuadros MA. & Navascués J. után módosítva

**45. oldal:**

28. ábra: Hemopoieticus őssejtek differenciálódásának lehetséges újtjai (módosított ábra; eredeti forrása: Google)

**Irodalomjegyzék és forráshivatkozások listája**

- Acarin L. et al., Demonstration of poly-N-acetyl lactosamin residues in amoeboid and ramified microglial cells in rat brain by tomato lectin binding. *J. Histochem. Cytochem.* 42:1033-1041 (1994)
- Ajami B. et al., Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci.* 10:1538-43. (2007)
- Albrecht RM., Belier R., Histochemical, functional and structural features of isolated adherent supraependymal cells: characterization as resident mononuclear phagocytes. *Scanning Electron Microsc.* 3:55-71 (1979)
- Alliot F. et al., Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Dev. Brain Res.* 117:145-152 (1999)
- Andjelkovic A. V. et al., Macrophages / microglial cells in human central nervous system during development: an immunohistochemical study. *Brain Res.* 814:13-25 (1998)
- Angata T. et al., Cloning and characterization of human Siglec-11. A recently evolved signaling that can interact with SHP-1 and SHP-2 and is expressed by tissue macrophages, including brain microglia. *J. Biol. Chem.* 277:24466-24474 (2002)
- Ashwell K., The distribution of microglia and cell death in the fetal rat forebrain. *Dev. Brain Res.* 58:1-12 (1991)
- Bairati A., Spreading factor and mucopolysaccharides in the central nervous system of vertebrates. *Experientia* 9:461 (1953)
- Bechmann et al., Immune surveillance of mouse brain perivascular spaces by blood-borne macrophages. *Eur. J. Neurosci.* 14:1651-1658 (2001)
- Bernhard W., Avrameas S., Ultrastructural visualisation of cellular carbohydrate components by means of concanavalin. *A. Exp. Cell. Res.* 64:232-236 (1971)
- Balkemore AW., The ultrastructure of the subependymal plate in the rat. *J. Anat.* 104:423-433 (1969)
- Bhave SA. et al., Macrophage and microglia-like cells in the avian inner ear. *J Comp Neurol.* 398:241-56.(1998)
- Bleier R., Albrecht RM., Supraependymal macrophages of third ventricle of hamster: morphological, functional and histochemical characterization in situ and culture. *J. Comp. Neurol.* 192:489-504 (1980)
- Bloom W., Fawcett DW., *A Textbook of Histology*, Saunders, Philadelphia pp 386-396. (1975)
- Boya J. et al., Ultrastructural study on the origin of rat microglia cells. *Acta Anat.* 130:329-335 (1987)
- Boya J., Calvo JL., Carbonell L., A. et al., A lectin histochemistry study on the development of rat microglial cells. *Journal of Anatomy*, 175:229-236 (1991)
- Caley DW., Maxwell DS., An electronmicroscopic study of the neuroglia during postnatal development of the rat cerebrum. *J. Comp. Neur.* 133:45-70 (1968)
- Cammermeyer J., Morphologic distinctions between oligodendrocytes and microglia cells in the rabbit cerebral cortex. *Am. J. Anat.* 118:227-248 (1966)
- Castellano B. et al., A comparative study on NDPase and TPP activities of glial cells in vertebrates and invertebrates. *Trab. Inst. Cajal Invest. Biol.* 75:81 (1984)

- Castellano B. et al., A double staining technique for simultaneous demonstration of astrocytes and microglia in brain sections and astroglial cell cultures. *J. Histochem Cytochem* 39:561-568 (1991)
- Chamberlain JG., Scanning electron microscopy of epileptic cells (macrophages) in the fetal rat brain *Am J. Anat.* 139:443-447 (1975)
- Chen L. et al., Distribution, markers, and functions of retinal microglia. *Ocul Immunol Inflamm.* 10:27-39. (2002)
- Clara, Max: *Das Nervensystem des Menschen* (56-57. o.)
- Crain B.J., Tran S.D., Mezey É., Transplanted human bone marrow cells generate new brain cells. *Journal of the Neurological Sciences* 233:121-123 (2005)
- Cramer EB.: Cell biology of phagocyte migration from the bone marrow, out of the bloodstream, and across organ epithelia. *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates* p: 341-351, Raven Press, New York (1992)
- Cuadros MA. et al., Microglia in the mature and developing quail brain as revealed by a monoclonal antibody recognizing hemopoietic cells. *Neurosci. Lett.* 148:11-14 (1992)
- Cuadros MA. et al., First appearance, distribution and origin of macrophages in the early development of the avian central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 330:113-129 (1993)
- Cuadros MA. et al., Specific Immunolabeling of Brain Macrophages and Microglial Cells in the Developing and Mature Chick Central Nervous System. *J. Histochem Cytochem* 54:727-738 (2006)
- Deiters O.: *Untersuchungen über Gehirn und Rückenmark des Menschen und der Säugethiere* (M. Schultze Hrsg.) F. Vieweg und Sohn, Braunschweig (1865)
- Fujimoto E. et al., Histochemical studies on the differentiation of microglial cells in the cerebral hemispheres of chick embryos and chicks. *Histochemistry* 87:209 (1987)
- Glenn J.A. et al., Further studies on the identification of microglia in mixed brain cell cultures. *Brain Res. Bull.* 22:1049 (1989)
- Goli C., Sulla fina anatomia degli organi centrali del sistema nervoso. *Rivista Sperimentale di Freniatria e di Medicina Legale* 11:72-123, 193-220 (1885)
- Guillemin GJ., Brew B.J., Microglia, macrophages, perivascular macrophages and pericytes: a review of function and identification. *Journal of Leukocyte Biology* 75:388-397 (2004)
- Henle J.: *Handbuch der Nervenlehre des Menschen*, F. Vieweg und Sohn, Braunschweig (1871)
- Houssaint E. et al., Bu-1 antigen expression as a marker for B cell precursors in chicken embryos. *Eur J Immunol.* 19:239-43. (1989)
- Ibrahim MZ. et al., The histochemical identification of microglia. *J. Neurol. Sci.* 22:211-233 (1974)
- Ignácio AR. et al., Distribution of microglial cells in the cerebral hemispheres of embryonic and neonatal chicks. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38:1615-1621 (2005)
- Irie-Sasaki J. et al., CD45 regulated signalling pathways. *Curr. Top Med. Chem.* 3:783-796 (2003)
- Jeurissen SH. et al., Monoclonal antibodies as probes for defining cellular subsets in the bone marrow, thymus, bursa of Fabricius and spleen of the chicken. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 19:225-238 (1988)

- Jordan FL., Thomas E., Brain Macrophages: questions of origin and interrelationship. *Brain Res. Rev.* 13:165-178. (1988)
- Kaur C., Ling E. A., Study of the transformation of amoeboid microglial cells into microglia labeled with isolectin Griffonia simplicifolia in postnatal rats. *Acta Anat. Basel* 142:118-125 (1991)
- Kaur C. et al., Origin of microglia. *Microscopy Research and Technique* 54:2-9 (2001)
- Kershman J., Genesis of microglia in the human brain. *Arch. Neurol. Psych.* 41:24-50 (1939)
- King JS., A light and electron microscopic study of perineuronal glial cells and process in the rabbit neocortex. *Anat. Rec.* 161:111-124 (1968)
- Kolmer VW., Über eine eigenartige Beziehung von Wanderzellen zu den Choroideal-plexus des Gehirns der Wirbeltiere. *Anat. Anz.* 54:15-19 (1921)
- Kopper L. és Schaff Zs. (szerk): *Patológia; Medicina kiadó* (2004)
- Kruger L., Maxwell DS., Electron microscopy of oligodendrocytes in normal rat cerebrum. *Am. J. Anat.*, 118:411-436 (1966)
- Kurz H., Christ B., Embryonic CNS macrophages and microglia do not stem from circulating, but from extravascular precursors. *Glia* 22:98-102 (1998)
- Leone C. et al., Characterization of human monocyte-derived microglia-like cells. *Glia* 54:183-92. (2006)
- Lewis PD., The fate of the subependymal cell in the adult rat brain, with a note on the origin of microglia. *Brain* 91:721-736 (1968)
- Ling EA., Tan CK., Amoeboid microglial cells in the corpus callosum of neonatal rats. *Arch. Histol. Jpn.* 36:265-280 (1974)
- Ling EA., Some aspects of amoeboid microglia in the corpus callosum and neighbouring regions of neonatal rats. *J. Anat.* 121:29-45 (1976)
- Ling EA., Light and electron microscopic demonstration of some lysosomal enzymes in the amoeboid microglia in neonatal rat brain. *J. Anat.* 123:637-648 (1977)
- Ling EA., The origin and mature of microglia. *Advances in cell neurobiology* Vol.2. p: 33-82; Academic Press, London (1981)
- Ling EA., Transformation of monocytes into amoeboid microglia and into microglia in the corpus callosum of postnatal rats as shown by labelling monocytes by carbon particles. *J. Anat.* 128:847-858 (1979)
- Malloy J.J., Low F. N., Scanning electron microscopy of the subarachnoid space in the dog. IV. Subarachnoid macrophages. *J. Comp. Neurol.*, 167:257-284 (1976)
- Malmfor T., Electron microscopic description of the glial cells in the nervous opticus in mice. *Journal Ultrastructural Research* 8:193 (1963)
- Matsuyama H. et al., Electron microscopic studies on the developing telencephalic wall of the rat fetus. *Okajimas Folia Anat.* 50:273-293 (1973)
- Mezey É., Chandross KJ., Bone marrow: a possible alternative source of cells in the adult nervous system. *Eur. J. of Pharmacology* 405:297-302 (2000)

- Mori S., Leblond C. P., Identification of microglia in light and electron microscopy. *J. Comp Neurol.* 135:57-80 (1969)
- Morse DE., Low F.N., The fine structure of subarachnoid macrophages in the rat., *Anat Rec.*, 174:469-476 (1972)
- Mosenson JA. & McNulty JA., Characterization of lymphocyte subsets over a 24-hour period in Pineal-Associated Lymphoid Tissue (PALT) in the chicken. *BMC Immunology* 7:1 (2006)
- Murabe Y., Sano Y., Morphological studies on neuroglia. I. Electron microscopic identification of silver-impregnated glial cells., *Cell Tissue Res.* 222:223-226 (1981)
- Murabe Y., Sano Y., Morphological studies on neuroglia. VII. Distribution of „Brain macrophages” in brains of neonatal and adult rats, as determined by means of immunohistochemistry, *Cell Tissue Res.* 229:85-95 (1983)
- Nagy N. et al., Quail as the chimeric counterpart of the chicken: morphology and ontogeny of the bursa of Fabricius. *J Morphol.* 259:328-39. (2004)
- Nagy N., Goldstein AM., Intestinal coelomic transplants: a novel method for studying enteric nervous system development. *Cell Tissue Res.* 326:43-55. (2006)
- Oehmichen M., Inflammatory cells in the central nervous system: an integrating concept based on recent research in pathology, immunology, and forensic medicine., *Prog. Neuropathol.* 5:277-335 (1983)
- Olah I., Glick B., Lymphopineal tissue in the chicken, *Dev Comp Immunol.* 8:855-862 (1984)
- Pardanaud L. et al., Vasculogenesis in the early quail blastodisc as studied with a monoclonal antibody recognizing endothelial cells. *Development* 100:339-349 (1987)
- Paterson JA. et al., Investigation of glial cells in semithin sections. Transformation of subependymal cells into glial cells, as shown by autoradiography after <sup>3</sup>H-thymidine injection into the lateral ventricle of the brain in young rats. *J. Comp. Neurol.* 149:83-102 (1973)
- Penfield W.: Neuroglia and microglia. The interstitial tissue of the central nervous system. *Special Cytology* 2nd. Ed. ; Editor: Cowdry EW.; p: 1445-1482 (1932)
- Penninger JM. et al., CD45: new jobs for an old acquaintance. *Nat. Immunol.* 2:389-396 (2001)
- Provis JM., Microglia in human retina: a heterogeneous population with distinct ontogenies. *Perspect Dev Neurobiol.* 3:213-22. (1996)
- Ramón y Cajal S., *Histologie du système nerveux de l’homme et des vertébrés.* Vol. 1. Maloine, Paris (1909)
- Ramón y Cajal S., Contribución al conocimiento de la neuroglia del cerebro humano. *Trabajos del Laboratorio de Investigaciones biológicas de la Universidad de Madrid* 11:255-315 (1913)
- Río-Hortega P. del, El „tercer elemento” de los centros nerviosos. I. La microglía en estado normal. *Boletín de la Sociedad Española de Biología* 9:68-82 (1919)
- Río-Hortega P. del, La Glía de escasas radiaciones (oligodendroglía), *Boletín de la Sociedad Española de Biología* 21:63-92 (1921)
- Río-Hortega P. del, Microglia. In: Penfield W. (Editor), *Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System.* Paul B. Hoeber, New York, 482-534 (1932)



- Robertson WF., A microscopic demonstration of the normal and pathological histology of mesoglia cells. *Journal of Mental Science* 46:724 (1900)
- Schnitzer J., Enzyme-histochemical demonstration of microglial cells in the adult and postnatal rabbit retina. *J. Comp. Neurol.* 282:249 (1989)
- Shin DH. et al., Glial cells in the chicken optic tectum. *Brain Res.* 962:221–225 (2003)
- Streit WJ., An improved staining method for rat microglial cells using lectin from *simplicifolia* (GSA I-B4). *J. Histochem. Cytochem.* 38:1683-1686 (1990)
- Szende Béla, Suba Zsuzsanna: Bevezetés a hisztopatológiába. *Medicina* (2005)
- Vallières L, Sawchenko PE., Bone marrow-derived cells that populate the adult mouse brain preserve their hematopoietic identity. *J. Neurosci.* 23:5197-207. (2003)
- Virchow R., Ueber eine im Gehirn und Rückenmark des Menschen aufgefundene Sustanz mit der chemischen Rection der Cellulose. *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin* 6:135-138 (1854)
- Vaughn JE., Peters A., A third neuroglial cell type. An electron microscopic study, *J. Comp. Neurol.*, 133:269-288 (1968)
- Veromaa T. et al., Monoclonal antibody against chicken Bu-1a and Bu-1b alloantigens. *Hybridoma* 7:41-48 (1988)
- Virchow R., Ueber das granulirte Ansehen der Wandungen der Gehirnventrikel. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie* 3:242-250 (1846)
- Wu CH. et al., Down-regulation of membrane glycoprotein in amoeboid microglia transforming into ramified microglia in postnatal rat brain. *J. Neurocytol* 23:258-269 (1994)