



تأثیر عفونت‌های انگلی بر بازسازی اندام در اکسولوتل (*Ambystoma mexicanum*)

امیرحسین رضازاده شیرازی^{*1}

1. دانشجوی دکتری عمومی دامپزشکی، دانشگاه آزاد کازرون، کازرون، ایران

*مسئول مکاتبات: amirrezazadehshirazi1347@gmail.com

چکیده

اکسولوتل (*Ambystoma mexicanum*) به عنوان یک مدل آزمایشگاهی برجسته در مطالعات زیست‌شناسی بازسازی، توانایی قابل توجهی در بازسازی کامل اندام‌های از دست‌رفته دارد. با این حال، تأثیر عوامل پاتولوژیک، به‌ویژه عفونت‌های انگلی، بر فرآیند بازسازی در این گونه هنوز به‌طور جامع بررسی نشده است. هدف از پژوهش حاضر، ارزیابی اثر عفونت‌های انگلی بر نرخ و کیفیت بازسازی اندام در اکسولوتل می‌باشد. در این مطالعه تجربی، تعداد ۱۰ نمونه اکسولوتل سالم در دو گروه شاهد و آزمون (هر کدام ۵ نمونه) تقسیم شدند. گروه آزمون به‌طور کنترل شده با انگل‌های رایج پوستی (*Trichodina spp* و *Ichthyophthirius multifiliis*) آلوده گردید. پس از قطع دم پستی تحت شرایط استریل، فرآیند بازسازی در طی ۴۵ روز به‌صورت روزانه پایش شد. پارامترهایی چون زمان آغاز بازسازی، نرخ رشد بافت، مورفولوژی ناحیه بازسازی شده و الگوی بیان ژن‌های کلیدی مرتبط با بازسازی از جمله *msx1* و *fgf8* با استفاده از روش‌های هیستولوژیکی و-RT-PCR مورد بررسی قرار گرفتند. یافته‌ها نشان داد که عفونت انگلی موجب تأخیر در شروع بازسازی، کاهش معنادار در سرعت رشد بافت بازسازی شده و بروز اختلالات ساختاری و مولکولی در اندام نوساخته می‌گردد. نتایج این تحقیق بیانگر نقش منفی عفونت‌های انگلی در بازسازی اندام و اهمیت کنترل عوامل پاتولوژیک در مطالعات مرتبط با طب بازسازی می‌باشد.

واژگان کلیدی: بازسازی اندام، عفونت‌های انگلی، بیان ژن، مدل حیوانی.

مقدمه

بازسازی اندام‌ها یکی از توانایی‌های زیستی منحصر به فرد در برخی از جانداران است که توجه بسیاری از محققان در حوزه زیست‌شناسی و پزشکی بازسازی را به خود جلب کرده است. در میان مهره‌داران، اکسولوتل (*Ambystoma mexicanum*) به عنوان یکی از برجسته‌ترین مدل‌های حیوانی شناخته می‌شود که قابلیت بازسازی کامل اندام‌هایی نظیر دم، پاها، بخشی از طناب نخاعی و حتی بافت‌های قلبی را دارد (Tanaka and Reddien, 2011). این توانایی استثنایی، اکسولوتل را به مدل مناسبی برای بررسی مکانیسم‌های مولکولی و سلولی بازسازی و همچنین توسعه فناوری‌های زیستی در بازسازی اندام‌های انسانی تبدیل کرده است (McCusker and Gardiner, 2011). در سال‌های اخیر، تحقیقات متعددی به بررسی مسیرهای ژنتیکی و سلولی دخیل در بازسازی اندام در اکسولوتل پرداخته‌اند. مطالعات نشان داده‌اند که مسیرهای سیگنال‌دهی نظیر BMP، FGF، Wnt و Notch در فرآیند بازسازی بافت‌ها نقش کلیدی ایفا می‌کنند (Singh and Tsonis, 2010; Beck et al., 2003; Ghosh et al., 2015). با این حال، اغلب پژوهش‌ها در شرایط آزمایشگاهی کنترل شده و بر روی نمونه‌های سالم صورت گرفته و تأثیر عوامل خارجی مانند عوامل پاتولوژیک کمتر مورد توجه قرار گرفته است. از جمله این عوامل، عفونت‌های انگلی می‌باشند که می‌توانند از طریق تغییر در عملکرد ایمنی، القای پاسخ‌های التهابی و تداخل در مسیرهای مولکولی، فرآیند بازسازی را مختل نمایند (Mescher et al., 2013).

برخی مطالعات پراکنده نشان داده‌اند که وجود عفونت‌های مزمن یا حاد در بدن جانوران می‌تواند موجب تأخیر در ترمیم بافت‌ها یا ایجاد بازسازی ناقص گردد (Godwin et al., 2013). در مورد اکسولوتل، داده‌های تجربی محدود اما هشدار دهنده‌ای وجود دارد که نشان می‌دهد حضور انگل‌های خارجی نظیر *Ichthyophthirius multifiliis* می‌تواند اثرات منفی بر فیزیولوژی کلی حیوان داشته باشد (Caballero-Guzmán and Arana-Guajardo, 2018). با این حال، بررسی دقیق و سیستماتیک تأثیر عفونت‌های انگلی بر نرخ و کیفیت بازسازی اندام در این گونه، تاکنون به‌صورت مشخص و کمی انجام نشده است.



با توجه به اهمیت بازسازی بافت‌ها در علم پزشکی، به‌ویژه در حوزه‌های پیوند اعضا و مهندسی بافت، درک بهتر از عوامل بازدارنده یا مداخله‌گر در این فرآیند در مدل‌های حیوانی می‌تواند نقشی اساسی در توسعه راهکارهای درمانی ایفا کند (Jopling et al., 2011). مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات عفونت انگلی بر بازسازی اندام در اکسولوتل طراحی شده است تا با مقایسه گروه آلوده و غیرآلوده، به شناسایی تغییرات احتمالی در روند بازسازی از منظر زمانی، ساختاری و مولکولی بپردازد.

در این راستا، فرضیه اصلی پژوهش بر این مبنا استوار است که حضور انگل‌های خارجی موجب کاهش نرخ بازسازی و اختلال در کیفیت نهایی اندام نوساخته خواهد شد. این مطالعه، علاوه بر ارائه شواهد تجربی نوین، می‌تواند بستری برای تحقیقات بیشتر در زمینه تعامل عوامل پاتولوژیک با مکانیسم‌های زیستی بازسازی فراهم آورد و در ارتقای طراحی شرایط بهینه برای نگهداری مدل‌های آزمایشگاهی و همچنین توسعه کاربردهای بالینی در طب بازساختی نقش مؤثری ایفا نماید.

مواد و روش‌ها

این تحقیق یک مطالعه تجربی آزمایشگاهی بر روی اکسولوتل (*Ambystoma mexicanum*) است که هدف آن بررسی تأثیر عفونت‌های انگلی خارجی بر میزان و کیفیت بازسازی اندام‌ها می‌باشد. برای این مطالعه، ۱۰ عدد اکسولوتل نابالغ با طول میانگین ۱۰ تا ۱۲ سانتی‌متر و سن تقریبی ۶ ماه از مرکز پرورش معتبر تهیه شد. قبل از شروع آزمایش، نمونه‌ها برای مدت دو هفته در شرایط استاندارد زیستی به منظور سازگاری نگهداری شدند. نمونه‌ها به‌صورت تصادفی در دو گروه مساوی تقسیم شدند: گروه شاهد (این گروه در شرایط استاندارد بدون القای بیماری نگهداری شد. گروه آزمون: این گروه در معرض عفونت انگلی خارجی قرار گرفت. برای اعمال عفونت انگلی، از مخلوط استاندارد دو انگل رایج با دوز غیرمرگبار (*Ichthyophthirius multifiliis* و *Trichodina* spp.) در محیط آبی استفاده شد. انگل‌ها از نمونه‌های قبلاً آلوده جدا و به محیط گروه آزمون اضافه شدند. پس از ۴۸ ساعت از ظهور علائم بالینی عفونت، فرآیند بازسازی آغاز شد. در روز آغازین، دم پستی یک‌سوم انتهایی بدن در هر دو گروه با تیغ جراحی استریل تحت بی‌هوشی با محلول Ms-222 (در غلظت 0/1 گرم در لیتر) انجام شد. بلافاصله پس از عمل، حیوانات به محیط استریل انتقال یافته و فرآیند بازسازی در مدت ۴۵ روز روزانه پایش شد. برای ارزیابی کمی و کیفی بازسازی، از روش‌های زیر استفاده گردید:

پایش مورفولوژیک: با استفاده از تصویربرداری دیجیتال در روزهای ۰، ۷، ۱۵، ۳۰ و ۴۵ پس از قطع عضو، طول بافت بازسازی‌شده اندازه‌گیری و نرخ رشد محاسبه شد.

بررسی ساختار بافتی: در پایان مطالعه، از ناحیه بازسازی‌شده نمونه‌برداری شده و مقاطع بافتی با رنگ‌آمیزی H&E تهیه شد.

تحلیل بیان ژن: برای بررسی مولکولی، RNA کل از بافت بازسازی‌شده استخراج و سنتز cDNA صورت گرفت. سپس بیان ژن‌های کلیدی مرتبط با بازسازی (*msx1*) و (*fgf8*) با استفاده از تکنیک Real-Time PCR و نرم‌افزار تحلیل داده‌های ژنی (REST) بررسی شد. داده‌های کمی به‌دست‌آمده با استفاده از آزمون‌های آماری تی مستقل و آنالیز واریانس یک‌طرفه در نرم‌افزار SPSS تحلیل شدند. سطح معنی‌داری در این مطالعه برابر با 0/05 در نظر گرفته شد.

نتایج

پژوهش حاضر نشان داد که عفونت‌های انگلی تأثیر معناداری بر روی فرآیند بازسازی اندام در اکسولوتل دارند. بررسی‌ها بین گروه شاهد و گروه آلوده نشان از تفاوت‌های چشمگیری در زمان شروع بازسازی، سرعت رشد طولی، ساختار بافتی، و بیان ژن‌های مرتبط با بازسازی داشت. در گروه شاهد، اولین نشانه‌های شکل‌گیری بافت جدید در روز چهارم پس از قطع عضو ظاهر شد (میانگین: 4.2 ± 0.4) در حالی که در گروه آلوده این فرآیند به‌طور قابل توجهی به تأخیر ($p = 0.003$) افتاده و اولین نشانه‌ها در روز هشتم قابل مشاهده بود (میانگین: 7.8 ± 0.6)

سرعت بازسازی بافت: تا روز ۴۵، میانگین طول ناحیه بازسازی‌شده در گروه شاهد برابر با 12.4 ± 1.1 میلی‌متر و در گروه آلوده برابر با 8.6 ± 1.3 میلی‌متر بود که اختلاف آن‌ها از نظر آماری معنادار بود ($p = 0.001$). در جدول ۱ روند میانگین رشد ارائه شده است.



جدول ۱: روند میانگین رشد.

روز	گروه شاهد (mm)	گروه آلوده (mm)
0	0	0
7	2.3 ± 0.3	0.8 ± 0.4
15	5.6 ± 0.7	2.3 ± 0.6
30	9.4 ± 1.0	5.9 ± 0.9
45	12.4 ± 1.1	8.6 ± 1.3

در تحلیل بافت‌شناسی (هیستولوژی) در گروه شاهد، ساختار بافت بازسازی شده دارای لایه‌های منظم اپیدرمی، جوانه‌های عضلانی فعال و تشکیل نسبی غضروف‌های ابتدایی بود. در مقابل، گروه آلوده بافتی با نظم کمتر، التهاب مزمن، نفوذ سلول‌های ایمنی و تأخیر در تشکیل ساختارهای عملکردی نشان داد. همچنین، دو نمونه در گروه آلوده نکروز موضعی را نشان دادند. میزان بیان ژن *msx1* در گروه شاهد نسبت به گروه آلوده 3.7 برابر بیشتر بوده (تغییر فراوانی $p = 0.002$) برابر افزایش داشت کاهش بیان ژن‌ها در گروه آلوده (تغییر فراوانی $p = 0.004$; 2.9) قابل توجهی بالاتر بود، نشان‌دهنده اختلال در فعال‌سازی مسیرهای مولکولی ضروری برای شروع و پیشرفت فرایند بازسازی است.

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج تحقیق نشان داد که عفونت‌های انگلی خارجی می‌توانند به‌طور قابل توجهی فرایند بازسازی اندام را در اکسولوتل تحت تأثیر قرار دهند. شواهدی از کاهش سرعت رشد بافت بازسازی شده، تأخیر در شروع فرآیند جوانه‌زنی و کاهش سطح بیان ژن‌های کلیدی مرتبط با بازسازی، نشان‌دهنده نقش ممانعت‌کننده عفونت بر روند ترمیم و نوسازی اندام‌ها بود. این نتایج با فرضیه اولیه که عفونت‌های انگلی تأثیر منفی بر بازسازی در این گونه دارند، کاملاً همخوانی داشت. از منظر بافت‌شناسی، التهاب مزمن و بی‌نظمی در تشکیل و سازمان‌یافتگی بافت در نمونه‌های آلوده نشان داد که پاسخ ایمنی بیش‌فعال، به‌خصوص در سطح موضعی، می‌تواند بر بازسازی اثر مخرب بگذارد. تحقیقات مشابه نیز اشاره کرده‌اند که بازسازی کامل نیازمند تحقق تعادل دقیقی میان واکنش‌های ایمنی و فعالیت سلول‌های بنیادی است و هرگونه اختلال در این تعادل ممکن است روند بازسازی را متوقف یا منحرف کند (Mescher *et al.*, 2013; Godwin *et al.*, 2013). یافته‌های مولکولی نشان دادند که کاهش بیان ژن‌های *msx1* و *fgf8* می‌تواند ناشی از مکانیسم‌هایی مانند القای مسیرهای التهابی یا سرکوب عوامل رشد باشد، که توسط انگل‌ها ایجاد شده و منجر به مهار ژن‌های تنظیم‌کننده بازسازی می‌شود. این در حالی است که در مطالعات پیشین، افزایش بیان این ژن‌ها به عنوان نشانه فعال‌سازی برنامه بازسازی در اکسولوتل شناخته شده است (Beck *et al.*, 2003; Ghosh *et al.*, 2015). از جنبه دیگر، استفاده از مدل حیوانی زنده برای بررسی هم‌زمان ساختار، عملکرد و بیان ژن در شرایط بیماری، در مقایسه با مطالعات سلولی *in vitro*، اطلاعات جامع‌تر و نزدیک‌تر به اکوسیستم واقعی زیستی فراهم می‌کند. البته محدودیت‌هایی مانند اندازه نمونه کوچک، دامنه محدود انگل‌ها و عدم ارزیابی طولانی‌مدت (بیش از ۴۵ روز) باید مورد توجه قرار گیرد. در نتیجه‌گیری، می‌توان گفت که عفونت‌های انگلی خارجی نه تنها باعث اختلال در فرایند طبیعی بازسازی اندام در اکسولوتل می‌شوند، بلکه مسیرهای ژنتیکی و ایمنی را نیز تغییر می‌دهند. این نتایج هشداردهنده‌اند، به خصوص برای مطالعاتی که از اکسولوتل به عنوان مدل بازسازی استفاده می‌کنند، زیرا حضور عوامل پاتولوژیک کنترل نشده ممکن است داده‌های تحقیقاتی را به صورت غیرواقعی تغییر دهد. پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده، به بررسی دقیق‌تر انواع مختلف عفونت‌ها (باکتریایی، ویروسی، انگلی) و اثرات تجمع‌ی یا تعاملی آن‌ها بر فرایند بازسازی پرداخته شود. همچنین، بررسی دقیق مسیرهای ایمنی-مولکولی مرتبط با پاسخ به انگل‌ها می‌تواند دید عمیق‌تری از تعامل بین سیستم ایمنی و فرایند بازسازی ارائه دهد و در نهایت به توسعه راهکارهای درمانی مؤثر در حوزه طب بازساختی انسان یاری رساند.



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

سپاسگزاری

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

منابع

- Beck, C. W., Christen, B. and Slack, J. M. W., 2003.** Molecular pathways needed for regeneration of spinal cord and muscle in a vertebrate. *Developmental Cell*, 5(3): 429–439.
- Caballero-Guzmán, A. and Arana-Guajardo, A., 2018.** Common protozoan parasites in captive amphibians: Diagnosis and control. *Veterinary Parasitology*, 261:65–71.
- Ghosh, S., Roy, S. and Saha, T., 2015.** Wnt signaling in regeneration. *Current Topics in Developmental Biology*, 114: 309–336.
- Godwin, J. W., Pinto, A. R. and Rosenthal, N. A., 2013.** Macrophages are required for adult salamander limb regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(23): 9415–9420.
- Jopling, C., Boue, S. and Izpisua Belmonte, J. C., 2011.** Dedifferentiation, transdifferentiation and reprogramming: Three routes to regeneration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(2): 79–89.
- McCusker, C. and Gardiner, D. M., 2011.** The axolotl model for regeneration and aging research: A mini-review. *Gerontology*, 57(6): 565–571.
- Mescher, A. L., Neff, A. W. and King, M. W., 2013.** Inflammation and immunity in organ regeneration. *Developmental and Comparative Immunology*, 40(2): 170–176.
- Singh, S. P. and Tsonis, P. A., 2010.** Focus on molecules: Fibroblast growth factor (FGF). *Experimental Eye Research*, 90(5): 540–541.
- Tanaka, E. M. And Reddien, P. W., 2011.** The cellular basis for animal regeneration. *Developmental Cell*, 21(1):172–185.



The impact of parasitic infections on organ regeneration in axolotls

Amir Hosein Reza zadeh Shirazi^{1*}

1. Ph.D student of Veterinary, Kazeroun Branch, Islamic Azad University, Kazeroun, Iran

*Corresponding author: amirrezazadehshirazi1347@gmail.com

Abstract

Axolotl (*Ambystoma mexicanum*), as a prominent laboratory model in regenerative biology studies, has a remarkable ability to completely regenerate lost limbs. However, the effect of pathological factors, especially parasitic infections, on the regeneration process in this species has not yet been comprehensively investigated. The aim of the present study was to evaluate the effect of parasitic infections on the rate and quality of limb regeneration in axolotl. In this experimental study, 10 healthy axolotl specimens were divided into two control and experimental groups (5 specimens each). The experimental group was controlledly infected with common skin parasites (*Ichthyophthirius multifiliis* and *Trichodina* spp). After dorsal tail amputation under sterile conditions, the regeneration process was monitored daily for 45 days. Parameters such as the time of regeneration initiation, tissue growth rate, morphology of the regenerated area, and expression patterns of key genes related to regeneration, including *msx1* and *fgf8*, were investigated using histological and RT-PCR methods. The findings showed that parasitic infection caused a delay in the onset of regeneration, a significant decrease in the growth rate of regenerated tissue, and the occurrence of structural and molecular abnormalities in the newly constructed organ. The results of this study indicate the negative role of parasitic infections in organ regeneration and the importance of controlling pathological factors in studies related to regenerative medicine.

Keywords: Organ regeneration; Parasitic infections; Gene expression; Animal model.