

## Válasz Dr. Elekes Károly professzor, MTA doktora opponensi kérdéseire

Mindenekelőtt hálásan köszönöm, hogy Professzor úr elvállalta az értekezés bírálatát. Rendkívül fontosnak tartom a disszertációval kapcsolatos kritikai megjegyzéseit és javaslatait, amelyek olyan klinikai relevanciákkal bíró problémákat érintettek, amikkel érdemes a jövőben foglalkozni. Tudomásul vettem és javítottam a formai és általános tartalomra vonatkozó kifogásokat, ezekre adott tömör leírásokat a válaszom második felében egyenként tüntettem fel.

### A feltett kérdésekre a válaszaim a következők:

#### 1. Milyen (klinikai) beavatkozások, mintavételi lehetőségek segíthetik elő a bemutatott eredmények alapján pl. a Hirschsprung-kór kialakulásának előrejelzését?

A Hirschsprung-kór általánosságban véve jól ismert, de egy ritka születési rendellenesség, amely a vastagbelet érinti és a bélben lévő idegrendszer egy részének vagy összességének hiánya jellemzi, ami súlyos székrekedést, elzáródást és vastagbélgyulladásokat okoz. Habár a Hirschsprung-kórt legtöbb esetben genetikai hiba váltja ki, szinte valamennyi hajlamosító mutáció részleges penetrációval és változó expresszivitással rendelkezik. Fontos kiemelni, hogy a Hirschsprung-kórban szenvedő gyermek születésének kockázata sokkal nagyobb, ha egy szülő vagy testvér szenved ebben a betegségben. Például inaktív RET-mutációk a sporadikus HSCR 15%-20%-ában és a familiáris Hirschsprung-kór 50%-ában fordulnak elő, mégis az inaktív RET-mutációval rendelkező gyermekeknek csak körülbelül a felénél alakul ki Hirschsprung-kór (Amiel és mtsai, 2008). Wang és Camilleri 2019-es *Neurogastroenterology and motility*-ben megjelent publikációjukban írták le a következő esettanulmányt: A szerzők megkísérelték a Hirschsprung-kór prenatális diagnosztizálását egy előrehaladott magzati életkorban vett magzatvíz-minta felhasználásával egy olyan családban, ahol egy ismert inaktív RET-mutáció volt, amely apában (hosszú szegmensű Hirschsprung-kór) és idősebb lányában (teljes vastagbél aganglionosis) nyilvánult meg. A magzatnak ugyanaz a RET-változata volt, de több éves követés után sem alakult ki a Hirschsprung-kór tünete, ami alátámasztja azt a következtetést, hogy ez a RET-mutáció egy autoszomális domináns gén, amelynek nem teljes a penetranciája. Ez a tapasztalat azt sugallja, hogy a genetikai tanácsadás a megfelelő első lépés a prenatális vizsgálatok indokoltságának gondos felmérésére, különösen akkor, ha a hosszú szakaszú Hirschsprung-kór fenotípusa annyira változó, és a betegség műtéttel potenciálisan gyógyítható.

Összefoglalva, a Hirschsprung-kórt okozó genetikai kockázati tényezők túl bonyolultak a születés előtti DNS-vizsgálathoz vagy a születés utáni DNS-teszthez ahhoz, hogy pontosan megjósolhassák a gyermek Hirschsprung-kórral születik-e vagy, hogy DNS-tesztet megbízhatóan használhassák a diagnózishoz. Továbbá, általánosan elfogadott, hogy a Hirschsprung-kórt nagyon nehéz prenatálisan kimutatni (első ultrahangos jellemzői a terhesség harmadik trimeszterében jelentkezhetnek), és a differenciáldiagnózisnak magában kell foglalnia a bélelzáródást és a meconium peritonitist.

Mivel a bélidegrendszer rendellenes kialakulását kiváltó változatos molekuláris mechanizmusok arra utalnak, hogy számos nem genetikai tényező is befolyásolhatja a Hirschsprung-kór előfordulását, azt gondolom, ha az előrejelzés a jövőben lehetséges lesz, akkor sokkal szélesebb spektrumú genetikai tesztekre lesz szükség, amiben integrálni kell a sejtváándorlást szabályozó, illetve az extracelluláris mátrix bioszintézisét kódoló gének expressziós mérését is.

## **2. Ha az előrejelzés lehetséges, akkor milyen beavatkozást javasolna, tart elképzelhetőnek a Jelölt a kialakuló malformáció esetleges megakadályozására?**

Annak ellenére, hogy 1948 óta elérhető a Hirschsprung-kór sebészeti kezelése, a betegségben szenvedő gyermekek körülbelül 5%-a korán meghal, és több mint 40%-uk műtét után is súlyos motilitási zavarral, bélgyulladásal küszködik. Ezért kiemelten fontos lenne, ha a Hirschsprung-kór előfordulását meg lehetne akadályozni. Jelenleg úgy gondoljuk, hogy a betegség kialakulása bizonyos esetekben elkerülhető a Hirschsprung-kór „magas genetikai kockázatát” hordozó anyák táplálkozásának, egészségének és gyógyszerhasználatának optimalizálásával a fogantatás előtt és a terhesség korai szakaszában. Ebből a szempontból különösen értékes a gyakori és elkerülhető kitétségek azonosítása.

Például, a terhesség korai szakaszában általánosan használt gyógyszerek *in vivo* tesztelése során felfedeztük (Schill és mtsai., 2016), hogy az ibuprofen jelentősen csökkenti az embryonális béltraktus ganglionlécsejtes kolonizációját, ami ganglionmentes utóbelet, a neuronok Hirschsprung-kór szerű hiányát okozta zebrahalban. Ezt a megfigyelést egereken végzett *in vivo* vizsgálatokkal is megerősítettük: Ret+/- egér utóbél ganglionléc-sejtes kolonizációját vizsgálva kimutattuk, hogy az ibuprofen lassíthatja az embryonális bél kolonizációját. Továbbá, az embryonális csirkebelek ibuprofennel történő kezelése a vastagbél ganglionléc sejtekkel történő kolonizációjának szinte teljes hiányához vezetett.

Ezekkel a megfigyelésekkel összhangban az ibuprofen csökkentette a sejtek migrációs sebességét a 2-dimenziós felületeken, csökkentette a lamellipodiumok számát, hosszát és a filamentáris aktin mennyiségét egér ganglionléc sejtekben. Ezzel szemben az ibuprofen nem lassította le a migrációt és nem csökkentette a lamellipodiumok mennyiségét az bélből származó mesenchymalis sejtekben. Vizsgálataink összességében azt sugallják, hogy az ibuprofen alkalmazása a terhesség korai szakaszában növelheti a Hirschsprung-kór kockázatát egyes genetikailag fogékony gyermekekben. Ez fontos lehet, mivel az USA-ban és z EU-ban a nők 23,5%-a szed ibuprofent a terhesség korai szakaszában (Thorpe és mtsai., 2013). Humán epidemiológiai vizsgálatokra lenne szükség annak meghatározásához, hogy a gyógyszerhatóanyagok milyen mértékben járulnak hozzá a Hirschsprung-kór kockázatához és csökkentésük hogyan befolyásolja a betegség előfordulását.

A genetikai tényezők és a növekedési faktorok mellett, a bélfal rendellenes extracelluláris mátrixa (ECM) gyakran áll a Hirschsprung-kór hátterében (Rao és Gershon, 2018). A ganglionléc sejtek proliferációját és túlélését kiemelten a laminin, a sejtek migrációját pedig az I-es és IV-es típusú kollagén segíti elő. Ez a sejtbiológiai

felismerés vezetett ahhoz a hipotézishez, hogy a Hirschsprung-kór az embryogenezis során az érintett bélben lévő abnormális extracelluláris mátrix mikrokönyezet eredménye lehet. A ganglionmentes vastagbélben korábban számos tanulmány rávilágított a rendellenes kollagén eloszlásra (Parikh és mtsai., 1995, Soret és mtsai.,2015; Nagy és mtsai., 2018).

Három ideutaló publikáció tükrében mutatnám be egy lehetséges megelőzésre felállított javaslatom:

**Gao és mtsai (2020)** Hirschsprung-betegek mintáin a kollagén I, III és IV eloszlását karakterizálta és megállapította, hogy az I-es és III-as típusú kollagének koncentrációja magas volt a normál bélszakaszokban, de a ganglionmentes szegmensben kevés mennyiségben fordultak elő. Továbbá, **Chevalier és mtsai (2018)** az ECM egy érdekes mechanikai tulajdonságát fedte fel, amely hatással van az enterális ganglionléc sejtek vándorlására. Megállapították, hogy a ganglionléc sejtek kolonizációjának idején a bél ECM-nek merevsége dinamikusan változik. A mikor embryonális bél nyújthatóságát atomerő és second-harmony generation mikroszkóppal kombinálva vizsgálták arra jutottak, hogy a ganglionléc sejtek kolonizációja alatt a bélfal merevsége fokozatosan nő, párhuzamosan az I-es típusú kollagén rostok sűrűségének növekedésével. Ez a megnövekedett merevség a ganglionléc sejtek migrációs sebességét pozitívan befolyásolja. Mindehhez nagyon fontos megemlíteni egy érthetetlen módon sokáig mellőzött tanulmányt (**Kalcheim és Leviel, 1988**), amely szerint a velőcsőexplantátumok aszkorbinsavval vagy rokon molekulá(i)val történő kezelése a vándorló ganglionléc-sejtekben fokozott kollagéntermelést váltott ki, ami jelentősen serkentette a ganglionléc sejtek migrációját.

Összefoglalva, ezek alapján, azt gondolom, hogy az ECM modulálása új kiegészítő stratégiát jelenthet nemcsak a Hirschsprung-kór betegek disztális vastagbelében a bélidegrendszer regenerációjának elősegítésére, hanem a megelőzésre is. Elképzelhetőnek tartom, hogy azoknak a várandós anyáknak, akikre a Hirschsprung-kór „magas genetikai kockázata” jellemző, a terhesség első trimeszterében ajánlott folsav tartalmú védővitaminokhoz hasonlóan, az aszkorbinsav szedése átsegítheti vagy fokozhatja a ganglionlécsejtek kollagén termelését és ez protektíve biztosítja a sejtek intenzív migrációját, az utóbél teljes kolonizációját.

### **3. Hogyan segíti elő a tenascin az ENNC-k vándorlását, ha az azokban intracellulárisan lokalizálódik, miközben köztudomású, és Jelölt ez maga is javasolja, hogy az ECM molekulák, mint extracelluláris elemek irányítják, terelik, majd rögzítik az innerváló elemek útját?**

Elnézést kérek, ha félreérthető módon fogalmaztam. A tenascin molekulák extracelluláris mátrix glikoproteinek, amelyek alegységei epidermális növekedési faktor (EGF)-szerű ismétlődésekből, fibronektin III típusú (FNIII) doménekből és egy C-terminális fibrinogénnel rokon doménből állnak.

In vitro migrációs vizsgálattal azt találtuk (Ackbareian, Nagy és mtsai, 2013), hogy a tenascin-C elősegíti az ganglionléc sejtek migrációját műanyag és fibronektinnel bevont felületeken. Ezek az eredmények összhangban vannak a tenascin-C ismert tapadásgátló szerepével (Fischer et al., 1997; Tucker, 2001), valamint azzal a

képességével, hogy gátolja a fibronektin integrinek által közvetített kapcsolódást. Ez a sejtkötő hatás teszi lehetővé a ganglionléc sejt gyorsabb leválását az extracelluláris szubsztrátumról és biztosítja az ganglionléc sejtek migrációját.

#### **4. Mi a hátsóbél innerváció kialakulásának meghatározó oldala, a "preszinaptikus" vagy a "posztoszínaptikus? Azaz a receptorok és azok hordozói (sejtes elemek; izom, glia, stb) vagy az intracelluláris, pl. növekedési faktorok?**

Az utóbelet kolonizáló ganglionléc sejtek sorsát, az innerváció kialakulását nagymértékben befolyásolja az extracelluláris és intracelluláris molekulák közti kölcsönhatás. Ennek alapján bátran ki lehet jelteni, hogy „kettőn áll a vásár”. Az extracelluláris kompartment magába foglalja az extracelluláris mátrix (ECM) alapú vázlat, amely kialakítja a bél háromdimenziós szerkezetét, s amely mentén a ganglionléc sejtek vándorolnak. Szintén, ide tartoznak a stromális mikrokörnyezet alkotóelemei, ami az ECM-ben ágyazott mesenchymális sejteket, simaizomsejteket, endothel sejteket, immunsejteket sejteket foglalja magába. Ezek a sejtek különféle ECM-komponenseket és növekedési-faktorokat választanak ki, amelyek alapvető jelzéseket biztosítanak a vándorló ganglionléc sejtek irányításához. Az ECM-ről, amely sok különböző, erősen konzervált fehérjét tartalmaz, egykor azt hitték, hogy csupán strukturális támaszként szolgál a szervezet sejtjeinek és szöveteinek. A molekuláris és sejtbiológiai módszerek robbanásszerű fejlődésének köszönhetően kezdjük felismerni, hogy az ECM-nek valójában milyen összetett szerepe van a ganglionlécből származó őssejtek vándorlási folyamatában. Egyre inkább elfogadott, hogy az ECM szükséges szubsztrátként és közvetítőként szolgál a mikrokörnyezeti jelek számára, amelyek befolyásolják a ganglionléc sejtek migrációját. Az ECM összetételének diszregulációja pedig nemcsak következménye, hanem mozgatórugója a Hirschsprung-kór patogenezisének.

#### **A kritikai megjegyzésekre adott válaszok:**

##### *Formai és általános tartalmi kifogások.*

**1. A disszertáció igen nagyszámú rövidítést tartalmaz, melyek szövegközi magyarázata ugyan megtalálható, de ennek ellenére szükséges lett volna a rövidítések listája, mert a munka igen sokoldalú, kiterjedt jellege miatt nem volt egyszerű mindent fejben tartani az olvasás során.**

Elnézést kérek a hiányosságért. A Rövidítések jegyzékét pótoltam, az értekezés végére csatoltam.

**2. Az eredmények tételes összefoglalása hiányzik, és ezt nem helyettesíti, hogy ez a tézisekben megtalálható.**

Az eredmények tételes összefoglalását csatoltam a Rövidítések jegyzéke fejezet után.

**3. Ugyancsak hiányzik a disszertáció alapjául szolgáló saját közlemények listája, melyet a Jelölt szintén csak a tézisekben ad meg. A tézisek és a**

**disszertáció két különálló egység a teljes doktori művel kapcsolatban, azért egyik a másikkal nem helyettesíthető.**

Egyetértek a Bírálóval, hiba volt kihagyni a felhasznált saját közlemények listáját. Pótoltam és csatoltam a Rövidítések jegyzéke fejezet után.

**4. A zebrahal szerepeltetése a disszertációban egyetlen egybekezdéses alfejezetben, egy ábrával nem indokolt.**

Köszönöm a javaslatot. Többféleképpen próbáltam beilleszteni zebrahal embryokkal kapott eredményeket. Mivel Halasy Katalin professzor asszony kérdése a halak bélidegrendszerére vonatkozott, ezért a válaszzal együtt a Bevezetés fejezetben is több adat került erről a modellállatról. Ezek után úgy gondolom nehezebben épült volna be a csirke embryot leíró előző alfejezetekbe és bár elismerem, hogy csökevényes, nem változtattam a halas alfejezet besorolásán.

**5. Az Eredmények fejezetben 57 ábra található, ami szinte kizárólag táblakép és igen nagyszámú (összesen több száz) részfotót foglal magában. Egyetlen egy felvételen sincs méretarányos jel (bar), vagy lenne legalább az ábraszövegben a számszerű nagyítás feltüntetve. Ez, függetlenül a bíráló sok évtizedes tapasztalatától a mikroszkópos munka területén, elengedhetetlen lett volna. A bírálónak egyébként is az volt az általános benyomása, hogy kevesebb ábra többet adott volna, mind a mondanivaló, mind magát az illusztrálást illetően.**

Többször is újra olvasva, kijavítva az értekezést én is egyetértek a Bíráló javaslatával, hogy kevesebb több lett volna, amit talán a felhasznált eredeti képanyag jelentős átszerkesztésével lehetett volna megvalósítani. A disszertáció alapját képező közlemények eredeti képanyagának így is csak közel kétharmadát használtam fel. Véleményem szerint a képek további redukálása nehezítette volna a különböző dolgozatokban leírt eredmények kapcsolódását, s az értekezés íve megtört volna.

A méretarányos jelt a képek aláírásában is pótoltam.

**6. Az ábrák egy jelentős része igen kisméretű, azokon a hisztokémiai, immunhisztokémiai jelölések differenciált megjelenítése, a jelölések gyakori mellőzése miatt is, nem sikerült, illetve nem egyértelmű. A jelölések hiánya az ábráknak és az eredmények leírásának összhangját, értelmezését együtt és akár külön is nehezítette. Az ábramagyarázatok „self-explanatory” jellege több esetben is kérdéses. Helyenként mintha az olvasóra lenne bízva, hogy a képeken megfelelően tájékozódjon, vagy jelek nélkül is azonosítsa az eredményekben, illetve az ábraszövegben olvasható állításokat.**

A képaláírásokat újból átnéztem, kijavítottam, igyekeztem pontosítani és a redundás részeket kiszedni, összehangolni az Eredmények fejezettel. Remélem a javítások segítik a megértést, olvasmányosabbá tették az Eredmények fejezetét.

**Az ábrák egy része (néhány vonalas kifejezetten) életlen.**

Elismerem, hogy óriási hibavolt a PDF formátumban szerkesztett képeket betenni a dolgozatba, mert a végső változat szintén PDF kiterjesztést kapott, aminek a célja az volt, hogy nyomtatásra és az online adatbázisba történő feltöltés előtt a digitális dokumentum mérete ne haladja meg az 5-10 megabite méretet. A formatálás

többszörösen felbontásbéli minőségcsökkenést okozott, a képek elmosódottak lettek, jelentősen árnyalva a munka minőségét. A probléma megoldására, a képek 80%-át nagyfelbontásúra kicseréltem, a rajzolt ábrákon növeltem a kontrasztot. Továbbá, a PDF formátum létrehozásakor kiemelten figyeltem a felbontás megőrzésére, végül nagyfelbontással újból kinyomtattam.

### **Válaszok a Részletes kritikai megjegyzésekre:**

#### **3. Módszerek fejezetcím – helyesen: *Anyagok és módszerek*.**

*Javítva.*

#### **4. Eredmények – A 4.7. alfejezet után rosszul a 4.9. számozás következik.**

*Javítva.*

### **Eredmények, ábrák, ábramagyarázatok**

#### **12A ábra – Olvashatatlan, 12B – az embrió felismerhetetlen, 12C – hol van pontosan az IHC jelölés (minden "kék")?**

Köszönöm a javaslatot. Az ábra valóban javarészt kivehetetlen lett, főleg a PFD konverziót követő nyomtatás után. Az ábrát javítottam, az A és B képet kicseréltem. Az in situ hibridizáció és az immunjelölés is egyaránt a teljes caudalis területet rajzolja ki, mivel az RCAS az osztódó sejteket, kifejezetten a mesenchymális kompartmenteket fertőzi meg. Az IHC a farokbimbó mesenchymális sejtjeit jelöli.

#### **17.-18. ábrák – A 17. ábrán nincs jelölés, a 18.-on mindenhol van. 17N-O – mindkettőn vörös immunfluoreszcens jelek is láthatók, 17Q – a jelölés inkább „merge” mint vörös.**

A 17-es ábrát jelölésekkel kiegészítettem és az ábraalírást a javítottam: **N-Q:** E9 (HH35) stádiumtól kezdve a SOX10 (piros) molekulát csak a B-fabp+ glia sejtek (zöld) expresszálják (N), a Tuj1+ enterális neuronokban (zöld) nem fejeződik ki (O). Az enterális ganglionokban az L1CAM expresszió a glia sejteken nemjelenik meg (P), csak a Tuj1+ neuronok fejezik ki (Q; sárga szín a kettősen jelölt neuronok mutatja). ep, epithelium; NoR, Remak-ganglion; mp, plexus myentericus; smp, plexus submucosus.

#### **25C, D ábrák – A minimális és a kép mérete miatt alig észrevehető reakciókat jelölni kellett volna.**

Köszönöm a javaslatot. A képekre jelölést tettem, hogy pontosan rámutassak a vagus, illetve sacralis régióból származó ganglionléc sejtek mesenchymális lokalizációjára.

#### **26. ábra – Az ábrának csak címe van, míg a magyarázó szöveg jobbra az Eredményekben olvasható. 26G – Mit jelölnek a nyilak? 26I – a sejtes jelölés a totál preparátumban nem figyelhető meg, ellenben a preparátum teljes, nem**

**differentiált festődése igen. 27. ábra – Szintén csak ábracímmel rendelkezik. 29H-L ábrák – A hozzájuk tartozó ábramagyarázat teljesen hiányzik.**

Köszönöm Professzor úrnak, hogy rámutatott a hiányosságokra. Mind a három ábraalírást részletes leírással pótoltam, a jelölésekre magyarázatot adtam.

**48. ábra– A 16 részképben bemutatott változások konkrét jellegének pontosítása az ábraszövegből hiányzik. - Mi a különbség az A, E, I, M (E8wt) és a B, F, J, N (nem kezelt) képek között?**

A képalírást részletesebben írtam át, pontosítottam, kiemelve a 8wt (A,E,I,M képek) és az 5 napos embryonális bél 3 napos tenyésztését követő (B,F,J,N) ECM mintázatának összehasonlítását.

**49. ábra – Az A, E képeken a jelölődések jellege teljesen eltérő a többitől; a jelölés E-ben erősebb, mint az A-ban, míg a B, F; C, G és D, H kép párokban ez fordított. Az A, E kép felbontása is eltérő a többiekétől.**

Az eltérő expresszió és fenotípus a kezelések miatt van. A-D kontroll ellenanyag, E-H képek az SHH-t blokkoló 5E1 ellenanyag jelenlétében kialakult bélidegrendszer és extracelluláris mátrix fenotípust mutatja. A képalírást a következőre cseréltem ki:

**49. ábra:** Az SHH funkciógátló ellenanyag a cyclopamine-hoz hasonló hatást mutat. Az E5 csirke utóbél szakaszokat kollagén gélben tenyésztettük 3 napig. A p75 (A, E), CS-56 (B, F), a kollagén IX (C, G) és a versican (D, H) expressziója szignifikánsan megváltozik Az SHH növekedési faktor funkcióját gátló 5E1 monoklonális ellenanyag hozzáadása miatt (E,H). Indifferens ellenanyag jelenlétében az utóbél ENS mindkét plexusa kifejlődik, a proteoglikánok (CS-56, kollagén IX és a versican) kifejeződése a hám alatti mesenchymára terjed ki. Ezzel szemben, az SHH-t blokkoló 5E1 ellenanyag hatására neurális diszplázia és hyperganglionózis fenotípus jelenik meg, ami együtt jár egy vékony hám alatti proteoglikán expresszióval (I). A versican expressziós mennyiségének mérése megerősíti az immunhisztokémiai eredményeket; SHH hatására fokozott expresszió mérhető.

**51. ábra – A: A farokbimbó malformáció a nyíl ellenére nem látható; H: a nyíl mire mutat?; J: ez a megváltozott izomfejlődést hivatott ábrázolni, ellentétben az ábraszöveggel; A K képhez a J ábraszöveg tartozik; L, M: mit ábrázolnak a felvételek?, az ábra magyarázat hiányzik.**

A képalírást hibásan kerül feltöltésre. Javítottam a következőre:

**H.)** A vírusfertőzés következtében a 14 napos utóbélben hypoganglionózis és ektopikusan elhelyezkedő ENCC-k (nyílhegy az epithelium közvetlen közelében lokalizálódó ektopikus Hu+ neuroncsoportot jelöli), valamint **I.)** rendellenes alpha-SMA+ simaizom fejlődés (a bélfal simaizomrétegei nem különülnek el) figyelhető meg. **K.)** Összehasonlításképpen a kontroll E14 embryoból izolált vastagbél neuron

specifikus anti-Hu (**K**), alpha-SMA (**L**) és kollagén IX (**M**) specifikus immunfestése látható.

**62-64. ábrák – Nincs ábramagyarázat, a szövegbeli eredmények jelölések hiányában nem követhetők a képeken. Mindhárom táblán az A képen korábbi ábraszámok (5E, 8E, 14E) is láthatók. Az eredmények leírásában (118. o, 4.9.1.) középen a 63., 64. ábrával kapcsolatban mindössze egy mondatban összegzi a Jelölt a megfigyeléseit: "E8 és E14 stádiumban,....., az ECM expressziója jelentősen megváltozott". Konkrétan ez mit jelent? Minimum egyszer a mesenchyma és a periganglionáris régiókat jelölni kellett volna a tájékozódás érdekében.**

Köszönöm a kritikai megjegyzést. Elfogadom, hogy rövid, felületes volt a képaláírás, ami jelentősen megnehezítette a bemutatott eredmények megértést. A képekhez részletes képaláírást készítettem, s a disszertációba beillesztettem. A képeken olvasható 5E, 8E, 14E felirat az embryok korát jelöli.

**65E, F ábrák – Hol van a jelölődés a ganglionon belül és kívül? A képek életlenek.**

A képet nagyobb felbontásúra kicseréltem, a ganglionra vonatkozó képaláírást pontosítottam.

Ellentétben az egér bélidegrendszer ganglionjaival, a csirke plexus submucosus és myentericus ganglionokban a kollagén XVIII (**E**) és az agrin (**F**) ganglionok körül és intraganglionárisan is kifejeződik.

**67D, E, H, I – Jelek hiányában a reakciók lokalizációja, azok rendellenes expressziója értelmezhetetlen (még a 123. o., 4.9.2. bekezdésben írottak segítségével sem). A D-I felvételek elektronmikroszkóppal készültek?**

A képek jelölését kiegészítettem és a képaláírást is pontosítottam:

I.) A perlecan expresszió nem változott meg, hasonlóan az agrinhoz, intenzív basalis membrán expressziót mutatott a lument bélelő hám (ep) alatt, erek (nyíl) és simaizom sejtek körül. A ganglionmentes bélfalban (H és I képek) nyílhegyek és pontozott vonal jelzik a plexus submucosus hiányát. Ep, epithelium; mp, plexus myentericus; smp, plexus submucosus

**69G ábra – Ez egy áramláscitometriai kép (l. 126. o., 2. bek.), amit az ábramagyarázat nem említ.**

Átírtam a következőképpen:



**G.)** A 3 hetes *Wnt1;tdT* egerek béltraktusából enzimatikus emésztés után áramlási citometriával izoláltuk az ENS sejteket. Az izolált sejtekből neurosphere technikával **(H)** Wnt1+, **(I)** p75+ és **(J)** HU+ idegi sejtaggregátumokat hoztunk létre, amiket E5 csirke embryo **(K)** coecumába történő transzplantáció (nyilak) után, 9 napig CAM membránon tenyésztettünk.

**690, P ábrák – A kollagén és agrin expresszió (zöld) a sejtek körül és nem azokon belül lokalizálódik.**

Köszönöm a javaslatot. Következésképpen javítottam a képaláírást: A Wnt1+ sejtek egér specifikus **(O)** kollagén XVIII-cat és **(P)** agrint expresszálnak, amely immuncitokémia festéssel extracellulárisan a sejtmembránhoz asszociáltan jelenik meg.

A javított értekezés az alábbi URL linken érhető el:

<https://semmelweis.hu/stemcell/files/2022/01/MTA-Nagydoktori.pdf>

Mégegyszer köszönöm a részletes bírálatot, bízom benne, hogy sikerült kielégítően megválaszolni Professor úr kérdéseit. Köszönöm, hogy bírálatában támogatta számomra az MTA doktori fokozat odaítélését.

2022. január 20.



Dr. Nagy Nándor

.....  
Amiel J, Sproat-Emison E, Garcia-Barcelo M, Lantieri F, Burzynski G, Borrego S, Pelet A, Arnold S, Miao X, Griseri P, Brooks AS, Antinolo G, de Pontual L, Clement-Ziza M, Munnich A, Kashuk C, West K, Wong KK, Lyonnet S, Chakravarti A, Tam PK, Ceccherini I, Hofstra RM, Fernandez R. Hirschsprung disease, associated syndromes and genetics: a review. *J Med Genet.* 2008;45:1–14.

Gao, N., Wang, J., Zhang, Q., Zhou, T., Mu, W., Hou, P., Wang, D., Lv, X., & Li, A. (2020). Aberrant Distributions of Collagen I, III, and IV in Hirschsprung Disease. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 70(4), 450–456. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000002627>

Kalcheim, C., & Leviel, V. (1988). Stimulation of collagen production in vitro by ascorbic acid released from explants of migrating avian neural crest. *Cell differentiation*, 22(2), 107–114. [https://doi.org/10.1016/0045-6039\(88\)90022-x](https://doi.org/10.1016/0045-6039(88)90022-x)

MacKenzie, K. C., Garritsen, R., Chauhan, R. K., Sribudiani, Y., de Graaf, B. M., Rugenbrink, T., Brouwer, R., van Ijcken, W., de Blaauw, I., Brooks, A. S., Sloots, C., Meeuwssen, C., Wijnen, R. M., Newgreen, D. F., Burns, A. J., Hofstra, R., Alves, M. M., & Brosens, E. (2021). The Somatic Mutation Paradigm in Congenital Malformations: Hirschsprung Disease as a Model. *International journal of molecular sciences*, 22(22), 12354.

Parikh, D. H., Leibl, M., Tam, P. K., & Edgar, D. (1995). Abnormal expression and distribution of nidogen in Hirschsprung's disease. *Journal of pediatric surgery*, 30(12), 1687–1693. [https://doi.org/10.1016/0022-3468\(95\)90453-0](https://doi.org/10.1016/0022-3468(95)90453-0)

Rao M., Gershon M.D. Enteric nervous system development: What could possibly go wrong? *Nat. Rev. Neurosci.* 2018;19:552–565. doi: 10.1038/s41583-018-0041-0.

Schill, E. M., Lake, J. I., Tusheva, O. A., Nagy, N., Bery, S. K., Foster, L., Avetisyan, M., Johnson, S. L., Stenson, W. F., Goldstein, A. M., & Heuckeroth, R. O. (2016). Ibuprofen slows migration and inhibits bowel colonization by enteric nervous system precursors in zebrafish, chick and mouse. *Developmental biology*, 409(2), 473–488. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2015.09.023>

Soret, R., Mennetrey, M., Bergeron, K. F., Dariel, A., Neunlist, M., Grunder, F., Faure, C., Silversides, D. W., Pilon, N., & Ente-Hirsch Study Group (2015). A collagen VI-dependent pathogenic mechanism for Hirschsprung's disease. *The Journal of clinical investigation*, 125(12), 4483–4496. <https://doi.org/10.1172/JCI83178>

Thorpe PG, Gilboa SM, Hernandez-Diaz S, Lind J, Cragan JD, Briggs G, Kweder S, Friedman JM, Mitchell AA, Honein MA National Birth Defects Prevention S. Medications in the first trimester of pregnancy: most common exposures and critical gaps in understanding fetal risk. *Pharmacoepidemiol Drug Saf.* 2013;22:1013–1018.

Wang, X. J., & Camilleri, M. (2019). Hirschsprung disease: Insights on genes, penetrance, and prenatal diagnosis. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 31(11), e13732. <https://doi.org/10.1111/nmo.13732>