

Csirke eredetű enterális neurospherek képzése, karakterizálása és transzplantációja ganglionmentes utóbélbe

Diplomamunka
Biológus mesterszak
Molekuláris Genetika, Sejt- és Fejlődésbiológia specializáció

készítette:
Pethő Csongor László

témavezető:
Prof. Dr. Nagy Nándor
egyetemi tanár
Semmelweis Egyetem, Anatómia, Sejt- és Fejlődésbiológia Intézet
Őssejtes és Kísérletes Embriológia Laboratórium

Soós Ádám, doktorandusz hallgató
Semmelweis Egyetem, Anatómia, Sejt- és Fejlődésbiológia Intézet
Őssejtes és Kísérletes Embriológia Laboratórium

belső konzulens:
Jezsó Bálint
Doktorjelölt, tudományos segédmunkatárs
ELTE TTK, Biokémia Tanszék

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
BIOLÓGIAI INTÉZET



Budapest, 2023

Tartalom

1. Bevezetés	2
II. Irodalmi áttekintés.....	3
2.1 A bélidegrendszer általános felépítése	3
2.2 A bélidegrendszer embrionális fejlődése.	7
2.3 Hirschsprung-kór és a bélidegrendszer rendellenes fejlődése	12
2.4.1 A Hirschsprung-kór kialakulásának molekuláris háttere.....	13
2.5 3D sejt kultúrák: spheroidok és organoidok	16
2.5.1 Enterális neurospheres képzése és transzplantációjuk egér és humán szervezetben	17
III. Célkitűzések.....	19
IV. Anyagok és módszerek	20
4.1 Kísérleti állatok.....	20
4.2 A szöveti minták feldolgozása.....	20
4.2.1 Az embriók utóbélének izolálása	20
4.2.2 Kipreparált szervek és neurospheres fixálása és beágyazása, zselatinos-szacharózos fagyasztott blokk készítése.	20
4.3 Fagyasztott metszetek készítése.....	21
4.4 Immunhisztokémia.....	21
4.5 Embriómanipuláció.....	23
4.5.1. Neurospheres képzése az izolált utóbélszakaszokból	23
4.5.2. Neurosphere transzplantáció és CAM-graft tenyésztés.....	24
4.5.3 Vándoroltatott sejtenyészet fibronektinnel bevont felszínen	25
4.6 Metszetek értékelése, képkészítés, képfeldolgozás, dokumentáció.....	26
4.7 Mérések és statisztikai elemzés	26
V. Eredmények és megvitatásuk.....	27
5.1 Csirke eredetű enterális neurospheres képzése embrionális utóbélből	27
5.2 Csirke eredetű enterális neurospheres karakterizálása	30
5.3 Csirke eredetű enterális neurospheres enterális sejtösszetételének vizsgálata.....	33
5.4 Csirke eredetű enterális neurospheres fibronektin-felszínen való tenyésztése	35
5.5 Csirke eredetű enterális neurospheres transzplantációja ganglionmentes utóbélbe	38
VI. Összefoglalás	41
VII. Summary	43
Köszönetnyilvánítás.....	45

1. Bevezetés

Az orvostudományban sokáig tartotta magát az a nézet, hogy agyunk egyedüli központként irányítja és hangolja össze annak komplex működéseit. Azonban ezt a gondolatot egyre inkább felváltja az a meglátás, miszerint agyunk ezt nem önállóan, hanem egy „második agy”-ként emlegetett bonyolult, a központi idegrendszertől (central nervous system – CNS) nagy mértékben független neurális rendszerrel együtt végzi. Ez, a gerincvelőnél is több idegsejtet magába foglaló neurális rendszer a bélidegrendszer (enteric nervous system – ENS), amely behálózza a teljes gasztrointesztinális traktust, és összetett módon szabályozza annak működését.

A bélidegrendszer a nyelőcső, a gyomor és a bél falában található ideg- és gliasejtekben gazdag ideghálózat, amely egyben perifériás idegrendszerünk legnagyobb képviselője. Ez a komplex struktúra felelős a tápcsatornánk szekréciós, abszorpciós és perisztaltikus működéseinek szabályozásáért, koordinálásáért. A bélidegrendszert kialakító őssejtek a velőcső dorzális részéből származnak, melyek innen leválva útjukat a gyomor felé folytatják és migrációjuk során kolonizálják a teljes tápcsatornát. A kolonizáció során a sejtekre folyamatos, de jól szabályozott migrációs, proliferációs és differenciációs folyamatok jellemzőek, melyek eredményeképpen kialakul a bélidegrendszer. Ha a felsorolt folyamatokban bármilyen zavar lép fel, az a bélidegrendszer rendellenes fejlődését okozza.

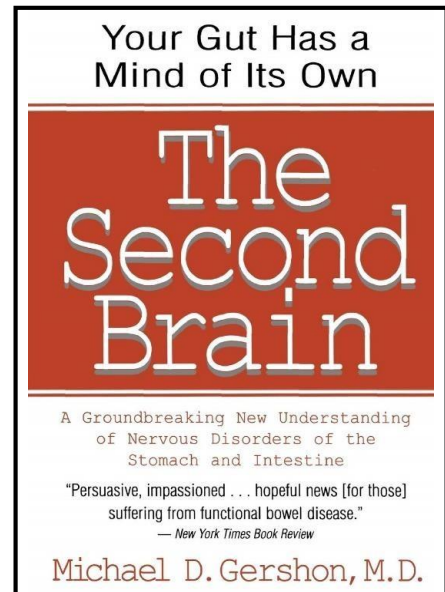
A bélidegrendszer fejlődési zavarából adódó egyik, már régóta ismert, ganglionmentes vastagbéllel jellemzett (aganglionózis) patológiás kór a Hirschsprung-kór (HSCR), amellyel szemben a klinikumnak még jelenleg is csak az érintett bélszakasz sebészeti úton való eltávolítása az egyetlen megoldása. Pontosan ezért az orvoslás felismerte a regeneratív medicina fontosságát, és napjainkban számos kutatás folyik az őssejt-transzplantáció lehetőségeiről. Ahhoz, hogy az őssejt-transzplantáció eredményes és hatékony megoldása lehessen a HSCR betegségnek, elengedhetetlen, hogy részletesen megismerjük a bélidegrendszert kialakító őssejtek viselkedésének molekuláris hátterét, a fejlődést irányító növekedési faktorok hatását, valamint a bélidegrendszer kialakítása során a sejtek és környezetük között zajló jelátviteli folyamatok kapcsolatát.

II. Irodalmi áttekintés

2.1 A bélidegrendszer általános felépítése

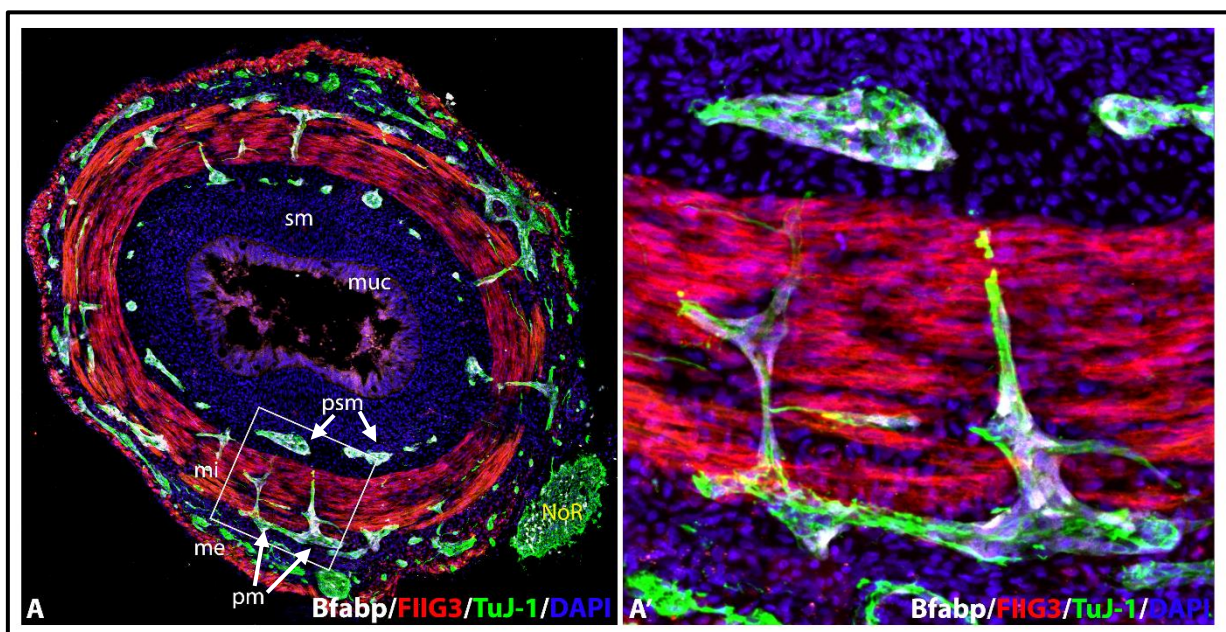
A múlt században a kutatók egyre inkább érdeklődni kezdtek a bélidegrendszer iránt, amelynek egyre részletesebb kutatása fontos eredményekhez vezetett. Ennek köszönhetően fokozatosan terjedt az a nézet, hogy a bélidegrendszer szerepe legalább annyira fontos mint a központi idegrendszeré és ezzel együtt a bélidegrendszer “második agyként” való említése is elterjedt. Ezt kiválóan szemlélteti Michael D. Gershon 1999-ben megjelent, a bél “agyáról” író ismeretterjesztő könyve (1. ábra), mely nagy hatással volt a tudományos érdeklődésre és közelebb hozta olvasóit a bélidegrendszeri megbetegedések megértéséhez.

A szimpatikus és paraszimpatikus idegrendszer mellett a bélidegrendszer képviseli az autonóm idegrendszer harmadik komponensét. (Furness és Costa 1980; Glick és mtsai., 2019). Bár később került az autonóm idegrendszert alkotó idegi hálózatok sorába, több idegsejtet foglal magába mint a másik két komponens együttvéve (Furness, 2012). A bélidegrendszer ember esetében kb. 400-600 millió idegsejtből, amelyek hozzávetőlegesen 20 különböző funkcionális osztályba tartoznak és nagyjából kétszer ennyi gliasejtből áll (Furness, 2006). Ezáltal a bélidegrendszer a második, neuronokat legmagasabb számban tartalmazó idegi struktúra a szervezetünkben (Schemann, 2005). A mélyrehatóbb vizsgálatok eredményeit összefoglaló szakirodalmak saját belső (intrinsic) neuronköröket, szenzoros primer afferens neuronokat, interneuronokat és négy fő motoneuron csoportot (serkentő és gátló, szekretomotoros, vazomotoros) különítenek el (Furness, 2006; Brookes, 2001). Ezek a bélidegrendszerre jellemző belső neuronkörök szolgálhatnak magyarázatul arra a régebbi kutyán végzett megfigyelésre, hogy egy központi idegrendszertől teljes mértékben elkülönített vékonybél szakasz is képes volt motorikus funkciókat produkálni (Bayliss és mtsai. 1899). Később Trendelenburg hasonló megfigyeléseket írt le 1917-ben tengerimalaccal végzett in vitro kísérletei során (Trendelenburg, 1917). Mindezek indokoltá tették a bélidegrendszer elkülönítését a központi idegrendszertől, valamint “második agy”-ként való megnevezését.



1. ábra: Michael D. Gershon –The Second Brain: A Groundbreaking New Understanding Of Nervous Disorders Of The Stomach And Intestine című könyv borítója (HarperCollins Publishers, NY, USA, 1999)

A bélidegrendszer két, koncentrikus körben elhelyezkedő fonatrendszerből (*plexus-ból*) áll: *plexus myentericus* és *plexus submucosus* (2. ábra). A gasztrointesztinális traktus falában található, ganglionokban gazdag plexusokat először Meissner (1857) és Auerbach (1862) írták le (Furness, 2006). A külső, *plexus myentericus* (Auerbach-féle fonat) a hosszanti- és a körkörös simaizomréteg között helyezkedik el, enterális ganglionokból és az ezeket összekötő idegrostokból áll. A bélidegrendszer idegsejtjeinek többsége a *myentericus* ganglionokban fordul elő, ez felelős legfőképp akét izomréteg automatikus perisztaltikus mozgásáért. A *plexus submucosus* (Meissner-féle fonat) a bélfal nyálkahártya alatti rétegének kötőszövetében helyezkedik el. Ez a plexus szabályozza a nyálkahártya alatti réteg szekretoros és abszorpciós funkcióit.



2. ábra: Az embrionális bélidegrendszer felépítése. (A) 12 napos csirke embrió utóbél keresztmetszetén végzett hármás fluoreszcens jelölés az enterális plexusok ideg- és gliasejtjeit és a bél két simaizom rétegét jelöli (fehér: brain-fatty acid binding proteint expresszáló gliasejtek, piros: γ enterális-simaizom aktin, zöld: neuronokra jellemző β -III-tubulin, kék: sejtmag festés). A *plexus myentericus* (pm) ganglionjai (fehér nyilak) a *muscularis externa* (me) és a *muscularis interna* (mi) rétege között helyezkednek el. A *plexus submucosus* ganglionjai a nyálkahártya (*mucosa*- muc) alatti rétegben (*submucosa*- sm) helyezkednek el. A kép jobb alsó sarkán a madarakra jellemző, az utóbéllel párhuzamosan futó Remak-ideg (Nerve of Remak – NoR) is megfigyelhető (A') Az A képen bekeretezett terület nagyobb felbontású felvétele a belső körkörös simaizomréteg két oldalán elhelyezkedő ganglionokról, és az ezeket összekötő idegrostokról.

A *plexus submucosus* ganglionjai általánosságba véve kisebbek, mint a *myentericus* ganglionok, és az összekötő idegrostok is vékonyabbak, de ez a plexus is folytonos a vékonybél és vastagbél teljes hosszán. Az enterális ganglionok megtalálhatók a nyelöcsőtől kezdve a végbél záróizmáig (Furness és Costa, 1980; Furness, 2006). A *plexus myentericus* a gasztrointesztinális traktus teljes hosszán jelen van, azonban a *plexus submucosus* az ember és

az emlősök nyelőcsőjében hiányzik (Timmermans és mtsai, 2001). A ganglionokban helyet foglaló neuronokat és az idegrostokat számos enterális gliasejt veszi körül. Ezeket a gliasejteket kezdetben periférikus Schwann-sejteknek hitték, de elektronmikroszkópos tanulmányok alapján ezek inkább a központi idegrendszer asztrocitáihoz hasonlítanak (Furness 2006).

A bélidegrendszer felelős a tápcsatorna autonóm mozgásáért, motilitásáért (kialakítva annak jellegzetes, perisztaltikus mozgásmintázatát), a gyomorsav szekréciónak szabályozásáért, a helyi véráramlás szabályozásáért, valamint kapcsolatot teremt a bél immun- és endokrinrendszerével (Furness, 2012). A neuronok részletes osztályozása több mint 20 funkcionális csoportba sorolható idegsejtet különít el (Furness, 2000; Furness, 2006), melyek nyúlványai más neuronokkal szinaptizálnak, beidegzik az izomrétegeket, a szekretoros epithéliumot és vérereket is. Az ún. intrinszik primer afferens idegsejtek (IPAN-ok) érzőidegsejtek, melyek sejttestjei a bélidegrendszer nyálkahártya alatti rétegében és *plexus myentericus* ganglionjaiban találhatóak, és a nyálkahártyához vezető perifériás idegrostokkal rendelkeznek. Az IPAN-ok szinaptikus kapcsolatot létesítenek a perisztaltikus reflex-mozgást szabályozó interneuronokkal (Furness és mtsai., 2014). Ezek az IPAN-ok nem csak a bélfalban végbemenő változások, a közvetlenül a nyálkahártyára ható mechanikus ingerek hatására aktiválódnak, hanem az epithéliumban elhelyezkedő enteroendokrin sejtekből felszabaduló neuronhormonok hatására is. (Heredia és mtsai., 2013; Smith és Gershon, 2015). Az enterikus motoneuronok az emésztőrendszer izomzatát, valamint az epithéliumot, az epitheliális mirigyeket és a vaszkuláris simaizmot idegzik be. A szekréciónak felelős neuronkörök egy afferens és egy szekretomotoros neuronból álló két neuronos reflexíven alapulnak és a *lamina propria*-ban végződnek (Furness és mtsai., 2014).

A bélidegrendszer annak ellenére, hogy nagyfokú automáciával rendelkezik, számos ponton kapcsolatban áll a központi idegrendszerrel, ami így szerepet játszik a bélidegrendszer működésének finomszabályozásában. Az enterális ganglionokon végződnek például vegetatív szimpatikus neuronok axonjai, valamint kapcsolat fedezhető fel extrinszik (X. agyidegtől és hashártyából származó rostok) idegek és a *plexus myentericus* között is. Számos bélidegrendszeri és központi idegrendszeri neuron kapcsolódik a gasztrointesztinális traktus szintjén, valamint egyes enterális neuronok axonjai a bélből kilépve a prevertebrális szimpatikus ganglionokhoz futnak, ahonnan az információ a központi idegrendszerbe kerül. Leírtak már olyan enterális ganglionokban jelenlevő idegsejteket is, amelyek az agytörzsbe, vagy a lumbo-szagrális gerincvelőbe vetülnek (Furness 2012, Furness és Stabbing 2017).

Mivel a központi idegrendszerhez köthető szimpatikus rostok főképp afferensek, a bél központi idegrendszer általi extrinszik beidegzése nem a jól meghatározott motilitásmintázatok kiváltásáért és irányításáért felelős, hanem annak finomhangolásáért és a szervezet éppen aktuális állapotához való igazításáért. (Margolis és mtsai, 2016; Powley és Phillips, 2002; Forsythe és mtsai., 2014).

Annak ellenére, hogy a bélidegrendszert szöveti komplexitása és működése, valamint nagyfokú függetlensége miatt “második agynak” nevezik, a bélidegrendszer és központi idegrendszer evolúcióját célzó kutatások arról számolnak be, hogy a bélidegrendszer kialakulása megelőzte a központi idegrendszer megjelenését. A két idegrendszer közötti kölcsönös kapcsolatok, valamint az evolúciós vizsgálatok adatai sokkal inkább két különálló de egymással kapcsolatban álló idegrendszer együttes evolúcióját, mintsem a két idegrendszer egy közös ősi formától való leszármazásának jeleit mutatják. A bélidegrendszer neuronokból és gliasejtekből felépülő ganglionhálózata hasonló felépítést mutat a hidráktól (*Hydra*), tengeri uborkákon (*Holothuroidea*) és gyűrűsférgeken át (*Annelida*) a polipokon (*Octopoda*) keresztül egészen az emberig, és számos olyan fajban is jelen van, amelyek központi idegrendszerrel nem rendelkeznek, mint pl. tüskésbőrűek (*Echinodermata*) vagy félgerinchúrosok (*Hemichordata*) (Furness és Stabbing, 2017). A különböző élőlénycsoportokban a bélidegrendszer kialakulásának mechanizmusa eltérhet egymástól, vagy különböző gasztrointesztinális régiók között is különbség lehet. Kétélvtűekben és hullőkben a plexus submucosus kizárólag a nyelőcső és a gyomor területén található, zebrahalban ez teljesen hiányzik, egérben pedig csak posztnatálisan jelenik meg (Gunn, 1951; Lamanna és mtsai., 1999; Wallace és Burns 2005). A kutatások alapján a bélidegrendszer már azelőtt megjelent a törzsféjlődés során, hogy a csalánzóok és kétoldali szimmetriájú állatok (*Bilateria*) kettéváltak volna, viszont a központi idegrendszer a kétoldali szimmetriájú állatok (pl. gerincesek) jellemzője. Következésképp a bélidegrendszer a központi idegrendszer előtt, és ettől függetlenül alakult ki, mely az evolúció során megőrizte struktúráját (Furness és Stabbing 2017).

2.2 A bélidegrendszer embrionális fejlődése.

A gerincesek evolúciójának egyik meghatározó momentuma volt a ganglionléc (dúcléc, *crista neuralis*, neural crest – NC) megjelenése, mivel ez az út vezetett később a gerincesek koponyájának kialakulásához (Gans és Northcutt 1983). A ganglionléc egy tranziens, multipotens összejtpopulációt tartalmazó struktúra, amely minden gerinces egyedfejlődésének korai szakaszában jelenik meg a kialakuló embrionális velőcső dorzális oldalán. A ganglionléc kialakulása az embriogenezis során a neurális velőlemez (*lamina neuralis*) és az epidermális ektoderma határán veszi kezdetét. A velőlemez és a nem-neurális ektoderma közötti határfelület a neuruláció folyamán a velőredők és a velőbarázda/velősánc létrejöttével megemelkedik, majd ezek összezáródásával a velőcső besüllyed. A ganglionléc-eredetű őssejtek a már felemelkedő velőredőben jelen vannak, és a besüllyedéskor a velőcső dorzális felszínére kerülnek (Selleck és Bronner 1995). Az őssejtek epitheliális-mesenchymális tranzíciót (EMT) követően leválnak a velőcsőről (delamináció), intenzív migrációs képességgel rendelkezve) az embrió szinte minden szervébe eljutnak (3.ábra A, B képek) (Gilbert és Baressi, 2017). A különböző területekhez érkező ganglionlécsejtek a szöveti környezet molekuláris jeleinek hatására számos különböző típusú sejté képesek differenciálódni: ideg- és gliasejtekké; csont-, porc- és kötőszöveti elemekké; endokrin sejté vagy melanocitákká (Le Douarin és Teillet 1973, Yntema és Hammond, 1954; Bronner és Le Douarin, 2012; Gilbert és Barresi 2016). A ganglionléc-őssejtek multipotenciája és differenciálódásuk széles spektruma miatt Brian K. Hall szerint a ganglionléc “negyedik csíralemeznek” tekinthető, és a három csíralemezes koncepció elavult nézet (Hall, 1998).

A ganglionléc négy különböző részét különítjük el a fejlődő embrió cranio-caudális tengelyén, melyek meghatározzák az adott régiókból származó ganglionlécsejtek sorsát (Ayer-Le Lievre és LeDouarin 1982, Bronner és LeDouarin 2012, Gilbert és Barresi 2016).

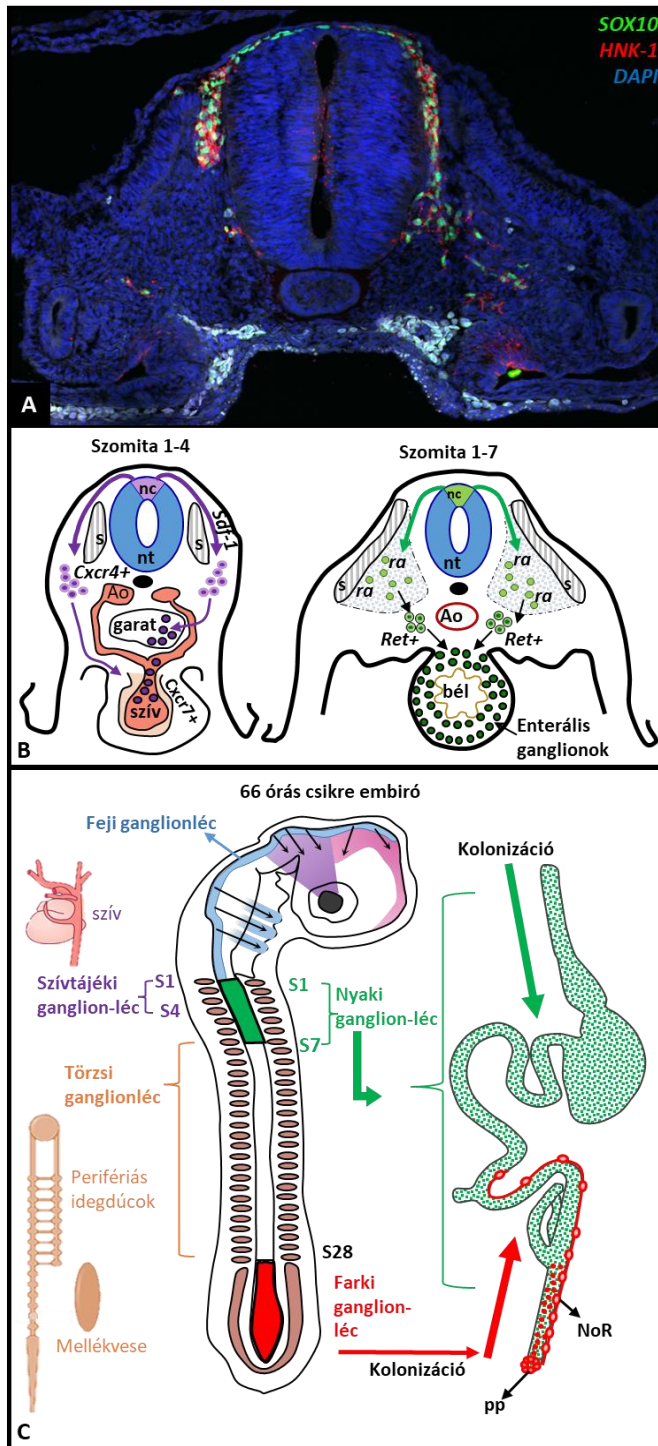
A **feji ganglionléc** (cranial neural crest) régiójából származó őssejtek hozzák létre a koponya és arc csontozatát, kötő- és támasztó szöveteit, valamint egyes agyidegek gliasejtjeit és érződucait (3. ábra, C kép) (D’Amico és Noden, 1983).

A **nyaki ganglionléc** (vagial neural crest, 1-7 szomiták szintje) a bélidegrendszer kialakulása szempontjából a legjelentősebb. A nyaki szakasz egy különleges régiót foglal magába, ugyanis Reedy és mtsai. az innen leváló ganglionléc sejteknek három, időben eltérő migrációs hullámát írta le, melyek két különböző útvonalon zajlanak: dorzolaterálisan és ventrálisan (Reedy és mtsai. 1998). A szomitákon keresztül, **ventrális** útvonalon haladó

ganglionléc-sejtek alakítják ki a bélidegrendszert illetve egyes érző és szimpatikus dúcokat. A nyaki szakasznak azonban elkülönítjük egy jól körülhatárolható alegységét az 1-4 szomiták szintjén. Az innen származó ganglionléc-sejtek egy másik populációja (mely nem a ventrális útvonalon halad) az ektoderma alatti **dorzolaterális** útvonalat követve a garatívek és a szív területét kolonizálják, kialakítva többek között a csecsemő-, pajzs-, és mellékpajzsmirigyek kötőszövetét, a szív és az aortaív artériák falában található simaizom sejtjeit valamint a szív parazimpatikus beidegzését. (Le Lievre és Le Douarin, 1975; Kirby és Waldo, 1995; Kuo és Erickson, 2010). Ablációs kísérletek számolnak be arról, hogy ennek a területnek az eltávolítása súlyos rendelleneségeket okozott, mint például a kamrasövény-defetus, truncus arteriosus communis persistens. Mindezen megfigyelések tették szükségessé a **szívtájéki ganglionléc** (cardiac neural crest) elkülönítését.

A **törzsi ganglionlécről** (trunk neural crest) delamináló sejtek hozzák létre a perifériás idegrendszer érző- és szimpatikus dúcait, a Schwann sejteket, valamint a mellékvese velőállományának sejtjeit (Serbedzija és mtsai 1994, Kuo és Erickson, 2010).

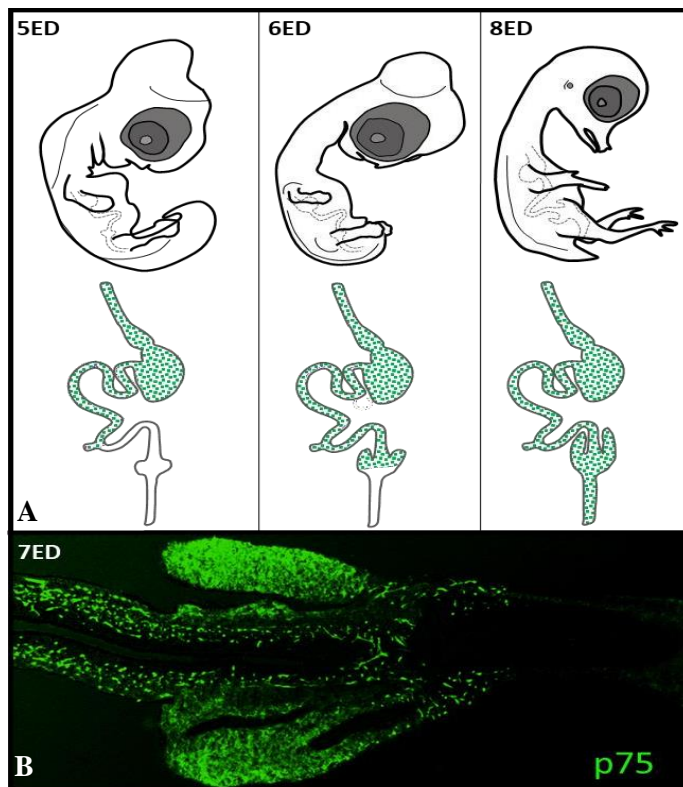
A **farki ganglionléc** (lumbosacralis ganglionléc, sacral neural crest) a 28. őscsigolyától caudálisan található. Sejtjei elsősorban a kismedencei zsigerek vegetatív beidegzését alakítják ki. Ezen felül, amint azt Le Douarin és Teillet 1973-ban csirke-fürj kiméra kísérletekkel igazolta, a lumbosacralis ganglionléc-sejtek is hozzájárulnak a bélidegrendszer kialakításához (Le Douarin és Teillet, 1973). Ezek a ganglionléc sejtek alakítják ki a madarakra jellemző extramurális Remak-gangliont, és úgy vélték, hogy a Remak-ganglion idegrostjain keresztül jutnak az utóbélbe a farki tájékról származó enterális idegsejtek, amelyek a vastagbél enterális neuronjainak kb 20%-át adják (Burns és mtsai., 2000; Burns és Le Douarin, 1998). Csirke embriókon végzett kísérletekkel tisztázták először, hogy bár a Remak-ganglion részt vesz a béltraktus extrinszik beidegzésében, a *plexus pelvicus* az, ahonnan az enterális ganglionsejtek származnak (Nagy és mtsai. 2007) (3. ábra, C).



3. ábra: A ganglionléc-sejtek migrációs útvonalai és bélidegrendszerrel alkotott fejlődéstani kapcsolata. (A) 66 órás csirke embrió keresztmetszetén SOX10 és HNK-1 dúlcélsejt markerekkel végzett fluoreszcens jelöléssel megfigyelhető a ganglionléc sejtek delaminációja és ventrális irányú vándorlása. **(B)** A ganglionléc (nc- neural crest)-sejtek velőcsőről(nt – neural tube) történő delaminációjának és migrációs útvonalainak ábrázolása. A CXCR4 receptort expresszáló szívtájéki ganglionléc-sejtek az 1-4 szomiták szintjén a velőcső dorzális felszínéről leválnak, majd dorzolaterálisan haladnak az őscsigolyák (s – somita) és az ektoderma között a garatívek és a szív felé, az ektoderma, a garatív-mezoderma, majd a szív közeli erek (Ao, aorta) mesenchymális sejtjei által szekretált Sdf-1 hatására. (Escot és mtsai. 2013). Az 1-7 szomiták szintjén a nyaki ganglionléc eredetű sejtek a velőcsőről leválva ventrálisan haladnak az őscsigolyák (s – somita) közt. Ebben a mezodermális környezetben a lokális retinsav (ra – retinic acid) hatására RET receptort expresszálnak (Ret+ sejtek), és elköteleződnek a bélidegrendszeri őssejtek irányába, majd az előbél felé fordulnak és az egész bélcatornát kolonizálják, kialakítva a bélidegrendszert (Nagy és Goldstein 2017, Kuo és Erickson 2010 után módosítva). **(C)** A ganglionléc régiói, valamint az ebből származó ganglionléc-eredetű őssejtek kolonizációs útvonala. A bélidegrendszert kialakító enterális ganglionléc sejtek a ganglionléc nyaki és farki régiójából származnak. A nyaki régióból (1-7 őscsigolyák szintje) származó enterális ganglionléc sejtek caudális irányba haladva kolonizálják a tápcsatornát. A farki régióból (28. őscsigolyától caudálisan) származó sejtek pedig ezzel ellenkezőleg, rostralis irányba haladva alakítják ki a vastagbél mellett dorsálisan haladó, madarakra jellemző Remak-gangliont (Nerve of Remak – NoR), valamint a *plexus pelvicut* (pp) melyek hozzájárulnak az utóbél beidegzéséhez (Gilbert és Baressi 2017 nyomán módosítva).

A gasztrointesztinális traktus nyaki ganglionlécsejtek általi rostrocaudális kolonizációja a csirkéhez hasonló módon történik zebrahal, egér és ember esetében is (Wang és mtsai., 2011; Young és mtsai., 1998, Wallace és Burns, 2005, Wallace és mtsai. 2005), pár különbséget leszámítva: emlősök esetén először a *plexus myentericus*, majd a *plexus submucosus* alakul ki, míg madarak esetén fordítva. Továbbra sem lehet tudni azt, hogy madarak és ember esetén is megfigyelhető-e kolonizáció során a ganglionléc-sejtek transzmezenterikus migrációja a középbélből egyenesen az utóbélbe a hashártyán keresztül, ahogyan azt egér embrióban kimutatták (Nishiyama és mtsai. 2012). A Remak-ideg hozzájárulását az utóbél beidegzéséhez madarak esetén sikerült tisztázni, de mivel ez egy madárspecifikus idegfonat, jogosan felvetődik a kérdés a farki-ganglionlécsejt-populáció szerepéről más amnióták esetén. Wang és mtsai. kísérleteik igazolták, hogy a farki ganglionléc emlősökben is részt vesz a *plexus pelvicus* kialakításában, egereken végzett vizsgálataik kimutatták, hogy a csirkéhez hasonlóan a farki-ganglionlécsejtek *plexus pelvicustól* a proximális utóbélbe nyúló idegrostok mentén vándorolnak, ahol neuronokká és gliasejtekké differenciálódnak (Nagy és mtsai., 2007; Wang és mtsai.. 2011).

A nyaki régióból származó ganglionléc-eredetű őssejteket (neural crest cells; NCC) amint beléptek a nyelőső mesenchymájába (embrionális kötőszövet) RET-receptort expresszáló enterális ganglionléc-eredetű sejtekké válnak (enteric neural crest-derived cells; ENCC). Ezek az ENCC sejtek caudális irányba haladva kolonizálják a teljes gasztrointesztinális traktust, miközben intenzíven osztódnak és differenciálódnak. A béltraktus kolonizációja során az élvonalban haladó, intenzíven migráló ENCC sejteket a szakirodalom "wavefront" sejteknek nevezi. Ezek a legelől haladó differenciálatlan progenitor sejtek fokozatosan kolonizálják a bélfal mesenchymáját, míg a mögöttük kb. 400 mikrométernyi távolságra található sejtek migrációja fokozatosan lecseng és elkezdenek neuron vagy glia irányba differenciálódni, kialakítva a bélidegrendszer két plexusát. Csirkében a "wavefront" sejtek 4,5ED stádiumban (4,5. Embrionális nap, embryonic day) a középbelet, a köldöki részt 5ED, a coecum telepét pedig 6ED stádiumban érik el. A 8ED embrionális stádium végére a teljes béltraktus kolonizációja lezajlik (4. Ábra, A). Ember esetén a ganglionlécsejtek craniocaudális migrációja az ötödik gesztációs héten kezdődik és a 12. hétre fejeződik be, míg ugyanez a folyamat egérben 5 napot vesz igénybe és a 9,5ED - 14,5ED embrionális korban zajlik le (Burns és LeDouarin 2002, Fu és mtsai. 2004, Goldstein és Nagy 2008, Nagy és Goldstein 2017).



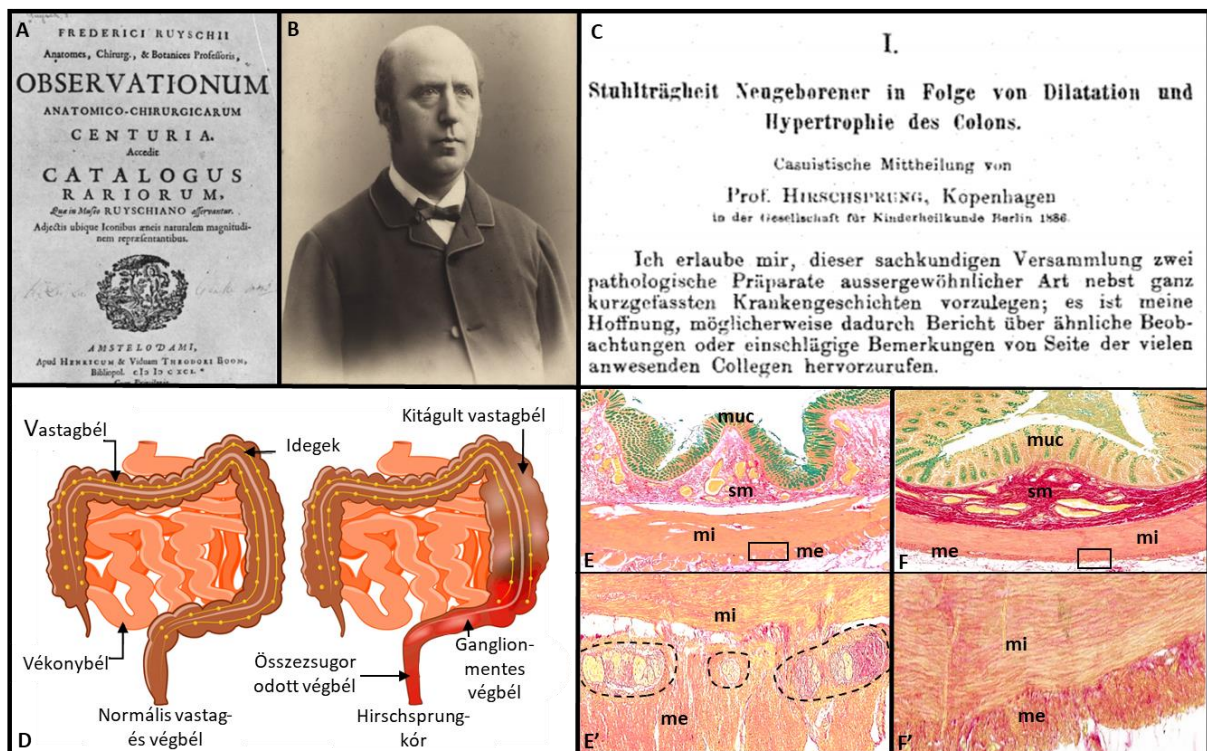
4. ábra: A béltraktus kolonizációja csirke embrióban. (A) A sémás rajz a béltraktus ganglionlécesjtes kolonizációját ábrázolja. A felső képsorban a különböző korú csirke embriók, alattuk a kolonizáció állapota (Goldstein és Nagy 2008 után módosítva). **(B)** Egy 7ED embrionális bél immunfluoreszcens technikával jelölt bélszakaszának hosszmetsete, bennük az utóbelet kolonizáló p75 neurotrophin-receptort expresszáló ENCC sejtek, amint épp elhagyták avakbél szakaszt és elkezdték az utóbél proximális szakaszának kolonizációját.

Valamennyi gerinces esetén az NCC sejtek enterális irányba történő elköteleződése már a korai migrációjuk során eldől, az őscsigolyák környezetében lokálisan termelődő retinsav hatására (3. ábra, B kép). A retinsav az NCC sejtek RAR retinsav-receptoraihoz kötődve aktiválja a RET tirozin-kináz-receptor expresszióját, amely kulcsfontosságú fehérje az enterális őssejtek további migrációjában (2.4 fejezet). Az embrionális fejlődés során a vándorló őssejtpopuláció tagjai és a bélcsőben differenciálódó sejtek megfelelő molekuláris markerekkel nyomonkövethetők. A velőcsőről levált NCC sejtek SOX10 és PHOX2B transzkripciós faktorokat és p75 neurotrophin-receptort expresszálnak. Az enterális vonal felé elkötelező ENCC őssejtek jelölésére az EdnrB- és RET-receptorok alkalmasak, míg az intenzíven vándorló “wavefront” sejtek azonosítása N-cadherin és L1CAM markerekkel lehetséges. A “wavefront” sejtpopuláció mögött a sejtek glia és neuron irányba differenciálódnak. A neuron irányba differenciálódó sejtek olyan korai neuron markereket fejeznek ki, mint a HuC/D neuronspecifikus RNS-kötő fehérje, béta-III-tubluin (TuJ-1) és CN (chick neurite marker), de elveszítik SOX10 expressziójukat. Ezzel ellentétben a glia irányba differenciálódó sejtek megőrzik SOX10 expressziójukat, majd a korai differenciálódás szakaszában Bfap-t (brain fatty acid protein), később Gfap-t (glial fibrillary acid protein) expresszálnak (Young és Newgreen 2001, Nagy és mtsai. 2012, Nagy és mtsai. 2017).

2.3 Hirschsprung-kór és a bélidegrendszer rendellenes fejlődése

1691-ben Fredericus Ruysch, holland anatómus egy fiatal gyermek erős alhasi fájdalomról és kórosan kitágult vastagbéléről tesz feljegyzést, munkája az *Observationum Anatomici- chirurgicarum Centuria*-ban jelent meg 1691-ben (5. ábra, A kép) (Leenders és Sieber 1970). Később egyre több hasonló esetről számoltak be, majd 1886-ban Harald Hirschsprung dán gyermekgyógyász (5. ábra, B kép) a jelenséget részletesebben leírta, emiatt később a betegséget róla nevezték el. A közlemény szerint két fiatal fiú halt meg hasi disztenzió (kóros puffadás), veleszületett megacolon és krónikus székrekedés következtében. A tanulmány 1888-ban jelent meg a "Gesellschaft für Kinderheilkunde-Berlin" c. folyóiratban "Constipation in the Newborn as a Result of Dilatation and Hypertrophy of the Colon" címmel (5. ábra, C kép). A számos korai megfigyelés ellenére a betegség etiológiája ismeretlen volt egészen 1949-ig. A bostoni Harvard Egyetemen sebész, Orvar Swenson ismerte fel először, hogy a Hirschsprung-kórt nem a rendellenesen kitágult vastagbél okozza, hanem a kitágult megacolon alatti bélszakasz születés előtti rendellenes aganglionotikus (ganglionmentes) fejlődése (5. ábra E-F képsorozatok), melynek következtében az állandó kontrakcióban van és nem képes kitágulni, ami megmagyarázza az eddig leírt kórosan kitágult vastagbélszakaszt, székrekedést és az ürítésre való képtelenséget (Swenson és mtsai. 1949, Kapur 2000, Holschneider és Puri, 2008).

A Hirschsprung-kór (HSCR) jelenleg csak sebészi beavatkozással orvosolható és hosszútávon ez további komplikációkkal (bélgyulladás, motilitási zavar, szövetpusztulás) járhat. Az elmúlt években egyre több információ látott napvilágot a bélidegrendszer embrionális fejlődésével kapcsolatban, valamint azonosításra kerültek azok az őssejtek, amelyek ennek kialakításáért felelősek. A regeneratív medicina felismerte az őssejt-transzplantációban rejlő lehetőségeket, de a hatékony őssejt-terápia kifejlesztéséhez kiemelten fontos, hogy feltérképezzük a ganglionléc-eredetű őssejtek mikrokozonyezetét, feltárjuk molekuláris kapcsolataikat, és megértjük differenciálódásukat, migrációjukat, proliferációjukat.



5. ábra A Hirschsprung-kór felfedezésének történeti áttekintése. (A) F. Ruysch's 1691-ben megjelent könyvének első oldala, amelyben elsőként került leírásra a congenitális megacolon jelenség (Leenders és Sieber 1970). (B) Harald Hirschsprung portréja (Google). (C) H. Hirschsprung közleményének fejléce, melyben leírja a megacolon. (D) A betegség vázlatos ábrázolása: a disztális vastagbélszakasz, valamint a végbél területén a bélidegrendszer nem fejlődik ki, hiányoznak az enterális ganglionok, melynek következtében az érintett régió előtti bélszakasz kórosan kitágul. (TeachMePaediatrics nyomán módosítva). (E) Egy kilenc hónapos HSCR kórbán szenvedő kislány egészséges bélszakaszának keresztmetszete (muc- mucosa, sm- submucosa, mi- muscularis interna, me- muscularis externa). (E') E kép feketével bekeretezett területének nagyított képe, szaggatot vonalakkal kiemelve a bélidegrendszer *plexus myentericus* ganglionjai az egészséges bélszakaszon. (F) Ugyanazon kislány aganglionotikus bélszakaszának keresztmetszeti képe. (F') Az F kép feketével bekeretezett területének nagyított képe. Az enterális ganglionok hiányoznak a külső (me) és belső (mi) simaizomrétegek közül. A szövettani metszeteken perjódsvav-biszulfit-alcianzöld festést alkalmaztunk: a sejtmagok barnák, a fibrin, gliarostok, citoplazmák, zsírszövet és vörösvértestek sárgák, a nyákok zöldek, a szarkolemma, kötőszöveti hyalin és kollagénrostok vörösek. (Dr. Krutsay Miklós, Patológiai technika, 182. old, 1999, Medicina)

2.4.1 A Hirschsprung-kór kialakulásának molekuláris háttere

A gasztrointesztinális traktus ENCC sejtek általi benépesítése során, míg a frontvonalban haladó, intenzíven vándorló "wavefront" sejtekek intenzíven osztódnak és invazívak, addig a mögöttük levő sejtpopuláció migrációja lassan lecseng, és neuron vagy gliasejtekké differenciálódva kialakítják a bélidegrendszert. A bél kolonizációjához tehát három fontos folyamat (migráció, proliferáció és differenciáció) szinkronizálása és pontos koordinálása elengedhetetlen. Amennyiben az ezeket szabályozó molekuláris mechanizmusok sérülnek, a HSCR-ra jellemző neurointesztinális zavar alakul ki.

A bélidegrendszer fejlődésében az egyik legfontosabb szignalizációs útvonal a RET-jelátvitel, amelynek sokrétű hatása van a bélidegrendszer kifejlődésére. A RET egy tirozinkináz-receptor, melynek aktiválója a gyomor és bél mesenchymájában termelődő GDNF (Glial cell line-derived neurotrophic factor). A GDNF elsősorban az ENCC sejtek migrációjáért felelős erős kemoattraktáns hatású növekedési faktor, mely legelőször a gyomorban expresszálódik, és biztosítja az ENCC sejtek további migrációját a középbel felé. Második expressziós helye a coecum telepe, mely organizátor centrumként egy újabb migrációt stimuláló zónát jelent a vándorló ENCC sejtek számára. *In vitro* kísérletekkel is igazolták, hogy kollagén gélbe oldott GDNF hatására a tenyészetbe kihelyezett embrionális bélszakaszokból a ganglionlécsejtek intenzív kivándorlása figyelhető meg (Fu és mtsai. 2004, Nagy és Goldstein 2006). A GDNF-RET szignálút vonal esszenciális a ganglionléc sejtek túléléséhez, proliferációjához, migrációjához és differenciálódásához az általa aktivált MAPK-kaszád és IP3-jelátviteli folyamatok révén. A korábban említett retinsav jelenléte mellett, a SOX10 és PHOX2B transzkripciós faktorok expressziója is szükséges a RET expressziójához. Ezeknek a géneknek a mutációi a HSCR esetek több mint 50%-át okozzák (Pattyn és mtsai., 1999, Gabriel és mtsai., 2002, Asai és mtsai., 2006, Nagy és Goldstein, 2008, Nagy és mtsai., 2012, Nagy és Goldstein, 2017)

Egy másik kulcsfontosságú növekedési faktor az endothelin-3 (Et3) peptid, amely szintén a bél mesenchymájában termelődik és az ENCC sejtek G-fehérjéhez kapcsolt endothelin-receptor-B (EdnrB) receptorához kötődik. Mutációjuk a colorectális bélszakasz aganglionózisához vezet (Mccallion és Chakravarti, 2001). Nagy és Goldstein csirke embrión végzett kísérletei igazolták, hogy az endothelin-3 kezdetben a vakbél majd az utóbél szintjén expresszálódik – 24 órával azelőtt, hogy az ENCC sejtek elérnék ezt a bélszakaszt. Az Et3-EdnrB-jelátvitel gátlása aganglionotikus fenotípust eredményezett az utóbél szintjén. Csirke embrión végzett kísérleteik megerősítették az Et3-EdnrB jelátvitel egérben már korábban megfigyelt szerepét: az Et3 az ENCC sejtek differenciációjára is hat, hiszen a migrációt indukáló hatása mellett gátolja a prekursor sejtek neuron és glia irányú differenciálódását (amit a GDNF indukál), ezáltal biztosítva a folyamatosan vándorló és osztódó őssejtpopuláció fennmaradását (Nagy és Goldstein, 2006, Nagy és Goldstein, 2008).

A GDNF és Et3 mellett számos egyéb mesenchymális eredetű növekedési faktorról derült ki, hogy a bélcső fejlődésének szabályozásán túl a bélidegrendszer sejteire is hatnak. Ide sorolható a VEGF, CXCL12 és a BMP-4 növekedési faktorok, amelyek a bélfal ereinek és simaizom szövetének differenciálódásának szabályozása mellett a ganglionléc sejtek bélben történő fejlődését is irányítják (Goldstein és mtsai., 2005, Nagy és mtsai., 2009, Ding, 2013).

A BMP fehérjék a TGF- β (transforming growth factor β) növekedési faktorok szupercsaládjához tartoznak, számos celluláris folyamatot képesek irányítani, beleértve a proliferációt, differenciációt, migrációt, sej- sejt kapcsolatok kialakítását és az apoptózist is. Bár nevüket a csontfejlődésben kiemelt szerepükről kapták, részt vesznek a ganglionléc eredetű sejtek velőcsőről való leválásában, osztódásában, apoptózisában, migrációjában és differenciálódásában is (Kléber és mtsai., 2005, Obermayr, 2013).

A BMP-jelátvitel szerepét a tápcsatorna szervfejlődésében és a bélidegrendszer kialakításában is felismerték. PCR technikával mutatták ki a BMP-fehérjék expresszióját a bél mesenchymájában, valamint receptoraik expresszióját az ENCC sejtekben. A BMP-jelátvitel a bél belső mesenchymális rétegében meggátolja a simaizom kifejlődését, kijelölve a bélfal simaizomrétegeinek és a bélidegrendszer plexusainak helyét a fejlődő bélmesenchymában (Sukegawa et al., 2000, Chalazonitis és Kessler, 2012). A BMP-4 jelátvitel mesterséges fenntartása esetén differenciálatlan bélmesenchyma és aganglionózis figyelhető meg, a jelátvitel gátlása muszkuláris hipertrófiát, és rendellenes bélidegrendszer fejlődést eredményezett (De Santa Barbara és mtsai., 2005). Az enterális ganglionléc-eredetű sejteken végzett *in vitro* kísérletek a glia irányú differenciáció serkentését írták le BMP-4 hatására, mely által a bél mesenchyma szabályozhatja a kialakuló bélidegrendszer megfelelő glia/neuron arányát (De Santa Barbara, 2005, Chalazonits és mtsai., 2011). Továbbá laboratóriumunkban enterális ganglionléc-eredetű sejtek aggregációját (gangliogenezis) figyeltük meg BMP-fehérjék hatására, melyet korábban is megfigyeltek (Chalazonitis és Kessler., 2012). BMP-4 hiányában a ganglionképzés elmaradt. Csirke és egér embriókon végzett kísérletek ellentmondásos eredményeket mutatnak: csirke embrióba injektált Noggin fehérje gátolta a BMP-4 mediált jelátvitelt, aminek hatására hypoganglionózis figyelhető meg. Ezzel szemben embrionális egér szervtenyészetekben a BMP-4 gátolta az enterális ganglionléc-eredetű sejtek migrációját a bélcsatornában és serkentette az idegek korai fasciculációját (rostösszezapződés) (Chalazonitis és mtsai., 2004, 2011, 2012; Goldstein és mtsai., 2005, Fu és mtsai., 2006.). A BMP-jelátvitel szerepe a bélidegrendszer fejlődésében, az egymással ellentmondó kísérleti eredmények miatt nem teljesen világos.

2.5 3D sejt-kultúrák: spheroidok és organoidok

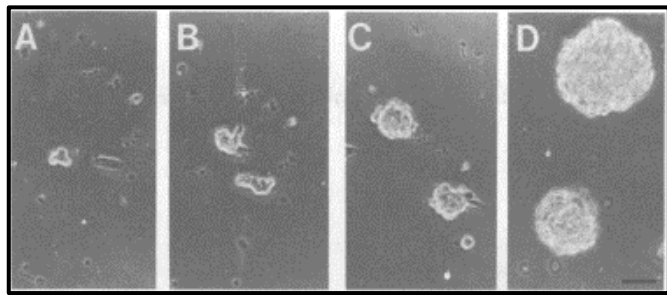
Az állatmodellek és sejt-kultúrák használata a modern kísérletes orvoslásban és betegségkutatásban elengedhetetlen, de megvannak a maguk korlátjai. Az állatkísérletek komoly etikai és morális aggályokat vetnek fel a tudóstársadalomban is, továbbá az állatok gyakran az embertől eltérő válaszokat produkálhatnak különböző patogénekre, gyógyszermolekulákra, sőt egyes betegségek lefolyása is eltérhet. Mindemellett az ún. „monolayer” sejt-kultúrák nem képesek emberi szöveteket/szerveket valóságosan imitálni, ami különböző gyógyszerek hatékonyság-vizsgálatát jelentősen megnehezítik (Sakalem és mtsai., 2021). Emiatt a kutatók további alternatívákat keresnek, amelyek egyszerre válthatják fel az állatkísérleteket, és modellezhetnek sokkal pontosabban humán szöveteket/szerveket és segítségükkel kórélettani állapotokat. Az elmúlt évtizedben robbanásszerűen elterjedt a 3D sejt-kultúrák használata és fejlesztése. A 3D sejt-kultúrák komplex sejt-sejt és sejt-extracelluláris mátrix kapcsolataik révén sokkal jobban képesek modellezni egy-egy vizsgálni kívánt szervet/szövetet elkerülve a szervek élő állatokból való eltávolítását. Ezek a biológiai struktúrák lehetővé teszik különböző sejt-típusok funkciójának és fejlődésének vizsgálatát az embriogenezis, morphogenezis és organogenezis folyamataiban egy *in-vivo* állapothoz sokkal inkább hasonlító megfigyelési rendszerben. A jelenleg legelterjedtebb 3D struktúrák a spheroidok és organoidok (Zanoni és mtsai., 2020, Kim és mtsai., 2023)

A spheroidok olyan kisebb sejtaggregátumok, melyek több, összetapadásra nagy tendenciát mutató, de csak egy féle szövetet létrehozó sejt-típus alkot. Ezek a bőséges kémiai és mechanikai kölcsönhatásokat lehetővé tevő, 3D multicelluláris struktúrák *ex vivo* szövetmodellekben saját tápanyag-, gáz- és növekedési faktor grádienseket produkáltak (Cui és mtsai., 2017). Emiatt például az őssejt-eredetű spheroidok kiemelkedő fontossággal bírnak a regeneratív medicinában. Sejtmegújító, differenciált sejt-típusokat létrehozó és fehérjéket szekretáló tulajdonságaik miatt jelenleg számos törekvés irányul az őssejtspheroidok transzplantációjára, amelyekkel számos csont-, kötő-, izom-, ideg- és bőrszöveti rendellenesség gyógyítását célozzák meg, elkerülve a transzplantációk során sokszor fennálló bioinkompatibilitási problémákat. (Lane és mtsai., 2017, Woochan, Kim és mtsai., 2023).

Ezzel ellentétben az organoidok olyan őssejtekből, vagy indukált pluripotens őssejtekből (iPSC) származtatott miniatűr szerv-modellek, amelyek egy natív szerv specifikus struktúráját és funkcionális jellegzetességeit mutatják. Jelenleg az organoidok olyan transzplantációs eszközzé váltak, amelyek potenciálisan helyettesíthetnek vagy regenerálhatnak egy nagyobb sérült vagy diszfunkcionális szövetet, szervet (Kim és mtsai., 2018, Roper és mtsai., 2017)

2.5.1 Enterális neurospherek képzése és transzplantációjuk egér és humán szervezetben

A neurospherek komplex spheroid struktúrák, amelyek 1992-ben kerültek leírásra, amikor Reynolds és Weiss egy egér disszociált agyszövetéből EGF-hatására a tenyésztőmédiumban lebegő spherikus struktúrákat figyeltek meg (Reynolds és Weiss, 1992). Később ezekben a neurospherekben éppen differenciálódó GFAP+ gliasejteket, B-III-Tubulin+ neuronokat és ezeket körülvevő Nestin+, EGFR+, integerin-1+ és differenciálatlan sejteket



6. ábra. Reynolds és Weiss felvételei az első egér striatumból képzett neurospherekről. (A) két nap tenyésztés után megfigyelhető volt az első sejtosztódás. A sejtek tovább osztódtak a harmadik (B) és negyedik (C) napon, sejtaggregátumokat alkottak és elkezdtek leválni a felszínről. (D) nyolc nap után az aggregátumok megnöttek és már a médiumban lebegtek. (Reynolds és Weiss, 1992)

azonosítottak (Campos et al., 2004). Kezdetben ezeket a neurosphereket az idegi őssejtek multipotenciájának és önmegújítókéességének vizsgálatára használták. Nemsokkal később az 1992-ban megfigyeltekre alapozva 2004-ben Schäfer és mtsai. sikeresen izoláltak először enterális neurosphereket egérbélből, bár nem nagy hatásfokkal, a sejtek nagyrésze ugyanis elpusztult a tenyésztés során (Schäfer és mtsai. 2004).

Napjainkban intenzíven zajlanak a neurosphere-transzplantációt végző kutatások, hiszen Schäfer és mtsai (2004) felfedezése megnyitotta kapuit a regeneratív medicina számára, hogy bélidegrendszer fejlődési zavarait (pl. HSCR) invazív sebészeti megoldások helyett őssejt-transzplantáció révén próbálja meg orvosolni a kóros állapotot a jövőben.

Neurospherek képzése lehetséges úgy felnőtt, újszülött, mint embrionális korú szervezetből is, a transzplantációs kísérletek pedig igen ígéretesek. Lindley és mtsai. 2008-ban leírták, hogy embrionális egér és újszülött humán bélből származó enterális neurospherek ganglionmentes gyomorba való transzplantálását követően a neurospherek sejtjei sikeresen kolonizálták a gyomrot, és funkcionális, összehúzódást kiváltani képes neuronokat hoztak létre (Lindley és mtsai., 2008). Később pedig sikerült kimutatniuk, hogy a primer enterális neurospherek disszociáltatása révén szekunder és terciér tenyészeteket létrehozva növelhető a p75+ progenitor és a PGP9.5+ neuronok száma (Lindley és mtsai., 2009). Hotta és mtsai. leírták, hogy embrionális és posztnatális egér eredetű enterális neurospherek transzplantációját követően a fogadó utóbél falában enterális ganglionokra emlékeztető képleteket figyeltek meg, az ezekben jelenlevő neuronok pedig a tipikus enterális neuronokra hasonló morfológiai,

neurokémiai és elektrofiziológiai jellegekkel bírtak (Hotta és mtsai., 2013). Fontos mérföldkő volt a felismerés, miszerint HSCR kórban szenvedő betegek ganglionotikus bélszakaszából is lehetséges neurosphereket képezni. Továbbá, ezen neurospherek proliferációs és neurogén potenciáljuk hasonló a nem HSCR donorokból képzett neurospherekétől, a bennük levő enterális progenitor sejtek embrionális ganglionléc-eredetű sejtekként viselkednek. (Cheng és mtsai., 2017). Chen 2022-ben végzett eredményes kísérletei során minimálisan invazív transz-anális injektálás révén disszociált enterális neurosphere sejteket juttatott a fogadó egér rektális submucosájába. A beavatkozás eredményeképp a rektális szakaszba injektált neurospherekből származó enterális sejtek egészen a vakbél szintjéig vándoroltak, és kimérikus *plexus myentericus* ganglionokat képeztek, melyeknek 41,2-67.5%-át alkották a donor enterális idegsejtjei (Chen, 2022).

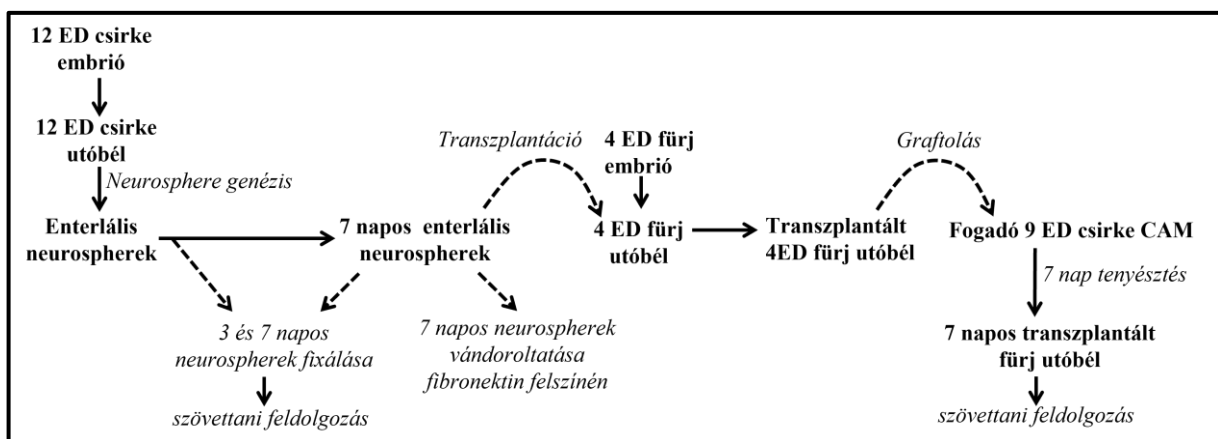
Az enterális neurospherek képzése az első leírásuk óta az alap tenyésztési oldatba oldott FGF, EGF, heparin, ILGF (insulin-like growth factor), FGF2 növekedési faktorokkal történik, azonban folyamatos kutatások vizsgálják, hogy milyen egyéb faktorokkal növelhető a neurosphere képzés hatékonysága és annak neurogenikus potenciálja. Cheng és mtsai leírták, hogy a tenyésztőmédiumba oldott GDNF (glial-cell-line-derived neurotrophic factor (GDNF)) hatására a neurospherek szignifikánsan több ganglionléc eredetű progenitorsejtet tartalmaznak, valamint sokkal több enterális neuront produkálnak (Cheng és mtsai., 2016). McKeown és mtsai. Ezt megerősítették, illetve kimutatták, hogy a GDNF szignifikánsan növeli a neurospherek méretét és túlélési arányát, valamint az idegsejtek migrációs távolságát (McKeown és mtsai., 2017). Az enterális neurospherek képzésének magasabb hatásfoka és a transzplantációk sikeressége érdekében azonban fontos, hogy további faktorok hatását is megvizsgáljuk, amelyekkel tovább optimalizálhatjuk a neurospherek alkalmazására mutató kísérletek eredményességét, növelhetjük neurogén potenciáljukat, enterális progenitorsejt tartalmukat.

III. Célkitűzések

Az enterális neurospherek transzplantációja reális megoldást jelenthet a Hirschsprung-kór gyógyításában, azonban nem sikerült még eléggé részletesen feltérképezni a neurosphere-genezis pontos folyamatát, illetve a folyamatban közrejátszó biológiai növekedési faktorok szerepét. Ezek mellett fontos szempont, hogy a technikát egy más modellszervezetben is alkalmazni tudjuk, mely árnyalhatja az eddig megszerzett ismereteket, és bővítheti azokat további eredményekkel, felfedezésekkel. Mivel a csirke a fejlődésbiológia és a bélidegrendszer kutatásának fontos modellszervezete, azonban csirkére optimalizált neurosphere-technika jelenleg nincs, de a vele együtt járó előnyök okán (nagy mintaszám, egyszerűbb kísérleti rendszer, könnyebb hozzáférhetőség) erre nagy igény mutatkozik, kísérletes munkám során az alábbi célokat tűztem ki:

- 1) Neurosphere technika kidolgozása és enterális neurospherek generálása csirke kísérleti modellrendszerekben
- 2) Neurospherek karakterizálása, tenyésztési körülményeinek optimalizálása
- 3) Enterális neurospherek transzplantációja ganglionmentes utóbélbe

Célkitűzéseim elérése érdekében kísérletes munkámhoz témavezetőm segítségével az alábbi kísérleti tervet (7. ábra) állítottuk fel:



7. ábra: A kísérletes munka során felállított kísérleti terv. A 12 napos embrióból származó utóbél szakaszból sejtenyésztéssel enterális neurophereket hoztam létre. Ezeket a neurophereket hét napig tenyésztettem (a harmadik és hetedik napon is elkülönítettem fixálásra szánt sphereket az immunhisztokémiához), majd a hetedik napon ezeket a neurophereket 4 napos fűj embrióból izolált coecum telepekkel rendelkező bélszakaszba transzplantáltam. A transzplantált szerveket egy kilenc napos csirke embrió CAM membránján további hét napig a tojást visszazárva inkubátorban tenyésztettem, majd a hét nap alatt kifejlett szervet izoláltam, fixáltam és feldolgoztam (4.2.3.,4.3,4.4). A transzplantáció során nem felhasznált hét napos neurosphereket fibronektinnel bevont Petri-csészékben tenyésztettem tovább egy napig (4.5.3). **Félkövér betűtípus:** biológiai szerv, szervezet, struktúra; **dőlt betűtípus:** tevékenység, folyamat; **szaggatott vonal:** biológiai struktúra áthelyezése).

IV. Anyagok és módszerek

4.1 Kísérleti állatok

A kísérleteim során SPF (*specific pathogen free*) csirke (*Gallus gallus*, White Leghorn SPF, Ceva-Phylaxia Oltóanyagtermelő Zrt., Magyarország) és fürj (*Coturnix coturnix*) embriókat használtam modellszervezetként. A csirke- és fürjtojásokat a laboratórium keltetőgépeiben 37°C-os hőmérsékleten, 90%-os páratartalom mellett inkubáltam felhasználásig. Az embrionális kort a továbbiakban embrionális napokban fejezem ki (ED - embryonic day). A kísérleti célokra felhasznált állatok tartása és feldolgozása megfelelt az állatvédelmi törvényekben előírtaknak és a Semmelweis Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottságának (MÁB) jóváhagyásával történt.

4.2 A szöveti minták feldolgozása

4.2.1 Az embriók utóbelének izolálása

A 12 ED donor csirke- illetve 4ED fogadó fürj embriókat perforált Moria típusú kanállal kiemeltem a tojásból, majd 30°C-os penicillin-sterptomycint [PenStrep, Sigma P0781] tartalmazó foszfáttal pufferelt sóoldatba (NaCl, KCl, Na₂HPO₄·2H₂O, KH₂PO₄ oldata, továbbiakban PenStrep-PBS) helyeztem. Következő lépésben sztereomikroszkóp alatt, mikropreparációra alkalmas eszközökkel (mikroolló, embriómanipulációra alkalmas csipeszek, embriókanál – Fine Science Tools, USA) az embriót felnyitottam és a béltraktust izoláltam, majd kimetszettem a kísérletekhez szükséges utóbelszakaszt. Az izolált szerveket neurospherek képzésére szánt protokoll szerint használtam fel (4.5.1 fejezet), vagy immunhisztokémiai vizsgálatokra alkalmas fagyasztott zselatinos blokkot készítettem belőlük (4.2.3, 4.3, 4.4 fejezetek).

4.2.2 Kipreparált szervek és neurospherek fixálása és beágyazása, zselatinos-szacharózos fagyasztott blokk készítése.

A kipreparált szerveket 4%-os paraformaldehidet (PFA – pH 7,4, Sigma) tartalmazó penicillines üvegcsébe helyeztem, és szobahőmérsékleten 60 percig fixáltam, majd 3x5 perc PBS mosás után a szerveket 15%-os szacharóz (Reanal puriss, 07140-0-08-38) 0,1M-os foszfát puffer oldatában (PBS, pH=7,2) inkubáltam egy éjszakán át 4°C –on. Következő nap a szacharóz oldatot lecseréltem zselatin-oldatra (PBS-ben oldott szacharóz (15%) és zselatin [7,5%, Sigma, G2500] oldata) és a szerveket 1,5 órán át, 37 °C-on inkubáltam. Neurospherek esetén a fixálást csak 30 percig végeztem, és a zselatinban való inkubálás csak

20 perc volt. Inkubáció alatt műanyag tálkákba egy réteg 37 °C-os zselatint pipettáztam ami az inkubálás alatt megszilárdult. Az inkubálás után a szerveket a megszilárdult zselatin rétegre helyeztem. Tíz perc várakozás után az üvegcsében levő zselatint a szervekre töltöttem és befedtem őket. Az elkészített zselatin blokkokat szobahőmérsékleten hagytam, hogy megszilárduljanak, majd kocka formára vágtam. Megjelöltem a szervek elhelyezkedését, hogy a metszés során orientálni tudjam a szerveket, ezután a zselatin blokkokat feliratozott kartonpapírra helyeztem és folyékony nitrogénben lehűtöttem, -50 °C-os izopentánba (2-metilbután, Sigma M32631) 60 másodpercig mártva lefagyasztottam. A fagyasztott blokkokat metszésig -80 °C-on tároltam.

4.3 Fagyasztott metszetek készítése

A metszést Shandon gyártmányú kriótómmal -26°C-on végeztem. A 12 µm vastag metszeteket poly-L-Lysine-nel (Sigma, P8920) bevont tárgylemezekre vettem fel, majd felhasználásig -20 °C-on tároltam.

4.4 Immunhisztokémia

Immunfluoreszcens jelölés (kétszeres, háromszoros)

A metszeteket üveggövedtában 37°C-os PBS-ben 15 percig rehidráltam, majd rá mértem a PBS-BSA-ban hígított primer ellenanyagot (I. táblázat) (40-60 µl/metszet), amelyet egy órán át inkubáltam szobahőn, nedveskamrában. 3x5 perces PBS mosást követően fluorokrómmal jelölt, a primer ellenanyagot felismerő szekunder ellenanyagot (II. táblázat) mértem rá a metszetekre, melyet PBS-ben hígítottam 1:100 vagy 1:200-as hígításban (fluoreszcens immunjelölésnél a szekunder ellenanyagot nem hígítjuk PBS-BSA-ban, mivel a Na-azid gyengíti a fluoreszcenciát). A következő lépéseket a fluorokróm fényérzékenysége miatt fénytől védett helyen végeztem. 45 perces inkubálás után ismételt 3x5 perces PBS mosás következett. A sejtmagok kimutatására DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole dihidrochloride, Invitrogen, D1306) reagenst használtam, PBS-ben hígítva, 1µg/ml arányban. Ezt 10 percig hagytam a metszeteken, a 10 perc inkubálás után 3x5 perces PBS mosás után, majd lefedtem. Kétszeres és háromszoros immunfluoreszcens jelölés esetén az első primer ellenanyagot felismerő szekunder ellenanyaggal való inkubálás után a protokoll kiegészült a második/harmadik primer ellenanyaggal illetve a velük kompatibilis szekunder ellenanyaggal való inkubálással az antigénspecifitás törvényeinek figyelembevételével.

1. táblázat: Az immunhisztokémiai jelölés során használt primer ellenanyagok listája

Ellenanyag	Megjelölt struktúra	Azonosított sejttípus	Ellenanyag specificitás	Forrás
SOX10	Sox10 transzkripciósfaktor	Ganglionléc-eredetű sejtek	Egér IgG	Santa Cruz (sc-365692)
p75	p75 neurothrophin-receptor	Enterális ganglionléc-eredetű sejtek	Nyúl IgG	Promega (G3231)
HNK-1	3-Szulfoglükuronozil epitóp	Enterális ganglionléc-eredetű sejtek	Egér IgM	DSHB
TuJ-1	β -III-tubulin	Csirke idegrostok	Egér IgG2a	Santa Cruz (sc-80016)
HuC/HuD	Neuron specifikus ELAV-like protein 3	Enterális neuronok	Egér IgG2b	Invitrogen (A-21271)
Bfabp	Brainy fatty acid protein	Enterális gliasejtek	Nyúl IgG	Dr.Thomas Müller
SMA (1A4)	α -simaizom-aktin	Csirke simaizom sejtek	Egér IgG2a	DAKO (MO851)
GIIF3	γ enterális-simaizom aktin	simaizom sejtek	Egér IgG1	Nagy és mtsai. 2001
Calponin	Calponin Ca ²⁺ kötő fehérje	simaizom sejtek	Egér IgG1	Sigma-Merck
CN	Ismeretlen neurális antigén	Csirke neuronok	Egér IgG1	Tanaka és mtsai. 1990
QCPN	Ismeretlen perinukleáris epitóp	Fürj sejtek	Egér IgG1	Tanaka és mtsai. 1990
8F3	Ismeretlen citoplazmatikus antigén	Csirke sejtek	Egér IgG1	DSHB

2. táblázat: Az immunhisztokémiai jelölés során használt szekunder ellenanyagok listája

Ellenanyag neve, faj- és izotípus specificitása	Gerjesztési hullámhossz	Beszerezés (katalógusszám)
Számárban termelt anti-egér IgG(H+L)	488	Invitrogen-Life Technologies (A21202)
Számárban termelt anti-egér IgG(H+L)	594	Invitrogen-Life Technologies (A21203)
Számárban termelt anti-egér IgG(H+L)	647	Invitrogen-Life Technologies (A31571)
Kecskében termelt anti-egér IgG1	594	Invitrogen-Life Technologies (A21125)
Kecskében termelt anti-egér IgG2a	488	Invitrogen-Life Technologies (A21131)
Kecskében termelt anti-egér IG2b	594	Invitrogen-Life Technologies (A21145)
Kecskében termelt anti-egér IgM	594	Invitrogen-Life Technologies (A21044)
Kecskében termelt anti-egér IgM	488	Invitrogen-Life Technologies (A21042)
Kecskében termelt anti-nyúl IgG(H+L)	647	Invitrogen-Life Technologies (A32795)

4.5 Embriómanipuláció

4.5.1. Neurospheres képzése az izolált utóbélszakaszokból

A neurospheres képzéséhez egy egérre optimalizált protokollt és oldatokat használtam, mivel csirke-specifikus sejttenyésztési protokoll jelenleg nem elérhető. A neurospheres tenyésztését 6 lyukú sejttenyésztő edényekben végeztem [Nunc Cell-Culture Treated Multidishes, ThermoFisher Scientific, kat:140675]. A műanyag felszín steril fülke alatt a sejtek kitapadását gátló, 2ml Anti-adherens rinsing solution-nel [Stem Cell Technologies; kat:07010] kezeltem, az edényt lefedtem, majd egy órára rázógépen [SU-10i, Biosan] 80 rpm sebességgel kevertetem. Egy óra elteltével az anti-adherens rinsing solution-t leszívтам, 2x5 perc steril PenStep PBS mosást követően további használatig Modified NeuroCult Basal Medium (NBM) oldattal töltöttem fel a plate-et (490 ml NeuroCult Basal Medium (Mouse & Rat) [StemCell Technologies; kat:05700] + 5 ml Penicillin/Streptomycin PBS.

Az izolált utóbélszakaszokat (7-8db) több apró darabra vágtam (annak érdekében, hogy a szövet emésztése hatásosabb legyen) melyeket egy 50 ml-es Falcon csőbe [Eppendorf; kat: 0030122151] helyeztem, majd a szövetdarabokhoz 2-3 ml emésztő enzim-keveréket (2 ml diszpáz II [5U/ml ; StemCell Technologies, kat. 07913] + 2.5 mg kollagenáz XI [800U/mg, Sigma, kat:C9722-50MG] + 4 ml NBM) pipettáztam. A szervdarabokat tartalmazó csövet 15 percenkénti vortexelés mellett 45 percre 37°-os vízfürdőbe raktam. Az emésztési idő alatt elkészítettem a sejttenyésztő-edény rekeszeibe a négy különböző sejttenyésztő médiumot, amelyekben a neurosphereset tenyésztetem:

1. PMC (Ploriferation Medium with Cytokins), mely a következőkből állt össze:

- 3ml Ploriferation Medium (1 ml Neurocult Proliferation Supplement (Mouse & Rat) [StemCell Technologies; kat: 05701] +9 ml Modified NeuroCult Basal Medium)
- 6,66 µl alap fibroblaszt növekedési faktor [bFGF; 10 ng/ml; StemCell Technologies; kat:78003]
- 6,66 µl Heparin-oldat [StemCell Technologies; 0.2%; kat:07980]
- 13,3 µl epidermális növekedési faktor [EGF; 20 ng/ml; StemCell Technologies; kat:78016]

2. PMC+GDNF – 3ml PMC+3µl GDNF [10 µg/ml; R&D Systems]

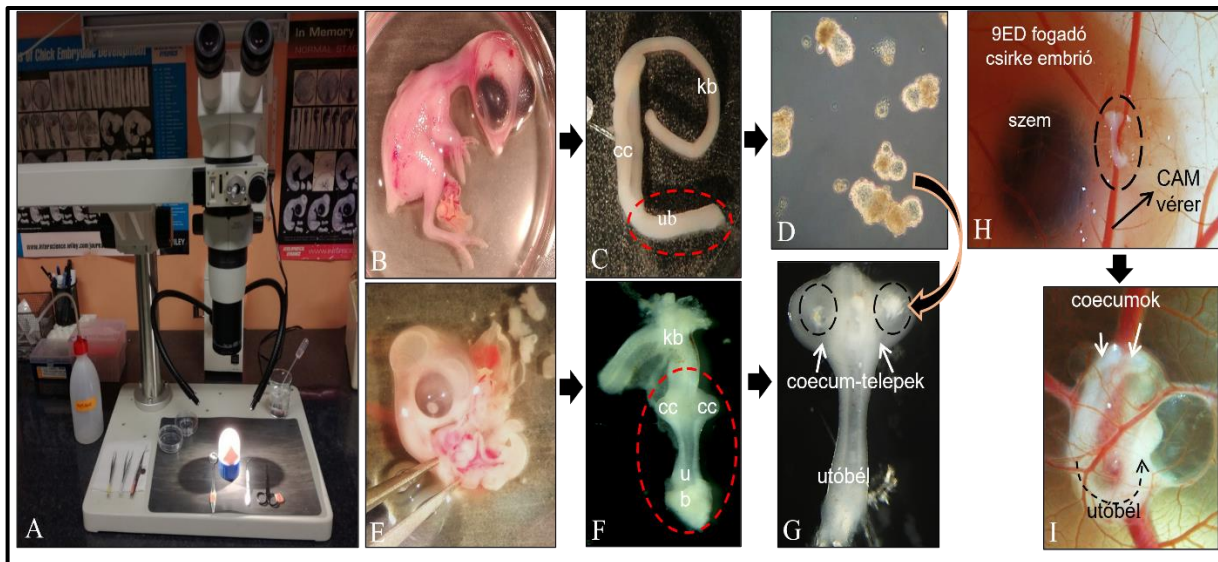
3. PMC+ GDNF+ Noggin – 3ml PMC+ 3µl GDNF (10ng/ml) + 3µl Noggin (100ng/ml) [R&D Systems, rm Noggin (aa28-232), 25µg, recombinant mouse (NSO-derived) >95% purity, 6997-WG]

4. PMC+ GDNF+ BMP-4 – 3ml PMC+ 3µl GDNF (10ng/ml) + 3µl BMP-4 (100ng/ml) [R&D Systems, rm BMP-4, 10µg, recombinant mouse (CHO-derived) >95% purity, 5050BP]

A 45 perc emésztési idő után az 50ml-s falcon-cső tartalmát 20ml-ig kiegészítettem NBM médiummal, ezzel leállítva az emésztést. Ezt követően a 20 ml oldatot átszűrtem sejtszűrő [Corning 40 μ m Cell Strainer; kat:431750] segítségével egy üres Falcon-csőbe. Az átszűrt oldatot, mely csak az izolált sejteket-sejtcsoportosulásokat, de nagyobb szövetdarabkákat már nem tartalmazott, nyolc percig 1500 rpm-en (500 g) centrifugáltam. A centrifugálás után a felülúszót leöntöttem, a visszamaradt pelletet (sejtek) pedig egy ml meleg NBM-ben reszuszpendáltam. 50 μ l sejtsuszpenzió + 450 μ l 4%-os tripánkék oldat (mely segíti az élő és elhalt sejtek elkülönítését) keverékéből Bürker kamra segítségével sejtszámot állapítottam meg (egy ml sejtsuszpenzió 7 100 000 sejtet tartalmazott), majd a 3ml médiumot tartalmazó well-ekbe 158 μ l sejtsuszpenziót pipettáztam (a megmaradt 950 μ l sejtsuszpenzió/ 6), majd újabb sejtszámot állapítottam meg (177 244 sejt/ml). Az így elkészült négy különböző médiumot tartalmazó hat lyukú edényt hét napig inkubátorba raktam. A harmadik és hetedik napon mindegyik kezelésből a keletkezett neurospheres egy részét szövettani feldolgozás (4.2.2, 4.3, 4.4) céljából felhasználtam, a többit a hetedik napon transzplantáció és vándoroltatott sejttenyésztés készítése során használtam fel (4.5.2, 4.5.3)

4.5.2. Neurosphere transzplantáció és CAM-graft tenyésztés

4ED fűrj embriók (8. ábra, E) béltraktusának disztális szakaszát (coecum+utóbél – 8. ábra, F) steril körülmények között izoláltam 37°C-os PenStrep-PBS-ben. A transzplantációra megfelelő (PMC, PMC+GDNF, PMC+GDNF+Noggin) hét napos neurosphereket (8. ábra, D) eltávolítottam a tenyésztőedényből majd sztereomikroszkóp alatt mikrosebészetre alkalmas eszközökkel a fűrj utóbelelek coecum telepébe egy-egy kisebb vágást ejtettem. Az így keletkező kis nyílásba helyeztem bele a csirke-eredetű neurosphereket (8. Ábra ,G) majd a telep feletti középbél szakaszt (ahol ebben a stádiumban az éppen vándorló wavefront ganglionléc-sejtek találhatóak) levágtam, törekedve a fűrj utóbelének ganglionmentességére. A 9ED csirke tojások felületét 70%-os alkohollal lefertőtlenítettem és egy kb. 1,5 cm. A nyíláson keresztül a transzplantációra előkészített 9ED embrió chorion-allantois membránján (CAM) nagyobb méretű erek közelében steril papírvatta segítségével apró sérüléseket ejtettem, hogy a hajszálereket traumatizáljam. A sérülés területére helyeztem a transzplantált fűrj utóbeleket (“graftok” – 8. ábra, H) és celluxszal a tojást lezártam és hét napra visszatettem a 37°C-os inkubátorba. Az inkubálás elteltével a kifejlett graftokat (8. ábra, I) eltávolítottam a membránról és fixáltam majd beágyaztam a szerveket (4.2.2, 4.3, 4.4 fejezetek).



8. ábra: A kísérletes munka folyamatainak áttekintése. (A) Munkaterület; **(B)** 12 ED csirke embrió; **(C)** 12 napos csirke embrióból izolált gasztrointesztinális traktus (kb – középbél, cc- coecum, pirossal keretezett ub – neurosphere tenyésztésre felhasznált utóbél) **(D)** A 12 ED csirke embrió izolált utóbélből tenyésztett hét napos, transzplantációra kész neurospherek, **(E)** 4 ED fűj embrió és mikroszipesz; **(F)** 4 ED fűj embrióból izolált gasztrointesztinális traktus, pirossal keretezett rész – neurosphere transzplantációra használt bélszakasz **(G)** 4 ED fűj utóbél coecumtelepekbe (fehér nyilak) transzplantált hét napos neurospherekkel (fekete szaggatott vonal); **(H)** fogadó embrióként szolgáló 9ED csirke embrió és az azt körülvevő CAM vérerekre (fekete nyíl) transzplantált 4 ED fűj utóbél (graft) **(G)**; **(I)** Hét nap alatt kifejlődött fűj utóbél graft kifejlett coecumokkal (fehér nyilak) és utóbélszakasszal (fekete szaggatott nyíl)

4.5.3 Vándoroltatott sejtenyészet fibronektinnel bevont felszínen

Steril műanyag Petri-csészékbe 3ml 10mg/ml-s fibronektin oldatot pipettáztam, ezeket 30 percre 37°C-os termosztátba raktam, majd az oldatot eltávolítottam, és PenStrep-PBS segítségével átmostam. A Petri-csészékbe 3ml PenStrep-DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium –highglucose, Sigma, D6429-500ml, RNBj0386) médium került, melyekbe 3µl GDNF-növekedési faktort (10ng/ml) oldottam, majd a transzplantálásra nem felhasznált hét napos neurosphereket áthelyeztem a GDNF-et tartalmazó PenStrep-DMEM médiummal feltöltött Petri-csészékbe. A négy különböző sejtenyésztő médiumban (PMC, PMC+GDNF, PMC+GDNF+Noggin, PMC+GDNF+BMP-4) kifejlődött hét napos neurosphereket tartalmazó Petri-csészéket 24 órára sejtenyésztő inkubátorba helyeztem (37°C, 5% CO₂). 24 óra elteltével a sejtenyészetet 30 percig 4%-os PFA-val fixáltam, majd 3x5 perc PBS-mosást követően kettős TuJ-1/HNK-1 immunhisztokémiai jelölést végeztem.

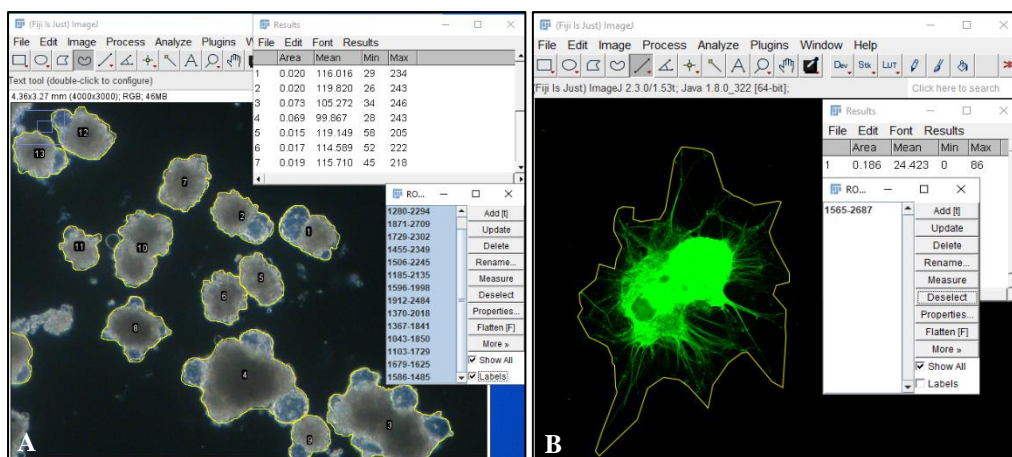
4.6 Metszetek értékelése, képkészítés, képfeldolgozás, dokumentáció

Az immunfluoreszcens képeket epifluoreszcens- (Nikon E800), illetve konfokális mikroszkóppal (Zeiss LSM 710) készítettük. A fénymikroszkópos és sztereomikroszkópos (Nikon SMZ 25) felvételeket Nikon Eclipse E800-as mikroszkóphoz csatlakoztatott Olympus DP74-es kamerával, CellSens szoftver segítségével, illetve Zeiss Axiovert 135 inverz mikroszkóphoz csatlakoztatott Canon PowerShot A650 kamera segítségével készítettük. A képek feldolgozása és szerkesztése ImageJ és Adobe Photoshop CS 2015 szoftverekkel történt.

4.7 Mérések és statisztikai elemzés

A neurospherek méretét a tenyészetekről készített felvételeken meg ImageJ szoftver segítségével állapítottam meg. A mérés során az egyes neurospherek által lefedett területet mértem meg (amely kedvezőbb volt az átmérők lemérése helyett, mivel nem az összes neurosphere volt gömb formájú). A mérés során 21-27 db neurosphere méretét mértem le, az eredményt pedig mm^2 -ben kaptam meg (10. ábra, A kép), a mérési adatokat az 1. melléklet tartalmazza.

Emellett a neurospherek TuJ-1+ neuronjainak rostjai által behálózott fibronectin felszín területét is megmértem, amely számos tanulmányban a transzplantált graftok migrációs és innervációs (idegrostokkal behálózó) potenciáljának mérésére szolgál (Hotta és mtsai. 2013, McKeown és mtsai. 2017, Stavely és mtsai. 2021). A mérés során a neurospherek körüli TuJ-1+ idegrostok végpontjait kötöttem össze, az így kapott területet mértem le (10. ábra, B kép, sárga vonal). A PMC kezelés kivételével (idegrostok hiányában) minden csoport esetén 21 mérést végeztem, a mérési adatokat az 1. melléklet tartalmazza. A mérések során kapott adatokat R-program segítségével statisztikai analízis alá vettem Shapiro-wilk normalitás vizsgálat, Levene-teszt variancia-analízis és Mood-median tesztek keretein belül.



10. ábra: A neurosphereken elvégzett mérések. (A) A neurospherek méretének lemérése ImageJ szoftverben. (B) A neurospherek TuJ-1+ sejtjei által behálózott fibronectin-felszín területének lemérése ImageJ szoftverben

V. Eredmények és megvitatásuk

5.1 Csirke eredetű enterális neurospherek képzése embrionális utóbélből

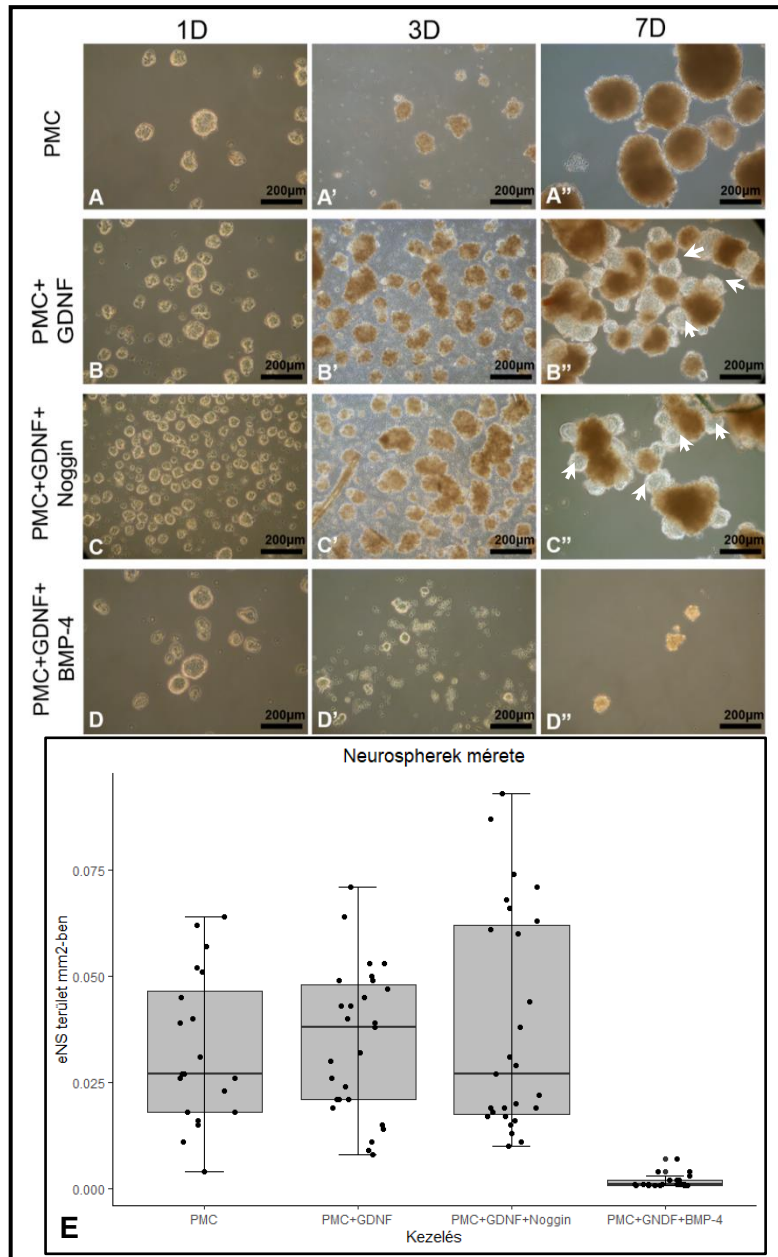
Enterális neurospherek tenyésztése jelenleg csak emlős és humán szövetmintákból történik (Cheng és mtsai., 2006, 2007; Hotta és mtsai. 2003, Stavely és mtsai. 2022). Az embrionális bélidegrendszer-fejlődést tanulmányozó kutatások elfogadott modellszervezete a madár embrió, ezért laboratóriumunk kiemelt célkitűzése, hogy fejlődő csirke embrióból származó vékony-, és vastagbélből enterális neurosphereket hozzon létre. Mivel a szakirodalomban csak emlős és humán sejtekre optimalizált neurosphere-tenyésztő protokoll volt elérhető, szakdolgozati munkám elsődleges célja az volt, hogy az emlős sejtekre optimalizált rendszerben próbáljam meg az enterális neurosphereket kitenyészteni embrionális csirke utóbélből. A tenyészteteket olyan növekedési faktorokkal is kiegészítettem, amelyek elengedhetetlenek a csirke- és emlős-bélidegrendszer fejlődésében. A GDNF az elsőszámú kemoattraktáns molekula, mely irányítja a ganglionléc-sejtek migrációját a bélcső kolonizációja során, de szerepe van a neuron/glia arány fenntartásában is (Fu és mtsai. 2004, Nagy és Goldstein 2006). A BMP-4 jelátvitel bélidegrendszer-fejlődésben játszó szerepét már számos tanulmány vizsgálta, hatása főképp a ganglio- és gliogenezis folyamataiban érvényesül (Chalazonitis és mtsai., 2004, 2011, 2012; Goldstein és mtsai., 2005, Fu és mtsai., 2006). A BMP-4 antagonistá Nokgin fehérje hatását is számos kutatócsoport vizsgálta, de az eredmények gyakran ellentmondásosak. Míg a BMP-4 jelátvitel Nokgin-nal való gátlása csirke embrió esetén meggátolta a ganglionléc-sejtek vándorlását (Goldstein és mtsai. 2005), egér embrió esetében serkentette azt (Fu és mtsai. 2006). Ganglionléc-sejtek Nokgin-nal való kezelése esetén a Nokgin neurogenézist indukáló hatását is megfigyelték (Chalazonits és mtsai. 2011).

Első lépésben 12 napos (12ED) csirke embriók (8. Ábra, B kép) bélszakaszát izoláltam (8. Ábra, C kép). Mivel 12 napos korban a gasztrointesztinális traktus teljes kolonizációja biztosan befejeződik és a bélidegrendszer kialakul (4. Ábra, A kép), csak az utóbél szakaszát használtam fel a tenyésztés során. Az izolált bélszakaszból enzimatikus emésztéssel kinyert sejteket négyféle médiumban tenyésztettem (4.5.1 fejezet). A sejtenyésztés hét napig tartott, az enterális neurospherek kialakulásáról az első, harmadik és hetedik napokon felvételt készítettem (11. ábra). A tenyésztés során nagy számban fejlődtek ki enterális neurospherek, ezek méretei megegyeznek az emlős rendszerekben végzett megfigyelésekkel (kb. 150-200µm átmérő) (Cheng és mtsai., 2017, McKeown és mtsai., 2017, Chen, 2022). Az emlős neurospherek tenyésztésére beállított PMC (Proliferation Medium with Cytokins) médiummal történő tenyésztés során ugyanakkor azt tapasztaltam, hogy hetedik napra kevesebb

neurosphere keletkezett, de ezek méretben nem voltak kisebbek (11. Ábra A-A” képek). A GDNF-fel és GDNF+Noggin-nal kiegészített médiumban több neurosphere alakult ki (11. ábra, B, C képek). A BMP-4 hozzáadása a tenyésztő médiumhoz nem segítette a neurospherek kialakulását és fejlődését, már a harmadik naptól (11. ábra, D’) a neurospherek növekedése megállt, a hetedik napra elszórtan találtam legfeljebb 100 μm átmérőjű. Kis méretük miatt ezeket a neurosphereket a továbbiakban nem használtam az immunhisztokémiai vizsgálatok, és a transzplantációs kísérletek során. A négy különböző sejtenyésző médiumban tenyésztett neurospherek méretét ImageJ szoftver segítségével határoztam meg (4.7 fejezet, 10. ábra, A kép). Az adatokat R programban készített dobozdiagramban ábrázoltam (11. ábra, E kép) és statisztikai elemzés alá vettem: a GDNF+Noggin és GDNF+BMP-4 neurospherek adatai Shapiro-Wilk teszt alapján nem normál eloszlást követtek, a Levene-teszt pedig az adatok varianciájának inhomogenitását mutatta. A nem paraméteres Mood Median teszt nem talált szignifikáns különbséget a PMC ($n=20$, $min=0.004$, $max=0.064$, $átlag=0.032$, $szórás=0.0176$), PMC+GDNF ($n=27$, $min=0.008$, $max=0.071$, $átlag=0.034$, $szórás=0.0172$) és PMC+GDNF+Noggin ($n=27$, $min=0.01$, $max=0.093$, $átlag=0.038$, $szórás=0.025$) csoportok adatai között ($p_{P-G} = 0.56$, >0.05 , $p_{P-N}=1$, >0.05 , $p_{G-N} = 0,58$, >0.05) de szignifikáns a különbség e három csoport és a PMC+GDNF+BMP-4 ($n=23$, $min=0.0007$, $max=0.007$, $átlag=0.001$, $szórás=0.0015$) csoport között ($p<0.05$ mindhárom esetben). Tehát, korábbi megfigyeléssel ellentétben (McKeown és mtsai., 2017) a GDNF nem (de a Noggin hozzáadása sem) növelte a csirke eredetű enterális neurospherek méretét, viszont megfigyelésem alapján a számukat igen. Ezzel ellentétben viszont a BMP-4 hozzáadása nem támogatta a neurospherek kialakulását és növekedését. Humán indukált pluripotens őssejtekből előállított enterális neurospherek tenyésztése során azonban a BMP-4 elengedhetetlenül szükséges, más BMP-fehérjékkel és GDNF-fel együtt serkenti a neurospherek képződését (Fan és mtsai., 2023). Az ellentmondás az eltérő fajból származó sejtekkel, illetve a tenyésztési protokollban megfigyelhető különbségekkel magyarázható, humán sejtek esetében a BMP-4-et a tenyésztés harmadik és hetedik napján adták a sejtekhez, ami elősegítette az idegi sejtaggregátumok kialakulását.

Új eredményként írható le, hogy a GDNF tartalmú médiumban fejlődött hét napos (7D) neurosphereken kisebb gömb alakú sejtcsoportosulások, ”sarjak” jelentek meg (11. ábra B”,C” képek, fehér nyilak). Ezt a jelenséget korábbi GDNF-fel kezelt rágcsáló és humán neurospherek esetén nem figyelték meg (Schäfer és mtsai, 2003, McKeown és mtsai., 2017, Cheng és mtsai. 2016), amely valószínűsíti, hogy a csirke sejtek érzékenyebbek a GDNF migrációt és proliferációt indukáló hatására. A sarjak képződése elmaradt, ha a médium BMP-4-et is

tartalmazott. Az is megfigyelhető, hogy a kis sarjak a mikroszkópos felvételeken világosabb, fényt sokkal inkább áteresztő képet mutattak. Azt feltételeztem, hogy a GDNF által indukált sarjak sejttöszetetele jelentősen eltérhet a közvetlen emésztés után kialakult nagyobb és sötétebb színű „anya” sphaerekétől.

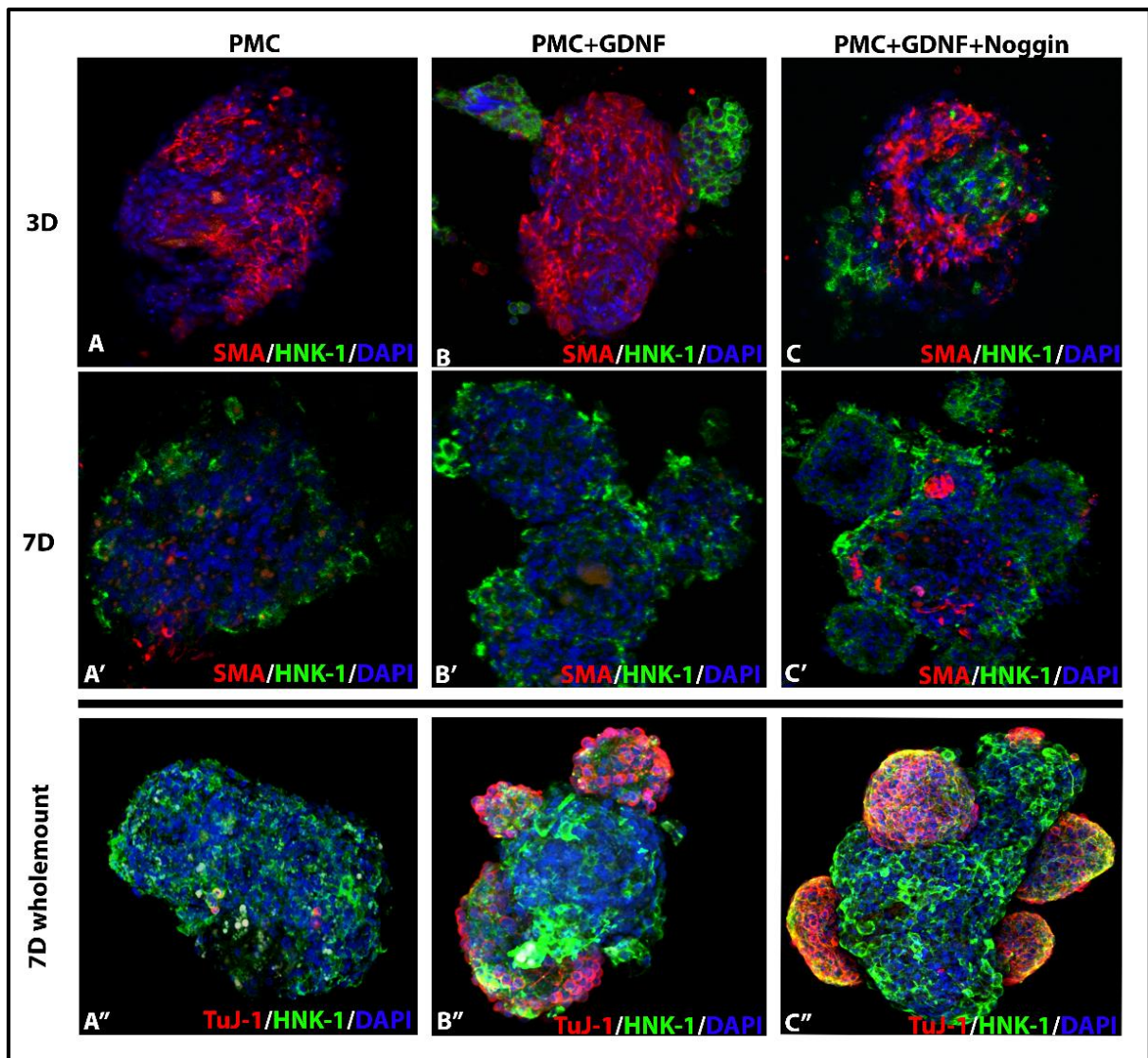


11. ábra: A 12ED csirke utóbélből képzett neurospherek mikroszkópos felvételei egy (1D), három (3D) és hét (7D) nap *in vitro* tenyésztés után. (A-A'') PMC alap médiumban tenyésztett enterális neurospherek felvételei. (B-B'') GDNF-fel kiegészített PMC médiumban tenyésztett neurospherek felvételei. Hét napos korban a neurosphereken sarjak jelentek meg (B'', fehér nyilak). (C-C'') GDNF+Noggin-nal kiegészített PMC médiumban tenyésztett neurospherek felvételei, a hetedik napon sarjak jelentek meg (C'', fehér nyilak). (D-D'') GDNF+BMP-4-gyel kiegészített PMC médiumban tenyésztett neurospherek felvételei. (E) A neurospherek méret-adatait ábrázoló dobozdiagram. A pontok az egyes méréseket jelentik. Vízszintes tengelyen a négy kezelésnek megfelelő csoport, függőleges tengelyen az enterális neurospherek(eNS) terület értékei mm²-ben.

5.2 Csirke eredetű enterális neurospherek karakterizálása

A neurosphereket alkotó sejttípusok azonosítása kiemelten fontos volt munkám során, hiszen, ha a neurospherek egyáltalán nem, vagy csak kevés enterális elemet tartalmaznak, ez a tenyésztési módszer nem alkalmas csirke eredetű enterális neurospherek képzésére. Ezért a vizsgálat legfőképp a neurospherekben található mesenchymális- és izom- valamint a későbbi transzplantáció céljából fontos ganglionléc-eredetű sejtek arányára irányult. A vizsgálatához három napos (3D) és hét napos (7D) stádiumú neurospherek szövettani metszetein végeztem immunhisztokémiai jelölést (4.2.2 és 4.4 fejezetek). A folyamat során HNK-1 (ganglionléc-eredetű sejt marker) és SMA (alfa-simaizom-aktin marker) jelölésekkel dolgoztam. Az immunhisztokémia eredményeit a 12. ábra tartalmazza. 3D stádiumban függetlenül a sejttenyésztő médiumba oldott növekedési faktoroktól a neurospherek nagy arányban inkább SMA+ simaizom/mesenchymális sejteket tartalmaznak (12. ábra A, B, C képek, piros jel), míg HNK-1+ ganglionléc-eredetű sejteket ebben a stádiumban csak a GDNF-fel kiegészített médiumokban tenyésztett neurospherekben találunk nagyobb számban (12. ábra B, C képek, zöld jel). Hetedik napra a neurospherekben kezeléstől függetlenül az SMA+ sejtek aránya fokozatosan lecsökken, és felszaporodnak az enterális ganglionléc-eredetű sejtek. Fontos megjegyezni, hogy amennyiben SMA+ sejtet mégis találunk, az csak a nagyobb méretű kiindulási neurosphere struktúrájában lesz jelen, a sarjak sosem tartalmaznak SMA+ sejteket (12. ábra C'). Az, hogy a kezdetekben a neurospherek inkább mesenchymális eredetű sejteket tartalmaznak, nem minősül a neurosphere tenyésztés alacsony hatékonyságának. Rhian és mtsai. kimutatták, hogy a fejlődő bélcső enterális mesenchyma sejtjei támogatják az enterális idegrendszeri őssejtek növekedését és túlélését, az általuk termelt növekedési faktorok révén. Tehát éppen ellenkezőleg, a mesenchymális sejtek jelenléte előnyös mikrokozonyezetet biztosít a neurospherek növekedéséhez és a neurális sejtek proliferációjához (Rhian és mtsai., 2021).

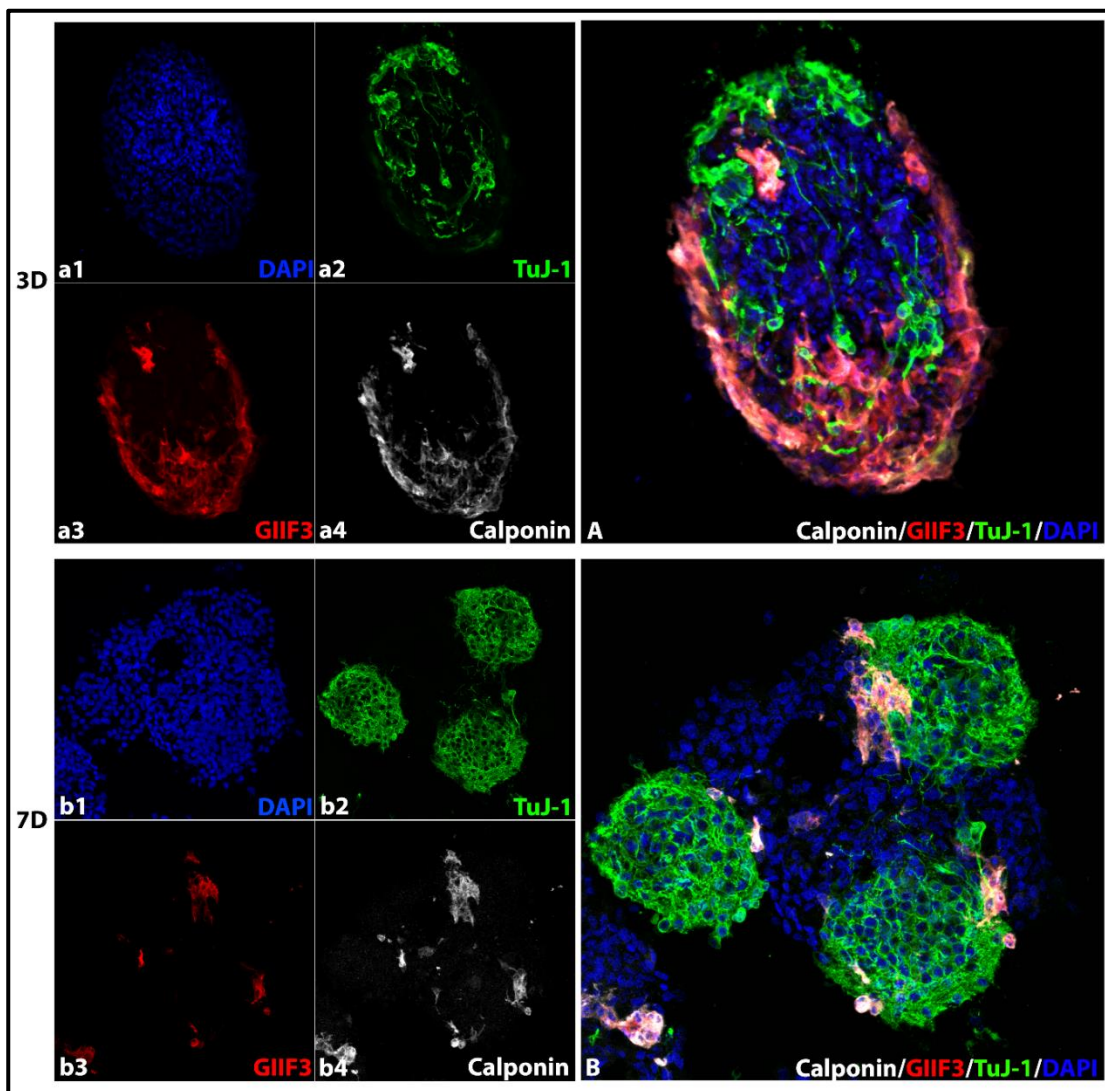
A teljes szervi (wholemount) immunhisztokémia (12. ábra, alsó sor) egyértelmű képet adott a 7D stádiumú neurospherek struktúrájáról: a HNK-1+ sejtek (zöld szín) jelenléte a neurospherek teljes egészére kiterjed, a rajtuk kifelődő sarjak pedig intenzív TuJ-1 pozitivitást mutattak (piros immunreakció). Ez egyben igazolja, hogy a felszínen képződő gömbölyded struktúrák főleg enterális neuronokat tartalmaznak. Ez a megfigyelés, valamint az, hogy a sarjak egyáltalán nem tartalmaznak mesenchymális- és izomsejteket alátámasztotta azt a felvetést, miszerint a sarjak az „anya” spherektől eltérő sejttartalommal rendelkeznek.



12. ábra: Az enterális neurosphereket felépítő sejtípusok azonosítása. Három (3D) és hét (7D) napos eNS-ek metszetein (felső két sor) végzett kettős fluoreszcens immunhisztokémia, mellyel átfogó képet kapunk az eNS-eket felépítő sejtekről: piros - alfa-simaizom-aktin-t (SMA) expresszáló simaizom és mesenchymális sejtek, zöld – HNK-1+ ganglionléc-eredetű sejtek, kék – DAPI sejtjelölés. (A-A'') PMC alap médiumban tenyésztett eNS-ek felvételei. (B-B'') GDNF-fel kiegészített PMC médiumban tenyésztett eNS-ek felvételei. (C-C'') GDNF+Noggin-nal kiegészített PMC médiumban tenyésztett eNS-ek felvételei. A vastag fekete vonallal elválasztott alsó sor hét napos neurospherek wholemount (teljes szervi) technikával jelölt 3D felvételeit tartalmazza: piros- β -III-tubulint (TuJ-1) expresszáló neuronok, zöld – HNK-1+ ganglionléc-eredetű sejtek, kék – DAPI sejtjelölés.

Fontos megjegyezni, hogy az SMA expresszió nem kifejezetten csak a simaizom-sejtekre jellemző, mesenchymális eredetű sejtek is expresszálhatnak SMA-t in vitro tenyésztési körülmények között, de a jelenség előfordulhat különböző fibrotikus folyamatok során is (Hinz és mtsai., 2012, Pinchuk, 2010, Talele és mtsai. 2015). Annak érdekében, hogy a neurospherek simaizom-sejt tartalmát vizsgáljam (mivel egy főleg izomsejteket tartalmazó neurosphere

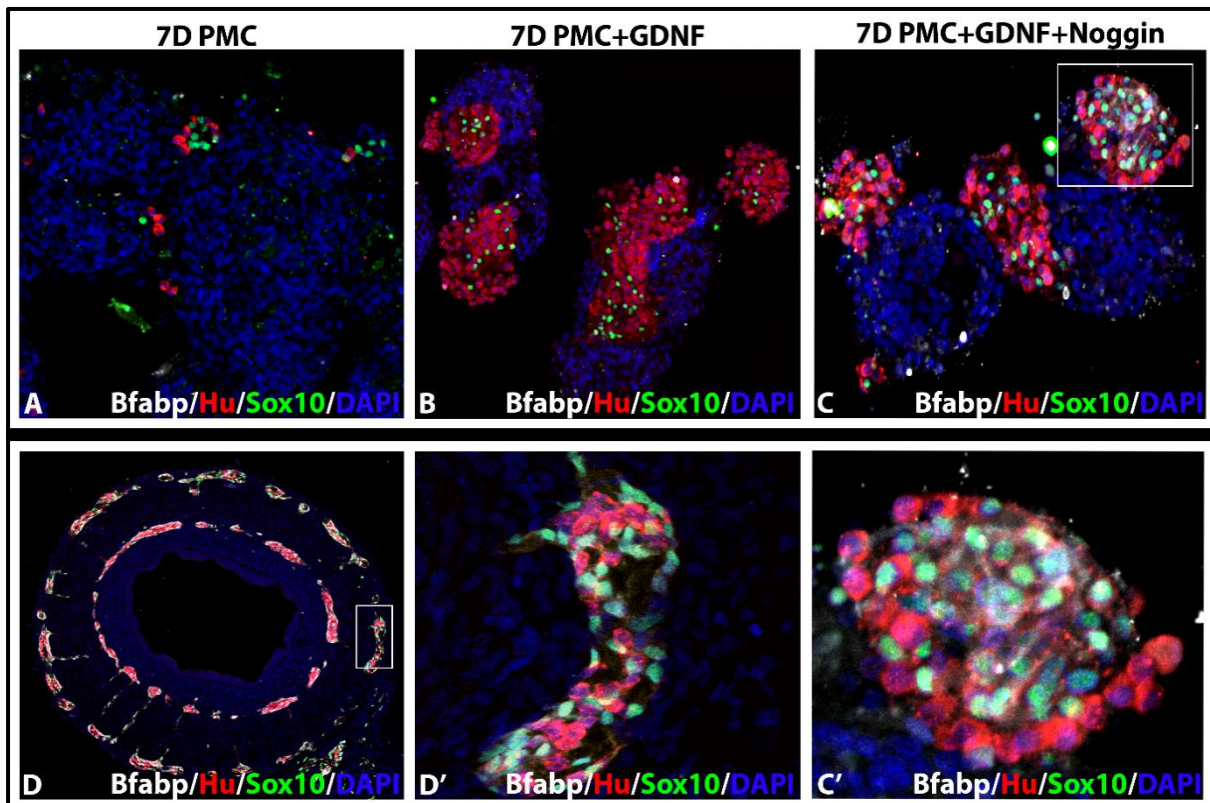
elveszti neurális jellegét, így nem alkalmazható neuropátiás rendellenességek őssejttranszplantációs gyógyítására) differenciált simaizom markerekkel (enterális gamma-simaizom-aktin és calponin) is végeztem jelölést. A vizsgálat eredményei (13. ábra) alátámasztják az SMA-val végzett jelölés eredményeit. 3D stádiumban a neurospheres nagy részben tartalmaznak simaizom sejteket, melyek mindkét izom markerre intenzív jelölést mutatnak (13. ábra, A, piros és fehér kolokalizáció), de a hetedik napra az izomsejtek száma jelentősen lecsökken, és nincsenek jelen a sarjakban, melyek az előző vizsgálatához hasonlóan intenzív neurális jelleget mutattak TuJ-1 expressziójuk révén (13. ábra, B kép).



13. ábra: Az enterális neurospheres simaizom-szövet tartalmának vizsgálata. Három (3D) és hét (7D) napos eNS-ek keresztmetszetein végzett hármass fluoreszcens immunhisztokémia, mely bemutatja a differenciált izomsejt-tömeg változását a neurospheres tenyésztése során: fehér - Calponin Ca²⁺ kötő fehérjét expresszáló simaizom sejtek, piros - enterális γ -simaizom aktint expresszáló simaizom sejtek, zöld - β -III-tubulint (TuJ-1) expresszáló neuronok, kék - DAPI sejtjelölés. **(a1-a4)** három napos eNS keresztmetszetén végzett hármass jelölés különálló csatornái. **(A)** az a1-a4 képek egymásba illesztett (merged) képe. **(b1-b4)** hét napos eNS keresztmetszetén végzett hármass jelölés különálló csatornái. **(B)** az a1-a4 képek egymásba illesztett (merged) képe.

5.3 Csirke eredetű enterális neurospherek enterális sejtösszetételének vizsgálata

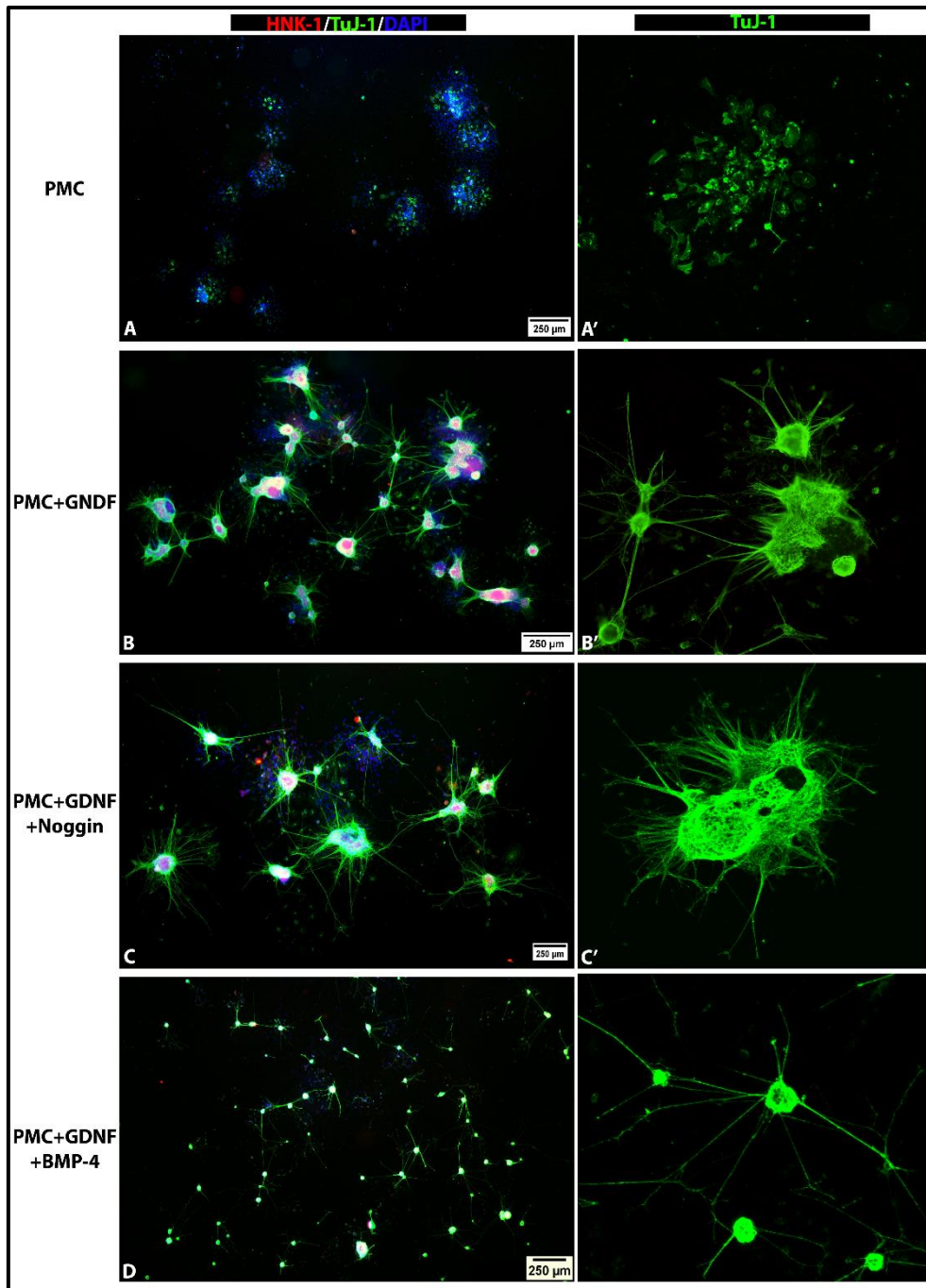
Az enterális neurospherek képzése és transzplantációja során a legfontosabb szempont az, hogy a tenyésztett neurospherekben sikerült-e felszaporítanunk azokat a sejteket, amelyek egy differenciált bélidegrendszer ganglionjait és idegi sejtálózatát felépítik. A következő vizsgálatban a hét napos (7D), transzplantációra alkalmas neurospherek keresztmetszetein Hu, Bfap, és Sox10 immunhisztokémiai jelöléssel vizsgáltam a bélidegrendszert felépítő sejtípusok (Hu+ enterális neuronok, Bfap+, Sox10+ gliasejtek, Sox10+ ganglionléc-sejtek) jelenlétét. Csirke modell esetén az emlős rendszerben alkalmazott alap PMC médiumban tenyésztett neurospherek alig tartalmazták ezeket a sejtípusokat (14. ábra, A kép), azonban GDNF hozzáadásának hatására ezek a sejtek nagy számban voltak jelen a neurospherek sarjaiban (14. ábra B, C képek). Ez az eredmény megegyezik korábbi kísérletek eredményeivel melyek kimutatták, hogy a GDNF kedvez a prekursor ganglionléc-sejtek neuron irányú differenciációjának (Nagy és Goldstein 2006, Nagy és Goldstein 2008), valamint amelyek GDNF neurogén potenciált növelő hatását bizonyítják (Cheng és mtsai., 2016). A 14. ábra alsó sora azt mutatja, hogy a neurospherek forrását jelentő bélidegrendszeri ganglionok neuron és gliasejtjei (14. ábra D, D' képek) a szöveti emésztést és tenyésztést követően képesek voltak felszaporodni a neurospherek sarjaiban (14. ábra C'), ahogyan azt Schäfer és mtsai. 2003-ban leírták az első enterális neurospherek egér bélből történő tenyésztése során (Schäfer és mtsai., 2003). A sarjakban felszaporodó enterális sejtek pedig a ganglionokat alkotó sejtek jellegzetességeit is mutatják: a Bfap+ gliasejtek megőrzik Sox10 expressziójukat (fehér-zöld kolokalizáció) míg a Hu+ idegsejtek differenciálódásuk során elveszítik azt (nincs piros-zöld kolokalizáció). Fontos lenne tudnunk azt is, hogy vajon ezek a neurospherek milyen arányban tartalmaznak nem differenciált Sox10+ progenitor ganglionléc-sejteket, melyek transzplantáció esetén növelhetik a regeneráció sikerességét, de jelenleg nincs pontos felmérés arról, hogy egyáltalán a bélidegrendszer kialakulása után milyen mennyiségben és minőségben maradnak jelen a bélben a bélidegrendszert kialakító őssejtek.



14. ábra: A bélidegrendszer felépítő enterális sejtek izolálása és felszaporítása enterális neurosphere képzés során. A kép felső sora három különböző médiumban tenyésztett hét (7D) napos enterális neurosphere keresztmetszetén végzett háromszoros immunhisztokémiai jelölését mutatja. A három kép bemutatja a bélidegrendszeri elemek izolálásának és felszaporításának hatékonyságát a különböző tenyésztési körülményekben. **(A)** PMC alap médiumban tenyésztett hét napos enterális neurosphere. **(B)** GDNF-fel kiegészített médiumban tenyésztett hét napos enterális neurosphere. **(C)** GDNF+Noggin-nal kiegészített médiumban tenyésztett hét napos enterális neurosphere. **(D)** Az enterális neurospherek forrása: 12ED csirke utóbél keresztmetszeti képe, jól kifejtett bélidegrendszerrel. **(D')** A D-kép bekeretezett enterális ganglionjának nagyított képe, melyen jól láthatóak az enterális ganglionokat alkotó sejtípusok. **(C')** A C-képen látható 7D enterális neurospheren képződött sarj nagyított felvétele, melyben ugyanazokat a sejtípusokat találjuk. Fehér -brainy fatty acid protein-t expresszáló korai enterális gliasejtek, piros- neuron specifikus ELAV-like protein-3-at expresszáló korai enterális neuronok, zöld – Sox10 transzkripcióis faktort expresszáló ganglionléc-sejtek, kék- DAPI sejtmagjelölés.

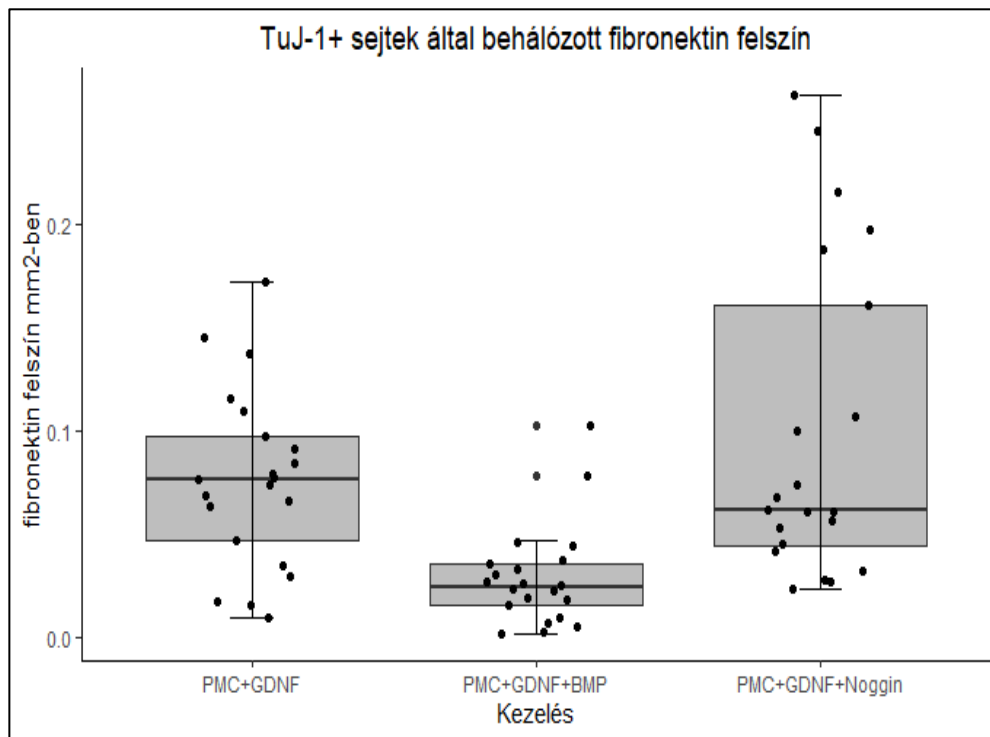
5.4 Csirke eredetű enterális neurospherek fibronectin-felszínen való tenyésztése

In vitro migrációs kísérletekkel igazolták, hogy kollagén gélbe oldott GDNF hatására a tenyészetbe kihelyezett embrionális bélszakaszokból a ganglionlécsejtek intenzív kivándorlása történik meg (Fu és mtsai. 2004, Nagy és Goldstein 2006). A ganglionléc-eredetű enterális sejtek vándorlása szintén megfigyelhető ha a sejteket egy migrációt elősegítő extracelluláris mátrix molekulával bevont felszínen tenyésztjük GDNF tartalmú médiumban. Kísérletes munkám során hét napos enterális neurosphereket tenyésztettem fibronectinnel bevont Petri-csészében 24 órán át GDNF-et tartalmazó DMEM médiumban (4.5.3 fejezet), az így kapott vándoroltatott sejttenyészetet pedig immunhisztokémiai eljárással jelöltem az enterális neuronokat. Bár az alap PMC médiumban tenyésztett neurospherek méretben nem tértek el szignifikánsan a többi csoport neurospherjeitől (11. ábra), jelentős különbség mutatkozott a vándoroltatás során az alap PMC és a GDNF-et tartalmazó PMC médiumokban tenyésztett neurospherek között. Azt tapasztaltam, hogy a PMC neurospherek nagyrésze fibronectin felszínen való tenyésztés során szétesett (15. Ábra A, A' képek), valamint a belőlük kivándorló TuJ-1+ neuronok pedig egyáltalán nem képeztek rostokat, és nem hálózta be a fibronectinnel bevont felszínt (15. Ábra, A' kép). Ezzel ellentétben a GDNF-et tartalmazó médiumban tenyésztett neurospherek neuronjai számos rostot képeztek a fibronectin felszínén, idegrostokban gazdag neuron hálózatot alakítva ki, ahogy azt korábban megfigyelték (Cheng és mtsai.,2006, 2007; Hotta és mtsai. 2003, Stavely és mtsai. 2022) (15. Ábra B-C és B'-C' képek). Fontos megjegyezni, hogy bár a BMP-4 meggátolta a neurospherek növekedését (11. ábra), mely a vándoroltatott tenyészetéről készített felvételeken is megfigyelhető (15. ábra, D kép), ezek a neurospherek ugyanúgy idegrostokat, neuron hálózatot képeztek a fibronectin felszínén (15. ábra, D' kép). Azonban megfigyelhetjük, hogy a Noggin-nal kezelt neurospherek láthatóan több idegrostot és sűrűbb ideghálózatot képeztek (15. ábra, C' kép), míg a BMP-4-gyel kezelt neurospherek inkább kevesebb, jól körülhatárolható rostot képeztek (15. ábra, D' kép). Ez összefügghet Fu munkacsoportjának megfigyelésével, miszerint a BMP-4 kezelés hatással van az enterális neuronok rostképzésére és a rostok morfológiájára (Fu és mtsai. 2006). A tenyészetek vizsgálata során felmerült a kérdés, hogy vajon a GDNF-hez adott Noggin vagy BMP-4 hatással volt-e a neuronok innervációs képességére, ezért ImageJ szoftver segítségével megmértem a neuronok és rostjaik által betérített felszín területét (10. ábra, B kép).



15. ábra: 7D enterális neurosferék fibronektin-felületen való tenyésztése GDNF-tartalmú médiumban. Hét nap tenyésztés után a neurosphereket fibronektinnel bevont petri-csészébe piepttáztam, majd GDNF-tartalmú médiumban további 24 órát tenyésztettem. **(A)** Fibronektinon vándoroltatott PMC alap médiumban tenyésztett 7D neurosferék kis nagyítású felvétele. **(A')** Ugyanazon tenyészet nagyobb felbontású felvétele a kivándorolt TuJ-1+ neuronokról. **(B)** Fibronektinon vándoroltatott GDNF-fel kiegészített PMC médiumban tenyésztett 7D neurosferék kis nagyítású felvétele. **(B')** Ugyanazon tenyészet nagyobb felbontású felvétele a kivándorolt TuJ-1+ neuronokról. **(C)** Fibronektinon vándoroltatott GDNF+Noggin-nal kiegészített PMC médiumban tenyésztett 7D neurosferék kis nagyítású felvétele. **(C')** Ugyanazon tenyészet nagyobb felbontású felvétele a kivándorolt TuJ-1+ neuronokról. **(D)** PMC médiumban tenyésztett 7D neurosferék kis nagyítású felvétele. **(D')** Ugyanazon tenyészet nagyobb felbontású felvétele a kivándorolt TuJ-1+ neuronokról. Skála: 250 μ m. Piros - HNK-1+ ganglionléc-eredetű sejtek, zöld – β -III-tubulint (TuJ-1) expresszáló neuronok és idegrostok, kék – DAPI sejtmagjelölés.

A mérési adatokat R-program segítségével dobozdiagrammon ábrázoltam (16. ábra), és statisztikai analízist végeztem: a GDNF+Noggin neurospherek adatai Shapiro-Wilk teszt alapján nem normál eloszlást követtek, a Levene-teszt pedig az adatok varianciájának inhomogenitását mutatta. A kérdést így nem paraméteres Mood Median tesztel vizsgáltam: a teszt nem talált szignifikáns különbséget a PMC+GDNF ($n=21$, $min=0.01$, $max=0.173$, $átlag=0.077$, $szórás=0.04$) és PMC+GDNF+Noggin ($n=21$, $min=0.024$, $max=0.263$, $átlag=0.1$, $szórás=0.077$) csoportok adatai között ($p_{P-G} = 0.56$, >0.05 , $p_{P-N}=1$, >0.05 , $p_{G-N} = 0,58$, >0.05) de szignifikáns a különbség e két csoport és a PMC+GDNF+BMP-4 ($n=21$, $min=0.002$, $max=0.103$, $átlag=0.029$, $szórás=0.024$) csoport között ($p<0.05$ mindkét esetben), bár ez betudható lehet pusztán a BMP-4 kezelt neurospherek kisebb méretének is.



16. ábra: A neurospherek TuJ-1+ idegrostjai által behálózott fibronectin-felszín méréseinek dobozdiagrammja. A pontok az egyes méréseket jelentik. Vízszintes tengelyen a három kezelésnek megfelelő csoport, függőleges tengelyen a behálózott terület mm²-ben.

5.5 Csirke eredetű enterális neurospherek transzplantációja ganglionmentes utóbélbe

A fibronectin felszínen tapasztalt intenzív rostképződés és sejt kivándorlás megerősítette, hogy ezek a neurospherek alkalmasak lehetnek transzplantációra és potenciálisan képesek lehetnek hozzájárulni egy ganglionmentes bélszakasz neuronhálózatának kialakításához.

A fejlődésbiológiában gyakran alkalmaznak csirke-fürj kimérákat, hiszen a megfelelő markerek segítségével jól elkülöníthetőek egymástól a csirke és a fürj eredetű sejtek (Le Dourain és Teillet, 1973, Nagy és mtsai., 2006). A chorio-allantois-membrán (CAM) való tenyésztés egy jól bevált, előnyös szervtenyésztési módszer, melyet gyakran alkalmaznak fejlődésbiológiai kérdések megválaszolására hiszen egy fejlődő embrió érhalozata biztosítja a fejlődő szerv táplálását és növekedését anélkül, hogy mesterségesen bármilyen anyaggal is támogatnunk kellene azt (Nagy és Goldstein, 2006). CAM-membrán tenyésztést alkalmaztak a korábbi neurosphere transzplantációt végző kísérletek során is (Cheng és mtsai. 2017).

Kísérletes munkám utolsó lépéseként hét napos enterális neurosphereket transzplantáltam 4 napos fürj embriók ganglionmentes utóbél-mesenchymájába. Ehhez a 12 napos csirke embrió utóbél szövetéből tenyésztett neurosphereket 4 napos fürj embrióból izolált utóbélszakasz mesenchymájába ültettem. A szöveti rekombinánsokat *in ovo* 9 napos csirke embrió CAM membránján további 7 napig tenyésztettem (4.5.2)

Első lépésben megvizsgáltam, hogy a CAM-tenyésztés alkalmas-e a bélidegrendszer fejlődés vizsgálatára. Négy napos fürj embrióból izoláltam a gasztrointesztinális traktus középbéltől-cloacaig terjedő szakaszát, és ezt tenyésztettem 9 napos csirke embrió CAM-membránján. A tenyésztett szerv szövettani metszetein TuJ-1 jelöléssel jól kivehetőek a bélidegrendszeri plexusok (17. ábra, A kép), a kolonizáció tehát végbement és a szervben megfelelően kialakult a bélidegrendszer a CAM-tenyésztés során.

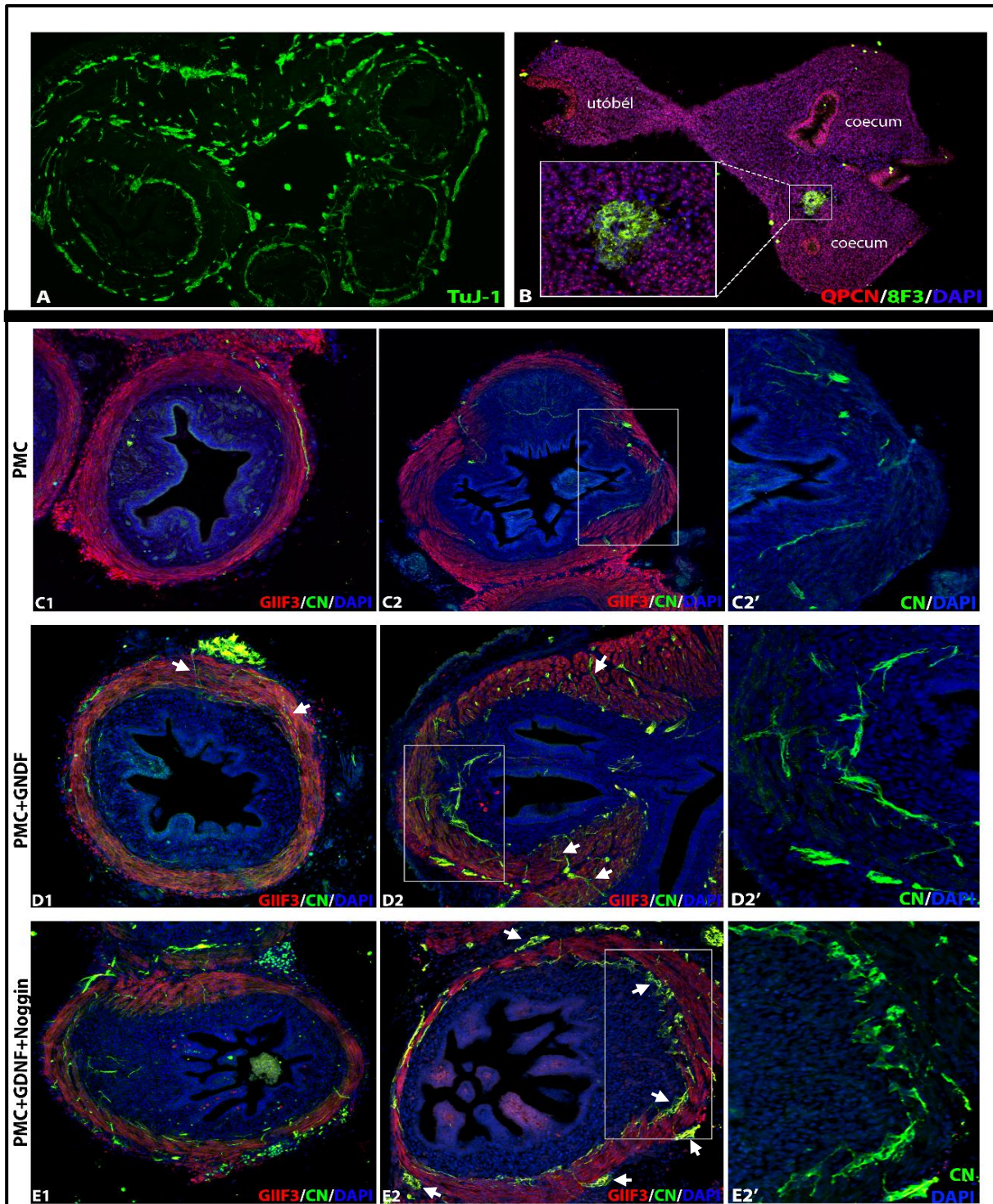
Ezt követően transzplantáltam az enterális neurosphereket a 4 napos fürj embrióból izolált, ganglionléc-sejtek által ebben a stádiumban még nem kolonizált utóbélszakasz coecum-telepeibe (8. ábra, G kép), és az így elkészített kiméra graftokat (17. ábra, B kép) tenyésztettem további 7 napig 9 napos csirke embrió CAM-membránján. A graftok szövettani metszetein kettős immunhisztokémiai jelölést végeztem GIIF3 izom- és CN – csirke specifikus idegsejt markerekkel. A transzplantáció eredményeit a 17. ábra C1-E2' képei foglalják össze.

A PMC médiumban tenyésztett neurospherek enterális sejtei nem kolonizálták a fürj utóbelet, (17. ábra C1, C2 képek) csak elszórtan találtam pár CN+ idegsejtet, illetve rostot a graftok szövettani metszetein (17. ábra C2' kép, zöld jel). Az eredmény hasonlóságot mutat a fibronectin felszínen végzett tenyésztés eredményeivel, ahol szintén nem tapasztaltam

idegrostokat, sem nagy mennyiségben kivándorolt idegsejteket (15. ábra, A' kép). Ezzel ellentétben a GDNF-fel kiegészített médiumban tenyésztett neurospherek enterális sejtjei nagyobb sikerrel kolonizálták a fűrj utóbelet a hét nap tenyésztés során, hat graftból négy esetben (ezek közül kettő a 17. ábra D1 és D2 képein látható) voltak jelen csirke eredetű CN+ idegsejtek, melyek nyúlványokat képeztek a belső simaizom szövetében (17. ábra D1 és D2 ábra, nyílhegyek) és annak két oldalán (17. ábra D' kép) (ahogyan ezt a bélidegrendszeri enterális neuronoknál tapasztaljuk). A PMC+GDNF+Noggin tartalmú médiumban tenyésztett neurospherek sejtjei szintén kolonizálták a fűrj utóbelet: a négy feldolgozott graftból mind a négyben (melyből kettőt a 17. ábra E1 és E2 képei mutatnak) fellelhetőek voltak a csirke eredetű CN+ sejtek, melyek sűrűn benépesítették a graft belső izomrétegének belső oldalán található submucosát (17. ábra E' kép), a szövettani metszeten enterális ganglionokra emlékeztető struktúrákat is találunk a *submucosalis* és a *myentericus* zónában is (17. ábra E2, nyílhegyek).

A BMP-4-et tartalmazó médiumban tenyésztett neurospherek kis méretük miatt technikailag nem voltak alkalmasak a transzplantációra, így a BMP-4 jelátvitel hatását konkrétan nem sikerült megvizsgálnom, de Fan és mtsai. humán indukált pluripotens-össejteken végzett kísérletei kiemelten fontosnak tartják a BMP-4 jelenlétét mely fokozta a neurogenézist és a sejtaggregációt (Fan és mtsai. 2023). A jövőben mi is szekvenciálisan tervezzük a BMP-4, Wnt11, Endothelin-3 növekedési faktorokat a GDNF kezelés után a sejtenyésztetekhez adni.

A Noggin-nal kezelt neurospherek transzplantációját követő intenzív sejtmigráció és rost- valamint ganglion képzés indokoltá teszik a Noggin alkalmazását a jövőben. Ezt megerősítik azok a korábbi tanulmányok is amelyekben a Noggin 40%-kal megnövelte a ganglionléc-sejtekből differenciált neuronok arányát (Chalazonits és mtsai. 2011), Továbbá a Noggin alkalmazása más növekedési faktorokkal (pl Endothelin-3) segít megőrizni a ganglionléc-sejtek Sox10 expresszióját, ezáltal tovább fenntartva ezen sejtek egy dedifferenciáltabb állapotát, mely igencsak fontos lehet egy neurális össejtenyésztet esetén (Kawaguchi és mtsai., 2010). Mindezek alapján, eredményeim megerősítik azokat a korábban emlős és humán rendszerekben leírt megfigyeléseket, miszerint az enterális neurospherek sejtjei transzplantáció révén képesek kolonizálni egy ganglionmentes utóbélszakaszt, és nagymértékben hozzájárulhatnak a bélidegrendszer regenerációjához, kialakításához.



17. ábra: Enterális neurospherek transzplantációja 4ED fűj embrióból származó utóbélbe. (A) 4ED fűj embrióból származó bélszakasz 9ED csirke CAM membránon való tenyésztése eredményeképp az átültetett embrionális szervben egy teljesen kifejlett embrionális bélidegrendszer alakul ki (a képen négy bélkeresztmetszetet is látunk, mivel a tenyésztés során a bélet körbeveszi a CAM szöve és egy burokszerű képletben fejlődik tovább, melyben a bélső tekeredik). **(B)** 4ED fűj utóbél coecum telepébe ültetett csirke eredetű enterális neurosphere (piros – fűj sejtek, zöld -csirke sejtek, kék- DAPI sejtjelölés). **(C1,C2)** PMC neurosphere-rel transzplantált fűj utóbelek keresztmetszeti képe. **(C2')** A C2 kép bekeretezett régiójának nagyított képe. **(D1,D2)** PMC+GDNF neurosphere-rel transzplantált fűj utóbelek keresztmetszeti képe. **(D2')** A D2 kép bekeretezett régiójának nagyított képe. **(E1,E2)** PMC+GDNF+Noggin neurosphere-rel transzplantált fűj utóbelek. **(E2')** Az E2 kép bekeretezett régiójának nagyított képe. Piros - enterális γ -simaizom aktint expresszáló simaizom sejtek, zöld – csirke eredetű idegsejtek és idegrostok, kék – sejtjelölés.

VI. Összefoglalás

Habár A Hirchsprung-kór egy jól körülírt patológiás kórkép melyet a bélidegrendszer rendellenes fejlődése jellemez, jelenleg a klinikumnak csak a rendellenes bélszakasz sebészeti eltávolítása áll gyógymódként rendelkezésre, ezért kiemelt figyelmet kapott a regeneratív medicina és az őssejttranszplantáció lehetősége a HSCR és az ehhez hasonló neuropátiák gyógyítására. Az elmúlt évtizedben robbanásszerűen elterjedt a 3D sejtkultúrák, organoidok és spheroidok tenyésztése, amelyek célja az állatkísérletek alkalmazásának csökkentése, egyes betegségek patogenezisének valóságosabb modellezése, illetve a gyógyszerkísérletek megbízhatóságának növelése.

A Hirchsprung-kórt gyógyítását célzó őssejttranszplantációs kísérletek idegi sejtaggregátumok (enterális neurospherek) bélszövetből való tenyésztésére és ezek ganglionmentes bélszakaszba történő transzplantálására irányulnak. 2003-ban írták le először az enterális neurospherek létrehozásának módszerét, s azóta rendszeresen tenyésztnek enterális neurosphereket rágcsáló és humán vastagbél eredetű szövetmintából. Mivel ezek igen csak költséges és körülményes eljárások, és az eddigi eredmények ellentmondásosak is, ezért indokoltnak találtuk egy új modellszervezetben is honosítani az enterális neurospherek képzését. A csirke és fürj modellek használata a bélidegrendszer fejlődését vizsgáló kutatásokban igen elterjedt, alkalmazásuk sokkal költséghatékonyabb s egyszerűbb az emlősökénél, így kiemelten fontos, hogy az enterális neurospherek csirke eredetű szövetből való tenyésztését is beállítsuk, további módszerekkel ötvözzük, optimalizáljuk.

Kísérletes munkám első célja az volt, hogy enterális neurosphereket állítsak elő csirke embrióból származó bélszövet-mintából. Mivel csirke modellszervezetre leírt neurosphere-tenyésztő protokoll jelenleg nem állt a rendelkezésemre, ezért az emlős modellrendszerekben leírt metodikákat követtem. Ez a megközelítés sikeresnek bizonyult, hiszen nagy számban alakultak ki enterális neurospherek 12 napos csirke embrióból izolált utóbélszövetét használva. A folyamat optimalizálására GDNF, Noggin és BMP-4 molekulák hozzáadásának hatását vizsgáltam. Eredményeim alapján a GDNF jelentős mértékben növeli a kialakult enterális neurospherek számát, elősegíti azok képződését és fejlődését. Továbbá fontos megfigyelés volt, hogy hetedik napra a GDNF-et tartalmazó médiumokban tenyésztett neurospherek sarjakat képeztek, melyet más modellrendszerekben nem figyeltek meg. Feltételeztük, hogy az enterális progenitor sejtek klonális felszaporodása hozza létre ezeket a struktúrákat. Annak ellenére, hogy korábban BMP-4 sejtaggregációt és gangliogenezist indukáló hatását figyelték meg, saját megfigyeléseim alapján a BMP-4 negatívan hatott a neurospherek képződésére.

A tenyésztett neurosphereken végzett immunhisztokémiás vizsgálataim alapján a szöveti tenyésztést követő harmadik napra az enterális neurospherek nagy számban tartalmaznak simaizom és mesenchymális sejteket, ám ezek száma jelentősen lecsökken a hetedik napra, de felerősödik a ganglionléc-eredetű sejtek jelenléte. Teljes szöveti (wholemout) immunhisztokémia segítségével igazoltam, hogy a GDNF által indukált sarjak neurális fenotípust mutatnak, szerkezetükben kettős jelöléssel sikeresen kimutattam az enterális ganglionokat felépítő enterális ideg- és gliasejteket. GDNF-mentes médiumban ezek a sejtek kis számban voltak jelen a neurospherekben.

Hét napos neurospherek fibronectin-felszínen való tenyésztése során azt tapasztaltam, hogy a GDNF-mentes médiumban tenyésztett neurospherek szétestek, a bennük jelenlevő TuJ-1+ enterális neuronok pedig nem képeztek neuronhálózatot a fibronectinnel bevont felszínen. Ezzel ellentétben, a GDNF-et tartalmazó médiumban tenyésztett neurospherekből kivándorolt neuronok rostokat képeztek és kiterjedt idegrostokból álló neuronhálózatot hoztak létre. Szignifikáns különbséget nem találtam a GDNF-et és a GDNF + Noggin-t tartalmazó médiumban tenyésztett neurospherek neuronjai által behálózott fibronectin felszín területe között. Fontos itt megjegyezni, hogy a Noggin-nal kezelt neurosphere egy sokkal összetettebb és több rostból álló hálózatot alakítottak ki, mint a BMP-4-gyel kezelt neurospherek.

Hét napos csirke enterális neurospherek fűrj embrióból származó ganglionmentes utóbelbe történő transzplantációját követően azt tapasztaltam, hogy a PMC alpmédiumban tenyésztett neurospherek sejtjei nem kolonizálták a fűrj utóbelet, idegrostokat nem képeztek. Ezzel ellentétben a GDNF jelentősen fokozta a sejtek kolonizációs és innervációs képességét. A GDNF, valamint a GDNF+Noggin neurospherek sikeresen kolonizálták az utóbelet, helyenként enterális ganglionokra hasonlító struktúrákat is kialakítottak, aminek alapján feltételezzük, hogy az inkubációs idő megnövelésével fejlettebb bélidegrendszer fog kialakulni.

Összegzésképp elmondható, hogy sikeresen izoláltam és tenyésztettem enterális neurosphereket embrionális csirke utóbeléből. A neurospherekben enterális neuronok és gliasejtek alakultak, melyeknek előfordulását GDNF-fel növelni tudtam. A neurosphere-eredetű enterális sejtek a transzplantációt követően sikeresen kolonizálták a fűrjből izolált ganglionmentes utóbelet. A BMP-4 hozzáadása a neurospherek tenyésztő médiumához meggátolta az enterális neurospherek kialakulását. Ezzel ellentétben a Noggin potenciálisan elősegítheti a transzplantációt követő kolonizációt, és korábbi eredmények indokoltá teszik a Noggin alkalmazását a neurospherek tenyésztési körülményeinek optimalizálásához, ennek hatásának vizsgálatához további kísérletek szükségesek.

VII. Summary

Although Hirschsprung's disease is a well-defined pathological condition characterized by abnormal development of the enteric nervous system, currently the only available treatment is the surgical removal of the affected intestinal segment. Therefore, regenerative medicine and the possibility of stem cell transplantation have received special attention for the treatment of Hirschsprung's disease and other congenital neurointestinal diseases. Over the past decade, the *in vitro* culturing of 3D cell cultures, organoids, and spheroids has rapidly spread, aiming to reduce the use of animal experiments, which provide more realistic modeling of certain diseases' pathogenesis, and increase the reliability of drug experiments.

Experimental efforts to cure Hirschsprung's disease focus on the culturing of gut tissue derived neural cell aggregates (enteric neurospheres) and their transplantation into the aganglionic intestinal segment. The method of creating enteric neurospheres was first described in 2003 and since then, enteric neurospheres have been regularly cultivated from tissue samples of rodents and human colon. As these procedures using mammalian tissues are costly and difficult, and the results so far have been contradictory, it was a big need to establish the formation of enteric neurospheres in a new model organism. The use of chicken and quail models is widespread in research on enteric nervous system development, as they are more cost-effective and simpler than mammalian models. Therefore, it is crucial to establish the culturing of enteric neurospheres from avian tissue and combine and optimize them with additional methods.

The first objective of my diploma work was to generate enteric neurospheres from intestinal tissue samples derived from chicken embryos. Since a neurosphere culture protocol specific to chicken models was not available, I followed methodologies described in mammalian model systems. This approach proved successful as a significant number of enteric neurospheres developed using the isolated distal intestinal tissue from 12-day-old chicken embryos. To optimize the process, I investigated the effects of adding GDNF, Noggin, and BMP-4 molecules. Based on my results, GDNF significantly increased the number of formed enteric neurospheres and promoted their formation and development. An important observation was that neurospheres cultured in GDNF-containing media formed buds on the seventh day, which was not observed in other model systems. We hypothesized that these structures were created through the clonal proliferation of enteric progenitor cells. Despite previous observations of BMP-4 inducing cell aggregation and gangliogenesis, my own findings indicated that BMP-4 had a negative effect on neurosphere formation.

Immunohistochemical analyses of the cultivated neurospheres revealed that by the third day following tissue culturing, enteric neurospheres contained a large number of smooth muscle and mesenchymal cells. However, their number significantly decreased by the seventh day, while the presence of neural crest derived cells increased. Using whole-mount immunohistochemistry, I confirmed that the buds induced by GDNF exhibited a neural phenotype, and through dual labeling, I successfully identified enteric nerve and glial cells that forms the enteric ganglia of the enteric nervous system. Neurospheres formed in GDNF-free media contained a small number of these cells.

During the seven-day culturing of neurospheres on fibronectin-coated surfaces, I observed that neurospheres cultured in GDNF-free media disintegrated, and the TuJ-1+ enteric neurons present did not form a neuronal network on the fibronectin-coated surface. In contrast, neurons that migrated from neurospheres cultured in GDNF-containing media formed processes and established extensive networks of nerve fibers. I did not find a significant difference on the area of fibronectin surface covered by neurons derived from neurospheres cultured in GDNF or GDNF+Noggin-containing media. It is important to note that Noggin-treated neurospheres formed a more complex and fiber-rich network compared to neurospheres treated with BMP-4.

After transplanting seven-day-old chicken derived enteric neurospheres into aganglionic quail hindgut mesenchyme, I observed that the cells from neurospheres cultured in the PMC basal medium did not colonize the quail hindgut and did not innervate the hindgut. In contrast, GDNF significantly enhanced the colonization and innervation capacity of the cells. Both GDNF and GDNF+Noggin neurospheres successfully colonized the quail colon and formed structures resembling enteric ganglia. Based on these findings, we assume that a more developed enteric nervous system will form with an extended incubation period and addition of developmentally important growth factors strongly support the neurogenesis

In summary, I successfully isolated and cultured enteric neurospheres from embryonic chicken hindguts. The neurospheres contained enteric neurons and glial cells, and their occurrence could be increased with GDNF. The enteric cells derived from neurospheres successfully colonized the aganglionic quail hindgut following transplantation. The addition of BMP-4, an important growth factor in enteric nervous system development, hindered the formation of enteric neurospheres. Conversely, Noggin potentially facilitates post-transplantation colonization, and previous results justify the use of Noggin to optimize the culturing conditions of neurospheres. Further experiments are required to examine its effects.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom elsősorban témavezetőmnek, Dr. Prof. Nagy Nándornak, az Óssejt és Kísérletes Embriológia laboratórium vezetőjének, segítőkész támogatásáért és szakdolgozati munkám koordinálásáért és kísérletek során nyújtott segítségéért, valamint belső konzulensemnek, Jezsó Bálintnak a dolgozatom alapos áttekintéséért. Köszönöm továbbá a Semmelweis Egyetem Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézetnek, hogy helyszínt biztosított a szakdolgozati munkám kísérleteinek elvégzéséhez. Megköszönöm az Óssejt és Kísérletes Embriológia laboratórium minden tagjának, kiemelten Soós Ádámnak, Szöcs Emőkének és Halasy Viktóriának, hogy saját munkájuk mellett engem is támogattak, kérdéseimre készségesen válaszoltak. Külön köszönettel tartozom Orbán Lili laborasszisztensnek, és Jancsovcics Dalma hallgatótársamnak, akik munkám során mindvégig a segítségemre voltak.

Irodalom

- Akbareian, S. E., Nagy, N., Steiger, C. E., Mably, J. D., Miller, S. A., Hotta, R., ... & Goldstein, A. M. (2013) Enteric neural crest-derived cells promote their migration by modifying their microenvironment through tenascin-C production. *Developmental biology*, **382**(2), 446-456.
- Asai, T. Fukuda, Z. Wu, A. Enomoto, V. Pachnis, M. Takahashi, F. Costantini. (2006) Targeted mutation of serine 697 in the Ret tyrosine kinase causes migration defect of enteric neural crest cells, *Development*, **133** (22), 4507–4516.
- Ayer-Le Lievre, C. S., & Le Douarin, N. M. (1982) The early development of cranial sensory ganglia and the potentialities of their component cells studied in quail-chick chimeras. *Developmental biology*, **94**(2), 291- 310.
- Bayliss, W. M.,& Starling, E. H. (1899) The movements and innervation of the small intestine. *The Journal of physiology*, **24**(2), 99-143.
- Breau, M. A., Dahmani, A., Broders-Bondon, F., Thiery, J. P., & Dufour, S. (2009) β 1 integrins are required for the invasion of the caecum and proximal hindgut by enteric neural crest cells. *Development*, **136**(16), 2791- 2801.
- Bronner, M. E.,& LeDouarin, N. M. (2012) Development and evolution of the neural crest: an overview. *Developmental biology*, **366**(1), 2-9.

- Brookes, S. J. (2001) Classes of enteric nerve cells in the guinea-pig small intestine. *The Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, **262**, 58-70.
- Burns, A. J., & Douarin, N. M. L. (1998). The sacral neural crest contributes neurons and glia to the post-umbilical gut: spatiotemporal analysis of the development of the enteric nervous system. *Development*, *125*(21), 4335-4347.
- Burns, A. J., Delalande, J. M. M., & Le Douarin, N. M. (2002) In ovo transplantation of enteric nervous system precursors from vagal to sacral neural crest results in extensive hindgut colonisation. *Development*, **129**(12), 2785-2796.
- Campos, L. S. (2004). Neurospheres: insights into neural stem cell biology. *Journal of neuroscience research*, **78**(6), 761-769.
- Chalazonitis, A., & Kessler, J. A. (2012) Pleiotropic effects of the bone morphogenetic proteins on development of the enteric nervous system. *Developmental neurobiology*, **72**(6), 843-856.
- Chalazonitis, A., & Kessler, J. A. (2012). Pleiotropic effects of the bone morphogenetic proteins on development of the enteric nervous system. *Developmental neurobiology*, **72**(6), 843-856.
- Chalazonitis, A., D'Autréaux, F., Guha, U., Pham, T. D., Faure, C., Chen, J. J., ... & Gershon, M. D. (2004) Bone morphogenetic protein-2 and-4 limit the number of enteric neurons but promote development of a TrkC- expressing neurotrophin-3-dependent subset. *Journal of Neuroscience*, **24**(17), 4266-4282.
- Chalazonitis, A., D'Autréaux, F., Pham, T. D., Kessler, J. A., & Gershon, M. D. (2011) Bone morphogenetic proteins regulate enteric gliogenesis by modulating ErbB3 signaling. *Developmental biology*, **350**(1), 64-79.
- Chen, J. C. (2022). Enteric neurosphere cells injected into rectal submucosa might migrate caudorostrally to reconstitute enteric ganglia along the entire length of postnatal colon. *Stem Cell Research & Therapy*, **13**(1), 498.
- Cheng, L. S., Graham, H. K., Pan, W. H., Nagy, N., Carreon-Rodriguez, A., Goldstein, A. M., & Hotta, R. (2016). Optimizing neurogenic potential of enteric neurospheres for treatment of neurointestinal diseases. *journal of surgical research*, **206**(2), 451-459.
- Cheng, L. S., Hotta, R., Graham, H. K., Belkind-Gerson, J., Nagy, N., & Goldstein, A. M. (2017). Postnatal human enteric neuronal progenitors can migrate, differentiate, and proliferate in embryonic and postnatal aganglionic gut environments. *Pediatric research*, **81**(5), 838-846.
- Cui, X., Hartanto, Y., & Zhang, H. (2017). Advances in multicellular spheroids formation. *Journal of the Royal Society Interface*, **14**(127), 20160877.
- D'amico-Martel, A., & Noden, D. M. (1983) Contributions of placodal and neural crest cells to avian cranial peripheral ganglia. *American Journal of Anatomy*, **166**(4), 445-468.

- de Santa Barbara, P., Williams, J., Goldstein, A. M., Doyle, A. M., Nielsen, C., Winfield, S., ... & Roberts, D. J. (2005) Bone morphogenetic protein signaling pathway plays multiple roles during gastrointestinal tract development. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, **234**(2), 312-322.
- Ding, X., Zhao, Z., Duan, W., Wang, S., Jin, X., Xiang, L., & Jin, X (2013) Expression patterns of CXCR4 in different colon tissue segments of patients with Hirschsprung's disease. *Experimental and molecular pathology*, **95**(1), 111-116.
- Dutt, S., Matasci, M., Sommer, L., & Zimmermann, D. R. (2006). Guidance of neural crest cell migration: the inhibitory function of the chondroitin sulfate proteoglycan, versican. *TheScientificWorldJOURNAL*, **6**, 1114-1117.:
- Fan, Y., Hackland, J., Baggiolini, A., Hung, L. Y., Zhao, H., Zumbo, P., ... & Studer, L. (2023). hPSC-derived sacral neural crest enables rescue in a severe model of Hirschsprung's disease. *Cell Stem Cell*, **30**(3), 264-282.
- Fei, T., Xia, K., Li, Z., Zhou, B., Zhu, S., Chen, H., ... & Chen, Y. G. (2010) Genome-wide mapping of SMAD target genes reveals the role of BMP signaling in embryonic stem cell fate determination. *Genome research*, **20**(1), 36-44.
- Forsythe, P., Bienenstock, J., & Kunze, W. A. (2014). Vagal pathways for microbiome-brain-gut axis communication. *Microbial endocrinology: the microbiota-gut-brain axis in health and disease*, 115-133.
- Fu, M., Lui, V. C. H., Sham, M. H., Pachnis, V., & Tam, P. K. H. (2004) Sonic hedgehog regulates the proliferation, differentiation, and migration of enteric neural crest cells in gut. *The Journal of cell biology*, **166**(5), 673-684.
- Fu, M., Tam, P. K. H., Sham, M. H., & Lui, V. C. H. (2004) Embryonic development of the ganglion plexuses and the concentric layer structure of human gut: a topographical study. *Anatomy and embryology*, **208**(1), 33- 41.
- Fu, M., Vohra, B. P., Wind, D., & Heuckeroth, R. O. (2006) BMP signaling regulates murine enteric nervous system precursor migration, neurite fasciculation, and patterning via altered Ncam1 polysialic acid addition. *Developmental biology*, **299**(1), 137-150.
- Fujiwara, N., Nakazawa-Tanaka, N., Miyahara, K., Arikawa-Hirasawa, E., Akazawa, C., & Yamataka, A. (2018) Altered expression of laminin alpha1 in aganglionic colon of endothelin receptor-B null mouse model of Hirschsprung's disease. *Pediatric surgery international*, **34**(2), 137-141.
- Furness, J. B. (2000) Types of neurons in the enteric nervous system. *Journal of the autonomic nervous system*, **81**(1-3), 87-96.

- Furness, J. B. (2006) *The Enteric Nervous System*. Blackwell Publishing, Malden, Massachusetts, US, pp 1, 15, 20, 31-34, ISBN-13: 978-1-4051-3376-0, ISBN-10: 1-4051-3376-7
- Furness, J. B. (2012) The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, **9**, 286-294.
- Furness, J. B., & Stebbing, M. J. (2017) The first brain: Species comparisons and evolutionary implications for the enteric and central nervous systems. *Neurogastroenterology & motility*, **30(2)**
- Furness, J. B., Callaghan, B. P., Rivera, L. R., & Cho, H. J. (2014). The enteric nervous system and gastrointestinal innervation: integrated local and central control. *Microbial endocrinology: The microbiota-gut-brain axis in health and disease*, 39-71.
- Furness, J. B., & M. Costa (1980) Types of nerves in the enteric nervous system. *Commentaries in the Neurosciences*, 235-252.
- Gabriel, S. B., Salomon, R., Pelet, A., Angrist, M., Amiel, J., Fornage, M., ... & Chakravarti, A. (2002) Segregation at three loci explains familial and population risk in Hirschsprung disease. *Nature genetics*, **31(1)**, 89-93.
- Gans, C., & Northcutt, R. G. (1983) Neural crest and the origin of vertebrates: a new head. *Science*, **220(4594)**, 268-273.
- Gao, N., Wang, J., Zhang, Q., Zhou, T., Mu, W., Hou, P., ... & Li, A. (2020) Aberrant Distributions of Collagen I, III, and IV in Hirschsprung Disease. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, **70(4)**, 450-456.
- Gilbert, S. F., & Barresi, Michael J.F. (2016) *Developmental biology*. Sinauer Associates Inc., Sunderland, United States
- Glick, D. B., Glick, G., & Stein, E. J. (2019). The autonomic nervous system. *Basics of anesthesia*, **6**.
- Goldstein, A. M., & Nagy, N. (2008) A bird's eye view of enteric nervous system development: lessons from the avian embryo. *Pediatric research*, **64(4)**, 326-333.
- Goldstein, A. M., Brewer, K. C., Doyle, A. M., Nagy, N., & Roberts, D. J. (2005) BMP signaling is necessary for neural crest cell migration and ganglion formation in the enteric nervous system. *Mechanisms of development*, **122(6)**, 821-833.
- Gunn, M. (1951). A study of the enteric plexuses in some amphibians. *Journal of Cell Science*, **3(17)**, 55-77.
- Hall, B. K. (1998) Germ layers and the germ-layer theory revisited. *Evolutionary biology*, 121-186.

- Heredia, D. J., Gershon, M. D., Koh, S. D., Corrigan, R. D., Okamoto, T., & Smith, T. K. (2013). Important role of mucosal serotonin in colonic propulsion and peristaltic reflexes: in vitro analyses in mice lacking tryptophan hydroxylase 1. *The Journal of physiology*, **591**(23), 5939-5957.
- Hinz, B., Phan, S. H., Thannickal, V. J., Prunotto, M., Desmoulière, A., Varga, J., ... & Gabbiani, G. (2012). Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling. *The American journal of pathology*, **180**(4), 1340-1355.
- His, W. (1868). Untersuchungen über die erste Anlage des Wirbelthierleibes: die erste Entwicklung des Hühnchens im Ei, *FCW Vogel*, **1**
- Holschneider, A. M., & Puri, P. (2008). Hirschsprung's disease and allied disorders (pp. 115-123).
- Hotta, R., Stamp, L. A., Foong, J. P., McConnell, S. N., Bergner, A. J., Anderson, R. B., ... & Young, H. M. (2013). Transplanted progenitors generate functional enteric neurons in the postnatal colon. *The Journal of clinical investigation*, **123**(3), 1182-1191:
- Huycke, T. R., Miller, B. M., Gill, H. K., Nerurkar, N. L., Sprinzak, D., Mahadevan, L., & Tabin, C. J. (2019) Genetic and Mechanical Regulation of Intestinal Smooth Muscle Development. *Cell*, **179**(1), 90–105.e21.
- Kapur, R. P. (2000). Developmental disorders of the enteric nervous system. *Gut*, 47(suppl. 4), iv81-iv83.
- Kawaguchi, J., Nichols, J., Gierl, M. S., Faial, T., & Smith, A. (2010). Isolation and propagation of enteric neural crest progenitor cells from mouse embryonic stem cells and embryos. *Development*, **137**(5), 693-704.
- Kim, S., Cho, A. N., Min, S., Kim, S., & Cho, S. W. (2019). Organoids for advanced therapeutics and disease models. *Advanced Therapeutics*, **2**(1), 1800087.
- Kim, W., Gwon, Y., Park, S., Kim, H., & Kim, J. (2023). Therapeutic strategies of three-dimensional stem cell spheroids and organoids for tissue repair and regeneration. *Bioactive Materials*, **19**, 50-74.
- Kirby, M. L., & Waldo, K. L. (1995). Neural crest and cardiovascular patterning. *Circulation research*, **77**(2), 211-215.
- Kléber, M., Lee, H. Y., Wurdak, H., Buchstaller, J., Riccomagno, M. M., Ittner, L. M., ... & Sommer, L. (2005) Neural crest stem cell maintenance by combinatorial Wnt and BMP signaling. *The Journal of cell biology*, **169**(2), 309-320.
- Kuo, B. R., & Erickson, C. A. (2010). Regional differences in neural crest morphogenesis. *Cell adhesion & migration*, **4**(4), 567-585.

- Lamanna, C., Costagliola, A., Vittoria, A., Mayer, B., Assisi, L., Botte, V., & Cecio, A. (1999). NADPH-diaphorase and NOS enzymatic activities in some neurons of reptilian gut and their relationships with two neuropeptides. *Anatomy and embryology*, **199**(5), 397-405.
- Lane, S. W., Williams, D. A., & Watt, F. M. (2014). Modulating the stem cell niche for tissue regeneration. *Nature biotechnology*, **32**(8), 795-803.
- Le Douarin, N., & Teillet, M. A. (1973) The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo. *Development*, **30**(1), 31-48.
- Leenders, E., & Sieber, W. K. (1970). Congenital megacolon observation by Frederick Ruysch- 1691. *Journal of pediatric surgery*, **5**(1), 1-3.
- Lièvre, C. L., & Douarin, N. L. (1975). Mesenchymal derivatives of the neural crest: analysis of chimaeric quail and chick embryos. *Development*, **34**(1), 125-154.
- Lindley, R. M., Hawcutt, D. B., Connell, M. G., Almond, S. N., Vannucchi, M. G., Fausone-Pellegrini, M. S., ... & Kenny, S. E. (2008). Human and mouse enteric nervous system neurosphere transplants regulate the function of aganglionic embryonic distal colon. *Gastroenterology*, **135**(1), 205-216.
- Lindley, R. M., Hawcutt, D. B., Connell, M. G., Edgar, D. H., & Kenny, S. E. (2009). Properties of secondary and tertiary human enteric nervous system neurospheres. *Journal of pediatric surgery*, **44**(6), 1249-1256.
- Margolis, K. G., Gershon, M. D., & Bogunovic, M. (2016). Cellular organization of neuroimmune interactions in the gastrointestinal tract. *Trends in immunology*, **37**(7), 487-501.
- Mccallion, A. S., & Chakravarti, A. (2001) EDNRB/EDN3 and Hirschsprung disease type II. *Pigment Cell Research*, **14**(3), 161-169.
- McKeown, S. J., Mohsenipour, M., Bergner, A. J., Young, H. M., & Stamp, L. A. (2017). Exposure to GDNF enhances the ability of enteric neural progenitors to generate an enteric nervous system. *Stem cell reports*, **8**(2), 476-488.
- Miyazono, K., Maeda, S., & Imamura, T. (2005). BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine & growth factor reviews*, **16**(3), 251-263.
- Nagy, N., & Goldstein, A. M. (2006). Endothelin-3 regulates neural crest cell proliferation and differentiation in the hindgut enteric nervous system. *Developmental biology*, **293**(1), 203-217.
- Nagy, N., & Goldstein, A. M. (2017). Enteric nervous system development: A crest cell's journey from neural tube to colon. *Seminars in cell & developmental biology*, **66**, 94-106.

- Nagy, N., Barad, C., Graham, H. K., Hotta, R., Cheng, L. S., Fejszak, N., & Goldstein, A. M. (2016) Sonic hedgehog controls enteric nervous system development by patterning the extracellular matrix. *Development*, **143**(2), 264-275.
- Nagy, N., Brewer, K. C., Mwizerwa, O., & Goldstein, A. M. (2007) Pelvic plexus contributes ganglion cells to the hindgut enteric nervous system. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, **236**(1), 73-83.
- Nagy, N., Burns, A. J., & Goldstein, A. M. (2012). Immunophenotypic characterization of enteric neural crest cells in the developing avian colorectum. *Developmental Dynamics*, **241**(5), 842-851.
- Nagy, N., Guyer, R. A., Hotta, R., Zhang, D., Newgreen, D. F., Halasy, V., ... & Goldstein, A. M. (2020) RET overactivation leads to concurrent Hirschsprung disease and intestinal ganglioneuromas. *Development*, **147**(21).
- Nagy, N., Mwizerwa, O., Yaniv, K., Carmel, L., Pieretti-Vanmarcke, R., Weinstein, B. M., & Goldstein, A. M. (2009) Endothelial cells promote migration and proliferation of enteric neural crest cells via $\beta 1$ integrin signaling. *Developmental biology*, **330**(2), 263-272.
- Nishiyama, C., Uesaka, T., Manabe, T., Yonekura, Y., Nagasawa, T., Newgreen, D. F., ... & Enomoto, H. (2012). Trans-mesenteric neural crest cells are the principal source of the colonic enteric nervous system. *Nature neuroscience*, **15**(9), 1211-1218.
- Obermayr, F., Hotta, R., Enomoto, H., & Young, H. M. (2013) Development and developmental disorders of the enteric nervous system. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, **10**(1), 43.
- Parikh, D. H., Tam, P. K. H., Van Velzen, D., & Edgar, D. (1994) The extracellular matrix components, tenascin and fibronectin, in Hirschsprung's disease: An immunohistochemical study. *Journal of pediatric surgery*, **29**(10), 1302-1306.
- Parikh, D. H., Tam, P. K., Van Velzen, D., & Edgar, D. (1992) Abnormalities in the distribution of laminin and collagen type IV in Hirschsprung's disease. *Gastroenterology*, **102**(4), 1236-1241.
- Pattyn, X., Morin, H., Cremer, C., Goridis, J.F., Brunet. (1999) The homeobox gene Phox2b is essential for the development of autonomic neural crest derivatives, *Nature*, **399**, 366-370.
- Pinchuk, I. V., Mifflin, R. C., Saada, J. I., & Powell, D. W. (2010). Intestinal mesenchymal cells. *Current gastroenterology reports*, **12**, 310-318.
- Powley, T. L., & Phillips, R. J. (2002). I. Morphology and topography of vagal afferents innervating the GI tract. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, **283**(6), G1217-G1225.

- Reedy, M. V., Faraco, C. D., & Erickson, C. A. (1998). The delayed entry of thoracic neural crest cells into the dorsolateral path is a consequence of the late emigration of melanogenic neural crest cells from the neural tube. *Developmental biology*, **200**(2), 234-246.
- Reynolds, B. A., & Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *science*, **255**(5052), 1707-1710.
- Roberts, D. J., Johnson, R. L., Burke, A. C., Nelson, C. E., Morgan, B. A., & Tabin, C. (1995) Sonic hedgehog is an endodermal signal inducing Bmp-4 and Hox genes during induction and regionalization of the chick hindgut. *Development*, **121**(10), 3163-3174.
- Roper, J., Tammela, T., Cetinbas, N. M., Akkad, A., Roghanian, A., Rickelt, S., ... & Yilmaz, Ö. H. (2017). In vivo genome editing and organoid transplantation models of colorectal cancer and metastasis. *Nature biotechnology*, **35**(6), 569-576.
- Sasselli, V., Pachnis, V., & Burns, A. J. (2012) The enteric nervous system. *Developmental biology*, **366**(1), 64-73.
- Schäfer, K. H., Hagl, C. I., & Rauch, U. (2003). Differentiation of neurospheres from the enteric nervous system. *Pediatric surgery international*, **19**, 340-344.
- Schemann, M. (2005) Control of gastrointestinal motility by the “gut brain”- the enteric nervous system. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, **41**, S4-S6.
- Schmittenebecher, P. P., Sacher, P., Cholewa, D., Haberlik, A., Menardi, G., Moczulski, J., ... & Ure, B. (1999) Hirschsprung's disease and intestinal neuronal dysplasia—a frequent association with implications for the postoperative course. *Pediatric surgery international*, **15**(8), 553-558.
- Sedlmeier, G., & Sleeman, J. P. (2017). Extracellular regulation of BMP signaling: welcome to the matrix. *Biochemical Society transactions*, **45**(1), 173-181.
- Selleck, M. A., & Bronner-Fraser, M. (1995) Origins of the avian neural crest: the role of neural plate-epidermal interactions. *Development*, **121**(2), 525-538.
- Serbedzija, G. N., Bronner-Fraser, M., & Fraser, S. E. (1994) Developmental potential of trunk neural crest cells in the mouse. *Development*, **120**(7), 1709-1718.
- Smith, T. K., & Gershon, M. D. (2015). CrossTalk proposal: 5-HT is necessary for peristalsis. *The Journal of physiology*, **593**(15), 3225.
- Stavely, R., Bhawe, S., Ho, W. L. N., Ahmed, M., Pan, W., Rahman, A. A., ... & Hotta, R. (2021). Enteric mesenchymal cells support the growth of postnatal enteric neural stem cells. *Stem Cells*, **39**(9), 1236-1252.

Sukegawa, A., Narita, T., Kameda, T., Saitoh, K., Nohno, T., Iba, H., ... & Fukuda, K. (2000) The concentric structure of the developing gut is regulated by Sonic hedgehog derived from endodermal epithelium. *Development*, **127**(9), 1971-1980.

Swenson, O., Rheinlander, H. F., & Diamond, I. (1949) Hirschsprung's disease: A new concept of the etiology: Operative results in thirty-four patients. *New England Journal of Medicine*, **241**(15), 551-556.

Talele, N. P., Fradette, J., Davies, J. E., Kapus, A., & Hinz, B. (2015). Expression of α -smooth muscle actin determines the fate of mesenchymal stromal cells. *Stem cell reports*, **4**(6), 1016-1030.

the inhibitory function of the chondroitin sulfate proteoglycan, versican. *TheScientificWorldJOURNAL*, **6**, 1114- 1117.

Timmermans, J. P., Hens, J., & Adriaensen, D. (2001). Outer submucous plexus: an intrinsic nerve network involved in both secretory and motility processes in the intestine of large mammals and humans. *The Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, **262**(1), 71-78.

Wallace, A. S., & Burns, A. J. (2005). Development of the enteric nervous system, smooth muscle and interstitial cells of Cajal in the human gastrointestinal tract. *Cell and tissue research*, **319**(3), 367-382.

Wallace, A. S., & Burns, A. J. (2005). Development of the enteric nervous system, smooth muscle and interstitial cells of Cajal in the human gastrointestinal tract. *Cell and tissue research*, **319**, 367-382.

Wallace, K. N., Akhter, S., Smith, E. M., Lorent, K., & Pack, M. (2005). Intestinal growth and differentiation in zebrafish. *Mechanisms of development*, **122**(2), 157-173.

Wang, X., Chan, A. K., Sham, M. H., Burns, A. J., & Chan, W. Y. (2011). Analysis of the sacral neural crest cell contribution to the hindgut enteric nervous system in the mouse embryo. *Gastroenterology*, **141**(3), 992-1002.

Yin, X., Yang, S., Zhang, M., & Yue, Y. (2019). The role and prospect of JMJD3 in stem cells and cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **118**, 109384.

Yntema, C. L., & Hammond, W. S. (1954) The origin of intrinsic ganglia of trunk viscera from vagal neural crest in the chick embryo. *Journal of Comparative Neurology*, **101**(2), 515-541.

Young, H. M., & Newgreen, D. (2001). Enteric neural crest-derived cells: origin, identification, migration, and differentiation. *The Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, **262**(1), 1-15.

Young, H. M., Hearn, C. J., Ciampoli, D., Southwell, B. R., Brunet, J. F., & Newgreen, D. F. (1998). A single rostrocaudal colonization of the rodent intestine by enteric neuron precursors is revealed by the expression of Phox2b, Ret, and p75 and by explants grown under the kidney capsule or in organ culture. *Developmental biology*, **202**(1), 67-84.

Zanoni, M., Cortesi, M., Zamagni, A., Arienti, C., Pignatta, S., & Tesei, A. (2020). Modeling neoplastic disease with spheroids and organoids. *Journal of hematology & oncology*, **13**(1), 1-15.

NYILATKOZAT

Név: Pethő Csongor László


ELTE Természettudományi Kar, szak: Biológus MSc

NEPTUN azonosító: HNT9JF

Diplomamunka címe: Csirke eredetű enterális neurospheres képzése, karakterizálása és transzplantációja ganglionmentes utóbélbe

A diplomamunka szerzőjeként fegyelmi felelősségem tudatában kijelentem, hogy a dolgozatom önálló szellemi alkotásom, aban a hivatkozások és idézések standard szabályait következetesen alkalmaztam, mások által írt részeket a megfelelő idézés nélkül nem használtam fel.

Budapest,
2022.05.20


.....
A hallgató aláírása

MELLÉKLETEK

NS terület (mm ²)		PMC	PMC+GDNF	PMC+GDNF+Noggin	PMC+GDNF+BMP-4
	1	0.057	0.032	0.017	0.001
	2	0.026	0.024	0.01	0.001
	3	0.018	0.053	0.018	0.001
	4	0.045	0.04	0.029	0.002
	5	0.04	0.021	0.016	0.001
	6	0.015	0.049	0.038	0.001
	7	0.018	0.026	0.02	0.001
	8	0.027	0.045	0.019	0.001
	9	0.052	0.015	0.027	0.001
	10	0.027	0.021	0.011	0.004
	11	0.064	0.043	0.019	0.002
	12	0.011	0.021	0.019	0.002
	13	0.023	0.071	0.015	0.001
	14	0.016	0.064	0.017	0.007
	15	0.031	0.011	0.087	0.0008
	16	0.039	0.03	0.068	0.0008
	17	0.062	0.053	0.066	0.0007
	18	0.051	0.019	0.013	0.0008
	19	0.026	0.039	0.074	0.0007
	20	0.004	0.043	0.061	0.0009
	21	NA	0.009	0.044	0.0009
	22	NA	0.049	0.093	0.003
	23	NA	0.038	0.06	0.004
	24	NA	0.05	0.063	NA
	25	NA	0.047	0.031	NA
	26	NA	0.008	0.071	NA
27	NA	0.014	0.022	NA	
MIN.	0.004	0.008	0.01	0.0007	
MAX.	0.064	0.071	0.093	0.007	
ÁTLAG	0.0326	0.03462963	0.038074074	0.001678261	
SZÓRÁS	0.017697457	0.017234019	0.025955474	0.001518659	

TuJ-1 neuronok által behálózott fibronectin felszín területe		PMC	PMC+GDNF	PMC+GDNF+Noggin	PMC+GDNF+BMP-4
	1	0	0.035	0.161	0.024
	2	0	0.085	0.188	0.037
	3	0	0.098	0.107	0.02
	4	0	0.01	0.042	0.023
	5	0	0.064	0.032	0.079
	6	0	0.11	0.057	0.01
	7	0	0.069	0.024	0.025
	8	0	0.138	0.027	0.047
	9	0	0.146	0.045	0.036
	10	0	0.08	0.263	0.045
	11	0	0.077	0.074	0.026
	12	0	0.074	0.053	0.007
	13	0	0.018	0.061	0.005
	14	0	0.047	0.028	0.002
	15	0	0.03	0.1	0.003
	16	0	0.116	0.068	0.016
	17	0	0.016	0.062	0.033
	18	0	0.092	0.246	0.03
	19	0	0.173	0.216	0.019
	20	0	0.067	0.061	0.103
21	0	0.077	0.198	0.027	
MIN.	0	0.01	0.024	0.002	
MAX.	0	0.173	0.263	0.103	
ÁTLAG	0	0.077238095	0.100619048	0.029380952	

1. melléklet: A statisztikai analízishez felhasznált mérési adatok