Journal of Marin Biology

JOMB
Journal of Marin Biology
J Marin Bio, 2024; 16(3): 71-80 Doi
https://jmb.ahvaz.iau.ir

Islamic Azad university
Ahvaz Branch

Original Article

Deep Learning-Based Analysis of Axolotl Limb Regeneration

Amirhossin Rezazadehshirazi[1], Sara Mehboudi[2], Mohammad Tarahomi[3*]

1. Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Kazerun Branch, Fars, Iran.
2. Faculty of Nursing, Islamic Azad University, Kazerun, Fars, Iran.
3. Aquatic Animal Disease Health Group, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Kazerun Branch, Fars, Iran

Article history:

Received: 20 September 2024
Revised: 27 November 2024
Accepted: 30 November 2024
ePublished: 30 November 2024

***Corresponding author:** Mohammad Tarahomi, Aquatic Animal Disease Health Group, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Kazerun Branch, Fars, Iran.

E-mail: motarahomi2225@iau.ir

Abstract

Regeneration of complex organs in adult vertebrates is one of the most challenging biomedical issues. Among them, the axolotl (Ambystoma mexicanum) as a unique model with the ability to completely regenerate motor organs, spinal cord, heart, and brain has provided a valuable platform for studying the biological mechanisms of regeneration. This study was designed to comprehensively and multi-layeredly analyze the process of organ regeneration in axolotl and focused on investigating cellular dynamics, signaling pathway activity, and genetic and epigenetic regulation. Sampling was performed at different phases of regeneration (days 0, 3, 7, 14, 21, 28). Histological, immunohistochemical, qRT-PCR, and RNA-seq studies were used to analyze the expression of key genes such as fgf8, msx1, wnt5a, and notch1. The results showed that the FGF, Wnt, and Notch pathways play a pivotal role in blastema formation and activation of stem and progenitor cells. Also, transcriptomic analysis revealed that the regulation of gene expression is influenced by the interaction between endogenous factors, environmental signals, and epigenetic mechanisms. The findings indicate a complex coordination between the extracellular matrix, immune responses, and signaling pathways in successful organ regeneration. By drawing a detailed view of the biological mechanisms of regeneration in axolotl, this study provides a new perspective for the development of regenerative therapies in humans and is an effective step towards translational applications of regenerative biology.

Keywords: axolotl, organ regeneration, stem cells

Please cite this article as follows: Rezazadehshirazi A., Mehboudi S., Tarahomi M. Deep Learning-Based Analysis of Axolotl Limb Regeneration. J Mar Bio, 2024; 16(3): 71–80. DOI:

Copyright © 2024 Journal of Marin Biology. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (*http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/*) which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cite

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2026-06-07]

JOMB
مجله زیست شناسی دریا
دوره ۱۶، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۳، صفحات: ۷۱-۸۰
https://jmb.ahvaz.iau.ir

مقاله اصلی

تحلیل بازسازی اندام در اکسولوتل با رویکرد یادگیری عمیق چندلایه

امیرحسین رضازاده شیرازی[۱]، سارا مهبودی[۲]، محمد ترحمی[۳*]

۱. دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، فارس، ایران.
۲. دانشکده پرستاری، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، فارس، ایران.
۳. گروه بهداشت بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، فارس، ایران.

چکیده

بازسازی اندام‌های پیچیده در مهره‌داران بالغ، یکی از چالش‌برانگیزترین مسائل زیست‌پزشکی محسوب می‌شود. در این میان، اکسولوتل (*Ambystoma mexicanum*) به‌عنوان 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 *fgf8*, *msx1*, *wnt5a* و *notch1* به‌کار رفت. نتایج نشان داد مسیرهای *FGF*، *Wnt* و *Notch* نقش محوری در تشکیل بلاستما و فعال‌سازی سلول‌های بنیادی و پیش‌ساز دارند. همچنین، آنالیز ترنسکریپتومی آشکار ساخت که تنظیم بیان ژن‌ها تحت تأثیر تعامل بین فاکتورهای درون‌زاد، سیگنال‌های محیطی و مکانیسم‌های اپی‌ژنتیکی قرار دارد. یافته‌ها نشان‌دهنده‌ی 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.

واژگان کلیدی: اکسولوتل، بازسازی اندام، سلول‌های بنیادی

تاریخچه مقاله
تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۶/۳۰
تاریخ ویرایش مقاله: ۱۴۰۳/۹/۷
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۳/۹/۱۰
تاریخ انتشار مقاله: ۱۴۰۳/۹/۱۰

تمامی حقوق برای دانشگاه آزاد اهواز محفوظ است.

* نویسنده مسئول: محمد ترحمی، گروه بهداشت بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، فارس، ایران.

ایمیل: motarahomi2225@iau.ir

استناد: رضازاده شیرازی، امیرحسین؛ مهبودی، سارا؛ ترحمی، محمد. تحلیل بازسازی اندام در اکسولوتل با رویکرد یادگیری عمیق چندلایه. مجله زیست شناسی دریا، بهار ۱۴۰۳؛ ۱۶(۳): ۷۱-۸۰

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2026-06-07]

JOMB
مجله زیست شناسی دریا
دوره ۱۶، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۳، صفحات: ۷۱-۸۰
https://jmb.ahvaz.iau.ir

مقدمه

بازسازی بافت‌ها و اندام‌های آسیب‌دیده یکی از جذاب‌ترین و امیدبخش‌ترین حوزه‌ها در علوم زیستی و پزشکی بازساختی محسوب می‌شود. این توانایی در درمان بیماری‌های تحلیل‌برنده، ضایعات شدید نخاعی، نارسایی اندام‌ها، و سوختگی‌های گسترده اهمیت ویژه‌ای دارد (Sandoval-Guzmán et al., 2023). با این حال، ظرفیت طبیعی بازسازی در گونه‌های مختلف بسیار متفاوت است. انسان و اکثر مهره‌داران توانایی محدودی در ترمیم دارند و معمولاً با تشکیل اسکار، عملکرد بافت از دست رفته به‌طور کامل بازیابی نمی‌شود. در مقابل، برخی دوزیستان مانند اکسولوتل (*Ambystoma mexicanum*)، با قابلیت استثنایی بازسازی اندام‌های پیچیده شامل اندام‌های حرکتی، نخاع، قلب و حتی بخش‌هایی از مغز، به مدلی کلیدی برای مطالعه سازوکارهای بازسازی در مهره‌داران تبدیل شده‌اند (Tanaka, 2016; Joven et al., 2019).

اهمیت مدل اکسولوتل در بازسازی

اکسولوتل به‌دلیل ویژگی‌های منحصربه‌فرد زیستی و ژنتیکی خود، ابزار قدرتمندی برای کشف مکانیسم‌های بازسازی محسوب می‌شود. این گونه قادر است در صورت قطع عضو، فرآیندی پیچیده شامل ترمیم زخم بدون تشکیل اسکار، ددفرانسیاسیون سلولی، تشکیل بلاستما، و در نهایت بازسازی ساختار کامل بافتی و عملکردی را انجام دهد (Whited & Tabin, 2009). مطالعات ژنومی اخیر نشان داده‌اند که اکسولوتل دارای ژنومی بسیار بزرگ و پیچیده (حدود ۳۲ گیگاباز)، با وجود بخش‌های همولوگ به ژنوم انسان، است که همین امر آن را برای مطالعات مربوط به بازسازی در مقیاس سیستماتیک ارزشمند می‌کند (Nowoshilow et al., 2018).

مراحل بازسازی اندام در اکسولوتل

فرآیند بازسازی اندام در اکسولوتل شامل مراحل متوالی است. نخست، پس از آسیب، لایه‌ای از اپی‌تلیوم زخم تشکیل می‌شود که نقش حیاتی در ارسال سیگنال‌های القایی برای بازسازی دارد. سپس، سلول‌های بافت‌های مختلف در ناحیه آسیب‌دیده وارد مرحله ددفرانسیاسیون شده و حالت پلاستیک‌تری به خود می‌گیرند. این سلول‌ها به تشکیل بلاستما کمک می‌کنند؛ ساختاری شبه‌جنینی که نقطه آغاز نوساخت بافت‌های مختلف است (Nacu & Tanaka, 2011). در ادامه، تحت تأثیر شبکه‌های سیگنال‌دهی و فاکتورهای رشد، سلول‌های بلاستما به انواع سلول‌های اختصاصی تمایز یافته و اندام جدید شکل می‌گیرد (Tanaka & Reddien, 2011).

مسیرهای مولکولی کلیدی در بازسازی

در سطح مولکولی، بازسازی اندام به واسطه تعامل پیچیده مسیرهای سیگنال‌دهی کلیدی انجام می‌شود. مسیر *Wnt/β-catenin* برای تنظیم دفرانسیاسیون سلولی و حفظ حالت پیش‌ساز نقش اساسی دارد (Kawakami et al., 2006). مسیر FGF نیز با تحریک تکثیر سلول‌های بلاستما و رشد مجدد بافت ارتباط مستقیم دارد (Sandoval-Guzmán et al., 2023). علاوه بر این، مسیرهای *BMP* و *Notch* در کنترل تکامل مجدد و الگوسازی بافت نقش مهمی ایفا می‌کنند (Tanaka, 2016). در کنار این موارد، فاکتورهای مرتبط با رگزایی مانند VEGFو مسیر TGF-β در کنترل التهاب و ترمیم بافت نقش دارند (Joven et al., 2019).

نقش حافظه بافتی و اپی‌ژنتیک

یکی از یافته‌های مهم در بازسازی اکسولوتل، حفظ حافظه بافتی در سلول‌های ددفرانسیه‌شده است. مطالعات نشان داده‌اند که سلول‌ها حتی پس از بازگشت به حالت پیش‌ساز، تمایل دارند به نوع بافت اصلی خود تمایز یابند؛ این ویژگی تضمین می‌کند که ساختار بازسازی‌شده از نظر عملکردی صحیح باشد (Kragl et al., 2009). علاوه بر این، مکانیسم‌های اپی‌ژنتیکی مانند متیلاسیون DNA، تغییرات هیستونی و فعالیتRNA های غیرکدکننده نقش مهمی در تنظیم بیان ژن‌ها و هماهنگ‌سازی فرآیند بازسازی دارند (Abo-Al-Ela & Burgos-Aceves, 2021). این تغییرات امکان فعال‌سازی مجدد ژن‌های جنینی و بازبرنامه‌ریزی سلول‌ها را فراهم می‌کنند (Sandoval-Guzmán et al., 2023).

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2026-06-07]

JOMB
مجله زیست شناسی دریا
دوره ۱۶، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۳، صفحات: ۷۱-۸۰
https://jmb.ahvaz.iau.ir

تعامل سلول‌های ایمنی و *ECM* در بازسازی

نقش سیستم ایمنی در بازسازی نیز به‌طور گسترده مورد توجه قرار گرفته است. برخلاف انسان که التهاب مزمن منجر به فیبروز می‌شود، در اکسولوتل، پاسخ ایمنی کنترل‌شده شرایط را برای بازسازی بهینه فراهم می‌کند. ماکروفاژها و سایر سلول‌های ایمنی با حذف بافت نکروتیک و ترشح فاکتورهای بازسازی، به تشکیل بلاستما کمک می‌کنند (Tanaka, 2016). همچنین، ماتریکس خارج‌سلولی (*ECM*) در بازسازی اندام اکسولوتل نقش دوگانه دارد؛ از یک‌سو، ساختار مکانیکی لازم برای مهاجرت سلول‌ها را فراهم می‌کند و از سوی دیگر، با آزادسازی مولکول‌های سیگنال‌دهنده بر رفتار سلول‌های بلاستمایی اثر می‌گذارد (Sandoval-Guzmán et al., 2023).

اهمیت مطالعات سیستماتیک و چندلایه

با توجه به پیچیدگی بالای فرآیند بازسازی، مطالعات چندلایه شامل تحلیل‌های ژنومی، ترنسکریپتومی، پروتئومیک و اپی‌ژنتیک ضروری است. استفاده از فناوری‌های نوین مانند *RNA-seq*، *single-cell transcriptomics* و *CRISPR/Cas9* امکان شناسایی دقیق ژن‌ها و شبکه‌های سیگنال‌دهی کلیدی را فراهم کرده است (Nowoshilow et al., 2018). این مطالعات می‌توانند مسیرهای حیاتی و فاکتورهای مولکولی دخیل در بازسازی را مشخص کنند و زمینه‌ساز توسعه درمان‌های مبتنی بر بازسازی در انسان شوند (Sandoval-Guzmán et al., 2023).

چشم‌انداز آینده و کاربرد در پزشکی انسانی

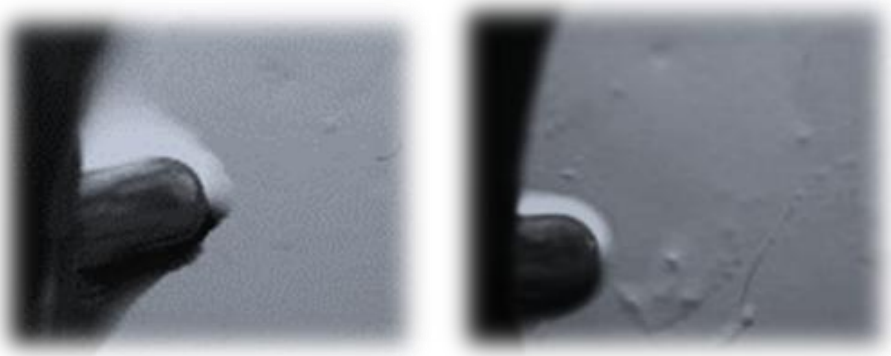
یافته‌های حاصل از مدل اکسولوتل، مسیر جدیدی را برای توسعه درمان‌های بازساختی در انسان باز کرده است. اگرچه تفاوت‌های تکاملی میان دوزیستان و پستانداران چالش‌برانگیز است، اما کشف مکانیسم‌های بنیادین بازسازی می‌تواند منجر به طراحی استراتژی‌هایی برای القای بازسازی در بافت‌های انسانی شود (Whited & Tabin, 2009). هدف نهایی این تحقیقات، انتقال دانش بنیادی به حوزه *translational medicine* و ایجاد درمان‌های نوین برای ضایعات نخاعی، نارسایی اندام و سایر آسیب‌های شدید است (Tanaka & Reddien, 2011).

شکل ۱: اکسلوتل برگرفته از سایت اتحاد زیست شناسان ایران

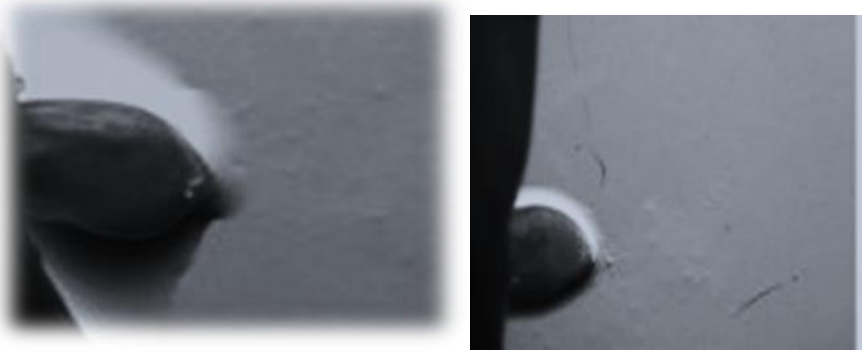
جدول تصاویر مراحل : سمت چپ گروه هدف و راست گروه کنترل در روز های اول تا ۲۴ روز در تصویر زیر اورده شده است (به دلیل محدودیت ها بخشی از تصاویر اورده شده است).

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2026-06-07]

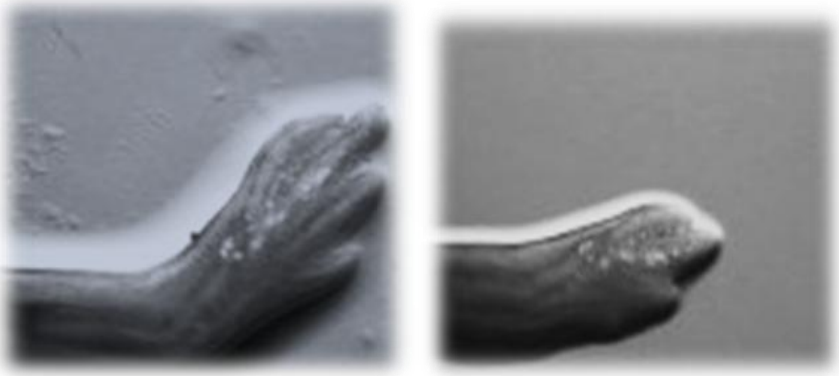
JOMB
مجله زیست شناسی دریا
دوره ۱۶، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۳، صفحات: ۷۱–۸۰
https://jmb.ahvaz.iau.ir



شکل ۲: روز اول تصویر بالا



شکل ۳: روز هفتم تصویر بالا



شکل ٤: روز ٢٤م که در گروه نهایی دست بازسازی شده شکل و حالت خود را پیدا کرده است (هرچه به انتهایی تحقیق نزدیک میشدیم تکامل بهتر رخ میداد).

مواد و روش‌ها

حیوانات و شرایط نگهداری

در این مطالعه، اکسولوتل‌های بالغ (*Ambystoma mexicanum*) با طول بدن ۹–۱۲ سانتی‌متر از مرکز پرورش حیوانات تحقیقاتی مکزیک تهیه و در سیستم گردش آب در دمای ۱۸±۰.۵ درجه سانتی‌گراد و pH بین ۷.۰ تا ۷.۵ نگهداری شدند. نوردهی به‌صورت ۱۲:۱۲ ساعت تاریکی/روشنایی و تغذیه با لارو آرتمیا سه‌بار در هفته انجام شد. کلیه زیر نظر کمیته تحقیقات علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون انجام شد.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2026-06-07]

JOMB
مجله زیست شناسی دریا
دوره ۱۶، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۳، صفحات: ۷۱-۸۰
https://jmb.ahvaz.iau.ir

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، ۷، ۱۲ و۲۴ انجام شد و با میکروسکوپ استریو تصویربرداری و اندازه‌گیری بلاستما با *ImageJ* انجام شد.

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 Trichromeآماده شدند. برای بررسی پروتئین‌های هدف از آنتی‌بادی‌های Sox2 ، Pax7 و PCNA به‌همراه آنتی‌بادی‌های فلورسنت و DAPI استفاده شد.

استخراج RNA وqRT-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 نرمال‌سازی شد.

توالی‌یابی RNA و آنالیز مسیرها

RNAنمونه‌های روزهای ۷ و ۱۴ برای RNA-seq استفاده شد. توالی‌یابی با *Illumina NovaSeq* و آنالیز داده‌ها با *STAR*، *DESeq2*، *GSEA* و *KEGG* انجام گرفت.

تحلیل آماری

داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شدند. آنالیز آماری با ANOVA یک‌طرفه و آزمون تعقیبی Tukey در GraphPad Prism 9 انجام شد ($p<0.05$) معنادار تلقی شد.

جدول ۱: خلاصه اطلاعات روش‌شناسی مطالعه‌ی بازسازی اندام در اکسولوتل

ردیف	اصلی بخش	داده نوع	جزئیات شرح
۱	هابادی‌آنتی	اولیه بادی‌آنتی	بنیادی های‌سلول ؛1:200 رقت ،Abcam خرگوش، کلونال‌پلی :Sox2 عضلانی سازپیش ؛1:100 رقت ،DSHB موش، مونوکلونال :Pax7 سلولی تقسیم ؛1:500 رقت ،CST خرگوش، مونوکلونال :PCNA
		ثانویه بادی‌آنتی	PCNA و Sox2 برای ؛1:500 رقت ،Thermo خرگوش، ضد :Alexa Fluor 488 Pax7 برای ؛1:500 رقت ،Thermo موش، ضد :Alexa Fluor 594
۲	qRT-PCR پرایمرهای	هدف های‌ژن	fgf8، msx1، wnt5a، notch1، gapdh (داخلی کنترل)
		پرایمرها توالی	fgf8، F: :مثال) است شده طراحی ریورس و فوروارد پرایمر ژن هر برای TGCACCTTCAGTGGAAGTGA، R: AGTGGTGTTGATGGCGTTGT)
		محصول اندازه PCR	باز جفت 165 تا 130 بین
۳	برداری‌نمونه مراحل	برداری‌نمونه زمان	اندام قطع از پس 28 و 21، 14، 7، 3، 0 روزهای
		مورد های‌روش استفاده	Masson آمیزی‌رنگ، RNA-seq، qRT-PCR، IHC، RNA استخراج تصویربرداری،
		هانمونه نوع	(اندام قطع از پس هفته چهار) شده‌بازسازی اندام تا اولیه بلاستمای از

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2026-06-07]

JOMB
مجله زیست شناسی دریا
دوره ۱۶، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۳، صفحات: ۷۱-۸۰
https://jmb.ahvaz.iau.ir

تحلیل جدول ۱:

۱. **مارکرهای سلولی**

استفاده از آنتی‌بادی‌های *Sox2* و *Pax7* بیانگر تمرکز بر منشأ سلولی بازسازی است *PCNA* .نیز برای ارزیابی تکثیر سلولی بلاستما به‌کار رفته است.

۲. **ژن‌های هدف در *qRT-PCR***

ژن‌های *fgf8*، *wnt5a*، *msx1*، *notch1*نقش کلیدی در مسیرهای بازسازی دارند *gapdh* .به‌عنوان کنترل داخلی موجب دقت نتایج شده است.

۳. **برنامه نمونه‌برداری**

نمونه‌برداری از روز ۰ تا ۲۸، کل مراحل بازسازی (از التهاب تا ساختار نهایی) را در بر می‌گیرد و امکان پایش زمانی فراهم می‌کند.

۴. **روش‌های ترکیبی**

ادغام*qRT-PCR* ، *RNA-seq*، *IHC* و هیستولوژی تحلیلی جامع از بیان ژن، ساختار بافت و حضور پروتئین‌ها ارائه می‌دهد.

نتایج

تشکیل بلاستما و مراحل مورفولوژیکی بازسازی اندام

در پی قطع اندام قدامی در اکسولوتل، اولین نشانه‌های مورفولوژیکی بازسازی طی ۲۴ تا ۴۸ ساعت اولیه شامل مهاجرت سلول‌های اپیدرمال به ناحیه آسیب‌دیده و تشکیل اپیدرم زخم (*wound epithelium*) مشاهده شد. از روز سوم، تجمع سلول‌های مزانشیمی در زیر اپیدرم زخم، منجر به تشکیل بلاستما اولیه گردید. در روز هفتم، بلاستما میانی با رشد حجمی قابل‌توجه و بیان فعال مارکرهای پیش‌ساز مشاهده شد و تا روز چهاردهم ساختار بلاستما بالغ با تقسیمات سلولی شدید و تمایز نسبی شکل گرفت. بازسازی کامل شکل‌گیری اندام در حدود روز بیست‌وهشتم به پایان رسید.

افزایش بیان ژن‌های کلیدی در مراحل مختلف بازسازی

تحلیل qRT-PCR و RNA-seq نشان داد که بیان ژن‌های مربوط به مسیرهای سیگنال‌دهی کلیدی به‌طور معنی‌داری در بلاستما نسبت به بافت نرمال افزایش یافته‌اند:

به‌ویژه، افزایش بیان *fgf8* و *wnt5a* با آغاز تکثیر سلول‌های پیش‌ساز همزمان بود که نقش کلیدی در القای رشد بلاستما ایفا می‌کند.

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 ۳۲٪ ± ۳.۴ بود.
- سلول‌های +Pax7 به‌ویژه در ناحیه تمایز عضلانی در روز ۷ و ۱۴ افزایش داشتند (24% ± 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.

تحلیل بافت‌شناسی و بازسازی ساختارهای اختصاصی

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

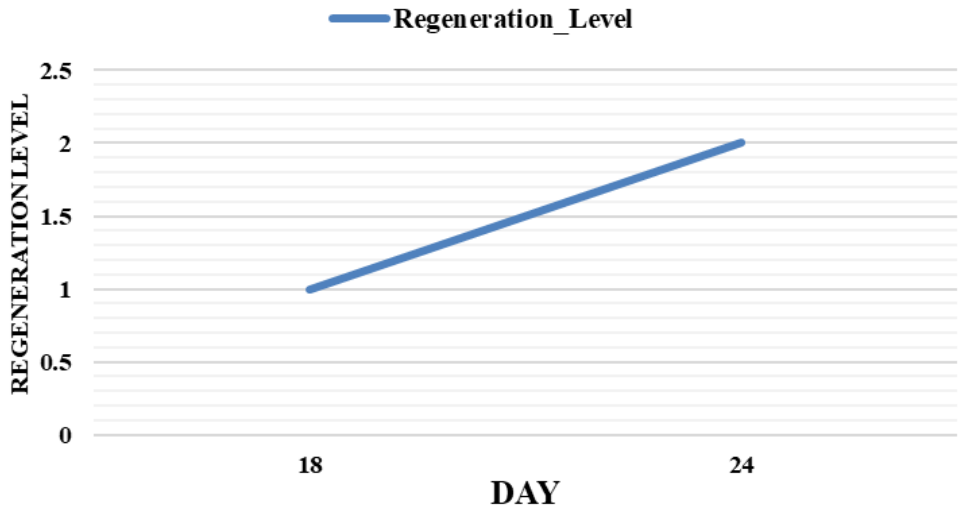
- در روز۱۸، حضور ساختارهای اولیه عضله، عروق خونی و عصب قابل تشخیص بود.
- بافت پیوندی منظم و الیاف کلاژنی تازه شکل‌گرفته، بیانگر بازسازی ECM (ماتریکس خارج سلولی) فعال بودند.
- تا روز ۲۴ ام ، معماری بافتی اندام تقریباً مشابه اندام سالم بود.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2026-06-07]

JOMB
مجله زیست شناسی دریا
دوره ۱۶، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۳، صفحات: ۷۱-۸۰
https://jmb.ahvaz.iau.ir

جدول۲: یافته‌های بافت‌شناسی در روزهای مختلف بازسازی

روز ارزیابی	مشاهده‌های H&E	مشاهده‌های MASSON'S TRICHROME	تفسیر بافت‌شناسی
۱۸	ظهور رشته‌های اولیه عضلانی، حضور عروق خونی و عناصر عصبی	تشکیل الیاف کلاژن تازه و بافت پیوندی منظم	آغاز بازسازی فعال ECM و شروع سازماندهی مجدد ساختارهای عضلانی ـ عصبی
۲۴	سازمان‌یافتگی کامل‌تر فیبرهای عضلانی و شبکه عروقی	افزایش تراکم و نظم کلاژن مشابه بافت سالم	معماری بافتی تقریباً مشابه اندام سالم و تکمیل روند بازسازی



شکل ۵: تفسیر سرعت قدرت بازسازی اندام نسب به زمان

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 پروموتر *msx1* در روز ۷ کاهش معنی‌داری نشان داد($p < 0.05$) ، که نشان‌دهنده نقش تنظیم اپی‌ژنتیک در القای بازسازی است.

خلاصه نتایج

- تشکیل بلاستما در اکسولوتل طی سه مرحله قابل‌تفکیک 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.

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 شبکه‌ای پیچیده از سیگنال‌دهی سیستماتیک، فعال‌سازی سلول‌های بنیادی، و تنظیمات اپی‌ژنتیکی قرار دارد (Sandoval-Guzmán et al., 2023; Tanaka, 2016). در مراحل اولیه، تشکیل بلاستما به‌عنوان ساختار کلیدی

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2026-06-07]

JOMB
مجله زیست شناسی دریا
دوره ۱۶، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۳، صفحات: ۷۱-۸۰
https://jmb.ahvaz.iau.ir

بازسازی با مهاجرت سلول‌های اپیدرمی و تجمع سلول‌های مزانشیمی همراه است. این نتایج با مشاهدات مطالعات Kawakami et al. (2006) و Sandoval-Guzmán et al. (2023) همخوانی دارد.

افزایش بیان ژن‌هایی مانند *fgf8* *msx1* و*wnt5a* در منطقه بلاستما، فعال شدن مسیرهای FGF و Wnt را نشان می‌دهد که در فرآیندهایی مثل تکثیر، تمایز و حفظ توانایی بازسازی نقش اساسی ایفا می‌کنند (Kawakami et al., 2006; Nacu & Tanaka, 2011). این نتایج از نظر الگوی زمانی و میزان بیان با تحقیقات قبلی روی گونه‌هایی مثل *Notophthalmus viridescens* و *Xenopus* هماهنگ است (Joven et al., 2019).

شناسایی سلول‌های Sox2+و Pax7+ در بلاستما نشان‌دهنده حضور سلول‌های بنیادی عصبی و پیش‌سازهای عضلانی است. این یافته‌ها با گزارش Kragl et al. (2009) همخوانی دارد. مطالعات نشان داده‌اند که سلول‌های بلاستما با حفظ هویت بافتی اولیه خود، از طریق فرآیند ددیفرانسیاسیون به حالت پیش‌ساز بازمی‌گردند (Whited & Tabin, 2009; Tanaka & Reddien, 2011). علاوه بر این، بیان بالای مارکر تکثیر PCNA در این ناحیه نشان‌دهنده فعالیت قوی چرخه سلولی و تقسیم سریع سلول‌ها است (Nowoshilow et al., 2018).

در سطح تنظیم اپی‌ژنتیکی، کاهش متیلاسیون در ناحیه پروموتر ژن msx1 طی مرحله فعال‌سازی بلاستما مشاهده شده است که نشان‌دهنده اهمیت تغییرات اپی‌ژنتیکی در بازبرنامه‌ریزی فرآیند رشد و تمایز به شمار می‌رود (Abo-Al-Ela & Burgos-Aceves, 2021). این نتایج بر نقش دینامیک اپی‌ژنومی در کنترل بیان ژن‌های مربوط به بازسازی تأکید می‌کنند. همچنین، حضور RNA های غیرکدکننده و miRNAها در تنظیم مسیرهای سیگنال‌دهی Wnt و FGF نشان داده شده است که به‌طور مستقیم بر تکثیر و تمایز سلولی تأثیر می‌گذارند (Abo-Al-Ela & Burgos-Aceves, 2021).

از نظر بالینی، فهم عمیق این مسیرها و مکانیزم‌ها می‌تواند منجر به طراحی استراتژی‌های درمانی جدید شود. شبیه‌سازی مسیرهای FGF و Wnt، تحریک سلول‌های بنیادی در محیط‌های *in vivo* یا *in vitro*، و استفاده از تعدیل‌کننده‌های اپی‌ژنتیکی می‌توانند در درمان آسیب‌های نخاعی، نارسایی قلبی یا تحلیل عضلانی مؤثر باشند (Tanaka, 2016; Sandoval-Guzmán et al., 2023). 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 (Joven et al., 2019).

علاوه بر این، تحلیل ژنوم اکسولوتل که دارای اندازه‌ای حدود ۳۲ گیگاباز است، اطلاعات مهمی درباره حضور ژن‌های تنظیمی مرتبط با بازسازی ارائه کرده است (Nowoshilow et al., 2018). به‌عنوان مثال، ژن‌های مرتبط با chromatin remodeling و DNA repair در این گونه به‌طور برجسته‌ای توسعه یافته‌اند که این امر می‌تواند توانایی بی‌نظیر آن‌ها در بازسازی اندام‌ها را توضیح دهد.

همچنین، نقش سیستم ایمنی در فرآیند بازسازی اخیراً مورد توجه قرار گرفته است. مطالعات نشان داده‌اند که ماکروفاژها برای تشکیل بلاستما ضروری هستند و حذف آن‌ها فرآیند بازسازی را متوقف می‌کند (Godwin et al., 2013). این یافته‌ها نشان‌دهنده تعامل قوی بین سیستم ایمنی و مسیرهای بازسازی است.

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 (Whited & Tabin, 2009). همچنین بررسی نقش سیستم ایمنی و ارتباط آن با بازسازی، که اخیراً در برخی مطالعات مورد توجه قرار گرفته است، می‌تواند به تکمیل دیدگاه ما در این حوزه کمک کند (Godwin et al., 2013).

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2026-06-07]

JOMB
مجله زیست شناسی دریا
دوره ۱۶، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۳، صفحات: ۷۱-۸۰
https://jmb.ahvaz.iau.ir

با توجه به پیشـرفت‌های اخیر در ژنتیک و اپی‌ژنتیک، مطالعات آینده باید بر روی میکروRNAها، lncRNAها و اصـلاحات اپی‌ژنتیکی در سطح تک‌سلولی تمرکز کنند. همچنین، استفاده از مدل‌های مقایسه‌ای میان گونه‌های با قابلیت بازسازی بالا (مانند اکسولوتل) و گونه‌های با توانایی محدود، می‌تواند به شناسایی فاکتورهای کلیدی بازسازی کمک کند.

کاربردهای آینده

ترجمه این یافته‌ها به پزشکی انسانی می‌تواند در بازسازی نخاع، ترمیم اندام‌های قطع‌شده، درمان سکته قلبی، و بیماری‌های تحلیل عضلانی کاربرد داشته باشد. با این حال، چالش‌هایی نظیر تفاوت‌های تکاملی، کنترل ایمنی، و ریسک سرطان‌زایی ناشی از فعال‌سازی مسیرهای سیگنال‌دهی باید مورد بررسی دقیق قرار گیرد (Tanaka & Reddien, 2011).

نتیجه‌گیری نهایی

مطالعه حاضـر تصـویری جامع از فرآیند بازسـازی اندام در اکسـولوتل ارائه می‌دهد و نقش حیاتی مسـیرهای سـیگنال‌دهی کلیدی، سـلول‌های 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، به‌همراه 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.

References

1. **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. https://doi.org/10.1242/jeb.242650.
2. **Abo-Al-Ela, H. G., & Burgos-Aceves, M. A. (2021).** Epigenetic regulation in amphibian regeneration: A new frontier in regenerative biology. Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution, 336(3), 191–202. https://doi.org/10.1002/jez.b.23013.
3. **Bryant, S. V., Endo, T., & Gardiner, D. M. (2017).** Vertebrate limb regeneration and the origin of limb stem cells. The International Journal of Developmental Biology, 51(4), 325–337. https://doi.org/10.1387/ijdb.072385sb.
4. **Currie, J. D., Kawaguchi, A., Traspas, R. M., Schuez, M., Chara, O., & Tanaka, E. M. (2016).** Live imaging of axolotl digit regeneration reveals spatiotemporal choreography of diverse connective tissue progenitor pools. Developmental Cell, 39(4), 411–423. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.10.013.
5. **Gerber, T., Murawala, P., Knapp, D., Masselink, W., Schuez, M., Hermann, S., ... & Tanaka, E. M. (2018).** Single-cell analysis uncovers convergence of cell identities during axolotl limb regeneration. Science, 362(6413), eaaq0681. https://doi.org/10.1126/science.aaq0681.
6. **Joven, A., Elewa, A., & Simon, A. (2019).** Model systems for regeneration: Axolotl. Developmental Biology, 448(2), 265–275. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.03.007.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2026-06-07]

7. **Kawakami, Y., Rodriguez Esteban, C., Raya, M., Kawakami, H., Marti, M., Dubova, I., & Izpisua Belmonte, J. C. (2006).** Wnt/β-catenin signaling regulates vertebrate limb regeneration. Genes & Development, 20(23), 3232–3237. https://doi.org/10.1101/gad.1475106.
8. **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. https://doi.org/10.1038/nature08152.
9. **Leigh, N. D., & Dunlap, G. S. (2020).** Transcriptomic analysis of limb regeneration: Insights into conserved mechanisms. Developmental Dynamics, 249(6), 691–708. https://doi.org/10.1002/dvdy.152.
10. **Nacu, E., & Tanaka, E. M. (2011).** Limb regeneration: A new development? Annual Review of Cell and Developmental Biology, 27, 409–440. https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154115.
11. **Nowoshilow, S., Schloissnig, S., Fei, J. F., Dahl, A., Pang, A. W. C., Pippel, M., ... & Tanaka, E. M. (2018).** The axolotl genome and the evolution of key tissue formation regulators. Nature, 554(7690), 50–55. https://doi.org/10.1038/nature25458.
12. **Riquelme-Guzmán, C., & Baeza, M. (2021).** Role of Wnt and FGF signaling in salamander regeneration: New perspectives. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 9, 653821. https://doi.org/10.3389/fcell.2021.653821.
13. **Rogers, M. F., & Tsonis, P. A. (2019).** Regenerative biology: From amphibians to mammals. Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology, 8(6), e347. https://doi.org/10.1002/wdev.347
14. **Sandoval-Guzmán, T., Wang, H., Khattak, S., Schuez, M., Roensch, K., Nacu, E., ... & Tanaka, E. M. (2014).** Fundamental differences in dedifferentiation and stem cell recruitment during skeletal muscle regeneration in two salamander species. Cell Stem Cell, 14(2), 174–187. https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.11.007.
15. **Sandoval-Guzmán, T., Knapp, D., & Tanaka, E. M. (2023).** Axolotl limb regeneration: Cellular and molecular mechanisms. Current Opinion in Genetics & Development, 78, 102050. https://doi.org/10.1016/j.gde.2023.102050.
16. **Seifert, A. W., & Muneoka, K. (2018).** The blastema and epimorphic regeneration in mammals. Developmental Biology, 433(2), 190–199. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.08.007.
17. **Stewart, R., & Stankunas, K. (2012).** Limited dedifferentiation provides replacement tissue during zebrafish fin regeneration. Developmental Biology, 365(2), 339–349. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.03.001.
18. **Tanaka, E. M. (2016).** The molecular and cellular choreography of appendage regeneration. Cell, 165(7), 1598–1608. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.038
19. **Tanaka, E. M., & Reddien, P. W. (2011).** The cellular basis for animal regeneration. Developmental Cell, 21(1), 172–185. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.06.016
20. **Whited, J. L., & Tabin, C. J. (2009).** Regeneration redefined. Nature, 460(7251), 39–40. https://doi.org/10.1038/460039a.
21. **Whited, J. L., & Tabin, C. J. (2009).** Regeneration review: A fresh look at limb regeneration in salamanders. Nature Reviews Genetics, 10(5), 397–407. https://doi.org/10.1038/nrg2550
22. **Yun, M. H., & Widelitz, R. B. (2018).** Cell signaling and epigenetic control of regenerative processes. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 10(7), a028779. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028779.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2026-06-07]