مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی- پژوهشی)
جلد ٦، شماره ٣، زمستان ١٣٩٤، ٤٨٠-٤٧١

بررسی تاثیر تغییرات اپی ژنتیکی بر فرآیند ترمیم پلاناریا با استفاده از تیمار به‌وسیله کوچک مولکول‌ها

مانا احمدراجی .M.Sc [1]، عبدالحسین شیروی .Ph.D[1]، سیده نفیسه حسنی.Ph.D[2] ، حسین بهاروند .Ph.D[2,3]*

۱- دانشگاه آزاد دامغان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی تکوینی، دامغان، ایران
۲- پژوهشگاه رویان، گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی، تهران، ایران
۳- دانشگاه علم و فرهنگ، دانشکده علوم پایه و فناوری‌های نوین زیستی، گروه زیست‌شناسی تکوینی، تهران، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: baharvand@royaninstitute.org

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۱/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۲/۶

چکیده

هدف: هدف این تحقیق، بررسی تاثیر تغییرات اپی ژنتیک توسط تیمار با کوچک مولکول‌های تغییردهنده سطح اپی ژنتیک سلول در حین فرآیند ترمیم پلاناریا است.

مواد و روش‌ها: کرم های پلاناریا با استفاده از برش به سه قطعه سر، دم و تنه تقسیم و پس از انتقال به چاهک‌های جداگانه با ۶ نوع کوچک مولکول تغییر دهنده سطح اپی ژنتیک با غلظت‌های مختلف تیمار شدند. برای بررسی تاثیر تیمارها بر روند فرآیند ترمیم، از ارزیابی خصوصیات ریخت‌شناسی در طول ۲۰ روز پس از قطعه کردن استفاده شد.

نتایج: ارزیابی دقیق ریخت‌شناسی نمونه‌های تیمار شده با کوچک مولکول‌ها نشان داد که از بین شش کوچک مولکول بررسی‌شده، دو کوچک مولکول سدیم بوتیرات و والپوریک اسید (مهار کننده آنزیم هیستون داستیلاز) به‌ترتیب باعث تاخیر در ترمیم قطعات مختلف سر، تنه و دم و تاخیر در تشکیل چشم قطعات تنه و دم می‌شوند. همچنین چهار کوچک مولکول دیگر شامل BIX01294، RG108، SAHA و Tranylcypromin تاثیری در فرآیند ترمیمی نداشتند و کلیه نمونه‌های تیمار شده به‌صورت طبیعی ترمیم شدند.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان می‌دهند که اپی ژنتیک سلول دارای نقش کلیدی در فرآیند ترمیمی پلاناریا است و مهار فعالیت هیستون داستیلازها باعث اختلال در فرآیند ترمیم طبیعی می‌شود. با این وجود، تعیین دقیق مکانیسم عملکرد هیستون داستیلاز در فرآیند ترمیم پلاناریا نیاز به بررسی بیشتر دارد. امید می‌رود از طریق بررسی نتایج به‌دست‌آمده بتوان به درک بهتری از مکانیسم‌های مولکولی فعال‌سازی و ممانعت کنندگی ترمیم در پلاناریا و سایر موجودات دست یافت.

واژگان کلیدی: پلاناریا، ترمیم، اپی ژنتیک، کوچک مولکول

مقدمه

امروزه پزشکی ترمیمی به‌عنوان نوید بخش‌ترین راه‌حل جهت پاسخ‌گویی به نیازهای درمانی که تاکنون پاسخ داده نشده‌اند، معرفی شده است. یکی از جنبه‌های مهم پزشکی ترمیمی، به‌کارگیری و فعال‌سازی پتانسیل و فرآیند طبیعی ترمیم به‌منظور بازیابی کارایی اندام‌ها و بافت‌های آسیب‌دیده انسان است (۱). متاسفانه، توانایی ترمیم در انسان‌ها پس از دوران جنینی تا حد زیادی محدود می‌شود و انجام مطالعات ترمیمی بر روی انسان به‌صورت آزمایشگاهی مقدور نیست. با این‌حال در طبیعت موجوداتی وجود دارند که پتانسیل ترمیمی بسیار بالایی را از خود نشان داده و می‌توانند به‌عنوان مدل مطالعات ترمیمی مورد استفاده قرار گیرند. در میان این موجودات، کرم‌های پهن پلاناریا به‌دلیل پتانسیل ترمیم خارق‌العاده، شرایط نگه‌داری آسان و دارا بودن ژن‌های مشترک با مهره‌داران، ازجمله انسان، مورد توجه ویژه و روز افزون محققین علوم ترمیمی قرار گرفته‌اند (۲, ۳). از بین گونه‌های مختلف پلاناریا، گونه آب شیرین *Schmidtea mediterranea* به‌دلیل داشتن قابلیت ترمیم فوق‌العاده و آسانی تکثیر در محیط آزمایشگاهی جهت مطالعات ترمیمی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. از این‌رو در سال ۲۰۰۷، ژنوم این گونه به‌صورت کامل توالی یابی شد و باعث افزایش ناگهانی در تعداد مطالعات ترمیمی جهت شناسایی دقیق مکانیسم‌های مولکولی درگیر در جنبه‌های مختلف فرآیند ترمیم گردید (۴ و ۵). توانایی ترمیم فوق العاده پلاناریا‌ها به نئوبلاست‌ها (Neoblast) نسبت داده می شود که تنها جمعیت سلولی تکثیر شونده در بدن پلاناریا هستند و رفتار آن‌ها شبیه به سلول‌های بنیادی است. این سلول‌ها در بدن پلاناریا ۲۵ تا ۳۰ درصد سلول‌ها را شامل می‌شوند و اثبات شده است که ژن‌های مشترکی از نظر پرتوانی با سلول‌های بنیادی پرتوان موشی و انسانی دارند (۶ و ۷). در فرایند ترمیم پلاناریا یک توده تمایز نیافته به‌نام بلاستما (Blastema) از طریق تکثیر سلول‌های نئوبلاست و یا تمایز زدایی (Dedifferentiation) سلول‌های تمایز یافته در منطقه آسیب‌دیده ایجاد می‌شود که درنهایت در مدت ۷ روز قسمت‌های ازدست‌رفته جبران و ترمیم می‌شوند. از این‌رو، تعیین مکانیسم‌های مولکولی درگیر در تکثیر و تمایز نئوبلاست‌ها و تشکیل بلاستما در پلانارایا به‌عنوان یک مدل ترمیم *In vivo* مورد توجه قرار گرفته است (۸).

یکی از جنبه‌های مهم موثر در فرآیند ترمیم پلاناریا و دیگر موجودات مدل ترمیم که اخیر مورد توجه قرارگرفته است، بررسی تاثیر تغییرات سطح اپی ژنتیک سلول بر فرآیند ترمیم است. بررسی‌ها نشان داده‌اند که تغییرات سطح اپی ژنتیک که شامل تغییرات متیلاسیون DNA، هیستون، مکان نوکلئوزوم‌ها و یا RNA های غیر کد کننده هستند، از نقش اساسی در القا و یا ممانعت کنندگی بیان ژن‌های تکوینی و آغاز فرآیند ترمیم برخوردارند (۹ و ۱۰). تاکنون نقش تغییرات سطح اپی ژنتیک بر فرآیند ترمیم بسیاری از اندام‌های پستانداران مانند کبد (۱۱) و عضلات و موجودات مدل ترمیمی (گوره خر ماهی) و حتی گیاه مدل (آرابیدوپسیس) مورد بررسی قرار گرفته است (۱۲ و ۱۳). فرآیند تمایز سلول‌های بنیادی از حالت پرتوان به سلول‌های سوماتیک نیز مستلزم بروز تغییرات کلی در الگوی بیان ژن در آن‌هاست که از شناخته شده‌ترین آن‌ها تغییرات اپی ژنتیکی است (۱۴, ۱۵). با این‌وجود، تاکنون تحقیقات محدودی بر روی تاثیر سطح اپی ژنتیک بر فرآیند ترمیم پلاناریا آن انجام‌شده است. هوبرت و همکاران (۱۶) تاثیر تنظیم‌کنندگی خانواده SET1/MLL که جزو هیستون متیل ترانسفرازها می‌باشند را بر تنظیم رفتار سلول‌های بنیادی پلاناریا که نئوبلاست‌ها نامیده می‌شوند، مورد بررسی قرار دادند و نقش کلیدی آنزیم‌های این خانواده را بر تنظیم حفظ پرتوانی و تمایز این سلول‌ها ا اثبات کردند. لذا با توجه به اهمیت تغییرات سطح اپی ژنتیک بر فرآیند ترمیم، هدف از این تحقیق، بررسی اهمیت و تاثیر تغییرات سطوح اپی ژنتیک سلول‌ها بر فرآیند ترمیم پلاناریا با کوچک مولکول‌های تغییردهنده سطح اپی ژنتیک سلول که عملکرد متفاوتی دارند. بررسی تغییرات اپی ژنتیکی می‌تواند درک بهتری در خصوص چگونگی تنظیم مولکولی حفظ بنیادینگی و تمایز هدفمند سلول‌های بنیادی فراهم کند که یکی از مراحل اصلی ترمیم را شامل می‌شود (۱۷, ۱۸). لذا امید می‌رود از طریق شناسایی مکانیسم‌های درگیر در ترمیم پلاناریا مانند مکانیسم‌های تاثیر تغییرات اپی ژنتیکی بتوان به درک بهتری از مکانیسم‌ها مولکولی و عوامل فعال‌کننده، ممانعت کننده و کنترل‌کننده فرآیند ترمیم انسان و پستانداران دست یافت.

مواد و روش‌ها

نگه‌داری پلاناریا: در این تحقیق، به منظور انجام تیمارها از پلاناریا های غیرجنسی کلون شده گونه *Schmidtea mediterranea* استفاده شد. پلاناریاها در محیط اختصاصی حاوی NaCl (1.6 mM)+ CaCl2(1.0 mM)+ MgSO4(1.0 mM)+ MgCl2(0.1 mM)+ KCl(0.1 mM)+ NaHCO3(2 mM) با pH= ۷-۷/۲ ، دمای ۱۸ تا ۲۰ درجه سانتی‌گراد و شرایط تاریکی نگه‌داری شدند. برای تغذیه پلاناریاها، از جگر گوساله خردشده و فریز شده به‌صورت هر هفته یک‌بار استفاده شد (۱۹). همچنین جهت انجام تیمار با کوچک مولکول‌ها از پلاناریاهای با اندازه در حدود هشت میلی‌متر که یک هفته گرسنگی را تحمل کرده بودند استفاده شد.

کوچک مولکول‌ها: انتخاب کوچک مولکول‌ها بر اساس سوابق استفاده آن‌ها در مطالعات بررسی مکانیسم‌های تاثیر اپی ژنتیک در سلول‌های بنیادی موشی و انسانی صورت گرفت (۲۰, ۲۱). بر این اساس شش کوچک مولکول انتخاب شدند (۲۲, ۲۳) که به‌ترتیب شامل BIX01294 (مهارکننده هیستون متیل ترانسفراز G9a)، RG108 (مهارکننده DNA methyltransferase Non-nucleoside)، SAHA (مهارکننده Class I and II HDAC)، Sodium butyrate (مهارکننده هیستون داستیلاز)، Tranylcypromine (مهارکننده MAO-A, MAO-B and LSD1) و Valproic acid (مهارکننده هیستون داستیلاز) می‌باشند. کوچک مولکول‌های ذکر شده از شرکت Tocris تهیه و خریداری گردید.

سمیت سنجی: پیش از انجام تیمار با کوچک مولکول‌ها، اثر کشندگی غلظت کوچک مولکول انتخابی بر روی پلاناریا مورد ارزیابی قرار گرفت. ابتدا غلظت‌های توصیه شده در مقالات مرتبط و غلظت‌های توصیه شرکت‌های تولید کننده کوچک مولکول شامل غلظت‌های نصف حداکثر غلظت ممانعت کنندگی (half maximal inhibitory concentration (IC_{50})) و نصف حداکثر غلظت موثر (half maximal effective concentration (EC_{50})) بررسی شدند و طیفی از غلظت، شامل میزان توصیه‌شده و دو تا چند برابر آن، برای پلاناریای کامل و قطع نشده مورد آزمایش قرار گرفت تا در صورت مرگ نمونه‌ها در غلظت‌های تعیین‌شده از غلظت‌های کمتر برای یافتن میزان غلظت مناسب جهت تیمار در مرحله بعدی استفاده گردد.

تیمار با کوچک مولکول: ابتدا به منظور یکنواختی آزمایش، پلاناریاهای با اندازه مناسب جهت تیمار (حدود هشت میلی‌متر) انتخاب شدند و هر نمونه با استفاده از تیغ جراحی به سه قسمت سر، تنه و دم تقسیم شده و قطعات حاصل به چاهک‌های پلیت ۱۲ خانه حاوی ۱ میلی‌لیتر از محیط اختصاصی به‌علاوه کوچک مولکول یا حلال منتقل شدند. گروه شاهد با توجه به نوع حلال کوچک مولکول مورد استفاده که آب یا DMSO (Dimethyl sulfoxide) بوده در نظر گرفته شد و سه تکرار برای هر تیمار کوچک مولکول و سه تکرار آزمایش برای نمونه‌ها انجام شد (۲۴, ۲۵). پلاناریاها طی مدت ترمیم تحت تاثیر تیمار با کوچک مولکول قرار گرفتند و در روز سوم تیمار، یک‌بار تعویض محیط انجام شد. جهت تیمار از غلظت توصیه شده برای هر کوچک مولکول در مقالات مرتبط که در آزمایش‌های تعیین سمیت، باعث مرگ و یا اثر منفی بر زنده مانی پلاناریا نشده بودند استفاده شد. به‌منظور بررسی تاثیر تیمار بر روی تشکیل بلاستما و فرآیند ترمیم، نمونه‌ها به‌مدت ۱ الی ۲۰ روز بعد از تیمار به‌وسیله لوپ مجهز به دوربین دیجیتال مشاهده شدند و جهت ثبت تغییرات از نمونه‌ها عکس‌برداری و فیلم‌برداری شد.

ارزیابی: جهت ارزیابی تاثیر تیمارها بر روند فرآیند ترمیم، از ریخت‌شناسی قطعات پلاناریا پس از تیمار به‌وسیله هر کوچک مولکول شامل بررسی و ثبت هرگونه تغییر در شکل طبیعی جانور و مراحل ترمیم مانند تشکیل بلاستما در محل زخم (لیز شدن)، تشکیل گیرنده نوری و تشکیل سر، دم و حلق استفاده شد. این مطالعه بر اساس مصوبه کمیته اخلاق پزشکی و پژوهشگاه رویان و رعایت مقررات استفاده از حیوانات آزمایشگاهی انجام شده است.

نتایج

بررسی اثر کشندگی و تعیین غلظت مناسب جهت تیمار با کوچک مولکول‌های موثر بر سطح اپی ژنتیک سلول

در جدول ۱ نتایج حاصل از بررسی تاثیر سمیت غلظت‌های مختلف کوچک مولکول‌های مختلف بر روی پلاناریاهای کامل ارائه‌شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، تیمار با کلیه غلظت‌های توصیه‌شده در مقالات مرتبط و دستورالعمل شرکت

تولیدکننده تاثیری در زنده مانی پلاناریاهای کامل در مدت ۷ روز تیمار نداشت و کلیه نمونه‌های تیمار شده با ۶ کوچک مولکول انتخابی زنده مانی خود را حفظ کردند. هدف از این آزمایش، این امر بوده است که در صورت مشاهده اثر کشندگی کوچک مولکول انتخابی در غلظت استفاده‌شده از آن غلظت در تیمار قطعات در حال ترمیم استفاده نگردد. زیرا در صورت مرگ موجود در اثر تیمار، تاثیر آن کوچک مولکول بر فرآیند ترمیمی پس از قطعه‌قطعه کردن مشخص نخواهد شد. لذا در مرحله بعد با توجه به مشاهدات این آزمایش‌ها غلظت‌های مناسب جهت تیمار تعیین شدند.

جدول ۱: نتایج بررسی اثر کشندگی غلظت‌های توصیه شده کوچک مولکول بر پلاناریا کامل

ردیف	کوچک مولکول	غلظت تیمار(μM)	نتایج پس از ۷ روز
۱	BIX-01294	۲۰	زنده
۲	RG-108	۵	زنده
۳	SAHA	۲۰	زنده
۴	Sodium butyrate	۲۰۰۰۰	زنده
۵	Tranylcypromin	۱۰	زنده
۶	Valproic acid	۱۰۰۰	زنده

تیمار پلاناریا با کوچک مولکول‌های تغییر دهنده اپی ژنتیک

نتایج تیمار با کوچک مولکول‌های انتخابی نشان داد که برخی از کوچک مولکول‌ها تغییر دهنده سطح اپی ژنتیک بر فرآیند ترمیم پلانارایا بی‌اثر بوده و برخی باعث ایجاد تغییرات مشخص در فرآیند تشکیل بلاستما و ترمیم شدند. جدول ۲ کوچک مولکول‌هایی را نشان می‌دهد که استفاده از آن‌ها (با غلظت‌های تعیین‌شده) در حین فرآیند ترمیم باعث ایجاد تغییر و اختلال قابل‌توجه در تشکیل بلاستما و ترمیم قطعات مختلف پلاناریا نشده است. قطعات مختلف پلاناریاهای تیمار شده با کوچک مولکول‌های RG-108، BIX-01294، SAHA و Tranylcypromin توانستند طی ۱۴ روز ترمیم قسمت‌های از دست داده خود را به‌طور کامل و طبیعی انجام دهند.

جدول ۲: کوچک مولکول‌های غیر موثر در ترمیم پلاناریا

ردیف	کوچک مولکول	غلظت‌های مورداستفاده (μM)	قطعات بدن	نتایج پس از ۱۵ روز
۱	BIX-01294	۲-۱۰-۱۵	سر-تنه- دم	ترمیم کامل قطعات
۲	RG-108	۵-۱۰-۲۰	سر-تنه- دم	ترمیم کامل قطعات
۳	SAHA	۵-۱۰-۲۰	سر-تنه- دم	ترمیم کامل قطعات
۴	Tranylcypromin	۲-۱۰-۲۰	سر-تنه- دم	ترمیم کامل قطعات

اما قطعات پلاناریاهای تیمار شده با کوچک مولکول‌های سدیم بوتیرات و والپوریک اسید (جدول ۳) قادر نبودند در طی ۱۴ روز پس از برش (زمان طبیعی کامل شدن قطعات پلاناریا در نمونه‌های کنترل) ترمیم خود را کامل کنند. نمونه‌های تیمار شده با این کوچک مولکول‌ها دچار ناهنجاری‌های مختلف در ترمیم در قطعات مختلف شامل سر، تنه و دم شده و در نهایت حتی باعث مرگ برخی نمونه‌ها شدند.

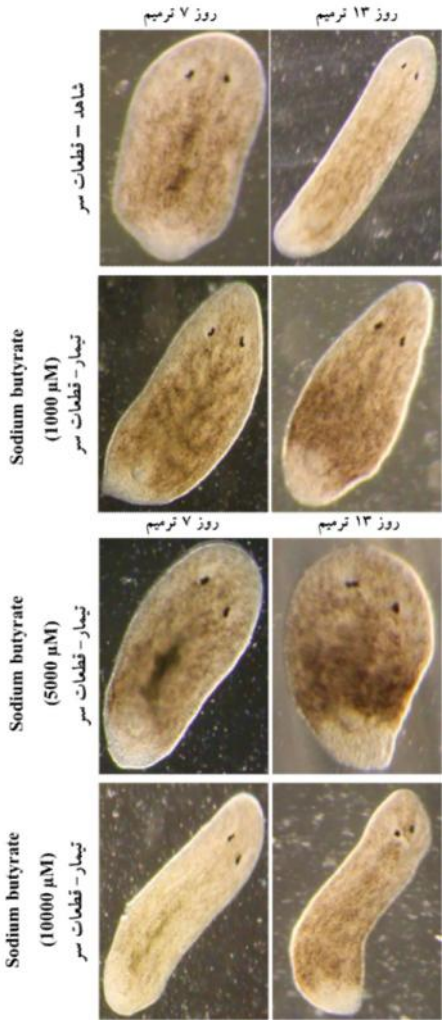
جدول ۳: کوچک موکول‌های موثر در ترمیم پلاناریا

ردیف	کوچک مولکول	غلظت‌های مورداستفاده (μM)	قطعات بدن
۱	Sodium butyrate	۱۰۰۰-۵۰۰۰-۱۰۰۰۰	سر-تنه- دم
۲	Valproic acid	۵۰۰-۱۰۰۰-۳۰۰۰	سر-تنه- دم

تیمار سدیم بوتیرات

نتایج مربوط به تیمار قطعات مختلف پلانارایا با غلظت‌های مختلف کوچک مولکول سدیم بوتیرات که ممانعت کننده هیستون داستیلاز است در جدول ۴ ارائه شده است.

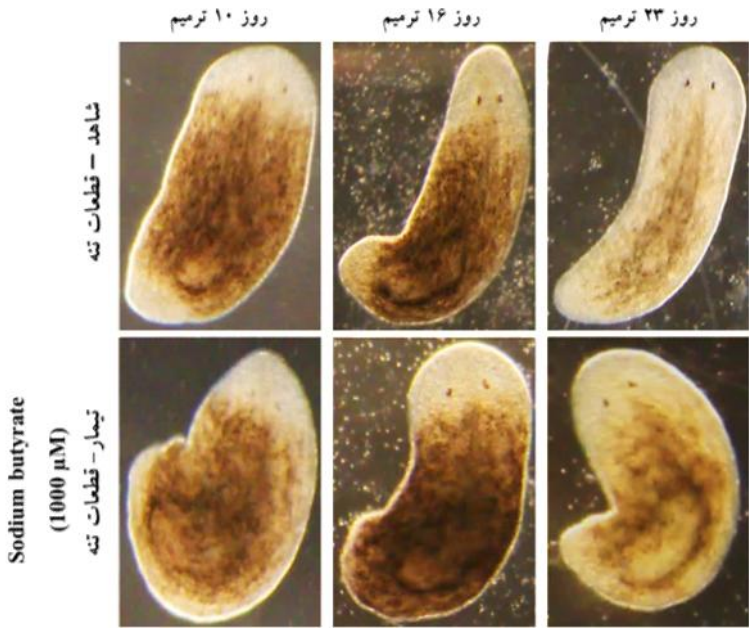
بررسی دقیق ریخت‌شناسی ۳۰ روزه نمونه‌های تیمار شده با کوچک مولکول سدیم بوتیرات نشان داد که در کلیه غلظت‌ها (۱۰۰۰، ۵۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ میکرومولار) قطعات سر توانستند با تاخیر خود را ترمیم کنند اما نمونه‌های ترمیم‌شده شکل و حرکت طبیعی نداشتند و بعد از روز ۱۴ از بین رفتند (شکل ۱). همچنین در اکثر موارد، ترمیم قطعات تنه و دم نیز به‌طور کامل انجام شد و تنها در غلظت ۱۰۰۰ میکرومولار ترمیم قطعه تنه با تاخیر انجام شد (شکل ۲). در غلظت ۱۰۰۰۰ میکرومولار نیز در قطعات دم تشکیل چشم دیده نشد (شکل ۳). این نتایج نشان می‌دهند که خاصیت ممانعت کنندگی این کوچک مولکول جنبه‌های مختلف ترمیمی در قطعات مختلف بدن را تحت تاثیر قرار داده و استفاده از غلظت‌های مختلف کوچک مولکول نیز باعث اختلالت متفاوتی شد.



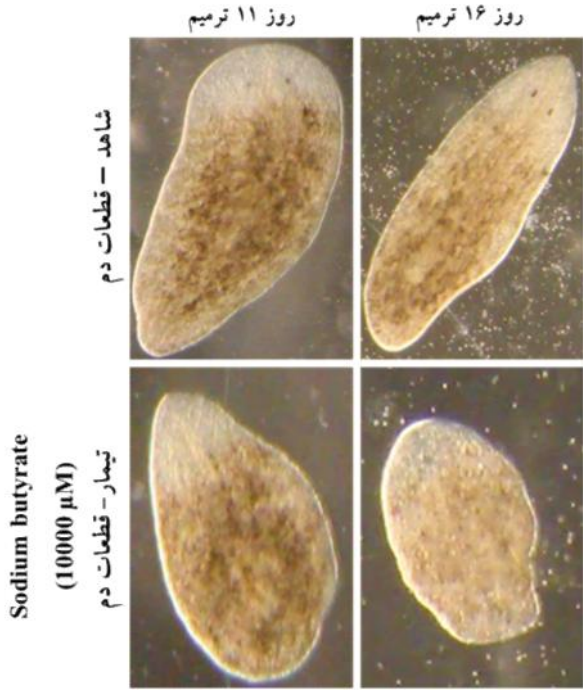
شکل ۱: تیمار قطعات سر پلاناریا با غلظت‌های ۱۰۰۰، ۵۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ میکرومولار Sodium butyrate. همان‌طور که در تصاویر مشاهده می‌شود تمام قطعات سر در هر سه غلظت بعد از روز ۱۳ تیمار به‌طور کامل ترمیم شدند، اما شکل غیرطبیعی داشتند که سرانجام نیز مردند

جدول ۴. نتایج تیمار قطعات پلاناریا با کوچک مولکول Sodium butyrate

کوچک مولکول	غلظت تیمار	قطعات بدن	زنده/ مرده	تعداد پاسخ	نتایج
Sodium butyrate	1000	سر	۳/۰	-	تاخیر در ترمیم کامل- مرگ
		تنه	۰/۳	۱	تاخیر در تشکیل ناحیه دمی
		دم	۰/۳	۳	ترمیم طبیعی
	5000	سر	۳/۰	-	تاخیر در ترمیم کامل- مرگ
		تنه	۰/۳	۳	ترمیم طبیعی
		دم	۰/۳	۳	ترمیم طبیعی
	10000	سر	۳/۰	-	تاخیر در ترمیم کامل- مرگ
		تنه	۰/۳	۳	ترمیم طبیعی
		دم	۱/۲	۲	عدم تشکیل چشم‌ها



شکل ۲: تیمار قطعات تنه پلاناریا با غلظت ۱۰۰۰ میکرومولار Sodium butyrate در یک مورد از قطعات تنه‌ای غلظت ۱۰۰۰ میکرو مولار تشکیل ناحیه دم با تاخیر انجام گرفت. همان‌طور در تصاویر مربوط به قطعات تنه‌ای تیمار شده دیده می‌شود تا روز شانزدهم توده بلاستمایی در این ناحیه دیده نمی‌شود. اما در نهایت پس از روز بیست و سوم دم کوچکی تشکیل شد و شکل طبیعی خود را پیدا کرد.



شکل ۳: تیمار قطعات دم پلاناریا با غلظت ۱۰۰۰۰ میکرومولار Sodium butyrate در تیمار قطعات دم در غلظت ۱۰۰۰۰ میکرو مولار یکی از قطعات مرده و دو قطعه دیگر نیز قادر به تشکیل چشم نبودند و در نهایت نیز زنده نماندند.

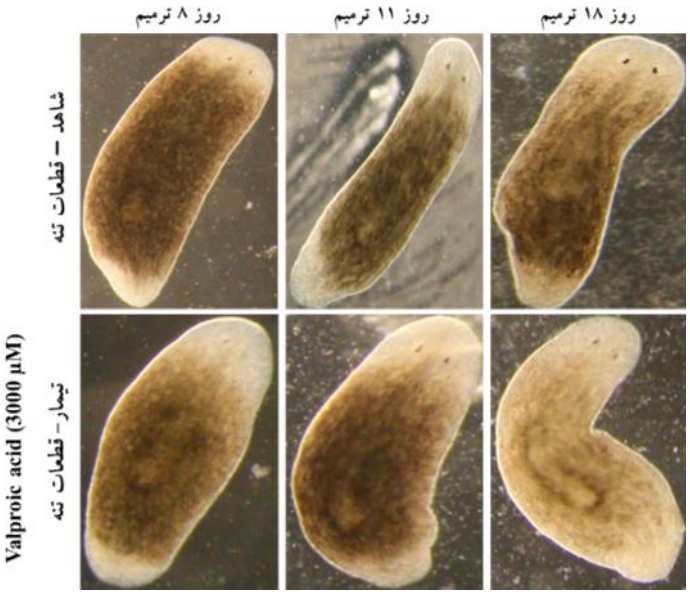
تیمار والپوریک اسید

از کوچک مولکول والپوریک اسید نیز که ممانعت کننده هیستون داستیلاز و تاثیرگذار بر فعالیت مسیرهای پیام‌رسانی ERK، پروتئین کیناز C و Wnt/β-Catenin است، در سه غلظت ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۳۰۰۰ میکرو مولار استفاده شد (جدول ۵).

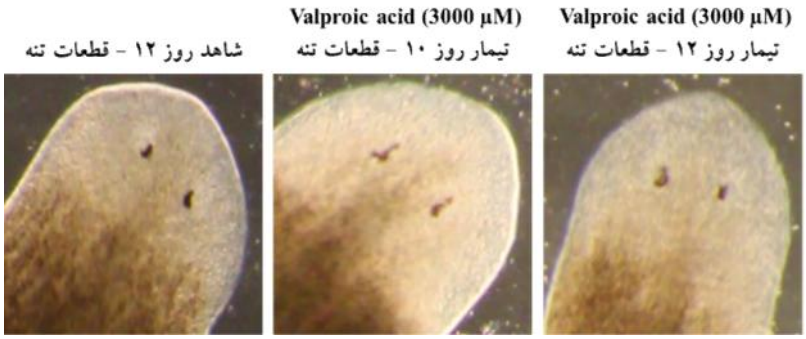
جدول ۵. نتایج تیمار قطعات پلاناریا با کوچک مولکول Valproic acid

کوچک مولکول	غلظت تیمار (μM)	قطعات بدن	زنده/ مرده	تعداد پاسخ	نتایج
Valproic acid	500	سر	۰/۳	۳	ترمیم طبیعی
		تنه	۰/۳	۳	ترمیم طبیعی
		دم	۰/۳	۳	ترمیم طبیعی
	1000	سر	۰/۳	۲	ترمیم طبیعی
		تنه	۰/۳	۳	تاخیر در تشکیل چشم‌ها
		دم	۰/۳	۳	ترمیم طبیعی
	3000	سر	۰/۳	۳	ترمیم طبیعی
		تنه	۰/۳	۱	تاخیر در تشکیل چشم‌ها و چشم‌های تغییر شکل یافته
		دم	۰/۳	۲	تاخیر در تشکیل چشم‌ها

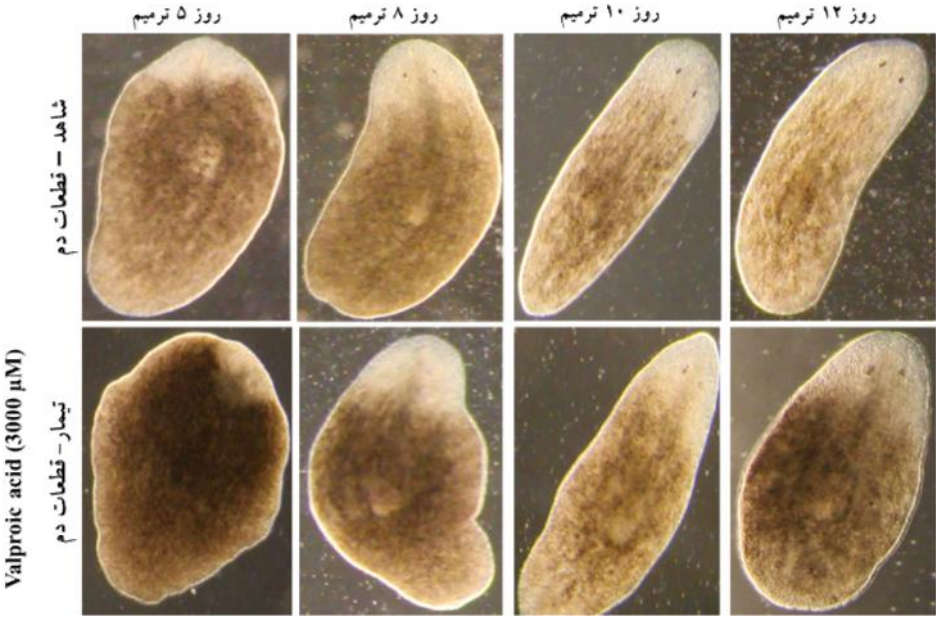
بررسی‌های ریخت‌شناسی قطعات تیمار شده با این کوچک مولکول نشان داد که در غلظت ۵۰۰ میکرومولار ترمیم کلیه قطعات به‌طور کامل و طبیعی انجام می شود. در تیمار با غلظت ۱۰۰۰ میکرومولار نیز ترمیم قطعات سر و دم به‌طور کامل انجام شد، اما در قطعات تنه تاخیر در تشکیل چشم‌ها مشاهده شد. با افزایش غلظت این کوچک مولکول به ۳۰۰۰ میکرو مولار، علاوه بر تاخیر در تشکیل چشم قطعات تنه (شکل ۴)، در برخی موارد نیز تشکیل چشم به‌صورت غیرطبیعی (کشیده‌تر و کم‌رنگ‌تر) انجام شد (شکل ۵). قطعات دم نیز دچار تغییر شکل و تاخیر در تشکیل چشم شدند (شکل ۶). اما ترمیم قطعات سر به‌صورت کامل و طبیعی انجام شد. نتایج نشان می‌دهند که تیمار با این کوچک مولکول بیشتر ترمیم سر و چشم‌ها (گیرنده‌های نوری) را تحت تاثیر قرار می‌دهد.



شکل ۴: تیمار قطعات تنه‌ای پلاناریا در غلظت ۳۰۰۰ میکرو مولار Valporic acid. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود تیمار با این کوچک مولکول باعث تاخیر در تشکیل و تکمیل شدن چشم‌ها قطعات تنه‌ای در غلظت ۳۰۰۰ میکرو مولار شده است.



شکل ۵: تشکیل چشم غیرطبیعی در تیمار قطعات تنه‌ای پلاناریا در غلظت ۳۰۰۰ میکرو مولار Valporic acid. در تیمارهای قطعات تنه به‌خصوص در غلظت سه هزار میکرومولار تغییر شکل فرم سیاهی چشم به‌وضوح دیده می‌شود که سیاهی چشم‌ها کشیده‌تر هستند.



شکل ۶: تیمار قطعات دمی پلاناریا با غلظت ۳۰۰۰ میکرومولار Valporic acid. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود تاخیر در تشکیل چشم‌ها در نمونه تیمار شده در مقایسه با نمونه شاهد از روز ۸ ترمیم کاملا مشخص است.

بحث

هدف این تحقیق توسعه روش استفاده از کوچک مولکول‌ها جهت شناسایی مکانیسم‌های موثر در ترمیم از طریق تیمار با کوچک مولکول‌هایی بوده است که تاکنون نقش آن‌ها در سلول‌های بنیادی انسانی و موشی مشخص‌شده است. نتایج این تحقیق نشان دادند که استفاده از کوچک مولکول‌ها می‌تواند روش مناسبی جهت جستجو و غربالگری مسیرهای پیام‌رسانی جدید، بررسی عملکرد فرآیندهای مختلف سلولی مانند تغییرات در سطح اپی ژنتیک در فرآیند ترمیم پلاناریا باشد (۲۶). درعین‌حال به‌دلیل سادگی روش کار ارائه شده در این تحقیق، امکان بررسی تعداد زیادی کوچک مولکول با عملکردهای مختلف وجود دارد، درصورتی‌که در روش‌های دیگر مانند خاموشی ژن با *RNAi* غربالگری نیاز به زمان و هزینه بسیار بیشتری دارد (۲۷, ۲۸). با این‌وجود، نتایج نشان دادند که کلیه کوچک مولکول‌های مورد استفاده که باعث تغییر سطح اپی ژنتیک سلول می‌شوند در فرآیند ترمیم پلاناریا موثر نبوده‌اند که این امر می‌تواند به‌دلیل مناسب نبودن غلظت توصیه‌شده در مقالات مرتبط و مقادیر استفاده‌شده در این تحقیق، جهت ایجاد اختلال در فرآیند ترمیم و یا عدم تاثیر فعالیت‌های آنزیمی (تغییردهنده سطح اپی ژنتیک سلول) تحت تاثیر قرارگرفته و ممانعت شده در فرآیند ترمیم پلاناریا باشد. از میان ۶ کوچک مولکولی که در ابتدا عدم سمیت آن‌ها

بر زنده‌مانی پلاناریای کامل موردبررسی قرار گرفت، ۴ عدد در کلیه غلظت‌های انتخابی هیچ‌گونه تاثیری از خود نشان ندادند و ترمیم کلیه قطعات پلاناریا شامل سر، تنه و دم به‌طور کامل و طبیعی مشابه با نمونه‌های شاهد انجام شد. درحالی‌که دو کوچک مولکول والپوریک اسید و سدیم بوتیرات که مهارکننده هیستون داستیلاز هستند باعث ایجاد تغییرات مختلف در فرآیند ترمیم مانند تاخیر در فرآیند ترمیم و یا ایجاد خصوصیات ریخت‌شناسی مشخص مانند تاخیر در تشکیل توده بلاستما یا عدم تشکیل چشم‌ها و تولید چشم غیرعادی شدند. بنابراین به‌نظر می‌رسد فعالیت هیستون داستیلاز که نقش کلیدی در تقسیم سلول و بیان ژن‌ها دارد، جهت فرآیند طبیعی ترمیم ضروری است. علاوه بر این فنوتیپ‌های به‌دست‌آمده را می‌توان این‌گونه ارزیابی نمود که تاخیر در تشکیل توده بلاستما با عدم تکثیر نئوبلاست‌ها در ارتباط بوده و عدم تکثیر و متعاقبا تمایز نئوبلاست ها به انواع سلول‌ها بافتی باعث ایجاد اختلال در فرآیند ترمیم می‌شود. همچنین تاخیر در تشکیل چشم‌ها و یا عدم تشکیل چشم با اختلال در تمایز سلول عصبی و ترمیم سیستم عصبی مرکزی پلاناریا ارتباط مستقیم دارد.

علاوه بر این استفاده از غلظت‌های مختلف کوچک مولکول باعث ایجاد تفاوت در سطوح پیام‌رسانی و یا خصوصیت عملکردی و متعاقبا ایجاد اثرات مختلف در فرآیند ترمیمی شد. بهره‌گیری از این مزیت کوچک مولکول‌ها، پیش از این برای بررسی تاثیر سطوح پیام‌رسانی مسیر *MAPK/ERK* بر مکانیسم تعیین قطبیت در حین ترمیم پلاناریا با استفاده از غلظت‌های مختلف کوچک مولکول *U0126* گزارش شده است (۲۴, ۲۵).

نتیجه گیری

اثرات مشاهده‌شده نشان می‌دهند که کوچک مولکول‌های موثر در تکثیر، تمایز و خود نوزایی سلول‌های بنیادی موشی و انسانی و مسیرهای پیام‌رسانی مرتبط با آن‌ها در فرآیند ترمیم پلاناریا نیز نقش بازی می‌کنند که این امر نشان‌دهنده شباهت مکانیسم‌های تنظیم سلول‌های بنیادی در بین این موجودات و مناسب بودن پلاناریا به‌عنوان یک مدل معتبر جهت بررسی مطالعات ترمیم است (۲۸, ۲۹). بااین‌وجود به‌منظور تعیین دقیق مکانیسم تاثیر مسیرها پیام‌رسانی و عملکردهای سلول معرفی‌شده در این تحقیق، تکرار تیمارها با تعداد نمونه بیشتر و استفاده از روش‌های مولکولی مانند هیبریداسیون کلی و هیبریداسیون فلورسنت درجا (*FISH*) و *RNAi* جهت تایید نقش مسیرهای معرفی‌شده در جنبه‌های مختلف ترمیم پلاناریا ضروری است (۳۰, ۳۱). امید می‌رود از این طریق بتوان ضمن بررسی نقش مسیرهای پیام‌رسانی در فرآیند ترمیم پلاناریا و همچنین سطوح مختلف پیام‌رسانی با استفاده از غلظت کوچک مولکول‌های مختلف، به شباهت‌های میان عملکرد مسیرهای پیام‌رسانی مرتبط در فرآیند ترمیم پلاناریا و حفظ خود نوزایی و پرتوانی سلول‌های بنیادی جنینی انسانی و موشی پی برد.

تشکر و قدردانی

هزینه‌های انجام این طرح از سوی پژوهشگاه رویان تامین‌شده است. همچنین از حمایت‌ها و همکاری صمیمانه کارکنان آزمایشگاه‌های رده ۱ و ۲ تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. Mason C, Brindley D, Culme-Seymour E, Davie N. Cell therapy industry: Billion dollar global business with unlimited potential. Regenerative Medicine. 2011; 6(3): p. 265-272.

2. Franco C, et al. Understanding regeneration through proteomics. Proteomics. 2013; 13(3-4): p. 686-709.

3. Pellettieri J, et al. Cell death and tissue remodeling in planarian regeneration. Developmental biology, 2010; 338(1): p. 76-85.

4. Agata, K, et al., Recent identification of an ERK signal gradient governing planarian regeneration. Zoology. 2014; 117(3): p. 161-162.

5. Wenemoser D. Identification of mechanisms that govern regeneration initiation, using the planarian Schmidtea mediterranea as a model. (2012) University of Berlin department of biology, Doctoral thesis, p123S.

6. Wagner DE, Wang IE, Reddien PW. Clonogenic neoblasts are pluripotent adult stem cells that underlie planarian regeneration. Science. 2011; 332(6031): p. 811-816.

7. Önal P, et al. Gene expression of pluripotency determinants is conserved between mammalian and planarian stem cells. The EMBO journal. 2012; 31(12): p. 2755-2769.

8. Reddien PW, Alvarado AS. Fundamentals of planarian regeneration. Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 2004. 20: p. 725-757.

9. Erler P and JR Monaghan. (2015). the link between injury-induced stress and regenerative phenomena: A cellular and genetic synopsis. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms 1849:454-461.

10. Bonasio RS, Tu S, Reinberg D. Molecular signals of epigenetic states. Science. 2010; 330(6004): p. 612-616.

11. Shukla V, et al. Loss of histone acetyltransferase cofactor transformation/transcription domain- associated protein impairs liver regeneration after toxic injury. Hepatology. 2011; 53(3): p. 954-963.

12. Li W, et al. DNA methylation and histone modifications regulate de novo shoot regeneration in Arabidopsis by modulating WUSCHEL expression and auxin signaling. PLoS genetics. 2011; 7(8): p. e1002243.

13. Stewart S, Tsun ZY, Belmonte JCI. A histone demethylase is necessary for regeneration in zebrafish. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2009; 106(47): p. 19889-19894.

14. Kim K, et al. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. Nature. 2010; 467(7313): p. 285-290.

15. Li W, Ding S. Small molecules that modulate embryonic stem cell fate and somatic cell reprogramming. Trends in pharmacological sciences. 2010; 31(1): p. 36-45.

16. Hubert A, et al. Epigenetic regulation of planarian stem cells by the SET1/MLL family of histone methyltransferases. Epigenetics. 2013; 8(1): p. 79-91.

17. Osakada F, et al. In vitro differentiation of retinal cells from humn pluripotent stem cells by small-molecule induction. Journal of cell science. 2009; 122(17): p. 3169-3179.

18. Meissner A. Epigenetic modifications in pluripotent and differentiated cells. Nature biotechnology. 2010; 28(10): p. 1079-1088.

19. Cebrià F, Newmark PA. Planarian homologs of netrin and netrin receptor are required for proper regeneration of the central nervous system and the maintenance of nervous system architecture. Development. 2005; 132(16): p. 3691-3703.

20. Zhang Y, et al. Small molecules, big roles–the chemical manipulation of stem cell fate and somatic cell reprogramming. Journal of cell science. 2012; 125(23): p. 5609-5620.

21. Nakhaei-Rad S, et al. New windows to enhance direct reprogramming of somatic cells towards induced pluripotent stem cells. Biochemistry and Cell Biology. 2011; 90(2): p. 115-123.

22. Lu B, Atala A. Small molecules and small molecule drugs in regenerative medicine. Drug discovery today. 2014; 19(6): p. 801-808.

23. Ho TV, et al. Current Status of Induced Pluripotent Stem Cells, in Tissue Engineering in Regenerative Medicine. 2011; Springer. Book Title: Tissue Engineering in Regenerative Medicine p. 39-52.

24. Tasaki J, et al. ERK signaling controls blastema cell differentiation during planarian regeneration. Development. 2011; 138(12): p. 2417-2427.

25. Umesono Y, et al. The molecular logic for planarian regeneration along the anterior-posterior axis. Nature. 2013; 500(7460): p. 73-76.

26. Rink JC. Stem cell systems and regeneration in planaria. Development genes and evolution. 2013; 223(1-2): p. 67-84.

27. Rouhana L, et al. RNA interference by feeding in vitro–synthesized double- stranded RNA to planarians: Methodology and dynamics. Developmental Dynamics. 2013; 242(6): p. 718-730.

28. Reddien PW, et al. Identification of genes needed for regeneration, stem cell function, and tissue homeostasis by systematic gene perturbation in planaria. Developmental cell. 2005; 8(5): p. 635-649.

29. Alvarado AS, Yamanaka S. Rethinking differentiation: stem cells, regeneration, and plasticity. Cell. 2014; 157(1): p. 110-119.

30. Wagner DE, Ho JJ, Reddien PW. Genetic regulators of a pluripotent adult stem cell system in planarians identified by RNAi and clonal analysis. Cell Stem Cell. 2012; 10(3): p. 299-311.

31. Alvarado AS. Planarian regeneration: its end is its beginning. Cell. 2006; 124(2): p. 241-245.

Journal of Cell & Tissue (JCT) *Original Article*
Wintre 2016; 6(4): 471-480

Exploring the Effect of Epigenetic Modifications on Planarian Regeneration Process using Small Molecules Treatment

Ahmadraji M, M.Sc.[1], Shiravi A, Ph.D.[1], Hassani SN, Ph.D.[2], Baharvand H, Ph.D.[2,3]*

1. Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran
2. Department of Stem Cells and Developmental Biology at the Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, PO Box 19395-4644, Tehran, Iran
3. Department of Developmental Biology, University of Science and Culture, ACECR,Tehran, Iran

*Correspondence address: baharvand@royaninstitute.org

Received: 7 Feb 2015 Accepted: 26 Apr. 2015

Abstract

Aim: In this study, we explored the effect of epigenetic modifications on planarian regeneration process by treating with small molecule epigenetic modifiers

Material and Methods: Planaria worms were cut into 3 sections including head, trunk, and tail regions and treated with 6 small molecules with epigenetic modification effects. All samples were evaluated morphologically for 20 days to monitor the effects on regeneration process.

Results: Morphological analysis of samples treated with selected six small molecules with different epigenetic modification functions revealed that treating with two of them including Sodium butyrate and Valporic acid will result in delayed head, trunk, and tail fragments regeneration, and delayed eye formation in trunk and tail fragments, respectively. In addition, samples treated with other four small molecules including BIX01294, RG108, SAHA, and Tranylcypromine with other epigenetic modification functions, regenerated normally.

Conclusion: These results indicating that different epigenetic levels and activity of histone deacetylases play a key role in planarian regeneration and inhibition of histone deacetylases activity will result in abnormal regeneration. However, further work is needed to determine the exact mechanism of histone deacetylases activity effect on planarian regeneration process. Finally, we hope to understand more about the underlying mechanism of planarian and vertebrate's regeneration inhibition and activation using these findings.

Keywords: Planaria, Regeneration, Epigenetic, Small molecules