



M Ű E G Y E T E M 1 7 8 2

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Vegyész-mérnöki és Biomérnöki Kar

Szakdolgozat

Biomérnök alapszak, egészségvédelmi szakirány

Kondroitin-szulfát proteoglikánok karakterizálása és módosítása az enterális idegi őssejtek transzplantációs hatékonyságának növelése érdekében kísérletes Hirschsprung-kór modellben

készítette:

Tóth Réka Borbála

témavezető:

Prof. Dr. Nagy Nándor, egyetemi tanár
Semmelweis Egyetem, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet
Őssejt és Kísérletes Embriológia Laboratórium

Szócs Emőke, doktorandusz hallgató
Semmelweis Egyetem, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet
Őssejt és Kísérletes Embriológia Laboratórium

belső témavezető:

Prof. Dr. Szarka András, egyetemi tanár
Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Vegyész és Biomérnöki Kar
Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

Budapest, 2024.

Tartalom

I.Bevezetés.....	2
II.Irodalmi áttekintés	3
2.1. A bélidegrendszer általános felépítése	3
2.2. A bélidegrendszer embrionális fejlődése	5
2.3. A ganglionléc sejtek vándorlásának molekuláris háttere.....	8
2.4. A Hirschsprung-kór embrionális alapjai	9
2.5. Extracelluláris mátrixmolekulák és szerepük.....	11
2.6. Össejt-eredetű spheroidok.....	15
III.Célkitűzések	19
IV.Anyagok és módszerek	20
4.1. Kísérleti állatok	20
4.2. Minták szövettani feldolgozása	20
4.3. Immunhisztokémia.....	21
4.4. <i>In vitro</i> sejt migrációs assay.....	22
4.5. <i>In vitro</i> függesztett szervtenyészet	23
4.6. Metszetek értékelése, képfeldolgozás	23
4.7. Neurosphere generálás.....	23
4.8. Neurosphere transzplantáció.....	26
V.Eredmények és megvitátásuk	27
5.1. Kondroitin-szulfát proteoglikánok eloszlása az utóbél embrionális fejlődése során.....	27
5.2. A kondroitin-szulfát proteoglikánok gátolják az enterális ganglionléc sejtek migrációját <i>in vitro</i>	29
5.3. <i>In vitro</i> kondroitináz kezelés megzavarja az enterális ganglionléc sejtek migrációs mintázatát	30
5.4 Transzplantált enterális neurospherek migrációs hatékonyságának jellemzése.....	32
VI.Összefoglalás.....	36
VII.Irodalomjegyzék	38
VIII.Köszönetnyilvánítás	43
IX.Függelék.....	44

I. Bevezetés

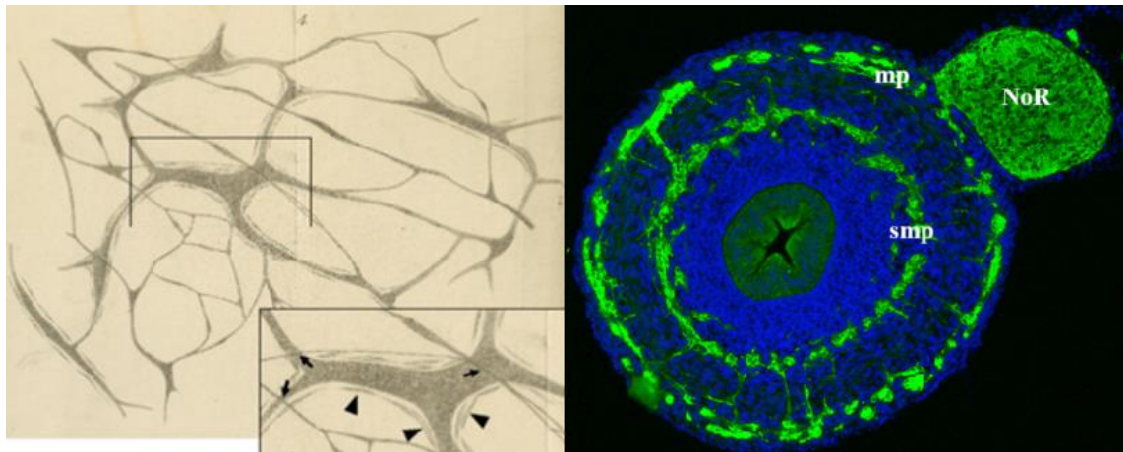
A regeneratív orvoslás, azon belül is a szövetmérnökség a modern orvostudományok egyik legígéretesebb és legdinamikusabban fejlődő ága, amely során valamely betegség vagy baleset következtében elpusztult sejtek, szövetek, esetleg egész szervek pótlása válik lehetővé. A kutatások során kulcsfontosságú szerep jut az őssejtek felhasználásának, kiemelten az őssejtekből alapított organoidoknak, amelyek transzplantációja a regeneratív medicina alapjait teremti meg. A hatékony őssejtterápia számára egyáltalán nem közömbös az őssejteket fogadó extracelluláris mikrokörnyezet szerkezetének pontos megismerése, karakterizálása és összehangolása.

A bélidegrendszer (enteric nervous system – ENS) a neuronok és a glia sejtek komplex hálózata, amely a gasztrointesztinális traktus teljes hosszában megtalálható, és a vegetatív idegrendszer legnagyobb autonóm alrendszerét képezi. Az ideg-és gliasejtek két, egymással szorosan összekapcsolt hálózatba rendeződnek: ezek a plexus myentericus és a plexus submucosus, amelyek összehangolt működése irányítja a megfelelő bélperisztaltikát, abszorpciót és szekréciót. A bélidegrendszer kialakításában a korai embrionális fejlődés során intenzív migrációt folytató dúcléc eredetű sejtek vesznek részt, amelyek a bélcső mesenchymáját kolonizálva neuron és glia irányú differenciációt mutatnak. Az említett folyamatokban jelentkező fejlődési zavar veleszületett neurointesztinális betegségek kialakulásához vezet, amelyek közül a Hirschsprung-kór (megacolon congenitum, HSCR) a vastagbél változó hosszúságú ganglionmentességével jár. Az intramurális parasymphaticus dúcok hiánya az érintett szakasz funkcióvesztését eredményezi, a motilitást nem mutató ganglionmentes területtől proximálisan a colon rendellenesen kitágul. Egyetlen terápiás megoldást az érintett ganglionmentes bélszakasz sebészi eltávolítása jelenti, azonban a páciensek gyakran hosszú távú bélgyulladásban szenvednek, így a klinikum felől egyre nagyobb az igény egy alternatív terápia kifejlesztésére. Az őssejt-transzplantációt övező kutatások új lehetőséget biztosítanak egy kevésbé invazív, a regeneratív orvoslás elveinek megfelelő terápiás eljárásra, ehhez azonban alapvető fontosságú a transzplantált sejtek jellemzése mellett a fogadó szöveti mikrokörnyezet részletes karakterizálása.

II. Irodalmi áttekintés

2.1. A bélidegrendszer általános felépítése

A 19. században a mikroszkópia és a sejtszintű tudományos módszertani eljárások fejlődésével beköszöntött a hisztológia, morfológia és élettan aranykora, ezáltal rendkívüli tudományos áttöréseket értek el a korabeli kutatók. Erre az időszakra esik a bélidegrendszer (enteric nervous system – ENS) részletes hisztológiai leírása is. Georg Meissner 1857-ben figyelte meg elsőként a submucosa idegfonatát (plexus submucosus vagy Meissner plexus) (Meissner plexus 1.ábra) (Neckel, 2023) majd 1862-ben Leopold Auerbach leírta a bél két izomrétege között megtalálható plexus myentericust (Auerbach plexus) (Wincewicz & Woltanowski, 2020).



1. ábra (A) A Meissner-fonat első publikált rajza (Billroth, 1858). Meissner felfedezését kép nélkül publikálta, az 1858-ban Bilroth által készült rajz pedig egy 6 napos gyermek submucosus plexusáról készült, valamint egy nagyított rajzot is készített, amellyel az intraganglionáris részeket kívánta bemutatni. (Neckel, 2023) **(B)** TUJ-1 jelölt E9 csirkeembrió keresztmetszeti képe fluoreszcens mikroszkóp alatt, megfigyelhető a két koncentrikus körben elhelyezkedő plexus subucosus (smp) és myentericus (mp), valamint a madarakra jellemző, erős pozitív jelet adó Remak ideg (NoR). (saját felvétel)

A bélidegrendszer a vegetatív idegrendszer legnagyobb alegysége a paraszimpatikus és szimpatikus idegrendszer mellett, amely egy kiterjedt, neuronokból és gliasejtekből álló hálózatot alkot a gasztrointesztinális traktus falában. (Cheng et al., 2017). A nagyszámú neuron és gliasejt komplex hálózata intrinsic reflexkörök révén képes a központi idegrendszer (central nervous system – CNS) nélkül is összehangoltan irányítani a gyomor-bél traktus funkcióit (Furness, 2012), ezért gyakran „második agynak” is nevezik (Hao & Young, 2009). A neuronális aktivitást tetrodotoxinnal vagy neurotranszmissziót gátló nikotin- és muszkarin-receptor

gátlókkal blokkolva megszüntethető a bélperisztaltika, ezzel is bizonyítva, hogy a bél az enterális idegrendszerre támaszkodik leginkább a funkcionális bélmozgás fenntartásához (Furness, n.d.). A gyomor-bélrendszer idegi szabályozására azonban egy integrált rendszerként kell tekintenünk, amely magába foglalja a lokális enterális szabályozáson kívül a szimpatikus ganglionokon keresztül haladó információkat, továbbá a bélből induló, majd a központi idegrendszer közreműködésével létrejövő komplex kölcsönhatásokat (Furness, 2012).

A bélidegrendszer hozzávetőlegesen 100 millió neuronból áll és akár hétszer annyi gliasejtet is tartalmazhat. A neuronok fő funkciójuk szerint három nagy csoportba sorolhatók: szenzoros neuronok, amelyek kémiai, termikus vagy mechanikai ingerek hatására aktiválódnak; interneuronok, amelyek a jelek továbbításáért felelősek a szenzoros és motoros neuronok között; valamint a motoros neuronok (Rao & Gershon, 2016; Wood, 2002). A motoros neuronok tovább oszthatók serkentő és gátló neuronokra. A serkentő neuronok izomösszehúzódást idéznek elő neurotranszmitterük, az acetilkolin felszabadulásával (Kleinschmidt et al., 2011), a gátló neuronok a serkentők működését gátolják, elsősorban a nitrogén-oxid (NO) és a vasoaktív intesztinális peptid (VIP) neurotranszmitterek segítségével (Mueller & Goldstein, 2022a). Az idegi hatás az izom ritmikus aktivitására épül, amelyet a Cajal-féle intersticiális sejtek, mint mezodermális eredetű, nem idegi sejttípus generálnak. (Furness, n.d.).

A neuronok ganglionokba rendeződnek és így oszlanak el az egész gasztrointesztinális traktus területén, a nyelőcsőtől a végbélig. Elmondható, hogy az enterális neuronok és a gliasejtek túlnyomó többsége két jól definiálható, egymással összekapcsolt hálózatba rendeződik. Ezek a plexus myentericus (a hosszanti és körkörös izomrétegek közt), valamint a plexus submucosus (a hámréteg és a körkörös izomréteg közt) idegfonatokat alkotják. (Mueller & Goldstein, 2022a). Madarakban és emlősökben az enterális neuronok nagy része a myentericus ganglionokba csoportosul. Kisebb emlősök esetén a plexus myentericus neuronjai elsősorban a bél motilitásának szabályozásában vesznek részt, a szekrécióért és az értónusért pedig a submucosus hálózat neuronjai felelnek (Hao & Young, 2009).

A bélidegrendszer továbbá szorosan együttműködik és kölcsönhatásban van a bél immun- és endokrin rendszerével, ezáltal integrálva a bél lumenéből érkező nagy számú stimulust (Furness, 2012). Az említett komplex kölcsönhatások alapján egyszerűen belátható, hogy a bélidegrendszer bármely funkciójának sérülése vagy

kiesése súlyos következményekkel járhat és számos veleszületett és szerzett neuropathia kialakulásához vezethet (Furness, 2012).

2.2. A bélidegrendszer embrionális fejlődése

A bélidegrendszer embrionális fejlődése egy összehangolt, többszörösen összetett kölcsönhatásokra épülő folyamat, amely a mezenchymális mikrokörnyezet és az enterális ganglionléc eredetű sejtek (ENCC-k) egymásra hatása révén következik be. A megfelelő struktúra, a funkcionális hálózat kialakításához a sejtek osztódási, migrációs és differenciálódási lépések sorozatán esnek át a fejlődő gasztrointesztinális traktusban (Nagy et al., 2021).

A gerincesek embriogenezise során megjelenő ganglionléc (neural crest - NC) egy tranziens, multipotens, nagy plaszticitással rendelkező, migráló sejtpopuláció, aminek sejtjeiből olyan struktúrák származtathatók, mint a perifériás idegrendszer neuron és glia elemei, a craniofaciális terület ectomesenchymalis származékai vagy a bőr pigmentsejtjei (Kudlik et al., 2015). A ganglionléc sejtek felfedezése a csirke embrióhoz köthető, 1868-ban egy német embriológus és anatómus, Wilhelm His írta le elsőként és megállapította, hogy a kivándorló neurális őssejtek a velőcső mellett halmozódnak fel, ahol a későbbiekben a gerincvelői dúcok fejlődnek ki (Le Douarin & Dupin, 2018). A ganglionléc a velőlemez (lamina neuralis) és a nem neuralis (epidermalis) ectoderma határán alakul ki. A neurolatio folyamata során a velőcső lefűződésével és záródásával a ganglionléc a velőcső dorsalis részére kerül. Azon sejtek, amelyek Foxd3 és Sox10 géneket expresszálnak epithelialis-mesenchymalis átalakuláson (EMT) esnek át, elveszítik kapcsolatukat a szomszédos sejtekkel, leválnak a velőcsőről és az embrió különböző szervrendszereit kolonizálják, ahol a lokális mikrokörnyezet hatására változatos differenciálódási folyamatokon mennek keresztül. (Kudlik et al., 2015).

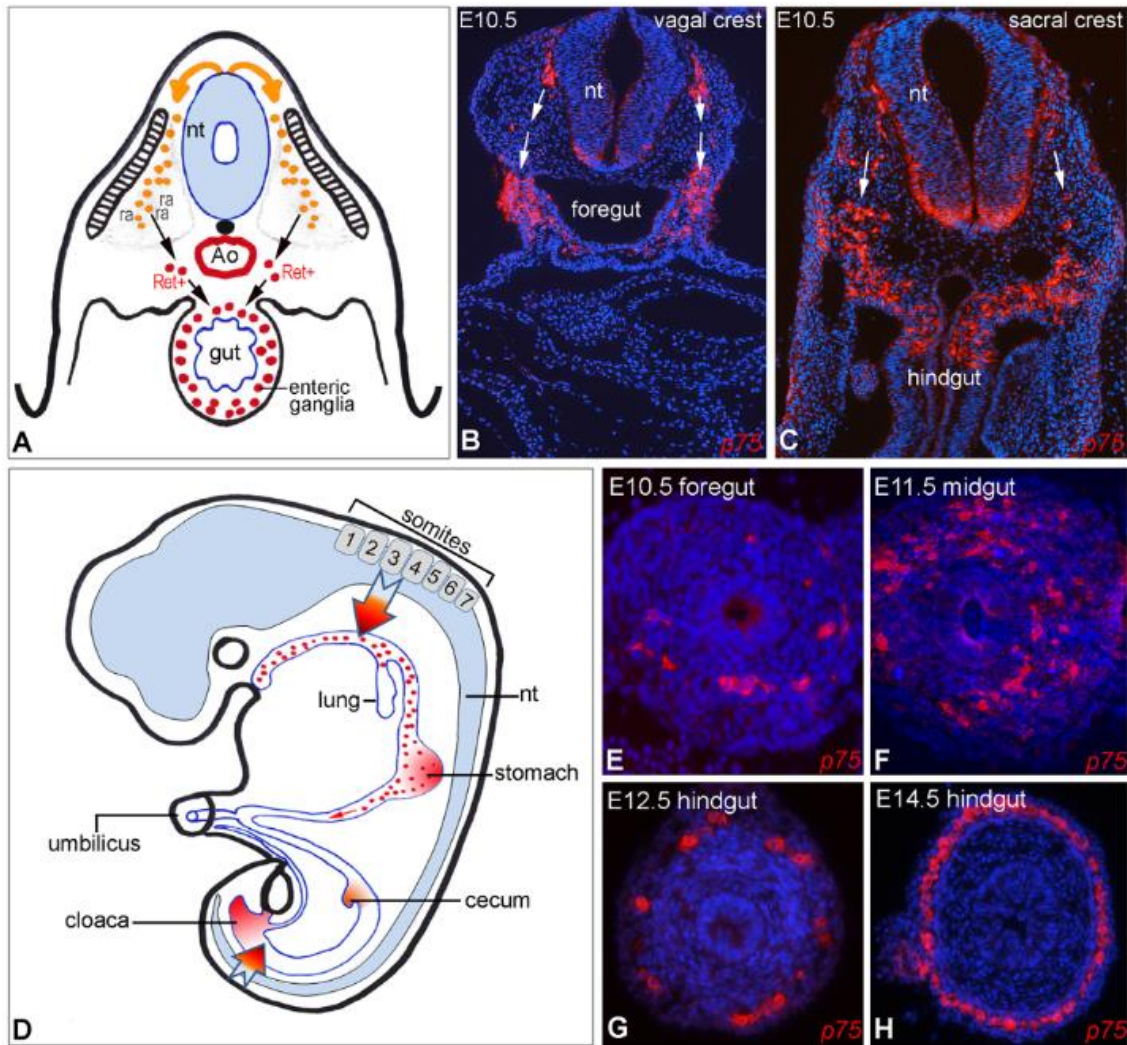
A ganglionléc cranio-caudalis irányban négy fő funkcionális régióra osztható: feji (cranialis), nyaki (vagalis), törzsi (trunk) és sacralis ganglionléc. (Bronner & LeDouarin, 2012). A feji ganglionléc (cranial neural crest) hozza létre az arccsontok jelentős részét, a melanocytákat, valamint egyes agyidegi érződúcokat és gliasejteket (Rothstein et al., 2018).

A vagus régióból származó ganglionléc (vagal neural crest) sejtjei a fejlődő embrió 1-7-es szomitáinak magasságából származnak, a feji és a törzsi ganglionléc

között elhelyezkedve (3.ábra) és kulcsfontosságú szerepet töltenek be a bélidegrendszer fejlődésében. Az első három szomita magasságából legkorábban kivándorló sejtek jellegzetes dorzolaterális migrációs útvonalat követve a szív és a garatívek területére vándorolnak (Kirby & Stewart, 1983; Rothstein et al., 2018). Ezzel szemben, ugyanezen régióból később vándorlásnak induló sejtek ventrális irányba haladva a szomiták között belépnek az előbélbe és részt vesznek a bélidegrendszer kialakításában. A caudálisabban elhelyezkedő 4-7 szomiták magasságából kivándorló sejtek kizárólag a ventrális útvonalon vándorolnak és bélidegrendszeri őssejtként lépnek be az előbélbe. A dorzalis velőcső 1-7. szomiták melletti területéről caudális irányban kivándorló sejtek csirke embrióban végzett megfigyelése alapján a sejtek az embrionális fejlődés 2,5. napján (E2.5) lépnek be az előbélbe, majd a 4,5. napon (E4.5) érik el a gyomrot, az 5,5. embrionális napon (E5,5) a közép- és utóbél határán találhatók meg, majd E6,5-kor a coecumon haladnak át, és végül az utóbél disztális részét E8. napon kolonizálják (Nagy et al., 2021).

A törzsi ganglionléc sejtek (trunk neural crest) vándorlásuk során 3 különböző útvonalat követnek: dorsolateralisan az ektoderma és a szomiták közt, ventrolateralisan a szomiták mentén és azok között, valamint ventromedialisan a velőcső és a hátsó sclerotom között (Vega-Lopez et al., 2017). Migráló sejtjei hozzájárulnak a perifériás idegrendszer gliasejtjeinek, beleértve a Schwann sejteket, az endokrin rendszer szekréciós sejtjeinek és a bőr pigmentsejtjeinek fejlődéséhez. (De Bellard et al., 2003; Nagy & Goldstein, 2017; Zuhdi et al., 2015).

A sacralis ganglionléc (sacral neural crest) sejtjei egérben a 24. szomitától, csirke embrióban a 28. szomitától caudálisan találhatók meg (Bondurand et al., 2018). Csirke embriókon végzett kísérletek bebizonyították, hogy a sacralis ganglionlécből származó sejtek az utóbelet kolonizálva hozzájárulnak a bélidegrendszer neuron és glia populációjának kialakításához. A vagus régióból származó ganglionléc sejtekkel ellentétben a sacralis sejtek anterior irányú, fordított migrációt mutatnak az utóbél disztális régiójából indulva. (Burns et al., 2000).



2. ábra Az enterális ganglionléc eredetű sejtek (ENCC-k) migrációs mintázata és differenciációja egér embrióban. (A) A gerincvelői őssejtek (NCC-k; pirossal jelölve) a neurális csőből kilépve a szomitákon keresztül vándorolnak, ahol a lokálisan képződő retinsav (RA) hatására elkezdik expresszálni a Ret gént, mielőtt belépnek az előbél mesenchymájába. (B) A metszeteken p75+ sejteket piros festékekkel jelöltek E10,5-ös egér embrió nyaki (C) és sacralis (D) régiójában, amint azok a neurális csőből kilépve a bélbe vándorolnak. (fehér nyilak a vándorlási útvonalat jelzik) A sematikus rajz (E) a nyaki és sacralis eredetű (nyilakkal jelezve) sejtek az enterális idegrendszer kialakításában betöltött szerepét jelzik. A piros pontok a vándorló ganglionléc eredetű sejteket mutatják, a gyomor, coecum és kloáka árnyékolt területe pedig az ET3 és GDNF magas lokális koncentrációját jelölik. E10.5 stádiumban (F) a ganglionléc eredetű sejtek már jelen vannak az előbélben, egy nappal később pedig eléri a középbél distális részét. (G) E12.5-re a vastagbél proximális része is kolonizálódik (H), a migráció pedig E14.5-re teljesen befejeződik (Nagy & Goldstein, 2017).

2.3. A ganglionléc sejtek vándorlásának molekuláris háttere

A vagus régióból származó ganglionléc sejtek vándorlásának megindulása kritikus lépést jelent a bélidegrendszer fejlődésében. Számos gerinces modellállattal végzett kísérlet alapján megállapították a ganglionléc fejlődésében szerepet játszó, komplex rendszert alkotó NC-gén-szabályozó hálózatot (neural crest gene regulatory network – GRN) (Bronner & LeDouarin, 2012). Korai induktív jelzésként a génkifejeződésben a környező szövetekből, például a mezodermből vagy a szomszédos neurális és nem neurális ectodermből származó morfogének (FGF-ek, Wnt-k, BMP-k és ezek inhibitorai) valamint a Notch rendszer közvetített jelzései vesznek részt. A transzkripciós faktorok kölcsönös egymásra hatásával és redundáns viselkedésükkel létrehozzák az úgynevezett ganglionléc specifikációs modult, amely hármas funkcióval bír: a NC sejtek fenotípusának meghatározása mellett a sejtek delaminációját és epithelo-mesenchymalis transzformációját (EMT) is támogatja. (Betancur et al., 2010a; Kudlik et al., 2015; Sauka-Spengler & Bronner-Fraser, 2008).

Ahhoz, hogy a migráció megkezdődjön, a premigrációs sejteknek el kell távolodniuk a neuroepitheliumtól, tehát a transzkripciós faktoroknak nemcsak a proliferatív állapotot kell fenntartaniuk, hanem az EMT-t létrehozó effektor gének aktiválását, vagy adott esetben represszálását is szabályozni kell. Az EMT során a sejtek motilitást nyernek a sejt szintű kapcsolatok bontásával és citoskeleton átrendeződés révén. Az egyik leggyakoribb módja ennek a kadherineinek regulációja az expressziójukban bekövetkező szabályozás által, amely során a II-es típusú (N-cadherin) molekulák mennyisége nő, míg az I-es típusúaké (E-cadherin) és egyéb epitheliális sejt típusokra jellemző tényezőké csökken. (Betancur et al., 2010b).

A ganglionléc sejtek elköteleződése az enterális fejlődési irány felé a szomiták közötti környezetben történik, ahol a paraxiális mezodermben lokálisan termelődő retinsav (RA) hatással van a vándorló NCC-kre, amelyek olyan retinsav receptorokkal rendelkeznek, mint a $RAR\alpha$, $RAR\beta$, $RAR\gamma$. A kölcsönhatás által az NCC-kben aktiválódik a receptor tirozin kináz (RET) expressziója, amely elengedhetetlen az ENS fejlődéséhez (Nagy & Goldstein, 2017). A retinsav termeléséhez szükséges retinaldehid-dehidrogenáz (RALDH2) hiányos egerekkel végzett kísérletekben igazolták, hogy az ENS nem képes kifejlődni, mivel a RET expresszió csökkent ezáltal a vagális NCC-kben. (Niederreither et al., 2003).

Az előbelet kolonizáló enterális ganglionléc eredetű sejtek a bélcső teljes hosszában felelősek az enterális ganglionok kialakításáért. A még differenciálatlan neurális őssejtek a béltraktusba való belépés előtt erős SOX10 és PHOX2B transzkripciós faktor expressziót mutatnak, továbbá megfigyelhető az endothelin receptor B (EDNRB), P75 és RET erősebb kifejeződése is (Goldstein et al., 2013). Simpson és munkatársai megállapították, hogy a bélcsövet kolonizáló sejtek legelő haladó populációja (wavefront cells) rendkívüli proliferációs és migrációs képességgel rendelkezik és jellemző a SOX10, PHOX2B, EDNRB, P75, valamint a transzkripciót szabályozó MASH1 gének expressziója. A migrációs front mögötti ENCC-k neuron és glia irányú differenciációt mutatnak, kialakítva a plexus myentericus és plexus submucosus ganglionjait. Neuron irányú elköteleződés esetén megfigyelhető a SOX10 és P75 expresszió csökkenése és a pán-neurális markerek, mint például a PGP9.5, neurofilamentumok, III-as típusú β -tubulin (TUJ1) és HuC/D emelkedett expressziója (Goldstein & Nagy, 2008; Mueller & Goldstein, 2022b; Simpson et al., 2007).

2.4. A Hirschsprung-kór embrionális alapjai

A Hirschsprung-kór (HSCR), más néven megacolon congenitum egyike a legjobban karakterizált veleszületett neurointesztinális betegségeknek, ahol hiányoznak a bélfalban lévő intrinzik ganglionsejtek a myentericus (Auerbach) és a submucosus (Meissner) plexusokban. Megközelítőleg 5000 élve született csecsemő közül 1-et érint a betegség, valamint a fiiúgyermekes esetében négyszer akkora gyakoriságról számoltak be (Butler Tjaden & Trainor, 2013; Rathi et al., 2024). A Hirschsprung-kór (HSCR) két fő típusát különböztetjük meg: rövid szegmensű (S-HSCR), ahol az enterális ganglionok hiánya végbélre és a szigmabélre korlátozódik, és a hosszú szegmensű (L-HSCR), amikor hosszabb bélszakaszok is ganglionmentesek lehetnek (Soret et al., 2020). Az intrinzik ganglionok hiánya ellenére az extrinzik idegrostok továbbra is képesek behatolni a bélalba, ahol az izmok stimulálásával a béltraktus összehúzódását okozzák, mivel a kontrakciót létrehozó neurotranszmitterek túlsúlyba kerülnek a relaxációt biztosítókhöz képest, ezáltal funkcionális elzáródást okozva a ganglionmentes szakaszon. (Sullivan, 1996). Potenciális diagnosztikus jel, ha az újszülött nem ürít meconiumot a születéstől számítva 48 órán belül (Rathi et al., 2024).

A betegség kezelése elsősorban műtéti beavatkozást igényel, amely során az ganglionmentes részt sebészetileg eltávolítják, majd a normál működéssel rendelkező bélszakasz és az anális sphincter feletti traktus anasztomózisát hozzák létre. A legelső életmentő műtétet 1948-ban végezték (Soret et al., 2020). A műtét szükségszerű az érintett esetekben, viszont a gyermekek több mint 50%-a szenved tartós posztoperációs komplikációktól, mint az enterocolitis, súlyos székrekedés vagy székletinkontinencia (Hotta et al., 2016).

Hirschprung-kór kialakulásában jelentős szerepet játszanak a genetikai tényezők, ezen belül is a RET fehérje, amely ez transzmembrán tirozik kináz receptor. Működésbeli hibája a HSCR esetek 50%-ában és a sporadikus esetek 20%-ában kimutatható. (Mahato & Sidorova, 2020). A RET aktiválódásával a GDNF (glia eredetű neurotróf faktor), mint növekedési faktor kötődik a GFR α 1 koreceptrohoz. Az így létrejövő GDNF-GFR α 1-RET jelátviteli út aktiválódása elengedhetetlen az ENCC-k túlélse, proliferációja és migrációja szempontjából (Soret et al., 2020).

A genetikai tényezők további hozzájárulását bizonyítja, hogy testvérek között viszonylag magasabb az előfordulási arány az átlaghoz képest, valamint sok esetben más kromoszóma rendellenességekkel is együtt jár a kórkép, mint például a Down-szindróma vagy a Waardenburg-szindróma (Sullivan, 1996). A Down-szindrómások esetén 100-szoros kockázatot figyeltek meg a normál kariotípussal rendelkező esetekhez képest (Soret et al., 2020).

A normál bélidegrendszer fejlődéséhez elengedhetetlenül szükséges: a glia-eredetű neurotróf faktor GDNF) és receptorai, neurotrofin-3 és TrkC receptor, BMP (bone morphogenic protein) és receptorai, a netrin és a deleted in colorectal cancer (DCC), sonic hedgehog (Shh), indian hedgehog (Ihh), endothelin-3 (ET3), valamint az endothelin-receptor-B (EDNRB) (Nagy & Goldstein, 2006). Ezen faktorok bármelyikének működésbeli zavara a bélidegrendszer fejlődési rendellenességéhez vezet.

A glia eredetű neurotróf faktor (GDNF) a fejlődő bél mesenchymában expresszálódik és igen jelentős kemotaktikus jelként funkcionál az ENCC-k számára. *In vitro* migrációs kísérletek bizonyították ezen hatását, ahol a tenyésztő médiumba oldott GDNF intenzív ENCC kivándorlást indukált az explantált bélszakaszból (Goldstein & Nagy, 2008; Nagy & Goldstein, 2006).

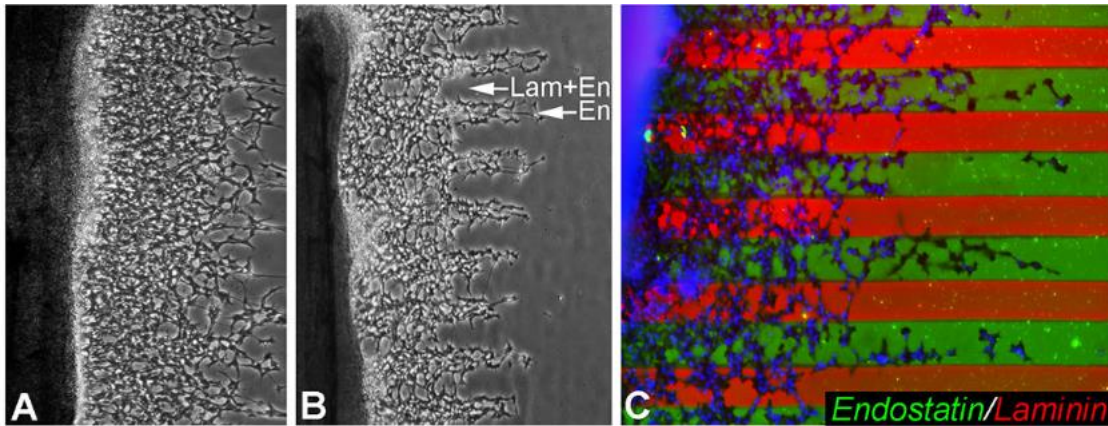
Az enterális idegrendszer fejlődésében kritikus szerepet játszik továbbá az endothelin receptor B (EDNRB) jelátviteli útvonala. Az EDNRB egy ENCC-k által

expresszált G-fehérje kapcsolt receptor, liganduma pedig a bélmesenchymában termelődő endothelin-3 (ET3). Az ET3-EDNRB jelátviteli útvonal aktiválódásával az ENCC-k proliferálnak, a neurális differenciációjuk gátolt, így fenntartva az őssejtek proliferatív progenitor állapotát. A jelátviteli út meghibásodása korai neuronális differenciációhoz, a progenitor sejtpopuláció kimerüléséhez, következésképpen a bél aganglionózisához vezet (Mueller & Goldstein, 2022b).

A mesenchymalis faktorok mellett hám-eredetű növekedési faktorok szerepe is bizonyított a bél organogenezise és a bélidegrendszer fejlődése során, A bélhámsejtek által szekretált Sonic Hedgehog (SHH) fehérje mesenchymalis BMP4 expressziót indukál. Számos kísérlet bizonyította, hogy a BMP4 és az FGF molekulák kölcsönhatása szabályozza a coecum kezdemény fejlődését, ugyanakkor a BMP4 a GDNF-fel kölcsönhatásban közvetlenül is kulcsfontosságú szerepet játszik az utóbél bélidegrendszerének kialakításában. Csirke embriókon végzett kísérletek igazolták, hogy a BMP4 önmagában gangliogenezist indukál, ezáltal serkenti az ENCC-k differenciációját. A coecum telepében magasan expresszáldó GDNF késlelteti a BMP4 hatását, így biztosítja a progenitor populáció fennmaradását az utóbél idegrendszerének létrehozása érdekében. (Kovács et al., 2023).

2.5. Extracelluláris mátrixmolekulák és szerepük

A dúlcélsejtek bélmesenchymába történő vándorlásuk során kölcsönhatásba kerülnek a fogadó bél mesenchymalis mikrokörnyezetével. Az extracelluláris mátrixot (ECM) alkotó molekulák, mint a laminin, fibronectin, vitronectin, kollagén XVIII és tenascin-C, valamint egyéb sejtadhéziós molekulák, mint az N-cadherin és a β 1-integrin együttesen járulnak hozzá az enterális idegi őssejtek megfelelő vándorlásához. Léteznek a migrációt gátló ECM molekulák is, mint az agrin, kollagén VI, és a kondroitin-szulfát proteoglikánok családja, beleértve a versican és a kollagén IX-et (Mueller & Goldstein, 2022b). A perifériás neuronok és a támogató sejtek vándorlását tehát a stimuláló és gátló molekulák egymásra hatásának finom egyensúlya, valamint az az ECM komponensei által, a vándorló sejtekben kiváltott válasz dinamikus egyensúlya irányítja, miközben a sejtek differenciálódásuk során fenotípusos változásokon mennek keresztül (Perris, 1997).



3. ábra Az agrin gátolja az enterális idegi őssejtek (ENCDC-k) vándorlását E7 csirke utóbélben, ECM molekulákkal bevont felszínen 24 órán át tenyésztve. **(A)** A sejtek fibronektin és endostatint egyaránt tartalmazó felületen hasonlóan jól vándoroltak, mint a csak endostatinnal bevont felszínen. **(B)** Az ENCDC-k nagyobb távolságot tesznek meg a csak endostatint tartalmazó csíkokon, mint azokon, amelyek endostatint és laminint is tartalmaznak. **(C)** A lamininre és endostatinnal specifikus antitestekkel jelölt immunhisztokémiai festés karakterizálja és megerősíti a molekulák relatív helyzetét és jelenlétét a csíkok mentén (Nagy et al., 2018).

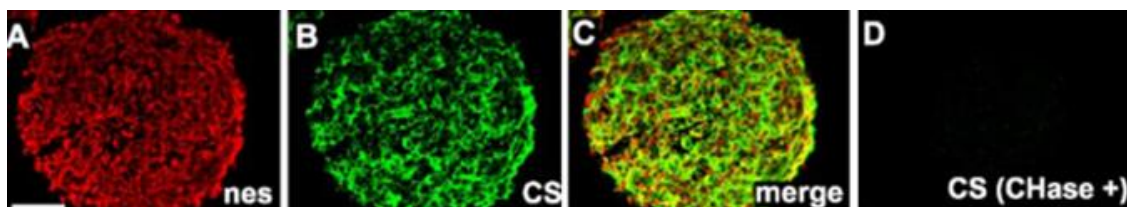
A kondroitin-szulfát molekulák (CS), mint szulfatált glükózaminoglikánok (GAG) egy központi fehérje lánchoz való kovalens kötésükkel alkotják a kondroitin-szulfát proteoglikánokat (CSPG). Ezen makromolekulás komplexek nagy mennyiségben megtalálhatók a sejt felszíneken és az extra-/pericelluláris mátrixokban. A CSPG-k esetében legalább egy kondroitin-szulfát oldallánc kovalensen kapcsolódik egy fehérjéből álló alaplánchoz, létrehozva az úgynevezett proteoglikán molekulaszervezetet. Szintézisük során a kondroitin-szulfát molekulák (CS) az alaplánc alkotó fehérjék szerin (Ser) aminosav csoportjához kötődnek glikozid kötéssel, vízkilépés közben egy közös összekötő régió (GlcA-Gal-Gal-Xyl) révén. A GAG láncokhoz további diszacharid egységek, mint például glükuronsav (GlcA) és N-acetil-galaktozamin (GalNAc) kapcsolódhatnak (Mencio et al., 2021).

Az így kialakult komplex struktúra nemcsak olyan fiziológiai folyamatokban játszik szerepet, mint a morfogenezis, vagy a neuronális plaszticitás kialakítása, hanem számos kóros folyamatban is, mint például a vázrendszeri rendellenességek, vagy a gerincvelői sérülések során kialakuló *in vivo* gliális hegek létrehozása. Egyre több kísérletes bizonyíték utal arra, hogy a CSPG-k funkciójukat nagyrészt a kondroitin-szulfát alegységek által fejtik ki, míg az alapfehérjék csupán inert strukturális vázként szolgálnak. A kondroitin-szulfát proteoglikánok nagymértékű variációját figyelhető meg *in vivo* az alapfehérje lánc hosszúságából és a kondroitin-szulfát oldalláncok által kölcsönzött szulfatáltság mértékéből adódóan. Ez alapján kilenc molekulát különítünk

el a CSPG molekula családban: aggregán (CSPG1), versican (CSPG2), neurocan (CSPG3), melanóma-asszociált kondroitin-szulfát proteoglikán (CSPG4), CSPG5, SMC3 (CSPG6), brevican (CSPG7), CD44 (CSPG8) (Mikami & Kitagawa, 2013)

Perris és munkatársai extracelluláris mátrixot alkotó proteoglikánok térbeli és időbeli eloszlását vizsgáló kísérleteikben kimutatták, hogy a molekulák dinamikus eloszlási mintázatot mutatnak embriogenezis során. Megfigyelték, hogy a migrációt folytató ganglionléc sejtek útvonala egy kondroitin-szulfát proteoglikánoktól mentes mesenchymális régiót képvisel és felvetették annak a lehetőségét, hogy a kondroitin-szulfát proteoglikánok felhalmozódása összefüggésben állhat a ganglionléc sejtek migrációjának gátlásával. (Perris et al., 1991). Kerr és Newgreen *in vitro* ganglionléc sejt migrációt vizsgáló kísérleteikben fibronektinnel bevont felszínhez 10-30 µl/ml koncentrációban E3.5 napos fűj embriók törzsi területéről izolált kondroitin-szulfát proteoglikánt adtak, amely gátolta a dúclécsejtek *in vitro* migrációját. Ez a hatás visszafordítható kondroitináz ABC-vel való enzimatis kezeléssel. Hasonló eredményeket értek el aggregánnal való kísérleteik során, azonban annak több mint 30x magasabb koncentrációra volt szükség hasonló mértékű hatás kiváltásához (Kerr & Newgreen, 1997).

Ismert, hogy a molekulák maguk is képesek a mikrokörnyezetük megváltoztatására, közvetlen ECM molekula szintézis által. Ida és munkatársai kísérleteikben EGF és FGF-2 tartalmú tápoldatban telencephalon eredetű neurosphereket hoztak létre, amelyek kondroitin-szulfát immunreaktivitást mutattak. (4. ábra) Kondroitináz ABC-vel végzett enzimatis emésztéssel bizonyították, hogy az idegi őssejtek endogén kondroitin-szulfát szintézisével és extracelluláris mátrixba való juttatásával részt vesznek saját környezetük kialakításában (Ida et al., 2006).



4. ábra Kondroitin-szulfát proteoglikánok lokalizációja neuroszférákban. (A) Antinestin antitesttel (nes) (B) CS56 antitesttel kezelt neuroszféra metszetei. (C) A két metszet egyesített képe. (D) Neuroszféra metszet immunfestése anti-CS antitesttel (CS-56), proteázmentes kondroitináz ABC-vel való kezelés után. Méretarány, 50 µm (Ida et al., 2006, módosítva)

A legújabb kutatások szerint a kondroitin-szulfát proteoglikánok fontos szerepet játszanak a központi idegrendszer (CNS) fejlődésében, a szinaptikus plaszticitás megőrzésében, valamint a hegszövetekben való axon regenerációban is (Sirko et al., 2007).

A krónikus gerincvelői sérülések kezelése során nemcsak a sejtpusztulás és a cisztaképződés jelent kihívást a terápia során, hanem a képződő, kondroitin-szulfát tartalmú hegszövet jelenléte is. Nori és munkatársai kísérleteikben oligodendroglia irányba átprogramozott humán idegi őssejteket (oNCP) vizsgáltak egy folyamatos kondroitináz ABC enzim leadására képes, speciális metilcellulóz alapú biofilm környezetében. A kezelés növelte az oNCP-k túlélését a lézió területén, valamint elősegítette az oligodendrocita irányú differenciációt. Továbbá elősegítette az axonok remyelinizációját és fokozta a szinaptikus kapcsolatok kialakulását. Következésképpen ez a kombinált terápia ígéretes stratégia lehet a jövőben a krónikusan sérült gerincvelő regenerációjára (Nori et al., 2018).

A kondroitin szulfát proteoglikánok felhalmozódását bioszintézisük gátlásával is megakadályozhatjuk, melynek egyik módja a β -D-xylosid kezelés. A β -D-xylosid iniciátorként szolgál a kondroitin-szulfát szintézis második glikoziltranszferáz lépésében, ezáltal szabad glükozaminoglikán-láncok szintézisét segíti elő, amelyek a tengelyfehérje nélkül jelennek meg az extracelluláris mátrixban. Faassen és munkatársai embrionális csirke chondrocytákat inkubáltak $^{35}\text{SO}_4^-$ és 1,0 mM-os p-nitrophenyl- β -D-xylosid jelenlétében, valamint hiányában. Gélszűrést követően mérték a CSPG-ok és a szabad poliszacharid láncok relatív mennyiségét. A xylosid-indukált poliszacharidok képződése mellett a kondroitin-szulfát proteoglikánok mennyiségének csökkenését figyelték meg (Schwartz, 1977). A xylosiddal való CSPG szintézis gátlását bizonyítja Gato és munkatársainak kísérlete, amelyben a β -D-xylosiddal való kezelés jelentős kondroitin-szulfát proteoglikán csökkenést eredményezett csirke szemlencse primordiumban (Gato et al., 2001).

A kondroitin-szulfát proteoglikánok hegszövetben való felhalmozódása több, már vizsgált szövetben kimutatható, azonban a béltraktust érintő, kiemelten a bélszövet sérülésével járó, invazív/minimál invazív beavatkozások következményeként létrejövő *in vivo*, CSPG molekulákat tartalmazó hegszövet képződéséről még nincsenek rendelkezésre álló publikációk. Laboratóriumunk munkatársainak korábbi megfigyelései alapján immunhisztokémiai eljárásokkal (CS56 jelölés) kimutatható a kondroitin-szulfát proteoglikánok jelenléte a bélszövet sérülése

esetén, azonban a CSPG-k enterális ganglionléc eredetű sejtek migrációjára kifejtett hatása ismeretlen.

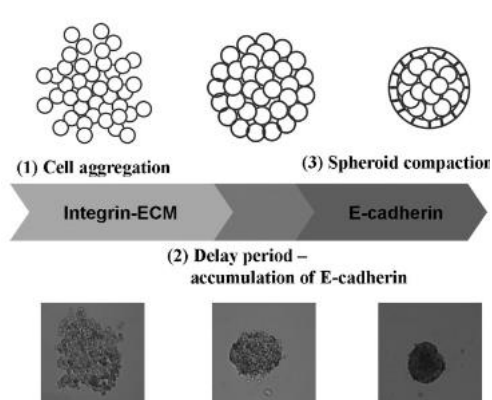
Jelenlegi ismereteink az extracelluláris mátrixról nem teljeseek, azonban korábbi kutatásokban megfigyelték, hogy az ECM molekulák rendellenes kifejeződése Hirschsprung-fenotípushoz vezetett egérmódellekben. A bél ECM molekulái az enterális ősidegsejteket azok felszíni receptoraik keresztül szabályozzák, ezáltal a molekulák pontos térbeli és időbeli szabályozása elengedhetetlen az enterális idegrendszer normális fejlődéséhez. Endothelin-3 null (EDN+) egerekkel végzett kísérletekben megnövekedett laminin-, IV-es típusú kollagén-, perlekan- és egyéb proteoglikán-típusok kifejeződését figyelték meg a bél ganglionmentes szakaszain. Ez az eredmény alátámasztja azt a tényt, hogy az ECM összetételének megváltozása hozzájárulhat a ganglionmentes bélszakasz kialakulásához. További kutatások során fokozott laminin-kifejeződést figyeltek meg humán HSCR minták ganglionmentes szegmenseiben, amely összhangban áll az egérmódellek eredményeivel. Egy másik tanulmány megerősítette, hogy az ECM molekulák egy dinamikus és összetett vázlat alkotnak, így specifikus jeleket és fizikai környezetet biztosítanak az enterális idegi őssejtek vándorlásához, ezáltal szabályozva az enterális idegrendszer megfelelő fejlődését (B. D. Parikh et al., 1994; D. H. Parikh et al., 1992; Paykttf et al., 1988).

2.6. Őssejt-eredetű spheroidok

Bár a 3D sejtenyésztési technikák intenzív fejlesztése csak néhány éve kezdődött meg, a sejtaggregátumok vizsgálata körülbelül 100 éves múltba tekint vissza. 1907-ben Wilson és munkatársai írták le az első kísérletet, amelyben disszociált szivacssejtek újbóli önszerveződésre voltak képesek. Weiss és Taylor 1960-ban csirkeembrióból származó több szervvel is kísérletezett. Nagyobb áttörést 1971-ben történt, amikor kínai hörcsög V79 tüdősejtjeinek szuszpenziós tenyésztésével, majdnem tökéletes gömb alakú többsejtű spheroidokat sikerült létrehozniuk a kutatóknak, majd 1981-ben Martin és munkatársai először számoltak be egér embrionális őssejtek sikeres izolálásáról és létrehozásáról. 1998-ban Thomson és munkatársai sikeresen izoláltak és tenyésztettek blasztocisztából származó humán embrionális őssejteket. A Yamanaka csoport elsőként hozott létre 2006-ban indukált pluripotens őssejteket egér és ember fibroblasztok reprogramozásával, majd 2009-ben Sato és munkatársai 3D bélorganoidokat tenyésztett felnőtt egér enterális őssejtjeiből

(W. Kim et al., 2023).

Számos őssejtípus képes aggregálódni és ezáltal 3D sejt kultúrákká, spheroidokká differenciálódni, amennyiben a megfelelő faktorokat tartalmazó tenyésztő médiumban és letapadást gátló környezetben tenyésztik. A hagyományos egysejtréteges (monolayer) kultúrákkal szemben a háromdimenziós spheroidok szerkezeti és funkcionális tulajdonságaikban jobban hasonlítanak a valós szövetekre, valamint számos primer vagy progenitor sejt jelentősen javult életképességet és funkcionalitást mutat, amennyiben spheroidként tenyésztik őket, így több szempontból is ideális építőelemei lehetnek a szövetrekonstrukciónak (Lin & Chang, 2008). A spheroidok terápiás hatékonyságát bizonyítja, hogy ischemias vesébe injektált mesenchymalis őssejt (MSC) eredetű spheroidok növekedett túlélési rátát és parakrin szignalizációt mutattak a disszociált sejtekkel összevetve, mivel nagyobb hatékonysággal tapadtak meg a fogadó szövetben. Továbbá MSC spheroidokat a közelmúltban sebgyógyulási folyamatok kezelésére is felhasználtak fokozott celluláris funkcióikból eredően, számos angiogenetikus faktor (FGF2, angiogenin, angiopoietin, VEGF) és gyulladáscsökkentő faktor fokozott termelése által (S. Jeong Kim et al., 2020).



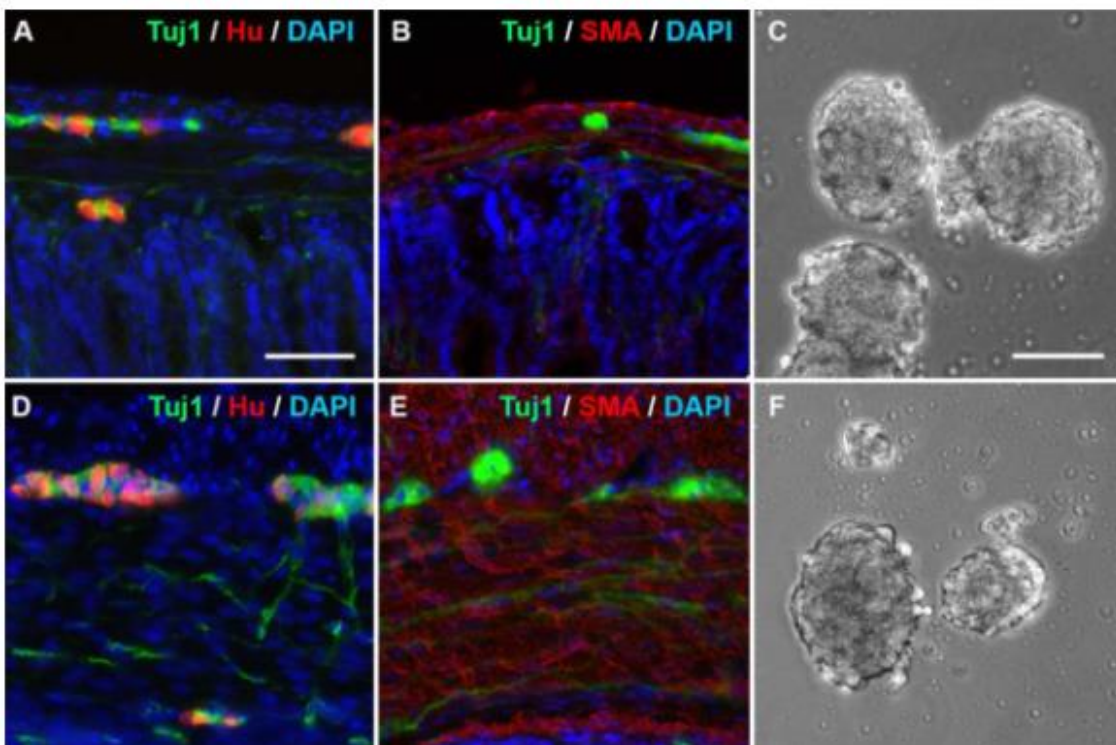
5. ábra. A spheroid képződés folyamatának három lépéses modellje. (1) Laza sejtaggregátumok képződése integrin-ECM kötődéssel. (2) Kadherineik kifejeződése és felhalmozódása. (3) Kompakt spheroidok kialakulása homofil kadherin-kadherin kölcsönhatások révén (Lin & Chang, 2008).

Spheroid típusú idegi őssejt aggregátumok a posztnatális bélben jelen lévő enterális idegi őssejtekből is létrehozhatók egér, sertés és humán izolált bélszövetből, mind a vékony-, mind a vastagbél régiójából. A nyálkahártya bélről való leválasztásával, az így létrehozott LMMP (longitudinal muscle myenteric plexus) preparátumot kollagenáz és diszpázzal emésztve izolálhatók az enterális ganglionok sejtjei, amelyek növekedési faktorról (FGF, IGF1, retinsav, B27 és N2) ellátott tápoldatban neurosphere formájában tenyészthetők. Az így kialakult idegi őssejt

aggregátumok neuronokká és gliasejtekké képesek differenciálódni bélbe való transzplantációjukat követően (Mueller & Goldstein, 2022b).

A neurospherek neurogén potenciálját tovább javította a tenyésztő médiumhoz adott glia eredetű neurotróf faktor (GDNF), mialatt az endotelin-3-nak (ET3) nem volt szignifikáns hatása. (Cheng et al., 2016).

A sejtek fogadó szövetbe való juttatása céljából Cheng és munkatársai kifejlesztettek egy minimálinvazív, endoszkópos mikroinjekciós módszert, amellyel ENSC-eket képesek Hirschprung-kóros egerek ganglionmentes vastagbélbe ültetni. Injektálás után a transzplantált sejtek cirkulárisan migráltak a submucosalis plexusba, valamint az akár 1 mm-es távolságba terjedő longitudinális vándorlásukat is megfigyelhető volt (Cheng et al., 2015).



6. ábra. Neurospherek előállítása egér vékony- (A, B, C) és vastagbélből (D,E,F) A Tuj1+ és Hu+ neuronokat tartalmazó enterális ganglionok mind a vékonybélben (SI, A), mind a vastagbélben (LI, D) megfigyelhetők. A myenterikus plexus Tuj1+ neuronjait a környező SMA+ muscularis propriával együtt izolálták a vékonybélből (B) valamint a vastagbélből (E), majd neurosphereket hoztak létre belőlük. (C, F; **rendre**). Megfigyelték, hogy a két forrásból származó neurospherek mérete hasonló volt (G), a vékonybélből származó neurospherek szignifikánsan több P75+ neurális lécből származó sejtet tartalmaztak (H) A vékony- és vastagbélből származó neurospherek neuronmigrációs távolsága hasonló volt (I). Az A jelzésű ábrán látható méretség 100 μm , és mind az A-B és D-E ábrákra is érvényes. A C jelzésű ábrán látható méretség 100 μm -t jelöl, amely az F ábrára is érvényes. (Cheng et al., 2016)

Potenciális terápiaként szolgálhat tehát az idegi őssejtek ganglionmentes bélbe történő transzplantációja Hirschsprung-kór esetén, amely által csökkenthető az invazív sebészeti beavatkozások mértéke. Azonban a sejtek fogadó szövetben való csökkent proliferációs és migrációs képessége miatt kiemelten fontos a fogadó szövet mikrokörnyezetének jellemzése, beleértve az extracelluláris mátrix molekulák összetételének módosítását célzó kutatásokat, az őssejtek terápiás potenciáljának optimalizása érdekében (Mueller & Goldstein, 2022a).

III. Célkitűzések

A Hirschsprung-kór terápiája az orvostudomány mai állása szerint csak sebészeti úton valósítható meg, azonban a legújabb, őssejteket, valamint miniatűr sejtaggregátumokat érintő kutatások biztató eredményeket mutatnak a kevésbé invazív őssejtterápia kifejlesztésére.

Jelenleg már rendkívül precíz transzplantációs eljárási protokollok érhetők el, azonban a sejteket fogadó mikrokörnyezet molekuláris összetételéről hiányos ismeretekkel rendelkezünk. Szakdolgozatomban a neurosphereket fogadó béltraktust, azon belül kiemelten az extracelluláris kondroitin-szulfát proteoglikánok eloszlásának megismerését és kísérletes módosítását tűztem ki célul a transzplantált enterális idegi őssejtek migrációs hatékonyságának növelése érdekében. Kísérletes munkám részletes célkitűzései a következők voltak:

1. A kondroitin-szulfát proteoglikánok expressziójának részletes karakterizálása embrionális bélszövetben.
2. Kondroitin-szulfát proteoglikánok vizsgálata *in vitro* enterális ganglionléc migrációs kísérletekben.
3. Transzplantált enterális neurospherek migrációs hatékonyságának vizsgálata kontroll és kondroitináz ABC kezelt *in vitro* utóbél tenyészetekben.

IV. Anyagok és módszerek

4.1. Kísérleti állatok

Modellszervezetként kísérleteim során csirke (*Gallus gallus domesticus*, White Leghorn SPF, Ceva-Phylaxia Oltóanyagtermelő Zrt., Magyarország) és fűj (*Coturnix japonica domestica*) embriókat használtam. A tojások inkubálása 37°C-on, 90%-os páratartalom mellett, a laboratóriumi keltetőgépben (Heka-18 Brutgerate TS-7000C) történt. A kísérleti állatok tartása és feldolgozása a Semmelweis Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottságának engedélyével, az állatvédelmi törvények szerinti megfelelő körülmények között zajlott.

4.2. Minták szövettani feldolgozása

A kísérlethez szükséges béltraktusokat sztereomikroszkóp (Nikon SMZ800) alatt, mikropreparációs eszközökkel (mikrocsipesz, perforált Moria típusú kanál, iridectómiás olló) távolítottam el, majd 37°C-os foszfáttal pufferelt sóoldatba (NaCl, KCl, Na₂HPO₄·H₂O, KH₂PO₄ - PBS) helyeztem. Az izolált szerveket, valamint az *in vitro* tenyésztett neurosphereket egy órán át 4%-os paraformaldehiddel fixáltam (PFA-pH 7,4, Sigma) szobahőmérsékleten, majd 3x5 perc PBS oldattal való mosást követően 15%-os szacharóz 0,1 M-os foszfát pufferes oldatába (Reanal puriss, 07140-0-08-38) helyeztem a szerveket és egy éjszakán keresztül 4°C-on inkubáltam. A fixált bélszakaszokat másnap PBS-ben oldott 7.5%-os zselatin (Sigma, G2500) és 15% szacharóz oldat keverékével infiltráltam, 37°C-on 2 órát. A fixálást a neurosphereket esetén 30 percig végeztük, a zselatinban való inkubálás fél órát tartott. Eközben műanyag tálkák aljára egy réteg 37°C-os zselatint öntöttem, majd szobahőmérsékleten dermedni hagytam. Az inkubációs idő letelte után a szerveket a megszilárdult zselatin rétegre helyeztem, megfelelő módon orientáltam, majd tíz perc után lefedtem egy második zselatin réteggel. A második réteg megszilárdulását követően a zselatinba ágyazott mintákat kocka formára vágtam olló segítségével. A kész zselatinkockákat a megfelelő felirattal ellátott kartonpapírra helyeztem és folyékony nitrogénnel hűtött -50°C-os izopentánba (2-metilbután, Sigma, M326631) helyeztem körülbelül 60 másodpercre. Az így elkészült fagyasztott blokkokat metszésig -80°C-on tároltam. Kriotóm (Shandon 0620M 9307837) segítségével -26°C-on 12 mikrométer vastag metszeteket készítettem, amelyeket poly-Lysine-nel (Sigma, P8920) bevont tárgylemezre vettem fel, majd -20°C-on tároltam felhasználásig.

4.3. Immunhisztokémia

Az elkészített metszeteket 15 percig rehidráltam 37°C-os PBS-sel megtöltött üvegküvetében, majd az előírt hígítási arányban elkészített (PBS-BSA-ban oldott) primer ellenanyagból (I. táblázat) 30 µl-t mértem a metszetekre, amelyeket egy órát inkubáltam nedves kamrában, szobahőmérsékleten. Az inkubációs idő leteltével 3x5 perces PBS mosással távolítottam el a be nem kötött primer ellenanyagot. A metszetekre a primer ellenanyagoknak megfelelő izotípusú és állatfajú fluorokrómmal jelölt szekunder ellenanyagot (II. táblázat) mértem 1:200-as PBS-ben való hígítással. A szekunder ellenanyagok inkubálása 45 percig zajlott, nedveskamrában, amelyet 3x5 perces PBS mosás követett. A sejtmagok jelölésére DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole dihidrochloride, Invitrogen, D1306) reagenst mértem a metszetekre. (PBS-ben hígítva 1µg/ml arányban), amelyet 15 percig inkubáltam, ezt követően újabb 3x5 perces PBS mosás következett. Kettős immunfluoreszcens jelölés esetében az előbbi lépéseket megismételtem egy újabb primer és szekunder ellenanyag párral. Az immunjelölt metszeteket vízdéköny fedőanyaggal (Aqua-Poly/Mount, Polysciences, 18606-20) fedtem le és 4°C-on tároltam

1. táblázat. Felhasznált primer ellenanyagok listája

Ellenanyag (klón) neve	Felismert struktúra	Hígítási arány	Ellenanyag izotípusa	Beszerzés (katalógusszám)
TUJ-1	Neuron specifikus β -III-tubulin	1:200	Egér IgG _{2a}	Santa Cruz Biotechnology AA10
SMA(1A4)	simaizom sejtek (α -simaizom-aktin)	1:200	Egér IgG _{2a}	Dako M0851
CS56	extracelluláris kondroitin-szulfát proteoglikán molekulák	1:1000	Egér IgM	Sigma C8035
HNK-1	ganglionléc-eredetű sejtek (3-szulfoglükuronozil epitóp)	1:500	Egér IgM	Neo-Markers
QCPN	Fürj sejtmag (ismeretlen perinukleáris epitóp)	felülúszó	Egér IgG1	DSHB AB_531886

2. táblázat. Felhasznált szekunder ellenanyagok listája

Ellenanyag neve, faj- és izotípus specifitása	Gerjesztési hullámhossz	Beszerzés (katalógusszám)
Kecskében termeltetett anti-egér IgG2a	594	Thermo Fisher Scientific A21135
Kecskében termeltetett anti-egér IgG (H+L)	594	Thermo Fisher Scientific A11005
Kecskében termeltetett anti-egér IgM	488	Thermo Fischer Scientific A21042
Kecskében termeltetett anti-egér IgM	594	Thermo Fisher Scientific A21044

4.4. *In vitro* sejtmigrációs assay

Steril körülmények között, E6 napos csirke embriók béltraktusát izoláltam a gyomor alatti területtől a vastagbél distalis részéig Pen/Strep-PBS oldat tartalmú Petri csészében. Az eltávolított középbél szakaszokat sejtenyészetre alkalmas Petri-csészék felszínére helyeztem. A tenyésztő edényeket előzetesen DMEM tenyésztő médiumban (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma-Aldrich, D8437) oldott 20 µg/ml fibronectin tartalmú vagy 20 µg/ml CSPG (Sigma-Aldrich, CC117) tartalmú oldattal inkubáltam 1 órán keresztül, 37°C-on. Ezt követően a felszínre ki nem kötődött fehérjék eltávolítását háromszoros Pen/Strep-PBS mosással végeztem. A két különböző extracelluláris mátrix felszínen vizsgáltam a glia eredetű neurotróf faktor (GDNF) által indukált sejtmigrációt. A bélszakaszokat 10 ng/ml GDNF tartalmú Pen/Strep-DMEM-ben, 37°C-on 5% CO₂ koncentráció mellett tenyésztettem. 24 óra tenyésztést követően a mintákat 4%-os PFA oldattal fixáltam, majd 3x5 perc PBS mosást követően 1:500 arányban PBS-BSA-ban hígított HNK-1 primer antitesttel inkubáltam. Szekunder antitestként kecskében termelt anti-egér IgM-et (594 nm, Thermo Fisher Scientific A21044) használtam. A mintákat epifluoreszcens mikroszkóp alatt (Nikon E800) vizsgáltam.

4.5. *In vitro* függesztett szervtenyészet

Steril körülmények között, Pen/Strep-PBS oldat tartalmú Petri csészében E5 napos csirke embriók közép- és utóbelét izoláltam, majd a szerveket két, függesztett sejttenyészetre alkalmas szilikon aljú Petri-csészébe rovartűk segítségével kitűztem. A kondroitin-szulfát proteoglikánok enzimátikus emésztésére kondroitináz ABC kezelést alkalmaztam (chABC from *Proteus Vulgaris*, Sigma-Aldrich, C2905). A kezelt tenyészet DMEM + Pen/Strep + 0,1U/ml koncentrációjú chABC oldatát tartalmazta, míg a kontroll sorozatra DMEM + Pen/Strep tartalmú tenyésztő médiumot pipettáztam. A függesztett béltenyészeteket 37°C-on, 5% CO₂ koncentráció mellett 3 napig tenyésztettem, a tenyésztő médiumot 24 óránként friss médiumra cseréltem. A tenyésztést követően a szerveket fixáltam, beágyaztam és metszettem, majd neuron, izom és CSPG specifikus ellenanyagokkal jelöltem.

4.6. Metszetek értékelése, képfeldolgozás

Az immunfluoreszcensen jelölt képeket Nikon Eclipse E800-as epifluoreszcens mikroszkóphoz csatlakoztatott Olympus DP74-es kamerát és a CellSens szoftvert használtam. A konfokális mikroszkópos felvételeket Zeiss LSM780 mikroszkóppal készítettem. A képek feldolgozásához és szerkesztéséhez az Adobe Photoshop 7.1.0. programot vettem igénybe.

4.7. Neurosphere generálás

Madár embrióból való neurosphere képzésre optimalizált publikált protokoll jelenleg még nem elérhető, így a laboratóriumunkban kifejlesztett eljárást használtam.

Sejttenyésztő edény és reagensek előkezelése

Steril fülke (NapFlow) alatt 2 ml, hideg Anti-Adherence Rising Solution (StemCell, 07010) oldatot pipettáztam 6 lyukú plate minden well-jébe, majd parafilmmel lefedtem, majd 1 órára rázógépre (SU-10i, Biosan) helyeztem és 70-80 rpm sebességgel kevertetem. A vízfürdőt (Stuart Scientific Water Bath SWBD) 37°C-ra állítottam, amelyben a NeuroCult Basal Mediumot (NBM), Proliferation Médiumot (PM) és Pen/Strep-PBS oldatokat melegítettem.

Idegi sejtaggregátumok létrehozása

7 napos fűrj (*Coturnix japonica domestica*) embriók béltraktusát (gyomortól vastagbél distalis részéig, 9 db) megfelelő mikromanipulációs eszközök segítségével eltávolítottam és apróbb darabokra vágtam. A béldarabokat 15 ml Falcon csőbe (Eppendorf, kat. szám:0030122151) 2 ml kollagenáz-diszpáz tartalmú emésztő enzim keverékbe (Dissociation Enzyme Mix, DE) helyeztem és 45 percig 37.5°C-on inkubáltam. Az inkubációs idő alatt az enzim keveréket 15 percenként vortexeltem. Az enzimatikus emésztési idő alatt a 6-lyukú sejttenyésztő edény mosását végeztem el. Pipettával, a habzás elkerülése érdekében lassan felszívtam az Anti-Adherence Rinsing Solution oldatot és 3 x 3ml PBS-es mosást végeztem el, elkerülve a felület kiszáradását. A tenyésztő plate-be NeuroCult Basal Medium oldatot pipettáztam, majd felhasználásig 37.5°C inkubátorba helyeztem.

Az enzimatikus emésztés lejártával (45 perc), a sejtszuspenziót 40 µm-es Cell Strainer Filter-en keresztül szűrtem egy 50 ml-es steril Falcon csőbe, majd a szűrőfiltert alaposan átmostam meleg NeuroCult Basal Medium oldattal, és a Falcon csövet 20 ml-ig töltöttem az enzimatikus emésztés hígítással való megállítása érdekében. Az átszűrt sejtszuspenziót 1600 rpm-en (500g) 8 percig centrifugáltam (JOUAN CR3i). A felülúszót leöntöttem és a pelletet 1 ml Proliferation Medium oldattal reszuspendáltam. Ezután Bürker-kamra segítségével inverz mikroszkóp (ZEISS Axiovert 135) alatti sejtszámlálás következett. 50 µl sejtszuspenzióhoz 450 µl 0,2%-os tripánkék (Trypan-blue) oldatot adtam, majd az így elkészült oldatot pipetta segítségével a Bürker kamrába juttattam. 25 négyzetben számoltam meg a tripánkék által nem jelölt élő sejteket (75 sejt), majd 1 ml-ben lévő sejtszám meghatározásához ezt az értéket 10^5 -nel szoroztam meg ($7,5 \times 10^6$ sejt/ml). Ezután frissen készítettem el a neurosphere képződést támogató növekedési faktorok hozzáadásával a Proliferation Medium oldatot. A faktorokra vonatkozó információkat a 3.táblázat tartalmazza, 3 ml Proliferatin Medium oldatra vonatkoztatva. A sejteket 600.000 sejt/ml koncentrációban osztottam szét a tenyésztő plate megfelelő lyukaiban, majd a sejteket 5% CO₂ koncentráció mellett 37°C-on tenyésztettem (ESCO CelCulture CO₂ Incubator), majd négy nap elteltével a képződött neurosphereket mikroszkóp alatt (Nikon SMZ25) fotóztam. Egy részüket fixáltam és immunhisztokémiai feldolgozásnak vettem alá, míg a többi neurosphere-t transzplantációra használtam fel.

3. táblázat. 3ml Proliferation Medium oldat növekedési faktor összetevői

Reagens	Törzsoldat	Térfogat	Végkoncentráció
EGF (StemCell, cat.no. 78006.1)	10 µg/ml	12 µl	40 ng/ml
bFGF (StemCell, cat.no. 78003.1)	10 µg/ml	6 µl	20 ng/ml
Heprain (StemCell, cat.no. 07980)	0,2% (2 mg/ml)	6,66 µl	0,0004% (4,44 µg/ml)
GDNF	10 µg/ml	3 µl	10 ng/ml

Felhasznált reagensek:

- **Anti-Adherence Rinsing Solution** - cat: 07010 - StemCell Technologies
- **NeuroCult Basal Medium - (NBM, cat.no: 05700 – StemCell Technologies)**
+ **5 ml Pen/ Strep** (cat.no: PO781 – SIGMA)
- **NeuroCult Proliferation Supplement** – cat.no:05701 – StemCell Technologies
- **Proliferation Medium (PM):** 7 ml NBM + 2 ml NeuroCult Proliferation Supplement
- **Dissociation Enzyme Mix (DE):** 2 ml dispase II (5U/mL stock, cat.no: 07913 – StemCell Technologies) + 2.5 mg of collagenase IX. (800U/mg cat.no: C9722-50MG - Sigma) + 4 ml NBM
- **Accutase** – cat.no:07920 – StemCell Technologies
- **UTV-PBS 500ml + Pen/Strep** (cat.no: P0781 – SIGMA)

0,2% tripánkék (Trypan blue) oldat Bürker-kamrás sejtszámláláshoz:

- A komponens: 0,2g Trypan blue + 100 ml ddH₂O
- B komponens: 4,25 g NaCl + 100 ml ddH₂O
- A komponensek 4:1 (A:B) arányban összekevertem, majd 0,2 µm-es átmérőjű filteren szűrtem.

4.8. Neurosphere transzplantáció

E14 csirke embriók utóbelét mikropreparációra alkalmas eszközök segítségével, steril Pen/Strep-PBS oldatban izoláltam, majd hosszanti irányban felnyitottam. Ezt követően apróbb téglalapokra vágtam a bélszakaszokat, amelyeket szilikonnal bevont steril Petri-csésze felszínére mikrotűk segítségével kitűztem. Az E7 fűj eredetű négy napos neurosphereket a tenyésztőedényből kivéve a függesztett bélszakaszok mellé helyeztem, majd mikrosebészeti eszközök segítségével vágásokat ejtettem a bélfal külső felszínén, és az így létrejött bemetszésekbe egyenként helyeztem bele a fűj eredetű neurosphereket. A kontroll tenyészetekhez Pen/Strep+DMEM (Sigma-Aldrich, D8437) tápoldatot használtam, a kondroitin-szulfát proteoglikánok bontásához 0,5 U/ml kondroitináz ABC (chABC from *Proteus Vulgaris*, Sigma-Aldrich C2905) tartalmú Pen/Strep + DMEM tenyésztő médiumot használtam. A függesztett tenyészeteket 3 napig 37°C-on, 5% CO₂ koncentráció mellett tenyésztettem, a médiumot 24 óránként cseréltem. A tenyésztési idő leteltével a rekombináns bélszakaszokat 40%-os PFA-val fixáltam, fagyasztva metszettem és fajspecifikus ellenanyagokat alkalmazva immunhisztokémiai módszerekkel vizsgáltam.

V. Eredmények és megvitatásuk

5.1. Kondroitin-szulfát proteoglikánok eloszlása az utóbél embrionális fejlődése során

Az utóbél idegrendszerének kialakulása csirke embrióban a fejlődés 5-8. napjai között zajlik, amikor az enterális ganglionléc eredetű sejtek intenzív migrációt folytatnak a bélcső mesenchymájában. A migrációt számos tényező befolyásolja, ezek között ismert számos mesenchymális eredetű növekedési faktor, mint a GDNF és az endothelin-3 irányító hatása (Nagy & Goldstein, 2006) az epitheliális eredetű Sonic hedgehog növekedési faktor, amely a versican és kollagén IX. molekulák expresszióját indukálja a hám alatti mesenchymális régióban, kijelölve ezáltal a bélcső ENCC mentes területét (Nagy et al., 2016). Ismert továbbá, hogy a vándorló ENCC-k endogén extracelluláris mátrix szintézis által maguk is befolyásolják saját mikrokozonyukat (Nagy et al., 2018). Ezek ismeretében, kíváncsiak voltunk számos sejt migrációja szempontjából gátló faktorként leírt kondroitin-szulfát proteoglikán molekulák eloszlására a fejlődő utóbél mesenchymájában.

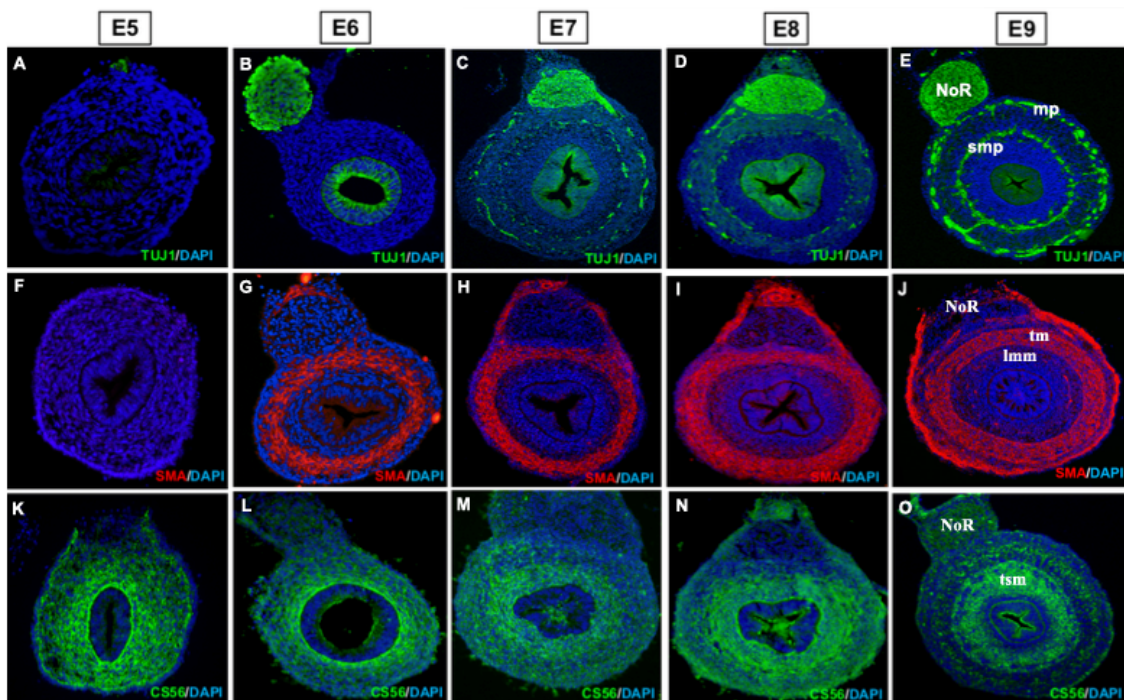
Dolgozatom első célkitűzése egy kontroll sorozat létrehozása volt E5-E9 csirkeembrió utóbélből származó metszetek immunjelölésével a kondroitin-szulfát proteoglikánok eloszlásának jellemzésére az ENCC migráció időszakában. Az immunjelölésre egy pán-CSPG markert használtam, amely a molekulacsaládba tartozó fehérjéket általánosan felismeri (8.ábra). A sorozat alkalmas a kondroitin-szulfát proteoglikánok, az ENCC eredetű differenciálódó idegsejtek, valamint a simaizom sejtek összehasonlító eloszlásának jellemzésére az embriogenezis során (7.ábra).

A neuron specifikus β -III tubulint expresszáló (TUJ1+), neuron irányba elkötelezett sejtek E7 stádiumban rajzolják ki először a koncentrikusan megjelenő plexus submucosus és plexus myentericus ganglionjait (7A-C ábra), a fejlődő belső körkörös izomréteg két oldalán (7F-H ábra). A vándorló idegi őssejtek az utóbél disztális részét E8. napon kolonizálják (Nagy et al., 2021), egy nappal később, a két idegfonat között elkezdnek kialakulni az idegsejtek nyúlványai által létrehozott összeköttetések (7D, E ábra). Megfigyelhető továbbá az utóbél dorzális részén kialakuló Remak-ganglion (NoR), amely egy madár specifikus struktúra és az utóbél külső beidegzéséhez járul hozzá (7A-E ábra).

A simaizomsejtek differenciálódása megelőzi az ENCC-k utóbél kolonizációját, A legelső izomsejtsoecifikus kontraktilis fehérje az α -simaizom aktin

(SMA) először E6 stádiumban jelenik meg a differenciálódó belső körkörös izomrétegben (7F, G) és a bélcső vastagodása során markáns réteget képez az utóbél külső rétegében (7H, I). E9 stádiumra megfigyelhető a külső hosszanti izomréteg megjelenése, valamint a lamina muscularis mucosae néhány izomsejtjének kialakulása (7J ábra).

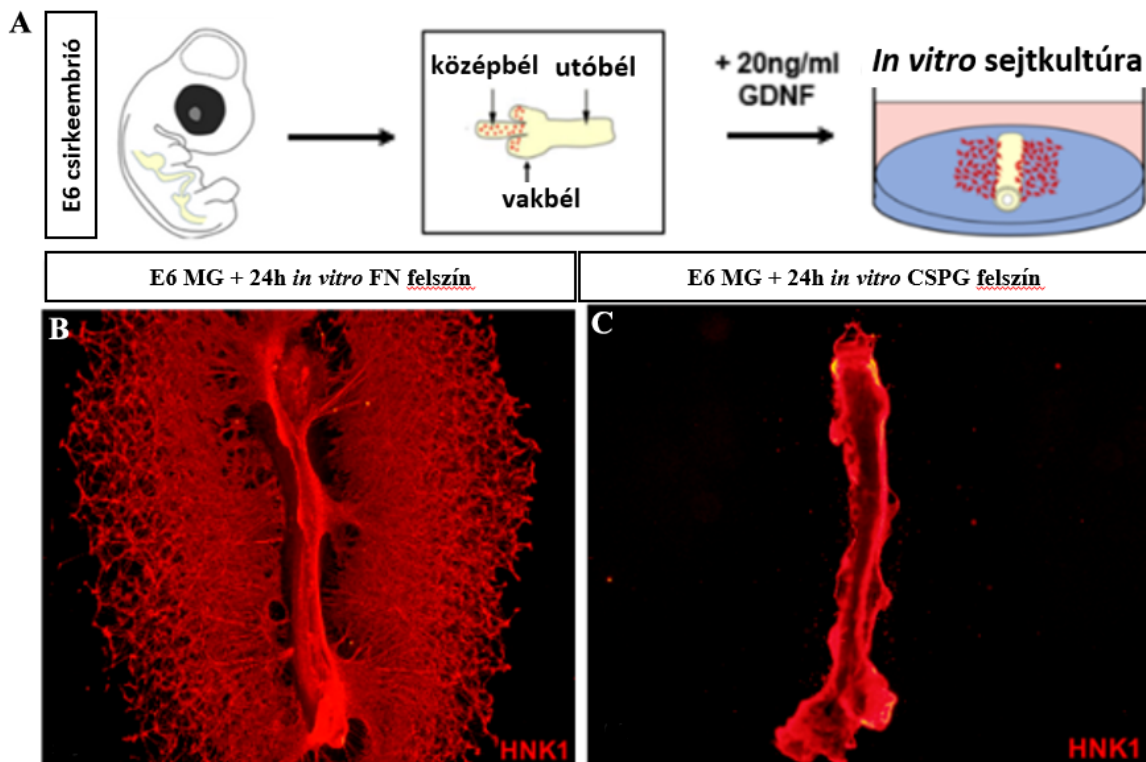
A kondroitin-szulfát proteoglikánok erőteljes expressziója jellemző az utóbél ENCC általi kolonizációjának teljes periódusára. E5-E8 stádiumban az utóbél mesenchymája diffúz CSPG expressziót mutat, fokozatosan erősödő kifejeződéssel a hám alatti mesenchymális régióban (7K-N). Az ENCC migráció befejeztével, E9 stádiumban megfigyelhető a kondroitin-szulfát proteoglikánok dinamikus átrendeződése, a CSPG expresszió a hám alatti mesenchymális régióban halmozódik fel, a leendő submucosális régió területén, kirajzolva a plexus submucosus ganglionjait (7O ábra), míg a muscularis régióban lecsökken.



7. ábra. E5-E10 napos csirke embrio utóbél traktusának részletes immunhisztokémiai karakterizálása. (A-E) TUJ1 immunjelölt metszeteken látható a bélidegrendszer kialakulása, a plexus submucosus, plexus myentericus és a Remak-ganglion megjelenése. **(F-J)** E5-E9 stádiumban zajlik az utóbél simaizomzatának differenciációja, SMA jelölt metszetek mutatják be a szekvenciálisan megjelenő belső körkörös, külső hosszanti izomrétegek kialakulását. **(K-L)** A kondroitin-szulfát proteoglikánok diffúz expressziója jellemző az utóbél mesenchymájára, amely E9 stádiumban a hám alatti mesenchymára koncentrálódik, korábbi stádiumokban csökkenő gradienst mutat a perifériás rétegek felé haladva. Jelölések: **NoR**:Remak ganglion, **mp**:plexus myentericus, **smp**:plexus submucosus, **tm**:tunica muscularis, **lmm**:lamina muscularis mucosae, **tsm**:tunica submucosa

5.2. A kondroitin-szulfát proteoglikánok gátolják az enterális ganglionléc sejtek migrációját *in vitro*

A glia eredetű neurotróf faktor (GDNF) ENCC-k vándorlására gyakorolt inductív hatását számos *in vitro* migrációs kísérlettel igazolták, ahol az enterális idegi őssejtek bélből való intenzív kivándorlása volt megfigyelhető. (Goldstein & Nagy, 2008; Nagy & Goldstein, 2006). Kísérletemben (8A. ábra) E6 napos csirke embrióból származó középbél eredetű ENCC-k GDNF indukálta *in vitro* migrációját vizsgáltam fibronectin és kondroitin-szulfát proteoglikánnal bevont Petri-csésze felszínén. A HNK-1 immunjelölés alkalmas a bélből kivándorló enterális ganglionléc eredetű sejtek vizualizációjára. GDNF jelenlétében a fibronectin támogatta az ENCC-k migrációját, a sejtek képesek voltak a bélfalból való kilépésre és intenzív vándorlásra (8B. ábra). A kondroitin-szulfát proteoglikánnal (CSPG) bevont felszínen az enterális idegi őssejtek migrációja elmarad, a sejtek képtelenek voltak a felszín kolonizációjára (8C. ábra). Megfigyeléseink alapján a kondroitin-szulfát proteoglikánok gátló hatást gyakorolnak az enterális idegi őssejtek migrációjára *in vitro* körülmények között.



8. ábra Kondroitin-szulfát proteoglikánok enterális idegi őssejtek vándorlására kifejtett hatása (A) E6 csirke embrió izolált középbél szakaszából vizsgáltuk a GDNF indukálta ENCC migrációt *in vitro* fibronectin és CSPG felszínén. (B) Fibronectin felszínén az ENCC-k intenzív sejt vándorlása volt megfigyelhető. (C) A CSPG felszín gátolta a HNK1+ ENCC-k migrációját.

Hasonló hatásról számoltak be a neuroblasztok, axon nyúlványok és glia progenitorok migrációja esetében is, ahol a kondroitin-szulfát proteoglikán felszínén limitált migrációs képesség volt megfigyelhető, amely kondroitináz ABC enzimatis kezeléssel visszafordítható volt (Galindo et al., 2018; Yuan et al., 2016).

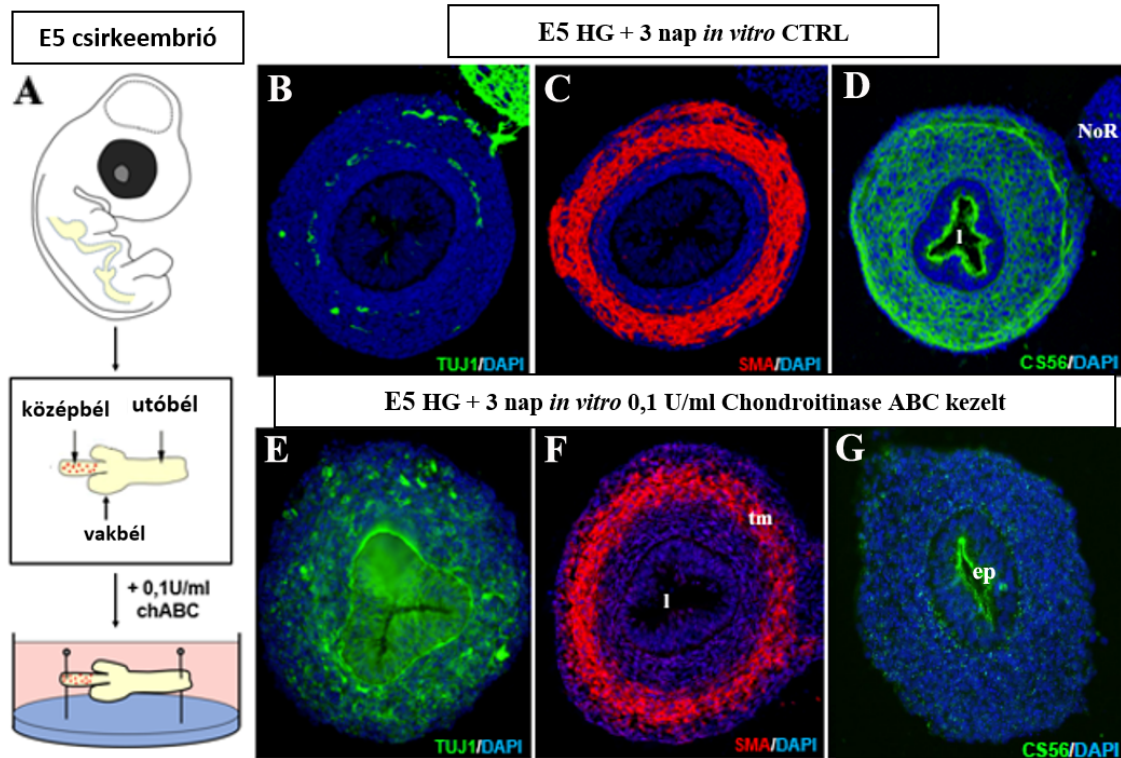
5.3. *In vitro* kondroitináz kezelés megzavarja az enterális ganglionléc sejtek migrációs mintázatát

A kondroitináz ABC (ChABC) kondroitin-szulfát proteoglikán lebontó hatását, valamint sejt migrációra gyakorolt pozitív hatását több kísérletben vizsgálták már. Kerr és Newgreen kísérleteikben bizonyították, hogy a kondroitin-szulfát tartalmú tápoldathoz hozzáadott ChABC enzim feloldja a dúlcsejteket a migrációs gátlás alól, következésképpen szabadon tudnak vándorolni fürj végtagbimbóval végzett kísérletekben (Kerr & Newgreen, 1997). Hasonló eredményekről számoltak be a neuroblasztok és glia progenitorok migrációja esetében is, ahol a gerincvelői sérüléseket modellezve mutatták ki, hogy a ChABC által létrehozott CSPG mentes környezet elősegítette a sejtek migrációját és az axonok növekedését (Galindo et al., 2018; Khalil et al., 2022; Sirko et al., 2007; Yuan et al., 2016).

Kísérleteimben egy *in vitro*, kondroitináz ABC kezelt függesztett szervtenyészet létrehozását és immunhisztokémiai jelölését végeztem el az ENCC-k vándorlási mintázatának megfigyelése érdekében neuron, simaizom és CSPG specifikus ellenanyagok használatával (9. ábra). A simaizom vizsgálata azért volt elengedhetetlen, hogy a már korábban létrehozott kontroll sorozattal (7F-J), valamint a tenyésztés során létrehozott kontroll tenyészetekkel (9B-D. ábra) összevetve kizárjam a kondroitináz ABC esetleges simaizom fejlődésre gyakorolt károsító hatását. A kísérlet során E5 napos csirke embriók közép- és vastagbelét izoláltam, majd a szervekből párhuzamosan kontroll és ChABC kezelt, függesztett szervtenyészetet hoztam létre. A kontroll tenyésztetre DMEM+Pen/Strep oldatát pipettáztam, a kezelt minta pedig DMEM+Pen/Strep+kondroitináz ABC 0,1 U/ml koncentrációjú oldatát tartalmazta. 3 napos *in vitro* tenyésztés után immunhisztokémiai jelöléssel a 9.E-F ábrákon megfigyelhető eredményeket kaptam.

A kontroll tenyésztettel szemben, ahol a kialakuló TUJ1+ idegsejtek koncentrikus körben helyezkednek el a bél mesenchymájában (9B ábra), kondroitináz ABC kezelés hatására megfigyelhető a TUJ1+ neuronok rendezetlen eloszlása, a bél radiális szimmetriájának eltűnése (9E ábra). Ezzel párhuzamosan megfigyelhető a

ChABC kezelés hatására a kondroitin-szulfát proteoglikán molekulák teljes hiánya az *in vitro* tenyésztett utóbél szintjén (9G. ábra). Feltételezzük, hogy a kondroitin-szulfát proteoglikánok, összhangban számos más mesenchymális faktorról fontos szerepet játszanak a vándorló ENCC-k migrációs útvonalának kijelölésében, megfelelő mennyiségben és eloszlásban támogatják az utóbélre jellemző idegi mintázat kialakulását.



9. ábra. Kondroitin-szulfát proteoglikánok hiánya befolyásolja az enterális dúcléc sejtek migrációját. (A) 5 napos csirke embrió közép- és utóbél szakaszából létrehozott *in vitro* függesztett szervtenyészet sémás ábrája. (B, C) A kontroll tenyészetekben a differenciálódó TUJ1+ neuronok az izomréteg két oldalán koncentrikus körökben jelennek meg. (D) A kondroitin-szulfát proteoglikánok diffúz eloszlást mutatnak az utóbél mesenchymájában. (E) 0,1 U/ml kondroitináz ABC kezelés hatására a TUJ1+ neuronok rendezetlen mintázatot mutatnak az utóbél szintjén. (F) Az enzimátikus kezelés nem befolyásolja a simaizomzat kialakulását. (G) 0,1 U/ml kondroitináz ABC jelenlétében a CSPG-k teljes lebomlása volt megfigyelhető a bél mesenchymájában. Jelölések: **NoR**: Remak-ideg, **I**: lumen, **tm**: tunica muscularis, **ep**: epithelium

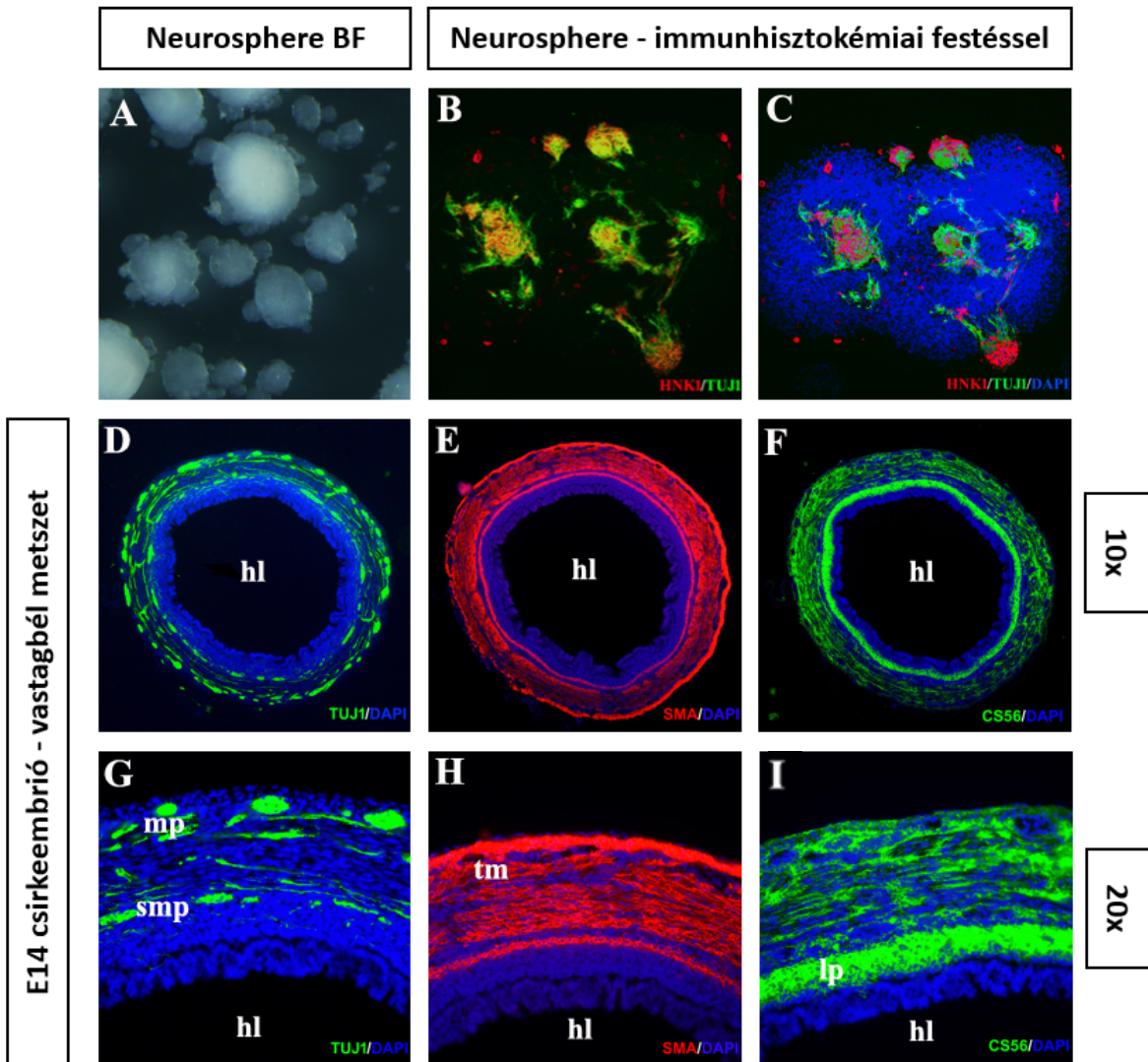
5.4 Transzplantált enterális neurospheres migrációs hatékonyságának jellemzése

Az elmúlt években kiemelt szerep jutott a spheroidok terápiás célra való felhasználásának, amelynek hatékonyságát mutatja, hogy a spheroid formában transzplantált sejtek Kim és munkatársainak kísérletes megfigyelései alapján nagyobb túlélési rátát mutattak, valamint nagyobb százalékban tapadtak meg a fogadó szövetben, a disszociált sejtekkel összevetve (S. jeong Kim et al., 2020). Az enterális idegi őssejtek jelenléte a posztnatális bélben is kimutatható és akár újszülöttekből vagy felnőttekből is izolálható, így mintegy saját őssejtekből létrehozott neurosphereként, a megfelelő faktorokkal elvégzett tenyésztést követően megvalósítható bélbe való transzplantációjuk, ahol neuronokká és gliasejteké képesek differenciálódni (Mueller & Goldstein, 2022b). A csirke-fürj kimerák alkalmazása igen elterjedt a fejlődésbiológiai-kutatásokban, mivel egy egyszerű módot biztosít a transzplantált sejtek és leszármazottaik követésére (Le Douarin & Teillet, 1973; Nagy & Goldstein, 2006).

Kísérletemben embrionális bélből izolált enterális idegi őssejtekből hoztam létre neurosphereket és vizsgáltam a transzplantált sejtek migrációs képességét a differenciált bélszövetben. E7 fürj embriók béltraktusát távolítottam el a gyomortól disztálisan, spheroidok képzésére a középbelt használtam, mivel bizonyított, hogy egér vékonybélből származó neurospheres szignifikánsan több TUJ-1 expresszáló neuront tartalmaznak, mint a vastagbélből származó neurospheres (Cheng et al., 2016). A sejteket a 4.7. alfejezet protokoll-lépései alapján kezeltem, majd négy napig tenyésztettem GDNF tartalmú médiumban. A kialakult neurosphereket E14 csirke utóbélbe transzplantáltam, majd három napos tenyésztést követően vizsgáltam a neurosphereből származó sejtek migrációját kontroll és 0,5 U/ml kondroitináz ABC-t tartalmazó tenyészetekben. A transzplantált spheroidokól, valamint a fogadó E14 csirke béltraktusról immunhisztokémiai jelölést követően epifluoreszcens mikroszkópos felvételeket készítettem, amelyek a 10. ábrán láthatók.

A neurospherekről készült mikroszkópos felvételeken megfigyelhető, hogy felületükön több apró, bimbózó képletet tartalmaznak, amelyek mind az enterális ganglionléc eredetű sejteket jelölő HNK-1, mind az idegsejtekre specifikus TUJ-1 immunhisztokémiai jelöléssel markáns jelet adnak, bizonyítva neurális eredetüket (10A, B, C ábra). Laboratóriumunk korábbi, valamint kísérletemben is megfigyelt

eredményeink alapján elmondható, hogy a csirke embrionális közepből eredetű spheroidok felületén kialakuló sarjak tartalmazzák a transzplantáció szempontjából fontos, neurogén potenciállal rendelkező sejtpopulációt (10B, C ábra). Neurális jellegükből adódóan a jövőben kiemelt szerep juthat a transzplantáció optimalizálásában és hatékonyságának növelésében.



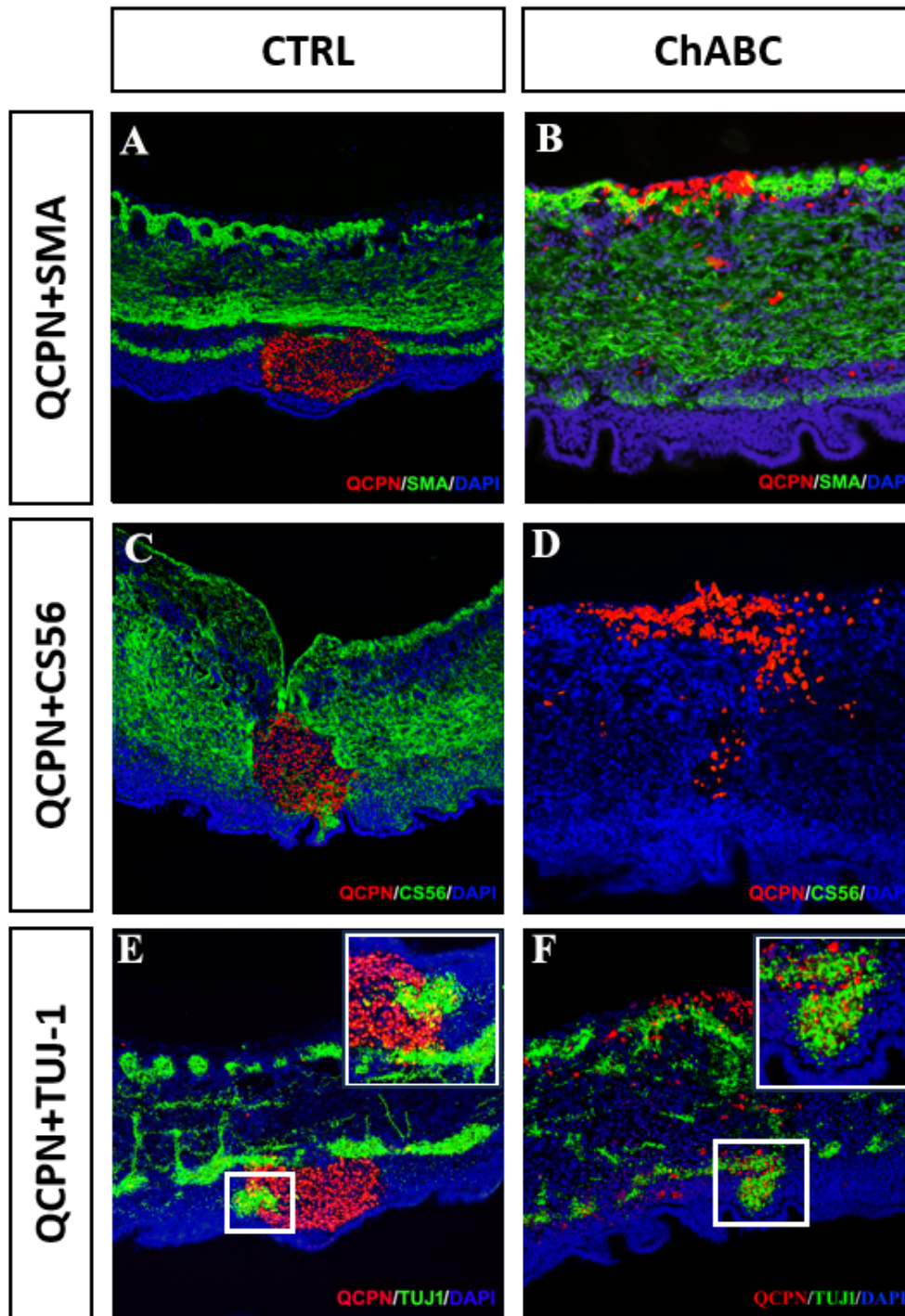
10. ábra A transzplantált ürj neurospherek valamint a beültetésre felhasznált E12 napos intakt csirke bélszakasz mikroszkópos felvételei. (A) 7E ürjből származó, GDNF növekedési faktorról 4 napig tenyésztett neurospherek sztereonmikroszkópos (B,C) és epifluoreszcens mikroszkópos felvételei. (D,G) Intakt bélszakasz metszet neurális markerrel jelölve, megfigyelhető a két koncentrikus idegi plexus. (E,D) Intakt bélszakasz metszet kifejlett tunica mucosa izomszövettel. (F, I) Intakt bélszakasz metszet CSPG jelölő markerrel, megfigyelhető a hálózatos struktúrájú kötőszövetes állomány, valamint a lamina propria intenzív jele. Jelmagyarázat: **hl**: vastagbél lumen, **mp**: myentericus plexus, **smp**: submucosus plexus, **tm**: tunica muscularis.

Miután az E7 fűrj eredetű spheroidokat négy napig tenyésztettem, E14 napos csirke vastagbél traktusát izoláltam és párhuzamosan kontroll és kondroitináz ABC kezelt függesztett szervtenyészeteket hoztam létre. A transzplatációhoz felhasznált fogadó bélszövet differenciált TUJ1+ neuronhálózattal rendelkezett (10D, G ábra), a simaizomzat kifejlett tunica mucosa és lamina muscularis mucosae rétegekre tagolódott (10E, H ábra), a kondroitin-szulfát proteoglikánok expressziója a fejlődő submucosa régiójában és az izomrétegben volt megfigyelhető (10F, I ábra).

In vitro tenyészetekben a mucosával lefelé kitűzött béldarabkák felszínén mikrosebészeti eszközök segítségével vágást ejtettem és belehelyeztem a tenyésztett neurosphereket. Három napos tenyésztés követően fajspecifikus ellenanyagokkal vizsgáltam a bélmetszeteket, amelyek eredményeit az epifluoreszcens-, valamint konfokális mikroszkóppal készített felvételek prezentálják. A kontroll és ChABC sorozat metszeteit fűrj sejteket jelölő QCPN, simaizomsejteket jelölő SMA, kondroitin-szulfát proteoglikánokat jelölő CS56, valamint neurális elemeket jelölő TUJ-1 immunmarkerekkel jelöltem.

A felvételek alapján megállapítható, hogy a kontroll tenyészetekben a transzplantált idegi őssejtek migrációja elmaradt. A CSPG jelölés alapján markánsan látható a sebzés hatására, a szövetben igen intenzíven felhalmozódó CSPG molekulák jelenléte (11C ábra). Az E ábrán megfigyelhető a QCPN/TUJ-1 kettősen pozitív neurosphere-sarj jelenléte, amelynek kinagyított képe az ábra bal alsó sarkában látható (11E. ábra). A fűrj eredetű TUJ-1+ neuronális elemek migrációja elmaradt, a sejtek nem voltak képesek a fogadó bélidegrendszeri elemekkel való neuronális kapcsolat kialakítására.

A ChABC kezelt tenyészetek jelentős eltérést mutattak. A QCPN+ neurosphere eredetű sejtek sugárirányú migrációja figyelhető meg a fogadó bélszövetben, egyes sejtek a lamina propria magasságát is megközelítették (11B ábra). Az enzimatikus kezelés hatására a kondroitin-szulfát proteoglikánok teljes hiánya volt kimutatható. Ezzel párhuzamosan a QCPN+ sejtek intenzív migrációja figyelhető meg, a sejtek a bélszövet teljes szélességében megtalálhatóak (11D ábra). Az F ábrán jól észlelhető egy TUJ-1 és QCPN kettősen pozitív sejtcsoport, amelynek kinagyított képe a bal alsó sarokban látható. Kísérletes eredményeink alapján elmondható, hogy a kondroitin-szulfát proteoglikánok enzimatikus bontásával nagymértékben növelhető a transzplantált őssejtek migrációs képessége a fogadó bélszövetben.



11. ábra E14 napos csirke vastagbélbe transzplantált E7+4 napos fűj neurosphere migrációs képességének jellemzése kontroll és ChABC kezelés hatására. (A) Kontroll tenyészetekben az izomrétegbe transzplantált QCPN+ fűj neurosphere eredetű sejtek nem képesek a fogadó bélszövet kolonizálására. (C) A fogadó bélszövet diffúz kondroitin-szulfát proteoglikán expressziót mutat, amely erőteljesebb a transzplantáció területének közvetlen zónájában (E) Beültetett neurosphere QCPN/TUJ-1 kettős immunjelölése. A fűj eredetű neuronok migrációja nem figyelhető meg a fogadó bélszövetben. (B) Kondroitináz ABC kezelés hatására az izomrétegbe transzplantált QCPN+ sejtek fokozott migrációt mutatnak, (D) a fogadó bélszövet CSPG expressziója eltűnik. (F) Számos neurosphere eredetű QCPN/TUJ-1 kettősen pozitív sejt kolonizálja a bélszövetet, annak teljes szélességében

VI. Összefoglalás

A Hirschsprung-kór gyógyítására jelenleg csak invazív sebészeti terápiák elérhetők, azonban a közelmúltban kifejlesztett neurosphere technika ígéretes lehetőséget biztosít a különböző neuropátiák regeneratív orvoslás alapelveinek megfelelő, őssejtterápiával való gyógyítására. A transzplantálásra szánt őssejtek biológiájának ismeretén kívül elengedhetetlen a fogadó szöveti mikrokörnyezet pontos molekuláris jellemzése a terápia optimalizálásának érdekében.

Az eddigi kutatási eredmények alapján a transzplantált idegi őssejtek kis hatékonysággal képesek kolonizálni a fogadó szövetet, amelynek háttérében a migrációt irányító faktorok ismeretének hiánya és a fogadó mikrokörnyezetben jelen lévő gátló faktorok feltérképezésének hiánya áll. Egy hatékony terápia kidolgozásának fontos aspektusa tehát a fogadó szöveti mikrokörnyezet ismerete és felkészítése a transzplantált sejtek/sejtaggregátumok befogadására, valamint migrációs képességük fokozására.

Szakdolgozatomban az enterális idegi őssejteket fogadó béltraktus kondroitin-szulfát proteoglikán eloszlásának karakterizálását és enzimátikus bontás általi módosítását tűztem ki célul, fűrj idegi őssejtekből tenyésztett neurospherek transzplantációs hatékonyságának növelése érdekében. A fejlődő embrionális utóbél részletes CSPG molekula expressziójának jellemzését követően *in vitro* migrációs kísérletekben és függesztett szervtenyészetekben bizonyítottam a kondroitin-szulfát proteoglikánok ENCC migrációt gátló hatását. Ezt követően E7 napos fűrj embriók közép- és vastagbél traktusából enterális idegi őssejteket izoláltam, majd tenyésztéssel neurosphereket hoztam létre, amelyeket E14 napos csirke embrió vastagbélbe ültettem, és 3 napig tartó kondroitináz ABC enzimátikus kezelésnek vettem alá. A beültetés során a szöveti sérülés hatására létrejövő hegyszövet nagymértékben gátolta a neurospherekből származó idegi őssejtek migrációját a kontroll tenyészetben. Ezzel szemben a ChABC enzimmel kezelt bélszövetben az őssejtek fokozott migrációját figyeltem meg. A sejtek migrációs képessége nagymértékben nőtt, miközben az enzim a kondroitin-szulfát proteoglikánok bontásán kívül más patológiás szöveti elváltozást nem okozott.

Kísérletes eredményeimet összefoglalva elmondható, hogy a kondroitin-szulfát proteoglikánok szöveti sérülés eredményeként létrejövő intenzív expressziójukkal, mint *in vivo* hegyszövet, jelentős gátló hatást fejtenek ki az enterális idegi őssejtek migrációs képességére, neurospherek formájában történő bélbe való transzplantációt követően.

Megfigyeléseink alapján a fogadó szövet kondroitináz ABC-vel való enzimátikus kezelése nagymértékben javítja az idegi őssejtek migrációs képességét. Következésképpen a fogadó bélszövet kondroitin-szulfát proteoglikán expressziójának modulálása potenciálisan javíthatja a Hirschsprung-kór kezelésére kidolgozás alatt álló őssejtterápia hatékonyságát.

VII. Irodalom

- Betancur, P., Bronner-Fraser, M., & Sauka-Spengler, T. (2010a). Assembling neural crest regulatory circuits into a gene regulatory network. In *Annual Review of Cell and Developmental Biology* (Vol. 26, pp. 581–603). <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.042308.113245>
- Betancur, P., Bronner-Fraser, M., & Sauka-Spengler, T. (2010b). Assembling neural crest regulatory circuits into a gene regulatory network. In *Annual Review of Cell and Developmental Biology* (Vol. 26, pp. 581–603). <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.042308.113245>
- Bondurand, N., Dufour, S., & Pingault, V. (2018). News from the endothelin-3/EDNRB signaling pathway: Role during enteric nervous system development and involvement in neural crest-associated disorders. In *Developmental Biology* (Vol. 444, pp. S156–S169). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.08.014>
- Bronner, M. E., & LeDouarin, N. M. (2012). Development and evolution of the neural crest: An overview. In *Developmental Biology* (Vol. 366, Issue 1, pp. 2–9). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.12.042>
- Burns, A. J., Champeval, D., & Le Douarin, N. M. (2000). Sacral neural crest cells colonise aganglionic hindgut in vivo but fail to compensate for lack of enteric ganglia. *Developmental Biology*, 219(1), 30–43. <https://doi.org/10.1006/dbio.1999.9592>
- Butler Tjaden, N. E., & Trainor, P. A. (2013). The developmental etiology and pathogenesis of Hirschsprung disease. In *Translational Research* (Vol. 162, Issue 1, pp. 1–15). Mosby Inc. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2013.03.001>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2016.08.035>
- 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. <https://doi.org/10.1038/pr.2017.4>
- Cheng, L. S., Hotta, R., Graham, H. K., Nagy, N., Goldstein, A. M., & Belkind-Gerson, J. (2015). Endoscopic delivery of enteric neural stem cells to treat Hirschsprung disease. *Neurogastroenterology and Motility*, 27(10), 1509–1514. <https://doi.org/10.1111/nmo.12635>
- De Bellard, M. E., Rao, Y., & Bronner-Fraser, M. (2003). Dual function of Slit2 in repulsion and enhanced migration of trunk, but not vagal, neural crest cells. *Journal of Cell Biology*, 162(2), 269–279. <https://doi.org/10.1083/jcb.200301041>
- Furness, J. B. (n.d.). *The enteric nervous system: normal functions and enteric neuropathies*.
- Furness, J. B. (2012). The enteric nervous system and neurogastroenterology. In *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* (Vol. 9, Issue 5, pp. 286–294). <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.32>
- Galindo, L. T., Mundim, M. T. V. V., Pinto, A. S., Chiarantin, G. M. D., Almeida, M. E. S., Lamers, M. L., Horwitz, A. R., Santos, M. F., & Porcionatto, M. (2018). Chondroitin Sulfate Impairs Neural Stem

- Cell Migration Through ROCK Activation. *Molecular Neurobiology*, 55(4), 3185–3195.
<https://doi.org/10.1007/s12035-017-0565-8>
- Gato, A., Martin, C., Alonso, M. I., Martinez-Alvarez, C., & Moro, J. A. (2001). Chondroitin sulphate proteoglycan is involved in lens vesicle morphogenesis in chick embryos. *Experimental Eye Research*, 73(4), 469–478. <https://doi.org/10.1006/exer.2001.1060>
- Goldstein, A. M., Hofstra, R. M. W., & Burns, A. J. (2013). Building a brain in the gut: Development of the enteric nervous system. *Clinical Genetics*, 83(4), 307–316.
<https://doi.org/10.1111/cge.12054>
- Goldstein, A. M., & Nagy, N. (2008). *Developmental Biology: Model Systems-A Series of Reviews A Bird's Eye View of Enteric Nervous System Development: Lessons From the Avian Embryo*.
- Hao, M. M., & Young, H. M. (2009). Development of enteric neuron diversity. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(7), 1193–1210. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00813.x>
- Hotta, R., Cheng, L. S., Graham, H. K., Pan, W., Nagy, N., Belkind-Gerson, J., & Goldstein, A. M. (2016). Isogenic enteric neural progenitor cells can replace missing neurons and glia in mice with Hirschsprung disease. *Neurogastroenterology and Motility*, 28(4), 498–512.
<https://doi.org/10.1111/nmo.12744>
- Ida, M., Shuo, T., Hirano, K., Tokita, Y., Nakanishi, K., Matsui, F., Aono, S., Fujita, H., Fujiwara, Y., Kaji, T., & Oohira, A. (2006). Identification and functions of chondroitin sulfate in the milieu of neural stem cells. *Journal of Biological Chemistry*, 281(9), 5982–5991.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M507130200>
- Kerr, R. S. E., & Newgreen, D. F. (1997). Isolation and Characterization of Chondroitin Sulfate Proteoglycans from Embryonic Quail That Influence Neural Crest Cell Behavior. In *DEVELOPMENTAL BIOLOGY* (Vol. 192).
- Khalil, A. S., Hellenbrand, D., Reichl, K., Umhoefer, J., Filipp, M., Choe, J., Hanna, A., & Murphy, W. L. (2022). A Localized Materials-Based Strategy to Non-Virally Deliver Chondroitinase ABC mRNA Improves Hindlimb Function in a Rat Spinal Cord Injury Model. *Advanced Healthcare Materials*, 11(19). <https://doi.org/10.1002/adhm.202200206>
- Kim, S. jeong, Kim, E. M., Yamamoto, M., Park, H., & Shin, H. (2020). Engineering Multi-Cellular Spheroids for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. In *Advanced Healthcare Materials* (Vol. 9, Issue 23). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/adhm.202000608>
- 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. In *Bioactive Materials* (Vol. 19, pp. 50–74). KeAi Communications Co.
<https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2022.03.039>
- Kirby, M. L., & Stewart, A. E. (1983). Neural Crest Origin of Cardiac Ganglion Cells in the Chick Embryo: Identification and Extirpation. In *DEVELOPMENTAL BIOLOGY* (Vol. 97).
- Kleinschmidt, S., Nolte, I., & Hewicker-Trautwein, M. (2011). Structural and Functional Components of the Feline Enteric Nervous System. *Journal of Veterinary Medicine Series C: Anatomia Histologia Embryologia*, 40(6), 450–456. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0264.2011.01091.x>
- Kovács, T., Halasy, V., Pethő, C., Szócs, E., Soós, Á., Dóra, D., de Santa Barbara, P., Faure, S., Stavelly, R., Goldstein, A. M., & Nagy, N. (2023). Essential Role of BMP4 Signaling in the Avian Ceca in

- Colorectal Enteric Nervous System Development. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(21). <https://doi.org/10.3390/ijms242115664>
- Kudlik, G., Matula, Z., Kovács, T., Urbán, S. V., & Uher, F. (2015). At the border of pluri- and multipotency: The neural crest stem cells. *Orvosi Hetilap*, 156(42), 1683–1694. <https://doi.org/10.1556/650.2015.30271>
- Le Douarin, N. M., & Dupin, E. (2018). The “beginnings” of the neural crest. In *Developmental Biology* (Vol. 444, pp. S3–S13). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.07.019>
- Le Douarin, N. M., & Teillet, M.-A. (1973). The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo. In *Embryol. e.xp. Morph* (Vol. 30).
- Lin, R. Z., & Chang, H. Y. (2008). Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. In *Biotechnology Journal* (Vol. 3, Issues 9–10, pp. 1172–1184). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/biot.200700228>
- Mahato, A. K., & Sidorova, Y. A. (2020). Ret receptor tyrosine kinase: Role in neurodegeneration, obesity, and cancer. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 19, pp. 1–21). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21197108>
- Mencio, C. P., Hussein, R. K., Yu, P., & Geller, H. M. (2021). The Role of Chondroitin Sulfate Proteoglycans in Nervous System Development. In *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* (Vol. 69, Issue 1, pp. 61–80). SAGE Publications Ltd. <https://doi.org/10.1369/0022155420959147>
- Mikami, T., & Kitagawa, H. (2013). Biosynthesis and function of chondroitin sulfate. In *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* (Vol. 1830, Issue 10, pp. 4719–4733). <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.06.006>
- Mueller, J. L., & Goldstein, A. M. (2022a). The science of Hirschsprung disease: What we know and where we are headed. *Seminars in Pediatric Surgery*, 31(2). <https://doi.org/10.1016/j.sempedsurg.2022.151157>
- Mueller, J. L., & Goldstein, A. M. (2022b). The science of Hirschsprung disease: What we know and where we are headed. *Seminars in Pediatric Surgery*, 31(2). <https://doi.org/10.1016/j.sempedsurg.2022.151157>
- 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 (Cambridge)*, 143(2), 264–275. <https://doi.org/10.1242/dev.128132>
- Nagy, N., Barad, C., Hotta, R., Bhave, S., Arciero, E., Dora, D., & Goldstein, A. M. (2018). Collagen 18 and agrin are secreted by neural crest cells to remodel their microenvironment and regulate their migration during enteric nervous system development. *Development (Cambridge)*, 145(9). <https://doi.org/10.1242/dev.160317>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.01.032>
- Nagy, N., & Goldstein, A. M. (2017). Enteric nervous system development: A crest cell’s journey from neural tube to colon. In *Seminars in Cell and Developmental Biology* (Vol. 66, pp. 94–106). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2017.01.006>

- Nagy, N., Kovacs, T., Stavely, R., Halasy, V., Soos, A., Szocs, E., Hotta, R., Graham, H., & Goldstein, A. M. (2021). Avian ceca are indispensable for hindgut enteric nervous system development. *Development (Cambridge)*, *148*(22). <https://doi.org/10.1242/dev.199825>
- Neckel, P. H. (2023). Annotated translation of Georg Meissner's first description of the submucosal plexus. In *Neurogastroenterology and Motility* (Vol. 35, Issue 3). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/nmo.14480>
- Niederreither, K., Vermot, J., Le Roux, I., Schuhbaur, B., Chambon, P., & Dollé, P. (2003). The regional pattern of retinoic acid synthesis by RALDH2 is essential for the development of posterior pharyngeal arches and the enteric nervous system. In *Development* (Vol. 130, Issue 11, pp. 2525–2534). <https://doi.org/10.1242/dev.00463>
- Nori, S., Khazaei, M., Ahuja, C. S., Yokota, K., Ahlfors, J. E., Liu, Y., Wang, J., Shibata, S., Chio, J., Hettiaratchi, M. H., Führmann, T., Shoichet, M. S., & Fehlings, M. G. (2018). Human Oligodendrogenic Neural Progenitor Cells Delivered with Chondroitinase ABC Facilitate Functional Repair of Chronic Spinal Cord Injury. *Stem Cell Reports*, *11*(6), 1433–1448. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.10.017>
- Oakley, R. A., & Tosney, K. W. (1991). Peanut Agglutinin and Chondroitin-6-sulfate Are Molecular Markers for Tissues That Act as Barriers to Axon Advance in the Avian Embryo. In *DEVELOPMENTAL BIOLOGY* (Vol. 147).
- Parikh, B. D., Tam, P., Van Velzen, D., & Edgar, D. (1994). *The Extracellular Matrix Components, Tenascin and Fibronectin, in Hirschsprung's Disease: An Immunohistochemical Study*.
- Parikh, D. H., Tam, P. K. H., Van Velzen, D., & Edgar, D. (1992). Abnormalities in the distribution of laminin and collagen type IV in Hirschsprung's disease. *Gastroenterology*, *102*(4 PART 1), 1236–1241. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(92\)70018-7](https://doi.org/10.1016/0016-5085(92)70018-7)
- Paykttf, R. F., Tennyson, V. M., Pomeranz, H. D., Pham, T. D., Rothman, T. P., & Gershon, M. D. (1988). Accumulation of Components of Basal Laminae: Association with the Failure of Neural Crest Cells to Colonize the Presumptive Aganglionic Bowel of Is,& mutant Mice. In *DEVELOPMENTAL BIOLOGY* (Vol. 125).
- Perris, R. (1997). The extracellular matrix in neural crest-cell migration. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 20, Issue 1, pp. 23–31). [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(96\)10063-1](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(96)10063-1)
- Perris, R., Krotoski, D., Lallier, T., Domingo, C., Sorrell, J. M., & Bronner-Fraser, M. (1991). *Spatial and temporal changes in the distribution of proteoglycans during avian neural crest development*.
- Rao, M., & Gershon, M. D. (2016). The bowel and beyond: The enteric nervous system in neurological disorders. In *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* (Vol. 13, Issue 9, pp. 517–528). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.107>
- Rathi, K., Verma, A., & Pingat, P. (2024). Early Detection and Intervention for Hirschsprung's Disease: A Key to Successful Outcomes. *Clinical Medicine Insights: Case Reports*, *17*. <https://doi.org/10.1177/11795476241226577>
- Rothstein, M., Bhattacharya, D., & Simoes-Costa, M. (2018). The molecular basis of neural crest axial identity. In *Developmental Biology* (Vol. 444, pp. S170–S180). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.07.026>

- Sauka-Spengler, T., & Bronner-Fraser, M. (2008). A gene regulatory network orchestrates neural crest formation. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 9, Issue 7, pp. 557–568).
<https://doi.org/10.1038/nrm2428>
- Schwartz, N. B. (1977). Regulation of chondroitin sulfate synthesis. Effect of β -xylosides on synthesis of chondroitin sulfate proteoglycan, chondroitin sulfate chains, and core protein. *Journal of Biological Chemistry*, 252(18), 6316–6321. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)39958-1](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)39958-1)
- Simpson, M. J., Zhang, D. C., Mariani, M., Landman, K. A., & Newgreen, D. F. (2007). Cell proliferation drives neural crest cell invasion of the intestine. *Developmental Biology*, 302(2), 553–568.
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.10.017>
- Sirko, S., Von Holst, A., Wizenmann, A., Götz, M., & Faissner, A. (2007). Chondroitin sulfate glycosaminoglycans control proliferation, radial glia cell differentiation and neurogenesis in neural stem/progenitor cells. *Development*, 134(15), 2727–2738.
<https://doi.org/10.1242/dev.02871>
- Soret, R., Schneider, S., Bernas, G., Christophers, B., Souchkova, O., Charrier, B., Righini-Grunder, F., Aspirot, A., Landry, M., Kembel, S. W., Faure, C., Heuckeroth, R. O., & Pilon, N. (2020). Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor Induces Enteric Neurogenesis and Improves Colon Structure and Function in Mouse Models of Hirschsprung Disease. *Gastroenterology*, 159(5), 1824–1838.e17.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.07.018>
- Sullivan, P. B. (1996). Hirschsprung's disease. In *Archives of Disease in Childhood* (Vol. 74, Issue 1, pp. 5–7). BMJ Publishing Group. <https://doi.org/10.1136/adc.74.1.5>
- Vega-Lopez, G. A., Cerrizuela, S., & Aybar, M. J. (2017). Trunk neural crest cells: Formation, migration and beyond. *International Journal of Developmental Biology*, 61(1–2), 5–15.
<https://doi.org/10.1387/ijdb.160408gv>
- Wincewicz, A., & Woltanowski, P. (2020). Leopold Auerbach's achievements in the field of vascular system. *Angiogenesis*, 23(4), 577–579. <https://doi.org/10.1007/s10456-020-09739-5>
- Wood, J. D. (2002). Neuropathophysiology of Irritable Bowel Syndrome. In *J Clin Gastroenterol* (Vol. 35).
- Yuan, X. B., Jin, Y., Haas, C., Yao, L., Hayakawa, K., Wang, Y., Wang, C., & Fischer, I. (2016). Guiding migration of transplanted glial progenitor cells in the injured spinal cord. *Scientific Reports*, 6.
<https://doi.org/10.1038/srep22576>
- Zuhdi, N., Ortega, B., Giovannone, D., Ra, H., Reyes, M., Asención, V., McNicoll, I., Ma, L., & de Bellard, M. E. (2015). Slit molecules prevent entrance of trunk neural crest cells in developing gut. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 41, 8–16.
<https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2014.12.003>

VIII. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom elsősorban témavezetőmnek, Prof. Dr. Nagy Nándornak, a Semmelweis Egyetem Anatómiai, Szövet-és Fejlődéstani Intézet, Óssejt és Kísérletes Embriológia Laboratórium vezetőjének, hogy lehetőséget adott a laboratórium munkájában való részvételre, valamint, hogy szakértelmével, segítőkész tanácsaival mindvégig támogatta szakdolgozatom elkészülését.

Szeretném megköszönni Szócs Emőke PhD hallgatónak a közös munkát, aki készséges segítségével és tanácsaival nagymértékben támogatta dolgozatom elkészültét.

Szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Szarka Andrásnak, a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Vegyész és Biomérnöki Kar dékánjának dolgozatom alapos és kritikus átnézéséért.


Továbbá köszönöm az Óssejt és Kísérletes Embriológia Laboratórium munkatársainak, kiemelten Halasy Viktóriának, Kegyes Noéminek, Orbán Lilinek és Soós Ádámnak, hogy hozzáértésükkel és barátságukkal mindvégig fáradhatatlanul támogattak szakdolgozatom elkészülte során.

IX. Függelék

Belső témavezetői nyilatkozat a dolgozat beadhatóságáról

Alulírott, Prof. Dr. Szarka András, mint belső témavezető nyilatkozom, hogy Tóth Réka Borbála, Neptun kódja: TR58UJ, „Kondroitin-szulfát proteoglikánok karakterizálása és módosítása az enterális idegi őssejtek transzplantációs hatékonyságának növelése érdekében kísérletes Hirschsprung-kór modellben” című dolgozata a hallgató rendszeres konzultációval segített önállóan készített írásműve és megfelel a BME Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar Szakdolgozat és diplomamunka szabályzatban előírt tartalmi és formai követelményeknek, így a dolgozat beadható.

Kelt, Budapest, 2024. november 25.




belső témavezető

Külső témavezetői nyilatkozat a dolgozat beadhatóságáról

Alulírott, Prof. Dr. Nagy Nándor, mint külső témavezető nyilatkozom, hogy Tóth Réka Borbála, Neptun kódja: TR48UJ „Kondroitin-szulfát proteoglikánok karakterizálása és módosítása az enterális idegi őssejtek transzplantációs hatékonyságának növelése érdekében kísérletes Hirschsprung-kór modellben” című dolgozatában ismertetett munkát a hallgató a szakmai irányítással végezte, amely szakmai tartalma alapján beadható.

Kelt, Budapest, 2024. november 25.



külső témavezető

Hallgatói nyilatkozat a dolgozat önálló tevékenységéről

Alulírott, Tóth Réka Borbála hallgató (Neptun kód: TR48UJ) nyilatkozom, hogy a „Kondroitin-szulfát proteoglikánok karakterizálása és módosítása az enterális idegi őssejtek transzplantációs hatékonyságának növelése érdekében kísérletes Hirschsprung-kór modellben” című dolgozatom készítése során betartottam a szerzői jogról szóló 1999. évi LXXVI. tv. szabályait, valamint a BME TVSZ és a BME Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kara által előírt, a dolgozat készítésére vonatkozó szabályokat, különösen a hivatkozások és idézések tekintetében.

Tudomásul veszem, hogy szakdolgozat esetén plágiumnak/szerzői jogsértésnek számít:

- szó szerinti idézet közlése idézőjel és hivatkozás megjelölése nélkül;
- tartalmi idézet hivatkozás megjelölése nélkül;
- más szerző publikált gondolatainak saját gondolatként való feltüntetése.

Tudomásul veszem, hogy a dolgozatban közölt módszerek, eredmények a kutatásban, fejlesztésben résztvevő kutatók és intézmények/cégek közös szellemi tulajdonát képezik, ezek hasznosítása, publikálása, csak az összes érintett egyetértésével történhet meg.

Kijelentem továbbá, hogy a dolgozat készítése során a konzulenszt, illetve a témavezetőt nem tévesztettem meg.

Kelt, Budapest, 2024. november 25.



hallgató