



تحلیل بازسازی اندام در اکسولوتل با رویکرد یادگیری عمیق چندلایه

امیر حسین رضازاده شیرازی^{۱*}، سارمهبودی^۲

۱- دانشجوی دکتری عمومی دامپزشکی دانشگاه آزاد کازرون، فارس، ایران

۲- دانشجوی کارشناسی پرستاری دانشگاه آزاد کازرون، فارس، ایران

*ایمیل نویسنده مسئول: amirrezazadehshirazi1347@gmail.com

چکیده

بازسازی اندام‌های پیچیده در مهره‌داران بالغ، یکی از چالش‌برانگیزترین مسائل زیست‌پزشکی محسوب می‌شود. در این میان، اکسولوتل (*Ambystoma mexicanum*) به عنوان مدلی منحصربه‌فرد با توانایی بازسازی کامل اندام‌های حرکتی، نخاع، قلب و مغز، بستری ارزشمند برای مطالعه مکانیسم‌های زیستی بازسازی فراهم کرده است. این پژوهش با هدف تحلیل جامع و چندلایه فرآیند بازسازی اندام در اکسولوتل طراحی شد و بر بررسی دینامیک سلولی، فعالیت مسیرهای سیگنال‌دهی، و تنظیمات ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی تمرکز داشت. نمونه‌برداری در فازهای مختلف بازسازی (روزهای ۰، ۳، ۷، ۱۴، ۲۱، ۲۸) انجام شد. مطالعات هیستولوژیک، ایمونوهیستوشیمی، qRT-PCR و RNA-seq برای تحلیل بیان ژن‌های کلیدی مانند *wnt5a*، *msx1*، *fgf8* و *notch1* به کار رفت. نتایج نشان داد مسیرهای Wnt، FGF، و Notch نقش محوری در تشکیل بلاستما و فعال‌سازی سلول‌های بنیادی و پیش‌ساز دارند. همچنین، آنالیز ترنسکرپتومی آشکار ساخت که تنظیم بیان ژن‌ها تحت تأثیر تعامل بین فاکتورهای درون‌زاد، سیگنال‌های محیطی و مکانیسم‌های اپی‌ژنتیکی قرار دارد. یافته‌ها نشان‌دهنده هماهنگی پیچیده بین ماتریکس خارج‌سلولی، پاسخ‌های ایمنی و مسیرهای سیگنال‌دهی در بازسازی موفق اندام هستند. این مطالعه با ترسیم نمایی دقیق از مکانیسم‌های زیستی بازسازی در اکسولوتل، چشم‌انداز تازه‌ای برای توسعه درمان‌های بازساختی در انسان فراهم می‌سازد و گامی مؤثر در جهت کاربردهای translational زیست‌شناسی بازسازی محسوب می‌شود.

کلمات کلیدی: اکسولوتل، بازسازی اندام، سلول‌های بنیادی

۱- مقدمه

بازسازی بافت‌ها و اندام‌های آسیب‌دیده یکی از حوزه‌های نویدبخش در علوم زیستی و پزشکی بازساختی به‌شمار می‌رود. این توانایی به‌ویژه در درمان بیماری‌های تحلیل‌برنده، آسیب‌های شدید مانند ضایعات نخاعی، نارسایی اندام‌ها و سوختگی‌های گسترده از اهمیت بالایی برخوردار است. با این حال، توانایی طبیعی موجودات در بازسازی اندام‌ها بسیار متفاوت است. در حالی که انسان و بیشتر مهره‌داران فقط قابلیت محدودی در ترمیم بافت‌ها دارند، اکسولوتل (*Ambystoma mexicanum*)، دوزیستی با ویژگی‌های منحصربه‌فرد، قادر است ساختارهایی پیچیده مانند اندام‌های حرکتی، نخاع، قلب و حتی بخش‌هایی از مغز را به‌طور کامل بازسازی کند [۱-۲]. این توانایی حیرت‌انگیز اکسولوتل را به مدلی بسیار مهم برای بررسی مکانیسم‌های بازسازی در مهره‌داران تبدیل کرده است. تحقیقات گذشته نشان داده‌اند که مسیرهای مولکولی مهمی مانند Wnt/β-catenin، FGF، BMP و Notch در تنظیم عملکرد سلول‌های بنیادی و تشکیل بلاستما، که یک توده سلولی اولیه در فرآیند بازسازی است، نقش دارند [۳-۴]. مسیرهایی مانند TGF-β، VEGF و Akt در فرآیندهایی نظیر رگزایی، تنظیم چرخه سلولی و کنترل التهاب نقش مهمی ایفا می‌کنند [۵]. علاوه بر این، مطالعات نشان داده‌اند که عوامل اپی‌ژنتیکی مانند متیلاسیون DNA، تغییرات هیستونی و RNAهای غیرکدکننده نقش مهمی در



تنظیم بیان ژن‌های مرتبط با بازسازی دارند [۶-۷]. با این حال، تعاملات پیچیده میان سلول‌های ایمنی، ماتریکس خارج سلولی و سیگنال‌های محیطی همچنان به طور کامل درک نشده‌اند.

با توجه به ژنوم بزرگ و پیچیده اکسولوتل و شباهت بیشتر آن به انسان نسبت به مدل‌های بی‌مهره، این گونه به عنوان یک سامانه مدل مناسب برای تحقیقات مربوط به بازسازی بافتی مطرح شده است. [۸] پژوهش حاضر با هدفی چندلایه و سیستماتیک، به بررسی فرآیند بازسازی در اکسولوتل می‌پردازد و از داده‌های ژنومی، ترنسکرپتومی و اپی‌ژنومی بهره می‌گیرد تا فهم دقیقی از سازوکارهای زیربنایی بازسازی ارائه کند. هدف نهایی این تحقیق، کشف راه‌حل‌های عملی برای انتقال این دانش به حوزه پزشکی انسانی و توسعه درمان‌های نوین بازسازی است.



شکل ۱: اکسولوتل برگرفته از سایت اتحاد زیست شناسان ایران

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱ حیوانات و شرایط نگهداری

در این مطالعه، اکسولوتل‌های بالغ (*Ambystoma mexicanum*) با طول بدن ۹-۱۲ سانتی‌متر از مرکز پرورش حیوانات تحقیقاتی مکزیکی تهیه و در سیستم گردش آب در دمای 18 ± 0.5 ، درجه سانتی‌گراد و pH بین ۷.۰ تا ۷.۵ نگهداری شدند. نوردهی به صورت ۱۲:۱۲ ساعت تاریکی/روشنایی و تغذیه با لارو آرتمیا سه بار در هفته انجام شد. کلیه مراحل با تاییدیه کمیته اخلاق دانشگاه کد (AEC2025-AXL02) انجام شد.

۲-۲ قطع اندام و تصویربرداری

پس از بیهوشی با (MS-222 (0.1%)، اندام جلویی راست از ناحیه میانی استخوان بازو قطع شد. نمونه‌برداری در روزهای ۰، ۳، ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ انجام شد و با میکروسکوپ استریو تصویربرداری و اندازه‌گیری بلاستما با ImageJ انجام شد.

۲-۳ نمونه‌برداری مولکولی و بافت‌شناسی

نمونه‌ها در هر زمان ($n=5$) یا در نیتروژن مایع فریز و یا در فرمالین ۱۰٪ فیکس شدند. نمونه‌های پارافینه برای رنگ‌آمیزی H&E و Masson's Trichrome آماده شدند. برای بررسی پروتئین‌های هدف از آنتی‌بادی‌های Sox2، Pax7 و PCNA به همراه آنتی‌بادی‌های فلورسنت و DAPI استفاده شد.



همایش ملی فناوری و نوآوری در آبرزی پروری

امنیت غذایی و حفاظت از محیط زیست



National Conference Technology and Innovation in Aquaculture Food Security and Environmental Protection

زمان برگزاری: ۱۷ اردیبهشت ۱۴۰۴

۲-۴ استخراج RNA و qRT-PCR

استخراج RNA با کیت Qiagen و سنتز cDNA با کیت Thermo Fisher انجام شد. بیان ژنهای *fgf8*، *msx1*، *wnt5a* و *notch1* با qRT-PCR ارزیابی و نسبت به ژن *gapdh* نرمال سازی شد.

۲-۵ توالی یابی RNA و آنالیز مسیرها

RNA نمونه های روزهای ۷ و ۱۴ برای RNA-seq استفاده شد. توالی یابی با Illumina NovaSeq و آنالیز داده ها با STAR، DESeq2، GSEA و KEGG انجام گرفت.

۲-۶ تحلیل آماری

داده ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شدند. آنالیز آماری با ANOVA یک طرفه و آزمون تعقیبی Tukey در GraphPad Prism 9 انجام شد ($p < 0.05$) معنادار تلقی شد.

۱. تحلیل جدول ۱-۱: مارکرهای سلولی:

استفاده از آنتی بادی های *Sox2* و *Pax7* بیانگر تمرکز بر منشأ سلولی بازسازی است *PCNA*. نیز برای ارزیابی تکثیر سلولی بلاستما به کار رفته است.

۲. ژن های هدف در: qRT-PCR

ژن های *fgf8*، *wnt5a*، *msx1*، *notch1* نقش کلیدی در مسیرهای بازسازی دارند *gapdh* به عنوان کنترل داخلی موجب دقت نتایج شده است.

۳. برنامه نمونه برداری:

نمونه برداری از روز ۰ تا ۲۸، کل مراحل بازسازی (از التهاب تا ساختار نهایی) را در بر می گیرد و امکان پایش زمانی فراهم می کند.

۴. روش های ترکیبی:

ادغام qRT-PCR، RNA-seq، IHC و هیستولوژی تحلیلی جامع از بیان ژن، ساختار بافت و حضور پروتئین ها ارائه می دهد.

۳- نتایج

۱- تشکیل بلاستما و مراحل مورفولوژیکی بازسازی اندام

در پی قطع اندام قدامی در اکسولوتل، اولین نشانه های مورفولوژیکی بازسازی طی ۲۴ تا ۴۸ ساعت اولیه شامل مهاجرت سلول های اپیدرمال به ناحیه آسیب دیده و تشکیل اپیدرم زخم (wound epithelium) مشاهده شد. از روز سوم، تجمع سلول های مزانشیمی در زیر اپیدرم زخم، منجر به تشکیل بلاستما اولیه گردید. در روز هفتم، بلاستما میانی با رشد حجمی قابل توجه و بیان فعال مارکرهای پیش ساز مشاهده شد و تا روز چهاردهم ساختار بلاستما بالغ با تقسیمات سلولی شدید و تمایز نسبی شکل گرفت. بازسازی کامل شکل گیری اندام در حدود روز بیست و هشتم به پایان رسید.



جدول ۱: خلاصه اطلاعات روش شناسی مطالعه‌ی بازسازی اندام در اکسولوتل

ردیف	اصلی بخش	داده نوع	جزئیات شرح
۱	هابادی آنتی	اولیه بادی آنتی	Sox2: کلونال پلی، بنیادی های سلول؛ 1:200 رقت DSHB، موش، مونوکلونال Pax7، عضلانی سازپیش؛ 1:100 رقت CST، خرگوش، مونوکلونال PCNA، سلولی تقسیم؛ 1:500 رقت
		ثانویه بادی آنتی	Alexa Fluor 488: ضد خرگوش، Sox2 برای 1:500 رقت Thermo، و PCNA Alexa Fluor 594: ضد موش، Pax7 برای 1:500 رقت Thermo.
۲	qRT-PCR پرایمرهای	هدف های ژن	fgf8، msx1، wnt5a، notch1، gapdh (داخلی کنترل)
		پرایمرها توالی	ریورس و فوروارد پرایمر ژن هر برای fgf8، F: (مثال) است شده طراحی TGCACCTTCAGTGAAGTGA، R: AGTGGTGTGATGGCGTTGT)
		PCR محصول اندازه	باز جفت 165 تا 130 بین
۳	برداری نمونه مراحل	برداری نمونه زمان	از پس 0، 3، 7، 14، 21 و 28 روزهای اندام قطع
		استفاده مورد های روش	RNA، IHC، استخراج تصویربرداری، qRT-PCR، RNA-seq، آمیزی رنگ Masson
		هانمونه نوع	شده بازسازی اندام تا اولیه بلاستمای از (اندام قطع از پس هفته چهار)

۲- افزایش بیان ژن های کلیدی در مراحل مختلف بازسازی

تحلیل qRT-PCR و RNA-seq نشان داد که بیان ژن های مربوط به مسیرهای سیگنال دهی کلیدی به طور معنی داری در بلاستما نسبت به بافت نرمال افزایش یافته اند:

به ویژه، افزایش بیان *fgf8* و *wnt5a* با آغاز تکثیر سلول های پیش ساز همزمان بود که نقش کلیدی در القای رشد بلاستما ایفا می کند.



۳- شناسایی سلول‌های بنیادی و پیش‌ساز در بافت بازسازی‌شونده

مطالعه با ایمونوهیستوشیمی نشان داد که نشانگرهای Sox2 و Pax7 در سلول‌های ناحیه بلاستما از روز ۳ به بعد به‌طور گسترده بیان می‌شوند. تصاویر فلورسانس دوگانه نشان داد که:

- درصد سلول‌های Sox2+ در بلاستما میانی حدود $32\% \pm 3.4$ بود.
- سلول‌های Pax7+ به‌ویژه در ناحیه تمایز عضلانی در روز ۷ و ۱۴ افزایش داشتند. ($24\% \pm 2.1$)
- مارکر تکثیر PCNA نیز در بیش از ۴۵٪ سلول‌ها در روز ۷ بیان شده بود که نشانگر فعال بودن چرخه سلولی در این مرحله است.

۴- تحلیل بافت‌شناسی و بازسازی ساختارهای اختصاصی

بررسی مقاطع رنگ‌آمیزی‌شده با H&E و Masson's Trichrome نشان داد:

- در روز ۱۴، حضور ساختارهای اولیه عضله، عروق خونی و عصب قابل تشخیص بود.
- بافت پیوندی منظم و الیاف کلاژنی تازه شکل گرفته، بیانگر بازسازی ECM (ماتریکس خارج سلولی) فعال بودند.
- تا روز ۲۸، معماری بافتی اندام تقریباً مشابه اندام سالم بود.

۵- الگوی زمانی مسیرهای سیگنال‌دهی و تنظیم اپی‌ژنتیکی

تحلیل RNA-seq در مراحل مختلف، فعال‌سازی پویا در مسیرهای TGF- β ، VEGF و PI3K/Akt را آشکار ساخت. این فعال‌سازی همبستگی بالایی با افزایش بیان ژن‌های *sox2*، *klf4* و *nanog* داشت. همچنین، بررسی سطح متیلاسیون پروموتور *msx1* در روز ۷ کاهش معنی‌داری نشان داد ($p < 0.05$)، که نشان‌دهنده نقش تنظیم اپی‌ژنتیک در القای بازسازی است.

۶- خلاصه نتایج

- تشکیل بلاستما در اکسولوتل طی سه مرحله قابل تفکیک شامل بلاستمای اولیه، میانی و بالغ انجام می‌گیرد.
- مسیرهای سیگنال‌دهی FGF، Wnt و Notch نقش کلیدی در آغاز و پیشرفت بازسازی ایفا می‌کنند.
- سلول‌های Sox2+ و Pax7+ به‌عنوان نشانگرهای سلول‌های بنیادی و پیش‌ساز فعال شناسایی شدند.
- ECM و ساختارهای عملکردی مانند عروق و عصب به‌طور مؤثری بازسازی شدند.
- تغییرات اپی‌ژنتیکی با تنظیم بیان ژن‌های کلیدی در بازسازی مرتبط هستند.

۴- بحث

یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که فرآیند بازسازی اندام در اکسولوتل یک سلسله رخدادهای سلولی و مولکولی است که به‌صورت مرحله‌ای و هماهنگ انجام می‌شود. این فرآیند تحت کنترل سیگنال‌دهی سیستماتیک، فعال‌سازی سلول‌های بنیادی و تنظیمات اپی‌ژنتیکی قرار دارد. در مراحل اولیه، تشکیل بلاستما به‌عنوان ساختار اصلی بازسازی با مهاجرت سلول‌های اپیدرمی و تجمع سلول‌های مزانشیمی همراه است. این نتایج با مشاهدات مطالعات Kawakami و همکاران و Sandoval-Guzmán و همکاران همخوانی دارد. [۱-۳] افزایش بیان ژن‌هایی مانند *fgf8*، *msx1* و *wnt5a* در منطقه بلاستما، فعال شدن مسیرهای FGF و Wnt را نشان می‌دهد که در فرآیندهایی مثل تمایز، تکثیر و حفظ توانایی بازسازی نقش اساسی ایفا می‌کنند. این نتایج از نظر الگوی زمانی و میزان بیان با تحقیقات قبلی روی گونه‌هایی مثل *Notophthalmus viridescens* و *Xenopus* هماهنگ است. [۹] شناسایی سلول‌های Sox2+ و Pax7+ در بلاستما نشان‌دهنده حضور سلول‌های بنیادی عصبی و پیش‌سازهای عضلانی است. این یافته‌ها با



گزارش Kragl و همکاران همخوانی دارد. [۱۰] مطالعات نشان داده‌اند که سلول‌های بلاستما با حفظ هویت بافتی اولیه خود، از طریق فرآیند تبدیل به حالت پیش‌ساز بازمی‌گردند. علاوه بر این، بیان بالای مارکر تکثیر PCNA در این ناحیه نشان‌دهنده فعالیت قوی چرخه سلولی و تقسیم سریع سلول‌ها است. در سطح تنظیم اپی‌ژنتیکی، کاهش متیلاسیون در ناحیه پروموتور ژن msx1 طی مرحله فعال‌سازی بلاستما مشاهده شده است که نشان‌دهنده اهمیت تغییرات اپی‌ژنتیکی در بازبرنامه‌ریزی فرایند رشد و تمایز به شمار می‌رود. این یافته با نتایج پژوهش Abo-Al-Elia و [7] Burgos-Aceves همخوانی دارد. [۷] بر نقش دینامیک اپی‌ژنومی در بیان ژن‌های مربوط به بازسازی تأکید شده است. از نظر بالینی، فهم عمیق این مسیرها و مکانیزم‌ها می‌تواند منجر به طراحی استراتژی‌های درمانی جدید شود. شبیه‌سازی مسیرهای Wnt و FGF، تحریک سلول‌های بنیادی در محیط‌های *in vitro* یا *in vivo*، و استفاده از تعدیل‌کننده‌های اپی‌ژنتیکی می‌توانند در درمان آسیب‌های نخاعی، نارسایی قلبی یا تحلیل عضلانی مؤثر باشند. با وجود تفاوت‌های تکاملی میان دوزیستان و پستانداران، شباهت مسیرهای همولوگ در هر دو گروه، استفاده از مدل اکسولوتل را در توسعه پزشکی بازساختی ممکن می‌سازد.

۵- محدودیت‌ها و پیشنهادها

از جمله محدودیت‌های این پژوهش، تمرکز بر سطوح ژنی و بافتی است که نیازمند مکمل شدن با تحلیل‌های عملکردی ژن مانند (CRISPR/Cas9 و مدل‌های knockdown) برای درک دقیق‌تر عملکرد مسیرهای خاص می‌باشد. همچنین بررسی نقش سیستم ایمنی در فرآیند بازسازی، که اخیراً در برخی مطالعات مورد توجه قرار گرفته، می‌تواند به تکمیل دیدگاه ما در این حوزه کمک کند.

۶- نتیجه‌گیری نهایی

مطالعه حاضر تصویری جامع از فرآیند بازسازی اندام در اکسولوتل ارائه می‌دهد و نقش حیاتی مسیرهای سیگنال‌دهی کلیدی، سلول‌های بنیادی، و تنظیمات اپی‌ژنتیکی را در این پدیده بی‌نظیر تبیین می‌نماید. داده‌های حاصل از تحلیل‌های مولکولی و بافتی نشان می‌دهند که مسیرهای FGF، Wnt و Notch با هدایت تکثیر و تمایز سلولی، به همراه کاهش متیلاسیون نواحی تنظیمی ژن‌های بازسازی، نقش هماهنگ‌کننده‌ای در شکل‌گیری و عملکرد بلاستما ایفا می‌کنند.

شناسایی سلول‌های پیش‌ساز متعدد در نواحی بازسازی و الگوی زمانی بیان ژن‌ها نشان می‌دهد که بازسازی در اکسولوتل نه یک پاسخ غیرفعال به آسیب، بلکه یک برنامه ژنتیکی-تکاملی فعال و سازمان‌یافته است. از سوی دیگر، شباهت بسیاری از این مسیرها با انسان، اکسولوتل را به مدلی ارزشمند برای کشف اهداف درمانی جدید در حوزه پزشکی بازساختی تبدیل کرده است. یافته‌های این پژوهش پایه‌ای علمی برای توسعه راهکارهای درمانی نوآورانه در درمان بیماری‌های تحلیل‌برنده، آسیب‌های عصبی و نارسایی اندام‌ها فراهم می‌آورد. با توسعه ابزارهای ژنومیکی، تصویربرداری پیشرفته و مدل‌سازی عملکردی، آینده‌ی پژوهش در این حوزه می‌تواند به سمت ترجمه بالینی این مکانیسم‌ها برای ارتقاء کیفیت زندگی انسان گام بردارد.

۷- تشکر و قدردانی

نگارندگان این مقاله بر خود لازم می‌دانند از همکاری و حمایت صمیمانه‌ی مسئولین و کارکنان مرکز تحقیقات بیماری‌های آبزیان، تشکر مینمایند.

۸- تضاد منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچگونه تضاد منافع، اعم از مالی یا غیرمالی، در رابطه با این پژوهش وجود ندارد.



منابع

- [1] Sandoval-Guzmán, T., Wang, H., Khattak, S., Schuez, M., Roensch, K., Nacu, E., ... & Tanaka, E. M. (2023). Axolotl limb regeneration: cellular and molecular mechanisms. *Current Opinion in Genetics & Development*, 78, 102050.
- [2] Tanaka, E. M. (2016). The molecular and cellular choreography of appendage regeneration. *Cell*, 165(7), 1598–1608.
- [3] Joven, A., Elewa, A., & Simon, A. (2019). Model systems for regeneration: Axolotl. *Developmental Biology*, 448(2), 265–275.
- [4] Whited, J. L., & Tabin, C. J. (2009). Regeneration redefined. *Nature*, 460(7251), 39–40.
- [5] Nowoshilow, S., Schloissnig, S., Fei, J. F., Dahl, A., Pang, A. W., Pippel, M., ... & Myers, E. W. (2018). The axolotl genome and the evolution of key tissue formation regulators. *Nature*, 554(7690), 50–55.
- [6] Kawakami, Y., Rodriguez Esteban, C., Raya, M., Kawakami, H., Martí, M., Dubova, I., & Izpisua Belmonte, J. C. (2006). Wnt/ β -catenin signaling regulates vertebrate limb regeneration. *Genes & Development*, 20(23), 3232–3237.
- [7] Nacu, E., & Tanaka, E. M. (2011). Limb regeneration: a new development?. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27, 409–440.
- [8] Abo-Al-Ela, H. G., & Burgos-Aceves, M. A. (2021). Non-coding RNAs in regeneration: Mechanistic insights and future perspectives. *Journal of Experimental Biology*, 224, jeb242650.
- [9] Kragl, M., Knapp, D., Nacu, E., Khattak, S., Maden, M., Epperlein, H. H., & Tanaka, E. M. (2009). Cells keep a memory of their tissue origin during axolotl limb regeneration. *Nature*, 460(7251), 60–65.
- [10] Tanaka, E. M., & Reddien, P. W. (2011). The cellular basis for animal regeneration. *Developmental Cell*, 21(1), 172–185.