

# SZAKDOLGOZAT

## Hemopoietikus sejtek fejlődés a korai madár embryóban

Készítette:

Dóra Dávid

SE ÁOK VI. évfolyam

Témavezető:

Dr. Nagy Nándor

Semmelweis Egyetem

Humánmorfológiai és Fejlődésbiológiai Intézet



Budapest, 2012

# Tartalomjegyzék

|   |     |
|---|-----|
| <b>1. Irodalmi áttekintés</b> .....                                   | 4.  |
| <b>Bevezetés</b> .....  | 4.  |
| <b>1.1 Vértképző őssejtek</b> .....                                   | 5.  |
| <b>1.2 A madár embryo, mint modell az őssejtkutatásban</b> .....      | 6.  |
| <b>1.3 Vértképzés a madár embryóban</b> .....                         | 7.  |
| 1.3.1 Extraembryonális (primitív) vértképzés a madár embryóban.....   | 9.  |
| 1.3.2 Intraembryonális (definitív) vértképzés a madárembryóban.....   | 10. |
| <b>2. Anyagok és módszerek</b> .....                                  | 14. |
| <b>2.1 Kísérleti állatok</b> .....                                    | 14. |
| <b>2.2 Szövetteni feldolgozás</b> .....                               | 14. |
| 2.2.1 Zselatin-szacharózos beágyazás.....                             | 14. |
| 2.2.2 Beágyazáshoz használt oldatok.....                              | 15. |
| <b>2.3 Metszetek készítése</b> .....                                  | 15. |
| <b>2.4 Immunhisztokémia és immunfluoreszcencia</b> .....              | 16. |
| 2.4.1 Immunhisztokémia.....   | 16. |
| 2.4.2 Immunfluoreszcencia.....  | 17. |
| 2.4.2.1 <i>Egyszeres immunfluoreszcencia</i> .....                    | 17. |
| 2.4.2.2 <i>Kettős immunfestés</i> .....                               | 17. |
| <b>2.5 Hematoxilin-Eozin (HE) festés</b> .....                        | 18. |
| <b>2.6 Az immunfestés során alkalmazott primer ellenanyagok</b> ..... | 19. |

|  |            |
|--|------------|
| <b>2.7. Immunelektronmikroszkópia.....</b>   | <b>20.</b> |
| <b>2.8 Metszetek értékelése, fényképezése, képfeldolgozás.....</b>                                 | <b>20.</b> |
| <b>2.9 Embryomanipuláció.....</b>  | <b>20.</b> |
| 2.9.1 Csirke – fűrj parabiózis.....  | 20.        |
| 2.9.2 Szikhólyag in ovo tenyésztése.....   | 21.        |
| 2.9.3 Embryotenyészet.....   | 21.        |
| <b>3. Célkitűzéseink.....</b>  | <b>23.</b> |
| <b>4. Eredmények.....</b>  | <b>24.</b> |
| <b>4.1 Hemopoiitikus sejtek karakterizálása a korai csirke embryoban.....</b>                      | <b>24.</b> |
| 4.1.1 Az első CD45+ sejtek megjelenése a szikhólyagban és az embryoban.....                        | 24.        |
| 4.1.2 CD45+ hemopoiitikus sejtek differenciálódása.....  | 28.        |
| <b>4.2 CD45+ nyúlványos sejtek ontogenezisének vizsgálata embryomanipulációs technikákkal.....</b> | <b>35.</b> |
| 4.2.1 Parabiózis.....  | 35.        |
| 4.2.2 In ovo szikhólyag tenyészet.....   | 38.        |
| 4.2.3 In vitro embryotenyészet.....  | 42.        |
| <b>5. Eredmények megbeszélése és konklúzió.....</b>  | <b>43.</b> |
| <b>Köszönetnyilvánítás.....</b>  | <b>47.</b> |
| <b>Irodalomjegyzék.....</b>  | <b>48.</b> |

# Irodalmi áttekintés

## Bevezetés

Az őssejtek az összes többsejtű élőlényben megtalálható olyan sejtek, amelyeknek különleges\_képessége, hogy mitotikus sejtosztódással széles körben képesek a szervezet speciális funkciót ellátó testi sejtjeivé differenciálódni. Emellett képesek az önmegújulásra is, azaz a mitózis folyamán egy differenciált sejten kívül, egy másik őssejt létrehozására, ezáltal fenntartva a későbbi megújulást biztosító őssejt - kolóniát. (*Becker és mtsai 1963; James és mtsai 1998*). A gerincesek őssejtjei két fő típusra oszthatók: az embrionális őssejtekre, és felnőtt, vagy szöveti őssejtekre. A fejlődő embrióban az őssejtek az összes specializált magzati szövétté képesek átalakulni. A felnőtt szervezetben az őssejtek, és az azokból differenciálódó előd- (progenitor) sejtek a test javító mechanizmusaként szolgálnak, ugyanakkor a folyamatosan megújuló szöveteknek – mint a vér, bőr vagy a bél mucosája – normális megújulásában is közreműködnek.

Mára az őssejt-kutatás már nemcsak a laboratóriumok falai között élő fogalom, hanem széleskörű társadalmi népszerűsége tett szert, gondoljunk csak a különböző köldökzsínórvér bankokra, és a megannyi jövőbeli potenciális gyógyító eljárásra, mely ezen sejtek differenciálódási, és önmegújulási képességeit használja ki. Napjainkban az őssejteket már rutinszerűen alkalmazzák a hematológiai gyakorlatban különböző leukémiák gyógyításában. Emellett a jövőben az olyan jelenleg nem, vagy korlátozott hatékonysággal kezelhető betegségek, mint az Alzheimer- és a Parkinson-kór, az agyvérzés, bizonyos izomsorvadások, stb. esetén is az őssejt-terápiától várják az előrelépést (*Lindvall, 2003*). Több közlemény jelent már meg igazolásaként annak, hogy az őssejtek laboratóriumi körülmények között képesek például inzulintermelő szigetsejtekké alakulni. Ezzel remény látszik arra, hogy a cukorbetegség bizonyos fajtáinál az őssejtek beültetésével végre gyógyíthatóvá válhat a betegség, és kiküszöbölhető lesz a naponkénti injekciós inzulinkezelés. Egy másik példa alapján, laboratóriumi körülmények között köldökzsínórvér-őssejtekből előállított idegsejtek működőképeseek, így a neurológiai betegségek – pl. stroke vagy gerincsérülés – esetén vizsgálják a felhasználhatóságukat (*Goldman és Windrem, 2006*). Egy másik fontos alkalmazási területre példa a szívinfarktuson átesettek gyógyítása, mely során őssejteket juttatva a károsodott szívizomzatba, képesek voltak szívizomsejteket létrehozni, és a szövet regenerálódását elősegíteni.

## 1.1 A vérképző őssejtek

A hemopoiitikus őssejtek olyan multipotens sejtek, melyek képesek, mind a négy nagy hemopoiitikus sejtvonalt (erythroid, myeloid, lymphoid, thrombocytoid) populációinak létrehozására. A hemopoiitikus őssejteket napjainkban a klinikumban is széles körben alkalmazzák hematológiai betegségek gyógyításában, mint az akut és krónikus myeloid, illetve lymphoid leukémiák, vagy a csontvelő degeneratív betegségeiben, mint az aplasticus anaemia, vagy más myelodysplasiás szindrómák. Ilyen sok esetben kuratív célú beavatkozások az allogén, vagy a perifériás vérből való őssejt-gyűjtéssel megvalósuló autológ csontvelő-transzplantáció. Emellett a modern medicinában egyre nagyobb teret kapnak különböző genetikai betegségek gyógyításában, de különböző szövetpótló eljárások esetén is. Az elmúlt évek kutatásai bebizonyították, hogy a csontvelői eredetű multipotens sejtekből májsejtek, primitív mesenchymális sejtek, izomsejtek, neuronok, és gliasejtek is kialakulhatnak. Ezen kísérletek a multipotens őssejtek nem várt plaszticitását, illetve transzterminációs képességét mutatják. A foetális máj egyidejűleg lát el élettani és vérképző funkciókat, bár mindkét funkcióért eltérő sejtvonalat tartanak felelősnek. Újabb megfigyelések szerint kapcsolat figyelhető meg a hepatocyták, és a hemopoiitikus sejtvonalt között. Egyes kutatócsoportok szerint a felnőtt csontvelő - mely az embryonális korban kolonizálódik vérképző őssejtekkel - potenciális tartalékokat jelent a májparenchyma számára (Alison és mtsai, 2001; Theise és mtsai, 2000; Mallet és mtsai, 2002). Nőbetegek májbiopsziás anyagából, férfitől származó transzfúziós készítmény beadása után donor eredetű májsejtek figyelhetőek meg (Korbling és mtsai, 2002).

A klinikai alkalmazás előtt azonban elengedhetetlen, hogy ezeknek sejteknek differenciálódásáról in vitro és in vivo, funkciójáról, eredetéről, illetve genetikai jellegzetességeiről precízebb, és széleskörűbb képet kapjunk. Hogy megértsük a felnőtt vérképző őssejtek ezen tulajdonságait, kiemelten fontos, hogy minnél pontosabban megismerjük embryonális eredetüket, lokalizációjukat, vándorlásukat, valamint differenciálódásukat, beleértve, hogy milyen regulációs faktorok hatására történik az.

Az egyik legmegbízhatóbb modell számunkra a fentiek megértéséhez a madár embryo, ami már sokat segített a mostani tudásunk kibontakozásához az embryonális hemopoiitikus rendszerek fejlődését illetően, a magasabb rendű gerincesekben. Nagy áttörésként nem egy kísérlet, és kutatás bebizonyította, hogy azok az embryonális hemopoiitikus őssejtek, amelyek később majd a felnőtt vérképzés központját, a csontvelőt is benépesítik, nem az

extraembryonális szikhólyagból, hanem egy intraembryonális vérképző régióból, az intraaortikus redőkből származnak. Az egyre nagyobb számú csirke eredetű genetikai adatbázisok azt is lehetővé teszik, hogy feltárjuk a legkülönbözőbb molekuláris regulációs mechanizmusokat a fejlődés folyamán.

## **1.2 A madár embryo, mint modell az őssejtkutatásban**

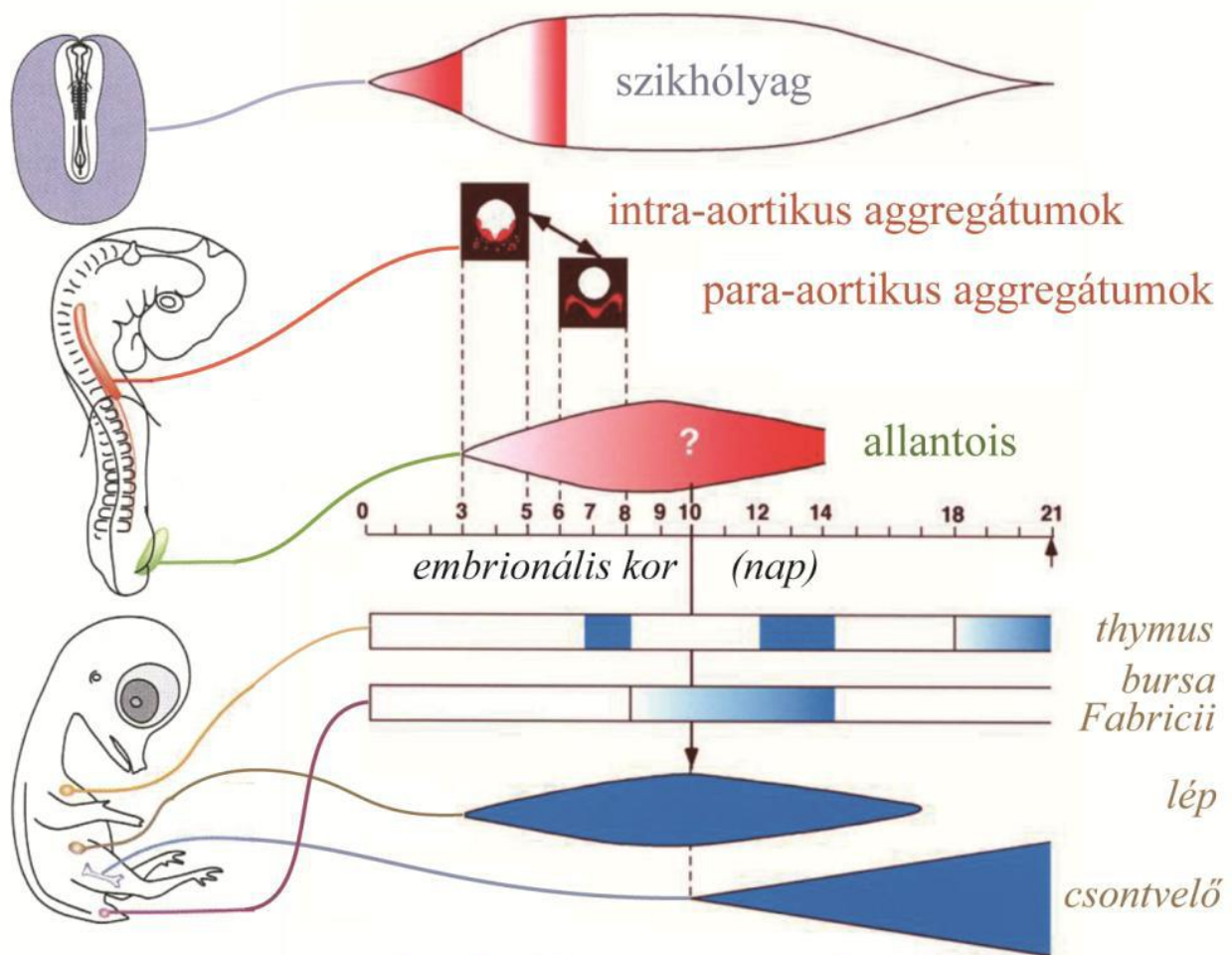
Az „optimális” fejlődésbiológiai modellek kiválasztásánál mindig is fontos szempont volt az embryológusok számára a könnyű hozzáférhetőség, fenntarthatóság, gyors fejlődés, manipulálhatóság, a kísérletes beavatkozásokkal szembeni ellenállóképesség. Az utóbbi években egyre nagyobb szerepet kaptak azok a madárembryokon végzett embryomanipulációs és sejtjelölési kísérletek, amelyekben nyomon követhető egy sejtípus eredete, vándorlása, differenciálódása. A relatíve nagy mérete, illetve hozzáférhetősége a madár embryoknak lehetővé teszi a legváltozatosabb embryomanipulációs kísérleteket, melyekkel széleskörűen tanulmányozható a sejtek eredete, illetve azok a köztük fenálló interakciók, melyek megjelennek a fejlődés folyamán az embryonális korban. Nem toxikus festékek (fluoreszkáló carbocianin anyagok); (*Serbedzija, 1989; Nagy és Goldstein, 2006a*) sejtvonala specifikus monoklonális ellenanyagok, (*Milstein, 1999*) vagy csirke-fürj kimérák (*LeDouarin, 1987; Teillet, 1999*) alkalmazása lehetővé tette egy-egy kérdéses sejtvonala sorsának tanulmányozását, sorstérképek készítését. Hybridoma technika alkalmazásával lehetőség nyílt specifikus monoklonális ellenanyagok előállítására, és a differenciálódó sejtípusok fejlődésbiológiai vizsgálatára, pl. ganglionléc, izom, endothél, hemopoietikus sejtek és azok utódsejtjeire (*Nagy és mtsai, 2001a, 2001b; Oláh és mtsai, 2002; Gumati és mtsai, 2003; Igyarto és mtsai 2008, Bodi és mtsai, 2009*). Csirke-fürj kimérák alkalmas eszközt jelentettek annak meghatározására, hogy a csíralemezek sejtjei milyen szervek kialakulásához járulnak hozzá. Ugyanakkor a már fejlődésnek indult szervtelepek transzplantációjával tisztázható az egyes sejtípusok eredete, sorsa. Talán legtöbbet a ganglionléc eredetű őssejteket vizsgálták, de ugyancsak kimérákkal igazolódott a végtagizmok myotom eredete, a bordák szklerotom eredete, a hemopoietikus sejtek intraembryonális eredete, (mely alapján az intraaortikus redőket, mint első definitív vérképző régiót meghatározták), a bursai dendritikus sejtek, és a lép fehérpulpájának fibrocyta eredete (*Catala, 1995; Brand-Saberi és Christ, 2000; Huang, 2000; LeDouarin, 2000; Nagy és mtsai, 2001a; 2004; Nagy és Goldstein, 2006a, 2006b; Nagy és mtsai, 2007*).

### **1.3 Vértképzés a madár embryóban**

A gerincesek vértképző rendszerének kialakításában a hemopoietikus őssejtek (Hemopoietic stem cells, HSC) több generációja vesz részt. Az első egy extraembryonális eredetű, szikhólyagból származó, és az embryonális fejlődés első (E1), illetve második napján (E2) formálódik, és primitív HSC – nek nevezik. A második generáció, az ún.: definitív HSC a harmadik naptól (E3) jelenik meg intraembryonálisan. Eddigi ismereteink szerint az embryonális eredetű HSC a definitív vértképző szerveket kolonizálja, míg a szikhólyag őssejtjeiből egy tranzien, főként erythroid hemopoietikus populáció keletkezik, mely az embryonális élet vége előtt eltűnik az embryóból.

A madár embryo definitív vértképzésének megindulását a dorsalis aorta ventralis falához tapadó sejtaggregátumok, ún.: intraaortikus redők megjelenése jelzi, a fejlődés harmadik napján (E3). Ezek a sejtcsoportok pár nap után eltűnnek, majd a hatodik napra (E6) a dorsalis mesenteriumban található paraaortikus régió vértképző helyeit hozzák létre (*Dieterlen - Lièvre 1984, 1994; Jaffredo, 2000*). Az itt lévő sejtek mind erythroid, mind myeloid kolóniák képzésére képesek. Feltételezések szerint az innen származó pre-T, és pre-B lymphocyta prekursorok, valamint myeloid progenitor sejtek népesítik majd be a primer embryonális nyirokszerveket, így a thymust, a bursa Fabricii és a lépét is (*Dieterlen - Lièvre, 1994, 1997*). Utóbbi kutatások arra világítottak rá, hogy létezik még egy vértképző hely, és ez az allantois, mely madárban a harmadik napon (E3) fejlődik ki, és a splanchnopleura származéka, csakúgy, mint a szikhólyag. (*Caprioli, 1998*). A madarak thrombocytái az emlősökével ellentétben nem megakaryocytákból fejlődnek, hanem thromboplastokból differenciálódnak a felnőtt madár csontvelőjében. Ezek a thromboplastok embryonális korban a szikhólyag area vasculosa vérszigeteiben kezdenek differenciálódni már a második embryonális napon, és később vándorolnak a vasa vitellina lumenébe, és lépnek be a véráramba (*Tahara és Morinaka, 1990*).

## VÉRKÉPZŐ SEJTEK EREDETE



## VÉRKÉPZŐ SZERVEK BENÉPESÜLÉSE

**1. ábra:** A vérképző rendszer fejlődése csirke embrióban. A kép az embrionális kor függvényében ábrázolja a vérképző sejtek keletkezésének a helyét illetve a különböző lympho-myeloid célszervek kolonizációs időintervallumát. (Forrás: Fejszák Nóra szakdolgozat, 2011. Témavezető: Dr. Nagy Nándor)



### 1.3.1 Extraembryonális (primitív) vérképzés a madár embryóban

A szikhólyagot hosszú ideig a hemopoiétikus progenitor sejtek egyetlen forrásának tekintették, melyek az embryonális fejlődés folyamán kolonizálják a későbbi definitív vérképző szerveket. Madár embryokon végzett embryomanipulációs kísérletek szerint, bár ennek az extraembryonális függelléknek komoly szerepe van a korai embryonális vérképzésben, a szikhólyag vérszigeteiben csak az erythrocyták azon első hulláma képződik, amely biztosítja az embryo oxigén-ellátását a passzív diffúzió, és az érett, már intraembryonálisan képződő vörösvérsejtek megjelenése között.

Gerinces embryokban az első hemopoiétikus sejt kolóniák a szikhólyagban keletkeznek. Ezek a vérképző sejtek az extraembryonális mesodermából származnak, mely az epiblast elsőként differenciálódó szövetfélesége a gastruláció során. Az szikhólyag mesodermális sejtjei a primitív csík posterior régióiból kezdenek el vándorolni antero-laterális irányban és telepednek le egy patkó formájú területen az extraembryonális entoderma, és ektoderma között (*Schoenwolf és mtsai, 1992*). Ezen a területen a második embryonális nap folyamán a hemopoiétikus őssejtek, szoros kapcsolatban az endothel sejtekkel sejtaggregátumokat hoznak létre, melyeket vérszigeteknek hívunk. A vérszigetek fejlődése közben a perifériásabb sejtek ellapulva az endothelt, a centrálisan elhelyezkedő sejtcsoportok pedig a kerek morfológiájú hemopoiétikus sejt populációt fogják alkotni. A fejlődés alatt, a vérszigetek szikhólyag-erekké, és érfalhoz tapadt intravasculáris vérsejt csoportokká alakulnak, ahonnan a második embryonális nap után, az intra,- és extraembryonális keringés egyesülésével a hemopoiétikus sejtek folyamatosan szakadnak le, és kerülnek a keringésbe (*Kessel és Fabian, 1985*). Az első, és második embryonális nap folyamán kialakuló vérszigetek fejlődésének megismerésével, egyre több kutatócsoportban felvetődött a kérdés, hogy ha ilyen szorosan asszociáltak differenciálódnak a hemopoiétikus, illetve endothel sejtek a szikhólyagon belül, lehetséges-e, hogy egy közös prekursorból származik mindkét sejt vonal. Bár a két sejt vonal korai tagjai sok közös molekulát és transzkripció faktor expresszálnak (VEGFR2, SCL, CD34) mind madár, mind emlős embryóban (*Shalaby és mtsai, 1995*); mégsem tiszta egyelőre, hogy ezek a sejtek bipotens hemangioblastok, vagy egyszerűen csak mesodermális progenitor sejtek.

Csirke – fürj szikhólyag kiméra kísérletek alapján, a madár embryóban ez a korai, primitív vérképző rendszer szerepe csupán átmeneti jelentőségű, a szikhólyagból származó vérsejtek száma a fejlődés folyamán a keringésben fokozatosan csökken, majd a kikelés

idejére teljesen eltűnik. Továbbá úgy tűnik, hogy a szikhólyag a definitív vérképzés megjelenése mellett is rendelkezik egy második erythrocyta sejtgenerációval, (elkülöníthető az első, és a második generációs erythroid sejt vonal, az embryonális, illetve fetális hemoglobin alapján), valamint madár embryóban a thrombocyta prekursorok is a szikhólyagban jelennek meg. (*Beupain és mtsai, 1979*). Ez a két sejt vonalon kívül (erythrocyta. thrombocyta) szikhólyag eredetű makrofágok létezéséről is jelentek meg közlemények, melyek szerint a szikhólyagból kilépő makrofágok bevándorolnak az embryonális szervek mesenchymájában, és a neuroepitheliumot is kolonizálják. Ezeknek a sejteknek későbbi differenciálódása kísérletesen nem bizonyított. (*Caudros és mtsai, 1992*).

Összefoglalásként elmondható, hogy átmenetileg a szikhólyagban fejlődő hemopoietikus sejtek főként az erythro-myeloid sejt vonalak tagjaivá differenciálódnak az ontogenezis korai szakaszán. Emellett több kísérletes bizonyíték áll már amellet, hogy a szikhólyag forrása lehet a pre-definitív hemopoietikus őssejtnek a fejlődés későbbi szakaszában. Bár az viszont még mindig tisztázatlan, hogy ezek a sejtek a normális embryonális fejlődés során képesek-e definitív vérképző őssejtekévé válni.

### **1.3.2 Intraembryonális (definitív) vérképzés a madárembryóban**

Mai ismereteink szerint a felnőtt hemopoietikus szerveket az embryóban a definitív HSC-k fogják benépesíteni, s a primitív vérképzéssel ellentétben a definitív prekursorok a kikelés után is fennmaradnak.

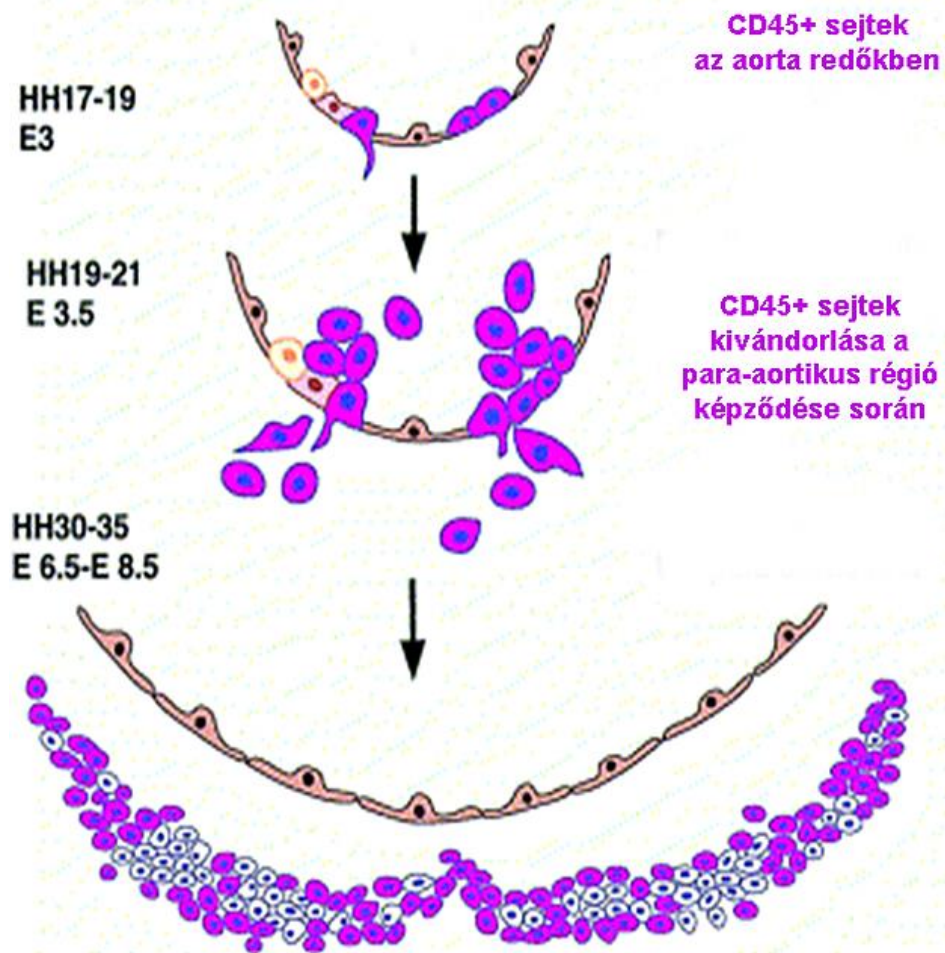
Madár embryóban az első definitív HSC-k megjelenése a dorsalis aortához köthető. Az aortának érdekes módon kettős eredete van: ortotóp csirke – fürj graft-kísérletek azt bizonyították, hogy amíg az aorta dorsalis és lateralis falának endothel sejtszomita, azaz paraxiális mesoderma eredetűek, addig a ventralis fala a splanchnopleurális mesodermából fejlődik (*Pardanaud és mtsai, 1996*).

Az aorta ventralis falát borító endothel sejt rétegben a fejlődés harmadik napján (HH17-19 stádiumban) hemopoietikus sejt-csoportok jelennek meg. Ezek az intraaortikus sejt-aggregátumok, vagy másnéven intraaortikus redők jelentik a definitív hematopoiesis első

hullámát. Pár nappal később, a 6-8 napos embryóban az aortától ventrálisan elhelyezkedő mesenchymában egy újabb hemopoietikus locus, a paraaortikus régió kezd kialakulni, (*Dieterlen – Lièvre és Martin, 1981*). (2. ábra), amely az intraaortikus redőkben képződött HSC mesenchymális megtelepedéséből jön létre. Emlősökben ezt a szakaszt Aorta – Gonád – Mesonephros (AGM) régióknak nevezzük. (*Alexander és Elaine, 1997*)

Csirke embryóban, a legkorábbi hemopoietikus marker a CD45, mely egy foszfortirozin foszfatáz aktivitású sejtfelszíni molekula, és nevezik közös leukocyta antigénnek is. Az erythroid az egyetlen hemopoietikus eredetű sejtvonal, melyet az anti – CD45 elleneanyag nem jelöl. Az első CD45+ HSC-ket az aortaredőkben a harmadik embryonális naptól kezdve lehet kimutatni. Ilyenkor az aortafal endothel sejtjei a VEGFR2 nevű sejtfelszíni receptort viszont már expresszálják. Immuncitokémiai festésekkel az intraaortikus redőkben nem lehet kollokalizációt kimutatni a CD45, illetve VEGFR2 expresszió között, viszont a a harmadik embryonális nap kezdetén nagyszámú CD45+, kerek morfológiájú sejt jelenik meg az ellapult aorta - endothel sejtek között. HH 20-as stádiumra ezek a CD45+ sejt aggregátumok fogják kialakítani az első, intraaortikus vérképző régiót. (Az aortafalból kiváló hemopoietikus sejtalakok, amint CD45-öt kezdenek expresszálni, hamarosan elvesztik endothel fenotípusukat, és nem expresszálják többet a VEGFR2 markert.)

Annak igazolása, hogy az intraaortikus redők hemopoietikus sejtcsoportjai az endothelből származnak, egy endothel – fluoreszens sejtjelöléses kísérlettel sikerült. A 2 napos embryoba acetilált LDL-t (Low density lipoprotein) injektáltak a szívcsőbe, mely egy lipofil fluoreszcens markerrel volt megjelölve (Dil). Ezeket a partikulomokat tipikusan két sejttypus veszi fel receptor mediált endocytosis révén: a makrofágok, és az endothel. A Dil-lel jelölt ac-LDL partikulumok a második napon történő injektálás után pár órával megjelentek az egész endothel sejtpopulációban, megfestve ezzel az embryo korai vascularis rendszerét. Egy nappal később, (azaz az intraaortikus redők megjelenése idejében) pedig láthatóak voltak már az első hemopoietikus, kerek CD45+/LDL-Dil+ sejtek az aortában, és annak ventralis vérképző redőiben. Ezzel a kísérlettel bebizonyosodott, hogy az intraaortikus CD45+ vérképző sejtclusterek, az aortafal endotheliumából származnak (*Jaffredo és mtsai, 1998*). Érdekes, hogy az aorta körüli mesenchymában is találtak elszórtan amöboid jellegű, CD45+ sejtalakokat is. Ezek a sejtek valószínűleg a szikhólyag első generációs hemopoietikus sejtvonalából származnak.



**2. ábra:** Az aorta-redők és a paraortikus régió kialakulása.

Az első CD45+ definitív HSC-k a harmadik embryonális napon jelennek meg, és létrehozzák az intraaortikus redőket. Az ötödik embryonális napra az aortaredők eltűnnek, majd egy nappal később az aortától ventralisan, a mesenteriumban megjelenik a paraaortikus régió, mint új vérképző hely az embryóban.

Feltételezések szerint az aorta, és paraaortikus régiókból képződnek azok a lymphomyeloid prekursor sejtek, amelyek a primer nyirokszerveket, és a csontvelőt, valamint emlősökben a májat fogják kolonizálni (*Jaffredo és mtsai, 1998*).

Madár embryóban az első B – lymphocytaikat a Bu-1 felszíni antigén expressziójuk alapján lehet azonosítani, amit a 9-10 napos embryóban a bursa Fabrici (B-sejtek éréséért felelős primer nyirokszerv) telepét kolonizálják, míg a thymus (a T-sejtek éréséért felelős primer nyirokszerv) pre – T sejtjeit csak a 10-11-edik napon lehet kimutatni (*Bockman, 1997*). B és T sejtmarkerek, valamint makrofág, granulocita, vagy thrombocita sejtekre specifikus antigének expressziója a paraaortikus régió fejlődése idején nem ismert.

# Anyagok és módszerek

## **2.1 Kísérleti állatok**

Kísérleteinkhez csirke (*Gallus gallus*, White Leghorn SPF, Phylaxia Sanophi, Magyarország), és fűj (*Coturnix coturnix japonica*) embryokat, valamint izolált embryonális szerveket használtuk fel. A madártojásokat laboratóriumunk keltetőgépében forgatórácsos inkubáltuk 38C<sup>0</sup> hőmérsékleten, 60%-os páratartalom mellett). A pontos fejlődési kor meghatározására a Hamburger Hamilton stádiumokat, illetve az embryonális szomiták számát használtam (Hamburger V. és Hamilton HL., 1951). Az öt napos vagy annál idősebb embryok esetén egyszerűen napokban fejeztük ki az embryonális kort. Az állatkísérletek a Semmelweis Egyetem Etikai Bizottságának jóváhagyásával történtek (engedélyszám: 779-000-2005).

## **2.2 A minták szövettani feldolgoása**

A hisztológiai vizsgálatokra korai (10 napnál fiatalabb) embryokat, a hozzájuk tartozó szikhólyagot; illetve embryonális szerveket (lép, bursa fabricii, szív, tüdő, máj, csontvelő, thymustelep) használtam fel, és az immuncitokémiai, és immunfluoreszens vizsgálatokhoz zselatinos, fagyasztott blokkot készítettünk. A kísérleteinkhez szükséges embryokat, és embryonális szerveket sztereomikroszkóp alatt, mikropreparációra alkalmas eszközökkel (mikroolló, csipeszek, rovartűk, embryospatula) távolítottam el.

### **2.2.1 Zselatin-szacharózos fagyasztott blokk készítése**

A kivett szerveket 1 órán keresztül fixáltam pufferelt 4% paraformaldehidben, majd foszfáttal pufferelt sóoldattal (PBS) háromszor 5 percig mostam. A szerveket a fixálást követően, egy éjszakát 15%-os szacharóz PBS oldatában inkubáltam 4C<sup>0</sup>-on, majd a beágyazást megelőzően 37C<sup>0</sup>-on, 1 órán keresztül, 15% szacharózt (Reanal puris, M:342,30) és 7,5% zselatint (Fluka, kat. szám: 04055) tartalmazó PBS-ben tartottam. Az így impregnált szerveket előre, tálkákba kiöntött zselatinágyra helyeztem. Néhány percig állni hagytam, hogy a szervek a zselatin ágyhoz tapadjanak, ezt követően meleg zselatinnal teljesen befedtem őket. A második réteggel történő lefedés előtt felmértem, hogy nincs-e túl nagy hőmérséklet-különbség a két zselatinréteg között, ami későbbiekben a fagyasztás folyamán a blokk

szétrepedéséhez vezethet. 4C°-on 5 percig szilárdulni hagytam, majd körbevágással kialakítottam a kívánt méretű blokkokat. Az így kapott zselatin blokkokat Shandon Cryomatrix-szal (Anatomical Pathology Ind., 67690006) feliratozott kartonpapírra rögzítettem. A blokkokat folyékony nitrogénnel -50C°-ra lehűtött 2-metilbután – izopentánban- (Sigma-Aldrich, kat. szám: M3,263-1) 1 perc alatt lefagyasztottam, majd felhasználásig -80C°-on tároltam.

### **2.2.2 Beágyazáshoz használt oldatok**

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

A szacharóz, és zselatin tartalmú PBS puffer: 15mg D-szacharózt oldunk fel 100ml PBS-ben, majd az oldatot 4C°-on hűtőben tároljuk. A szacharózt (15m/V%), és zselatint (7,5m/V%) tartalmazó PBS puffert pedig -20C°-on fagyasztva tároljuk. A zselatin felolvasztásánál, és beágyazás előtti újramelegítésénél ügyelünk arra, hogy ne kerüljön a puffer hőmérséklete 60 C° felé, ami a későbbiekben fagyasztott blokk készítéséhez alkalmatlanná tenné a puffert.

Pufferelt 4%-os paraformaldehid (pH=7,4): 700ml desztillált vizet lombikban 60C°-ra melegítjük fel. 40g paraformaldehidet adunk hozzá és mágneses keverőre helyezük. A keletkezett csapadékot cseppenként hozzáadott 20%-os (0,5M) NaOH-dal feloldjuk. Az oldatot megsűrjük, majd 250ml 0,24M PBS-t adunk hozzá. Még mindig mágneses keverőn beállítjuk a pH-t, majd az oldatot átöntve 1000ml-es mérőhengerbe, a térfogatát desztillált vízzel kiegészítjük 1000ml-re. Végül 15ml csövekbe szétosztva -20C°-on tároljuk.

### **2.3 Metszetek készítése**

A metszésre Shandon gyártmányú kriotomot használtunk, a zselatinos blokkokat -24C°-os, munkahőmérsékleten metszettem. A blokkokat metszés előtt a kriosztátba helyeztem, hogy felvegye annak hőmérsékletét. A mintákból 11-13 µm vastag metszeteket készítettem, amelyet poly-L-lysine-nel (Sigma, P8920) bevont tárgylemezre vettem fel. Az így elkészült metszeteket felhasználásig -20 C°-on tékába rendezve tároltam.

## **2.4 Immunhisztokémia és immunfluoreszcencia**

### **2.4.1 Immuncitokémia**

Az immunhisztokémiai vizsgálatokat fagyasztott metszeteken végeztem az alábbi protokoll szerint:

A metszeteket PBS-ben 10 percig rehidratáltam szobahőmérsékleten (a zselatinos metszeteket először a zselatin kioldása érdekében, előre felmelegített PBS-be helyeztem kb 10 másodpercre, ezután szobahőmérsékletű PBS-be átrakva rehidratáltam őket). Ezt követően rámértem a metszetekre a primer ellenanyagot [1.táblázat] (50-80 $\mu$ l/metszet), ami vagy egy a laborunkban felszaporított sejttenyészetnek a monoklonális ellenanyagot tartalmazó hígított ill. hígítatlan felülúszója, vagy előzetesen betitrált hígítású ellenanyagoldat volt (a szükséges hígításokat 1%-os BSA-t és Na- azidot tartalmazó PBS-ben -PBS-BSA- végeztük). A primer ellenanyaggal lefedett metszeteket 45 percig, szobahőmérsékleten, nedves kamrában inkubáltam. Ezt mosás követte PBS-ben (3x5 perc). Ha többféle primer antitestet alkalmaztam, az első 5 perces mosást egy gyors PBS-es öblítés előzte meg az antitest-oldatok esetleges keveredése elkerülése végett.

Szekunder ellenanyagként biotinnal konjugált lóban termeltetett anti-egér , illetve anti-nyúl IgG-t használtam (Vector Laboratories, BA-2000; PBS-BSA-ban feloldva 1:200-as, illetve 1:100 hígításban alkalmaztuk), amellyel további 45 percig inkubáltam szobahőmérsékleten és nedves kamrában. Újabb mosás PBS-ben (3x5 perc). A szöveti endogén peroxidázok aktivitásának blokkolása érdekében a metszeteket PBS-el 3%-ra hígított H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ba (Sigma-Aldrich, H1009) helyeztem 10 percre, majd ezt mosás követte PBS-ben (3x5 perc). A mosás után ABC komplexet (avidin-biotin-peroxidáz komplex, Vectaststain Elite PK-6100; Vector Laboratories) vittem fel a metszetekre és fél órát inkubáltam így őket. Az ABC oldatot a cég által megadott hígításban készítettem el (1:100 arányban, PBS-ben), PBS-be kimértem az avidin-, majd a biotinilált peroxidázt tartalmazó oldat megfelelő mennyiségét, alaposan felkevertem, majd fél óra állás után használtam fel. Mosás PBS-ben (3x5 perc). A kötődött peroxidáz enzim aktivitását 4-chloro-1-naftollal detektáltam (Sigma; C8890). A kloronaftolt előzetesen kimértem és PBS-be vittem (100 $\mu$ l 4-chloro-1-naftol törzsoldat 100ml PBS-ben oldva), majd 300 $\mu$ l 3%-os H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ot adtam hozzá, amelyet sötétben mágneses keverőn legalább fél órát kevertettem. Felhasználás előtt szűrőpapíron átszűrtem. A metszeteket ebben az oldatban 30 percig sötétben inkubáltam . Mosás PBS-ben (3x5 perc).



Végül vízdékony fedőanyaggal (Poly-Aqua Polyscience Inc., Warrington PA, USA; 18606) fedtem le a metszeteket és ezután 4C°-on hűtőben tároltam.

## **2.4.2 Immunfluoreszcencia**

### *2.4.2.1 Egyszeres immunfluoreszcens festés*

A metszetek előkészítését, primer ellenanyaggal való inkubálását az immunhisztokémiai fejezetben leírtakkal azonos módon végeztem. Ezt követően szekunder ellenanyagot (50-80µl/ metszet) mértem a metszetekre. Ez lehetett közvetlenül konjugáltatva fluorokrómmal, kecskében termeltetett anti-egér Alexa-Fluor 594 IgG (Invitrogen, Molecular Probes Alexa 594 IgG; hígítva 1:100 PBS-ben), vagy csak biotinnal konjugáltatott anti-egér IgG (hígítva PBS-BSA-ban 1:200). Az inkubálást mindkét esetben 45 percig, szobahőmérsékleten, nedves kamrában végeztem, illetve a fluorokrómmal konjugáltatott szekunder ellenanyag fényérzékenységére való tekintettel az inkubáció fénytől védett helyen történt. A biotinilált szekunder ellenanyagok bekötődésének detektálására streptavidinnel konjugált fluorókrómot (Invitrogen, Molecular Probes Streptavidin Alexa-Fluor 594 cat.No.: S11227 ) alkalmaztam 1:100 PBS-ben hígítva, mely ismételt 45 perces, fénytől védett inkubálást igényelt. Az inkubálások között ill. után PBS-sel mostam a metszeteket (3x5 perc).

A sejtmagok kimutatására DAPI (4,6 diamino-2-phenylindole, dihydrochloride, Invitrogen, D1306) reagenst használtam, PBS-ben hígítva 1µg/ml arányban. Ezt 10 percig hagytam a metszeteken, majd mosás következett PBS-ben (3x5 perc), lefedés és tárolás (sötétben, 4C°-on).

### *2.4.2.2 Kettős immunfluoreszcens festés*

A kettős immunfestés első lépésében a metszetekre rémértem az első primer ellenanyagot (CD45), melyet a fentiekben említett körülményekkel azonos módon 45 percig inkubáltam. A mosást követően (PBS) közvetlenül fluorokrómmal jelölt szekunder ellenanyagot (kecskében termeltetett anti-egér Alexa-594 IgG, vagy anti-egér Alexa-488 IgG1, vagy anti-egér Alexa-594 IgG2a) vittem fel a metszetre, mely a primer ellenanyagnak megfelelő izotípus specifikus volt . Munkafolyamat további lépéseit a fluorokróm fényérzékenysége miatt fénytől védetten végeztem. 45 perces, nedves kamrában történő inkubálás után mostam PBS-ben (3x5 perc). Ezután a metszetre rámértem a második primer

ellenanyagot (MHCII, LEP100, QH1, PH3), szintén 45 percig inkubáltam, majd mostam PBS-ben (3x5 perc). A második szekunder ellenanyagot (mely a második primer ellenanyaghoz faj specifikus volt) úgy választottam meg, hogy a vele konjugált fluorokróm színe eltérjen az előzőleg használt szekunder ellenanyag színétől (így kecskében termeltetett anti-nyúl Alexa-488 IgG-t használtam). A metszetekre való pipettázását követően 45 perces inkubáció követte. A sejtmagok kimutatására itt is DAPI-t használtam, amit 10 percig adtam a metszetekhez. A mosás után (PBS) a tárgylemezeket vízdékony lefedőanyaggal fedtem le, majd hűtőben 4C°-on tároltam.

## **2.5 Hematoxin-Eozin (HE) festés**

Az embryokból készített fagyasztott metszeteken való tájékozódáson gyakran hematoxin-eozin (HE) festést is használtunk. Mindkét festék igen állandó, az általuk megfestett metszetek évtizedek után is vizsgálhatóak.

A festés lépései:

1. Rehidráció után (a zselatin eltávolítása céljából meleg PBS-ben) a metszeteket timsós hematoxin oldatban festjük 5 percig
2. Öblítés desztillált vízben
3. Kékítés csapvízben 5 percig
4. Öblítés desztillált vízben.
5. Festés 1 percig 0,5%-os vizes eozin-oldattal, amelynek 100 ml-éhez 1 csepp 2%-os ecetsavat adunk.
6. Öblítés izopropil-alkoholban
7. Víztelenítés és derítés izopropil-alkohol - xilol sorozatban.
8. Lefedés kanadabalzsammal és fedőlemezzel.

## 2.6 Az immunfestés során alkalmazott primer ellenanyagok

| <b>Primer antitest</b>            | <b>Antigén specifitás</b>                             | <b>Felismert sejttípusok</b>                                   | <b>Beszerzés forrása /Forgalmazó</b>                  | <b>Izotípus</b> |
|-----------------------------------|---|--|---|-----------------|
| <b>HIS-C7</b>                     | csirke CD45   | minden csirke leukocytá  | CEDI-Diagnostics                                      | IgG2a egér      |
| <b>QH1</b>                        | $\alpha$ -macroglobulin                               | minden fürj hemopoeticus és endothel sejt, kivéve erythrocyták | Thierry Jaffredo (Paris, Franciaország) szívességéből | IgG1 egér       |
| <b>TAP 1</b>                      | MHC II  | Minden antigén prezentáló sejt                                 | DSHB  | IgG1 egér       |
| <b>B7H6</b>                       | Bu-1a + Bu-1b   | B-sejtek ( és macrophagok egy alcsoportja)                     | saját laboratóriumunkban előállított antitest         | IgG1 egér       |
| <b>Lep100</b>                     | Lamp1 (lysosome associated membrane protein 1) CD107a | Makrofágok   | DSHB  | IgG1 egér       |
| <b>GRL2</b>                       | highly N-glycosylated protein                         | Granulocyták, aktivált T-sejtek,                               | DSHB  | IgG1 egér       |
| <b>Anti-CD3</b>                   | CD3 felszíni antigén (T-sejt receptor, TCR)           | T-sejtek   | DAKO  | IgG nyúl        |
| <b>Phospho-histone H3 (SER10)</b> | foszforilált H3 hisztonfehérje                        | Minden már S fázis belépett, éppen osztódó sejt                | Cell Signaling  | IgG nyúl        |
| <b>8F3</b>                        | Citoplazmatikus csirke sejtmarker                     | Valamennyi csirke sejt   | DSHB  | IgG1 egér       |
| <b>QCPN</b>                       | Fürj sejtmag marker                                   | Valamennyi fürj sejt   | DSHB  | IgG1 egér       |

**1. táblázat: Primer antitestek**

## **2.7. Immunelektronmikroszkópia**

A szövetmintákat, 0,1%-os pufferolt glutáraldehidben fixáltuk egy éjszakán keresztül 4C°-on. PBS mosást követően a mintákon CD45 festést végeztünk. Ennek menete megegyezett a fentebb leírtakkal (4.1), annyi különbséggel, hogy az inkubációs lépések hosszabbak voltak (4-5 óra). A primer ellenanyag kötődését 3,3' -diamino benzidin segítségével tettük láthatóvá. Az immunhisztokémiát követően 3 órát utófixáltunk 1%-os ozmium tetroxid-dal. Az etanolos dehidrációt követően a mintákat Polybed/Araldite 6500 keverékbe ágyaztuk be. Az 1 µm vastag félvékony metszeteket toluidin kézzel festettük meg. Az elektronmikroszkópiára az ultra-vékony metszeteket uranil-acetáttal, és ólom-citráttal tettük kontrasztossá. A preparátumokat Hitachi H-7600 típusú elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

## **2.8 Metszetek értékelése, fényképezése, képfeldolgozás**

A metszeteket Zeiss Axiophot mikroszkóppal tekintetem át, és a hozzácsatlakoztatott Zeiss AxioCam HCR kamera segítségével digitális képeket készítettem különböző nagyításokon. (Konfokális lézermikroszkópiát BioRad Radiance 201 Rainbow LCM típusú mikroszkóppal végeztem). A képek további feldolgozása, szerkesztését Adobe Photoshop CS 7.01 típusú programmal végeztem.

## **2.9 Embryomanipuláció**

### **2.9.1 Csirke – fürj parabiózis**

A csirke - fürj parabiózis technika alkalmas arra, hogy meghatározzuk a keringésben lévő kerek CD45+ sejtek, milyen fejlődési képességgel rendelkeznek; azaz származhatnak-e az embryo mesenchymájában található, csillag alakú CD45+ sejtek, a keringés vérképző sejtjeiből. A kísérlet során, 24 órát inkubált csirke tojásokból először a léghólyag fölötti héjon ütött apró lyukon fecskendővel 8 ml albumint leszívunk, és a lefektetett tojás oldalán egy 3 cm-es ovális lyukat vágunk. Ezután a csirke embryopajzsot úgy orientáltuk, hogy az minnél nagyobb felületen érintkezzen a fürjtojásból mellé öntött fürj embryopajzssal. A kísérlet

közben fontos, hogy ne sérüljenek az embryok telepei. Ezután az antibiotikus PBS oldattal megcsepegtetett embryokat, és a tojást lezárjuk átlátszó ragasztószalaggal (természetesen figyelve arra, hogy annak belső felszíne ne hogy érintkezzen a kezünkkel, vagy más nem steril felülettel), és 38C<sup>o</sup>-on inkubáljuk őket a laboratóriumunk keltetőgépében.

### **2.9.2 Szikhólyag in ovo tenyésztése**

A szikhólyag vérszigeteiben megjelenő CD45+ sejtek differenciálódási képességének meghatározására olyan tenyésztési technikát alkalmaztunk, melynek során az embryot eltávolítottuk annak extraembryonális részeitől, és a visszamaradt szikhólyagot a tojásban tovább tenyésztettük. A kísérlet során egy Narishige márkájú mikroinjektorhoz rögzített 100µl-es Hamilton fecskendő segítségével, egy vékony üvegapillárison át, a 2 napos embryok szívcsövébe (a felszíni chorion, illetve pericardium lemez eltávolítása után) néhány mikroliter 0,1%-os Fast Green nevű vitális festék PBS oldatát injektáltuk.

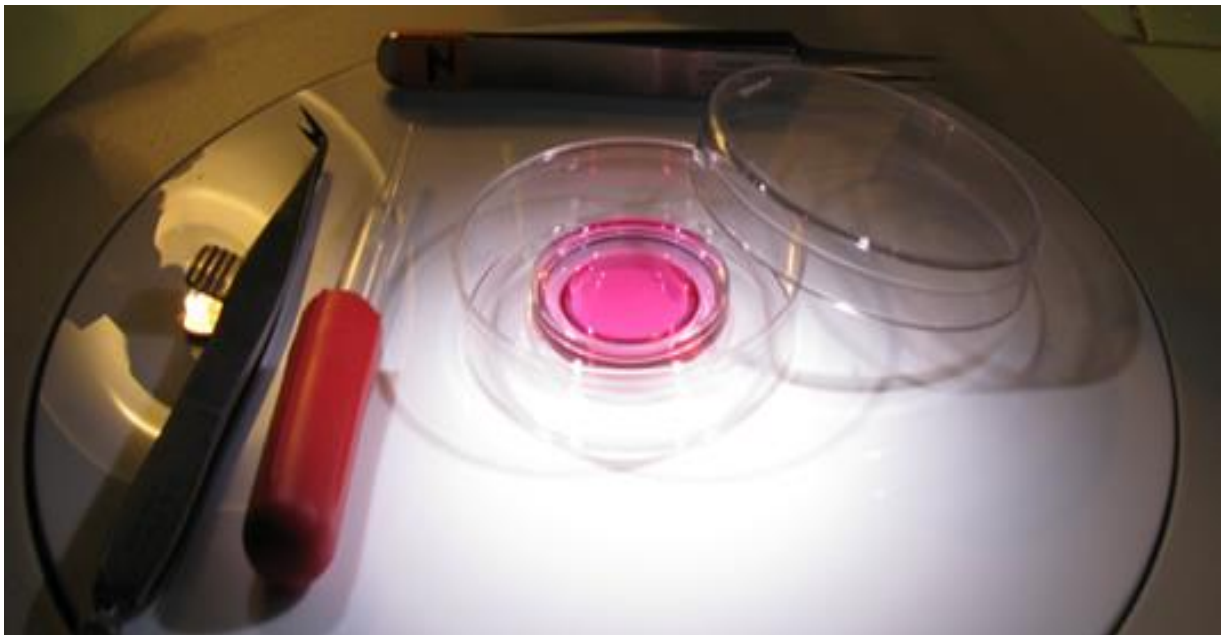
A perfundálás után megfigyeltük, hogy a 2 napos embryok HH12 stádiuma előtt még nem létesült kapcsolat az embryo véredényei és a szikhólyag vérszigetei között, így ezt a stádiumot választottuk az extraembryonális vérképzés kísérletes különválasztásának tanulmányozására. Ezután a felszíni chorion eltávolítása után az embryopajzsból, egy szemészetben használt speciális iridectomiás ollóval kivágtuk a HH12 stádiumú embryot úgy, hogy a vágást követően a szikhólyag lemezének két vágott szélé összetapadt. Az így létrejött embryo nélküli szikhólyag tenyészeteket a tojásban 38C<sup>o</sup>-on, 48 óráig illetve néhány esetben 5 napig inkubáltuk tovább.

### **2.9.3 Embryotenyésztés**

Az extraembryonális részeitől elválasztott két napos (HH12 stádiumú, 13 szomitás), embryokat 48 órát tenyésztettük még egy kollagén mátrix alapú szervtenyésztésben. A tenyésztést Falcon 353037 Center-Well Organ Culture Dish márkájú tenyésztőedényben folytattuk, melynek belső körébe kollagén mátrixot, külső körébe pedig penicillines - streptomycines PBS oldatot töltöttünk. Az embryokat a belső kör kollagén mátrixának két rétege közé rögzítettük.

*A kollagén mátrix elkészítésének lépései:*

1. Eppendorfbba: 700  $\mu$ l DMEM (tenyésztő közeg), 6  $\mu$ l 1N NaOH, 294  $\mu$ l kollagén (rat tail 3,38%); /Kevergetve (szívogatással pipettával, hidegen!)/
2. Petri belső körébe bemérni 350 – 400  $\mu$ l –t a gélből
3. 5 perc szobahőn, majd 5 – 10 perc inkubátorban (a polimerizálódáshoz)
4. Preparátum(ok) elhelyezése a gél felszínén
5. 10 perc inkubátorban
6. Frissen készített gélből 350 – 400  $\mu$ l rámerése a preparátumokra (ne ússzon fel!)
7. Inkubáció (kívánt időtartamra /2-3 nap/)



**3. kép:** *Falcon típusú tenyésztőedény*

## Célkitűzés

Madár embryokon végzett vizsgálatok mutatták meg először, hogy a magasabb rendű gerincesekben, így a humán embryóban is, a vérképzés definitív őssejtjei a dorzális aorta területén alakulnak ki és az itt fejlődő CD45+ progenitorok később az összes vérsejtvonal létrehozására képesek. Habár a vérsejtek differenciálódására számos molekuláris biológiai adat áll rendelkezésünkre, az embryóban zajló korai vérképzés immunmorfológiai karakterizálása csak részben ismert.

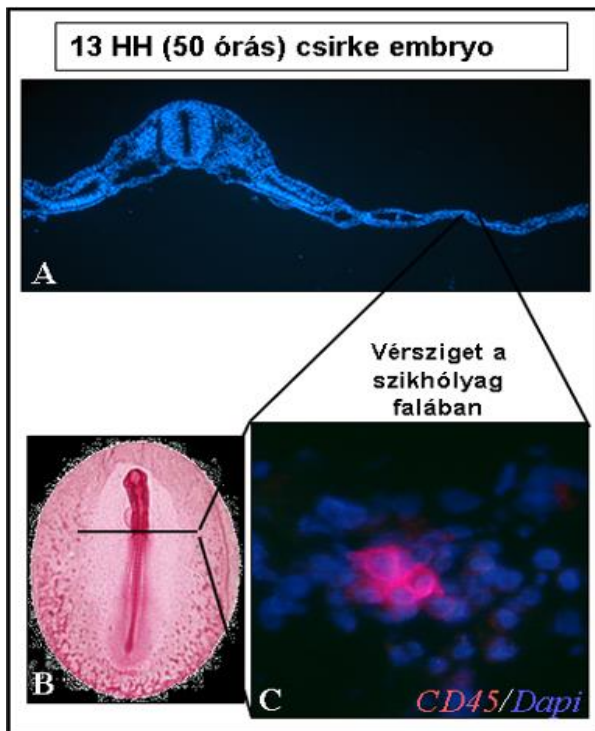
1. Szakdolgozati munkám célja volt immuncytokémiai módszerekkel tanulmányozni az embryonális vérképzés korai szakaszait, nyomon követni az első CD45+ vérképző őssejtek megjelenését és differenciálódást.
2. Meghatározni, hogy milyen fejlődésbiológiai kapcsolat van a kerek és csillag alakú, nyúlványos CD45+ sejtpopulációk között.

# Eredmények

## 4.1 Hemopoietikus sejtek karakterizálása a csirke embryo korai fejlődése során

### 4.1.1 Az első CD45+ sejtek megjelenése a szikhólyagban és az embryóban

Csirke embryóban a CD45 felszíni antigént felismerő ellenanyag tekinthető a hemopoietikus sejtek azonosítására készült legkorábbi markernek. Munkám során ezt a markert használtam a korai vérképző őssejtek embryonális fejlődés alatt történő azonosítására. Az első embryonális kor, ahol CD45+ sejteket találunk az 50 órás (HH13) embryo. Ebben a stádiumban (HH12 – 13) veszi kezdetét a szikhólyag és az embryo keringési rendszerének összekapcsolódása (Sheng, 2010). Adataink szerint már 24 órával az intraembryonális vérképzés megjelenése előtt is kimutatható a CD45+ sejtek jelenléte. Metszeteinken a CD45+ sejtek mind kerek morfológiát mutattak, s csak a szikhólyag vérszigeteiben lokalizálódtak (4. kép). Megjegyzem, hogy az irodalmi adatok szerint CD45 expressziót csak a 3. embryonális napon (HH18) írtak le eddig (Jaffredo és mtsai. 1998). Ilyenkor a vérszigetekben főleg erythroid alakokat találunk (az erythrocyták CD45 antigént nem fejeznek ki). Kisebb csoportokat alkotva a CD45+ hemopoietikus sejtek az area vasculosa (a szikhólyag vérszigeteket képző régiója) laterális szélén mindenhol előfordulnak (4. kép: C)



**4. kép:** CD 45+ sejtek megjelenése az 50 órás embryóban.

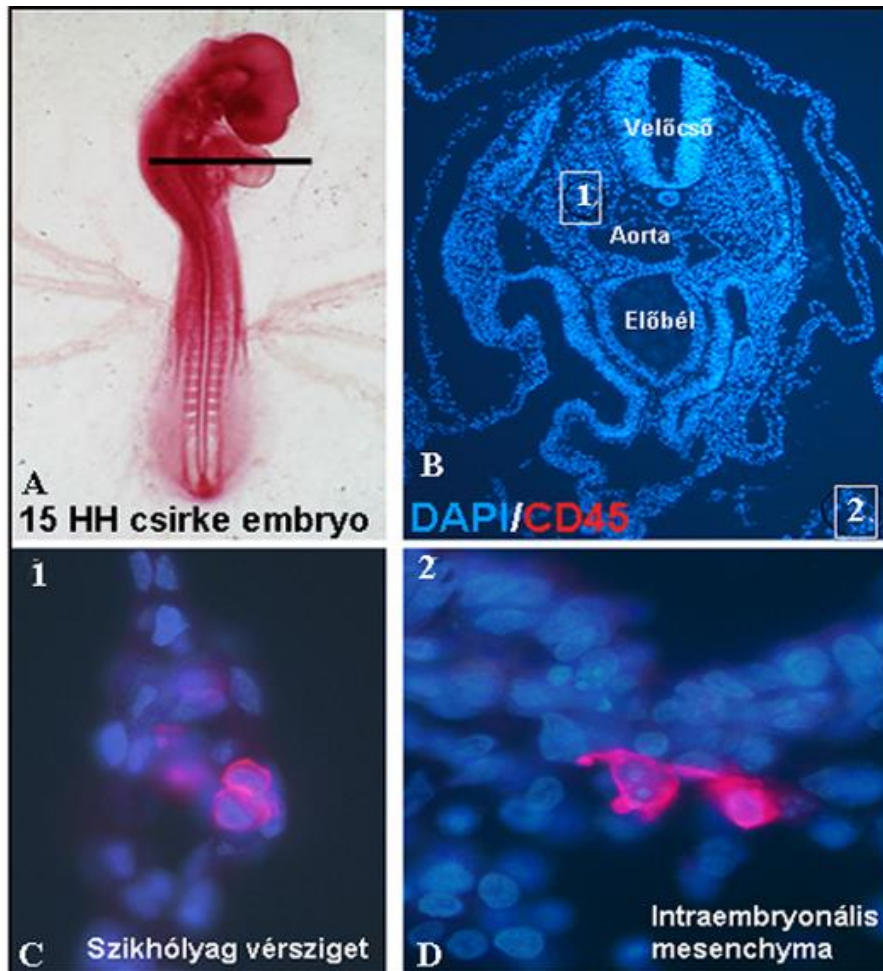
(A): (keresztmetszet) a sejtmagokat a képen DAPI nevű festék jelöli.

(B): A HH13 embryo átnézeti képe. Vérszigetek az area vasculosa területén képződnek.

(C): CD45+ sejtek a vérszigetek lumenében. A kerek morfológiát mutató CD45+ sejtek piros



Az embryonális fejlődés folyamán, a következő általunk vizsgált stádium az 56 órás (HH15) embryo volt. Ennek az *in vivo* képe, és metszete látszik az 5. képen. A HH15 stádiumú embryo már 28 szomitával rendelkezik, megjelenik a harmadik kopolyúív, de még nem vette kezdetét az intraembryonális vérképzés, az intraaortikus redők még nem fejlődtek ki. Az embryo metszete a már meggyömbült szívcső magasságában készült. Látható a dorsalis aorta, a velőcső, az előbél; illetve az amnion és a chorion lemezei is, mint extraembryonális területek (5. kép). A 15 HH stádiumban készült immunfluoreszens festések azt mutatták, hogy a vérszigetekhez kötött, kerek CD45+ sejtek mellett megjelenik egy ettől eltérő morfológiájú, nyúlványos, csillag alakú CD45+ sejthalak is. (5. kép). A nyúlványos CD45+ sejtek kis számban az intraembryonális mesenchymában fordulnak elő.

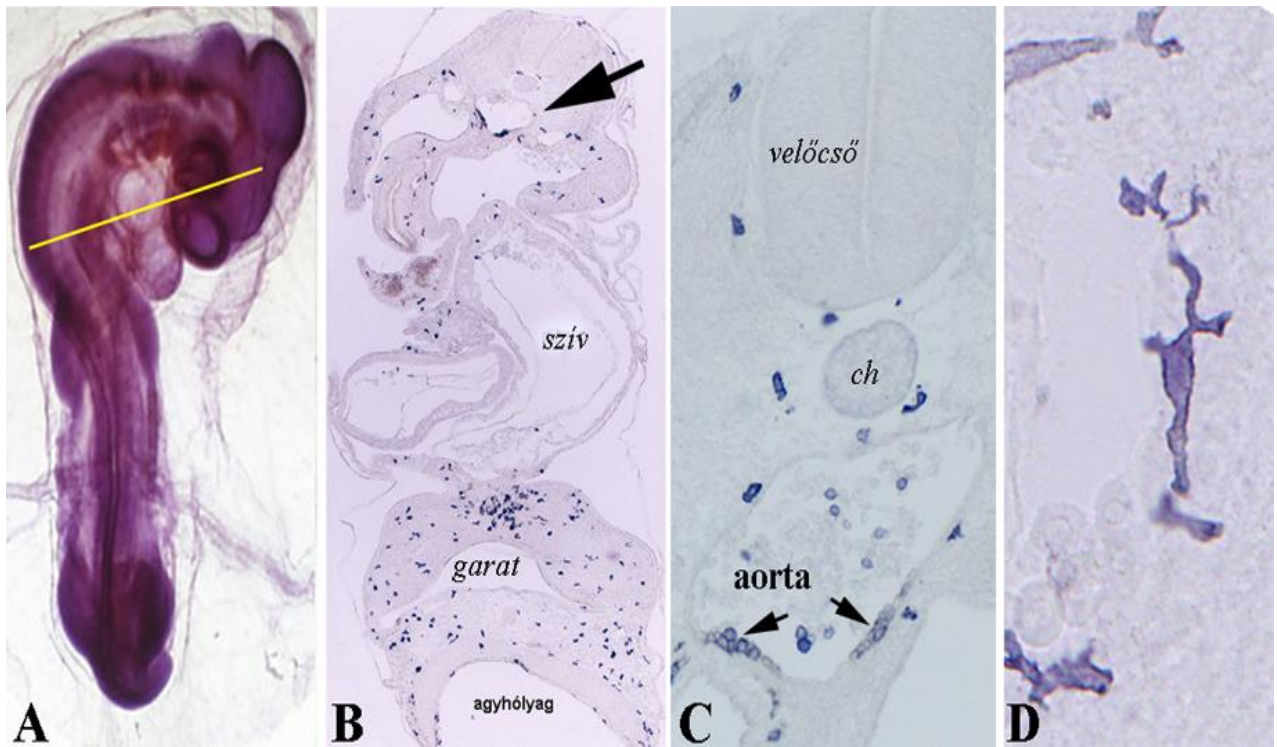


**5. kép:** CD45+ sejtek eloszlása a HH15 stádiumú embryóban.

(A, B): Az embryo metszete a szívcső magasságában készült.

(C, D): Kerek, és nyúlványos CD45+ sejtek a vérszigetekben, illetve az intraembryonális mesenchymában.

A 72 órás embryóban (HH18) jelenik meg az definitív vérképzés első állomása a madár embryóban az aorta ventro – lateralis falán képződő ún.: aortaredők kialakulásával (Jaffredo és mtsai, 1998). Az ilyenkor már 30 – 35 szomitával rendelkező embryóban megfigyelhetőek végtagbimbók, s kezdetét veszi az allantois fejlődése is. (6. kép: A). Az immuncitokémiával festett metszeteken látható a CD45+ sejtek eloszlása az embryóban (6. kép: B, C). Megfigyelhető a 15HH stádiumnál 12 órával idősebb embryo metszetein, hogy a kerek CD45+ sejtek a keringésben, és az intraaortikus redőkben lokalizálódnak (6. kép: B, C) míg a nyúlványos CD45+ sejtek elárasszák az egész embryonális mesenchymát (6. kép: B, D). A mesenchymális CD45+ sejtek eloszlása azt mutatja, hogy ebben a stádiumban a fej és nyak régióban fordulnak elő nagy számban a nyúlványos CD45+ sejtek (6. kép: B).



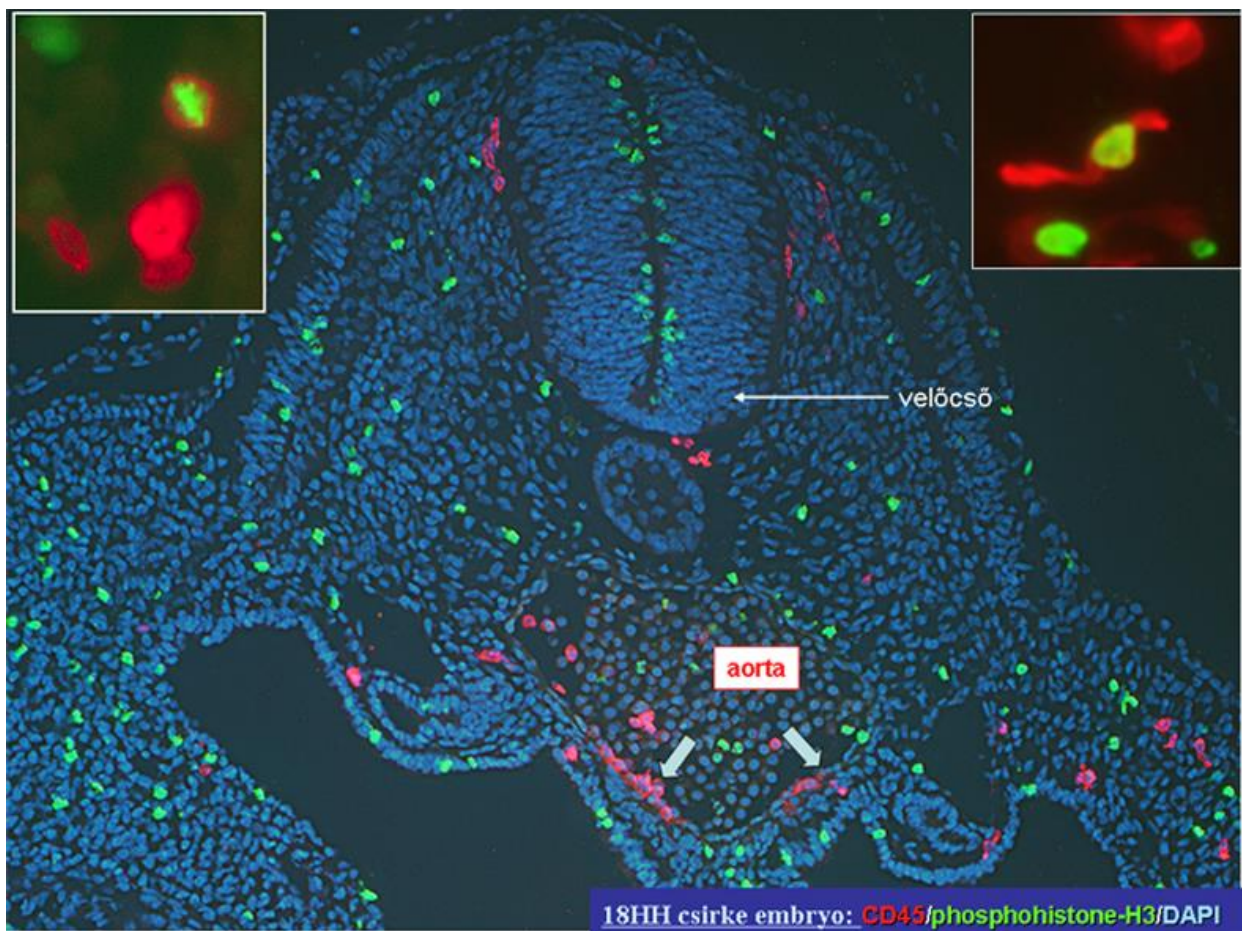
**6. kép:** CD45+ sejtek eloszlása 3 napos (18HH) csirke embryóban.

(A, B): Az embryo metszete a szív magasságában készült (A kép sárga vonal), ahol a fekete nyíl az aortát jelöli, benne az intraaortikus redők CD45+ hemopoietikus sejtcsoportjai.

(B, C). Az intraembryonális mesenchymában láthatóan nagyszámú CD45+ nyúlványos sejt van, melyekről közeli kép is látható (D).

(D): A mesenchymális CD45+ sejtek többsége jól fejlett nyúlványokkal rendelkezik.

A 3 napos (HH18) csirke embryo immuncitokémiai jellemzése során megvizsgáltuk a kerek, és nyúlványos alakú CD45+ sejtek proliferációs képességét is. Ehhez egy Phosphohistone H3 (SER10) molekulát felismerő poliklonális antitestet használtunk, mely a foszforilált H3 hisztonfehérjét, mint a proliferáció S fázisában expresszálódó molekulát jelöli. A 7. képen látható kettős immunfluoreszcenciával készült HH18 stádiumú embryo metszetén piros színnel láthatóak a CD45+ sejtek, melyek között mind a kerek, mind a nyúlványos sejtekben kimutatható a proliferáció.



**7. kép** A három napos (18HH) embryo CD45/Phosphohistone H3 festése. A metszeten a 18 HH stádiumú csirke embryo Phosphohistone H3 (zöld), és CD45 (piros) kettős immunfluoreszcens festése látható. Kék színnel a DAPI nevű festék jelöli a sejtmagokat. Az osztódó sejteket a sejtmagban lokalizált phosphohistone H3 immunpozitivitása mutatja. Osztódó alakok kis számban, de mind a kerek, mind a nyúlványos CD45+ sejtek között is előfordulnak (jobb, és bal felső sarokba illesztett képek).

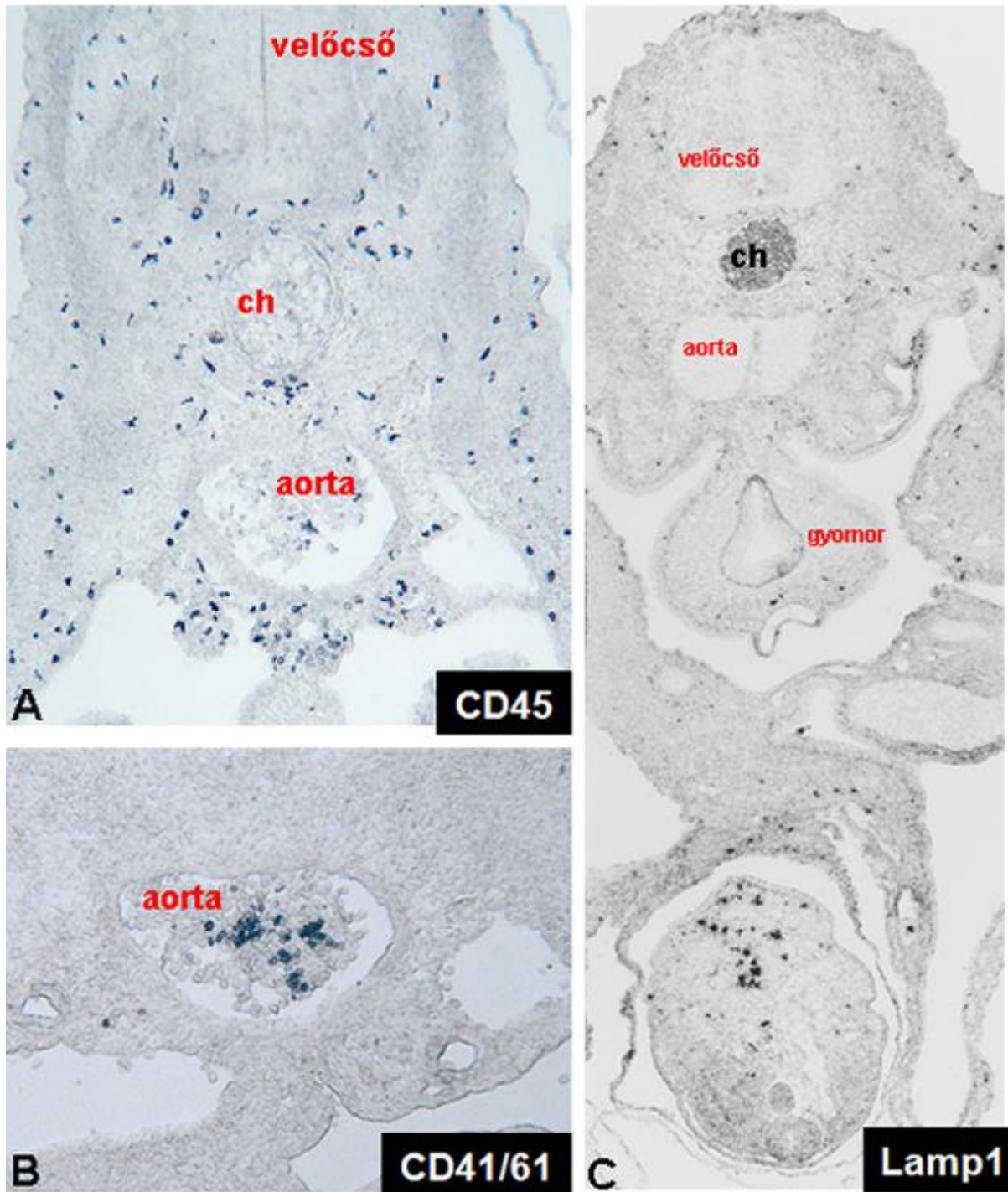


#### 4.1.2 CD45+ hemopoietikus sejtek differenciálódása a 4-10 napos csirke embryóban

A negyedik embryonális napon (HH23) fejeződik be csirkében a szomitogenezis; ekkora veszi fel az embryo az agyhólyagoktól a farokig tartó jellegzetes, domború, C – alakú dorsalis kontúráját. A harmadik nap végére alakul ki az extra és intraembryonális szöveteket összekötő függelék, az allantois, megjelenik a negyedik kopoltyúív.

A negyedik embryonális nap után el kezdenek visszahúzódni, majd eltűnni, az addig definitív vérképzés központjának számító ventrolateralis CD45+ aortaredők. A keringésben ezzel párhuzamosan nagy számban fedezhetőek fel a kerek morfológiájú CD45+ hemopoietikus sejtek. (8. kép: A). A nyúlványos CD45+ sejtpopuláció viszont számarányaiban robbanásszerű növekedésbe kezd, és a négy napos embryo mesenchymáját eláraszák a nyúlványos CD45+ sejtek. (8. kép: A).

Ebben a stádiumban jelennek meg először az immuncitokémiailag kimutatható molekulák a CD45+ sejteken. Így a keringésben (pontosabban az aorta lumenében), megjelennek a CD41/61 antigént expresszáló kerek thrombocytoid előalakok (8. kép: B); illetve a mesenchymában az ún.: Lysosome – associated membrane protein 1 (LAMP1) citoplazmatikus antigént hordozó amőboid morfológiájú, makrofág prekurzorok is. A LAMP1+ makrofágok nagyobb számban a farokbimbó mesenchymájában fordulnak elő.



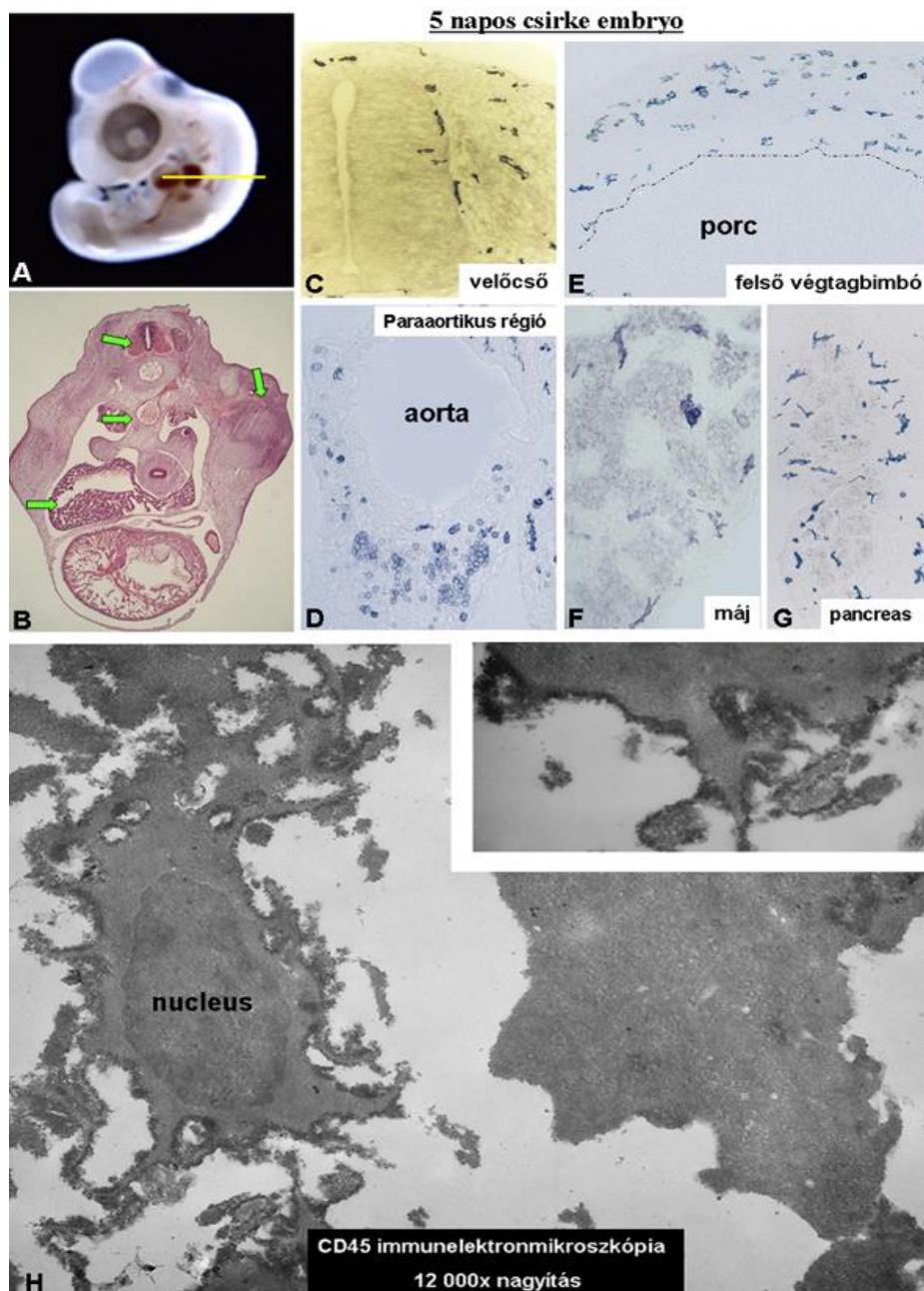
**8. kép:** Keresztmetszet a 4 napos embryo thoracalis régiójából

(A): CD45+ nyúlványos sejtek intraembryonális eloszlása.

(B): CD41/61+ thrombocyta prekurzorok lokalizációja az embryóban.

(C): LAMP1+ makrofágok, a mesenchymában.

Az 5 napos embryóban (HH26) (9 kép: A), a korábbi intraaortikus redők hemopoietikus sejtjei kilépve a ventralis mesenteriumba létrehozzák az ún.: paraaortikus régiót, mely a madár embryo definitív vérképzésének a következő központja. (*Dieterlen – Lièvre és Martin, 1981*). (9. kép: D). Amíg az 5 napos csirke embryóban a kerek morfológiájú CD45+ sejtek lokalizációja erre a területre, és a keringésre korlátozódik, addig a nyúlványos CD45+ sejtek megtalálhatóak a mesenchymán kívül gyakorlatilag az összes embryonális szervekben. Fellelhetőek az idegrendszer telepében (9. kép: C), (velőcső, és agyhólyagok fala is); a végtagbimbók mesenchymájában (9. kép: E); a máj, és a pancreas parenchymájában (9. kép: F, G). Ezen felül nagy számban vannak jelen a gonádok, a vese előtelepében; megtalálhatóak a szív, és a tüdő szöveteiben is (nincs kép). Ezek a sejtek mind kifejezetten nyúlványos morfológiát mutatnak. A CD45+ sejtek elektronmikroszkópos szintű vizsgálatával kimutattuk, hogy a CD45+ nyúlványos sejt, és a szintén nyúlványos mesenchyma sejtek között nem csak felszíni molekulák tekintetében, immunológiai karakterizációjában van különbség, hanem fenotípusosan is, egy eltérő sejtpopulációt jelent (9. kép: H).



**9. kép** CD45+ sejtek eloszlása az 5 napos csirke embryóban, és különböző szervtelepeiben

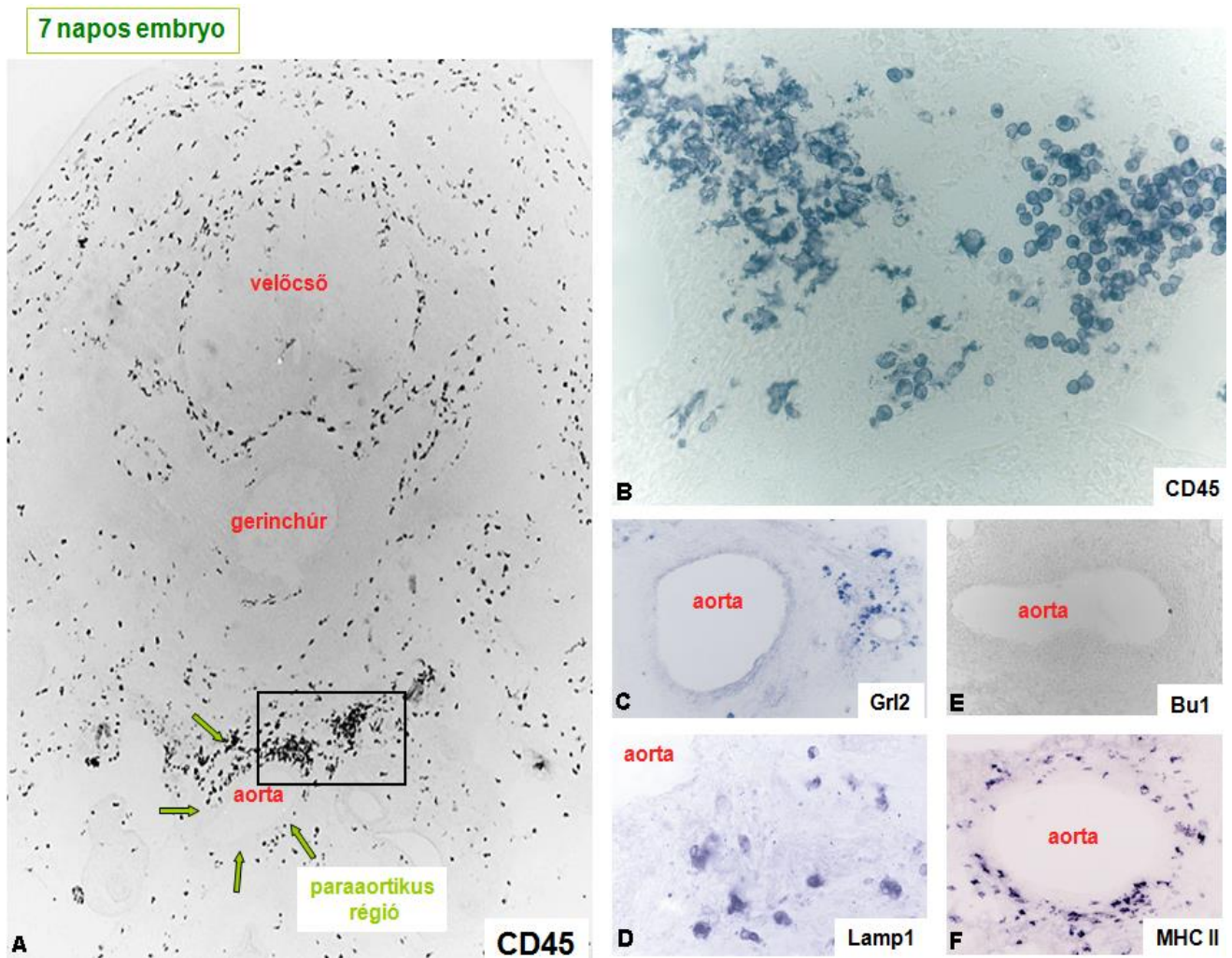
(A): 5 napos csirke embryo sztereomikroszkópos felvétele. (B): Az embryo szívmagasságú metszetének (A kép, vonal) hematoxilin - eozin festése (a nyilak az aorta, a máj, a velőcső, és a felső végtagbimbó telepeit mutatják). (C): CD45+ sejtek a velőcső felszínén és a neuroepithel sejtek között (D): Kerek CD45+ sejtek az aorta alatti mesenchymában csoportosulva a paraaortikus régiót képezik. Itt csak kerek CD45+ sejteket találunk. (E, F, G): Nyúlványos CD45+ sejtek a szervek parenchymájában. (F): A májban a CD45+ sejtek a hepatocyták közötti térben lokalizálódtak. A H kép a nyúlványos CD45+ sejteket, és mesenchymális sejtek közötti ultrastrukturális különbséget mutatja. Az immunoelektronmikroszkópiával készült metszeten feketével jelöli az elektrondenz csapadék a sejtmembrán CD45 pozitivitását.

A 7 napos csirke embryóban, még mindig hatalmas számú nyúlványos morfológiájú hemopoiitikus sejt látható, melyek közül egyre több sejtcsoport kezd a CD45 mellett valamilyen más hemopoiitikus markert is expresszálni. (10. kép). Az A képen a hét napos csirke embryo metszetén még jól látható az ebben a stádiumban jelen lévő legfontosabb definitív vérképző hely, a paraaortikus régió (10. kép: A). A CD45+ sejtcsoportok kerek morfológiát mutatnak, és láthatóan elkülönülnek a nyúlványos, vagy amőboid, makrofág-szerű struktúrát mutató CD45+ sejtcsoportoktól (10. kép: B). A hetedik napra megjelennek az ún.: highly N – glycolisated protein antigént hordozó, GRL2 antitestre pozitív granulocytá előalakok, illetve egyre nagyobb számú sejt expresszálna a makrofágokra jellemző LAMP1 antigént is. Mindkét utóbbi sejttalok amőboid morfológiát mutat (10. kép: C, D). A hat napos stádiumban sikerül először azonosítani differenciálódott lymphocytá prekurzort. A Bu1 antigént hordozó pre – B lymphocytákból csupán egyetlen sejtet találtunk a 7 napos embryo aortájának lumenében (10. kép: E). A nyúlványos sejttalok közül az 5. nap végén jelennek meg először, de a 7. napra fordulnak elő szignifikáns arányban az MHCII molekulát expresszálnó CD45+ sejtek (10. kép: F). Ezek, az antigén prezentációra képes, nyúlványos sejttalok megtalálhatóak, mind a mesenchyma, mind a szervezdemények parenchymája területén. A CD45+ sejtek differenciálódása során szétváló lymphoid, myeloid, valamint thrombocytoid sejtvonalak számarányait és időbeni megjelenését az 2. táblázat mutatja.

|               | 3. nap | 4. nap | 5. nap | 6. nap | 9. nap |
|---------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| CD45          | +      | +      | ++     | +++    | ++++   |
| B – sejtek    | -      | -      | +      | +      | +      |
| T- sejtek     | -      | -      | -      | -      | (+)    |
| Makrofágok    | -      | +      | +      | ++     | ++     |
| Granulocyták  | -      | +      | +      | ++     | ++     |
| Thrombocyták  | -      | +      | +      | +      | +      |
| MHCII+ sejtek | -      | -      | +      | ++     | +++    |

**2. táblázat:** Hemopoiitikus sejtek differenciálódása a korai csirke embryóban

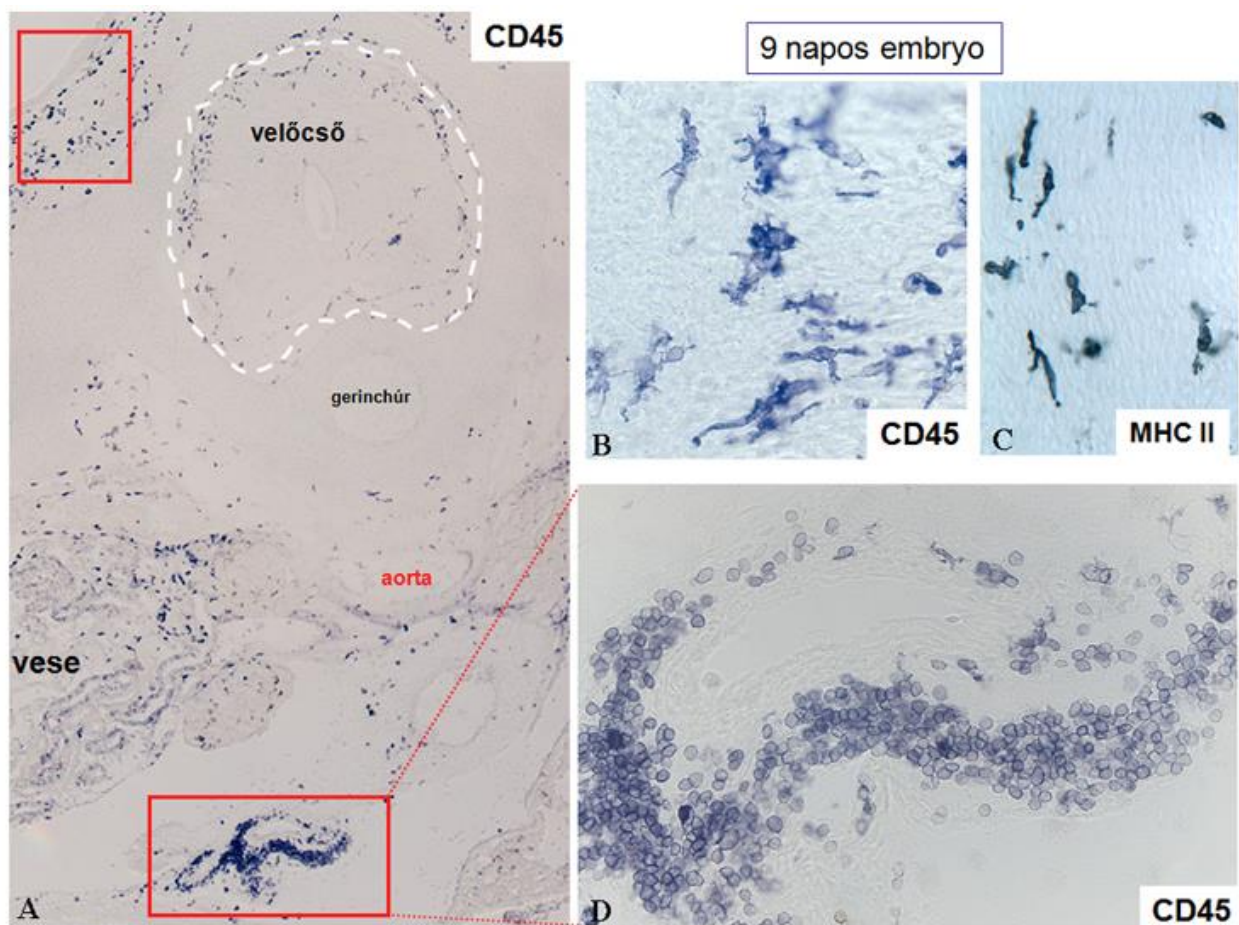




**10. kép: A hét napos csirke embryo metszete.**

(A): Az egész embryot elárasztó CD45+ nyúlványos sejtek csoportjai, illetve a paraaortikus régiót alkotó, kerek morfológiájú CD45+ hemopoietikus sejtaggregátumok. (B): Kinagyított felvétel az A kép CD45 ellenanyaggal festett embryo paraaortikus régiójából. A kerek és nyúlványos CD45+ sejtek csoportokra különülve fordulnak elő (C, D): GRL2+ és LAMP1+ granulocytá és makrofág előalakok csoportjai. (E): Bu1+ B – sejt az aorta lumenében. (F): Az aorta körüli mesenchyma nyúlványos CD45+ sejtjei egyre nagyobb arányban expresszálnak MHCII molekulát. Az F képen látható, hogy az aorta körüli mesenchyma nyúlványos CD45+ sejtjei egyre nagyobb arányban expresszálnak MHCII molekulát. Az E kép az egyetlen ebben stádiumban talált, differenciálódott lymphocytát, egy Bu1+ B-sejt előalakot mutat.

A hetedik és kilencedik embryonális nap között, a szív teljesen bezáródik a mellüregbe, kifejlődik az ötödik kopolytúív is. Megjelennek a lábujjak, és a kültakarón az első tollak kezdeményei. Ez időszak alatt veszi kezdetét a primer nyirokszervek (a thymus és a bursa Fabrici, a T, - illetve B – lymphocyták érési, differenciálódási szerveinek) kialakulása. A 10. napra kialakul a csontvelő is, mely a 11-12. naptól fogva a definitív vérképzés központjává válik, és kikelés után is hasonló szerepet fog ellátni (Sheng G. és mtsai, 2010). A 9 napos embryóban a nyúlványos morfológiájú CD45+ sejtcsoportok, az eddigi megfigyelthez hasonlóan a mesenchymában, és az embryonális szervek parenchymájában találhatóak meg (11. kép: A, B). A 6. és 8. nap között fennálló paraoartikus régió kerek CD45+ hemopoietikus sejtjei ekkora már eltűnnek, a definitív hematopoiesis központjává a lép, a bursa Fabrici, és a csontvelő fog válni. Emellett viszont megfigyeltünk egy új, kerek CD45+ sejtek által kolonizált hemopoietikus területet egy mesenterialis artéria adventitiájában, ami akár egy hemopoietikus hüvely, úgy helyezkedik el az érfalban (11. kép: A, D). Ehhez hasonló vérképző helyet gerinces embryóban még nem írtak le. A nyúlványos CD45+ sejtek egyre nagyobb arányban expresszálnak MHCII molekulát (11. kép: C).



**11. kép:** Kerek és nyúlványos CD45+ sejtek a 9 napos csirke embryóban.

Az A képen a 9 napos embryo metszete látszik a vese telepének magasságában. Látható a képen a velőcső az aorta, a testfal mesenchymája, és a ventralis mesenterium is, aminek egy artériája körül helyezkedik el a D képen látható hemopoietikus hüvely. A szervek parenchymájában, és a testfal mesenchymájában nagyszámú csillag alakú CD45+ sejtek található, melyek egyre nagyobb arányban fejdenek ki MHC II molekulát (A, B, C kép)

A 10. embryonális napon már nagyszámban jelennek meg CD45+ granulocyták, T- és B – lymphocyták, valamint makrofágok, de ezek elsősorban a primer nyirokszervek epitheliális, és a lép mesenchymális telepében fordulnak elő (nincs kép).

## **4.2 CD45+ nyúlványos sejtek ontogenezisének vizsgálata embryomanipulációs technikákkal**

### **4.2.1 Parabiózis**

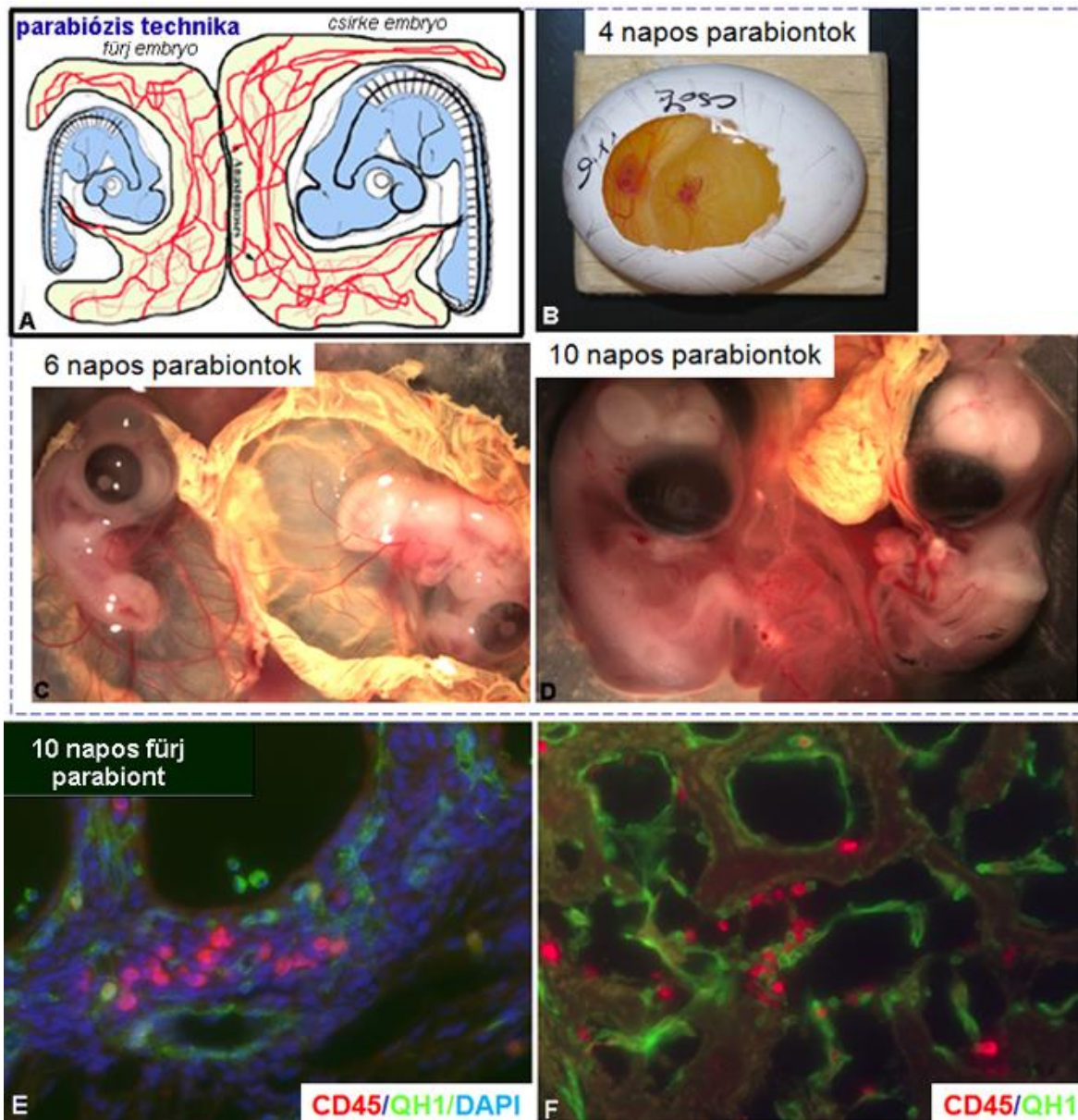
A hemopoietikus sejtek korai differenciálódásának vizsgálata után arra kerestük a választ, hogy mi a kerek és nyúlványos hemopoietikus sejtek egymáshoz való viszonya? Lehet-e a nyúlványos CD45+ sejtek precursora a kerek CD45+ sejt?

Ahhoz, hogy megállapítsuk, hogy a szöveti, nyúlványos CD45+ sejtek származhatnak – e a keringésben lévő, kerek morfológiájú CD45+ sejtektől egy csirke – fürj vérkiméra létrehozására volt szükség. Ezzel a technikával nyomon követhető, ha egy keringésben lévő csirke őssejt kilép az érfalon és a fürj embryo mesenchymájában megtelepedve differenciálódik (Nagy és mtsai. 2004, 2005). A kísérlet során steril körülmények között (Penicillint, és Streptomycint tartalmazó PBS oldattal) egynapos fürj és csirke embryokat öntöttünk egy közös csirketojásba majd 8-10 napig inkubáltunk. Az embryonális fejlődés 5. napján a két embryo szikhólyag - keringése anastomózisokat képezett, az embryoknak közös vérkeringése lett (12. kép: A, B). A 12 inkubált parabiotikus embryopárból 3 nap után még 7 volt életben, 5 nap után mintegy 3, 7 nap után (tehát a 8 napos csirke és fürj parabiöntok közül) pedig 2 embryopár maradt meg. Ez a kísérlet végére mintegy 17%-os túlélési arányt jelentett. A 6 napos parabiöntok Chorioallantois membránja már láthatóan egyesült; a 10 napos parabiöntikus embryokat lefixáltuk, és fagyasztott metszeteket készítettünk belőlük. (12. kép: C, D).

A két alsó képeken látható metszetek a 10 napos fürj embryo fejének dermiséből (12. kép: E), és csontvelőjéből (12. kép: F) készült. Piros színnel a CD45+ csirke parabiöntből származó hemopoietikus sejtek, zölddel pedig a QH1+ fürj eredetű HSC-k, és az endothel jelölődik. Az immunfluoreszens festésekből kapott eredmények alapján, a fürj embryo szöveteiben csak a kerek morfológiát mutató, csirke keringésből származó CD45+ HSC-k jelennek meg, nyúlványos sejteket nem találunk. Ezen kívül megfigyelhetünk pár CD45+ elnyúlt, endothel szerű sejtalakot is a csontvelői erek falához tapadva, melyek jól elkülönülnek a QH1+ fürj hemopoietikus és endothél sejtektől. Csirke-fürj parabiöntikus kimérák immuncitokémiai analízise azt mutatta, hogy csak a kereksejtek „keverték” az embryokban, míg a nyúlványosok a közös keringés ellenére sem kolonizálták kölcsönösen a szervek mesenchymáját. Ez a kísérletes eredmény felveti annak a lehetőségét, hogy az



embriókban a kerek és nyúlványos sejtvonal már a keringés megindulása előtt szétválík, és a kereksejtes forma nem precursora a nyúlványosnak.



**12. kép:** *Csirke- fűj parabiózis.*

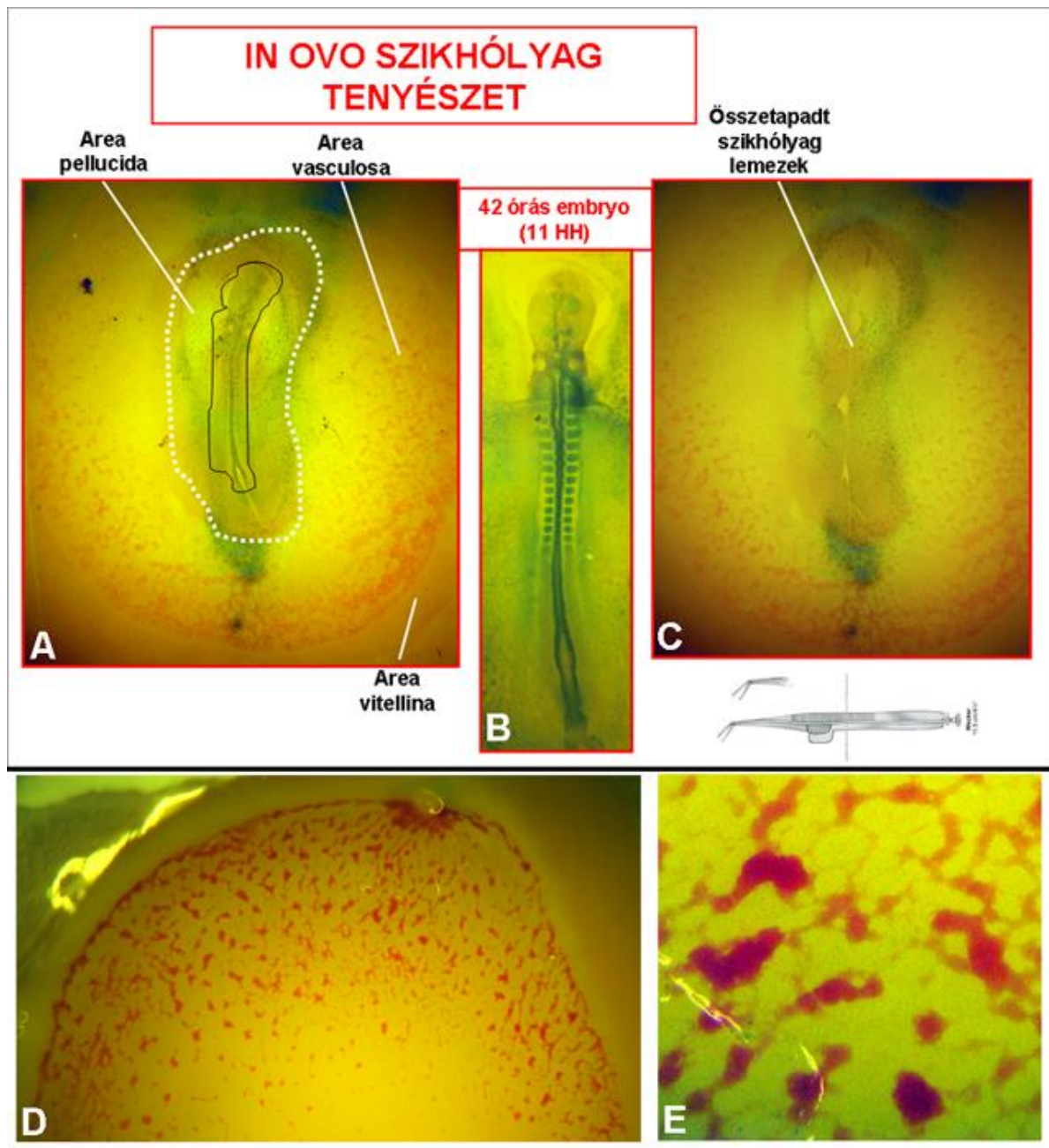
Az A, B, C, D képeken a parabiózis technika sémás rajzát, és sztereomikroszkópos in ovo képét láthatjuk (C). Az inkubáció 6. napján a két embryo szikhólyag keringése anasztomózisokat képez, a keringés közös lesz (jobb oldali a fűj, bal a csirke embryo) (D). A 10 napos embryóban csak a kerek típusú csirke CD45+ hemopietikus sejtek fordulnak elő a fűj parabiogen szöveteiben. (E, F)

#### 4.2.2 In ovo szikhólyag - tenyészet

A parabiózis technika alkalmas volt arra, hogy kizárjuk a nyúlványos morfológiájú CD45+ sejttípus és a keringésben található hemopoietikus sejtek ontogenetikai kapcsolatát, de azt nem mutatta meg, hogy mégis a keringés megindulása előtt, az intra-, - vagy extraembryonális kompartmentből származik a mesenchymát infiltráló, nyúlványos CD45+ sejtpopuláció. A kérdés megválaszolására in vitro és in ovo embryo tenyésztési technikákat alkalmaztunk.

A kísérlet során steril körülmények között a 42 órás, 13 szomitás (HH12 stádium) csirke embryokat a vérkeringés megindulása előtt kimetszettük, és az épségben megtartott szikhólyagot 48 órát, illetve 5 napot tovább inkubáltuk (13. kép: A, B, C). Ahhoz, hogy meggyőződjünk a pontos embryonális korról, illetve arról, hogy a szikhólyag és az embryo keringése nem egyesült még, az embryopajzsokat Nílus kék szulfát 0,2% - os PBS oldatával festettük meg, majd a szívcsőbe 0,1%-os Fast Green oldatot tartalmazó vitális festéket injektáltuk. Így megtudtuk pontosan számolni a szomiták számát, és megfigyelhettük, hogy az embryonális szövetek perfúziója után a festék kijut –e az area pellucidán kívül a szikhólyag area vasculosájába. Az így előkészített embryopajzsból iridectómiás ollóval kimetszettük az embryot úgy, hogy a megmaradt szikhólyag szélei összetapadjanak. A sikeres ablatio után a tojásokat 48 óráig, illetve további 5 napot inkubáltuk.

Ezt követően a lefixált szikhólyag - preparátumokat fagyasztva lemetszettük, majd immuncitokémiai és immunfluoreszens festésekkel vizsgáltuk. A 48 órás szikhólyag – tenyésztésekről készült immuncitokémia festések azt mutatták, hogy a vérszigetek zömében erythroid elemei között nagyszámú csillag alakú, CD45+ sejt is van a kerek CD45+ hemopoietikus sejtalakok mellett (14. kép: A, B). Az 5 napig inkubált tenyészetekben kifejezettebb volt a nyúlványos morfológiájú CD45+ sejttípus jelenléte (14 kép: C, D). A CD45 immunpozitív sejtek mellett nagy számú endogén peroxidáz pozitív erythrocyta tölti ki a vérszigeteket (nincs kép).



**13. kép:** *In ovo szikhólyag tenyészet.*

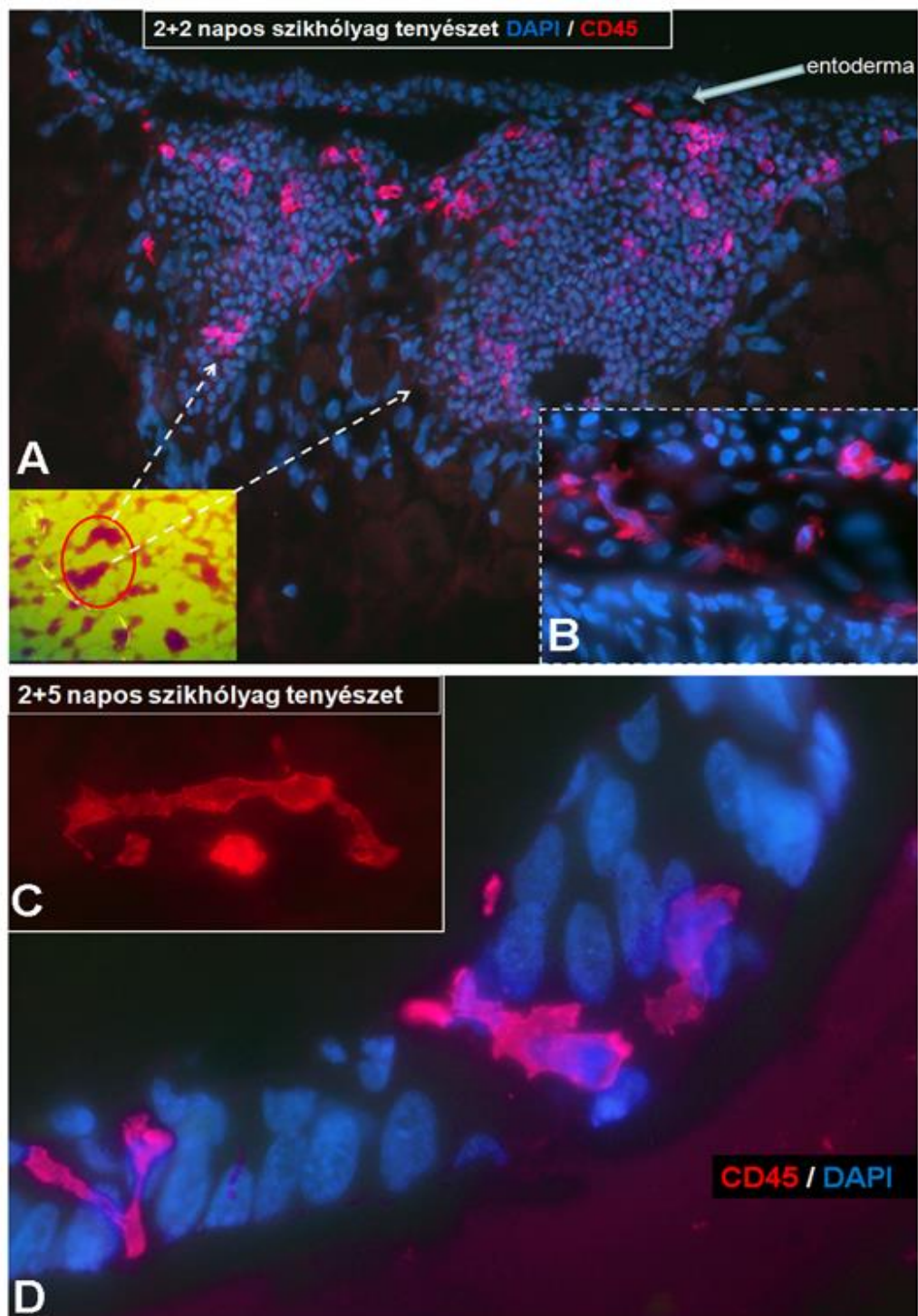
(A): HH12 stádiumú embriopajzs. A szikhólyag area vasculosája és az embriopajzs határa pontozott vonallal jelölve.

(B): Fast Green oldattal megfestett 13 szomitás embryo.

(C): Az embryo iridectomiás ollóval történő eltávolítása után megmaradt szikhólyag - lemez két vágott szélé összetapadt.

(D, E): 48 órával az embryo kimetszése a szikhólyag tenyészeteken az elfolyási akadály miatt nagyra duzzadtak az erythrocytában gazdag vérszigetek.

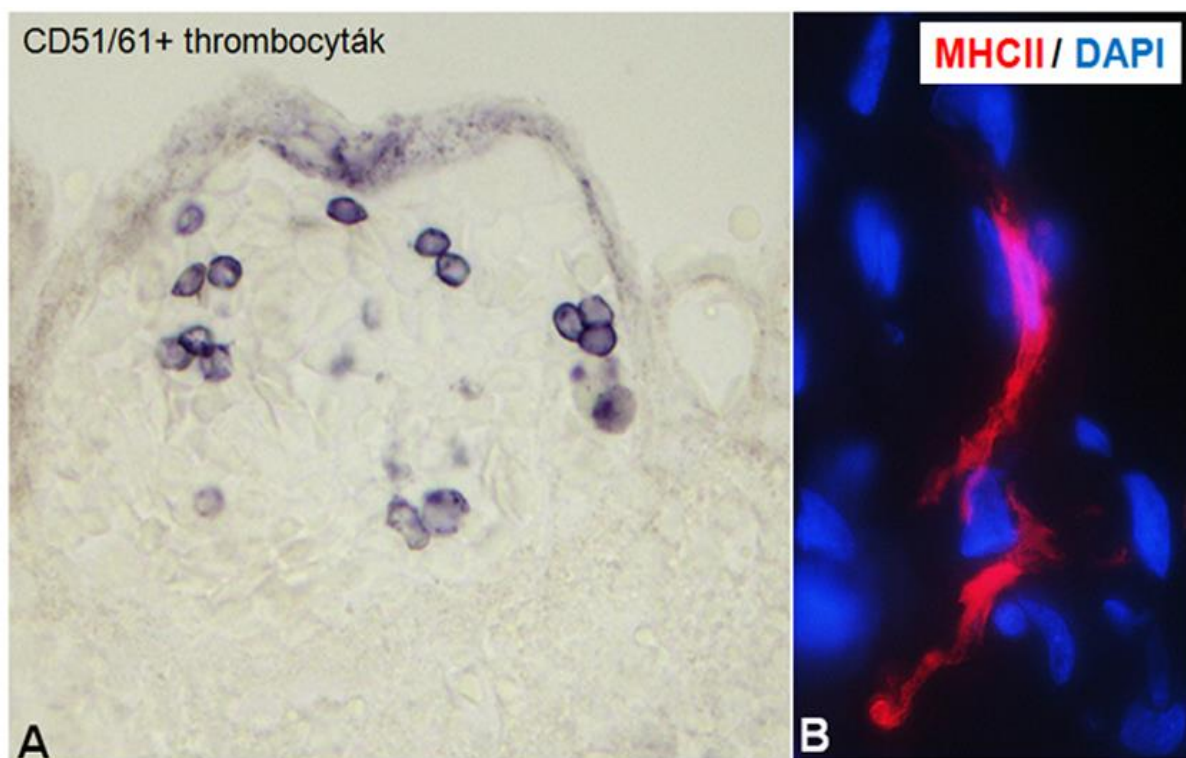




**14. kép:** 48 órás (2+2) és 5 napos (2+5) szikhólyag tenyészetekben előforduló CD45+ sejtek. (A, B): Két vérsziget CD45+ (piros) kerek, és nyúlványos sejtjei. A C képen a nyúlványos, és kerek morfológiájú sejtek közötti különbséget, a D képen a nyúlványaikkal az entoderma sejtjei közé illeszkedő, nyúlványos CD45+ sejteket láthatjuk. A DAPI (kék) jelöli a sejtmagokat.



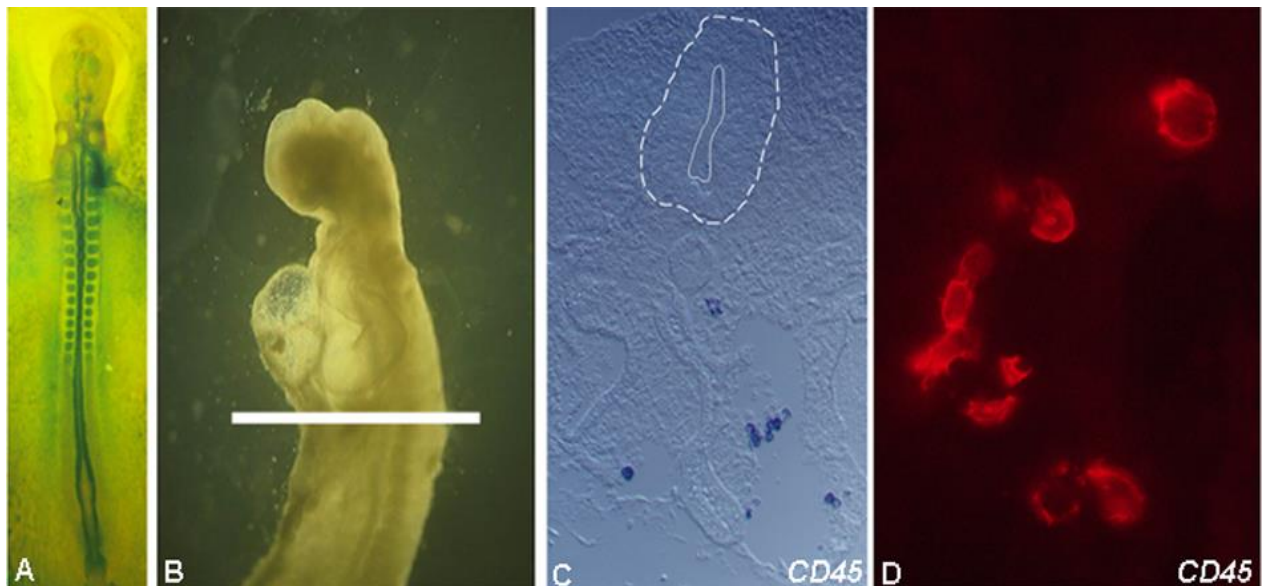
Az öt napig inkubált szikhólyag preparátumok metszetein más hemopietikus markerek (thrombocyta, makrofág, MHCII) immuncitokémiai festéseit is elvégeztük. A CD51/61+ thrombocyták nagy számban differenciálódtak a vérszigetek lumenében, míg az MHCII+ nyúlványos sejtek főleg a vérszigetek falában és a mesenchymában lokalizálódtak. (15.kép: A, B).



**15. kép:** Az 5 napos szikhólyag tenyészet hemopietikus sejtjeinek differenciálódása. Az A kép az  $\alpha 2\beta 5$  integrin antigént expresszáló (CD51/61+) thrombocyta prekurzorokat mutatja egy vérsziget lumenében. A B képen nyúlványos MHCII+ (piros) sejtek láthatóak a vérsziget falában. A DAPI (kék) jelöli a sejtmagokat.

### 4.2.3 In vitro embryotenyészet

Az in ovo szikhólyag – tenyésztésre kimetszett 2 napos (HH12 stádiumú) embryokat (16. kép: A) 48 óráig collagénmátrix alapú szervtenyészetben tovább tenyésztettük (16. kép: B). A létrejött embryotenyészeteket hemopoiitikus specifikus markerekkel tanulmányoztuk. Az immuncitokémia festések azt mutatták, hogy az izolált embryokban csak kerek morfológiájú CD45+ sejtek fejlődtek, amelyek elsősorban az aorta lumenében fordultak elő (16. kép: C, D).



**16. kép:** Embryotenyésztés kollagénmátrixban.

(A): Nílus kék festéssel megjelölt HH11 stádiumú embryo.

(B): 48 órás embryotenyészet. A fehér csík jelöli a metszetek szintjét (C, D).

(C, D): CD45+ sejtek a 48 óráig tenyésztett, 2 napos embryóban.

## Eredmények megbeszélése és konklúzió

A klasszikus monophyletikus hemopoiezis szerint a hemopoietikus őssejt (HSC) extraembryonálisan a szikhólyag falának vérszigeteiben képződik és az extra- és intraembryonális keringés összekapcsolódása után kerül az embryo májába és telepszik meg a csontvelőbe. Ezzel a HSC vándorlási folyamattal azonban nehéz magyarázni a klinikai gyakorlatba jól ismert primitív (embryonális) és felnőtt (definitív) vérképzést. Mai felfogásunk szerint a monophyletikus hemopoiezis elmélete módosul, amennyiben az extraembryonális vagy primitív vérképzés őssejtjei a szikhólyagból jönnek és csak az embryo vörösvérsejtjeit képezik, míg az intraembryonális, vagy definitív vérképzés őssejtjei az aorta ventrolaterális redőibe képződnek, majd kilépnek a paraaortikus régió mesenchymájába. A definitív HSC innen vándorol a májba-lépbe, thymusba és végül a csontvelőbe.

Csirke embryokon végzett embryomanipulációs vizsgálatok (csirke-fürj kimérák) mutatták meg először, hogy a magasabb rendű gerincesekben, így a humán embryóban is, a vérképzés definitív őssejtjei nem a szikhólyagban, hanem a dorzális aorta területén alakulnak ki és az itt fejlődő progenitorok később az összes vérsejtvonal létrehozására képesek (*Dieterlen-Lievre és Martin, 1981; Dzierzak, 2002; Dieterlen-Lievre, 2007; Kissa és Herbomel, 2010*). Habár a vérsejtek determinációjára és differenciálódására számos molekuláris biológiai adat áll rendelkezésünkre, a madár embryóban zajló korai vérképzés immunmorfológiai karakterizálása csak részben ismert.

Szakedolgozati munkám során csirke embryok hemopoietikus sejtjeinek megjelenését, differenciálódását követtük nyomon immuncytokémiai módszerekkel, in vivo, in ovo és in vitro tenyészetekben. Kísérleteinkben először az intraembryonális vérképzés korai szakaszait tanulmányoztuk, azaz a HSC megjelenését térbe és időben, majd a lymphoid, myeloid, erythroid és thrombocytoid sejtvonalak első megjelenését próbáltuk feltérképezni. Immuncitokémiai módszerekkel igazoltuk, hogy a korai embryóban két különböző morfológiájú CD45+ sejt figyelhető meg. Az első CD45+ hemopoietikus sejtek kerek alakúak és a szikhólyag vérszigeteiben tűnnek fel. Emlősökben a HSC differenciálódás során a CD45 felszíni molekulát megelőzi a CD34 molekula expressziója, amely a HSC-k mellett az endothél sejteket is jelöli. Madarakban a CD34 gént *McIntyre és munkatársai (2008)* azonosították először, de eddig még nem készült madár specifikus ellenanyag a CD34 fehérje

ellen. Eredményeink szerint a CD45 specifikus ellenanyag jóval korábban is jelöli a HSC-et mint ezt eddig az irodalmi adatok alapján gondoltuk (*Jaffredo és mtsai, 1998; 2000*) s ezért a CD45 ellenes antitest alkalmas markert jelenthet az extraembryonális HSC-k azonosítására is.

Az aorta ventrolaterális redője, mint az intraembryonális HSC „niche” a 3. embryonális nap végén jelenik meg, mellyel szinte azonos időben mutatható ki a paraaortikus régióba is a CD45+ HSC. Az inkubáció 5. napján a CD45+ populáción belül már az egyes sejtvonalak is fellépnek, amelyeket Bu-1+ B sejt és CD3+ T sejt; Grl-1+ és Lamp-1+ granulocytá-makrofág, valamint CD41/CD61+ thrombocytá, és az erythrocytáakra jellemző endogén peroxidáz reakcióval pozitív sejtek megjelenése igazol. A CD45+ HSC sejtek száma messze meghaladja a lymphoid, myeloid, erythroid és thrombocytoid sejtek összszámát. Ez a megfigyelés fölveti annak a lehetőségét, hogy a CD45 hemopoietikus marker nemcsak a felsorolt sejtvonalakat, hanem ezen kívül más sejtípust is felismer. Későbbi fejlődési stádiumokban (7-9. embryonális nap) a kerek CD45+ sejtek a keringésben, az aorta és **annak zsigeri ágait körülvevő mesenchymában** fordultak elő. A 7-9 napos embryóban a nagyobb abdominalis erek körül kialakuló CD45+ kereksejtes hüvely jóval nagyobb arányban tartalmaz CD45+ sejteket, mint az 5-6 napos embryokban megtalálható para-aortikus régiója. A para-aortikus régió csirke embryóban a 8. nap után eltűnik. A para-aortikus régiót az aorta redőkből kivándorló sejtekből származtatják (*Jaffredo és mtsai, 2000*), de az itt lokalizálódó CD45+ sejtek későbbi sorsa nem ismert. Feltehetőleg a CD45+ sejtek a para-aortikus régióból átkerülnek az általunk megfigyelt nagyobb erek körüli mesenchymában, majd innen kolonizálják a lépét, a 9-11. napon kialakuló bursa Fabricii, thymus és csontvelő telepét. Ennek a folyamatnak az experimentális bizonyítására a jövőben aorta csirke-fürj kimérákat tervezünk.

Az első csillag alakú CD45+ sejtek 12 órával a szikhólyagban kimutatott CD45 kereksejtes pozitivitás megfigyelése után az intraembryonális mesenchymában detektálhatók. Ilyen korai stádiumban megjelenő, nyúlványos morfológiájú CD45+ sejtekről eddig nem jelent meg irodalmi adat. A kerek morfológiájú CD45+ sejtek intraembryonális felszaporodásával párhuzamosan nagyszámú csillag alakú CD45+ sejt is differenciálódik és ezek a sejtek valamennyi szervezdemény mesenchymáját benépesítették.

Következő vizsgálatunk célja az volt, hogy kiderítsük, milyen fejlődésbiológiai kapcsolat van a kerek és csillag alakú, nyúlványos CD45+ sejtpopulációk között;

származhatnak-e a nyúlványos sejtek a keringésben lévő CD45+ sejtekből? A kérdés megválaszolására először csirke-fürj parabiózis technikát alkalmaztunk. A parabiótikus embryok immuncitokémia festése azt mutatta, hogy úgy a fürj mind a csirke embryokban csak kerek morfológiájú hemopoiotikus sejtek keveredtek, a másik fajból származó véreredetű nyúlványos sejtek viszont nem fordultak elő a fogadó embryok mesenchymájában. Parabiózis kísérletekből kapott eredményeinket alátámasztották azok a 2006-ban és 2011-ben megjelent közlemények (*Pardanaud és Eichmann, 2006, 2011*) ahol a korai csirke-fürj parabiótikus embryokban csak vérerek lumenében található hemopoiotikus sejtek és emellett csak kisszámú, érfalhoz tapadt, úgynevezett keringő endothél sejt kimérizmus volt megfigyelhető. Ezzel szemben laboratóriumunk korábbi parabiózis munkái kimutatták (*Nagy és mtsai 2004, 2005*), hogy a 12-16 napos embryok primer és szekunder nyirokszerveiben (bursa Fabricii, lép) található dendritikus sejtek prekursorai a vérkeringésből származnak. Ez utóbbi kísérleti eredmények azzal magyarázhatóak, hogy a nyirokszervek ontogenezise során, keringésből származó CD45+ sejtek vándorolnak a nyirokszervek mesenchymájába ahol dendritikus, makrofág és lymphoid sejtekké differenciálódnak (*Nagy és mtsai, 2004*)

A parabiózis kísérletek eredményeinek értékelése felveteti azt a hipotézist, hogy a korai embryoban elkülöníthető, keringésben lévő CD45+ kerek és a mesenchymában található nyúlványos CD45+ sejtek szétválása még a vaszkularizáció kialakulása előtt megtörténik és erre a következőkben a szikhólyag vérszigetek izolálásával és tenyésztésével próbáltunk választ adni. Ezekben az in ovo és in vitro kísérletekben a 2 napos csirke embryokat még az intra- és extraembryonális vérkeringés közös megindulása előtt a tojásból kimetszettük és az épségben megtartott szikhólyagot 2-5 napig tovább inkubáltuk. Az izolált embryokat szintén 2 napig, collagénmátrix alapú szervtenyészetben tartottuk. A létrejött embryotenyészeteket hemopoiotikus specifikus markerekkel tanulmányoztuk. Az immuncitokémia festések azt mutatták, hogy az izolált embryotenyészetekben csak kerek morfológiájú sejtek fejlődtek, míg az in ovo tenyésztett szikhólyag falában kerek és nyúlványos CD45+ sejtek egyaránt kialakultak.

A szikhólyag vérképzésben betöltött szerepe mindmáig vitatott. Általánosan elfogadott a primitív erythrocyták képzésében betöltött szerepe, de újabb adatok szerint a definitív erythrocyták képzésében is részt vesz (*Sheng, 2010*). Madarakra jellemző, hogy az erythroblastok mellett thromboplastok is képződnek a szikhólyag vérszigeteiben, valamint csirke - fürj szikhólyag kimérákkal igazolták, hogy a szikhólyagban olyan makrofág populáció is képződik amely később a velőcsöbe vándorol és mikroglia-szerű sejtekké

differenciálódik (*Cuadros és mtsai, 1992; Pardanaud és Eichmann, 2011*). Madárembryokon végzett kísérletek alapján kiindulva, az egérembryok microglia sejtjeinek szikhólyag eredetét nemrég experimentálisan transzgenikus egerekben igazolták (*Ginhoux, 2010*). Továbbá, olyan szikhólyag eredetű endothél prekursorok létezését is kimutatták, amelyek a keringéssel közlekedve intraembryonálisan képesek részt venni az érfal intima képzésében (*Pardanaud és Eichmann, 2011*).

A szikhólyag vérszigetek in ovo tenyésztésével egy olyan új embryomanipulációs technikát dolgoztunk ki ahol eddigi vizsgálataink szerint 5 napig lehet tenyészteni az embryotól leválasztott szikhólyagot, s ezzel izoláltan lehet tanulmányozni a szikhólyag eredetű őssejtek differenciálódását. A tenyészetekben kialakult nagyszámú nyúlványos CD45+ sejt megjelenése felveti azt a hipotézist, hogy a CD45+ nyúlványos sejtek a szikhólyagból származnak, az embryonális szervek kezdeményeket kolonizálják és szervspecifikusan MHC II+ dendritikus morfológiájú sejtekké (mikroglia, lymphoid dendritikus sejtek, Langerhans sejtek, máj Ito sejtek, vese mesangiális sejtek) differenciálódnak.

### **Konklúzió:**

1. A korai vérképzés idején kétféle CD45+ sejt differenciálódik. Az aorta, és annak zsigeri ágai körül lokalizálódó kerek CD45+ sejtek mellett, nagyszámú CD45+ nyúlványos morfológiájú sejt jelenik meg elszórtan az embryo mesenchymájában.

2. A keringésben található CD45+ kerek sejtek a szikhólyag vérszigeteiben és intra-aortikusan képződnek, míg a CD45+ nyúlványos sejtek prekursorai az a szikhólyag vérszigeteiben differenciálódnak és a mesenchymában vándorolva kolonizálják az embryot.

Feltételezzük, hogy a CD45+ kerek morfológiájú sejtek a keringés valódi hemopoiitikus sejtjeit hozzák létre, míg a nyúlványos CD45+ alakok a szikhólyagból származnak és az egyes szervek kezdeményekben MHCII-t expresszáló dendritikus vagy stellate sejtekként differenciálódnak.

# Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek Dr. Nagy Nándornak, a Semmelweis Egyetem Humánmorfológiai és Fejlődésbiológiai Laboratórium vezetőijének, aki munkám során mindvégig támogatott és mellettem állt.

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

Végül hálás vagyok családomnak és barátaimnak, akik nagy türelmmel álltak mindvégig mellettem, buzdítottak és támogattak.

## Irodalomjegyzék

Alison M, Poulsom R, Forbes S, (2001) Update on hepatic stem cells. *Liver* 21:367-373.

Alison M, Poulsom R, Jeffrey R (2000) Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 406:257

Becker AJ, McCulloch EA, Till JE (1963.). Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* 197, 452–4. o

Beupain D., Martin C., and Dieterlen-Liévre F. (1979). Are developmental hemoglobin changes related to the origin of stem cells and site of erythropoiesis? *Blood*, 53:212-225

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

Bodi I Nándor Nagy, Lídia Sinka, Botond-Zoltán Igyártó and Imre Oláh (2009) Novel monoclonal antibodies recognize guinea fowl thrombocytes. *Acta Vet Hung Jun;57(2):239-46.*

Brand-Saberi B, Christ B. (2000). Evolution and development of distinct cell lineages derived from somites. *Curr Top Dev Biol.* 48:1-42.

Burns AJ, Delalande JM, Le Douarin NM (2002). In ovo transplantation of enteric nervous system precursors from vagal to sacral neural crest results in extensive hindgut colonisation. *Development.* 129(12):2785-96.



Caprioli A, Jaffredo T., Gautier R, Dubourg C. and Dieterlen - Lièvre F. (1998). Blood - borne seeding by hematopoietic and endothelial precursors from the allantois. Proc Natl Acad Sci USA 95: 1641-1646

Catalá C. (1995). Identification of glucopyranosyl-p-1,4- glucopyranosyl-p-1-oxindole-3-acetyl-N-aspartic acid, a new IAA catabolite, by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. J. Mass Spectrom 30: 1007-1017

Dieterlen-Lièvre F., Martin C. (1981). Diffuse intraembryonic hemopoiesis in normal and chimeric avian development. Dev Biol 8(1):180–191.

Dieterlen-Lièvre F. (1984). Emergence of intraembryonic blood stem cells in avian chimeras by means of monoclonal antibodies. Dev Comp Immunol. 3:75-80

Dieterlen-Lièvre F. (1994). Hemopoiesis during avian ontogeny. Poultry Science Rev. 5:273-305

Dieterlen-Lièvre F. (1997). Intraembryonic hemopoietic stem cells. Hematol Oncol Clin North Am. 11:1149-1171

Dieterlen-Lièvre F. (2007). Emergence of haematopoietic stem cells during development. C R Biol. 330:504-9.

Dzierzak E. (2002). Hematopoietic stem cells and their precursors: developmental diversity and lineage relationships. Immunol Rev. 187:126-38.

Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Mehler MF, Conway SJ, Ng LG, Stanley ER, Samokhvalov IM, Merad M. (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*. 330:841-5.

Goldman S, Windrem M (2006). Cell replacement therapy in neurological disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361 (1473): 1463–75.

Goldstein AM, Nagy N. (2008). A bird's eye view of enteric nervous system development: lessons from the avian embryo: Avian model for studying ENS development. *Pediatric Res*. 64(4):326-33.

Gumati MK, Magyar A, Nagy N, Kurucz E, Felfoldi B, Olah I. (2003). Extracellular matrix of different composition supports the various splenic compartments of guinea fowl (*Numida meleagris*). *Cell and Tissue Research*. 312(3):333-43.

Hamburger, V and Hamilton, HL (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology* 88 (1): 49–92. doi:10.1002/jmor.1050880104.

Huang R, Zhi Q, Patel K, Wilting J, Christ B. (2000). Dual origin and segmental organisation of the avian scapula. *Development*. 127:3789-3794.

Igyártó BZ, Nagy N, Magyar A, Oláh I.(2008). Identification of the avian B-cell-specific Bu-1 alloantigen by a novel monoclonal antibody. *Poult Sci*. 2008 Feb;87(2):351-5.

Jaffredo T., Gautier R, Eichmann A., Dieterlen - Lièvre F. (1998). Intraaortic haemopoietic cells derived from endothelial cells during ontogeny. *Development* 125, 4575-4583.

Jaffredo T., Gautier R, Brajeul V, Dieterlen - Lièvre F. (2000). Tracing the progeny of the aortic hemangioblast in the avian embryo. *Dev Biol*. 224: 204-14

James AT., Joseph IE., Shander SS., Michelle AW., Jennifer JS., Vivienne SM., and Jeffrey MJ., (1998) Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science* 282:5391-1145

Kissa K, Herbomel P. (2010). Blood stem cells emerge from aortic endothelium by a novel type of cell transition. *Nature*. 464:112-5.

Korbling M, Katz R, Khanna A, Ruifrok A, Rodon G, Albitar M, Champlin R, Estrov Z (2002) Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. *N.Engl J. Med.* 346:738-746

Le Douarin NM, Teillet MA. (1973). The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo. *J Embryol Exp Morphol.* 30(1):31-48.

Le Douarin NM, Dieterlen-Lievre F, Teillet MA, Ziller C. (2000). Interspecific chimeras in avian embryos. *Methods Mol Biol.* 135:373-386.

Lindvall O. (2003). Stem cells for cell therapy in Parkinson's disease. *Pharmacol. Res.* 47 (4): 279–87.

Mallet V, Mitchel C, Mezey E, Farbe M, Guidotti J, Renia L, Coulumbel L, Kahn A, Gilgenkratz H (2002) Bone marrow transplantation in mice leads to a minor population of hepatocytes that can be selectively amplified in vivo. *Hepatology* 35:799-804

McIntyre BA, Alev C, Tarui H, Jakt LM, Sheng G. (2008). Expression profiling of circulating non-red blood cells in embryonic blood. *BMC Dev Biol.* 8:21.

Medvinsky LA., Dzierzak EA. (1997). Development of the definitive haemopoietic hierarchy in the mouse. *Dev and Comp Immun.* 22: 289-301

Milstein C. (1999). The hybridoma revolution: an offshoot of basic research. *Bioessays.* 21:966-973.

Nagy N, Brewer KC, Mwizerwa O, Goldstein AM. (2007). Pelvic plexus contributes ganglion cells to the hindgut enteric nervous system. *Devl Dyn.* 236(1):73-83.

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

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

Nagy N, Biro E, Takacs A, Polos M, Magyar A, Olah I. (2005). Peripheral blood fibrocytes contribute to the formation of the avian spleen. *Dev. Dyn.* 232: 55-66.

Nagy N, Magyar A, Toth M, Olah I. (2004). Quail as the chimeric counterpart of the chicken: Morphology and ontogeny of the bursa of Fabricius. *Journal of Morphology.* 259(3):328-39.

Nagy N, Magyar A, Toth M, Olah I. (2004). Origin of the bursal secretory dendritic cell. *Anatomy and Embryology.* 208: 97-107.

Nagy N, Magyar A, Dávid A, Gumati MK, Oláh I. (2001). Development of the follicle-associated epithelium and the secretory dendritic cell in the bursa of Fabricius of the guinea fowl (*Numida meleagris*) studied by novel monoclonal antibodies. *The Anatomical Record.* 262: 279-292.

Nagy N, Magyar A, Oláh I. (2001). A novel monoclonal antibody identifies all avian embryonic myogenic cells and adult smooth muscle cells. *Anatomy and Embryology.* 204: 123-34.

Nagy N, Brewer KC, Mwizerwa O, Goldstein AM. (2007). Pelvic plexus contributes ganglion cells to the hindgut enteric nervous system. *Developmental Dynamics*. 236(1):73-83.

Oláh I, Gumati KH, Nagy N, Magyar A, Kaspers B, Lillehoj H. (2002). Diversity of the K-1 antigen expression by the cortico-medullary and reticular epithelial cells of the bursa of Fabricius in chicken and guine fowl. *Dev Comp Immunol*. 26(5):481-8.

Pardanaud L, Eichmann A. (1996). Identification, emergence and mobilization of circulating endothelial cells or progenitors in the embryo. *Development*. 133:2527-37.

Pardanaud L, Eichmann A. (2011). Extraembryonic origin of circulating endothelial cells. *PLoS One*. 6:e25889.

Schoenwolf GC, Garcia-Martinez V, Dias MS. (1992). Mesoderm movement and fate during avian gastrulation and neurulation. *Dev Dyn*. 193(3):235-48.

Serbedzija GN, Bronner-Fraser M, Fraser SE. (1989). A vital dye analysis of the timing and pathways of avian trunk neural crest cell migration. *Development*. 106:809-816.

Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. (1995). Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*. 376(6535):62-6.

Sheng G. (2010). Primitive and definitive erythropoiesis in the yolk sac: a bird's eye view. *Int J Dev Biol*. 2010;54(6-7):1033-43.

Theise Nd., Nimmakayalu M., Gardner R., Illei PB., Morgan G., Teperman L., Krause DS. (2000). Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 32:11-16

Yutaka Tahara and Toshiyuki Morinaka (1990). The blood island is a Site of Formation of the Primary embryo Thrombocyte in the Chick Blastoderm. *Develop Groth and Differ.* 32: 403-409