

## Válaszok dr. Halasy Katalin professzor, MTA doktora opponensi kérdéseire

Tisztelt Professzor Asszony!

Köszönöm, hogy elvállalta pályázatom részletes áttanulmányozását és bírálatát.

### Formai és általános tartalmi kifogásokra adott válaszom:

**Bevallom, a cím kissé megtévesztett, az „extracelluláris mikrokörnyezet” kifejezésen inkább az extracelluláris mátrix komponenseire gondolván.**

Az értekezés címének megválasztásánál törekedtem a rövidegre, és a mikrokörnyezet kifejezéssel a szerkezeti elemek (rezidens sejtek és extracelluláris mátrix) és az extracelluláris térben diffundáló morfogének összességét kívántam jelölni. A cím megfogalmazása valóban okozhat félreértést.

Egyetértek a Bíráló javaslatával; hiba volt kihagyni a rövidítések jegyzékét és a méretarányos jelt. Mindkét formai kritikára válaszoltam, a méretarányos jelt a képek aláírásában is pótoltam, rövidítések jegyzékét az értekezés végére illesztettem.

Köszönöm a képekre és a jelölésekre vonatkozó észrevételt. A vörösvértest szót kijavítottam. Az értekezésben szereplő ábrák 80%-át nagy felbontású képekre kicseréltem, a 36. ábra immunelektronmikroszkópos képét külön oldalon (85. oldal) nagy nagyítással is megmutatom.

**A bélidegrendszer - enteric nervous system - kifejezés első használója, tehát a névadó, Langley (1921) nevét érdemes lett volna megemlíteni.**

Köszönöm a javaslatot. A bélidegrendszer első leíróját (Langley) a Bevezetés (2. oldal) első paragrafusában idéztem.

„A bélidegrendszer elnevezés John Newport Langley-től (1921) a Cambridge-i egyetem élettan professzorától származik, aki a béltraktusban található komplex autonóm ideghálózatot a perifériás idegrendszer harmadik alegységeként különválasztotta a szimpatikus és paraszimpatikus idegrendszertől.”

Referencia: Langley J.N. (1921) The autonomic nervous system, Cambridge. Ed. by W. Heffer & Sons.

**A 11. oldalon szerepel, hogy „a halaknak nincs plexus submucosusa” . Ezt annyiban helyesbíteném, hogy a hivatkozott cikk szerzője a zebra dánióról írta le ezt a megfigyelést. Holmgren (1985) 33 halfaj bélidegrendszerét tanulmányozva állapította meg, hogy igen nagy a fajok közötti eltérés. Ezt**

**magam is megerősíthetem, a kecsége, ponty és compó esetében, a Benedeczky István professzor úr által vezetett munkacsoportunk eredményei alapján .**

Köszönöm a javaslatot. Egyetértek, hogy a halakra vonatkozó rész elnagyolt volt és megért volna bővebb bemutatást, főleg hogy a kiemelten csirke és egérembrionokon végzett kísérletek mellett, transzgenikus zebrahal embryokon tett megfigyelések is szerepelnek az Eredmények fejezetben. A Bevezetés fejezet 11. oldalának első paragrafusát a következő résszel egészítettem ki.

A fejlődésgenetikai kutatások kiemelt kísérleti modellszervezetének, a zebrahal embryonak nincs plexus submucosusa és ez felnőtt állatban sem alakul ki. A csontos halak többségében a plexus submucosus hiánya miatt, a plexus myentericusból származó idegrostok hálózják be a bél mucosalis rétegeit (Gábrriel és mtsai., 1990; Olsson, 2009; Ceccotti és mtsai., 2018; Baker és mtsai., 2019). A halak között egyébként nagy az eltérés, néhány halfajban leírtak egy jól körülhatárolható plexus submucosust a tunica muscularis luminalis oldalán, de ez ellentétben a madarak és emlősök bélidegrendszerével, neuronokat nem tartalmaz (Holmgreen, 1985; Olsson, 2009). Ezt igazolja egy szingapúri kutatócsoport publikációja is (Wong és Tan, 1978), amely szerint a sörtefogúfélék családjába sorolt közönséges csipeszhal bélrendszerének részletes neurohisztológiai elemzése a plexus submucosus helyén neuront nem tartalmazó idegrostok dús szövedékének rétegződését mutatta ki, de neurális sejtek nem találhatók a rostok között. Ugyanakkor, a pisztrángok vastagbélszakaszát vizsgálva Li és Furness (1993) a submucosalis idegrostok között helyenként 2-3 nNOS expresszáló neuron perikaryonját írta le. **A submucosalis plexus hiánya összefügg a muscularis mucosae hiányával; például a szívárványos pisztrángban a submucosalis plexus szintjén neuronok csak a bél caudalis részében vannak jelen, az egyetlen olyan bélszakaszban, ahol jól fejlett a muscularis mucosae (Ezeasor, 1979).**

*A feltett kérdésekre a válaszaim a következők:*

**Hogyan készültek a whole-mount preparátumok? Kellett-e az embryonális bélből nyúzatot készíteni, vagy azok elég vékonyak a mikroszkópos vizsgálatokhoz?**

A teljes madár és egérembrionok korai stádiumban, illetve izolált teljes embryonális béltraktus „whole-mount” preparátuma immuncitokémiára és in situ hybridizációra egyaránt használható és nem szükséges a nyúzat készítése. Ez elsősorban a kis méret miatt (az embryonális bél átmérője a korai stádiumokban nem haladja meg az 500 micront) alkalmazható, de sokat segít a laza embryonális szöveti szerkezet, ami 24-48 órás inkubálás alatt az ellenanyagokkal/ RNS probákkal gond nélkül impregnálódik.

A módszer leírása röviden; a whole-mount jelölés előtt a szerveget methanollal dehidratáltuk, fixáltuk, permeabilizáltuk és 15%-os H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-t tartalmazó Dent-féle rögzítő oldatban (20% DMSO metanolban) utófixáltuk. PBS-mosás után (5x1 óra) a szerveget

24 óráig primer ellenanyaggal jelöltük 4°C-on. Az ellenanyag kimutatása 0,05 mg/ml diaminobenzidin és 0,02% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> és 0,1 M-os Tris pufferben (pH 7,0) történt.

**Van-e a bélidegrendszerben a vér-agy gátra emlékeztető vér-ENS gát? Ha igen, ennek a kialakulása a fejlődés melyik fázisában történik?**

Erre a kérdésre adott válaszom a dokumentum végén olvasható.

**A madarak vastagbele igen rövid. Ismeretes-e a madarakban is a Hirschsprung-kórra emlékeztető patológiás elváltozás? Mennyiben felel meg a madár vastagbél ennek modellezésére?**

Specifikusan Hirschsprung-kórra jellemző elváltozást nem írtak le genetikailag manipulált madarakban, és spontán elfordulása is nagyon ritka. Ugyanakkor Hirschsprung-kórra jellemző megacolon, motilitási zavar és bélgyulladás számos esetben előfordulhat, amit kikelés után a bélrendszert fertőző paraziták, vírusfertőzések válthatnak ki.

Fontos megemlíteni, hogy az 50-es években spontán szelekcióval izoláltak olyan csirke törzseket (Talpid és Rumpless csirke), amelyeknek fenotípusa a humán neurocristopathiakban megfigyelt rendellenességet, bélrendszerben kialakult hibákat mutatta.

Az elmúlt évben két közleményünk jelent meg a Talpid mutáns csirke embryok (Talpid<sup>2</sup>, Talpid<sup>3</sup>) bélrendszerének rendellenes fejlődéséről. A Talpid<sup>2</sup> és Talpid<sup>3</sup> gének a primér csillók képzéséért felelős fehérjét kódolnak, amelynek hiányában a Sonic hedgehog (Shh) növekedési faktor jelátvitelének zavarára hasonló craniofacialis és gastrintestinalis anomáliák figyelhetők meg. A Talpid<sup>3</sup> mutációt csökevényes vastagbél, polydactilia és craniofacialis deformitás jellemzi. Külföldi kollaborációban *Dr. Jean-Marie Delalande (UCL, Inst. of Child Health, London)* laboratóriumával a Talpid<sup>3</sup> mutáns csirke és egértörzsből származó embryok vastagbél szakaszát hasonlítottuk össze molekuláris, komparatív embryológiai, in situ hybridizációs és immuncitokémiai módszerekkel, kiegészítve Talpid<sup>3</sup> mutáns humán embryok immuncitokémiai analízisével. **társ-első szerző: Jean Marie Delalande, Nandor Nagy** és mtsai., 2021). Ezzel párhuzamosan egy másik tudományos együttműködés is zajlott *Dr. Samantha A. Brugmann, (University of Cincinnati College of Medicine, USA)* laboratóriumával. A kollaboráció kiemelten a Talpid<sup>2</sup> mutáns embryok craniofacialis elváltozásainak és a fejlődő béltraktus radiális mintázatának komparatív embryológiai vizsgálatára fókuszált (**Brooks és mtsai., 2021**).

Morfológiai elemzésünk kimutatta, hogy a TALPID gének hiánya következetesen befolyásolta a bél neuromuszkuláris fejlődésének mintázatát. A TALPID<sup>3</sup> hiánya például, a nyelőcsőben a simaizom és a bélidegrendszer teljes hiányát eredményezte, míg a gyomorban és a disztális bélszakaszban a TALPID<sup>3</sup> gén hiánya ektopiás simaizom differenciálódásához, az enterális neuronok ectopicus elhelyezkedéséhez vezetett. Hasonlóképpen, a TALPID<sup>3</sup> (humánban KIAA0586 gén) mutációt hordozó magzat emberi utóbelének egy része teljesen normális neuromuszkuláris mintázatot mutatott, míg egy másik része fokozott izomszövet differenciálódást és hypoganglionosist, illetve ganglionmentes vastagbelet mutatott. TALPID<sup>2</sup> mutáns

embryok bélidegrendszert érintő fenotípusa hasonlít a TALPID3-hoz. Ezek a megfigyelések szerint a különböző altípusú Talpid mutáns csirke embryok alkalmas modellrendszert jelentenek a Hirschsprung-kórra jellemző ganglionmentes vastagél tanulmányozására. A Talpid mutánsok hátránya, hogy a homozigóta embryok többsége az embryonális élet korai szakaszában (9-10 napos) elpusztul.

Klasszikus embryomanipulációs módszerekkel (velőcső ablatio, ganglionléc sejtek kolonizációja előtt izolált utóbél szakaszok chorioallantois membránon történő tenyésztése) szintén lehet ganglionmentes vastagbelet létrehozni csirke embryóban, de a manipulált embryokat nem lehet kikeltetni. Ezeknek a problémákra jelenthet megoldást a korai embryok endothelin-3 képződését blokkoló foszforamidonnal való kezelése, aminek hatására Hirschsprung-szerű fenotípusra jellemző ganglionmentes vastagbél alakul ki (Gasc és mtsai, 2015).

### **A madarak coecuma fajonként változó méretű, funkciójú, és bizonyos fajokban hiányzik. Tükröződik-e az eltérő funkció a bélszakasz beidegzésében is?**

McLelland 1988-ban megjelent közleményében részletesen összegyűjtötte a madarak coecumának előfordulását, komparatív morfológiáját. A legtöbb madárnál a jobb és bal coecum oldalirányban vagy ventrolateralisan alakul ki a vékony- és vastagbél találkozásánál. A madarak *Galloanserae* öregrendjébe tartozó lúdalakúak és a tyúkalakúak rendjébe tartozó fajok páros coecummal rendelkeznek addig ezzel ellentétben, sok gémben és keselyűben csak egy coecum található, míg a kígyászkeselyűben (*Sagittarius serpentarius*) két pár coecum van az utóbél proximális és középső szakaszán (Maumus, 1902; Clench és Mathias, 1995). Ugyanakkor, a harkályban, a kolibríben, a galambokban csökevényes, teljesen visszafejlődik.

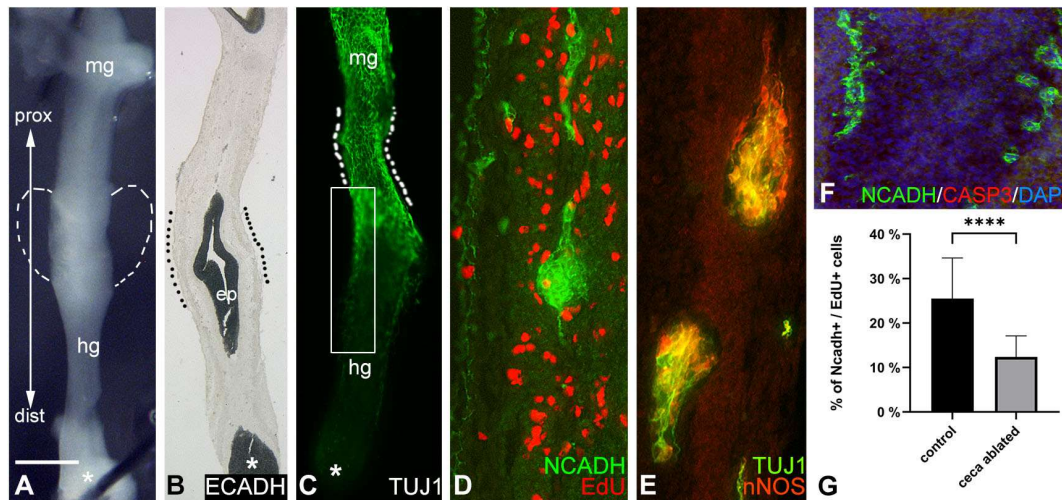
A felnőtt állatok bélrendszerének komparatív anatómiájával ellentétben, embryonális adat egyáltalán nem elérhető, így a legtöbb madárfaj esetében nem lehet tudni, hogy volt-e embryonálisan coecum, ami később involúció miatt eltűnt, és arra sincs adat, hogy lenne eltérés a vastagbél beidegzésében. Egyetlen publikációt találtam egzotikus madárfajok embryonális fejlődésére vonatkozóan: Abraham (1901) szerint a coecum egyáltalán nem fejlődik ki a törpepapagáj embryójában (*Melopstacus undulatus*).

Csirke, fűrj, gyöngytyúk és liba embryokban jól láthatóan kialakul a páros coecum kezdemény az utóbél idegrendszer ontogenezise előtt (Romanoff, 1960; Nagy és mtsai., 2012; 2021; saját megfigyelés a liba és gyöngytyúk embryokra vonatkozik).

A disszertáció beadása óta egy új közleményünk jelent meg, ami témában kifejezetten az embryonális coecum bélidegrendszer fejlődésére gyakorolt funkcióját vizsgálta RNAseq és embryomanipulációs módszerekkel (**Nagy és mtsai, 2021, Development**)

Coecum kimérák és transzgenikus GFP-csirke embryok alkalmazásával, embryonális bélcsatorna *ex vivo* tenyésztésével, coecum ablatio és molekuláris biológiai módszerek (*in situ* hybridizáció, RNAseq analízis) ötvözésével igazoltuk, hogy: **1)** A coecumon áthaladó ganglionléc sejtek intenzívebben osztódnak, mint a bél más szakaszaiban. **2)** A coecum korai ablatioja miatt, a ganglionléc-sejteket csökkent osztódási arány és korai neurális differenciálódás, az utóbelet pedig distalis aganglionozis jellemzi. **3)** Az RNAseq analízis és *in situ* hybridizáció is igazolta, hogy

a coecumban szelektíven kifejeződő WNT5A és WNT11 növekedési faktorok nélkülözhetetlen szerepet töltenek be az utóbél ENS fejlődésében.



**A coecum szükséges az utóbél bélidegrendszerének fejlődésében.** (A-F) A coecum telepek mikrosebészeti eltávolítása az 5 napos csirke mebró bélről. (A, szaggatott vonalak határolják a coecum korábbi helyét). B) Az abláción átesett utóbelet E-cadherin (ECADH; CDH1) ellenanyaggal festettük meg, hogy megerősítsük az egyébként ép bélszisztémát (B, szaggatott vonalak jelzik a coecum helyét). 72 óra szervtenyésztés után a hosszanti metszeteket TUJ1 ellenanyaggal festettük meg, ami azt mutatja, hogy a ganglionléc sejtek migrációja leállt a proximális utóbélben (C, bekeretezett terület nagy NCADH+ sejtaggregátumok képződését mutatja, amelyek minimális sejtproliferációt (D) és kiterjedt nNOS-differenciációt (E) mutatnak. (G) Coecum ablációt követően a ganglionléc sejtek proliferációja szignifikánsan csökkent a kontrollhoz képest.

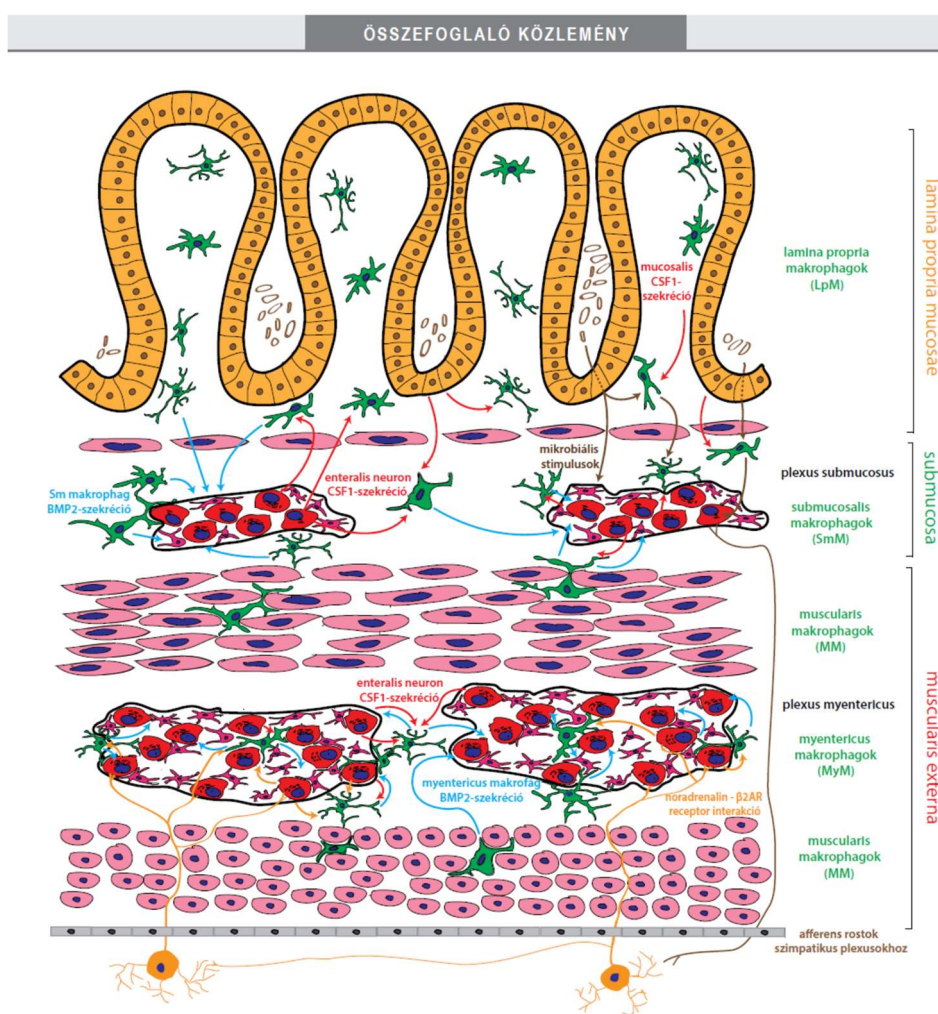
## A bélidegrendszer és a bélcsatorna immunitásban szerepet játszó szöveteinek embryonális fejlődése során van-e valamilyen kölcsönhatás a két nagy szabályozó rendszer között?

Az elmúlt két évtizedben a bélidegrendszer fejlődése téma mellett, intenzív kutatásokat végeztünk a béltraktus immunitásában meghatározó szerepet játszó bélhez-asszociált nyirokszervek, lympho-myeloid sejtek embryonális fejlődésének jellemzésére (összefoglalva az *Avian Immunology* c. könyv két első fejezetében: **Nagy és mtsai 2022; Yvernogeu L, Nagy és mtsai 2022**).

Legutóbbi vizsgálatainkban kimutattuk, hogy az embryonális madár és emlős bélidegrendszer ganglionjaiban keringésből származó nyúlványos myeloid sejtek fordulnak elő (**Dóra és mtsai., 2018**). Ezek a megfigyelések felvetették annak a lehetőségét, hogy az enterális ganglionokat a ganglionléc eredetű neuronok és gliasejtek prekursorain kívül egy harmadik, makrofágszerű sejtpopuláció is benépesíti. Az "intraganglionáris makrofágok" (IGM) az enterális neuronokat és gliát körbefonva, a ganglionokat környezetüktől elhatároló kötőszövetes kapszulán (**Nagy és mtsai., 2018**) belül helyezkednek el, és mikroglia/makrofág specifikus sejt felszíni markereket expresszálnak (**Dóra és mtsai., 2018**). Az eredeti közleményben erről az új sejt típusról címlapfotó készült és a publikációt az év legjobb közleményének is megválasztotta a *Journal of Anatomy*.

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/joa.12863>

Vizsgálatainkat később emlősökre is kiterjesztettük: transzgenikus CX3CR1<sup>GFP</sup> felnőtt egerekből izolált vékony- és vastagbelek immuncitokémiai festéseivel kimutattuk, hogy a CX3CR1+ macrophagok egy része intraganglionarisan fordul elő, ahol nyúlványaikkal „körbefonják” az enteralis neuronokat és gliasejteket, és kifejezetten a központi idegrendszeri microgliához hasonló markereket (CD45, CD11b, Iba1, CSF1R) expresszálnak. Az intraganglionáris makrofágok elektronmikroszkópos morfológiája azt mutatja, hogy a sejtek ganglionba kerülés után jelentős morfológiai transzformáción mennek keresztül: extenzív vakuolizációt, mitokondrium-felhalmozódást és aktív fagocitózis jeleit mutatják (Dóra és mtsai, 2021). Ez a tulajdonságuk emlékeztet a microgliának az ún. „scavenger” funkciójára.



Sémás rajz a bél neuroimmunológiai kölcsönhatását bemutató összefoglaló közleményünkből:

Dóra, D., Kovács, T., & Nagy, N. (2020). Az intestinalis macrophagok és az enteralis idegrendszer szerepe a bél neuroimmunológiai kapcsolataiban. Alap kutatás és klinikai vonatkozások [The role of intestinal macrophages and the enteric nervous system in gut neuroimmunology. Basic science and clinical implications]. *Orvosi hetilap*, 161(19), 771–779. <https://doi.org/10.1556/650.2020.31685>



A közlemény kiemelten hangsúlyozza, hogy a bélben zajló neuroimmunológiai interakciók részletesebb feltérképezéséhez elengedhetetlen lesz a jövőben az intestinalis macrophagok funkciójának pontos megismerése fiziológiás és patológias állapotokban egyaránt.

**Van-e a bélidegrendszerben a vér-agy gátra emlékeztető vér-ENS gát? Ha igen, ennek a kialakulása a fejlődés melyik fázisában történik?**

2018-ban megjelent közleményünkben kimutattuk, hogy Col18 és az agrin bélidegrendszer fejlődése során szerepet játszik a sejt migrációban, valamint a neuronális és glia differenciálódásában, későbbi embryonális stádiumokban pedig a gangliogenezis aggregációs szakaszát határozza meg (Nagy és mtsai 2018). Az említett ECM molekulák perzisztens expressziója posztnatális bélben arra utal, hogy az érett bélidegrendszer integritásának fenntartásában is szerepet játszhatnak. Korábbi tanulmányok a laminint és a IV-es típusú kollagént mutatták ki az emlős myenterialis ganglionok körül (Gabella, 1981). Mivel a felsorolt ECM fehérjék körülveszik a ganglionokat, feltételeztük, hogy egy védőgát létrehozásában vesznek részt, amely elválasztja a ganglionokat a környező sejtektől és megvédi az immunológiai folyamatoktól. Ez a hipotézis összhangban van az agrin molekula agyi gátfunkciójával, ahol a kapillárisokat körülvevő bazális membránokban való felhalmozódása egybeesik a mikrovaszkuláris átjárhatatlanság kialakulásával és a vér-agy gát érésével (Barber és Lieth, 1997).

Legújabb közleményünkben elektronmikroszkópiával és immuncitokémiai eljárással kimutattuk, hogy a bélben létezik vér-ENS gát, ami a vér-agy gáthoz hasonlóan egy folyamatos enterális gliat alp rétegből, számos ECM fehérjéből és bazális membránból áll. A agrint és kollagén IV-et tartalmazó bazális membrán barrier funkciójának teszteléséhez kisméretű 4- és 10 kDA-os FITC dextránt, majd nagyméretű 66 kDA-os fluoreszcens albumint fecskendezünk egerek farokvénájába. A feltöltések információt nyújtottak a vér-bélidegrendszer barrier permeabilitásáról és azt össze tudtuk hasonlítani a vér-agy gáttal. A fluoreszcens dextrán részecskék fagocitózisa alkalmas volt a makrofágok migrációjának in vivo követésére is. A makrofágok aktivitása és a barrier közötti kapcsolatot DSS-indukált egér bélgyulladásos modellben tanulmányoztuk, amit az L-chlodronate-al előidézett makrofág deplécióval ötvöztünk. Összefoglalva, ezekből a kísérletekből levonható, hogy a bélidegrendszert határoló barrier normál és patológias körülmények között érzékenyen reagál a makrofágok jelenlétére, s aminek kulcsszerepe lehet a bélidegrendszert érintő gyulladások patomechanizmusában. **(Dóra és mtsai, 2021).**

Végezetül köszönöm Professzor Asszonynak részletes kérdéseit és hogy bírálatában támogatta számomra az MTA doktori fokozat odaítélését.

A javított, átdolgozott disszertáció az alábbi URL linken letölthető:

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

2022. január 18.



Dr. Nagy Nándor

.....  
Abraham, K. (1901). Beiträge zur Entwicklungsgeschichte des Wellensittichs (*Melospiza psittacus undulatus*). Wiesbaden. Anat Hefte, vol. 27, 589-669.

Baker, P. A., Meyer, M. D., Tsang, A., & Uribe, R. A. (2019). Immunohistochemical and ultrastructural analysis of the maturing larval zebrafish enteric nervous system reveals the formation of a neuropil pattern. *Scientific Reports*, 9(1), 6941. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43497-9>

Brooks, E. C. C. L. B. Paese, A. H. Carroll, J. N. Struve, N. Nagy, and S. A. Brugmann, "Mutation in the ciliary protein *c2cd3* reveals organ-specific mechanisms of hedgehog signal transduction in Avian Embryos," *Journal of Developmental Biology*, vol. 9, no. 2, 2021.

Ceccotti, C., Giaroni, C., Bistoletti, M., Viola, M., Crema, F., & Terova, G. (2018). Neurochemical characterization of myenteric neurons in the juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata*) intestine. *PLoS one*, 13(8), e0201760.

Clench M.H. & Mathias J.R. (1995) The avian cecum: a review. *Wilson Bulletin*, 107, 93–121.

Dóra, D., Arciero, E., Hotta, R., Barad, C., Bhave, S., Kovacs, T., Balic, A., Goldstein, A. M., & Nagy, N. (2018). Intraganglionic macrophages: a new population of cells in the enteric ganglia. *Journal of Anatomy*, 233(4), 401–410. <https://doi.org/10.1111/joa.12863>

Dóra, D., Kovács, T., & Nagy, N. (2020). Az intestinalis macrophagok és az enterális idegrendszer szerepe a bél neuroimmunológiai kapcsolataiban. Alapkutatás és klinikai vonatkozások [The role of intestinal macrophages and the enteric nervous system in gut neuroimmunology. Basic science and clinical implications]. *Orvosi hetilap*, 161(19), 771–779. <https://doi.org/10.1556/650.2020.31685>

Dóra, D., Ferenczi, S., Stavely, R., Toth, V. E., Varga, Z. V., Kovacs, T., Bodi, I., Hotta, R., Kovacs, K. J., Goldstein, A. M., & Nagy, N. (2021). Evidence of a Myenteric Plexus Barrier and Its Macrophage-



Dependent Degradation During Murine Colitis: Implications in Enteric Neuroinflammation. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*, 12(5), 1617–1641. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2021.07.003>

Fiegel, H. C., Schönberg, R. A., Roth, B., Grasshoff, S., & Kluth, D. (2006). Submucosal plexus of dilated gut disappears after ligation in chicken embryos: preliminary results. *European Journal of Pediatric Surgery*; 16(6), 407–410. <https://doi.org/10.1055/s-2006-924750>

Gábríel R, Halasy K, Fekete É, Eckert M, Benedeczki I. (1990). Distribution of GABA-like immunoreactivity in myenteric plexus of carp, frog and chicken. *Histochemistry*.; 94: 323-328

Gasc, J. M., Clemessy, M., Corvol, P., & Kempf, H. (2015). A chicken model of pharmacologically-induced Hirschsprung disease reveals an unexpected role of glucocorticoids in enteric aganglionosis. *Biology Open*, 4(5), 666–671. <https://doi.org/10.1242/bio.201410454>

Holmgren S. (1985). Neuropeptide functions in the fish gut. *Peptides*, 6 Suppl 3, 363–368.

Langley J.N. (1921) The autonomic nervous system, Cambridge. Ed. by W. Heffer & Sons.

Li, Z. S., & Furness, J. B. (1993). Nitric oxide synthase in the enteric nervous system of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Archives of histology and cytology*, 56(2), 185–193. <https://doi.org/10.1679/aohc.56.185>

Krotoski, D. M., Fraser, S. E., & Bronner-Fraser, M. (1988). Mapping of neural crest pathways in *Xenopus laevis* using inter- and intra-specific cell markers. *Developmental Biology*, 127(1), 119–132. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(88\)90194-7](https://doi.org/10.1016/0012-1606(88)90194-7)

Maumus, J. 1902. Les caecums des oiseaux. *Ann. Sci. Nat. Zool.* 15:1-148.

McLelland J. (1989). Anatomy of the avian cecum. *The Journal of Experimental Zoology*.3, 2–9. <https://doi.org/10.1002/jez.1402520503>

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, England)*, 148(22), dev199825. <https://doi.org/10.1242/dev.199825>

Nagy N, Olah I, Vervelde L. (2022). Structure of avian lymphoid system, in: AVIAN IMMUNOLOGY. 3rd Editor(s): Bernd Kaspers, Karel A. Schat, Thomas W. Göbel, Lonneke Vervelde, Academic Press, Pages 11-44. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128187081000270>

Olsson C. (2009). Autonomic innervation of the fish gut. *Acta Histochemica*, 111(3), 185–195.

Parisi Salvi, E., Vaccaro, R., Baglaj, S. M., & Renda, T. (2004). Nervous system development in normal and atresic chick embryo intestine: an immunohistochemical study. *Anatomy and Embryology*, 209(2), 143–151. <https://doi.org/10.1007/s00429-004-0435-9>

Romanoff, Alexis, (1960). *The Avian Embryo: Structural and Functional Development*. Ed. Macmillan Co; New York, N. Y

Schoenberg, R. A., & Kluth, D. (2002). Experimental small bowel obstruction in chick embryos: Effects on the developing enteric nervous system. *Journal of pediatric surgery*, 37(5), 735–740. <https://doi.org/10.1053/jpsu.2002.32267>

von Sochaczewski, C. O., Wenke, K., Metzger, R. P., Loveland, J. A., Westgarth-Taylor, C., & Kluth, D. (2015). Reversible small bowel obstruction in the chicken foetus. *African journal of paediatric surgery : AJPS*, 12(1), 12–17. <https://doi.org/10.4103/0189-6725.150932>

Wong, W. C., & Tan, C. K. (1978). Fine structure of the myenteric and submucous plexuses in the stomach of a coral fish, *Chelmon rostratus* Cuvier. *Journal of Anatomy*, 126(Pt 2), 291–301.

Yvernogeu L, Nagy N, Dunon D, Robin C, ThierryJaffredo T (2022). Development of the avian hematopoietic and lymphoid system. in: AVIAN IMMUNOLOGY. Editor(s): Bernd Kaspers, Karel A. Schat, Thomas W. Göbel, Lonneke Vervelde, Academic Press, Pages 45-69. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128187081000312?via%3Dihub>