

Szakkolgozat

A máj strómális sejtjei: a titokzatos Ito-sejtek nyomában

Készítette:

Erdélyi Kamilla
SE ÁOK VI. évf.

Témavezető:

Dr. Nagy Nándor

Semmelweis Egyetem
Humánmorfológiai és Fejlődésbiológiai Intézet



Budapest, 2009

TARTALOMJEGYZÉK

Irodalmi áttekintés	4
1. Bevezetés	4
2. A csirke máj fejlődése	5
3. A csirke máj szövettani szerkezete	6
3.1 Az Ito-sejtek funkciói	11
3.2 Az Ito-sejtek eredete	12
Anyagok és módszerek	14
1. Kísérleti állatok	14
2. Szövettani feldolgozás	14
2.1. Zselatin-szacharózos beágyazás	14
2.2. Májba ágyazott fagyasztott metszetek készítése	15
2.3. Beágyazáshoz használt oldatok	15
3. Metszetek készítése	15
4. Immunhisztokémia és immunfluoreszcencia	16
4.1. Immunhisztokémia	16
4.2. Immunfluoreszcencia	17
4.3. A metszetek értékelésére használt ellenanyagok	18
4.4. Az immunfestések során alkalmazott előhívószerek, oldatok	19
5. Félvékony metszetek készítése	19
6. Metszetek értékelése, fényképezés, képfeldolgozás	20
7. Tus injektálása	20
8. Embryomanipulációs módszerek	20
8.1. Csirke-fürj májkiméra	20
8.2. Fürj embryonális máj kiültetése csirke chorioallantois membránra	22
8.3. Az átültetéskor használt oldatok és vegyszerek elkészítése	23
Célkitűzések	24

Eredmények	25
1. A felnőtt csirke máj sejtjeinek karakterizálása	25
2. Desmin+/vimentin+ sejtek megjelenése a máj organogenezise során	30
3. Ito-sejtek embryonális eredetének nyomonkövetése csirke-fürj kiméra technikával	30
3.1. Csirke-fürj testüreg kiméra	30
3.2. Fürj májszövet átültetése chorioallantois membránra	34
Eredmények megvitatása	35
Köszönetnyilvánítás	38
Irodalomjegyzék	39

Irodalmi áttekintés

1. Bevezetés

A csirke (*Gallus domesticus*) az egyik legszélesebb körben elterjedt háziállat, jelentős szerepet tölt be a népelelmezésben; nemzeti és vallási hovatartozástól függetlenül szerte a világon fogyasztják húsát, tojását.

Természettudományos kutatásokban a csirke modellállatként való alkalmazása elsősorban a fejlődésbiológia területén terjedt el, emellett a madár fejlődésbiológiai kutatások az elmúlt 5-10 évben jelentős lendületet kaptak a molekuláris és sejtbiológia felől. Az újszerű génmanipulációs módszereket ötvözve az embryosebészeti technikákkal (kiméra, szervtelep transzplantáció, morfogénekkal átítatott mikrogöngyök beültetése, fluoreszcens sejtjelölés) a madár embryo a fejlődésbiológia kiemelt kísérleti modellje lett (Nagy és Oláh, 2009; Nagy és Goldstein, 2006; Goldstein és Nagy, 2008; Le Douarin, 2008; Mozdziak és Petite, 2004). Ilyen módszerekkel vizsgálták olyan sejtípusok fejlődését, amelyek emlős embryokban experimentálisan nem vizsgálhatók. Madár embryokban sikerült először tisztázni a végtagok, szőr, bélcsatorna, központi idegrendszer, szomiták, ganglionléc sejtek organogenezisének és a fejlődést szabályozó molekuláris mechanizmusok fontos lépéseit, viszont a *máj strómális sejtjeinek ontogenezisének ilyen típusú kutatások nem érintették.*

Gerincesekben a máj normális működése döntő szerepet játszik az egész szervezet metabolizmusának összehangolt működésében. Funkciói szorosan kötődnek a vérkeringésben elfoglalt helyzetéhez: stratégiaileg kiváló helyen van ahhoz, hogy a bélből felszívódott anyagokat feldolgozza, átalakítsa, azokból új anyagokat szintetizáljon, tárolja, illetve az általános keringésbe juttassa a szervezet mindenkori szükséglete szerint. Embryonális korban az emlős máj részt vesz a vérképzésben is. A máj patológiás működésének leggyakoribb következménye a májfibrózis. A májfibrózis és a májcirrózis (májzsugor) a máj szerkezetének átépülésével járó súlyos megbetegedés, mely gyakran előrehaladott stádiumban kerül felismerésre. A májszövet jobb fejlődésbiológiai megértése közelebb vinne nemcsak a normális, de a kóros májfunkciók pathomechanizmusának megértéséhez is.

A szakirodalomban a máj funkcióiról, fejlődéséről és szövettani felépítéséről szóló adatok elsősorban emlősre vonatkoznak. Az itt kapott eredmények szerint a máj

hepatocitái az entodermából származnak, de a strómális sejtek fejlődéstani származása nem tisztázott. Az embryológiai modellek kiválasztásánál fontos szempont a könnyű hozzáférhetőség, fenntarthatóság, gyors fejlődés, manipulálhatóság, az őssejtekből differenciálódó sejtek nyomonkövethetősége, a kísérletes beavatkozásokkal szembeni ellenálló képesség. Mindezeknek a szempontoknak a csirke embryo kiválóan megfelel, ezért alkalmas modellként használhatjuk egy kérdéses májsejt-típus embryológiai nyomonkövetésére.

2. A csirke máj fejlődése

A májat embryonális fejlődése során három szöveti komponens alkotja:

1. a májtelep, amely az előbél entodermájából származik;
2. a septum transversum és a ventrális mesentérium mesenchymája;
3. a primitív sinusoidok endothelsejtei.

Az embryonális fejlődés első napján (Hamburger és Hamilton (HH) szerinti 4-5. stádiumú csirke embryo) a Hensen csomó két oldalán helyezkedik el a cardio-hepatikus régió, amelyből a máj és a szív szövete fejlődik (Romanoff, 1960; Ishii és mtsai 2007). A szív a cardio-hepatikus régió mesodermális struktúráiból származik, azonban a máj szövetének alkotásában a mesodermán túl az entoderma is részt vesz. Az entodermális komponens máj parenchymává való elköteleződése a precardiális mesoderma indukáló hatására jön létre (Le Douarin, 1975). A 16 szomitás csirke embryóban (HH 12 stádium) az előbél entodermája kitüremkedik a ductus omphaloentericus szintjében (Kingsbury és mtsai, 1956). Ez a kitüremkedés (diverticulum) a máj entodermális telepe, sejtjei már a 4-5 szomitás (HH 8. stádium) csirke embryóban elkülönülnek. A 13. HH stádiumú embryóban megjelenik egy második entodermális kitüremkedés, a két entodermális májtelep a ductus venosushoz képest elöl és hátul helyezkedik el (Nakayama és mtsai., 2006). A ductus venosus a páros vena omphalomesentericák összeömléséből keletkezik, amely a sinus venosusba torkollik. A 15-16. stádiumú embryóban a diverticulumok gyorsan proliferálnak a ductus venosus körül, és a ventrális mesentérium, majd később a septum transversum mesodermája felé terjednek. Ekkor már az entodermális májsejtek vékony gerendákat formálnak a ductus venosus körül. Bár a két entodermális diverticulum eleinte elkülönülten fejlődik, a harmadik

napra proliferációjuk közben összenőnek, és a májsejt gerendák kiterjedt hálózatát hozzák létre. A májsejt gerendák alapállományát a ventrális mesenterium és a septum transversum mesenchymája adja.

A ductus venosusból öböl-szerű érkinövések indulnak el a májsejt felé, emellett a vena vitellinából is megfigyelhetők a májsejt felé penetráló kapillárisok: ezek alkotják a sinusoidok endothelsejtjeit. A septum transversumban már a májsejt megjelenése előtt is jelen vannak endothelsejtek és kapilláris-szerű képződmények. Az angiogenesis a hepatikus mesoderma indukáló hatására indul el a 20-22 szomitás embryoban (Le Douarin 1975).

Az epehólyag és a choledochus a HH 18. stádium körül alakul ki. Az eredeti entodermális diverticulumok kapcsolata fennmarad az előbéllel, ők fogják alkotni a két fő epevezetékét. Az entodermális májtelep sejtjei mind a hepatociták, mind az epevezetékek epithelsejtjeinek a kialakításában részt vesznek. (Yanai és mtsai, 2008) A májsejt terjedését a testfal, a szív és a gyomor határolja be. A 20. stádiumtól kezdve a májsejt sugár irányú terjedése figyelhető meg, amelyek a későbbi lebenyeket fogják alkotni. A máj mesothel borítása a 30. stádium körülre alakul ki, mint a máj végleges formája, jobb és bal lebenye is.

Madarakban az emlősökkel ellentétben a máj csak csekély mértékben vesz részt az erythropoiesisben. Közvetlen a kikelés után egy átmeneti időre kompenzálja a szikhólyag vérképzésének hiányát, amíg a csontvelő el nem éri teljes érettségét. (Le Douarin, 1975)

3. A csirke máj szövettani szerkezete

A felnőtt csirke máj felületét mesothel-sejtek rétege, a serosa vonja be, amely alatt vékony kötőszöveti tok található. A májkapu környékén a tok (Glisson-tok) vastagabb, ahonnan a vérerek és az epevezetékek mentén jelentősebb kötőszövet terjed a máj belsejébe. Ebben a perivascularis kötőszövetben sok lymphoid sejt, és helyenként kisebb nyiroktüszők is elhelyezkednek (Wong és mtsai, 1993).

A madarak májának lebenyezettsége elmosódott, mert nem alakultak ki a lebenyek között kötőszöveti sövények, és az erek intrahepatikus elágazódási formája sem ad kellő támpontot az egyes lebenyek körülhatárolására. A vena centralis és a

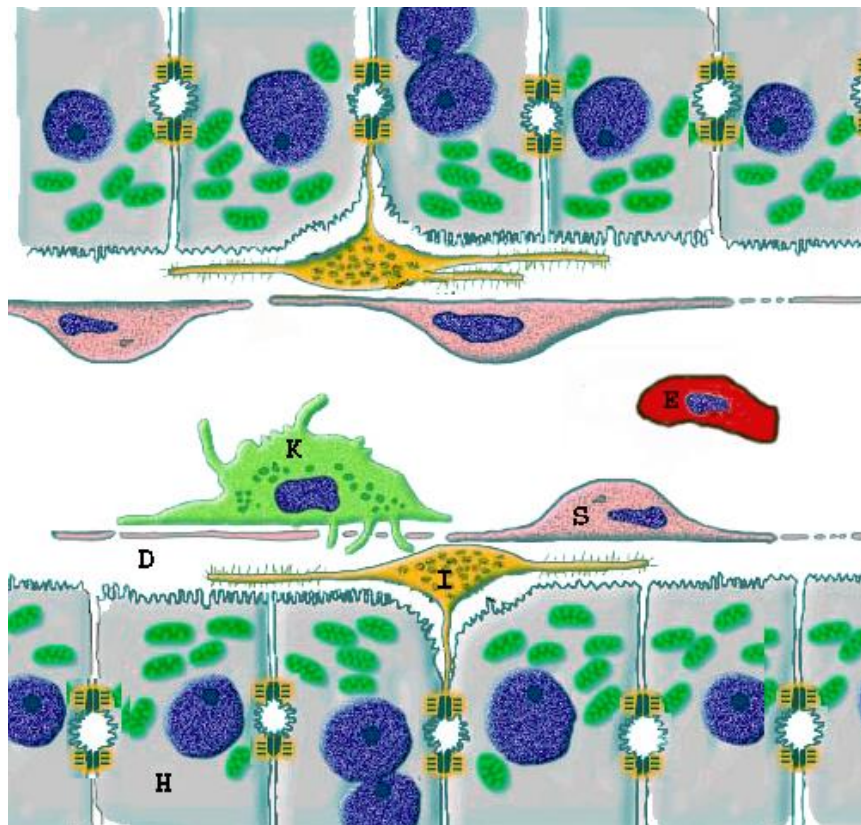
körülötte sugár irányban rendeződött májsejtek és sinusoidok alapján határozhatjuk meg a szabálytalan sokszögletű lebenykék területét.

A máj parenchymáját a **hepatociták** alkotják, amelyek polihedrális, 30-40 µm átmérőjű epitheliális sejtek. Mivel a májsejtek két sejsor vastagságú gerendákba rendeződnek, mindig csak az egyik felszínük érintkezik vérrel (Wong és mtsai 1992). Ez adja a csirke májsejtek jellegzetes polarizáltságát. A vascularis pólus nagyszámú mikrobolyhot képez, amelyek a Disse-térbe nyúlnak. A biliáris pólus, — azaz az epe canaliculusokat alkotó oldal — keskeny, és szintén tartalmaz mikrobolyhokat. A májsejtek dezmoszómákkal és zonula occludenssekkel kapcsolódnak egymáshoz, az intercelluláris rés a sejthártya behúzódnak miatt szakaszonként kitágul. A hepatociták igen fejlett durva és sima felszínű endoplazmás retikulummal rendelkeznek. A durva felszínű endoplazmás retikulum (dER) hálózatai fénymikroszkópban foltos bazofil területekként látszanak. A dER fejlett volta a sejt intenzív fehérjeszekréciós aktivitását tükrözi. A sima felszínű endoplazmás retikulum (sER) a máj méregtelenítő funkciójában vesz részt, emellett a lipidszintézis egyes enzimeit is a sER-ben lokalizálódnak. A Golgi-apparátus kiterjedt, perinukleárisan, főként a magnak az epekapillárisok felé eső oldalán található meg. A transz-Golgi-ciszternában és hálózatban sötét anyag jelzi az epeszekréció, valamint a vérfehérje-szekréció előanyagait. Közeliében mindig található néhány primer lizoszóma. A májsejtek különösen sok peroxiszómát tartalmaznak (sejtenként 2-300), amelyek szerteágazó oxidatív tevékenységükkel egy sor anyagcsere-folyamatban vesznek részt. A hepatocitákban a legnagyobb számban előforduló organelum a mitokondrium, amelyek oválisak vagy pálca-alakúak, dupla membránnal rendelkeznek. A májsejtek tápanyagok tárolási helyéül szolgálnak, ezek között a legfontosabb a gyorsan fel- és leépíthető polimer szénhidrát, a glikogén. Elektronmikroszkóppal a glikogén a riboszómáknál nagyobb, sötét granulumokból álló rozettákat képez, amelyek egyes citoplazma-területeken (sokszor a sER tubulusai között) felszaporodnak. A májsejtben neutrális zsírok is tárolódnak, különböző átmérőjű cseppek formájában.

Négy-hat szomszédos májsejt zárja közre az epekapillárist, így a májsejtek térben nagyjából kerek átmetszetű hengereket vagy gerendákat alkotnak. Az így kialakult csatornarendszert sejtkapcsoló komplexusok zárják le, amelyek megakadályozzák, hogy

az epe visszaáramoljon a sinusoidokba. A hepatociták biliáris pólusán és az epecanaliculusokba is benyúló sejtmembránokban kontraktilis, aktinból és miozinból álló mikrofilamentumrendszer segíti az epeelfolyást. Az epecanaliculus-rendszer a Hering-csatornákban folytatódik, amelyeket részben hepatociták, részben az epeutak kőb alakú hámsejtjei alkotnak. Végül az epeelfolyás a már önálló hámsejtekkel határolt biliáris ductulusokban folytatódik.

A májsejtek kettős sorai között húzódnak az oldalágakkal egymással összeköttetésben álló sinusoidok. A sinusoidokat bélelő endothelsejteket a szűk *Disse-tér* (perisinusoidális tér) választja el a májsejtektől. A Disse-térbe nyúlnak a májsejtek mikrobolyhai, amelyekhez az endothel lazán támaszkodik. A vér és a májsejtek közvetlen érintkezése a Disse-térben teszi lehetővé azok igen szoros funkcionális kapcsolatát.



1. ábra: sémás rajz a máj sinusoid szerkezetéről. D: Disse-tér, E: vörösvérsejt, H: hepatocita, I: Ito-sejt, K: Kupffer-sejt, S: sinus endothelsejt. (Forrás: Melbourne-i Egyetem Biomedical Multimedia Unit ábrája után átalakítva.)

A sinusoidokat béleelő *endothelsejtek* ellapult, szorosan a bazális membránhoz simuló sejtek. Hosszú citoplazma nyúlványaik vannak, amelyek nem folyamatosak, hanem kis nyílások figyelhetők meg rajtuk. Az alattuk fekvő bazális membrán szintén fenesztrált. A szomszédos endothelsejtek egymással a citoplazma nyúlványok végén kapcsolódnak. (Matsumoto és mtsai, 2004).

A sinusoidok lumenében foglalnak helyet a *Kupffer-sejtek*, amelyek szabálytalan alakú, citoplazmában gazdag sejtek. Nyúlványaikkal az endothelsejtek közé ékelődnek, azonban azokhoz nem kötik sejtkepcsoló struktúrák. Alakjuk, helyzetük és az endothelsejtekhez való viszonyuk állandóan változhat. Aktív fagocita tulajdonságuknak megfelelően a szokványos sejtorganellumokon kívül sok bennük a lizoszóma és a phagosoma. A Kupffer-sejtek kísérletesen könnyen kimutathatók vitális festékek (tus, tripánkék) intravénás injekciójával. A sejtek a vitális festék kolloidális részecskéit néhány percen belül felveszik, és kiszűrik a vérből. A részecskékkel megrakott Kupffer-sejtek szövettani metszeten könnyen azonosíthatók. Az endothelsejtek és az Ito-sejtek is képesek a tus szemcsék fagocitálására, ám a Kupffer-sejtek veszik fel azokat a legkorábbi stádiumban, mintegy 15 perccel az injektálás után. (Ohata és Ito, 1986, Kanai és mtsai, 2007)

A Disse-térben helyezkednek el az *Ito-sejtek*, amelyek hosszú nyúlványokat bocsátanak ki az endothelsejtek felé, így nyúlványaik miatt jellegzetesen csillag alakúak.

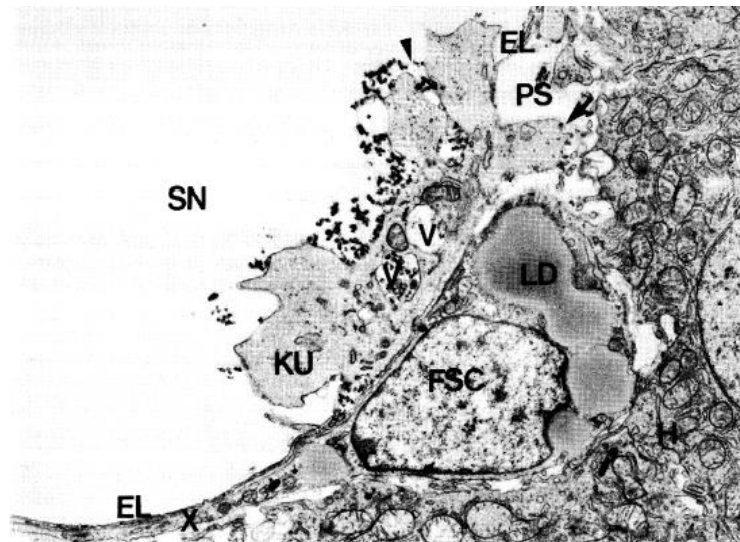
Az Ito-sejtek a máj legtitokzatosabb sejtjei, még elnevezésükkel kapcsolatban sincs konszenzus a kutatók között. Talán nincs is más olyan sejt, amely ennyi névvel bírna; elnevezték már az alakja (csillag sejt), elhelyezkedése (pericita, interstitialis sejt, mesenchymális sejt), citoplazmájának szerkezete (szemcsés sejt, zsírraktározó sejt, lipocita), fémekhez való kötődése (metallo-cita), autonóm idegrostokkal való szoros kapcsolata (transzmitter sejt), A-vitamin tartalma és a fibrogenesisben betöltött szerepe alapján. Napjainkban tudományos szimpoziumok igyekeznek egységes nomenklatúrát kialakítani, ajánlásuk szerint az arachnocita elnevezés lenne a megfelelő, amely pusztán a sejtek morfológiáját írja le. A rengeteg név között mégis az „Ito-sejt” elnevezés lett a legszélesebb körben elfogadott és használt, pedig a sejtek első leírója nem Ito, hanem Kupffer volt. Kupffer 1876-ban egy Waldeyerhez írt levelében tesz először említést kutya májában perivascularisan elhelyezkedő csillag alakú sejtek jelenlétéről, amelyeket „Sternzellen”-nek (csillagsejt) nevezett el. Kupffer érdeklődése ekkor a máj autonóm idegrostjainak feltérképezésére irányult, krómsavas és aranykloridos festések

alkalmazásakor lett figyelmes a jellegzetes csillag alakú sejtekre. Kupffer első megfigyelését több más kutató is alátámasztotta, ennek ellenére 22 év elteltével a perisinusoidális sejtekről és a ma már az ő nevét viselő sinusoidális makrofágokról tett első megfigyeléseit tévesen átértékelte, endotheliális sejtnak tekintve mindkettő sejtípust.

A fenti leírások és megfigyelések ellentmondásossága nagyban nehezítette a kutatási eredmények összevetését. Toshio Ito, a japán Gunma Egyetem szövettanásza új lendületet adott a kutatásoknak 1951-ben, amikor leírt a Disse-térben egy sejtípust, amelyek jellegzetességét gazdag zsírcsepp tartalmukban látta. Ito ekkor azt gondolta, hogy egy addig ismeretlen sejtípust fedezett fel, amely funkciója a zsírok felvétele a keringésből, ezért a „shibo-sesshu saibo” (zsírfelvevő sejtek) nevet adta nekik. Később felfedezte, hogy zsírcseppek nagy része glikogénből szintetizálódik, ezért a nevüket „shibo-chozo saibo”-ra (zsírraktározó sejtek) változtatta. (Reuben, 2003)



1. kép: Toshio Ito arcképe



2. kép: „fat storing cell”, Ito elektronmikroszkópos megfigyelése. Ito-sejt (FSC), benne lipid cseppek (LD), nyúlványával (X) hozzásimul az sinusoid (SN) endothelsejtjeihez (EL). KU: Kupffer-sejt, V: vacuolum, PS: Disse-tér. (Ohata és Ito, 1986)

Végül Kenjiro Wake, fény- és elektronmikroszkópos munkái során mutatta ki 1971-ben, hogy Kupffer „csillagsejtjei” és Ito „zsírraktározó sejtjei” egy és ugyanazt a sejtípust írják le.

3.1 Az Ito-sejtek funkciói

- a szervezet teljes A vitamin tartalmának mintegy 80 %-a bennük raktározódik, ezért alapvető a szerepük az A-vitamin homeosztázisának fenntartásában. (Blomhoff és mtsai, 1990)
- extracelluláris mátrix komponenseket (kollagén I, III, IV, laminin, fibronectin, proteoglikánok) és mátrix metalloproteinázt termelnek, ezzel részt vesznek a máj extracelluláris mátrixának átépítésében. A kollagén szintézisben közreműködik egy hősokk fehérje, a Hsp47 is. A Hsp47 az endoplazmás retikulumban helyezkedik el, a prokollagén becsomagolásánál az újonnan szintetizált kollagén molekulákat stabilizálja, védi a denaturációtól. A Hsp47 immuncitokémiai kimutatásával láthatóvá tehető az Ito-sejtek. (Miyaiishi és mtsai. 1992)
- növekedési faktorokat és citokineket termelnek, amelyeknek egy sérülést követő gyulladáshoz (sejttörmelék és extracelluláris matrix eltakarításában) és reparatív sebgyógyulási (hegszövet-képződés) folyamatokban nélkülözhetetlen szerepük van.
- sinusoidok lumenének „kontrakcióját” képesek létrehozni, endothelin, angiotensin, thromboxán és prosztaglandinok hatására. (Sato és mtsai 2003) E tulajdonságuk és a sinusoid endothelsejtekhez közeli elhelyezkedésük alapján sok szerző pericitaként tekint az Ito-sejtekre. Más kontrakcióra képes sejtekhez hasonlóan tartalmaznak desmin, vimentin és aktin intermedier filamentumokat. (Fujimoto és mtsai 1987)
- a legújabb kutatások szerint az Ito-sejtek részt vesznek az antigén prezentálásban is (Winau és mtsai 2007), e funkciójukhoz kötődően MHC II molekulákat expresszálnak. A máj ilyen tekintetben immunszervként is funkcionál. (Crispe, 2009)

3.2 Az Ito-sejtek eredete

Az Ito-sejtek eredetére vonatkozóan számos elmélet keletkezett, amelyeknek alapját elsősorban immunhisztokémiai tulajdonságaik adták. Immunhisztokémiai módszerekkel ugyanis az Ito-sejtek „mesenchymális” (desmin, vimentin, simaizom alfa-aktin) és „neurális” (GFAP, N-CAM) markerekkel karakterizálhatók. Ezek az adatok, a kevert mesenchymális és neurális tulajdonságok alapvetően négy jellegzetes feltételezést vetettek fel eredetükre vonatkozóan.

1. Az első feltételezés szerint a septum transversum mesenchymájából származnak. Ezt alátámasztja az, hogy a hepatociták a máj fejlődése során belenőnek a septum transversum mesenchymába, és az Ito-sejtek mesenchymális markerekkel karakterizálhatók. Madarakban azonban, mivel a szívet és a májat nem választja el rekeszizom, a septum transversum csak csökevényesen alakul ki, a máj szövete pedig fejlődésének csak későbbi stádiumában nő bele a septum transversum mesenchymájába. (Pérez-Pomares és mtsai, 2004)
2. Más feltételezések szerint a májat körülvevő mesothelből származnak. Csirke embryóban morfológiai folytonosság mutatható ki az Ito-sejtek és a mesothel sejtei (Glisson-tok) között. E szerint a feltételezés szerint a mesothelből származó mesenchyma hozza létre az Ito-sejteket és a sinusoidok endothelsejtjeit is. (Pérez-Pomares és mtsai, 2004)
3. Tekintve neurális tulajdonságaikat (GFAP, N-CAM pozitivitás), illetve morfológiai kapcsolataikat az autonóm idegrendszerrel (szinapszis-szerű kapcsolatok autonóm idegvégződésekkel), felmerült az, hogy az Ito-sejtek ganglionlécből származnak. Csirke-fürj kiméra segítségével azonban jól nyomon követhetőek a ganglionléc eredetű sejtek. Ezek a kutatások arra vezettek, hogy az Ito-sejtek ganglionléc eredete nem valószínű (Le Douarin, 1993). Kettős transzgenikus egér modellen végzett kísérletek is megerősítették a fenti eredményt (Cassiman és mtsai, 2006).
4. A legújabb kutatások alapján felmerült az, hogy az Ito-sejtek lehetnek mobilis, véreredetű sejtek (Baba és mtsai, 2004). Részt vesznek az antigén prezentálásban, MHC II molekulákat expresszálnak, s ez a tulajdonság csontvelői eredetű sejtek jellemzője. Laboratóriumunkban egy korábbi munka során (Nagy és mtsai, 2005), lépkiméra és csirke-fürj parabiotikus embryok alkalmazásával megfigyelték, hogy a madár embryok vérkeringéséből collagen I

és III termelő, vimentin+, CD45+, MHC II+ sejtek telepednek le a fejlődő lép parenchymájában, ahol a vörös pulpában nyúlványos sejtekké, vagy a fehér pulpa ellipsoid sejtjeivé differenciálódtak. A csirke lépen kapott eredményeket hamarosan egy másik kutatócsoport egerekben is igazolta (Kisseleva és mtsai, 2006). E szokatlan, nyúlványos (stellate) sejtípust Bucala és mtsai írták le először (Bucala és mtsai 1994), mint perifériás vér fibrocita sejteket és feltételezték, hogy ezek a keringésből való kilépésük után valamennyi szervben előfordulhatnak és részt vesznek a sebgyógyulásban, illetve a fibrotikus folyamatokban.

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 forgatórácsos inkubáltuk 38°C hőmérsékleten, 60%-os páratartalom mellett. A kísérletek során felhasznált szerveket sztereomikroszkóp alatt, mikropreparációra alkalmas eszközökkel (mikroolló, csipeszek, rovartűk, embryospatula) távolítottuk el. Az állatkísérletek a Semmelweis Egyetem Etikai Bizottságának jóváhagyásával történtek (engedélyszám: 779-000-2005).

2. Szöveti feldolgozás:

A hisztológiai vizsgálatokra embryonális és felnőtt állatok máját, összehasonlító immuncytokémiai festésekhez csirke nyirokszerveket használtunk fel. A kivett szervekből immuncytokémiai és immunfluoreszcens vizsgálatokra májba ágyazott-, vagy zselatinos fagyasztott blokkot készítettünk.

2.1. Zselatin-szacharózos beágyazás:

A zselatinos blokkok készítéséhez laboratóriumunkban beállított módszert használtam (Nagy és mtsai, 2001). A kipreparált felnőtt és embryonális szerveket pufferelt 4%-os paraformaldehidben 1 óráig fixáltam, majd PBS-ben (foszfáttal pufferelt sóoldat) háromszor 5 percig mostam. Következő lépésben 15%-os szacharóz (Reanal puris, M:342,30) PBS oldatában (pH 7,2) hűtőszekrényben 4°C-on egy éjszakán át inkubáltam, 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 ágyal előkészített műanyag mérőtálcákba 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. Az így elkészített 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 felnőtt madaraktól kivett szerveket foszfáttal pufferelt sóoldatban (PBS, $\text{pH}=7,2$) tartottuk a blokk elkészítéséig. A beágyazás során egy májszeletet $1,5 \times 1,5$ cm-es kartonpapírra helyeztünk, erre tettük a szerveket, majd vékony májdarabokkal teljesen befedtük, így elkerülhető azok kiszáradása. Az így előkészített mintát folyékony nitrogén gőzébe -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, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 1,42g, KH_2PO_4 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, $\text{pH}=7,4$ (PFA): 700ml desztillált vizet bemérünk egy 1000ml-es lombikba és 60°C -ra felmelegítjük. Hozzáadunk 40g paraformaldehydet és mágneses keverőre helyezük. A keletkezett csapadékot cseppenként hozzáadott 20%-os (5M-os) NaOH-dal feloldjuk. Az oldatot megsűrjük, majd 250ml 0,24M PBS-t adunk hozzá. Még mindig mágneskeverőn beállítjuk a pH -t, majd az oldatot átöntve 1000ml-es mérőhengerbe, térfogatát desztillált vízzel kiegészítjük 1000ml-re. Végül sejttenyésztő flakákba kiöntve -20°C -on fagyasztva tároljuk felhasználásig.

3. Metszetek készítése:

Metszésre Shandon gyártmányú kriótómot használtunk, amelyet zselatinos blokk esetén -24°C , májba ágyazott blokk esetén -19°C munkahőmérsékletre állítottunk be. A blokkokat metszés előtt a kriosztátba helyeztük, hogy átvegyék annak hőmérsékletét. A

mintákból 8-12 μm vastag metszeteket készítettünk, amelyeket poly-L-lysine-nel (Sigma, P8920) bevont tárgylemezre vettünk fel. Az így elkészült metszeteket felhasználásig tékába rendezve -20°C -on tároltam.

4. Immunhisztokémia és immunfluoreszcencia:

4.1. Immunhisztokémia:

Immunhisztokémiai vizsgálatainkat fagyasztott metszeteken végeztem, az alábbi protokoll szerint:

A metszeteket először 37°C -on PBS-be helyeztem a zselatin kioldása és a minták rehidrációja céljából. Ezután rámértem a primer ellenanyagot (40-80 μl / metszet) a metszetekre, és szobahőmérsékleten, nedves kamrákban 60 percig inkubáltam.

Szekunder ellenanyagként biotinnal konjugált lóban termelt anti-egér, ill. anti-nyúl IgG-t használtunk (Vector Laboratories BA-2000 1:200 hígításban alkalmaztam 1%-os BSA-t és Na-azidot tartalmazó PBS-ben - PBS-BSA - feloldva), amellyel további 60 percig inkubáltam. Mosás következett PBS-ben (3x5 perc). A szöveti endogén peroxidázok aktivitásának blokkolására küvetába töltött, PBS-ben 3%-osra hígított H_2O_2 -ba (Sigma-Aldrich, H1009) merítettem a tárgylemezeket 8-10 percre, majd újabb mosás következett PBS-ben (3x5 perc). A szekunder ellenanyagok kötődésének előhívására avidin-biotin-peroxidáz komplexet használtam (Vectastain Elite PK-6100; Vector Laboratories). Az oldatot a Vector cég által megadott hígításban készítettem el (1:100 arányban, PBS-ben). PBS-be kimértem az avidin-, majd a biotinilált peroxidáz tartalmazó oldat megfelelő mennyiségét, alaposan felkevertem, majd fél óra állás után használtam fel. A metszeteket fél óráig inkubáltam ABC-komplexszel. A következő lépés: mosás PBS-ben (3x5 perc). Az immunreakció előhívására, kromogén szubsztrátként 4-kloro-1-naftolt (Sigma; C8890), vagy 3-amino-9-etilkarbazol kitet (AEC substrate kit for peroxidase, SK-4200, Vector Laboratories) használtam. A kloronaftolt 100 ml PBS-ben oldottam, majd a színreakció 500 μl 3%-os H_2O_2 jelenlétében jött létre. A feloldott kloronaftolt előzetesen PBS-be mértem, és sötétben mágneses keverőn legalább fél órát kevertettem. Kevertetés után szűrőpapíron leszűrtem, és közvetlenül a felhasználás előtt adtam hozzá a 3%-os H_2O_2 -t, majd 25 percen keresztül inkubáltam. Az AEC peroxidase kit elkészítéséhez 500 μl desztillált

vízhez 6µl „Buffer Stock Solution”-t és 7 µl „AEC Stock Solution”-t adtam, majd jól összekevertem. A színreakció 10µl H₂O₂ jelenlétében jött létre, 15-20 perc alatt. Az oldatból 50-70 µl-t mértem egy-egy metszetre.

Ezután a metszeteket PBS-sel mostam (3x5 perc). A mosás után a metszeteket vízdékony fedőanyaggal (Poly-Aqua Mount, Polyscience Inc., Warrington PA, USA; 18606) lefedtem, és 4°C-on, hűtőben tároltam.

4.2. Immunfluoreszcencia:

Egyszeres immunfluoreszcencia:

A metszetek előkészítését, primer ellenanyaggal való inkubálását az immunhisztokémia fejezetben leírtakkal azonos módon végeztem. Ezt követően 40-80µl/metszet fluorokrómmal konjugált szekunder antitestet (Alexa Fluor 488/594 anti-egér IgG H+L, Invitrogen A11001/A11005; Alexa Fluor 594 anti-nyúl 1:100 PBS-BSA-ban oldva) mértem a metszetre, majd szobahőmérsékleten fénytől védve 60 percig inkubáltam. A sejtmagok jelölésére a tárgylemezeket DAPI-val (4,6 diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride, Invitrogen, D1306) további 20 percig inkubáltam. Mosás után (3x5 perc PBS-ben) vízdékony lefedőanyagot használtam, majd a metszeteket 4°C-on, hűtőben, fénytől védve tároltam.

Kettős immunfestés:

A metszetek előkészítésekor és primer ellenanyaggal való inkubálásakor az egyszeres immunfluoreszcens festésnél leírtakkal megegyezően jártam el. Ezt követően 60 percig fénytől védve a primer ellenanyagot felismerő faj, ill. immunoglobulin izotípus specifikus, fluorokrómmal konjugált szekunder ellenanyaggal inkubáltam (Alexa Fluor 594 anti-egér IgG1, Invitrogen A21125, Alexa Fluor 488 anti-egér IgG2a, Invitrogen A21131; Alexa Fluor 594/488 anti-egér IgM, Invitrogen A21044/A21042). Az immunjelölés további lépéseit ettől a ponttól mindvégig a metszeteket fénytől óvva végeztem. Mosás után a tárgylemezekre rámértem a következő primer ellenanyagot, majd faj és izotípus specifikus fluorokrómmal konjugált szekunder ellenanyaggal inkubáltam. A második lépésben használt ellenanyag fluoreszcenciája különbözött az első ellenanyag kimutatására használttól. A sejtmagok kimutatására szintén DAPI-t használtam, amelyet 20 percig adtam a metszetekhez. Mosás után a tárgylemezeket vízdékony lefedőanyaggal fedtem le, majd hűtőben, 4°C-on tároltam.

Példa kettős immunfluoreszcencia menetére: Hsp47+desmin. A Hsp47 ellenanyag izotipusa IgG2a. Laboratóriumunkban nem elérhető izotípus specifikus fluorokrómmal konjugált szekunder ellenanyag. Streptavidint a máj magas biotin tartalma miatt nem használhatunk. Desmin izotipusa IgG1

1. inkubálás Hsp47-tel (1:200), 60 perc
2. mosás 3x5 perc PBS-ben
3. anti-egér IgG könnyű és nehézlánc, fluorokrómmal jelzett (fluoreszcencia: 488, zöld) szekunder ellenanyag (1:100), 60 perc
4. mosás 3x5 perc PBS-ben
5. inkubálás desminnel (1:200), 60 perc
6. mosás 3x5 perc PBS-ben
7. anti-egér IgG1 fluorokrómmal konjugált (fluoreszcencia: 594, piros) szekunder ellenanyag (1:100), 60 perc
8. mosás 3x5 perc PBS-ben
9. DAPI, 10 perc

4.3 A metszetek értékeléséhez használt ellenanyagok

Primer antitest	Antigén specificitás	Felismert sejtípusok	Beszerezés forrása / Forgalmazó:	Izotípus
HIS-C7	Csirke CD45	Minden csirke leukocita	CEDI-Diagnostics	IgG2a
TaP 1	MHC II	Exogén antiént prezentáló sejtek	DSHB	IgG2a
CVI-ChNL-68.2	45 kDa protein	ellipsoid reticulocyták, macrophagok	CEDI-Diagnostics	IgG1
GFAP	GFAP	Ito-sejtek, astrocyták	DAKO, Dánia	Poliklonális nyúl
Amf-17b	Vimentin	Madár dendritikus sejtek, endothel sejtek	DSHB	IgG1
VIM 3B4	Vimentin	Madár dendritikus sejtek, endothel sejtek	Progen, Biotechnik GmbH, Heildelberg	IgG2a
8F3	Citoplazmatikus csirke sejt marker	Valamennyi csirke sejt	DSHB	IgG1
QCPN	Fürj sejtmarker	Valamennyi fürj sejt	DSHB	IgG1
1a4	Simaizom aktin	Endothel sejtek	DAKO	IgG2a
Mep21	Trombomucin	Endothel sejtek	Kelly McNaghy szívességéből	IgG1
31	Laminin	Bazális membrán	Invitrogen	IgG1
3B2	Kollagén III., csirke specifikus	Kötőszövet	DSHB	IgG1

D3	Desmin	Csirke izom sejtek, Ito-sejtek	DSHB	IgA
Lu5	Pan-cytokeratin	Hepatocyták, epithel sejtek	BMA Biomedicals AG	IgG1
DE-R-11	Desmin	Csirke izom sejtek, Ito-sejtek	DAKO, Dánia	IgG1
E-kadherin	E-kadherin	Epithel sejt	BD Biosciences	IgG2a
B3/D6	fibronektin	kötőszövet	DSHB	IgG2a
M16.10A1	Hsp47	Ito-sejtek	Abcam	IgG2b

4.4. Az immunfestések során alkalmazott előhívószerek, oldatok:

1%-os PBS-BSA: 1g BSA-t (Bovine Serum Albumin, Sigma A9647), 100ml PBS-ben feloldunk. Szűrés után 0,1 %-ban NaN₃-at adunk hozzá.

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

Vízoldékony lefedőanyag készítése:

2,4g Moviol 4-88 (poli-vinil-alkohol) és 6g glicerin 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 helyezzük, míg teljesen homogén oldat nem lesz. A lefedő anyagot lecentrifugáljuk 15'-ig 6900-as percenkénti fordulatszámon, hogy az esetleges szennyeződésekeltávolítsuk. A felülúszót szemcseppentőkbe töltjük.

5. Félvékony metszetek készítése:

A kivett szerveket 4%-os Millonig-pufferes glutáraldehidben fixáltuk fél órán át, majd feldaraboltuk a szerveket a megfelelő méretre és tovább fixáltuk legalább két órán át ugyanilyen összetételű oldatban. Ezután Millonig-pufferrel mostuk (3x5 perc), majd 12%-os ozmiumtetroxiddal utófixáltuk két órán keresztül. (Az ozmiumos fixálásra a további elektronmikroszkópos felhasználás miatt volt szükség.) Újabb mosás után felszálló alkoholsorban (50%, 70%, 80%, 90% és abszolút etanol), minden esetben 10

percig dehidráltuk a szövetet. Ezt az intermediummal (propilén-oxid), majd propilén-oxidban oldott műgyantával (Araldit 6005 + Polybed; Polysciences) való átitatás követte. Az átitatott szerveket műgyantába ágyasztuk, és egy éjszakán át 4°C-on tartottuk, majd másnap 56°C-on, termosztátban inkubáltuk a teljes keménység eléréséig. Az így elkészített blokkokból ultramikrotómmal készítettünk 2 µm vastagságú metszeteket, amelyeket 1%-os toluidinkékkel festettük. A metszeteket araldittal fedtük.

6. Metszetek értékelése, fényképezés, képfeldolgozás:

Metszeteket Zeiss Axiophot mikroszkóppal tekintetem át, és a hozzácsatlakoztatott Zeiss AxioCam HRC kamerával digitális fényképeket készítettem különféle nagyításokon. A képek további feldolgozására, szerkesztésére Adobe Photoshop CS programot használtam.

7. Tus injektálása

Tus injektálásával a csirke máj fagocita rendszerének egyszerű funkcionális vizsgálatát végezhetjük el. A fagocitáló sejtek belsejében megjelennek a tus szemcséi, amelyek eloszlása fénymikroszkóppal vizsgálható.

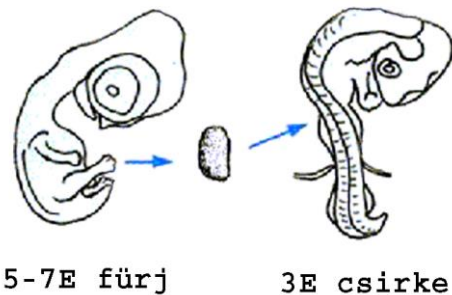
A tus szuszpenzióból 2 ml-t kétszeresére hígítottunk fiziológiás sóoldatban. A csirke legkönnyebben elérhető vénája a szárnyán található, alkoholos fertőtlenítés után körülbelül egy perc alatt, lassan adtuk be a 4 ml tus szuszpenziót. Már a beadás közben a csirkén dyspnoe jelentkezett, amely jelezte a tus kisvérkörbe kerülését. Fél óra várakozás után szövettani feldolgozás céljából mintát vettünk a csirke májából, nyirokszerveiből, illetve tüdejéből. A szervmintákból zselatinba ágyazott vagy májas blokkokat készítettünk.

8. Embryomanipulációs módszerek

8.1 Csirke-fürj májkiméra

A csirke-fürj kiméra olyan élőlény, amely szervezetét mindkét fajtól származó sejtek alkotják. A transzplantátumok (graft) és a fogadó állatok (recipiens) szövettani

feldolgozása sok, eddig megválaszolatlan kérdés megoldásához vezethet közelebb minket. 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

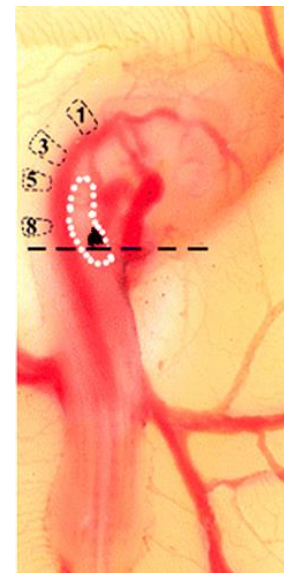


2. ábra: a kimérák létrehozásának vázlatos rajza

összetétele egyszerűen nyomon követhető, mivel a magok szerkezete mindvégig magán viseli az adott faj jellegzetességét. A különböző eredetű sejtek azonosítására újabban számos faj- és sejt-specifikus ellenanyag elérhető. QCPN antitesttel a fürj sejtek magja, 8F3 ellenanyaggal a csirke sejtek citoplazmája jelölhető. (Nagy és mtsai 2007, Nagy és Goldstein 2006a, Nagy és Goldstein 2006b)

A kimérák létrehozásakor fürj embryok máját ültettük át csirke embryok testüregébe, ami optimális környezetet biztosít a graft megtapadásához, továbbfejlődéséhez. Az embryomanipulációs kísérleteket steril eszközökkel, oldatokkal végeztük. Munkánk során 5 és 7 napos fürj embryokat használtunk donor állatokként. A kiemelt fürjeket Penicillin-Streptomycin-t tartalmazó steril PBS-be (PenStrep-PBS) helyeztük. Az embryok fejlődő máját sztereomikroszkóp alatt alkalmas mikrocipeszek segítségével eltávolítottuk, majd a beültetésig autoklávozott PenStrep-PBS-be helyeztük.

A recipiens szervezetek háromnapos csirke embryok voltak, amelyek fejlettsége a 18. és 20. Hamburger-Hamilton stádiumnak felel meg. A fogadónak szánt tojásokat úgy pozícionáltuk, hogy az embryo a felülre eső felszín közelében helyezkedjen el. A tojások tompa végén bevezetett fecskendőn keresztül 2 ml sziket távolítottunk el, hogy az embryo lesüllyedjen. Ezután a fejlődő embryo felett 2 cm átmérőjű ablakot vágunk a tojáshéjon, majd a héjhártya



3. kép: Recipiens csirke embryo fotója, az átültetett és megjelölt máj graffal

megnyitásával láthatóvá tettük az embryo-t. A megnyitott tojásba 2-3 alkalommal PenStrep-PBS-t cseppentettünk. Az extraembryonalis ereket megkímélve 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 májat szénszemcsékkel megjelöltük, a fogadó embryo helyezettük, és üvegbot segítségével orientáltuk. Az optimálisan behelyezett transzplantátum a jobb tüdő-szív-aorta-májtelep által határolt testüreg régióban fejlődött tovább.

A mikromanipuláció után a tojáshéjat ragtapasszal zártuk, és az embryokat további 12-14 napig visszahelyeztük a keltetőbe. Az inkubációs idő lejárta után a kimérákban finom preparációval felkerestük a szénnel vizualizált graft májat, amely sokszor a csirke saját májához nőve, külön lebenyként volt megtalálható. Gyakran feltapadt a pericardiumhoz. Eltávolítottuk a feltételezett graft szövetet, majd a korábbi pontokban leírtaknak megfelelően szövettani feldolgozásukat kezdtük meg.

8.2. Fürj embryonalis máj kiültetése csirke chorioallantois membránra:

A kísérletek során 5, 7, 11 napos fürj embryok májtelepét izoláltuk, és ültettük át nyolcnapos csirke embryo chorioallantois membránjára (CAM). A CAM ideális környezet az embryonális szervek tenyésztésére, és ezzel a módszerrel a keringésből származó sejtek eredetét nagyobb biztonsággal lehet nyomonkövetni. (Nagy és mtsai 2007)

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 máját óvatosan eltávolítottuk, majd PenStrep PBS-be helyezettük. 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. Következő lépésben a feltárt CAM graftot fogadó területén papírvattából készített paprikával finom felületes sérülést okoztunk. Az átültetni kívánt fürj májat mikrospatulával, vagy Pasteur-pipettával a felsértett területre helyezettük. Legvégül a csirketojásokat ragtapasszal zártuk, és megfelelő ideig visszahelyeztük a keltetőbe. 1 hét inkubálás után a ragasztószalagot eltávolítottuk, és a graftot tartalmazó

CAM részletet kimetszettük. Steril eszközökkel PenStrep PBS-ben a graftokat kipreparáltuk. Az eltávolított fűrj graftok egy részét paraformaldehiddel lefixáltuk, és szövettani blokkot készítettünk.

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 fiziológias 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.

Célkitűzések

Az irodalomban található adatok és laboratóriumunk eddigi munkái alapján feltételeztem, hogy a madár modellrendszer felhasználásával közelebb kerülhetünk a máj különböző sejtjei eredetének megértéséhez.

Célkitűzéseink a következők voltak:

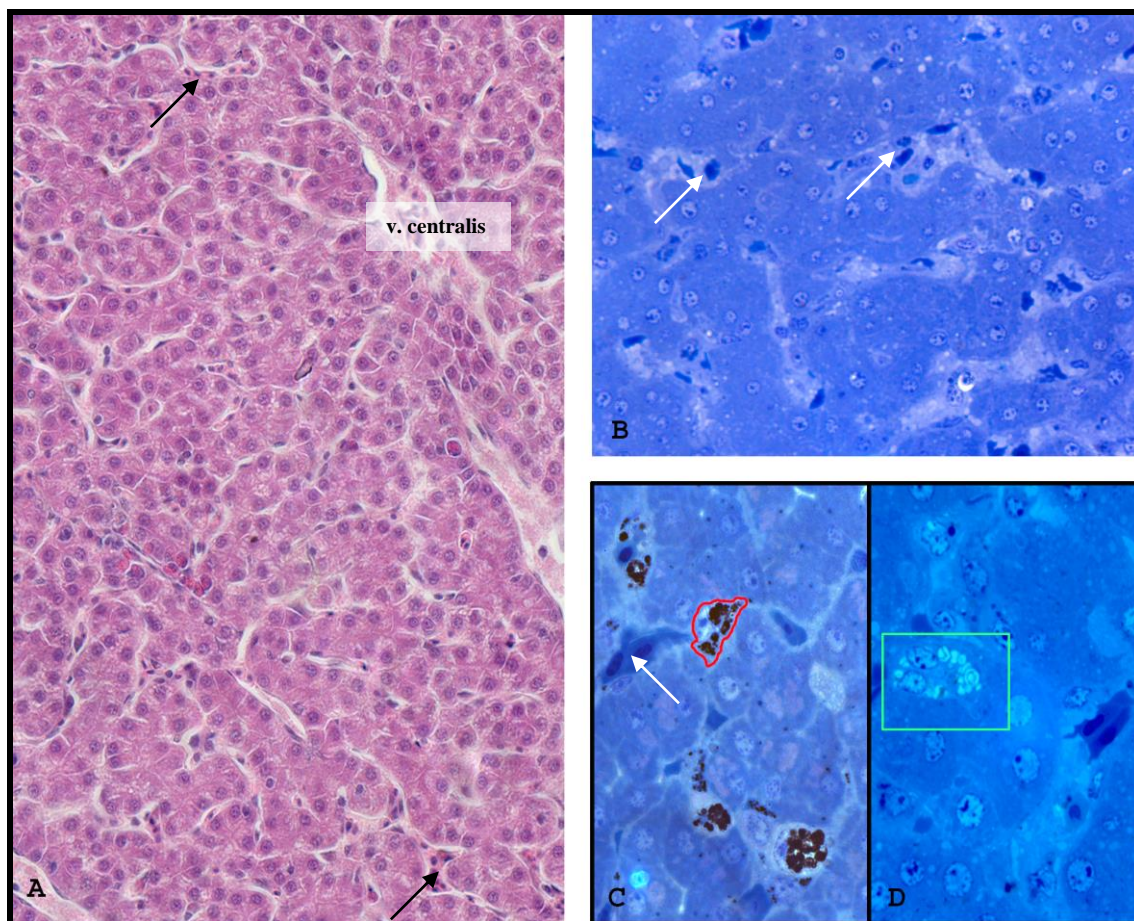
1. A felnőtt csirke máj sejtjeinek karakterizálása, olyan markerek keresése, amelyek segítségével megbízhatóan elkülöníthetők egymástól az egyes sejtípusok. Az immunhisztokémiai karakterizálás során az Ito-sejtek meghatározása volt az elsődleges célom.
2. Különböző korú csirke embryokból készített fejlődési sor májszövetének tanulmányozásával kívánom nyomon követni a csillag alakú sejtek fejlődését.
3. Embryomanipulációs módszerekkel (kiméra, CAM) az Ito-sejtek eredetével kapcsolatos kérdésekre próbálok választ találni.

Eredmények

1. A felnőtt csirke máj sejtjeinek karakterizálása

Szakdolgozati munkám során, első lépésben a felnőtt csirke máj szövettani szerkezetét tanulmányoztuk klasszikus hisztológiai és immuncitokémiai módszerekkel.

A paraffinba ágyazott, hematoxilin-eosinnal festett metszeten (4/A kép) jól felismerhető a csirke máj általános szöveti szerkezete. Láthatjuk, hogy a májsejtek nem rendeződnek olyan szabályos lebenykékbe, mint az emlősöknél, hanem két sejtsorba szerveződve szabálytalan lefutású gerendákat alkotnak. A májsejtek sorai között már kis nagysággal felismerhetők a vörösvérsejt tartalmú sinusoidok, és a vena centralisok.



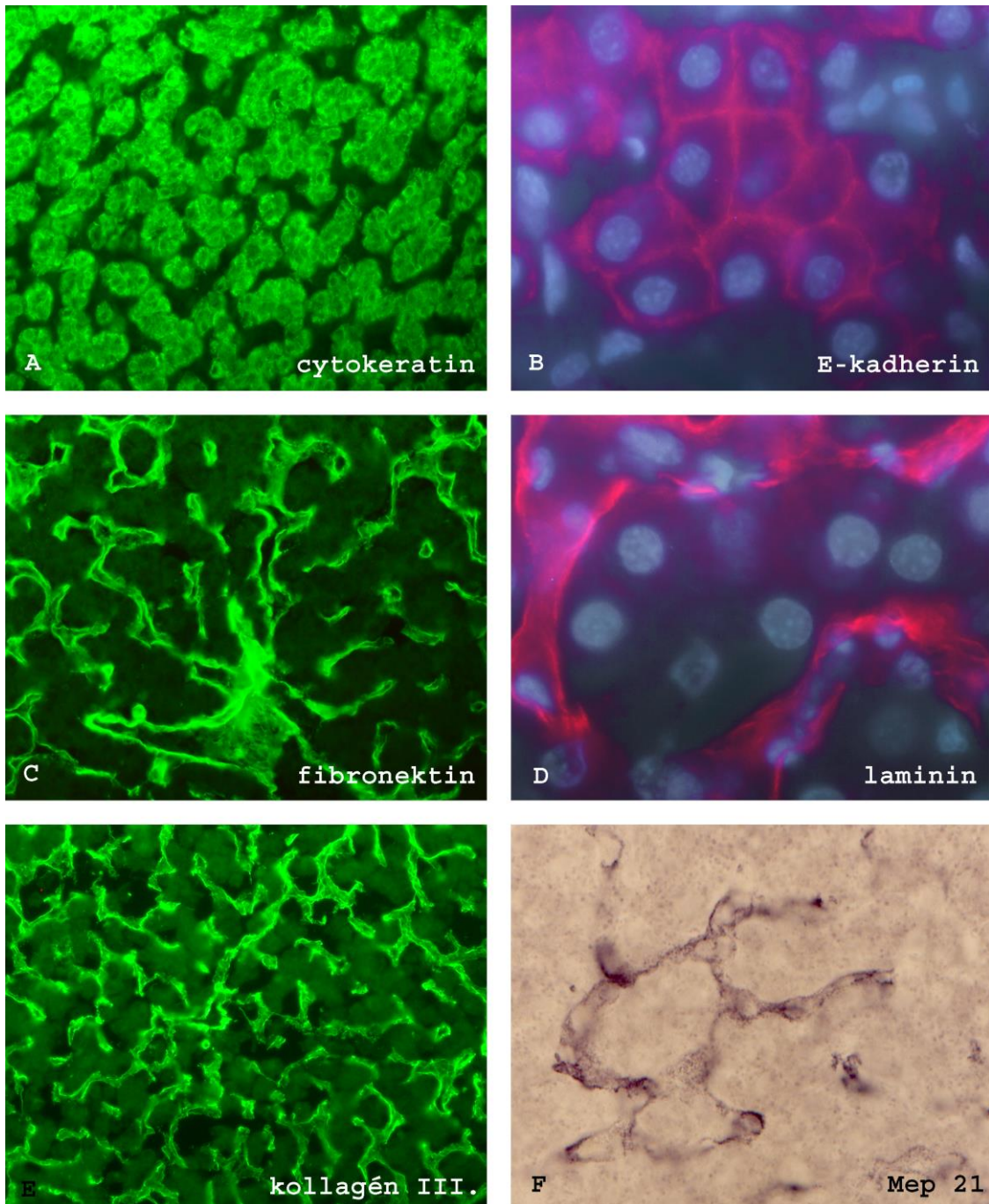
4. kép: 10 hetes csirke máj **A:** paraffinba ágyazott, hematoxilin-eosinnal festett metszet. Nyilak a vörösvérsejteket tartalmazó sinusoidokra mutatnak. **B:** félvékony metszet, toluidin kék festés. Nyilak a hepatociták közötti vörösvérsejtekre mutatnak. **C:** félvékony metszet, toluidin kék. Fél órával tus injektálása után a fagocita sejtek könnyen azonosíthatók. Egy Kupffer-sejt pirossal van körberajzolva, citoplazmájában szén szemcsékkel. (Nyíl egy sinusoid vörösvérsejtjeire mutat.) **D:** félvékony metszet, toluidin kék. A lipid cseppektől habos citoplazmájú Ito-sejtek zöld keretben vannak.

Toluidin kékkel festett, félvékony metszeten (4/B kép) megfigyelhetjük a sinusoidok endothel sejtjeit, a sinusoidok lumenében a Kupffer-sejteket valamint a

vörösvérsejteket. A csirke Kupffer-sejteket az emlősöknél is ismert módszerrel: tus keringésbe történő injektálásával lehet megbízhatóan azonosítani. (4/C képen pirossal körülrajzolt sejt). Szintén félvékony metszeten a Kupffer-sejtek mellett az endothel sejtek és a májsejtek között, lipid tartalmú, „habos” citoplazmájú sejteket figyelhetünk meg, amelyek megfelelhetnek a csirke Ito-sejteknek. (4/D kép).

Következő lépésben immuncitokémiai módszerekkel próbáltuk karakterizálni a csirke máj parenchymális sejtjeit. A máj hepatocitáinak jelölésére pan-citokeratin ellenanyagot használtunk, amely a hámsejtekre jellemző intermedier filamentumokat jelöli. Az immunfluoreszcens festéssel valamennyi májsejt intenzív keratin pozitivitást mutatott (5/A kép). A májsejteket E-kadherin adhéziós molekulák kapcsolják össze, amelyeknek festésével kirajzolódnak a hepatociták sejtmembránjai (5/B kép). A sinusok endothel sejtei és a hepatociták közti extracelluláris mátrix laminint, fibronektint és kollagén III.-at tartalmaz (5/C,D,E kép). A máj endothel sejtjeit a trombomucin antigénre specifikus Mep21 ellenanyag jelöli, amely kirajzolja a máj sinusoidok endothel sejtjeinek membránját (5/F kép).

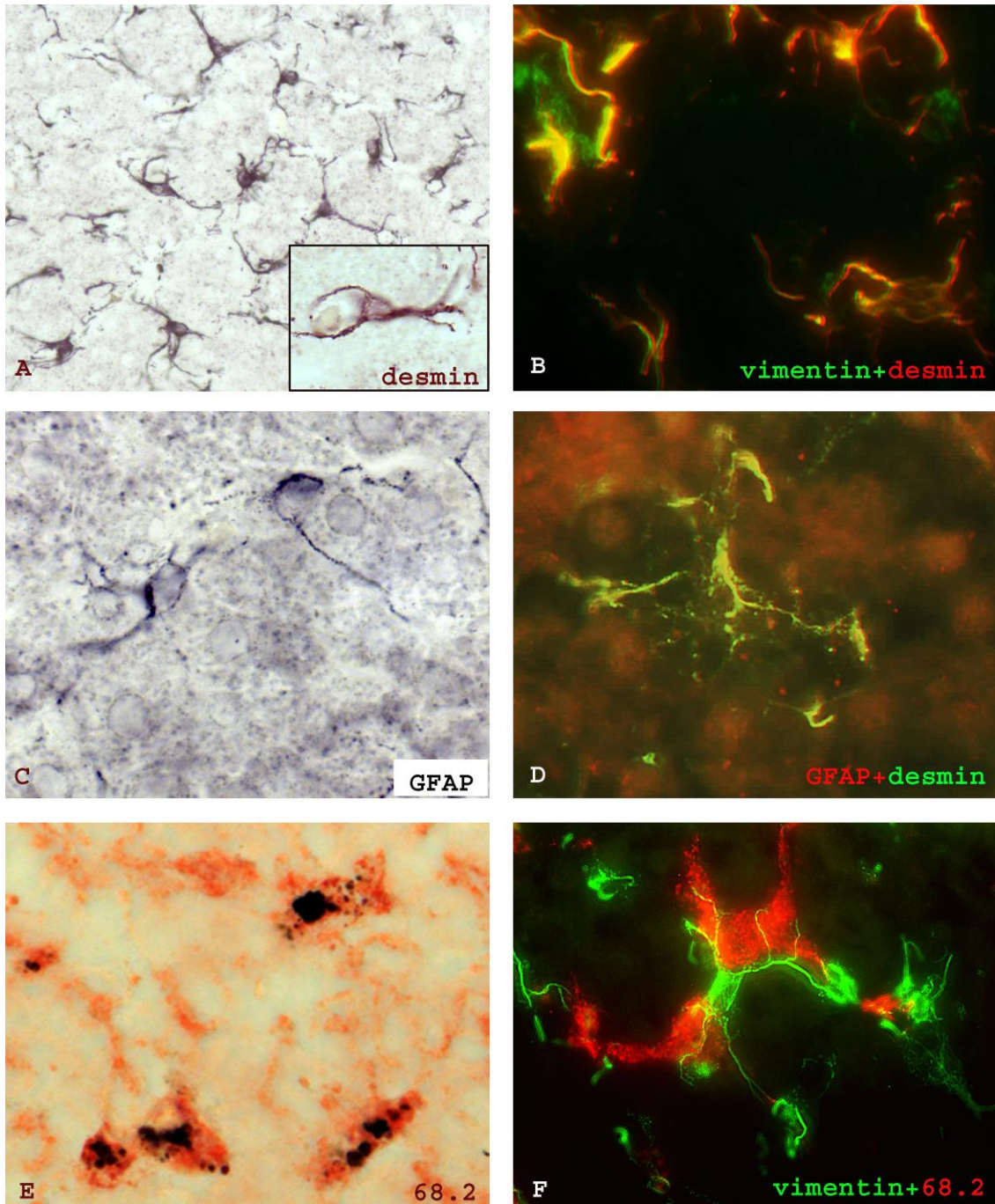
Az Ito-sejtek karakterizálására emlősben leírt markereket használtunk. Desmin, vimentin és GFAP (glial fibrillary acidic protein) jelölésével a májban jellegzetes csillag alakú sejteket találtunk, amelyek szorosan a sinusoidokhoz kapcsolódva helyezkednek el (6/A,C kép). Desmin és vimentin kettős immunfluoreszcens festéssel (6/B kép) megállapíthatjuk, hogy a jellegzetesen csillag alakú Ito-sejtekben a desmin és a vimentin intermedier filamentumok is megtalálhatók. A kettősen pozitív sejtek mellett vimentin+ / desmin- sejtek is előfordulnak, amelyek azonban nem csillag alakúak. GFAP poliklonális ellenanyaggal is lehet stellate morfológiájú sejteket jelölni csirke májban, azonban a festés intenzitása jelentősen gyengébb, mint a desminé (6/C kép). Desmin és GFAP kettős immunfluoreszcens festéssel (6/D kép) azt találtuk, hogy a két marker a máj perisinusoidális sejtjeiben teljes mértékben kolokalizál, de a nagyobb erek simaizom sejtjei csak desmin pozitivitást mutattak. Az Ito-sejtekre a desmin intermedier filamentumok kifejeződése mellett a kollagénszintézis is általánosan jellemző. A kollagénszintetizáló sejtekben megtalálható hősokk fehérje, a Hsp47 is az Ito-sejtek ismert markere, amelynek festésével csirkében is találhatunk nyúlványos sejteket. Desmin és Hsp47 kettős immunfluoreszcenciával (7/E kép) a két marker kolokalizációját láttuk, azaz a Hsp47 a desmin+ Ito-sejtekben fejeződött ki, míg az erek simaizom sejtjei csak desmin pozitivitást mutattak.



5. kép: 10 hetes csirke máj immuncitokémiai karakterizálása. A: citokeratin **B:** E-kadherin (piros), sejtmagok DAPI-val jelölve (kék). A sejtkapcsoló struktúrák jelölésével kirajzolódnak a hámsejtek citoplazmái. **C-D-E:** bazális membránt alkotó mátrix anyagok (fibronektin, laminin, kollagén III.) lokalizációja a májsejtek között. **F:** Mep 21 az endothel sejteket jelöli.

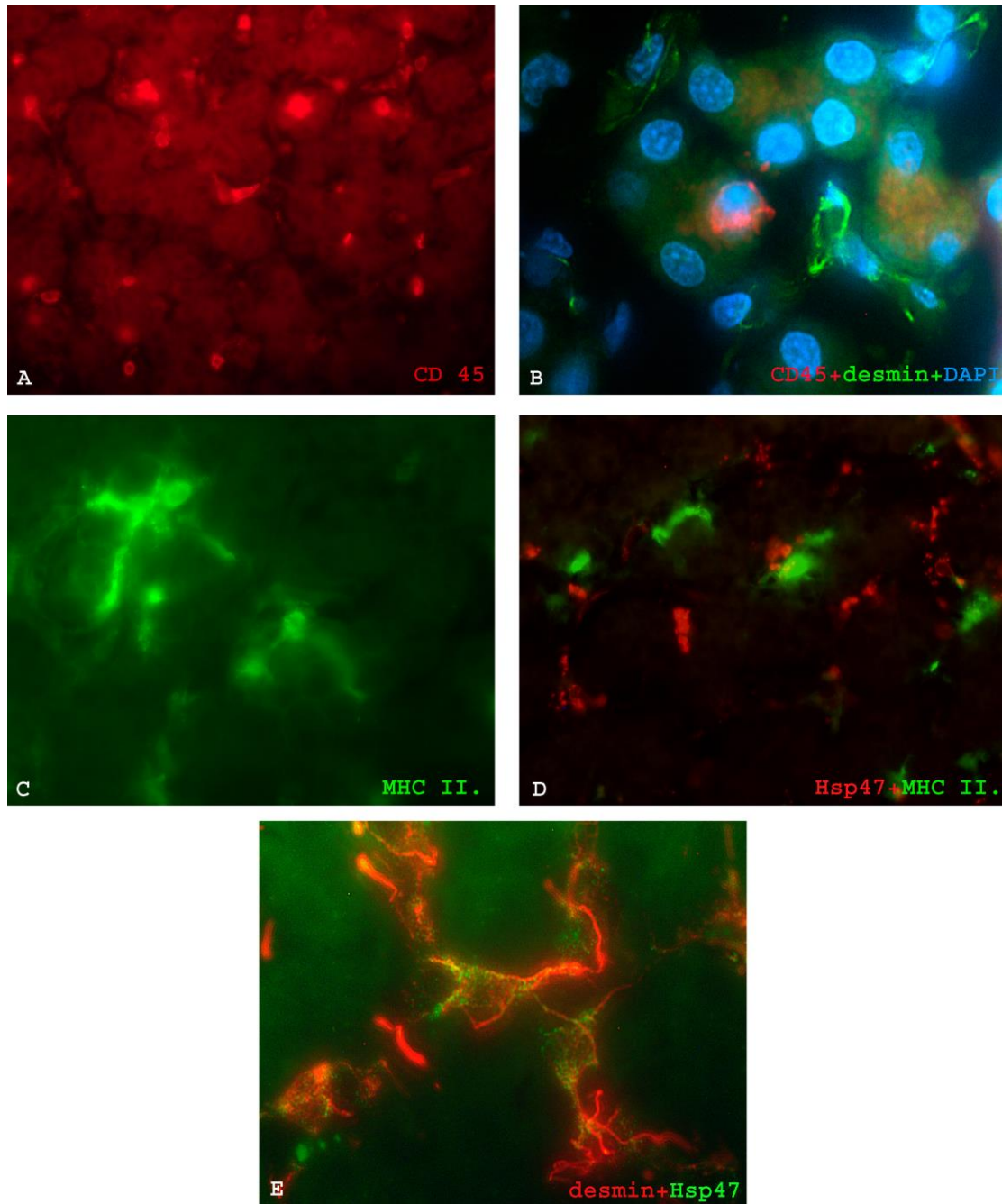
A csirke nyirokszervekben 74.2, KULO1, 68.2 nevű monoklonális ellenanyagokkal lehet karakterizálni a makrofágokat, ezért feltételeztük, hogy a máj Kupffer-sejtjeit is meghatározhatjuk ezekkel a markerekkel. Az immuncitokémiai festések során kiderült, hogy csak a 68.2 ellenanyag jelöl nyúlványos, Kupffer-sejtekre emlékeztető sejteket elszórtan a máj parenchymájában. Annak eldöntésére, hogy a 68.2+ sejtek megfelelnek-e a máj Kupffer-sejtjeinek, tust injektáltunk a csirke

vérkeringésébe. A lép 68.2+ sejtjei mellett azt láttuk, hogy a májban minden 68.2+ sejt fagocitálta a tusszemcséket (6/E kép). Ezt követően vimentin és 68.2 kettős immunfluoreszcens festéssel kimutattuk, hogy a Kupffer-sejtekben nem található meg vimentin, így a két sejtípus teljes biztonsággal elkülöníthető egymástól (6/F kép).



6. kép: 10 hetes csirke máj. **A:** desmin festésével a jellegzetes csillag alakú sejteket láthatjuk, a nagyított képen láthatjuk, hogy a perisinusoidálisan elhelyezkedő sejt nyúlványaival körülölel egy sinusoidot, és benne egy vörösvérsejtet. **B:** vimentin és desmin kettős festés **C:** GFAP **D:** GFAP (piros) + desmin (zöld) **E:** 68.2+ Kupffer sejtek fél órával tus injektálása után (fekete szemcsék a citoplazmában). **F** vimentin+ (zöld) jellegzetes csillag alakú, Ito-sejt lokalizációja a 68.2+ (piros) Kupffer sejtek között.

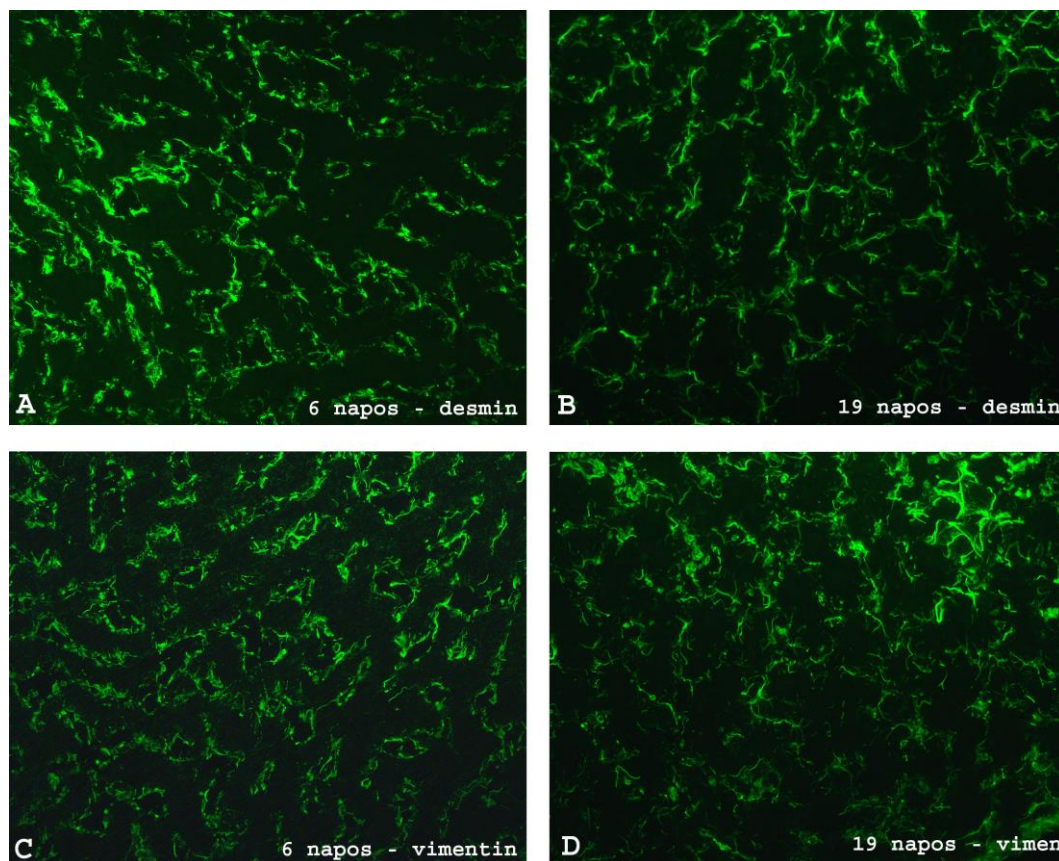
A CD45 marker minden csirke hemopoietikus eredetű sejtet jelöl (7/A kép). Desmin és CD45 kettős immunfluoreszcenciával azt láttuk, hogy az Ito-sejtek nem rendelkeznek ezzel a korai felszíni hemopoietikus markerrel (7/B kép). Az irodalomban emlősöknél ismert, hogy az Ito-sejtek – mivel részt vesznek az antigén prezentálásban – felszínükön MHC II. molekulákat is expresszálhatnak (Winau és mtsai, 2007). Eredményeink alapján, a csirke máj MHC II. pozitív nyúlványos sejtjei (7/C kép), nem kolokalizáltak a Hsp47+ Ito-sejtekkel (7/D kép).



7. kép: 10 hetes csirke máj. **A:** CD45+ sejtek. **B:** CD45 (piros) és desmin (zöld) kettős festés, a sejtmagokat DAPI-val jelöltük (kék). A CD45 pozitív sejtek nem kolokalizálnak desminnel. **C:** MHC II. molekulát hordozó nyúlványos sejtek a májban. **D:** Hsp47 (piros) és MHC II. (zöld) kettős festés. **E:** Hsp47 (zöld) és desmin (piros) kettős festés.

2. Desmin+/vimentin+ sejtek megjelenése a máj organogenezise során

A felnőtt máj immuncitokémiai karakterizálása után 6, 8, 12, 16, 19 napos embryokat és 1 hetes fiatal csirkék májszövetét is tanulmányoztuk. Már a hat napos embryonális kortól kezdve nagyszámú vimentin és desmin pozitív sejt fordult elő. Az embryonális kor vége felé a csillag alakú sejtek egyre nagyobb arányban jelentek meg.



8. kép: Embrionális máj desmin és vimentin immunfluoreszcens festése. A, C: 6 napos csirke embryo mája B, D: 19 napos csirke embryo mája

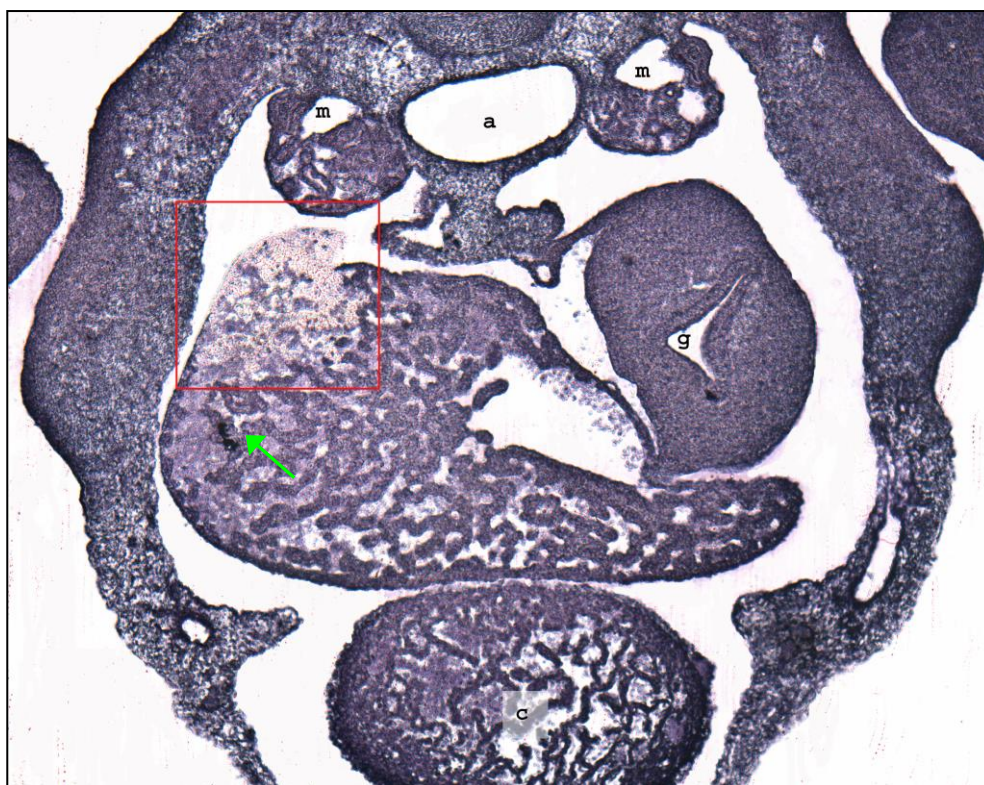
3. Ito-sejtek embryonális eredetének nyomonkövetése csirke-fürj kiméra technikával

3.1 Csirke-fürj testüreg kiméra

A csirke-fürj kimérák létrehozásakor fürj embryok májtelepét ültettük át csirke embryok testüregébe, ami optimális környezetet biztosít a graft megtapadásához, továbbfejlődéséhez. A kísérlet során 5 és 7 napos fürj embryokat használtunk

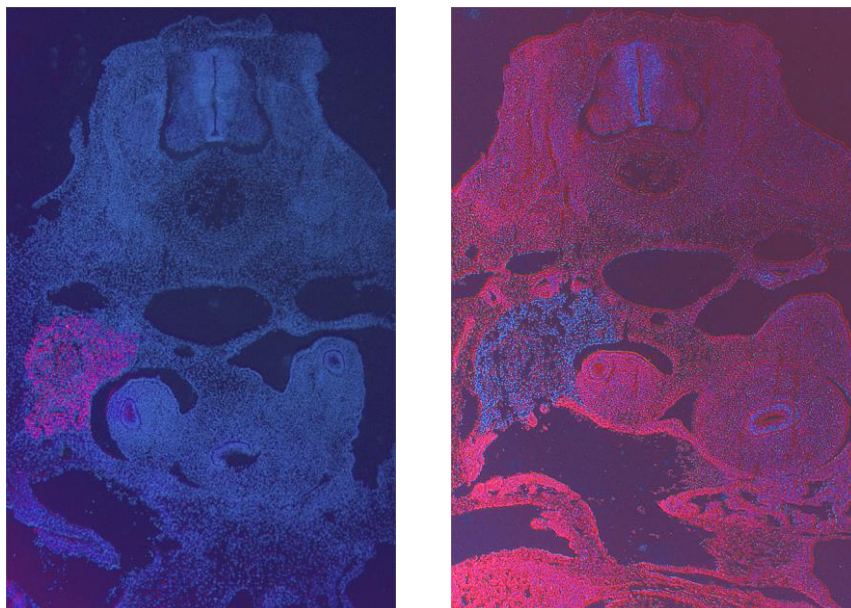
donorként. A recipiensek három napos csirke embryok voltak, amelyek fejlettsége a 18. és 20. Hamburger-Hamilton stádiumnak felelt meg. Összesen 30 májkimérát készítettünk, amelyből 14 nappal az inkubálás után 9 embryo maradt életben (30 %).

Az inkubáció végén a fogadó embryo májában az átültetett fűrj szövet megtalálása sokszor nehézségekbe ütközött, mert a két különböző fajból származó májszövet makroszkóposan teljesen egybeépült. Már három nap inkubálás után a fűrj graft májszövet teljesen hozzánőtt a fogadó embryo májához (9. kép). Sokszor a graftok megjelölésére használt szénszemcse sem adott elegendő támpontot a graft makroszkópos azonosításához.



9.kép: csirke-fűrj májkiméra, három nap inkubálás után, keresztmetszet, 8f3 antitesttel festve. A 8f3 minden csirke sejt citoplazmáját festi. Piros keretben az átültetett fűrj eredetű 8f3 negatív graft szövet. m: mesonephros, a: dorsalis aorta, g: gyomor, c: szív. A nyíl a graftok megjelölésére használt szénszemcsére mutat.

Néhány esetben a graft szövetet, mint egy külön lebenyt lehetett megtalálni a pericardiumhoz feltapadva, más esetekben csak a májszövet színe illetve a szénszemcse jelenléte alapján sejthettük a graft elhelyezkedését. Biztos azonosításuk azonban csak QCPN ellenanyaggal volt lehetséges, amely minden fűrj eredetű sejt magját jelöli (10.kép).



10. kép: csirke-fürj májchiméra, három nap inkubálás után

QCPN (piros), minden fürj sejtmagot jelöl, a sejtmagokat DAPI-val jelöltük meg (kék)

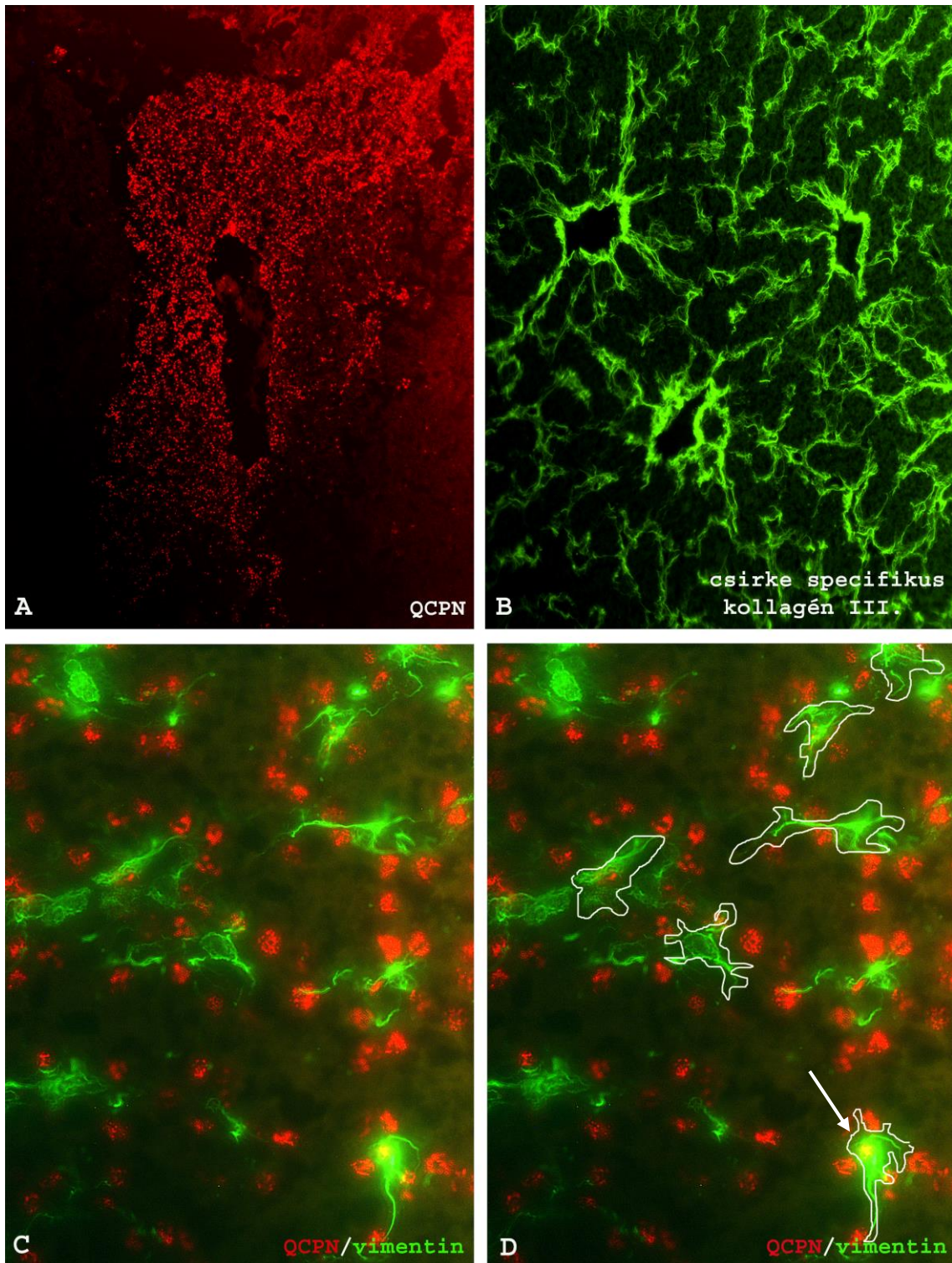
8F3: minden csirke sejt citoplazmáját jelöli, sejtmagokat DAPI-val jelöltük meg (kék)

A fürj máj graft a csirke embryo testüregében összefüggő májszövetet alkotott, további fejlődése során jól differenciálódott, hisztológiai szerkezete megfelelt egy azonos korú fürj embryo májszövetének.

A kimérák értékelése során fajspecifikus markereket használtunk. QCPN pozitivitás alapján azonosított graft májszövetet megfestettük csirke specifikus kollagén III. ellenanyaggal (laboratóriumunkban is teszteltük és csak a csirke eredetű kollagénrostokat jelöli, a fürjben nem ad pozitívást.). Azt tapasztaltuk, hogy a fürj eredetű májszövetben csirke eredetű kollagénrost hálózat alakult ki, amelyet feltehetőleg a csirke embryoból származó Ito-sejtek hozhattak létre (11/B kép).

Az Ito-sejtek graftban való azonosítására vimentin és QCPN kettős immunfluoreszcenciát alkalmaztunk (11/C-D kép). Habár a desmin megbízhatóbb markere az Ito-sejteknek, desmin és QCPN kettős festést nem tudtunk létrehozni, mert a laboratóriumunkban elérhető ellenanyagok izotípusa megegyezett, és nem állt rendelkezésünkre a megfelelő izotípus specifikus szekunder ellenanyag. Megjegyzem azt is, hogy a máj magas biotin tartalma miatt nem alkalmazhattunk streptavidin tartalmú szekunder ellenanyagot. A Hsp47, mint Ito-sejt marker alkalmazása izotípus

problémákat ugyan nem vetett fel, azonban embryonális korban a Hsp47 nem fejeződik ki, így nem alkalmas marker az Ito-sejtek embryonális nyomonkövetésére.



11. kép: **A:** QCPN pozitivitás csirke-fürj kiméra embryo májában. Az átnézeti képen jól látható, hogy a fürj eredetű graft szövet elkülönül a csirke saját májszövetétől. **B:** csirke specifikus kollagén III. rostok hálózata fürj eredetű májszövetben. **C:** QCPN (piros) és vimentin (zöld) kettős immunfluoreszcencia. **D:** Fehérrel körül vannak rajzolva az Ito-sejtek, nyíl egy fürj eredetű (QCPN+) Ito-sejtre mutat.

Vimentin immunfluoreszcens festésével a májsejtek között elhelyezkedő jellegzetesen nyúlványos Ito-sejtek könnyen azonosíthatóak. QCPN és vimentin kettős immunfluoreszcenciával azt találtuk, hogy a fürj graft májszövetben körülbelül 40%-ban található kettősen pozitív, azaz fürj eredetű Ito-sejtek. Az Ito-sejtek nagyjából 60%-ában nem láttunk QCPN pozitívítást, ezek a sejtek tehát a csirke embryoból vándoroltak át a fürj májszövetbe.

3.2 Fürj májszövet átültetése choioallantois membránra

A chorioallantois membrán (CAM) ideális környezet az embryonális szervek tenyésztésére, és ezzel a módszerrel a keringésből származó sejtek eredetét nagyobb biztonsággal lehet nyomonkövetni., mivel a graft szövetbe csak a véráramon keresztül juthatnak be sejtek. Ez a módszer lenne alkalmas arra, hogy az Ito-sejtek mesenchymális eredetét kizárhassuk.

A kísérletek során 5, 7, 11 napos fürj embryok májtelepét izoláltuk, és ültettük át nyolcnapos csirke embryo chorioallantois membránjára. Azt tapasztaltuk, hogy a graft máj szövege nem fejlődött megfelelően CAM-on. A májra jellemző szöveti felépítés nem alakult ki, nem indult el a további fejlődés, növekedés. A graft szövetben a sejtek nekrozisa kezdődött, és a szövet növekedése helyett nagyobb savóval telt bulla alakult ki. Ugyan a graft szövet vascularizációja elkezdődött, feltehetően a máj parenchymális szerkezete miatt nem volt alkalmas CAM-on való tenyésztésre. Bár különböző korú graft szövetekkel is próbálkoztunk (5, 7, 11), egyik módszer sem hozott eddig megbízható eredményt.

Eredmények megvitatása

Szakdolgozati munkám célkitűzése a csirke máj Ito-sejtjeinek karakterizálása és eredetének vizsgálata volt. Első lépésben a felnőtt csirke máj immuncitokémiai karakterizálását végeztük el. Eredményeink alapján elmondható, hogy madarakban a máj valamennyi sejt típusa meghatározható egy vagy több egér monoklonális ellenanyaggal, amelyek acetone és formaldehid fixált fagyasztott metszeteken jól használhatók. A májsejteket pán-cytokeratinnal, az endothelsejteket trombomucin ellenes ellenanyaggal, a bazális membránt lamininnel, fibronektinnel, a retikuláris rostokat kollagén III-mal, és a Kupffer-sejteket 68.2 nevű makrofág markerrel lehet kimutatni. Ennek alapján elmondható, hogy a madár jó vizsgálati modell a máj szöveti szerkezetének tanulmányozására, a különböző sejt populációk szelektíven jelölhetők, és az itt kapott eredmények összevethetők az emlősökben ismert adatokkal.

Munkámban az Ito-sejtek többi máj sejt típusától való elkülönítése és karakterizálása volt a legfontosabb cél. Emlős adatok szerint a máj Ito-sejtjeit desmin, GFAP és vimentin expressziójuk alapján lehet karakterizálni (Zhao és Burt, 2007). *Immuncitokémiai és fluoreszcens festéseink szerint mindhárom intermedier filamentum típusra specifikus (desmin, GFAP, vimentin) ellenanyag a madárban is elérhető és a festések jól alkalmazhatók a májban.* Fujimoto és Singer kimutatták (1987), hogy csirke májban vimentinnel több pozitív sejt található, mint desminnel. Ezt az eredményt mi is igazolni tudtuk. A csillag alakú kettősen pozitív sejtek mellett csak vimentinre pozitív myeloid szerű sejtek is előfordultak. Vimentin és 68.2 kettős immunfluoreszcenciával kimutattuk, hogy a vimentin+ és desmin- sejtek nem azonosak a Kupffer-sejtekkel, hanem feltehetően más myeloid vagy lymphoid sejtvonalba tartozó sejtek lehetnek. Winau és munkatársai 2007-ben leírták, hogy egérben az Ito-sejtek részt vesznek az antigén prezentálásban, így felszínükön MHC II molekulákat hordoznak. Csirkében MHC II immunfluoreszcenciával ugyan találtunk nyúlványos morfológiájú sejteket, amelyek azonban nem lokalizáltak Hsp47-tel, így tehát madarakban az Ito-sejtek MHC II pozitívitasát nem tudtuk igazolni.

Az Ito-sejtek fejlődéstani eredete nem tisztázott. Mesenchymális, ganglionléc és mesothel eredetük mellett az utóbbi években mindinkább a csontvelői/hemopoietikus eredet merült fel (Loo és Wu 2008; Pérez-Pomares és mtsai 2004, Baba és mtsai. 2004). Az immuncitokémiai karakterizálást követően az Ito-sejtek eredetével kapcsolatban

felmerült kérdésekre kerestük a választ. Kísérleteinkben csirke-fürj testüreg kiméra technikát alkalmaztunk. A kísérletben arra voltunk kíváncsiak, hogy az Ito-sejtek prekursorai lehetnek-e bevándorló, mobilis sejtek. Eredményeink alapján az átültetett embryonális májdarab jól fejlődött, szöveti differenciálódása nem maradt el a befogadó embryo májszövetétől. ***Ezzel először sikerült madár embryóban sikeres „májtranszplantációt” elvégeznünk.*** Továbbá azt találtuk, hogy a beültetett fürj májszövetében található Ito-sejtek nagyjából 60%-a volt csirke eredetű, amelyek tehát a csirke embryoból vándoroltak át a graft szövetbe. Azt, hogy ***az Ito sejtek prekursora mobilis sejt,*** az is alátámasztja, hogy a beültetett fürj májban fejlett csirke specifikus kollagén III hálózatot találtunk. Ezzel a módszerrel azonban nem zárható ki, hogy a septum transversum vagy a ventrális mesentérium mesenchymájából származnak a graft szövet Ito-sejtjei, mint ahogy az sem, hogy a fogadó csirke embryo Glisson-tok mesenchymája adja a graftban található Ito-sejtek prekursorait.

A testüreg kimarákból kapott eredményeink után úgy gondoltuk, hogy az Ito-sejtek esetleg hemopoiotikus eredetét megbízhatóan csirke chorioallantois membránra ültetett fürj májszövet vagy parabiosis segítségével lehetne kimutatni. Ezekben a kísérleti rendszerekben a két különböző fajból származó májszövet csak a vérkeringésen keresztül kerülhet kapcsolatba. CAM transzplantációs kísérleteink többszöri próbálkozás ellenére sem adtak értékelhető eredményt. A csirke CAM-ra ültetett embryonális fürj májlebenyek gyakran nekrotikus szövetmasszává differenciálódtak, vagy savóval telt bullák keletkeztek. A sikertelen kísérletek ellenére érdemes lenne kipróbálni idősebb embryokból is kiültetni májdarabokat, amelyek hosszabb ideig őrzik meg szöveti integritásukat. További lehetőségnek tekintjük embryonális véresejtek transzfúzióját fürj embryokból csirke embryokba. Laboratóriumunkban már el is kezdtük ennek a technikának a beállítását. Három napos fürj embryok izolált hemopoiotikus sejtjeit injektáltuk három napos csirke embryokba. Ebben a stádiumban a májtelep még kezdeti fejlődési szakaszában van, és a keringésből származó sejteket a korai stádiumokban is nyomon lehetne követni.

Konklúzió: A csirke máj immuncitokémiai karakterizálásával kimutattuk, hogy a máj szöveti szerkezete, immuncitokémiai sajátosságai hasonlóak az emlősökéhez. Madarakban tehát az Ito-sejteket desmin, vimentin, GFAP és Hsp47 pozitivitás jellemzi. Ez a sejtípus embryomanipulációs kísérletekben is teljes biztonsággal azonosítható. Csirke-fürj testüreg kiméra kísérleteinkben kimutattuk, hogy az Ito-sejtek prekursorai

mobilis, vándorlásra képes sejtek. Eddigi adataink alapján a madár embryot megbízható modellnek tekintjük az Ito-sejtek ontogenezisének nyomonkövetésére. *A beállított markerekkel felvértezve és újabb kiméra technikák bevetésével folytatni lehet az Ito-sejtek eredetének kiderítésére elindított „hadjáratot”.*

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom családomnak: szüleimnek és testvéreimnek, akiktől az egyetem hat hosszú éve alatt minden segítséget megkaptam tanulmányaim elvégzéséhez. Köszönöm férjemnek támogatását és a dolgozat szerkesztésében nyújtott segítségét.

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Nagy Nándornak, a Semmelweis Egyetem Humánmorfológiai és Fejlődésbiológiai Intézet adjunktusának, és Prof. Dr. Oláh Imre Tanár Úrnak, akik munkám során végig mellettem álltak, és kitartóan tanítottak meglátni a lényegét, és azt érthetően megfogalmazni.

Köszönöm a Fejlődésbiológiai és Immunológiai Laboratórium összes munkatársának segítségét, amellyel nagyban hozzájárultak szakdolgozatom elkészültéhez: Dr. Kittner Zsuzsa és Dr. Kocsis Katalin egyetemi adjunktusoknak, Dr. Bíró Éva, Bódi Ildikó és Dr. Molnár Dávid PhD-hallgatóknak, Fügedi Jutka, Orbán Edit és Vidra Györgyné asszisztenseknek.

Baba és mtsai (2004): Commitment of bone marrow cells to hepatic stellate cells in mouse. *J Hepatol.* 40(2):255-60

Blomhoff és mtsai (1990): Transport and storage of vitamin A. *Science* 250:399-404

Bucala és mtsai (1994) Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med.* 1(1):71-81

Cassiman és mtsai (2006): Hepatic stellate cells do not derive from the neural crest. *J Hepatol* 44:1098-1104

Crispe (2009): The liver as a lymphoid organ. *Annu Rev Immunol.*, 27:147-63.

Fujimoto és Singer (1987): Immunocytochemical studies of desmin and vimentin in pericapillary cells of chicken. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry:* 35(10):1105-1115

Geerts (2004): A. On the origin of stellate cells: mesodermal, endodermal or neuroectodermal? *J Hepatol* 40:331-334

Ghoddusi és mtsai (2004): Ultrastructure of in situ perfusion-fixed avian liver, with special reference to structure of the sinusoids. *Microscopy Research and technique* 65:101-111

Goldstein AM, Nagy N. (2008): A bird's eye view of enteric nervous system development: lessons from the avian embryo. *Pediatr Res.* Oct;64(4):326-33.

Handharyani és mtsai (2001): Immunohistochemical and ultrastructural study of Ito cells (fat-storing cells) in response to extrahepatic bile duct ligation in broiler chickens. *J. Vet. Med. Sci.* 63(5):547-552

Ishii és mtsai. (2007): Induction of proepicardial marker gene expression by the liver bud. *Development.* 134(20):3627-37.

Kanai és mtsai (2007): Uptake behavior of embryonic chick liver cells. *The anatomical record* 290:862-874

Kingsbury és mtsai (1956): The development of the liver in the chick. *Anatomical Record*. 124(2):165-87

Kisseleva és mtsai (2006) Bone marrow-derived fibrocytes participate in pathogenesis of liver fibrosis. *Journal of Hepatology*, 45 (3), pp. 429-438.

Le Douarin NM (1975): An experimental analysis of liver development. *Med Biol* 53:427-455

Le Douarin és mtsai (1993): Patterning of neural crest derivatives in the avian embryo: in vivo and in vitro studies. *Dev Biol* 159:24-49

Le Douarin NM. (2008): Developmental patterning deciphered in avian chimeras. *Dev Growth Differ*. 50 Suppl 1:S11-28.

Loo és Wu (2008): Origin of stellate cells from submesothelial cells in a developing human liver. *Liver International*; 28(10):1437-45.

Matsumoto és mtsai (2008): Wnt9a secreted from the walls of hepatic sinusoids is essential for morphogenesis, proliferation, and glycogen accumulation of chick hepatic epithelium. *Dev Biol*. 15;319(2):234-47

Miyaishi és mtsai (1992): Distribution of the collagen binding heat-shock protein in chicken tissues. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 40(7):1021-1029

Mozdziak PE, Petite JN. (2004): Status of transgenic chicken models for developmental biology. *Dev Dyn*. 229(3):414-21

Nagy N és mtsai (2001): A novel monoclonal antibody identifies all avian embryonic myogenic cells and adult smooth muscle cells. *Anat Embryol*. 204(2):123-34.

Nagy N és mtsai (2005): Peripheral blood fibrocytes contribute to the formation of the avian spleen. *Dev Dyn.* 232(1):55-66.

Nagy N, Goldstein (2006a): Endothelin-3 regulates neural crest cell proliferation and differentiation in the hindgut enteric nervous system. *Dev Biol.* 1;293(1):203-17.

Nagy N, Goldstein (2006b): Intestinal coelomic transplants: a novel method for studying enteric nervous system development. *Cell Tissue Res.* 326(1):43-55.

Nagy N és mtsai (2007): Pelvic plexus contributes ganglion cells to the hindgut enteric nervous system. *Dev Dyn.* 236(1):73-83.

Nagy N, Oláh I. (2009) Locally applied testosterone is a novel method to influence the development of the avian bursa of Fabricius. *J Immunol Methods.* Epub: 2009 Mar 3.

Nakayama és mtsai (2006) Id3 is important for proliferation and differentiation of the hepatoblasts during the chick liver development. *Mech Dev.* 123(7):580-90

Ohata Masako, Toshio Ito (1986): Experimental study on the fine structure of chicken liver parenchyme with special referensces to extrasinusoidal macrophages and sinusoidal blood cells, part1. *Arch. Histol. Jap.*, 49(1):83-103

Pérez-Pomares et al. (2004): Contribution of mesothelium-derived cells to liver sinusoids in avian embryos. *Developmental Dynamics* 229:465-474

Reuben A(2003): Ito becomes a star. *Hepatology* 35(2):503-504.

Sato Mitsuru et al. (2003): Hepatic stellate cells: Unique characteristics in cell biology and phenotype. *Cell Structure and function* 28:105-112

Wong GK, Cavey MJ. (1992) Development of the liver in the chicken embryo. I. Hepatic cords and sinusoids. *Anat Rec.* 234(4):555-67

Wong GK, Cavey MJ. (1993) Development of the liver in the chicken embryo. II. Erythropoietic and granulopoietic cells. *Anat Rec.* 235(1):131-43

Yanai és mtsai (2008) FGF signaling segregates biliary cell-lineage from chick hepatoblasts cooperatively with BMP4 and ECM components in vitro. *Dev Dyn.* 237(5):1268-83

Yokouchi (2005): Establishment of a chick embryo model for analyzing liver development and a search for candidate genes. *Develop. Growth. Differ.* 47:357-366

Zhao és Burt (2007): The diffuse stellate cell system. *J. Mol. Histol.* 38(1):53-64.