پیدایش دردهای نوروپاتیک پس از درمان مدل تجربی آسیب نخاعی در موش با کمک پیوند سلول‌های بنیادین مغز استخوان

دکتر باقر پورحیدر*[1]، دکتر محمد تقی جغتایی[2]، دکتر منصوره سلیمانی[3]، وحید پیرحاجاتی[4]، مریم پورحیدر[5]

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۱/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱/۲۵

چکیده

پیش زمینه و هدف: امروزه پیوند سلول‌های بنیادی از روش‌های متداول برای درمان ضایعات نخاعی (SCI) به‌شمار می‌رود. مطالعات نشان داده‌اند که پیوند سلول‌های بنیادی عصبی (NSCs) برای درمان SCI علی‌رغم ایجاد بهبود حرکتی موجب ایجاد دردهای نوروپاتیک می‌شود. از آنجا که سلول‌های بنیادی مغز استخوان (BMSCs)کاربرد فراوانی در درمان SCI دارند لذا هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر پیوند سلول‌های مذکور در ایجاد دردهای نوروپاتیک می‌باشد.

مواد و روش کار: در این مطالعه از ۲۴ رت بالغ از نژاد ویستار استفاده شد پس از ایجاد مدل آسیب نخاعی contusion، موش‌ها به سه گروه کنترل، شم و آزمایش تقسیم شدند. در گروه کنترل تنها لامینکتومی در سطح T_{8-9} انجام گرفت در گروه آزمایش ($۱۰^۵ \times ۳$) سلول BMSC در محل ضایعه و ۷ روز پس از ضایعه تزریق شد در گروه شم تنها سرم تزریق گردید. سلول‌های پیوندی BMSCs کشت و سپس توسط نشانگر Brdu جهت ردیابی سلول در مطالعات ایمونوهیستوشیمی نشان‌دار گردیدند. بررسی وضعیت حرکتی حیوان‌ها با تست BBB و ارزیابی درد نوروپاتیک با تست withdrawal threshold testهر هفته و به مدت ۸ هفته بعد از ضایعه انجام شد.

یافته‌ها: افزایش معنی‌داری در نمرات BBB حیوانات گروه آزمایش در مقایسه با حیوان‌های گروه‌های sham و کنترل دیده شد ($P<۰/۰۵$) ونیز اختلاف معنی‌داری در میزان withdrawal threshold mean بین گروه‌های آزمایش و sham مشاهده گردید ($P<۰/۰۵$).

بحث و نتیجه گیری: مطالعه حاضر نشان داد که اولاً پیوند سلول‌های BMSC برای درمان SCI به طور موثری سبب بهبود عملکرد حرکتی شده ثانیاً موجب ایجاد دردهای نوروپاتیک می‌شود لذا ضروری است مطالعات سل تراپی در آینده همراه با روش‌هایی برای کاستن دردهای نوروپاتیک باشد.

کلید واژه‌ها: سلول بنیادی مغز استخوان، ضایعه نخاعی، درد نوروپاتیک، پیوند سلولی، withdrawal threshold test

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و سوم، شماره دوم، ص ۱۳۲-۱۲۳، خرداد و تیر ۱۳۹۱

آدرس مکاتبه: دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده پزشکی، گروه آناتومی، تلفن: ۰۹۱۴۴۴۶۲۱۶۵

Email: bpourheydar@yahoo. com

مقدمه

ضایعه نخاعی خواه به علت تروما ایجاد شده باشد و یا علت غیر تروماتیک داشته باشد موجب اختلال در عملکرد و ناتوانی می‌شود. آسیب نخاعی نه تنها به طور فیزیکی و روانی بر خود شخص آسیب دیده اثر می‌گذارد بلکه عوارض آن خانواده و جامعه را هم درگیر می‌سازد.

مرکز ملی آمار ضایعات نخاعی آمریکا[5] میزان شیوع ضایعات نخاعی در این کشور را در سال ۲۰۰۴، ۱۱۰۰۰ مورد در سال اعلام کرد که حدوداً ۴۰ نفر را در هر یک میلیون نفر جمعیت این کشور شامل می‌شود که این میزان در جهان بین ۱۵ تا ۴۰ مورد در هر یک میلیون نفر جمعیت می‌باشد (۱) در دنیا حدود ۲/۵ میلیون نفر با ضایعات نخاعی زندگی می‌کنند و هر سال ۱۳۰۰۰۰ نفر با ضایعات جدید به این تعداد اضافه می‌شود (۲).

---

[1] استادیار گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه (نویسنده مسئول)

[2] استاد گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

[3] استادیار گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

[4] دانشجوی دکتری علوم تشریحی، دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

[5] کارشناس ارشد گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

[5] National Spinal Cord Injury Statistical Center(NSCISC)

در کشور ماهم با توجه به عوارض جنگ تحمیلی و نیز افزایش تصادفات جاده‌ای تعداد بیماران مبتلا به ضایعات نخاعی افزایش پیدا کرده است. به طور کلی ۷۰۰۰ نفر در ایران دچار ضایعه نخاعی هستند که هر سال سه در صد به این مقدار افزوده می‌شود. مرکز ضایعات نخاعی وابسته به معاونت بهداشت و درمان بنیاد شهید و امور ایثارگران آمار جانبازان ضایعه نخاعی در کشور را ۲۰۱۴ نفر اعلام کرده است.

به دنبال ضایعه نخاعی فرد مبتلا درحالی‌که شغل خود را از دست می‌دهد هزینه‌های جدیدی به زندگی او اضافه می‌شود به عنوان مثال هزینه نگهداری و توان‌بخشی یک فرد ۲۵ ساله با ضایعه نخاعی (تتراپلژی) در آمریکا ۲/۹ میلیون دلار برآورد شده است (۱) که شامل هزینه‌های خدمات بستری و سرپایی و مراقبت‌های پرستاری و تجهیزات پزشکی می‌باشد.

لذا با توجه به اثرات سوء فیزیکی و روانی و اقتصادی این ضایعات بر شخص و خانواده و جامعه، نیاز به مداخلات درمانی و پزشکی به منظور کاهش عوارض ناشی از صدمات ضروری به نظر می‌رسد. در سال‌های اخیر روش‌های درمانی مختلفی برای درمان ضایعات نخاعی پیشنهاد شده است. با توجه به این‌که بعد از ضایعه نخاعی نورون‌ها و سلول‌های گلیال از بین می‌روند لذا یکی از اهداف مهم درمانی جایگزین کردن این سلول‌هاست. یکی از انواع سلول‌ها که اخیراً توجه محققین را به خود جلب کرده است استفاده از سلول‌های بنیادی[1] می‌باشد. در سال‌های اخیر از سلول‌ها و بافت‌های مختلف برای پیوند سلولی بعد از SCI استفاده شده است که عبارتند از: سلول‌های بنیادی جنینی[2]، گزارش‌ها نشان داده‌اند که این سلول‌ها پس از پیوند به داخل نخاع صدمه دیده به نورون متمایز شده و به حفظ عملکرد کمک کردند (۳) پیوند سلول‌های[3] روش دیگری است که برای درمان SCI بکار رفته است (۴). این سلول‌ها دارای توانایی مهاجرت به بافت‌های آسیب دیده و تمایز به انواع سلول‌ها مثل نورون، آستروسیت و الیگودندروسیت بوده و پس از پیوند سبب بهبود کلینیکی در مدل‌های حیوانی شده‌اند. از سلول‌های[4] هم به منظور درمان SCI استفاده شده است گزارش‌ها نشان داده‌اند که این سلول‌ها موجب میلینه شدن آکسون‌ها و رژنراسیون آکسون‌های آسیب دیده و بهبود فانکشنال چشمگیری شده‌اند (۵) از سلول‌های SCs[5] نیز برای سل تراپی استفاده شده است(۶). مطالعات نشان داده‌اند که پیوند این سلول‌ها موجب بهبود عملکرد در حیوانات آسیب دیده نخاعی شده است (۷).

مطالعات نشان می‌دهند که هرچند پیوند سلول‌های بنیادی در حیوانات آسیب دیده نخاعی موجب بهبود حرکتی می‌شوند ولی موجب ایجاد درد ناخواسته‌ای بنام آلودینیا می‌گردد (۸). آلودینیا یک سندرم درد غیر طبیعی می‌باشد که در آن تحریکاتی که در حالت معمولی غیر دردناک می‌باشند موجب ایجاد درد می‌شوند. مطالعات اپیدمیولوژیکی نشان داده‌اند که بالغ بر ۶۴درصد بیماران ضایعه نخاعی از سندرم‌های درد مزمن[6] رنج می‌برند (۹). آلودینیا تأثیرات فیزیکی و پسیکولوژیکی مختلفی را بر روی بیماران گذاشته و موجب اختلال در کیفیت زندگی (۱۰) آن‌ها شده ونیز موجب می‌شود که این بیماران توانایی کم‌تری برای کار کردن داشته باشند.

به طور کلی محققین دو مکانیسم اصلی را برای ایجاد آلودینیا توضیح می‌دهند: مکانیسم اول شامل این هیپوتز می‌شود که بعد از ضایعه نخاعی تون مهاری[7] در نخاع کاهش یافته و یا از بین می‌رود. در شرایط طبیعی نوروترانسمیتر[8] که توسط اینترنورون‌های اینترنورون‌های موجود در ماده خاکستری شاخ خلفی نخاع آزاد می‌شود- انتقال سیناپسی ایمپالس‌های درد را تعدیل می‌کنند (۱۱) ولی بعد از ضایعه نخاعی مقدار فراوانی از اینترنورون‌های GABAergic شاخ خلفی از بین می‌روند (۱۲) که این امر موجب از بین رفتن تون مهاری در شاخ خلفی شده که خود سبب تسهیل انتقال ایمپالس‌های تحریکی به لایه‌های سطحی شاخ خلفی نخاع (لامیناهای I تا III که با ادراک درد[9] در ارتباط می‌باشند) می‌گردد می‌گردد (۱۳). مکانیسم دومی که محققین برای اتیولوژی آلودینیا شرح می‌دهند عبارت است از این‌که: سلول‌های بنیادی مانند سلول‌های بنیادی عصبی - هنگامی‌که به داخل نخاع ضایعه دیده پیوند می‌شوند پرولیفراسیون پیدا کرده و به سلول‌های گلیال (عمدتاً آستروسیت‌ها) متمایز می‌شوند (۱۵،۱۴) که سلول‌های اخیر فاکتورهای نوروتروفیک به ویژه فاکتور رشد عصبی (NGF) را تولید می‌کنند (۱۶). مطالعات مختلف نشان داده‌اند که NGF موجب جوانه زدن آکسونی غیر طبیعی در نورون‌های لامیناهای I تا III شاخ خلفی نخاع که با ادراک درد در ارتباط می‌باشد- شده که خود به ایجاد آلودینیا منجر می‌شود(۱۷). بررسی‌های متعدد نشان می‌دهد که پیوند سلول‌های بنیادی به داخل نخاع ضایعه دیده موش‌های صحرایی موجب بهبود حرکتی در این حیوانات می‌شود. از آنجا که امروزه استفاده از سلول‌های بنیادی مغز

[1] stem cells
[2] ESCs (embryonic stem cells)
[3] NSCs (neural stem cells)
[4] OECs (olfactory ensheathing cells)
[5] Schwann cells

[6] chronic pain syndromes
[7] inhibitory tone
[8] GABA(Gamma Amino Butyric Acid)
[9] nociception

استخوان (BMSCs) در مطالعات سلول درمانی (سل تراپی) برای درمان ضایعات نخاعی کاربرد وسیعی پیدا کرده است لذا ما بر آن شدیم تا بررسی کنیم که آیا پیوند این سلول‌ها در نخاع آسیب دیده می‌تواند موجب بهبود فانکشنال شده ونیز قادر است موجب کاهش آلودینیا گردد؟

مواد و روش‌ها

حیوانات:

در این مطالعه از موش‌های صحرایی ماده نژاد ویستار (n =۲۴) به وزن ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم (تهیه شده از انستیتو پاستور تهران) استفاده شده است. تمام مراحل این مطالعه توسط کمیته اخلاقی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران از نظر اصول نگهداری حیوانات آزمایشگاهی مورد تایید قرار گرفته است. حیوانات در قفس‌های استاندارد نگهداری می‌شدند. اتاق نگهداری دارای نور و حرارت کافی بود. درجه حرارت اتاق در محدوده ۳۷ درجه سانتی‌گراد حفظ می‌شد و آب و غذای کافی برای حیوانات به صورت آزاد وجود داشت.

جداسازی سلول‌های بنیادی مغز استخوان:

جدا سازی سلول‌های بنیادی مغز استخوان طبق روشی که جزئیات آن توسط Azizi و همکاران در سال ۱۹۹۸ شرح داده شد (۱۸) انجام شد. به طور خلاصه سلول‌های بنیادی مغز استخوان از استخوان‌های تیبیا و فمور استخراج شده و در محیط کشت α -MEM کشت داده شده و حدود چهار بار پاساژ داده شدند.

نشان‌دار کردن سلول‌های بنیادی مغز استخوان:

برای نشان‌دار کردن سلول‌های BMSCc - این سلول‌ها ۷۲ ساعت قبل از پیوند در داخل Brdu[1] که با غلظت 3μg/ml به محیط کشت افزوده می‌شود- انکوبه شدند (۱۹).

مدل ضایعه نخاعی:

برای ایجاد ضایعه نخاعی از روش contusion و دستگاه (NYU[2]) استفاده شد(۲۰) به این ترتیب که لامینکتومی در سطح سطح T_8 -$_9$ طناب نخاعی انجام شد. پس از expose شدن نخاع یک استوانه فلزی ۱۰ گرمی و به قطر ۲میلی‌متری از ارتفاع ۱۲/۵ میلی‌متری بر روی این ناحیه انداخته شد. بعد از جراحی محل زخم بسته شده و مراقبت‌های بعد از عمل به مدت یک هفته انجام شد.

هیستولوژی:

چهار هفته بعد از ضایعه نخاعی تعداد چهار حیوان عمیقاً بیهوش شدند و پرفیوژن ترانس کاردیال توسط پارافرمالدئید ۴درصد انجام گرفت. بافت‌ها یک شبانه روز در داخل سوکرز ۳۰درصد انکوبه شدند. یک قطعه ۱/۵ سانتی‌متری از نخاع که شامل محل ضایعه می‌شد جدا گردید- embedding در داخل OCT انجام شد؛ و برش‌های عرضی ۸ میکرومتری به صورت سریال تهیه شد. این مقاطع برای مطالعه مورفولوژی با رنگ کرزیل ویوله رنگ آمیزی شدند.

پروسه پیوند سلولی:

موش‌های صحرایی به صورت تصادفی به سه گروه کنترل (n=۸) و شم (n =۸) و آزمایش (n =۸) تقسیم شدند. در گروه کنترل تنها لامینکتومی صورت گرفت. در گروه شم تنها سرم به صورت داخل نخاعی تزریق شد. در گروه آزمایش (گروه BMSC) تعداد (۳×۱۰^{۵}) سلول BMSC در محل ضایعه و هفت روز پس از آسیب نخاعی تزریق شد. سوسپانسیون سلول‌هایBMSC با غلظت ۳۰۰۰۰ سلول دریک میکرولیتر تهیه شد. هفت روز پس از ضایعه نخاعی موش‌ها توسط مواد بی حس کننده بیهوش شدند و محل ضایعه دوباره expose شد و پیوند سلولی طبق مراحل زیر صورت گرفت: 10μl سوسپانسیون سلولی توسط یک سرنگ هامیلتون به آرامی و در مدت دو دقیقه در فواصل یک میلی‌متری روسترال و کودال محل ضایعه تزریق شد. قبل از هر جلسه پیوند سلولی یک نمونه از سلول‌های BMSC از سرنگ هامیلتون بر روی یک لام نئوبار ریخته شد و با تریپان بلو رنگ آمیزی شد و cell viability آن‌ها تعیین گردید.

بررسی رفتاری (عملکرد حرکتی):

ارزیابی وضعیت حرکتی با استفاده از تست open- field walking test انجام شد (۲۱). در این تست توانایی حرکتی حیوان در عرض ۵ دقیقه سنجیده می‌شود. به حیوان اجازه داده می‌شود که آزادانه حرکت کند. دو آزمایش کننده مستقل حرکات اندام‌های خلفی موش را مشاهده کرده و بر اساس مقیاس (BBB scale[3]) نمره گذاری می‌کنند.

در مقیاس BBB به حیوان نمرات از صفر تا ۲۰ داده می‌شود که نمره صفر نشان دهنده فلج کامل و نمره ۲۱ نشان دهنده راه رفتن نرمال می‌باشد. نمره نهایی حیوان میانگین نمرات هر دو آزمایش کننده خواهد بود. در طول تست راه رفتن حیوان توسط یک دوربین دیژیتال فیلم‌برداری می‌شود. بررسی وضعیت حرکتی قبل از ضایعه و پیوند سلولی و نیز هر هفته و به مدت ۸ هفته بعد از پیوند سلولی انجام شد.

[1] bromodeoxyuridine
[2] new york university weight-drop device
[3] Basso, Beattie and Bresnahan

بررسی رفتاری (مکانیکال آلودینیا):

برای بررسی حساسیت مکانیکی در کف اندام‌های خلفی موش‌ها از ابزاری بنام von frey filaments استفاده شد. این بررسی قبل از پیوند سلولی و بعد از آن هر هفته و به مدت ۸ هفته انجام شد. (جزئیات انجام تست توسط آقای pitcher و همکاران در سال ۱۹۹۹ شرح داده شده است) (۲۲). این تست بنام withdrawal threshold hair test نامیده می‌شود که توسط دو فرد آزمایش کننده انجام می‌گیرد. قابل ذکر است که این افراد نسبت به درمان blind می‌باشند. سکویی که تست بر روی آن انجام می‌شود از یک جعبه پلاستیکی transparent تشکیل شده است. این جعبه حاوی سوراخ‌هایی به قطر ۱/۵ میلی‌متر می‌باشد که از طریق این سوراخ‌ها فیلامان‌های von frey filaments با کف پای حیوان تماس پیدا می‌کند. این فیلامان‌ها از رشته‌هایی تشکیل شده‌اند که range آن‌ها از ۰.۰۰۸ تا ۳۰۰ گرم می‌باشد که با بکار بردن این فیلامان‌ها میزان hind paw withdrawal threshold تعیین می‌گردد.

جهت آداپته شدن حیوان با محیط آزمایش قبل از انجام تست حیوان‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در جعبه آزمایش قرار داده می‌شوند. همه چهار پای حیوان بایستی در تماس با سکو باشد. هر کدام از فیلامان‌ها در یک جهت صعودی برای تحریک کف پای حیوان بکار برده می‌شوند و تنها برداشته شدن کامل پای حیوان از سکو به عنوان withdrawal response تلقی می‌شود. تست ۵ بار و با فواصل ۵ ثانیه‌ای انجام می‌شود. مقدار نیرویی را که این فیلامان‌ها بر پای حیوان وارد کرده و موجب ایجاد درد و در نتیجه برداشته شدن آن (paw withdrawal) می‌شود بر حسب گرم بر روی فیلامان‌ها نوشته شده است که در واقع آستانه تحریکی درد را برای پای حیوان تعیین می‌کند.

ایمونوهیستوشیمی:

۸ هفته پس از پیوند سلولی حیوان‌ها عمیقاً بیهوش شدند و پرفیوژن ترانس کاردیال توسط پارافرمالدئید ۴درصد انجام شد. بافت‌ها به صورت overnight در داخل سوکرز ۳۰درصد انکوبه شدند و یک قطعه یک سانتی متری نخاع از محل ضایعه برداشته شد و پس از Embedding در داخل OCT سکشن های سریال ۸ میکرومتری تهیه شد.

ایمونوهیستوشیمی Brdu:

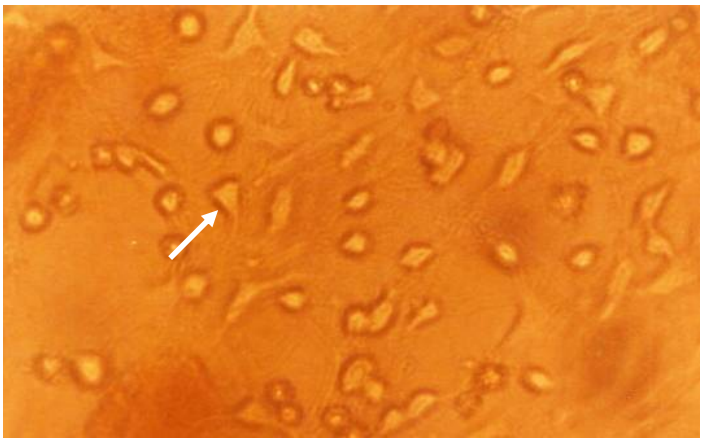
سلول‌های BMSC که قبل از پیوند با Brdu نشان‌دار شده بودند طبق مراحلی که آقای Li Y et al آن‌را شرح دادند شناسایی شدند (۲۳). به طور خلاصه سکشن ها پس از انکوبه شدن با mouse anti- Brdu monoclonal antibody (sigma) به مدت یک شب با Fluoescein Isothiocyanate (FITC) conjugated secondary antibody انکوبه شدند سپس پس از شستشو با PBS با لامل پوشانده شده و با میکروسکوپ فلوئورسنت مورد مطالعه قرار گرفتند.

آنالیز آماری:

مقایسه آماری بین گروه‌ها با استفاده از (ANOVA) و Tukey test انجام شد. آنالیز آماری با استفاده از برنامه SPSS15 انجام گرفت. $P < 0.05$ از نظر آماری معنی‌دار تلقی شد و تمامی داده‌ها به صورت (Mean± SD) ارائه شد.

یافته‌ها

کشت سلولی: سلول‌های BMSC در محیط کشت DMEM کشت داده شدند و هنگامی‌که به confluency ۸۰درصد رسیدند چهار بار پاساژ داده شدند.

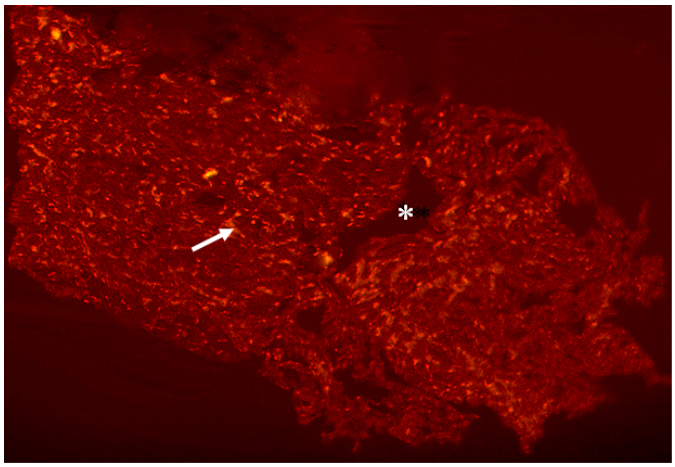


شکل شماره (۱): مرحله‌ای از کشت سلول‌های بنیادی مغز استخوان (BMSC) مشاهده می‌شود سلول‌ها مورفولوژی تیپیک سلول‌های (BMSC) را از خود نشان داده و همگی به کف فلاسک چسبیده‌اند. (عکس‌برداری از میکروسکوپ Olympus 1X 70)

چهار هفته پس از ضایعه contusion مشاهده نمونه‌هایی که با کرزیل ویوله رنگ آمیزی شده بود نشان داد که تعدادی واکوئل و حفره کیستی با اندازه‌های مختلف در محل ضایعه ایجاد شده است. تشکیل کیست حاکی از مرگ نورون‌ها و اینتر نورون‌ها و سلول‌های گلیال بعد از SCI می‌باشد.

یافته‌های ایمونوهیستوشیمی:

یافته‌های ایمونوهیستوشیمی وجود سلول‌های پیوند شده را در محل ضایعه تایید کرد به عبارت دیگر یافته‌های ایمونوهیستوشیمی نشان داد که ۸ هفته بعد از پیوند سلول‌های BMSC پیوند شده زنده مانده و در محل ضایعه حضور یافتند. مشاهده با میکروسکوپ فلوئورسنت نشان داد که سلول‌های بنیادی مغز استخوان که در محل ضایعه پیوند شدند Brdu positive بوده و ۸ هفته پس از پیوند زنده مانده و در اطراف محل ضایعه تجمع کردند (شکل ۲).



شکل شماره (۲): یافته‌های ایمونوهیستوشیمی ۸ هفته پس از پیوند سلول‌های BMSC . مقطع عرضی از محل ضایعه- فلاش سلول‌های Brdu-positive BMSC را نشان می‌دهد که ۸ هفته پس از پیوند زنده مانده‌اند و در اطراف cavity مستقر شده‌اند و ستاره محل ضایعه را نشان می‌دهد. ضخامت 40 µm - (مشاهده با میکروسکوپ فلوئورسنت Olympus AX70)

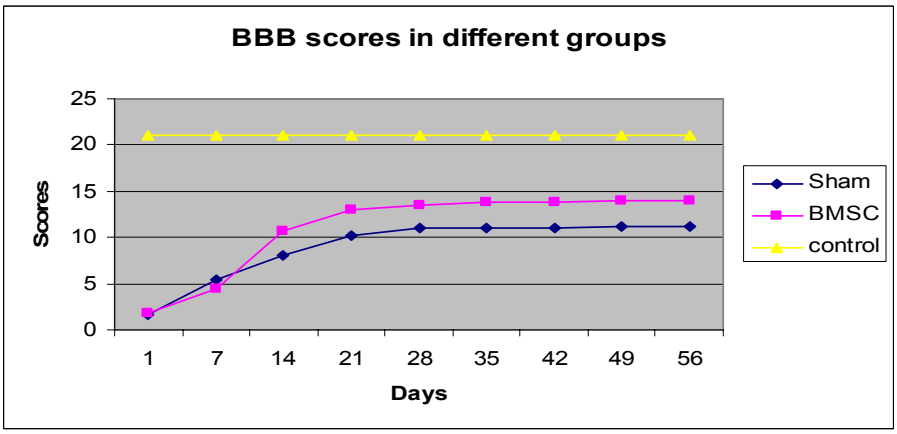
نتایج بررسی رفتاری (عملکرد حرکتی):

به طور کلی قبل از ضایعه نخاعی حیوانات تمام گروه‌ها BBB score– ۲۱ از خود نشان دادند. یک روز پس از ضایعه حیواناتی که ضایعه contusion دریافت کرده بودند کاهش قابل ملاحظه‌ای را در اعمال حرکتی اندام‌های خلفی از خود نشان دادند تا جایی که فلج کامل پیدا کرده و هیچ حرکتی در آن‌ها مشاهده نشد و BBB score آن‌ها بین صفر تا یک بود.

در روزهای بعد BBB score تمامی گروه‌ها به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت به عنوان مثال در روز ۱۴ بعد از ضایعه نخاعی BBB score بر حسب (mean ±SD) در گروه شم به (۱/۱۲ ± ۸/۱۲) و در گروه BMSC به (۱/۳۰ ± ۱۰/۶۲) رسید. از هفته ۳ تا ۸ حیوان‌های گروه BMSC در مقایسه با حیوان‌های گروه شم افزایش پیش رونده‌ای را در حرکات اندام خلفی از خود نشان دادند ($p < 0.05$) (نمودار ۱)

در هفته‌های هفتم و هشتم در رت‌های گروه BMSC در مقایسه با رت‌های گروه شم به طور معنی‌داری مهارت‌های راه رفتن پیشرفت پیدا کرد علاوه بر این رت‌های گروه BMSC پایداری لازم را در گام برداشتن (consistent weight supported stepping) و هماهنگی اندام‌های قدامی و خلفی در طی راه رفتن (consistent fore-hind limb coordination) را کسب کردند در حالی که رت‌های گروه شم فاقد این پیشرفت‌ها بودند. حیوان‌های گروه کنترل در طول تمام مراحل تحقیق دارای BBB score – ۲۱ بودند.

در هفته هشتم میانگین BBB score در حیوان‌های گروه شم و BMSC به ترتیب به مقادیر زیر رسید: (۱/۱۲ ± ۱۱/۱۲) و (۰/۷۵ ± ۱۴). تجزیه و تحلیل آماری نشان می‌دهد که از نظر میانگین BBB score یک اختلاف معنی‌دار مهمی بین گروه‌های BMSC و شم و کنترل وجود دارد. ($P < 0.05$).

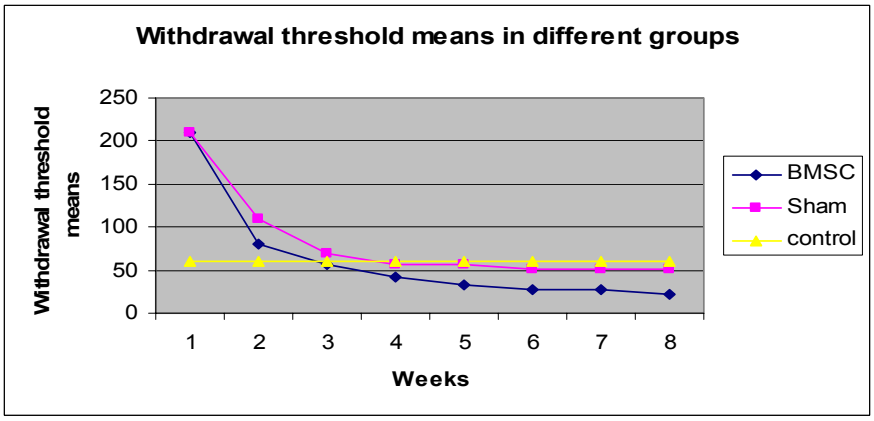


نمودار شماره (۱): نمودار ارزیابی عمل حرکتی با استفاده از تست BBB هشت هفته پس از پیوند به صورت هفتگی در تمامی گروه‌ها. تجزیه و تحلیل آماری نشان می‌دهد که از نظر میانگین BBB score اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های BMSC و شم و کنترل وجود دارد و این نشان می‌دهد که پیوند سلول‌های BMSC در مدل تجربی ضایعه نخاعی می‌تواند موجب بهبود حرکتی معنی‌داری گردد.

نتایج بررسی رفتاری (آلوداینیای مکانیکی):

Von Frey hair test به منظور ارزیابی آلوداینیای مکانیکی هر هفته و به مدت ۸ هفته در تمام گروه‌های مورد مطالعه انجام گرفت و نتایج زیر بدست آمد: (نمودار ۲). میانگین پاسخ درد حیوانات به تحریک پنجه خلفی در گروه کنترل در تمام طول ۸ هفته ثابت و برابر با (۰± ۶۰) گرم بود. میانگین پاسخ درد حیوانات به تحریک پنجه خلفی در گروه شم در هفته اول برابر با (۱۹/۶۴ ±۲۱۰) گرم – در هفته دوم برابر با (۱۰± ۱۱۰) گرم – در هفته سوم برابر با (۶/۵۴ ± ۷۰) گرم – در هفته‌های چهارم و پنجم برابر با (۴/۲۵± ۵۵/۷۵) گرم و در هفته‌های ششم و هفتم و هشتم برابر(۵/۵۶± ۵۱/۵) گرم بود. در پایان هفته هشتم اختلاف این گروه با گروه‌های BMSC و کنترل معنی‌دار بود ($p < 0.05$)

میانگین پاسخ درد حیوانات به تحریک پنجه خلفی در گروه BMSC در هفته اول برابر (۱۹/۶۴± ۲۱۰) گرم – در هفته دوم برابر (۱۰/۰۹± ۸۰/۷۵) گرم – در هفته سوم برابر (۸/۲۵±۵۶/۵) گرم- در هفته چهارم برابر (۷/۰۶ ± ۴۱/۶۳) گرم – در هفته پنجم برابر (۶/۰۱ ± ۳۳/۱۳) گرم – در هفته‌های ششم و هفتم برابر (۴/۹۶ ± ۲۷/۵) گرم و در هفته هشتم برابر (۲/۰۱ ± ۲۱/۸۸) گرم بود . در پایان هفته هشتم اختلاف معنی‌داری بین این گروه و گروه‌های کنترل و شم مشاهده شد ($P < 0.05$).



نمودار شماره (۲): مقایسه میانگین پاسخ درد حیوانات به تحریک پنجه خلفی در گروه‌های مورد بررسی در پایان هفته‌های اول تا هشتم پس از ضایعه بر اساس عمل پس کشیدن اندام خلفی (withdrawal threshold) بر حسب گرم. تجزیه و تحلیل آماری نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری بین گروه BMSC و گروه‌های شم و کنترل وجود دارد و این نشان می‌دهد که پیوند سل‌های BMSC در مدل تجربی ضایعه نخاعی می‌تواند موجب ایجاد مکانیکال آلودینیا شود.

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که پیوند سلول‌های بنیادی مغز استخوان (BMSC) به داخل نخاع آسیب دیده با ضایعه contusion سبب بهبود عملکرد حرکتی و نیز موجب ایجاد آلودینیای مکانیکی می‌گردد به عبارت دیگر هر چند پیوند سلول‌های BMSC موجب بهبود حرکتی می‌شود ولی از طرف دیگر منجر به ایجاد حس نامطلوبی بنام مکانیکال آلودینیا می‌گردد.

یافته‌های هیستولوژیک این مطالعه تایید کرد که حیوانات گروه آزمایش یک ضایعه contusion را متحمل شده‌اند. سلول‌های BMSC کشت داده شدند (شکل ۱) و توسط Brdu نشان‌دار گردیدند.

یافته‌های ایمونوهیستوشیمی نشان داد که بعد از ۸ هفته سلول‌های BMSC گه Brdu-positive بودند زنده ماندند و در اطراف محل ضایعه تجمع پیدا کردند (شکل ۲).

نتایج ارزیابی رفتاری (عملکرد حرکتی) نشان داد که پیوند سلول‌های BMSC در مدل تجربی ضایعه نخاعی می‌تواند موجب بهبود حرکتی معنی‌داری گشته و پیوند این سلول‌ها می‌تواند روش درمانی موثری را برای ضایعات نخاعی فراهم آورد..همچنین نتایج مطالعه حاضر نشان داد که پیوند سلول‌های BMSC به داخل نخاع ضایعه دیده موجب ایجاد یک حالت نامطلوبی بنام مکانیکال آلودینیا می‌شود. ضایعه نخاعی اغلب منجر به ایجاد یک درد نوروپاتیک ناتوان کننده‌ای بنام آلودینیا می‌شود. آلودینیا در تعریف عبارت است از یک حساسیت افزایش یافته در پاسخ به محرک‌هایی است که در حالت نرمال غیر دردناک می‌باشند (۲۴) به عبارت دیگر آلودینیا پاسخ دردناک به یک محرک غیر دردناک می‌باشد.

محققین مکانیسم‌های مختلفی را برای اتیولوژی آلودینیا شرح داده‌اند به عنوان مثال مطالعه آقای Sung و همکاران نشان داد که کاهش گیرنده‌های μ- opioid در نخاع به دنبال ضایعه اعصاب محیطی با مکانیکال آلودینیا در ارتباط می‌باشد (۲۵).

مطالعه آقای Mukhida و همکاران نشان داد که به دنبال ضایعه نخاعی مقدار فراوانی از اینترنورون‌های GABAergic در شاخ خلفی نخاع از بین رفته و این موجب تسهیل انتقال ایمپالس‌های تحریکی در شاخ خلفی شده که خود منجر به ایجاد آلودینیا می‌شود. این محققین اضافه کردند که پیوند داخل نخاعی سلول‌های GABAergic می‌تواند موجب کاهش مکانیکال آلودینیا شود (۲۶).

Ledeboer و همکاران در مقاله خود اظهار داشتند که ضایعه نخاعی یا تروما سبب فعال شدن سلول‌های گلیال (میکروگلیا و آستروسیت) شده و این سلول‌های فعال شده سیتوکین های پیش التهابی و سایر مدیاتورها را آزاد می‌کنند که این خود موجب تسهیل انتقال ایمپالس‌های درد شده و در نهایت منجر به تولید آلودینیا می‌شود (۲۷). آن‌ها گزارش کردند که تزریق (Minocycline intrathecal) که یک مهار کننده فعالیت سلول‌های میکروگلیال می‌باشد می‌تواند موجب کاهش مکانیکال آلودینیا شود.

Hofstetterو همکاران سلول‌های بنیادی عصبی (NSCs) را به داخل نخاع آسیب دیده رت تزریق کردند و گزارش کردند که این سلول‌ها تزاید پیدا کرده و به سلول‌های گلیال (عمدتاً آستروسیت‌ها) تمایز پیدا کردند که سلول‌های اخیر نیز فاکتورهای نوروتروفیک به ویژه فاکتور رشد عصبی (NGF) را آزاد نمودند. NGFموجب جوانه زدن آکسونی غیر عادی در نورون‌های لامینای I تا III شاخ خلفی نخاع که با دریافت حس درد در ارتباطند گشته و این خود موجب ایجاد آلودینیا می‌شود (۱۷).

Maciasو همکاران سلول‌های بنیادی عصبی (NSCs) را به رت‌های مبتلا به ضایعه نخاعی پیوند کردند که موجب بروز آلودینیا در اندام‌های حیوان‌ها شد. همچنین این گروه با مهندسی ژنتیک سلول‌های NSCs را طوری اصلاح کردند که آن‌ها GDNF[1] را بیان کنند و سپس این سلول‌ها را به رت‌های مبتلا به ضایعه نخاعی تزریق کردند و مشاهده نمودند که آلودینیای مکانیکی کاهش یافت و نتیجه گرفتند که پیوند سلول‌های NSCs موجب ایجاد آلودینیا شده و اینکه GDNF نقش مهمی را در کاهش آلودینیا ایفا می‌کند(۲۸).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که پیوند سلول‌های BMSC به داخل نخاع آسیب دیده موش صحرایی بور معنی‌داری میانگین پاسخ درد به تحریک پنجه اندام خلفی[2] را در مقایسه با حیوانات گروه شم که هیچ سلولی را دریافت نکرده بودند کاهش داد. ($P<0.05$) (شکل A,B,C- ۵). به عبارت دیگر پیوند این سلول‌ها سبب ایجاد آلودینیای مکانیکی شد.

نتایج مطالعه حاضر با نتایج مطالعات Hofstetter و همکاران (۲۰۰۵) (۱۷) و Macias و همکاران (۲۰۰۶) (۲۸) مشابه است این نتایج نشان می‌دهد که پیوند سلول‌های بنیادی به داخل نخاع ضایعه دیده موجب ایجاد آلودینیا می‌شود.

همچنین نتایج مطالعه حاضر نشان داد هرچند پیوند سلول‌های بنیادی مغز استخوان در داخل نخاع آسیب دیده حیوان به طور چشم‌گیری موجب بهبود عملکرد حرکتی می‌شود ولی آن سبب ایجاد درد نامطلوبی بنام آلودینیا می‌گردد.

[1] glial derived neurotrophic factor
[2] withdrawal threshold

به طور خلاصه یافته‌های این تحقیق نشان می‌دهد که پیوند سلول‌های بنیادی مغز استخوان در نخاع آسیب دیده یک روش درمانی موثری بوده و ضروری است در مطالعات سل تراپی آینده برای درمان ضایعات نخاعی از این سلول‌ها استفاده شود و اینکه هرچند پیوند این سلول‌ها موجب بهبود حرکتی در حیوان می‌شود از طرف دیگر موجب افزایش آلوداینیا ی مکانیکی می‌گردد لذا مطالعات سل تراپی آینده باید به دنبال یافتن روش‌هایی برای کاستن آلوداینیا در حیواناتی می‌شود که برای درمان آن‌ها از پیوند سلول‌های بنیادی استفاده می‌شود.

محققین روش‌های مختلفی را برای کاستن آلوداینیا گزارش کرده‌اند که عبارتند از: پیوند سلول‌های GABAergic (۲۶)- تجویز آگونیست های رسپتورهای GABA (۲۹)- پیوند سلول‌هایی که سروتونین و کاته کولامین‌ها و اوپیوئیدها را ترشح می‌کنند نظیر سلول‌های کرومافینی بخش مدولای غده آدرنال(۳۰)- استفاده از meloxicam- مهار کننده cyclooxigenase-2 (cox-2) (۳۱)- تجویز intrathecal آدنوزین(۳۲) و لیدوکائین(۳۳) و به طور کلی استفاده از روش‌هایی که تمایز سلول‌های بنیادی را از رده آستروسیتی به رده الیگودندروسیتی shift دهد(۱۷). و استفاده از Minocycline که از فعال شدن سلول‌های گلیال (میکروگلیا و آستروگلیا) جلوگیری کرده و به دنبال آن مانع از بیان سیتوکین‌های پیش التهابی می‌شود (۳۴).

نتیجه گیری

مطالعه حاضر نشان داد که پیوند سلول‌های بنیادی مغز استخوان به داخل نخاع آسیب دیده موش صحرایی موجب بهبود عملکرد حرکتی شده و از طرف دیگر سبب ایجاد درد نوروپاتیک ناخواسته‌ای بنام آلوداینیا می‌شود و ضروری است مطالعات آینده سل تراپی شامل یافتن روش‌هایی باشد که بتواند آلوداینیا را کاهش دهد.

تقدیر و تشکر

مطالعه حاضر از حمایت مالی مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی تهران برخوردار شده است . پروسه cryosectioning این مطالعه در بخش آناتومی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است لذا در اینجا لازم میدانیم از زحمات همکاران در این مراکز صمیمانه سپاسگزاری کنیم.

References:

1. Peter AC Lim, Adela M Tow. Recovery and regeneration after spinal cord injury: a review and summary of recent literature. Ann Acad Med Singapore 2007; 36:49-57.
2. Thuret S, Moon LD, Gage FH. Therapeutic interventions after spinal cord injury. Nature Rev Neurosci 2006; 7:628-43.
3. Deshpande DM, Kim YS, Martinez T, Carmen J, Recovery from paralysis in adult rats using embryonic stem cells. Ann. Neurol 2006; 60:32-44.
4. Enzmann GU, Benton RL, Talbott JF, Cao Q. Functional consideration of stem cell transplantation therapy for spinal cord repair. J Neurotrauma 2006;23:479-95.
5. Delaviz H, Joghataie MT, Mehdizadeh M, Bakhtiari M. The effect of fetal olfactory mucosa on tissue sparing and locomotor recovery after spinal cord hemisection in rats. Yakhteh Med J 2008; 10(3):185-92.
6. Joghataie MT, Bakhtiari M. Pourheydar B, Mehdizadeh M. Co-transplantation of Schwann cells and bone marrow stromal cells promotes locomotor recovery in the rat contusion model of spinal cord injury. Yakhteh Med J 2010; 12(1):7-16.
7. Khalatbari AR, Tiraihi T. A comparison study of therapeutic benefits of intraspinal and intravenous bone marrow stromal cells administration to spinal cord injuries. Iran Biomed J 2009;13(1):43-8.
8. Christensen MD, Hulsebosch CE. Chronic central pain after spinal cord injury. J Neurotrauma 1997; 14:517-37.
9. Nicholson B, Verma S. Comorbidities in chronic neuropathic pain. Pain Med 2004: 5 (suppl 1) S9-S27.
10. Cairns D.M, R.H Adkins and M.D Scott. Pain and depression in acute traumatic spinal cord injury: origins of chronic problematic pain? Arch Phys Med Rehab 1996; 77:329-35.

11. Mayer DJ, Price DD, Becker DP. Neurophysiological characterization of the anterolateral spinal cord neurons contributing to pain perception in man. Pain 1981; 11:163-83.
12. Wolf CJ. Pain: moving from symptom control toward mechanism specific pharmacologic management. Ann Intern Med 2004; 140: 441-51.
13. Baba H.Ji R-R, Kohno T. Removal of GABAergic inhibition facilitates polysynaptic A fiber-mediated excitatory transmission to the superficial spinal dorsal horn. Mol Cell Neurosci 2003; 24: 818-30.
14. Cao QL, Zhanng YP, Howard RM, Walters WM. Pluripotent stem cells engrafted into the normal or lesioned adult rat spinal cord are restricted to a glial lineage. Exp Neurol 2001; 167: 48-58.
15. Viomen M, Aigner L, Winkler J, Weidner N. Adult Neural progenitor cell grafts survive after acute spinal cord injury and integrate along axonal pathways. Eur J Neurosci 2003; 18: 743-51.
16. Lu P. Jones LL, Snyder EY and Tuszynski M.H. Neural stem cells constitutively secrete neurotrophic factors and promote extensive host axonal growth after spinal cord injury. Exp Neurol 2003; 181: 115-29.
17. Hofstetter CP, Holmstrom NAV, Lilja JA, Schweinhardt P. Allodynia limits the usefulness of intraspinal neural stem cell grafts, directed differentiation improves outcome. Nature Neuroscim 2005; 8(3): 346-53.
18. Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats- similarities to astrocytes grafts. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 1998; 95: 3908-13.
19. Xiao Z, Gang LV. Schwann cells promote neuronal differentiation of bone marrow stromal cells. African J Biotechnol 2011;10(17):3498-503.
20. Pal R, Gopinath C, Rao NM, Banerjee P. Functional recovery after transplantation of bone marrow- derived human mesenchymal stromal cells in rat model of spinal cord injury. Cytotherapy 2010; 12(6): 792-806.
21. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor testing scale for open field testing in rats. J Neurotrauma 1995; 12:1-21.
22. Pitcher GM, Richie J, Henry JL. Paw withdrawal threshold in the von frey hair test is influenced by the surface on which the rat stands. J Neurosci Methods 1999; 87:185-93.
23. Li Y, Chen J, Choop M. Adult bone marrow transplantation after stroke in adult rats. Cell Transplant 2001; 10: 31-40.
24. Macias MY, Syring MB, Pizzi MA, Crowe MJ, Alexanian AR. Pain with no gain: Allodynia following neural stem cell transplantation in spinal cord injury. Exp Neurol 2006; 201:335-48.
25. Seung KB, Jaehee L, Seung KH, Heung SN. Loss of spinal μ-opioid receptor is associated with mechanical Allodynia in a rat model of peripheral neuropathy. Pain 2006; 123:117-26.
26. Mukhida K, Mendez I, Mcleod M, Kobayashi N, Haughn C. Spinal GABAergic transplants attenuate mechanical Allodynia in a rat model of neuropathic pain. Stem Cells 2007; 25: 2874-85.
27. Ledeboer A, Sloane E.M, Milligan ED, Frank MG, Mahony JH. Minocycline attenuates mechanical Allodynia and proinflammatory cytokine expression in rat models of pain facilitation. Pain 2005; 115: 71-83.
28. Macias M.Y, Syring M.B, Pizzi MA, Crowe MJ, Alexanian AR. Pain with no gain: Allodynia following neural stem cell transplantation in spinal cord injury. Exp Neurol 2006; 201:335-48.
29. Gwak YS, Tan HY, Nam TS. Activation of spinal GABA receptors attenuates chronic central neuropathic pain after spinal cord injury. J Neurotrauma 2006; 23: 1111-24.
30. Hains BC, Chastain KM, Everhart AW, McAdoo DJ, Hulsebosch CE. Transplantation of adrenal

patients with neuropathic pain. Pain 2003; 105: 65-70.

33. Tian J, Gu Y, Su D, Wu Y, Wang X. Effects of Intrathecal lidocaine on hyperalgesia and allodynia following chronic contusion injury in rats. Eur J Pain 2009; 13: 130-7.
34. Ledeboer A, Sloane EM, Milligan ED, Frank MG, Mahony JH, Maier SF et al. Minocycline attenuates mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in rat models of pain. Pain 2005; 115: 71-83.

medullary chromaffin cells reduces forelimb and hindlimb Allodynia in a rodent model of chronic central pain after spinal cord hemisection injury. Exp Neurol 2000; 164:426-37.

31. Takahashi M, Kawaguchi M, Shimada K, Nakashima T, Furuya H. Systemic Meloxicam reduces tactile allodynia development after L5 single spinal nerve injury in rats. Reg Anesth Pain Med 2005; 30(4): 351-5.
32. Eisenach JC, Rauck RL, Curry R. Intrathecal but no intravenous adenosine reduces allodynia in