

Pécsi Tudományegyetem
Természettudományi kar
Biológia Intézet

37. OTDK Biológia Szekció

Ugyanaz vagy mégsem? A szelvényregeneráció új megközelítésben



Témavezető: Dr. MOLNÁR LÁSZLÓ
tudományos főmunkatárs

Készítette: TÓTH GABRIELLA LAURA
(WQCY8J)
SZAK: Biológia BSc 3. évfolyam

Pécs, 2025

Tartalom

Bevezetés.....	4
A regeneráció megismerésének rövid áttekintése	4
A földigiliszták szelvényregenerációja.....	5
Az idegrendszer szerepe a regenerációban.....	6
Neurohormonok, transzmitterek szerepe a regenerációban	7
A cölómasejtek szerepe a regenerációban	8
A Heat Shock Proteinek (HSP) szerepe a regenerációban	8
Vas-kofaktorok szerepe a regenerációban	9
Célkitűzések:	9
Anyagok és módszerek:	10
1.) Kísérleti állatok.	10
2.) A szelvénycsonkolás módszere	10
3.1. A táplálás hatása a szelvényregeneráció kinetikájára	11
3.2. A cölómasejtek és cölómafolyadék hatása a szelvényregenerációra.....	11
3.3. Exogén bioaktív anyagok hatásainak vizsgálata	11
3.3.1 A GABA hatása a szelvényregeneráció kinetikájára	11
3.3.2 A cölómasejtek bioaktív anyagai	12
3.4 Az eredeti és a regenerálódó szelvények makroszkópos és hisztológiai vizsgálata.....	13
3.6 HSP70 expressziójának qRT-PCR elemzése	14
Statisztikai elemzés:	15
Eredmények.....	16
3.1. A táplálás hatása a szelvényregeneráció kinetikájára	16
3.2. A cölómasejtek és cölómafolyadék szelvényregenerációra ható morfológiai vizsgálata	16
3.3.1. Az exogén GABA hatása a szelvényregeneráció kinetikájára	17
3.3.2. A cölómasejtek bioaktív anyagai.....	18
3.4. A regenerálódó szelvények anatómiai, hisztológiai és hisztokémiai tulajdonságai	21
Nem hem típusú háromértékű vas jelenlétének vizsgálata	21
Nem hem típusú kétértékű vas jelenlétének vizsgálata.....	22
Hem vas jelenlétének vizsgálata	23
Cölómasejtek beszűremkedése a szövetekbe.....	23
Az izomban bekövetkező változások a csonkolást követően	24
Kollagén jelenlétének vizsgálata a regenerátumban	24
Nem hem típusú vas jelenléte az eredeti és regenerált szövetek esetén	26

3.5 HSP70 expressziójának qRT-PCR elemzése	27
Az eredmények megvitatása.....	29
2.1. A szelvényregeneráció kinetikája	29
2.2. A cölómasejtek hatása a szelvényregeneráció kinetikájára	29
3.4. A regenerálódó szelvények anatómiai, hisztológiai és hisztokémiai tulajdonságai	31
3.5 HSP70 expressziójának qRT-PCR elemzése	31
Köszönetnyilvánítás	32
Irodalomjegyzék:.....	32

Bevezetés

A regeneráció megismerésének rövid áttekintése

Az állatok és az emberek sebesülése a sérülés nagyságától függően kisebb-nagyobb mértékben veszélyezteti az egyedek normális életvitelét, esetenként az életben maradását. Már a bőr felszakadása megterhelő az egyedek számára, mert az erek sérülése vérvesztéssel jár együtt, és bekövetkezhet a szövetek mikrobiális fertőzése, ami gyulladásos reakciót, rosszabb esetben a szövetek elhalását idézi elő. A mélyebb szöveti sérülések nyilvánvalóan nagyobb kihívások elé állítják az élőlényeket, amelyek természeti körülmények között végzetessé válhatnak.

A sebek kezelésének igénye egyidős az emberi kultúra kialakulásával és a különböző korokban más-más módszerek alkalmazásával próbálták megoldani a seb elfertőződését, a sérült testrész megmentését. Már az ókori orvosok számára is nyilvánvaló volt, hogy az állatok és az emberek sérülései azonos módszerek alkalmazásával gyógyíthatók. Emiatt keltett nagy feltűnést Abraham Trembley felfedezése a 18. században, hogy a csalánozók polip ételalakja az elvesztett testrészeit újraképi, azaz regenerálja (Galliot 2012). A jelenség számos természetbúvárt ösztönzött arra, hogy hasonló tulajdonságú élőlényeket találjanak és megismerjék a regeneráció anatómiai és élettani hátterét. A 19. század végére több regenerációra képes állatfaj vált ismertté és azt is megállapították, hogy a regenerációs képesség nincs kapcsolatban a filogenetikai fejlettséggel. Jól regeneráló fajok találhatók a csalánozók, laposférgek, gyűrűsférgek, halak és kételtűek között is (Bely, 2006 Egger és mtsai., 2016, Bölük és mtsai., 2022).

A felhalmozott kísérleti eredmények és saját vizsgálatai alapján T. H. Morgan (1901) a regenerációbiológiai kutatások fejlődését meghatározó következtetésekre jutott. Megállapította, hogy az elvesztett testrészek visszaszerzése alapvetően kétféle módon játszódik le. Morfallaxisnak nevezte el azt a folyamatot, amikor a hiányzó testrész pótlását a sérült testrész sejteinek újrendeződése biztosítja és sejtprolifерáció nem, vagy csak minimális mértékben járul hozzá az új szövetek kialakulásához. Ez jellemző az egyszerű testszerveződésű (csupán tucatnyi sejtípussal rendelkező) csalánozók regenerációjára. A bonyolultabb testszerveződésű állatok regenerációja epimorfózissal valósul meg. Az epimorfózis során úgynevezett regenerációs blasztéma alakul ki a sértett testfelszíneken és annak sejtei intenzív osztódással, differenciálódással alakítják ki az új szöveteket, testrészeket. A blasztémában elhelyezkedő sejtek többségét szöveti őssejteként (neoblasztok) azonosította, bár azok eredetét nem tudta megállapítani. Lényeges felismerése volt a regeneráció neurális függése, azaz annak

kimondása, hogy az új szövetek kialakulásához az idegi struktúrák jelenléte nélkülözhetetlen a sértett szövetek közelében.

A 20. század nyolcvanas éveitől végzett regenerációbíológiai kutatások alapvetően igazolták Morgan téziseit és számos vegyületről (neurohormonok, neurotranszmitterek) mutatták ki, hogy nagy valószínűséggel szerepet játszanak a regeneráció szabályozásában. Az elért eredmények alapvetően nem változtatták meg a regeneráció mechanizmusáról alkotott képünket, de a szövettani és citológiai vizsgálatok feltárták, hogy az epimorfózis során kialakuló regenerációs blasztéma különböző eredetű sejtszoptokat tartalmaz. A sértés helyére vándorló szöveti őssejtek mellett nagy számban fordulnak elő dedifferenciálódó szöveti sejtek is, azaz az epimorfózis kezdeti szakasza morfallaxisnak tekinthető (Londono és mtsai 2018).

Az epimorfózissal regenerálódó szervezetek közé tartoznak a laposférgek, gyűrűsférgek, egyes hal és kétlábú fajok. A gyűrűsférgek regenerációjának tanulmányozása jellegzetes testszerveződésük miatt elősegítheti a magasabbrendű szervezetek regenerációjának megértését is. Bár egyszerű testterv jellemzi őket, néhány tulajdonságuk (pl. zárt keringési rendszer, hemoglobin tartalmú vér, sejt és humorális immunválaszra képesek) inkább a gerincesekhez áll közelebb, mint a gerinctelenekhez. Testszelvényeikben a központi idegrendszer dúcai és az azokból kiinduló szegmentális idegek helyezkednek el, így a kísérleti körülmények között végrehajtott testcsonkolások után mind a központi idegrendszer, mind a hám, izom, és kötőszövetek regenerációja tanulmányozható.

A földigiliszták szelvényregenerációja

Trembley vizsgálatait után hamarosan felfedezték egyes gyűrűsféreg fajok regenerációs képességét is. Bonnet 1745-ben végzett kísérleteivel megállapította, hogy egyes oligochaeta fajok mind a testvégen, mind a test elején elhelyezkedő szelvényeket képesek visszanzöveszteni (Rota, 2022).

Bonnet követői kimutatták, hogy a földigiliszták túlélhetik nagy mennyiségű szelvény elvesztését, attól függően, hogy hol vágják át a testüket. A nyereg mögötti (posztklitelláris) szelvények csonkolását az elülső testrész túléli és az elvesztett szelvényeket regenerálja, míg a levágott posztklitelláris rész elpusztul (Herlant-Meewis, 1964). Megállapították, hogy a leghatékonyabb szelvényregeneráció akkor valósul meg, ha a csonkolás a testvégi 20-25 szelvényre korlátozódik. Ez magyarázható a földigiliszta fajok megfigyelt öncsonkító (autotómia) tulajdonságával, mert predáció, kellemetlen inger hatására 20-25 szelvényüket választják le. Ez arra utal, hogy a testüknek van egy speciális régiója, aminek feltehetően nagyobb a regenerációs potenciálja (Kociński és mtsai 2016). Az első nyolc, esetleg kilenc

testszelvény regenerációjára is képesek, de az ivarszerveket tartalmazó szelvények sérülése végzetes az állatok számára (Herlant-Meewis, 1964).

Alapvető kérdés szelvényregenerációval kapcsolatban, hogy a folyamat mennyire pontos, mennyire követi a genetikailag meghatározott testterv helyreállítását. A szövettani vizsgálatok eredményei arra utalnak, hogy a regenerált szelvények szerveződése, szövettana megegyezik az eredeti szelvényekével. Bár a közölt adatok alapján nem állapítható meg, hogy a regeneráció melyik szakaszában figyelhető meg az azonos felépítés. A szelvényszám helyreállítását tanulmányozó kutatások eredményei jelentős mértékű szóródást mutatnak. Egyes tanulmányok kevesebb, mások azonos vagy nagyobb számú szelvény regenerálódásáról számoltak be. Ezek arra utalnak, hogy a genetikailag meghatározott testterv helyreállítása jelentős mértékben befolyásolható endogén és exogén tényezőkkel.

Az idegrendszer szerepe a regenerációban

A regeneráció neurális függésének igazolása a kiemelkedő regenerációs képességű hidrák (Cnidaria) és örvényférgék (Platyhelminthes) esetében a kiboncolható idegi struktúrák hiányában direkt módon nem oldható meg. A regeneráció neurális függése reprodukálható módon tanulmányozható a tengeri csillagok karjának regenerációja (Huet, 1975), a kétéltűek végtag regenerációja (Singer, 1952) és az oligochaeta gyűrűsférgék szelvényregenerációja során.

Az idegi struktúrák szerepét a perifériás szövetek regenerációjában Morgan (1901) részletesen tanulmányozta földigiliszták szelvényregenerációja során.

Többben kimutatták, hogy az idegrendszernek szerepe van a regenerációban. Feltételezhető, hogy bármely idegrendszerrel kapcsolatos molekula hatással van a sejtproliferációra vagy sejt differenciálódásra (Fraguas S., 2014). A gyűrűsférgék dúcidegrendszerrel rendelkeznek, amely központi és környéki idegrendszerre bontható. A központi idegrendszer maga az agydúc, illetve a hasdúc-lánc. A hasdúc-láncot szelvényenkénti ganglionok, illetve a ganglionokat összekötő konnektívumok alkotják. A környéki idegrendszer a dúcokból kilépő szegmentális idegekből a bőrízomtömlőben található érzékszervekből és a bélplexusból épül fel (Jamieson, 1981). Feltételezték, hogy az ép idegrendszerből kiáramló szabályozó faktorok indítják el a regenerációs blasztómában található sejtek differenciálódási folyamatait (Herlant-Meewis 1964). Ezek alapján feltételezhető, hogy valójában nem feltétlenül az ideg jelenlétére van szükség, hanem egy anyagra, amit a még nem beidegzett rész máshogy juttat el a regenerálódó régióba. Szintén vizsgálták, hogy a sejtproliferáció a sértett ganglion környezetében játszódik le (Müller és mtsai. 2003). Emellett Morgan megvizsgálta, hogy az emésztőrendszer jelenléte és hiánya milyen hatást fejt ki a giliszta regenerációjára, és azt találta, hogy emésztőrendszer

nélkül is tud új fejet vagy testvéget regenerálni a giliszta, azonban nem tudja teljesen kialakítani stomodoeumot, illetve arra is rájött, hogy a csonkolt idegrendszer a központja az új regenerálódó résznek.

Neurohormonok, transzmitterek szerepe a regenerációban

Az idegrendszer és az endokrinrendszer között kapcsolatot képeznek a neuroszekréción neuronok (Scharrer, 1967). Agyirtást követően az *Allolobophora morelli* faj esetében megfigyelték, hogy nem, vagy csak nagyon csekély mennyiségben történik regeneráció, ami azt jelentheti, hogy szükség van az agyból egy stimuláló faktorra, amely a nyelőcső alatti ganglionok neuroszekréción sejteiből felszabadít egy a regenerációhoz szükséges faktort. Fiatal egyedek esetén agyirtást követően csökkent a poszterior régióban regenerált szelvényszám, míg ivarérett egyedek esetén az agyirtást követően több szelvényt regenerált a giliszta, ami azt jelenti, hogy fiatal korban az agydúc regenerációt serkentő faktort szabadít fel, míg ivarérett egyedekben valamilyen gátló faktort (Alonso-Bedate és Sequeros, 1985). Morgan megelőlegezte, hogy bizonyos idegi tényezők, ilyenek például a neurotranszmitterek, illetve neurohormonok szükségesek a regenerációs blasztéma kialakításához, amelyekből majd az új szegmensek jönnek létre (1989). Az *Eisenia fetida* faj központi idegrendszerében neuroszekréción sejteket azonosítottak (Scharrer és Brown, 1962). Fiatal állatok és ivarérett állatok esetén különböző eredményt kaptak a hormonális hatás vizsgálatakor. Kimutatták, hogy amikor a szövetet valamilyen károsodás éri az idegrendszer növekedési faktorokat és hormonokat szabadít fel. A hormonok, illetve növekedési faktorok a sértés helyén keletkező blasztémában sejtprolifерációt indítanak el (Herlant- Meewis, 1964). Korábban a planáriák esetében kimutatták, hogy a neurotranszmitterek, neurohormonok és növekedési faktorok hatással vannak a regenerációra (Franquinet és Martelly, 1981). A *Platynereis dumerilii* faj esetében a regenerációs potenciál csökkentebb, mint a földigiliszta esetében, ennél a fajnál a posterior regeneráció a juvenilis korban játszódik csak le, mivel ekkor egy agyban termelődő hormon elősegíti a regenerációt, viszont a szexuális érést követően már nem tud lejátszódni, mert az agyban lecsökken vagy egyáltalán nem termelődik a regenerációhoz szükséges hormon (Álvarez-Campos és mtsai., 2022). Agyirtott földigilisztákban szerotonin és dopamin immunreaktív neuronok figyelhetőek meg a regeneráció korai fázisában, majd folyamatosan növekszik ezek száma a regeneráció előrehaladásával (Csoknya és mtsai., 2003). Megvizsgálták, hogy a szerotonnának szerepe lehet az axonvezetésben és az elágazások kialakításában olyan módon, hogy helyi reakciókat indukál a kiterjedt idegsejtekben (Koert és mtsai., 2001). Ez utal arra, hogy neurotranszmitterek szerepet játszhatnak a regeneráció

lejátszódásában. A *Lumbricus terrestris* faj esetében több szerotonin tartalmú axont is találtak, illetve rostokat. HPLC-s mérések igazolták, hogy a szerotonin lecsökken regeneráció során az ép ganglionban, majd a 17. naptól az eredeti szerotonin tartalom figyelhető meg, ez alátámasztja a feltevést, hogy a szerotoninnak szerepe van az idegrendszer regenerációja során (Csoknya, 1993). A neurotranszmitterek közül a gamma-aminovajsav (GABA)-nak szerepe van a progenitor sejtek proliferációjának szabályozásában (Braun és Jessberger, 2014), ez zebrahál retina regenerációja során is megfigyelhető (Rao, és mtsai., 2017), emellett megfigyelték, hogy az exogén GABA alkalmazása csonkolt anterior régióval rendelkező *Eisenia fetida* egyedeken felgyorsította a garat neuronjainak proliferációját (Csoknya, 2002), illetve rákos sejtek esetén is szerepet játszik a proliferáció szabályozásában (Wang és mtsai., 2006).

A cölómasejtek szerepe a regenerációban

Az immunrendszer fejlettsége és működése szorosan összefügg a regenerációs képességgel, mivel minél fejlettebb az immunrendszer annál csekélyebb mértékű regeneráció valósul meg (Julier és mtsai., 2017). A cölómafolyadék és a cölómasejtek az immunrendszer fontos részét képezik, antimikrobiális proteinek (AMP) és citokineket tartalmaznak (Mácsik és mtsai., 2015). A cölóma lektin jellegű glikoproteinjei a szénhidrátokhoz kötődve elősegítik az idegen anyagok felismerését, majd agglutinációval, illetve lízissel azok degradációját idézik elő (Kauschke és mtsai., 2007). A bőrizomtömlő sérülése cölómasejtek számának intenzív növekedését és az agglutininek, lizinek és proteázok aktivitásának emelkedését váltja ki (Eue, 1998).

A cölómasejtek jelentős mennyiségű tartalék tápanyagot (glikogén és lipidek) tartalmaznak, amelyeket a perifériás szövetekbe szállítanak (Liebmann, 1942). Laboratóriumi vizsgálatok szerint a cölómasejtek mennyiségének csökkentése szignifikáns módon lelassította, néha megakadályozta a szelvényregeneráció folyamatát (Liebmann, 1943). Újabb adatok arra utalnak, hogy a cölómasejtek riboflavin tartalma elősegíti az idegszövet regenerációját (Molnár és mtsai 2015).

Eisenia foetida-ból kivont cölómafolyadék bioaktív anyagai az emlős szövetekre is hatnak., és gyorsítják a sebgyógyulás folyamatát. (Singh és mtsai, 2015).

A Heat Shock Proteinek (HSP) szerepe a regenerációban

A HSP-k szerepet játszanak a sejtciklus szabályozásában (Moseley, 1998) és az apoptózis gátlásában (Gordon és mtsai., 1997). A HSP70-ek felszabadítása egyfajta veszélyjelzésként is szolgálhat, amivel az adaptív és veleszületett immunrendszer aktiválható (Oki és Younes,

2004). A regeneráció során kialakuló blasztémában intenzív sejtproliferáció és differenciálódás játszódik le. A sejtproliferáció során sejtciklus szabályozás történik, ezért feltételezhető, hogy a HSP70-es család részt vesz a regenerációban is, amit kimutattak axolotl végtag regeneráció során (Lévesque és mtsai., 2005)

Vas-kofaktorok szerepe a regenerációban

Az eukarióta sejtekben Fe-S klaszterek, hem-kötő fehérjék és a ribonukleotid-reduktázok nagy mennyiségben találhatóak (Dlouhy and Outten, 2013), amelyek szerepet játszanak sejtciklus során az RNS szintézis, fehérjeszintézisben, a DNS szintézisben és javításban (Zhang, 2014), a metabolikus változásokban és a mitózis előkészítésében. Emellett a G1/ S és az S/G2-es sejtciklus ellenőrző pontokon is jelentős funkcióval rendelkeznek, az átmenetekhez szükségesek. Vas kofaktorok hiánya bizonyos esetekben megakadályozza a sejt G2-es fázisból M fázisba lépését, illetve túl magas jelenléte leállíthatja a sejtnek a G1-es fázisból a kilépését (Khan és mtsai. 2020). A vas kofaktorok alapvetően nélkülözhetetlenek a sejtosztódás lejátszódásához és annak ellenére, hogy a regeneráció során intenzív sejtosztódás figyelhető meg, ezeknek a szerepét nem vizsgálták.

Célkitűzések:

Az *E. andrei* a regenerációbiológiai és összehasonlító immunbiológiai kutatások kedvelt modellállatai, mivel tartásuk, szaporításuk könnyű, egyszerű anatómiai felépítés jellemzi és könnyen manipulálhatóak. Emellett olyan kísérleti állat, amelynél megfigyelhető epimorfikus regeneráció, azonban a regenerációs képesség korlátozott. A korábbi irodalmi adatok alapján megállapítható, hogy nincs egyértelmű bizonyíték, hogy az idegrendszer szerepet játszik a regeneráció folyamatában, illetve arról sincs, hogy milyen anyagok játszanak szerepet a regenerációban.

Célunk meghatározni, hogy az újraképzett szelvényekben a szövetek differenciálódása hasonló-e a sebgyógyulás során megfigyelhető folyamatokhoz.

A gerincesek esetében megfigyelt sebgyógyulás közbeni kollagén lerakódáshoz hasonlóan van-e a regenerációs során kollagén lerakódás és azt követő szöveti átrendeződés. Célunk meghatározni, hogy az eredeti szelvényekkel azonos anatómiai, szövettani szerveződés jellemzi-e a regenerált szelvényeket, illetve a regenerálódó szelvényekben felhalmozódó cölómasejtek a regeneráció melyik fázisában és milyen faktorokkal vesznek részt.

Fontosnak tartottuk meghatározni, hogy a gyors sejtosztódási és sejt differenciálási folyamatokkal jellemezhető regenerátumban kimutatható-e a hem vas és nem hem vas vegyületek felhalmozódása.

Mivel a HSP70-et regenerációs folyamatok irányításában való szerepét más modellállatok esetén kimutatták, ezért célunk volt az oligochaeta regenerációs folyamatokban való szerepének a meghatározása.

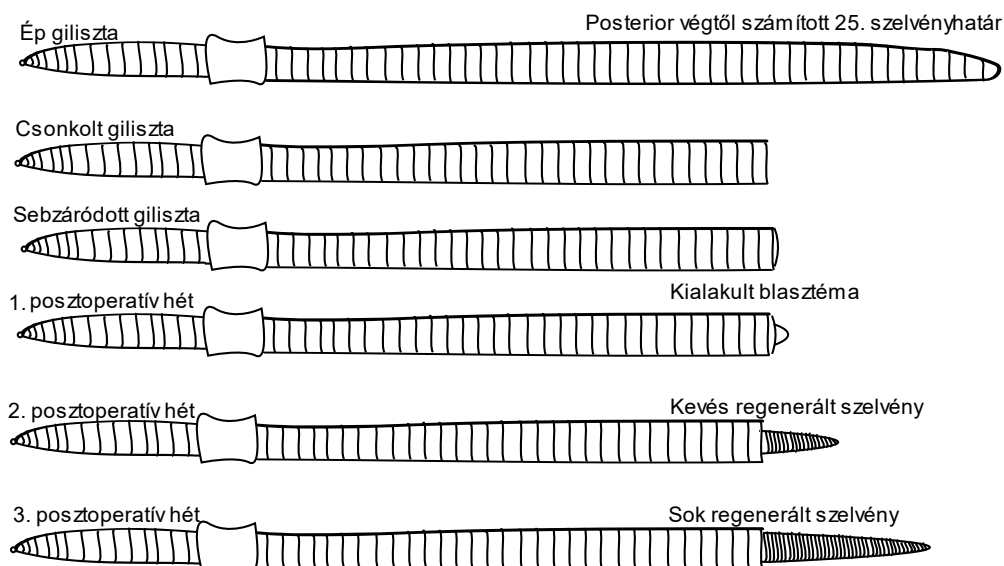
Anyagok és módszerek:

1.) Kísérleti állatok.

Kísérleteinkhez a laboratóriumi körülmények között tartott *Eisenia andrei* (Annelida, Clitellata, Lumbricidae) törzstenyészetek egyedeit használtuk. A törzstenyészetek talaja virágföld (ph 6,5), tőzegmoha és kvarchomok 6:3:1 súlyarányú keverékéből állt, amelyhez kilogrammonként 1 gramm kalcium karbonátot kevertünk. A talajt csapvízzel nedvesítettük, az állatokat ad libitum csapvízben áztatott lucerna granulátummal tápláltuk. A kísérletekhez kigyűjtött egészséges állatokat a bél kiürítése céljából három napig csapvízzel nedvesített papírvattán tartottuk. A kísérletekhez csoportonként 10-15 darab 35-40 mg tömegű, ivarérett (nyereggel rendelkező), vagy az ivarérettséghez közel álló (fejlett serdülési dudorral rendelkező) egyedet használtunk fel. A szelvényregeneráció kinetikájának vizsgálata.

2.) A szelvénycsonkolás módszere

A szelvényregeneráció kinetikáját sztenderd testcsonkolás alkalmazásával tanulmányoztuk, különböző kísérleti körülmények között. A lehűtött szóдавízzel elbódított egyedek testvégeinek utolsó 25 szelvényét akkor távolítottuk el (1. ábra), amikor azok menekülési reflexét mechanikai ingerléssel nem lehetett kiváltani. A csonkolt egyedeket csapvízzel nedvesített papírvattán tartottuk 24 órán át, majd sztereomikroszkóppal ellenőriztük az állapotukat és csak kifogástalan állapotú (befűződő, vagy bevérzett szelvényekkel nem rendelkező) állatokat használtuk további vizsgálatainkhoz. A regenerált szelvények számát a 2. és harmadik posztoperatív héten határoztuk meg, amikor a szelvényhatárok egyértelműen azonosíthatók voltak.



1. ábra: A standard csonkolás és regeneráció folyamatának sematikus ábrázolása

3.1. A táplálás hatása a szelvényregeneráció kinetikájára

Az állatokat két csoportra osztottuk. Az egyik csoportot a csonkolást követően szárított lucernát tartalmazó táptalajra helyeztük, míg a másik csoportot csapvízzel nedvesített szűrőpapírra. A táptalaj és a szűrőpapír nedvességét naponta ellenőriztük.

3.2. A cölómasejtek és cölómafolyadék hatása a szelvényregenerációra

A kísérlet során 4 csoporttal dolgoztunk, az egyedekből az előzőleg ismertetett eljárással különböző időpontokban vontuk ki a cölómasejteket. Az 1. csoport esetén a csonkolást megelőzően történt a kivonás, a 2. csoport esetén 3 nappal a csonkolást követően, a 3. csoport esetén 7 nappal a csonkolást követően, míg a 4. csoport esetén 2 héttel a csonkolást követően. Az állatok minden esetben nedvesített szűrőpapíron tartottuk.

3.3. Exogén bioaktív anyagok hatásainak vizsgálata

3.3.1 A GABA hatása a szelvényregeneráció kinetikájára

Az exogén GABA hatását két módon vizsgáltuk. Az egyik során az csonkolt egyedeket 5ml 100mM-os GABA oldatba áztattuk, amikor az egyedek a sebfelszínen keresztül tudták felvenni a GABA-t. A másik esetben 10mM-os GABA oldatot injektáltunk be a csonkolt egyedek utolsó 3 szelvényébe a posztoperatív 24. órában, tehát a testben található szöveti sejteken keresztül tudták felvenni.

A GABA oldat sebfelszínen keresztüli vizsgálata során négy csoporttal dolgoztunk. Az 1. csoport egyedeit a csonkolás után azonnal alkalmaztuk a GABA oldatba áztatást 1 órán át, majd

nedves szűrőpapírra helyeztük. A 2. csoport egyedei a csonkolást követően 1 órán keresztül giliszta ringerrel borítottuk el, majd nedves szűrőpapírra kerültek. A 3. és 4. csoport csonkolást követően nedves szűrőpapírra került, majd 24 órával a csonkolást követően a 3. csoport egyedeit 5 ml 100mM-os GABA oldatba áztattuk 1 órán keresztül, míg a 4. csoport egyedeit giliszta ringer folyadékba áztattunk 1 órán keresztül, majd az áztatást követően mindkét csoportot nedves szűrőpapírra helyeztük. A kísérleti állatok állapotát naponta ellenőritük, a szűrőpapírt rendszeresen cseréljük.

A másik esetben a teljes sebzáródás elérését követően a posterior régiótól számított 3. szelvénynél fecskendővel 0,01ml fiziológias sóoldatot a kontroll csoport esetében, míg 10mM-os GABA oldatot a kísérleti csoport esetében fecskendeztünk. A csonkolást követően 2, illetve 3 hét elteltével leszámoljuk a regenerált szelvények számát és statisztikai elemzést végzünk.

3.3.2 A cölómasejtek bioaktív anyagai

A kontroll állatokból izolált cölómasejtekben immunfestéssel, illetve tömegspektrometriával GABA és szerotonin bioaktív anyagokat mutattunk ki.

- immunhisztokémia

A cölómasejt keneteket 4%-os PFA-val fixáltuk, majd az immunhisztokémiai protokolloknak megfelelően poliklonális anti-GABA (Sigma Co.) vagy monoklonális anti-szerotonin (Dako Co.) primér antitestekkel kezeltük azokat. A specifikusan kötött antitestek lokalizációját fluorescens molekulával jelölt másodlagos antitest alkalmazásával vizualizáltuk, majd a preparátumokat fluorescens mikroszkóppal vizsgáltuk.

- tömegspektrometria

A kivont cölómafolyadékot eppendorfba pipettáztuk. Az eppendorfokat 2 percen keresztül centrifugáltuk 3000-es fordulaton. A felülúszót másik eppendorfba pipettáztuk át. A sejttörmelék és felülúszós eppendorfokat fagyasztozóba helyeztük. A minták előkészítése analitikai vizsgálatokra, és a HPLC-MS analízis végrehajtása A cölómasejtek GABA és szerotonin tartalmát egy korábbi protokoll alapján mértük. A mintáinkat TissueLyser LT (QIAGEN) segítségével homogenizáltuk 0,5 ml acetonitrilben, amely 0,1% hangyasavat, 0,01 m/v% ditiotreitolt és dopamin-1,1,2,2,2-d₄- hidrokloridot (#73483; Sigma-Aldrich) belső standardot tartalmazott 100 ng/ml végső 9 koncentrációban. Ezt követően a mintáinkat ultraszonációval tovább extraháltuk. Centrifugálás után (16 000×g 5 percig 4 °C-on) a felülúszókat új csövekbe helyeztük, és nitrogéngáz-áramlással (35 °C, 0,5 bar) szárazra pároltuk. Végül a mintáinkat 150 µl ultratiszta vízzel, amely 0,1% hangyasavat és 10 mM ammónium-formiátot tartalmazott, vortex-keveréssel és ultraszonizálással indukáltuk újra. A

kromatográfiás elemzést egy Agilent UPLC rendszeren végeztük, amely egy 1100 bináris szivattyút, egy 1260 autosamplert és egy 1200 DAD detektormodult tartalmazott (Agilent Technologies Inc, Santa Clara, Kalifornia, USA), és HyStar 3.2 szoftverrel működött. Az elválasztásokhoz gradiens elúciót végeztünk egy Phenomenex Kinetex Polar C18 fordított fázisú oszlopon (50x4,6 mm, 2,6 μ m). Az áramlási sebesség 200 μ l/perc volt, az injektálási térfogat pedig 5 μ l. A 0,1% hangyasavat és 10 mM ammónium-formiátot tartalmazó, nagy tisztaságú LC-MS vizet használtuk gyenge mobilfázisként (A eluens) és az 5% LC-MS vizet, 0,1% hangyasavat és 10 mM ammónium-formiátot tartalmazó LC-MS minőségű acetonitrilt használtuk erős oldószerként (B eluens). Az első 2 perc izokratikus periódus volt, a keverési arány 97%:3% A:B eluens volt. Az eluens összetételét a következő 4 percben 60% B-re változtattuk, majd további 4 percre állandó értéken tartottuk. Ezután az eluens B-tartalmát 1 perc alatt 100 %-ra növeltük, majd 4 percre állandó értéken tartottuk. Végül az oszlopot 1 perces lineáris gradiens és 3 perces izokratikus periódus mellett a kezdeti feltételekhez egyensúlyba hoztuk. A GABA-t egy ESI ionforrással felszerelt Bruker amaZon SL ioncsapdás tömegspektrométerrel (Bruker Daltonik GmbH, Bréma, Németország) detektáltuk, amelyet a trapContorl 8.0 szoftverrel üzemeltettünk. A szárítógáz (N₂) áramlási sebességét 10 L/min-re állítottuk be, hőmérséklete pedig 350 °C volt. A kapilláris feszültsége 4500 V volt, a porlasztógáz nyomása pedig 2,75 bar. A tömegdetektálást pozitív ion üzemmódban végeztük. Az analitok szelektív és érzékeny kimutatására és mennyiségi meghatározására 0,4 m/z-es elkülönítési ablakkal az alapion-szkennelési (single ion monitoring) és a fragmentation-szkennelési (MS/MS) üzemmódok szűrőit használtuk. Az elemzéshez a legintenzívebb prekursor-fragmentum átmeneteket használtuk. Az adatok kiértékelése és elemzése a Bruker Compass DataAnalysis 4.4 SR1 moduljával történt. A mennyiségi elemzéshez hárompontos kalibrációs görbéket készítettünk 1,0, 10,0 és 100,0 μ g/ml GABA és szerotonin standardok (#1020023, Sigma-Aldrich) felhasználásával. A korrelációs együtthatók (r^2) 0,97 és 0,99 között voltak minden elfogadható kalibrációs görbe esetében, mind a szülőionok letapogatása (MS), mind a fragmentationok letapogatása (MS/MS) módban (nem látható)

3.4 Az eredeti és a regenerálódó szelvények makroszkópos és hisztológiai vizsgálata

- Totálpreparátum készítése:

A preparátumokat minden esetben a következő módon készítettük el: az állatokat CO₂-vel dúsított vízben elkábítottuk, majd a háti oldalon felnyitottuk. A totálpreparátumok elkészítésekor készült olyan, amelyeknél a belet preparáltuk, illetve olyan, ahol a bél kivételét

követően a hasdúcláncot fixáltuk le. A fixálást 4%-os paraformaldehiddel (PFA) hajtottuk végre. A preparátumokat a posztoperatív 5. héten készítettük el.

- **Metszet készítése:**

Kontroll csoport esetén az egyedek poszterior régiójától leszámoltunk 5 szelvényt, majd csonkoltuk és a testvéget fixáltuk le. A kísérleti állatok esetén a kísérlet lejártaival a regenerátumot megelőző 4. szelvény határon csonkoltuk az állatot és a regenerátumot fixáltuk. Csonkolást követően a testvéget minden esetben széndioxiddal dúsított vízben tartottuk a teljes elernyedés elérése érdekében. A mintákat 4%-os paraformaldehiddel (PFA), vagy ecetsavas fixálóval (7ml 35%-os formalin, 1ml cc. ecetsav, 17ml desztillált víz) fixáltuk, majd azokból vagy paraffin, vagy kriosztát metszeteket készítettünk.

A szokványos szövettani vizsgálatokhoz, illetve a hisztokémiai vizsgálatokhoz egy mikrotechnikai kézikönyben (Molnár és Gábel 2001) megtalálható alábbi protokollokat alkalmaztuk:

- Hematoxin-eozin festés
- Van Gieson reakció a kollagén kimutatására
- Perls reakció a háromértékű vas kofaktorok kimutatására. A totálpreparátumokat a berlinikék csapadék kialakulásáig festettük meg a metszeteket DAB és CoCl_2 kezeléssel intenzifikáltuk.
- Turnbull reakció a kétértékű vas kofaktorok kimutatására
- Pszeudoperoxidáz reakció a hemoglobin kimutatására

A preparátumokat Zeiss fény- és fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk.

3.6 HSP70 expressziójának qRT-PCR elemzése

Hogy vizsgáljuk a HSP70 gén expresszióját, a kontroll, kísérleti, és regenerált állatokból kiperaráltuk a hasdúcláncot (45db), a középbelet (45db) és a bőrízomtömlőt (25db), majd a mintákat szövetenként „pool”-oztuk. Az idegrendszer és bél mintákat 600 µl TRI reagensben (#93289, Sigma-Aldrich) homogenizáltuk TissueLyser LT (Qiagen) készülékkel. A bőrízomtömlő mintákat folyékony nitrogénben, sterilizett dörzsmozsárban elporítottuk, majd 600 µl TRI reagensben tovább homogenizáltuk.

Az RNS-t a Direct-zol™ RNA MiniPrep kit (#R2050, Zymo Research) segítségével izoláltuk. A minták RNS tartalmát a NanoDrop One UV-Vis Spectrophotometer készülék (#ND-ONE-W, Thermo Fisher Scientific) használatával kvantifikáltuk. A reverz transzkripciót a RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit-el (#K1631, Thermo Fisher Scientific)

csináltuk, minden minta esetében random hexamer primereket és 200 ng kiindulási RNS mennyiséget használva.

A HSP70 mRNS expresszió szint kvantifikálására a mintákban, qRT-PCR-t használtunk. Mindegyik PCR reakcióelegy 20 μ L volt, ami 10 μ L 2x SYBR Green PCR Master Mix-et (#208252, Qiagen), 6 μ L nukleázoktól mentes vizet, 2 μ L cDNS mintát (20 ng) és 1-1 μ L primert (500 nM végső koncentráció) tartalmazott. Endogén kontroll génnek β -katenint használtunk.

Az alkalmazott primerek szekvenciája a következő volt (Integrated DNA Technologies, Belgium):

HSP70 forward primer - 5'- AGC CGA CAC GTT CAT GAT GC - 3'

HSP70 reverse primer - 5'- TGC AGG ACT TCT TCA ACG GA - 3'

β -katenin forward primer - 5'- ATT TCA TCC AGG CCG TGC TT - 3'

β -katenin reverse primer - 5'- TTG AGC AGT GGC TAT GTC CGT - 3'

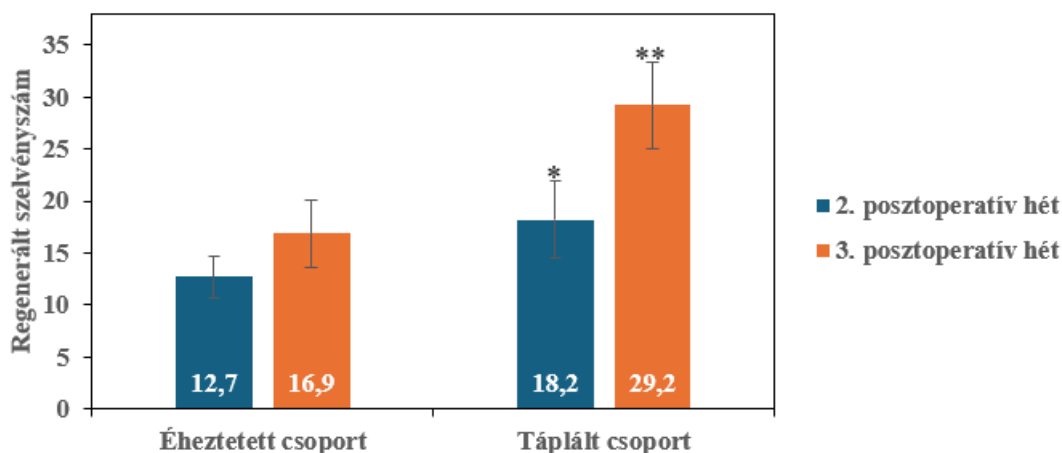
Minden reakcióelegyet egy 96-lyukú mikrolemezben készítettünk el, 2 ismétlést végezve. A PCR reakciókat QIAquant 96 2plex készülékkel (Qiagen) végeztük a következő kondíciókkal: 50 °C 2 percig („Hold 1”), 95 °C 2 percig („Hold 2”), majd 40 ciklusban 95 °C 15 másodpercig és 60 °C 1 percig („Cycling”). A mérés végén olvadási görbe analízist végeztünk (0.3 fokként 60-95 °C között), hogy ellenőrizzük a PCR termékek specifitását. A Ct értékeket a Q-Rex szoftver (v. 2.0, Qiagen) használatával határoztuk meg. A HSP70 relatív mRNS expresszióját $2^{-\Delta\Delta C_t}$ módszerrel számoltuk és hasonlítottuk össze a kísérleti csoportok között.

Statisztikai elemzés:

Az adatokat minden esetben statisztikailag elemeztük, először F próbával megvizsgáltuk, hogy a szórások azonosak-e, majd mivel minden esetben azonosak voltak Student T próbával végeztük a számításokat.

Eredmények

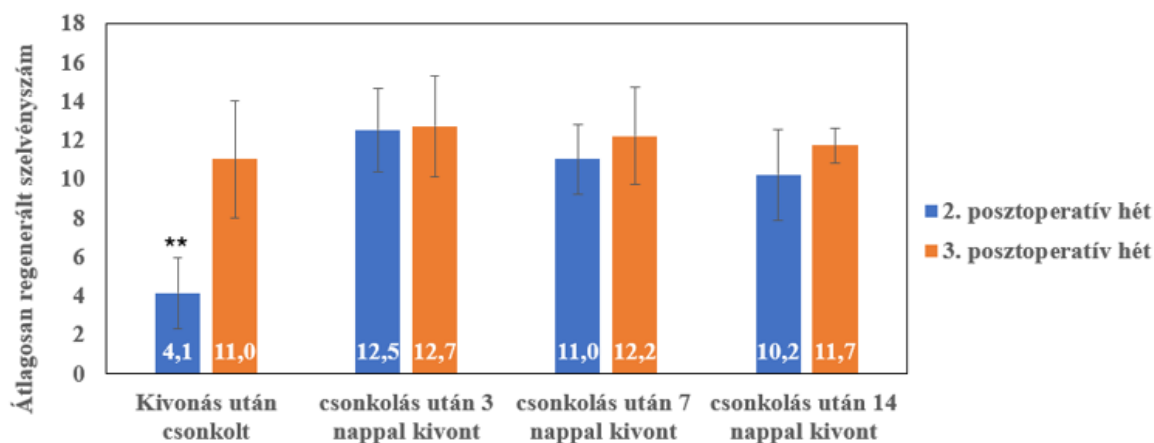
3.1. A táplálás hatása a szelvényregeneráció kinetikájára



2. ábra: A éheztetett és táplált egyedek szelvényregenerációjának kinetikája . $n=15$

Az éheztetés nem akadályozta meg, csak jelentősen lassította a szelvényregenerációt (2. ábra). Megfigyelhető, hogy az éheztetett és a táplált egyedek regenerált szelvény száma között annál nagyobb különbség alakul ki minél több idő telt el a csonkolás után.

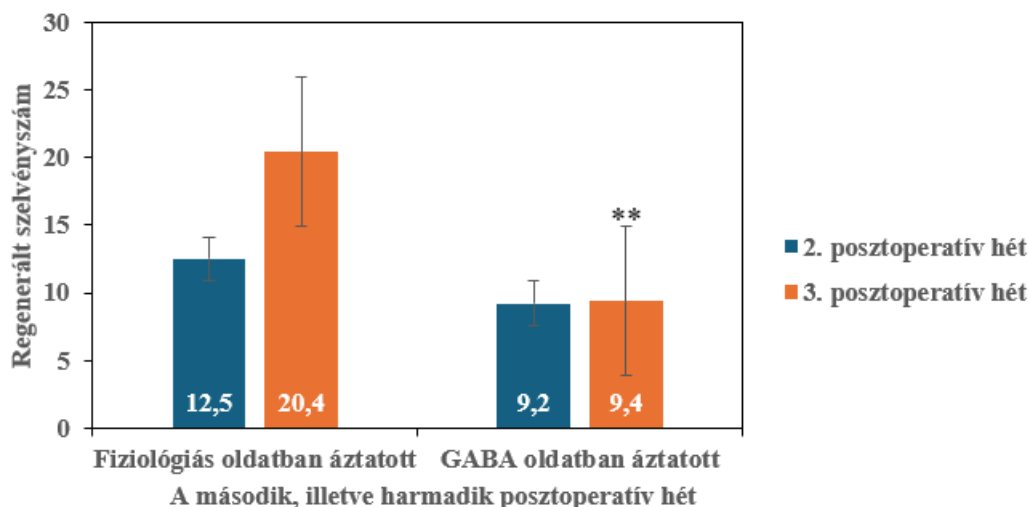
3.2. A cölómasejtek és cölómafolyadék szelvényregenerációra ható morfológiai vizsgálata



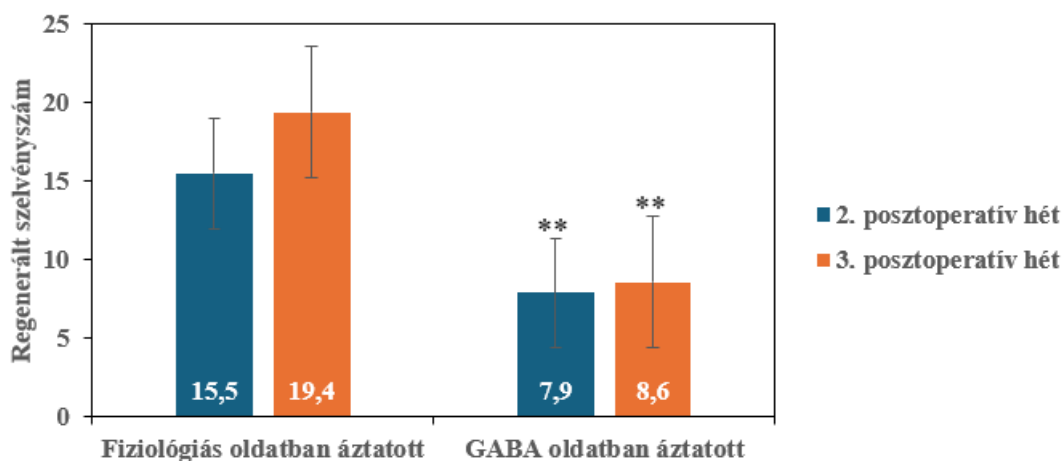
3. ábra: A cölómasejt-kivonás hatása a szelvényregeneráció kinetikájára. $n=10$

Megállapítottuk, hogy a cölómasejtek és cölómafolyadék kivonása gátolta az új szelvények képződését, de a gátlás hatékonyságát a kivonás időpontja jelentős mértékben befolyásolta (3. ábra). A csonkolás előtti extrakció gátolta a leghatékonyabban a szelvényregenerációt, bár a 3. posztoperatív héten már a többi csoportra jellemző szelvény számot regeneráltak az egyedek. A csonkolások után alkalmazott cölóma kivonások következményei közel azonos mértékűek voltak.

3.3.1. Az exogén GABA hatása a szelvényregeneráció kinetikájára



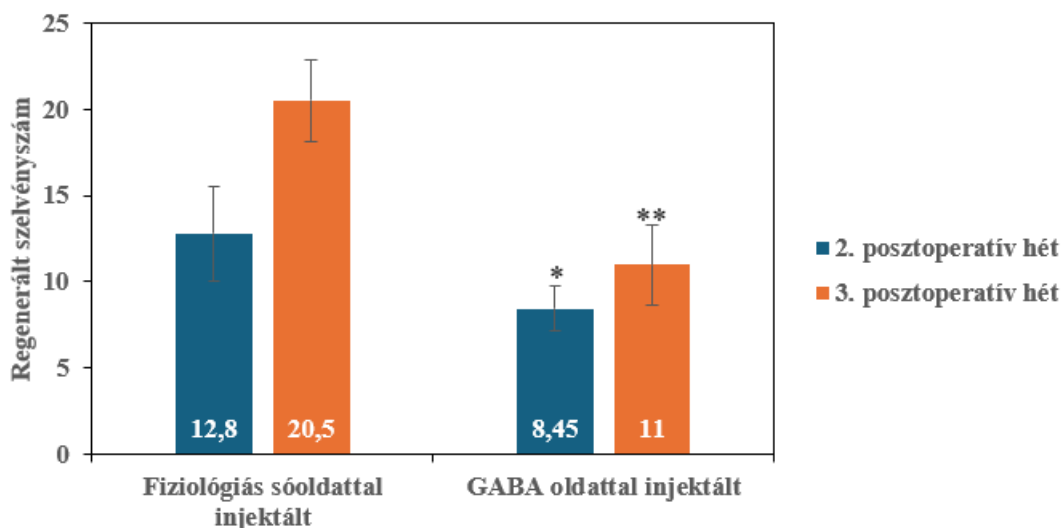
4. ábra: A csonkolás után azonnal fiziológiás oldatban ($n=15$) és 100 mM GABA oldatban ($n=15$) áztatott egyedek regenerált szelvényszámának összehasonlítása ($n=15$).



5. ábra: A csonkolást követően 24 órával 100mM-os GABA oldat használatának hatása a regenerált szelvényszámra fiziológiás sóoldattal kezelt egyedek regenerált szelvényszámával összehasonlítva. $n=6$ adat/csoport (6 ismétlés, $n=10$ állat/ ismétlés)

A csonkolást követően azonnal és 24 órával áztatott egyedek esetén is azt tapasztaltuk, hogy a GABA hatására kevesebb szelvényt regeneráltak az egyedek, mint azok, amelyek fiziológiás sóoldatban áztak. Az is megfigyelhető, hogy mindkét esetben (4. és 5. ábrán is) a GABA oldatnak kitett állatok a második hétre szinte elérték a végleges regenerált szelvényszámot, míg a kontroll csoport egyedei a 2. hétről a 3. hétre még több szelvényt voltak képesek regenerálni. A statisztikai elemzés alapján azt találtuk, hogy 99%-os konfidencia szinten a GABA oldatba

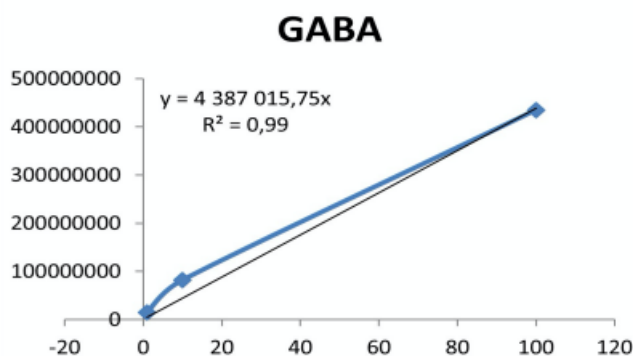
áztatott egyedek kevesebb szelvényt regeneráltak az azonnal áztatott (4. ábra), illetve a 24 órával a csonkolást követően áztatott (5. ábra) esetén is. Nem találtunk szignifikáns különbséget az azonnal és 24 órával GABA oldatba áztatott egyedek között, tehát nem befolyásolja a regenerált szelvények számát, hogy GABA oldatnak a csonkolást követően azonnal vagy 24 órával tesszük ki.



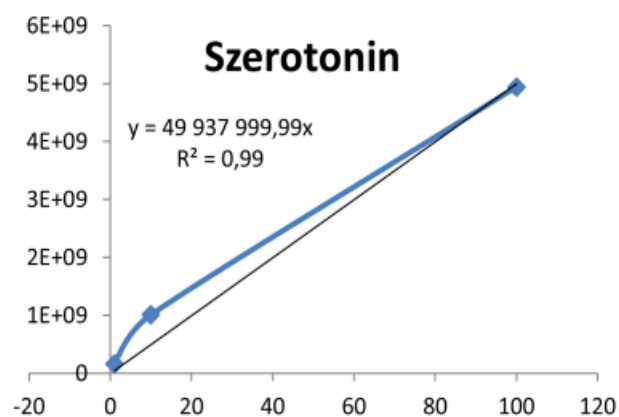
6. ábra: A csonkolást követően 24 órával 10mM-os GABA oldat poszterior régiójába történő beinjektálásnak a hatása a regenerált szelvényszámra fiziológias sóoldattal beinjektált egyedek regenerált szelvényszámával összehasonlítva. $n=15$

Megvizsgáltuk, hogy okoz-e szignifikáns különbséget, hogyha az egyedeket a csonkolást követően nem GABA oldatba áztatjuk, hanem a GABA, illetve fiziológias sóoldatot beinjektálunk az utolsó 3 szelvénybe (6. ábra). Megfigyeltük, hogy a két esetben a GABA csökkenti a regenerált szelvények számát. Nincs szignifikáns különbség az áztatott és beinjektált egyedek regenerált szelvényeinek száma között.

3.3.2. A cölómasejtek bioaktív anyagai

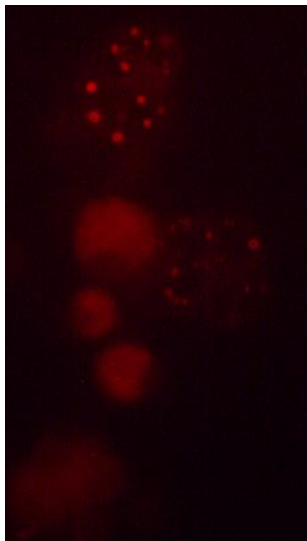
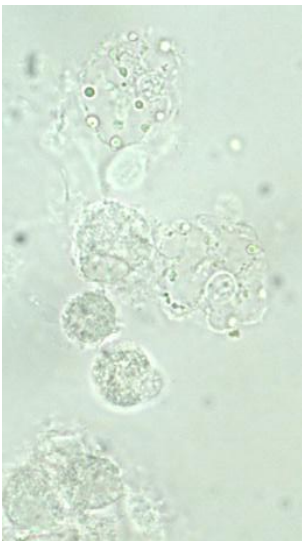
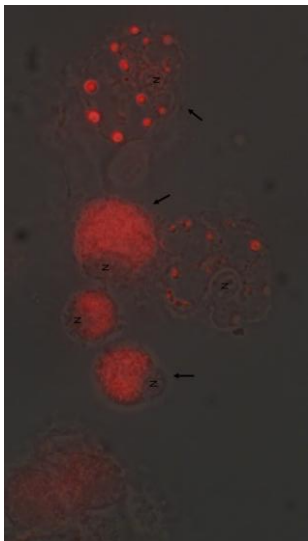


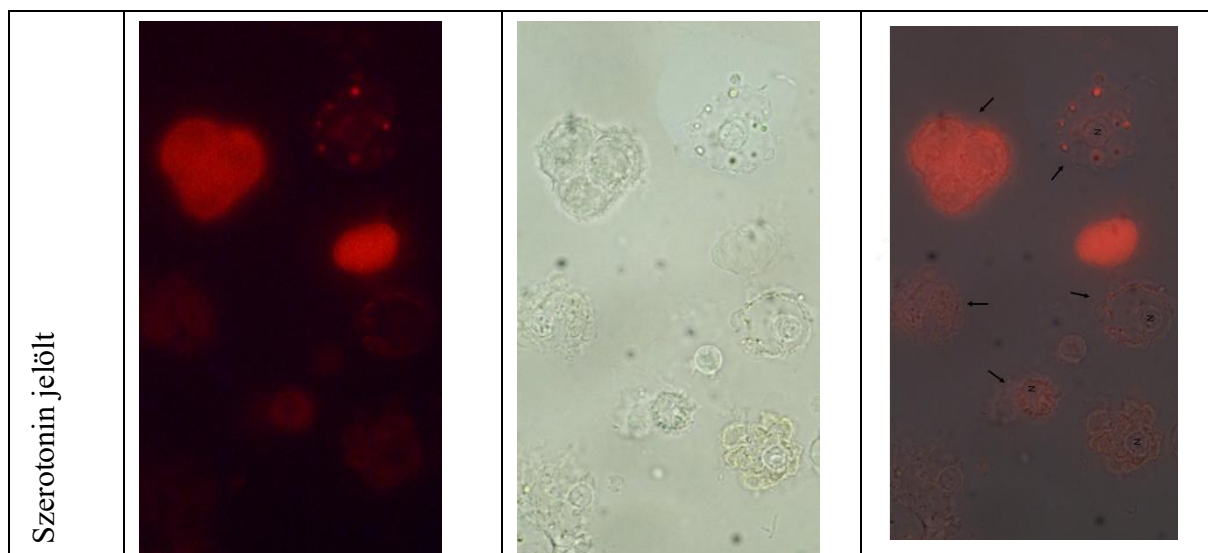
7. Ábra: A mért GABA kalibrációs görbéje (HPLC-MS)



8. Ábra: A mért szerotonin kalibrációs görbéje (HPLC-MS)

A HPLC-MS mérések szerint a cölómasejtek bioaktív molekulákat (GABA, szerotonin) tartalmaznak. A bioaktív molekulák koncentrációinak meghatározásához analitikai minőségű sztenderdek alkalmazásával szerkesztett kalibrációs görbéket használtunk (7. és 8. ábra). A GABA esetén 71 mikrogramm/ gramm sejt, míg a szerotonin esetén 20 mikrogramm/ gramm sejtet mutattunk ki.

	Fluoreszcens	Áteső fényvel	Fúzió
GABA jelölt			



9. ábra Cölómasejtek szerotonin és GABA immunfestéssel jelölve áteső fénnnyel, fluoreszcens fénnnyel vizsgálva.

Rövidítések: N: nucleus, fekete nyíl: amöbocyták, eleocyták

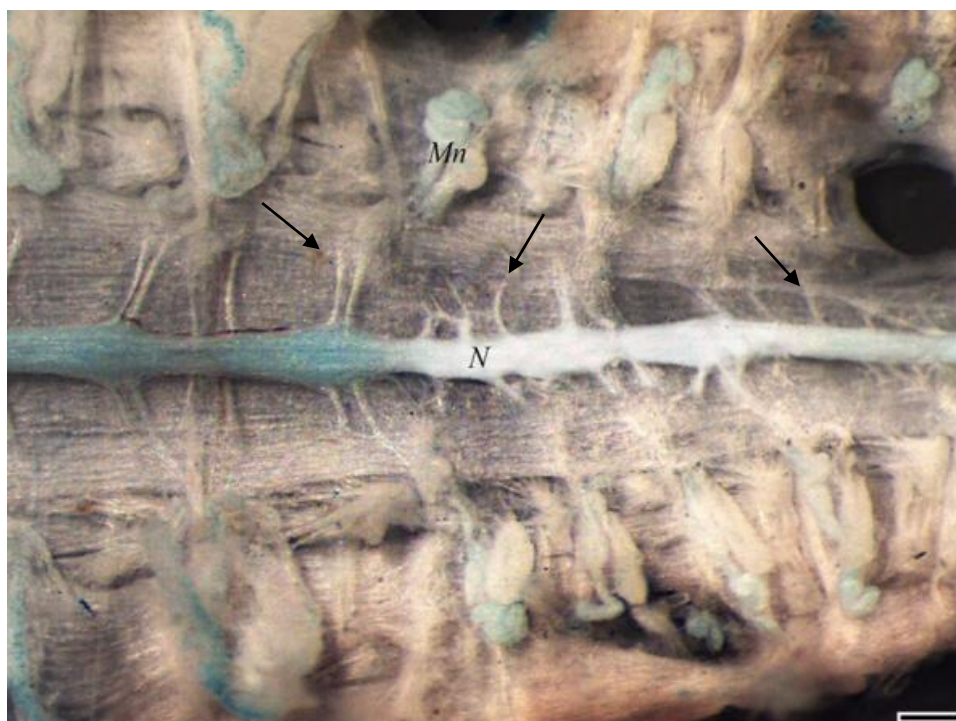
Az 9. ábrán megfigyelhető, hogy minden esetben találhatóak amöbocyták és eleocyták is, amelyek szerotonin, illetve GABA tartalommal rendelkeznek, illetve olyanok is, amelyek nem. Ez alátámasztja a tömegspektrometriás eredményeinket, miszerint a cölómasejtek GABA és szerotonint tartalmaznak.

3.4. A regenerálódó szelvények anatómiai, hisztológiai és hisztokémiai tulajdonságai

Nem hem típusú háromértékű vas jelenlétének vizsgálata



10. ábra: Perl's reakcióval készített totálpreparátum a bélcsatornáról a poszt operatív 4. héten
Rövidítések: gt: bélcsatorna, N: hasdúclánc



11. ábra: Perl's reakcióval készített totálpreparátum a hasdúcláncról a poszt operatív 4.héten.
Rövidítések: N: hasdúclánc, Mn: metanephridium, fekete nyíl: szegmentális ideg

Perls reakcióval vizsgáltuk a nem hem típusú vas jelenlétét a regenerált közép bélben (10. ábra), illetve a regenerált hasdúccláncban (11. ábra). Látható, hogy a csonkolás határáig az eredeti struktúrák festődtek, azaz tartalmazznak nem hem típusú háromértékű vasat, míg a regenerált struktúrák esetén sem a hasdúcclánc, sem a közép bél nem tartalmaz a csonkolást követően 5. hétnél nem hem tartalmú háromértékű vasat. Emellett megfigyelhető, hogy az első 2-3 ganglion több szegmentális ideget tartalmaz. Az utána következő szelvények esetén már az eredeti struktúrához hasonló szerkezetű ganglion figyelhető meg.

Nem hem típusú kétértékű vas jelenlétének vizsgálata



12. ábra: Turnbull reakcióval készített totálpreparátum a bélcsatornáról az 5. poszt operatív héten

Rövidítések: gt: bélcsatorna

Turnbull reakcióval vizsgáltuk a nem hem tartalmú kétértékű vas jelenlétét a regenerált bélben (12. ábra). Megfigyelhető, hogy a csonkolás határáig tartalmaz a bél Fe^{2+} ionokat, de a regenerált bélben egyáltalán nem található.

Hem vas jelenlétének vizsgálata

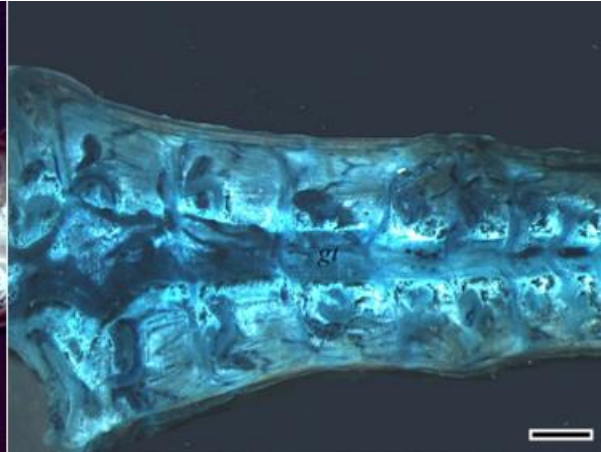
13. ábra: Az 5. poszt operatív héten
bélcsatornáról készített DAB-al inkubált
totálpreparátum

Rövidítések: gt: bélcsatorna



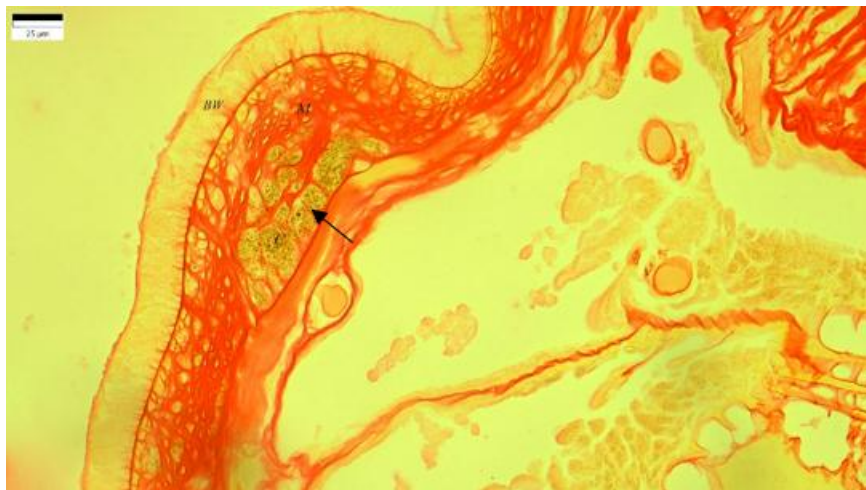
14. ábra: Az 5. poszt operatív héten
bélcsatornáról készített DAB-al inkubált
majd H₂O₂-vel kezelt totálpreparátum

Rövidítések: gt: bélcsatorna



A reakció alapján látható, hogy az eredeti szövet több hem vasat tartalmaz, mivel erősebb a reakció, míg a regenerátum kisebb mennyiségben, de tartalmaz hem vasat,

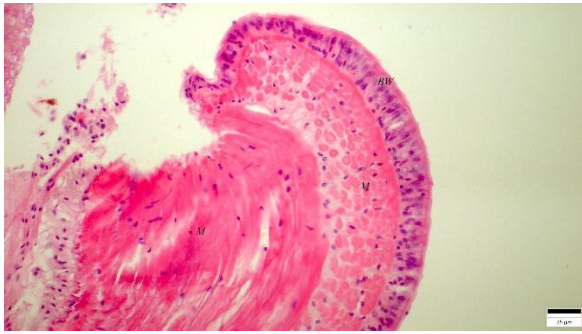
Cölómasejtek beszüremkedése a szövetekbe



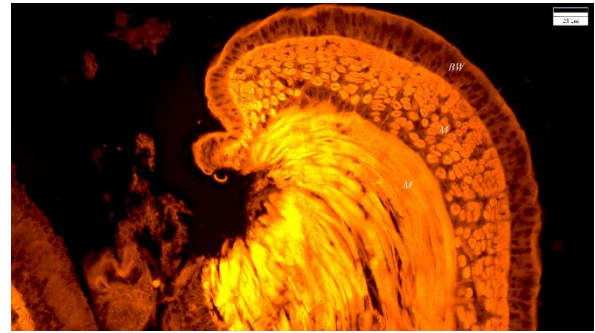
15. ábra: Izomsejtekbe beszüremkedő cölómasejtek
Rövidítések: C: cölómasejtek, M: izomszövet, BW: bőrizomtömlő

A 15. ábrán megfigyelhető, hogy az izomrétegbe cölómasejtek szüremkednek be. Alapvetően a cölómasejtek a sebzárásnál írták le kulcsfontosságúnak, viszont megfigyelhető, hogy a sebzés helyett inkább az izomsejtek dedifferenciálódásában lehet szerepük.

Az izomban bekövetkező változások a csonkolást követően



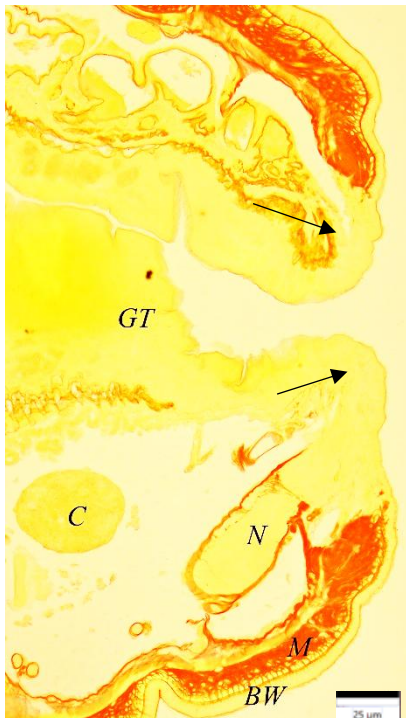
16. ábra: Az izomszövet a csonkolást követően áteresztő fényel vizsgálva
Rövidítések: M: izomszövet, BW: bőrízomtömlő



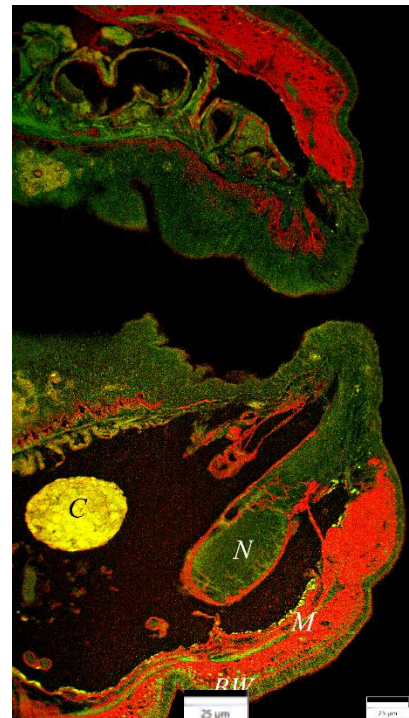
17. ábra: Az izomszövet a csonkolást követően fluoreszcens fényel megvilágítva
Rövidítések: M: izomszövet, BW:

Az izom esetén a csonkolást követően megfigyelhető egy erőteljes dedifferenciálódás (16. ábra). Mindamellet, hogy egyfajta átrendeződés figyelhető meg a szövetekben a 17. ábrán látható, hogy az izom fénytörése is megváltozik a dedifferenciálódó szövetekben, hiszen a vágás menti izomsejtek esetén erősebb gerjesztett fénykibocsátás figyelhető meg, ami a nagyobb eozin tartalom miatt van.

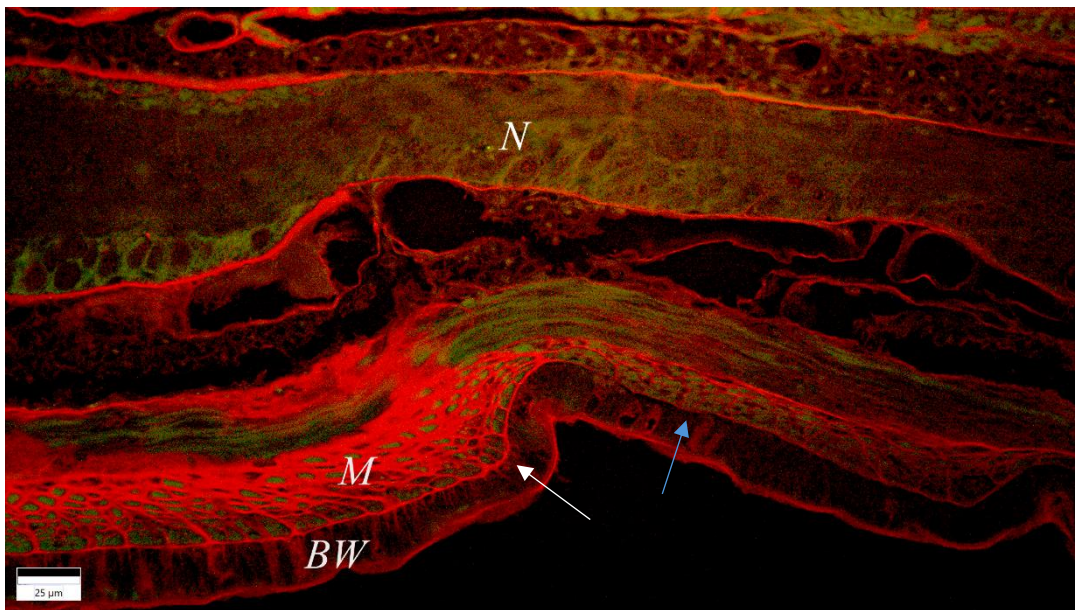
Kollagén jelenlétének vizsgálata a regenerátumban



18. ábra: Kollagén jelenléte a regenerálódó régióknál áteső fényel vizsgálva
Rövidítések: N: ideg, M: izomszövet, BW: bőrízomtömlő, Gt: bélcsatorna, fekete nyíl: regenerálódó régió



19. ábra: Kollagén jelenléte a regenerálódó régióknál fluoreszcens fényel megvilágítva
Rövidítések: N: ideg, M: izomszövet, BW: bőrízomtömlő

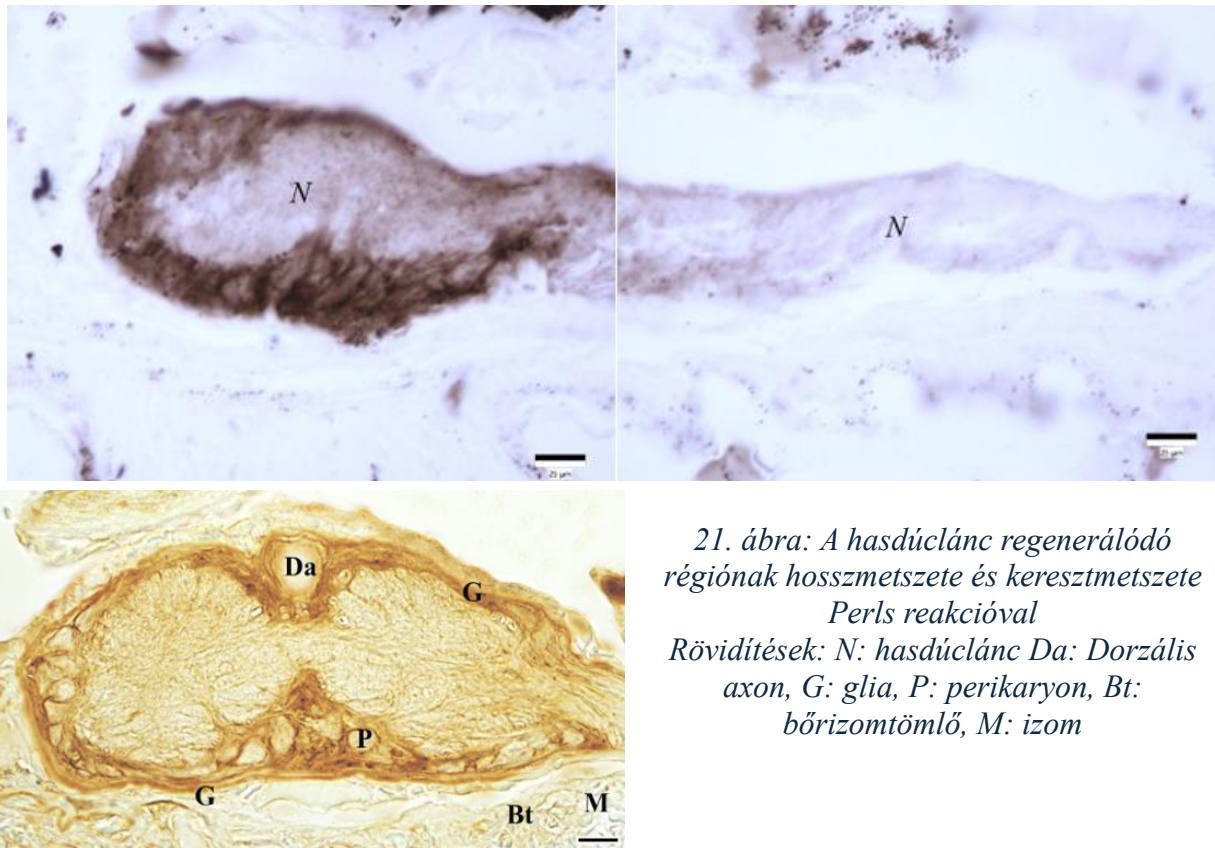


20. ábra: Kollagén jelenléte a regenerálódó régiónál a csonkolást követő 5. poszt operatív héten

Rövidítések: N: hasdúclánc, M: izomréteg, BW: bőrizomtömlő, fehér nyíl: eredeti struktúra, kék nyíl: regenerálódó struktúra

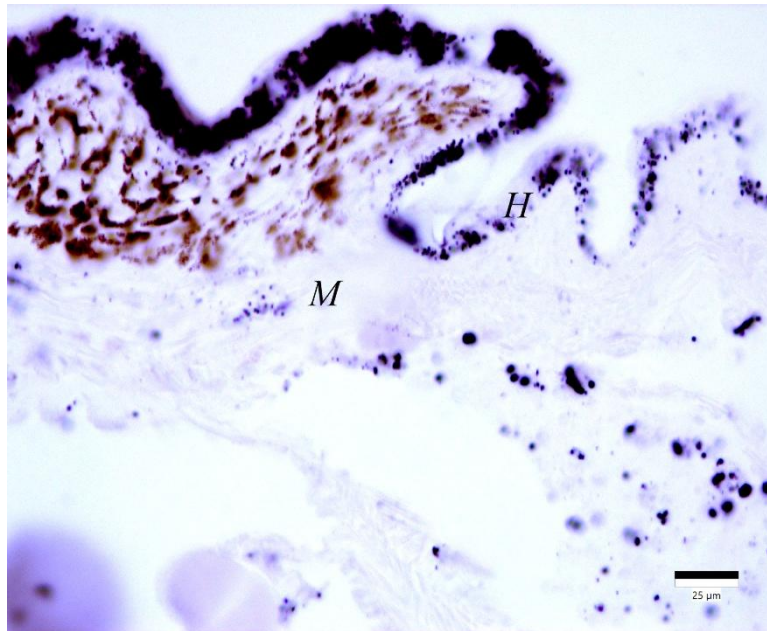
A kollagén esetén is megfigyelhető, hogy az eredeti struktúrák kollagénben gazdagok, míg a csonkolást követően 5 hét elteltével a regenerált struktúrákban kollagén nem, vagy csak nagyon kis mennyiségben található (18. és 19. ábra). Ez megfigyelhető az izom, az idegrendszer/hasdúclánc, és a bazális membrán esetén is (20. ábra).

Nem hem típusú vas jelenléte az eredeti és regenerált szövetek esetén



21. ábra: A hasdúclánc regenerálódó
régiónak hosszmetsete és keresztmetsete
Perls reakcióval
Rövidítések: N: hasdúclánc Da: Dorzális
axon, G: glia, P: perikaryon, Bt:
bőrízomtömlő, M: izom

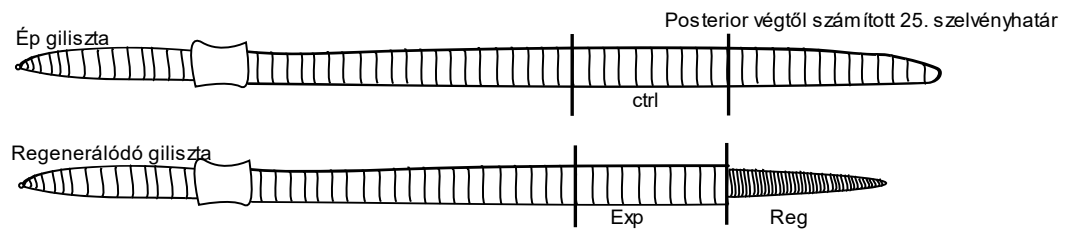
A totálpreparátumokon látottak alapján hisztológiai vizsgálatot is végeztünk. 3 hetes regenerátum esetén megfigyelhető, hogy a hasdúclánc (N) eredeti része tartalmaz vasat, míg a regenerált régió nem. A hosszmetsetet kisebb nagyítású, mint a keresztmetsetet, ezért az utóbbin lehet jól megfigyelni, hogy a glianyúlványok tartalmazzák a ferri-vegyületeket.

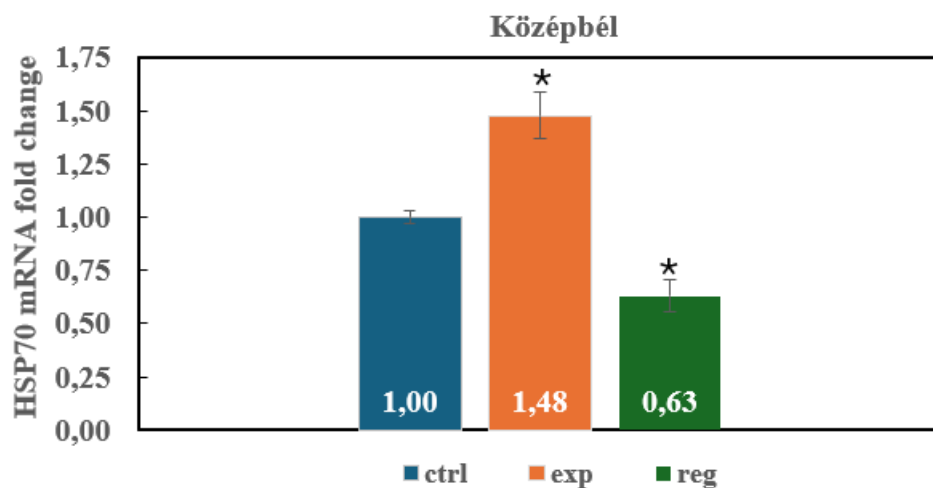


22. ábra: Abőrizomtömlő vastartalma a regenerálódó régiónál
M: izomszövet, H: bőrizomtömlő hám

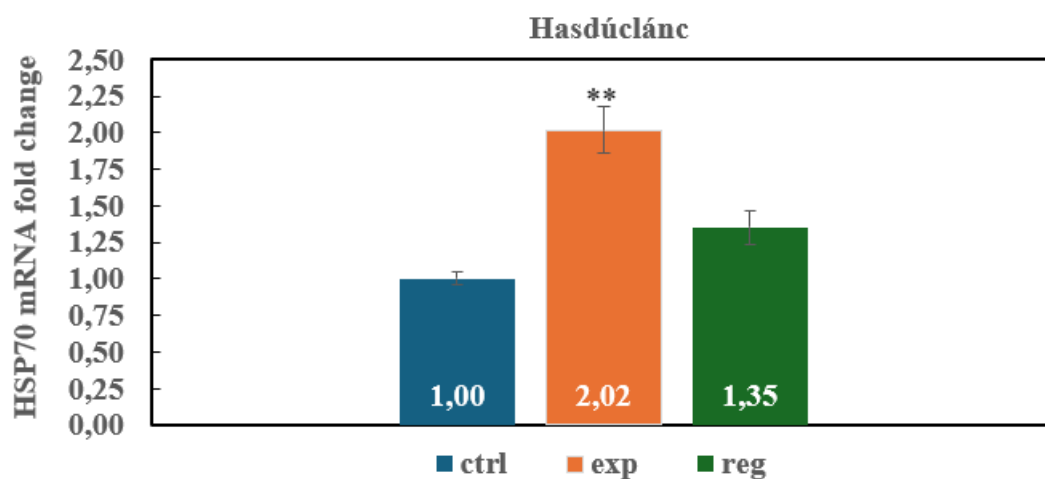
Az izom (M), illetve a bőrizomtömlő hám (H) esetén is megfigyelhető szintén, hogy az eredeti régiók tartalmazznak vasat, míg a regenerált régió nyomokban tartalmaz vasat.

3.5 HSP70 expressziójának qRT-PCR elemzése

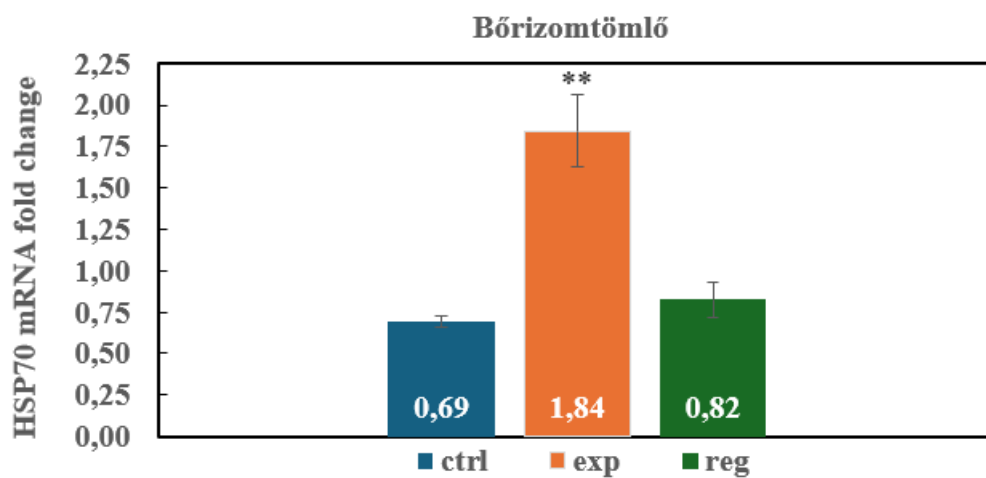




23. ábra: A HSP70 mRNS expressziója középbélben



24. ábra: A HSP70 mRNS expressziója a hasdúcláncban



25. ábra: A HSP70 mRNS expressziója bőrizomtömlőben

A regenerálódó egyedek utolsó 10 intakt szelvényének minden szervében magasabb a HSP70 expressziójának mértéke. A regenerátumban azonban a szövettől függően változó az expresszió. Középbélben a kontrollnál alacsonyabb, hasdúccláncban a kontrollnál magasabb, míg a bőrízomtömlőben a kontroll egyedek HSP70 expressziójával közel megegyező.

Az eredmények megvitatása

Eredményeink alátámasztják, hogy a szelvényregeneráció kinetikáját több tényező befolyásolja. Ezek egyrésze kapcsolódik más laboratóriumok által korábban elért eredményekhez, többségüket azonban a szelvényregeneráció mechanizmusát eddig nem alkalmazott vizsgálati módszerek alkalmazásával értük el.

2.1. A szelvényregeneráció kinetikája

Kimutattuk, hogy a táplált állatok szignifikáns mértékben több szelvényt regenerálnak, mint az éheztetettek (2. ábra). A regenerált szelvényszám a 3. posztoperatív héten 16 %-kal meghaladta az eltávolított szelvények számát. A növények által termelt szteroidok egy része xenohormonként befolyásolja gerinctelen és gerinces állatok hormonális regulációját (Zhabinskii és mtsai 2015). A földigiliszták szteroid receptorainak megléte vitatott kérdés, de vízi oligochaeta fajokban már egyértelműen kimutatták azokat (Azevedo és mtsai 2024). Az *E. fetida* és *E. andrei* fajok idegrendszerében kimutatott szteroidokat halmozó neuroszekréciós sejtek (Molnár és mtsai, publikálatlan eredmény) arra utalnak, hogy szteroid hormonok szintézisére képesek. Így lehetséges, hogy a kísérlet során táplálékként használt lucerna szteroid vegyületei (Janeczko 2021) a modellállat endokrin rendszerén át stimulálták a szelvényregeneráció folyamatát.

Feltűnő, hogy a táplálékmgvonás ellenére a 3.posztoperatív hétre az eltávolított szelvényszám 68%-a pótlódott. Éhező szervezetekben ez csak a rendelkezésre álló szöveti sejtek újra rendeződésével lehetséges. Eredményeink arra utalnak, hogy szelvényregeneráció vizsgálata során sztenderdizált tartási körülményeket kell biztosítani a kísérleti állatok számára a reprodukálható eredmények elérése érdekében.

2.2. A cölómasejtek hatása a szelvényregeneráció kinetikájára

Megerősítettük Liebmann (1943) felismerését, hogy a cölómasejtek mennyiségének csökkentése gátolja a szelvényregenerációt, egyben azt is feltártuk, hogy a kivonás időpontja szignifikáns mértékben befolyásolja a regenerált szelvények számát (3. ábra). Eredményeink

arra utalnak, hogy a cölómasejtek főleg a regeneráció korai eseményeit befolyásolják, a későbbi folyamatokra kisebb mértékben hatnak. Az epimorfózis kezdeti szakaszában a regenerációs blasztéma a szöveti sejtek dedifferenciálódásával, a szöveti össejtek sértett szöveti felszínekhez vándorlásával alakul ki, majd a sejtek intenzív osztódása és differenciálódása vezet az új szöveti struktúrák kialakulásához (Londono és mtsai., 2018). A cölómasejtek több módon segíthetik elő a szövetek újraképzését. A sértett szövetekbe vándorolva az általuk szállított tápanyagok, riboflavin felszabadításával befolyásolhatják a sejtek működését, hasonlóan Molnár és mtsai (2015) által az agydúc regenerációja során megfigyelt folyamatokhoz.

A cölómasejtekben általunk kimutatott szerotonin, és GABA (7. és 8. ábra) neurotranszmitterként ismert vegyületek, amelyek sértett idegrendszerből történő felszabadulását a regeneráció során több tanulmány leírta, azt sugallva, hogy a regeneráció szabályozásában szerepet játszanak (Carnevali és mtsai., 1996, Csoknya és mtsai., 2003; Koritsánszky & Hartwig, 1974). Bár ezek elfordulását cölómasejtekben eddig még nem azonosították egyértelműen, de a hisztokémiai és tömegspektrometriai eredményeink (7., 8. és 9. ábra) is egyértelműen bizonyítják jelenlétüket a cölómasejtekben. A cölómasejteket funkcionális tulajdonságaik alapján a gerinces immunsejtekkel analóg struktúráknak tartják, amelyekben szerotonin (Herr és mtsai 2017), dopamin (Matt és Gaskill 2020) és GABA (Bhandage és Barragan 2021) expresszióját az utóbbi években mutatták ki. Eredményeink arra utalnak, hogy egyes szignál molekulák már a gerinctelenek immunsejtjeiben megjelentek és szerepet játszhatnak a veleszületett és az adaptív immuválasz szabályozásban és befolyásolhatják perifériás szövetek működését is.

A GABA morfogenetikus hatásainak vizsgálata gerincesekben az utóbbi évtizedben vált intenzívvé. A farmakológiai és in vitro kísérletek során változó koncentrációjú exogén GABA hatást tanulmányozták a különböző laboratóriumok. Mivel jól reprodukálható eredményeket értek el 100 mM GABA alkalmazásával (Huang és mtsai 2023), kísérleteink során mi is ezt a koncentrációt alkalmazzuk. Az exogén GABA kezelés hatására kevesebb szelvényt regeneráltak a kísérleti állatok (4., 5. és 6. ábra), amit a GABA morfogenetikus hatásának tulajdoníthatunk. Felszabadulhat GABA a rostokból, illetve növekedési kúpokból, olyan módon, hogy a GABA transzporterek membránhoz kötöttsége megfordul. GABA megjelenik a nagyagy ventriculáris zónájában található proliferálódó sejtekben (LoTurco és mtsai., 1995; Owens és mtsai., 1999), amiből arra lehet következtetni, hogy a GABA-nak sejt proliferációt szabályozó szerepe lehet. A GABA limitálja az embrionális sejtek proliferációját, ezáltal a GABA elfogadottan egy negatív regulátor is (Young és Bordey, 2009). A perifériás idegrendszerben megfigyelték, hogy a GABA képes gátolni a Schwann sejtproliferációt (Magnaghi, és mtsai., 2004). Megfigyelték,

hogy a GABA jelátvitel GABA_A receptorokon keresztül negatívan befolyásolja az embrionális őssejtekben és beültetés előtti embrionális növekedést a boundary-cap őssejt nicheben. Megnövekedett sejtterfogat növekedéshez vezet az S szakaszban, ezáltal a sejtproliferáció csökkenéshez vezet (Wang és mtsai., 2008). A bioaktív molekulák, amelyek találhatóak a cölómafolyadékban antiproliferatív hatásúak is lehetnek (Augustine, 2017). Mivel a cölómafolyadékban található bioaktív molekulák antiproliferatív hatásúak is lehetnek, ezért ráksejtekre való hatását is megvizsgálták a cölómafolyadéknak, amely során hatékony antiproliferatív hatást fejtett ki (Haque és mtsai., 2023).

Az agy fejlődése során a GABA depolarizáló aktivitást fejt ki az agykérgi idegi prekurzorokban, kontrollálva a sejtosztódást és hozzájárulva a neuronok migrációjához és éréséhez (Salazar és mtsai., 2008). Emellett kimutatták, hogy a GABA GAT-2-es transzporterének a hiánya indukálja a bél germinális közpopntjában a B sejtek differenciálódását (Liao és mtsai., 2022), tehát elmondható, hogy a GABA bizonyos esetekben hatással van a sejt differenciálódásra.

3.4. A regenerálódó szelvények anatómiai, hisztológiai és hisztokémiai tulajdonságai

A hisztológiai vizsgálatok alapján kimondható, hogy a regenerálódó struktúra bár először úgy tűnhet, hogy megegyezik az eredeti struktúrával szövettanilag nem azonosak. A csökkent vas jelenléte utalhat arra, hogy annak jelenléte nélkül játszódik le az erőteljes sejtproliferáció. Feltételezhető, hogy a regeneráció során a vas kofaktorok alacsony szintjével történik a kóros sejtburjánzás megakadályozása.

Az emlősben megfigyelhető sebzáródás esetén megfigyelhető kollagén felhalmozódás sem történik meg, sőt az újonnan létrehozott struktúrák nem tartalmaznak kollagént. Tehát elmondható, hogy a sejtvándorlás a kollagén által biztosított mátrix nélkül játszódik le, továbbá a regeneráció folyamatát sem lassítja annak a lebontása.

3.5 HSP70 expressziójának qRT-PCR elemzése

A HSP70 expressziójának vizsgálata során megállapítható, hogy a modellállat regenerálódó szöveteiben magasabb az expresszió mértéke, mint a sértetlen szövetekben. A regenerálódó planáriákban is a HSP70 emelkedett expresszióját figyelték meg (Wang és mtsai. 2022), ami felveti azt a lehetőséget, hogy az emelkedett HSP70 expressziót a regeneráció markerének lehet tekinteni.

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőm Dr. Molnár László munkámhoz nyújtott támogatását, tanácsait, Dr. Fodor Istvánnak a qRT-PCR vizsgálatoknál nyújtott segítségét. Köszönöm Dr. Komáromy Andrásnak a tömegspektrométer kalibrálásához és a mérések elvégzéséhez nyújtott segítségét, valamint Dunai Dániel szövettani, hisztokémiai munkákhoz nyújtott segítségét.

Irodalomjegyzék:

- Alonso-Bedate M, Sequeros E. (1985) Suggested regulatory mechanisms for caudal regeneration in *Allolobophora molleri* (Annelida: Oligochaeta). *Comparative Biochemistry and Physiology Part: A* 81:225-8. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(85\)90126-4](https://doi.org/10.1016/0300-9629(85)90126-4).
- Augustine, D., Rao, R. S., Anbu, J., & Murthy, K. C. (2017). In vitro antiproliferative effect of earthworm coelomic fluid of *Eudrilus eugeniae*, *Eisenia foetida*, and *Perionyx excavatus* on squamous cell carcinoma-9 cell line: a pilot study. *Pharmacognosy research*, 9(Suppl 1), S61. https://doi.org/10.4103/pr.pr_52_17
- Azevedo, T., Gonçalves, M., Silva-Reis, R., Medeiros-Fonseca, B., Roboredo, M., Sousa, J. R., Oliveira, P. A., Pinto L. M., Peixoto, F., Gaivao, I., Matos, M., & Coimbra, A. M. (2024). Do endocrine disrupting compounds impact earthworms? A comprehensive evidence review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 23(3), 633-677. <https://doi.org/10.1007/s11157-024-09698-z>
- Álvarez-Campos (2022). On the hormonal control of posterior regeneration in the annelid *Platynereis dumerilii*. *Jez-B Molecular And Developmental Evolution*: Volume:340, issue:2. <https://doi.org/10.1002/jez.b.23182>
- Bely, A. E. (2006). Distribution of segment regeneration ability in the Annelida. *Integrative and Comparative Biology*, 46(4). <https://doi.org/10.1093/icb/icj051>
- Braun, S. M. G., & Jessberger, S. (2014). Adult neurogenesis and its role in neuropsychiatric disease, brain repair and normal brain function. *Neuropathology and applied neurobiology*, 40(1), 3-12. <https://doi.org/10.1111/nan.12107>
- Bhandage, A. K., & Barragan, A. (2021). GABAergic signaling by cells of the immune system: more the rule than the exception. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 78(15), 5667-5679. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03881-z>
- Bölük, A., Yavuz, M., & Demircan, T. (2022). Axolotl: A resourceful vertebrate model for regeneration and beyond. *Developmental Dynamics*, 251(12), 1914-1933. <https://doi.org/10.1002/dvdy.520>
- Carnevali, M. D. C., Bonasoro, F., Invernizzi, R., Lucca, E., Welsch, U., & Thorndyke, M. C. (1996). Tissue distribution of monoamine neurotransmitters in normal and regenerating arms of the feather star *Antedon mediterranea*. *Cell and Tissue Research*, 285(2), 341-352. <https://doi.org/10.1007/S004410050651/METRICS>
- Cornelis E, Koert, Gaynor E. Spencer, J. van Minnen Ka Wan Li, Wijnand P. M. Geraerts, Naweid I. Syed, August B. Smit & Ronald E. van Kesteren (2001). Functional Implications of Neurotransmitter Expression during Axonal Regeneration: Serotonin, But Not Peptides, Auto-Regulate Axon Growth of an Identified Central Neuron. *Journal of Neuroscience*: 21 (15) 5597-5606. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-15-05597.2001>
- Csoknya, M., Barna, J. & Elekes, K. (2002). Reorganization of the Gabaergic System Following Brain Extirpation in the Earthworm (*Eisenia fetida*, Annelida, Oligochaeta). *Acta Biologica Hungarica* 53, 43-58. <https://doi.org/10.1556/ABiol.53.2002.1-2.6>.
- Csoknya M, Barna J, Hiripi L Hámori J, Elekes K. (2003) Reorganization of monoaminergic systems in the earthworm, *Eisenia fetida*, following brain extirpation. *J Exp Zool A Comp Exp Biol* 296:18-29. <https://doi.org/10.1002/jez.a.10239>

- Csoknya, M., Lengvári, I., Hiripi, L., Elekes, K., Vincze, J., Szelier, M., & Hámori, J. (1993). Serotonin content during the regeneration of nervous system in earthworm (*Lumbricus terrestris* L., Oligochaeta). *Acta Biol Szeged*, 39, 39-49.
- Dlouhy, A. C., & Outten, C. E. (2013). The iron metallome in eukaryotic organisms. *Metallomics and the Cell*, 241-278. https://doi.org/10.1007/978-94-007-5561-1_8
- Doris D. Wang, Arnold R, Kriegstein, & Yehezkel Ben-Ari (2008). GABA Regulates Stem Cell Proliferation before Nervous System Formation. *Epilepsy Currents*: volume 8, issue 5. <https://doi.org/10.1111/j.1535-7511.2008.00270>.
- Egger, B., Ladurner, P., Nimeth, K., Gschwentner, R., & Rieger, R. (2006). The regeneration capacity of the flatworm *Macrostomum lignano*—on repeated regeneration, rejuvenation, and the minimal size needed for regeneration. *Development Genes and Evolution*, 216, 565-577. <http://dx.doi.org/10.1007/s00427-006-0079-2>
- Eue, I., Kauschke, E., Mohrig, W., & Cooper, E. L. (1998). Isolation and characterization of earthworm hemolysins and agglutinins. *Developmental & Comparative Immunology*, 22(1), 13-25. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(97\)00049-9](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(97)00049-9).
- Fraguas, S., Barberán, S., Iglesias, M., Rodriguez-Esteban, G., & Cebrià, F. (2014). egr-4, a target of EGFR signaling, is required for the formation of the brain primordia and head regeneration in planarians. *Development*, 141(9), 1835-1847. <https://doi.org/10.1242/dev.101345>
- Fotia, C., Avnet, S., Kusuzaki, K., Roncuzzi, L., & Baldini, N. (2015). Acridine orange is an effective anti-cancer drug that affects mitochondrial function in osteosarcoma cells. *Current Pharmaceutical Design*, 21(28), 4088-4094. <https://doi.org/10.2174/1381612821666150918144953>
- Franquinet, R., & Martelly, I. (1981). Effects of serotonin and catecholamines on RNA synthesis in planarians; in vitro and in vivo studies *Cell differentiation*, 10(4), 201-209. [https://doi.org/10.1016/0045-6039\(81\)90002-6](https://doi.org/10.1016/0045-6039(81)90002-6)
- Galliot B. (2012) Hydra, a fruitful model system for 270 years. *International Journal of Developmental Biology*, 56(6-8):411-23. <https://doi.org/10.1387/ijdb.120086bg>.
- Gordon, S. A., Hoffman, R. A., Simmons, R. L., & Ford, H. R. (1997). Induction of heat shock protein 70 protects thymocytes against radiation-induced apoptosis. *Archives of surgery*, 132(12), 1277-1282. doi:10.1001/archsurg.1997.01430360023004
- Haque, S., Hussain, A., Almalki, A. H., Aldawsari, M. F., Lal, B., Rai, A. K., ... & Fiołka, M. (2024). Prospects of earthworm coelomic fluid as a potential therapeutic agent to treat cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 43(2), 621-637. <https://doi.org/10.1007/s10555-023-10148-5>
- Herlant- Meewis H. (1964) Regeneration in Annelids. *Advances in Morphogenesis* 4:155-215. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4831-9951-1.50008-5>
- Herr, N., Bode, C., & Duerschmied, D. (2017). The effects of serotonin in immune cells. *Frontiers in cardiovascular medicine*, 4, 48. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2017.00048>
- Huang, D., Alexander, P. B., Li, Q. J., & Wang, X. F. (2023). GABAergic signaling beyond synapses: an emerging target for cancer therapy. *Trends in cell biology*, 33(5), 403-412. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2022.08.004>
- Huet (1975). Le rôle du système nerveux au cours de la régénération du bras chez une Etoile de mer: *Asterina gibbosa* Penn. (Echinoderme, Astéride). *Journal of Embriology and experimental morphology*. 33 (3): 535–552. <https://doi.org/10.1242/dev.33.3.535>
- Janeczko, A. (2021). Estrogens and androgens in plants: the last 20 years of studies. *Plants*, 10(12), 2783. <https://doi.org/10.3390/plants10122783>
- Jamieson, Barrie G. M. (1981) The ultrastructure of the Oligochaeta. Chapter 5: wound healing and regeneration. *Academic Press*, London 119-47. ISBN: 012380180X 9780123801807

- Julier, Z., Park, A. J., Briquez, P. S., & Martino, M. M. (2017). Promoting tissue regeneration by modulating the immune system. *Acta biomaterialia*, 53, 13-28. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.01.056>
- Kauschke, E., Mohrig, W., & Cooper, E. L. (2007). Coelomic fluid proteins as basic components of innate immunity in earthworms. *European Journal of Soil Biology*, 43, S110-S115. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2007.08.043>
- Khan, A., Singh, P., & Srivastava, A. (2020). Iron: Key player in cancer and cell cycle? *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 62, 126582. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2020.126582>
- Kociński, M., Takacs, V., Molnar, L., Morgan, A. J., Bigaj, J., & Plytycz, B. (2016). Experimental induction of autotomy in two potential model lumbricid earthworms *Eisenia andrei* and *Aporrectodea caliginosa*. *Invertebrate Survival Journal*, 13.
- Koritsánszky, S., & Hartwig, H. G. (1974). The regeneration of the monoaminergic system in the cerebral ganglion of the earthworm, *Allolobophora caliginosa*. A morphological and microspectrofluorimetric analysis. *Cell and tissue research*, 151(2), 171–186. <https://doi.org/10.1007/BF00222221>
- Owens, D. F., Liu, X., & Kriegstein, A. R. (1999). Changing properties of GABAA receptor-mediated signaling during early neocortical development. *Journal of neurophysiology*, 82(2), 570-583. <https://doi.org/10.1152/jn.1999.82.2.570>
- Lévesque, M., Guimond, J. C., Pilote, M., Leclerc, S., Moldovan, F., & Roy, S. (2005). Expression of heat-shock protein 70 during limb development and regeneration in the axolotl. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 233(4), 1525-1534. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20458>
- Liao, Y., Fan, L., Bin, P., Zhu, C., Chen, Q., Cai, Y., ... & Ren, W. (2022). GABA signaling enforces intestinal germinal center B cell differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(44), e2215921119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2215921119>
- Liebmann E. (1942) The coelomocytes of *Lumbricidae*. *Journal of Morphology* 11:221-49.
- Liebmann, E. (1942). The correlation between sexual reproduction and regeneration in a series of Oligochaeta. *Journal of Experimental Zoology*, 91(3), 373-389. <https://doi.org/10.1002/jez.1400910305>
- Liebmann E. (1943) New light on regeneration of *Eisenia fetida* (Sav.). *Journal of Morphology* 73:583-610. <https://doi.org/10.1002/jmor.1050730307>
- LoTurco, J. J., Owens, D. F., Heath, M. J., Davis, M. B., & Kriegstein, A. R. (1995). GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. *Neuron*, 15(6), 1287-1298.
- Londono, R., Sun, A. X., Tuan, R. S., & Lozito, T. P. (2018). Tissue repair and epimorphic regeneration: An overview. *Current Pathobiology Reports*. 6 (1), 61–69. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90008-x](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90008-x)
- Magnaghi, V., Ballabio, M., Cavarretta, I. T., Froestl, W., Lambert, J. J., Zucchi, I., & Melcangi, R. C. (2004). GABAB receptors in Schwann cells influence proliferation and myelin protein expression. *European Journal of Neuroscience*, 19(10), 2641-2649. <https://doi.org/10.1111/j.0953-816X.2004.03368.x>
- Matt, S. M., & Gaskill, P. J. (2020). Where is dopamine and how do immune cells see it? dopamine-mediated immune cell function in health and disease. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 15, 114-164. <https://doi.org/10.1007/s11481-019-09851-4>
- Mayer, M. P., & Bukau, B. (2005). Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and molecular life sciences*: 62, 670-684. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4464-6>
- Mácsik, L. L., Somogyi, I., Oppler, B., Bovári-Biri, J., Pollák, E., Molnár, L., Németh, P., & Engelmann, P. (2015). Induction of apoptosis-like cell death by coelomocyte extracts from *Eisenia andrei* earthworms. *Molecular immunology*, 67(2), 213-222. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.05.015>
- Molnár L. és Gábor R. (2001) Fény.- és elektronmikroszkópos mikrotechnika. Dialóg-Campus kiadó, Pécs.

- Molnar, L., Pollak, E., Skopek, Z., Gutt, E., Kruk, J., Morgan, A. J., & Plytycz, B. (2015). Immune system participates in brain regeneration and restoration of reproduction in the earthworm *Dendrobaena veneta*. *Developmental & Comparative Immunology*, 52(2), 269-279. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.04.001>
- Morgan, T. H. (1901). *Regeneration Columbia University Biological Series*, vol 3. New York: The Macmillan Company.
- Morgan, T. H. (1902). Experimental studies of the internal factors of regeneration in the earthworm. *Archiv für Entwicklungsmechanik der Organismen*, 14(3), 562-591.
- Morgan, T. H. (1898). Experimental studies of the regeneration of *Planaria maculata* (Vol. 2). W. Engelmann.
- Moseley, P. L. (1998). Heat shock proteins and the inflammatory response. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 856(1), 206-213. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb08327.x>
- Müller M. C. M., Berenzen A, Westheide W. (2003) Experiments on anterior regeneration in *Eurythoe complanate* ("Polychaeta", Amphinomididae): reconfiguration of the nervous system and its function for regeneration. *Zoomorphology* 122:95-103. <https://doi.org/10.1007/s00435-003-0073-4>
- Rao, M. B., Didiano, D., & Patton, J. G. (2017). Neurotransmitter-regulated regeneration in the zebrafish retina. *Stem cell reports*, 8(4), 831-842. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.02.007>
- Rota, E. (2022). How the discovery of oligochaete regeneration during the Enlightenment was pivotal to the advancement of annelid research. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 196(1), 1-24. <https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlab111>
- Salazar, P., Velasco-Velázquez, M. A., & Velasco, I. (2008). GABA effects during neuronal differentiation of stem cells *Neurochemical research*, 33, 1546-1557. <http://doi.org/10.1007/s11064-008-9642-8>
- Scharrer (1967). The Neurosecretory Neuron in Neuroendocrine Regulatory Mechanisms. *American Zoologist*, 7:161-169. <https://doi.org/10.1093/icb/7.1.161>
- Scharrer, E., & Brown, S. (1962). Neurosecretion in *Lumbricus terrestris*. *General and Comparative Endocrinology*, 2(1), 1-3. [http://doi.org/10.1016/0016-6480\(62\)90022-9](http://doi.org/10.1016/0016-6480(62)90022-9)
- Singer, M. (1952). The influence of the nerve in regeneration of the amphibian extremity. *The Quarterly review of biology*, 27(2), 169-200. <http://doi.org/10.1086/398873>
- Singh, R. V., Aithal, H. P., Kinjavdekar, P., Pawde, A. M., Singh, K. P., Gugjoo, M. B., & Amarpal, D. (2015). Evaluation of the healing potential of earthworm coelomic fluid in full thickness skin wounds in rabbits. *Veterinarski arhiv*, 85(2), 189-200.
- Oki, Y., & Younes, A. (2004). Heat shock protein-based cancer vaccines. *Expert Review of Vaccines*, 3(4), 403-411. <https://doi.org/10.1586/14760584.3.4.403>
- Wang, F. Y., Zhu, R. M., Maemura, K., Hirata, I., KATSU, K. I., & Watanabe, M. (2006). Expression of gamma-aminobutyric acid and glutamic acid decarboxylases in rat descending colon and their relation to epithelial differentiation. *Chinese journal of digestive diseases*, 7(2), 103-108. <https://doi.org/10.1111/j.1443-9573.2006.00247>
- Wang, Q., Xie, L., Wang, Y., Jin, B., Ren, J., Dong, Z., ... & Liu, D. (2022). Djhs70s, especially Djhs70c, play a key role in planarian regeneration and tissue homeostasis by regulating cell proliferation and apoptosis. *Gene*, 820, 146215. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2022.146215>
- Young, S. Z., & Bordey, A. (2009). GABA's control of stem and cancer cell proliferation in adult neural and peripheral niches. *Physiology*, 24(3), 171-185. <https://doi.org/10.1152/physiol.00002.2009>
- Zhabinskii, V. N., Khripach, N. B., & Khripach, V. A. (2015). Steroid plant hormones: effects outside plant kingdom. *Steroids*, 97, 87-97. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2014.08.025>
- Zhang, C. (2014). Essential functions of iron-requiring proteins in DNA replication, repair and cell cycle control. *Protein & cell*, 5(10), 750-760. <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0083-7>