

Central Neuropathic Pain after Graft of Bone Marrow Stromal Cells in the Spinal Cord Contusion of Rat

***Pirhajati Mahabadi V., M.Sc.*, Tiraih T., Ph.D., Khalatbary A.R., Ph.D.,
Aziz-zade Delshad A.R., Ph.D.***

** P.O.Box: 14115-111, Anatomy Department, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran*

Abstract

Purpose: The purpose of this study was the investigation of thermal and mechanical Allodynia after BMSCs grafting in the Spinal Cord Contusion of rat

Materials and Methods: In this study used 40 female Sprague- Dawley 6-8 week old that 33 rats received vertebral laminectomy to expose spinal cord (L1 vertebral level). The cord was then contused with the weight drop device. Experimental groups consist group 1(Intact) rats without intervention (n=7); group 2 and 3: 16 rats given PBS alone without cell administration respectively 10 rats intravenously (vehicle1) and 6 rats intraspinaly (vehicle2); group 4 and 5: 17 rats given BMSCs after 4 passages respectively 10 rats intravenously and 7 rats intraspinaly. Grafts were done 1 week after injury. Behavioral tests were done for 10 weeks (after injury). For thermal testing, rats were placed on a hotplate. Mechanical sensitivity was assessed with Von Frey Hairs. Tracing of the cells at the injured site was performed immunohistochemically and then astrocyte differentiation was detected with the double-Staining method.

Results: BMSCs-engrafted rats showed significant decrease in withdrawal threshold and time latency to licking of hindpaws in comparison with vehicle groups. Also there was astrocyte differentiation.

Conclusion: The results demonstrate that intraveous and intraspinal grafts of BMSCs in the cases of spinal cord contusion enhance thermal and mechanical Allodynia. Also Allodynia could be positively correlated with the number of astrocytes.

Key words: Bone Marrow Stromal Cells (BMSCs), Graft, Spinal Cord Contusion, Central neuropathic pain, Allodynia

درد نوروپاتیک مرکزی بعد از پیوند سلولهای استرومایی مغز استخوان در ضایعه Contusion نخاع موش صحرائی

وحید پیر حاجاتی M.Sc.*، تقی طریحی Ph.D.*، علیرضا خلعتبری Ph.D.**، علیرضا عزیز زاده دلشاد Ph.D.***

*گروه علوم تشریح دانشگاه تربیت مدرس

**گروه علوم تشریح دانشگاه لرستان

***گروه علوم تشریح دانشگاه شاهد

تاریخ وصول: اردیبهشت ماه ۸۶، تاریخ پذیرش: مرداد ماه ۸۶

چکیده

هدف: بررسی آلوداینای گرمایی و مکانیکی ناشی از ضایعه نخاعی، بعد از پیوند سلولهای (Bone Marrow Stromal Cell) BMSC
مواد و روشها: این مطالعه یک تحقیق تجربی است. در این مطالعه ۴۰ سر موش صحرائی ماده ۶ تا ۸ هفته ای، نژاد Sprague-Dawley استفاده شد که ۳۳ سر از آنها به منظور در معرض دید قرار گرفتن نخاع در سطح مهره L1، لامینکتومی شدند و سپس نخاع توسط ابزار weight drop ضایعه داده شد. گروههای آزمایش عبارت بودند از: گروه ۱ (سالم): شامل ۷ سر که هیچ مداخله ای در آنها صورت نگرفت، گروه ۲ و ۳: ۱۶ سر موش صحرائی که PBS (Phosphate Buffer Saline) را بدون سلول به ترتیب ۱۰ سر به صورت داخل وریدی (Vehicle1) و ۶ سر به صورت داخل نخاعی (Vehicle2) دریافت کردند، گروه ۴ و ۵: ۱۷ سر موش صحرائی که سلولهای BMSC را بعد از ۴ پاساژ به ترتیب ۱۰ سر به صورت داخل وریدی و ۷ سر به صورت داخل نخاعی دریافت کردند. تزریقها یک هفته بعد از ضایعه انجام شدند. آزمونهای رفتاری به مدت ۱۰ هفته بررسی شدند. برای آزمون گرمایی رتھا روی صفحه داغ گذاشته شدند و برای آزمون مکانیکی از Von Frey Hairs استفاده شد. ردیابی سلولها به روش ایمونوهیستوشیمیایی در بخش آسیب دیده نخاع صورت گرفت و همچنین به روش Double-Staining تمایز آستروسیتی بررسی شد.
یافته‌ها: یوند سلولهای BMSC، کاهش آستانه پس کشیدن اندام خلفی را نسبت به محرک مکانیکی و کاهش تاخیر لیسیدن اندام خلفی را نسبت به محرک گرمایی در مقایسه با گروهی که PBS دریافت کرده بودند نشان دادند. همچنین تمایز آستروسیتی مشاهده شد.
نتیجه گیری: نتایج نشان می‌دهد که تزریق درون وریدی و داخل نخاعی سلولهای BMSC در مدل ضایعه نخاعی کانتیوژن، آلوداینای گرمایی و مکانیکی را افزایش می‌دهد و نیز میزان آلوداینای ارتباط مستقیم با تعداد آستروسیتها دارد.

کلید واژه‌ها: سلولهای استرومایی مغز استخوان، پیوند، آسیب نخاعی Contusion، درد نوروپاتیک مرکزی، آلوداینای

آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، گروه علوم تشریح، صندوق پستی: ۱۱۱-۱۴۱۱۵

E-mail: vpirhajati.1@gmail.com

مقدمه

شایعترین دلیل ضایعه نخاعی، انواع تروما است که عبارتند از: تصادفات، صدمات ورزشی و آسیبهای شغلی [۱]. یکی از شایعترین ضایعات نخاعی، ضایعه از نوع Contusion است [۲]. به دنبال ضایعه نخاعی درد نوروپاتی مرکزی (Central Neuropathic Pain) از نوع آلوداینیا (Allodynia): درد ناشی از یک محرک غیر دردزا) ایجاد می شود [۳]. روشهای مختلفی برای درمان درد ناشی از ضایعه نخاعی وجود دارد که عبارتند از: دارو درمانی، جراحی، فیزیوتراپی [۴]. طی ۲۰ سال اخیر استفاده از استراتژیهای سلولی به جای درمان دارویی، برای درمان درد ناشی از ضایعه نخاعی پیشرفتهای زیادی کرده است. از جمله استفاده از سلولهای کرومافین غده آدرنال و سلولهای پیش ساز عصب که در روش اخیر با استفاده از مولکولهای ایجاد کننده فنوتیپ عصبی در این سلولها خصوصیات ضد درد القا می شود [۵]. اخیراً در درمان درد ناشی از ضایعات نخاعی از سلولهای بنیادین استفاده شده است. در تحقیقی هافستتر (Hofstetter) و همکارانش شرح دادند که بعد از ضایعه نخاعی، تزریق سلولهای بنیادین عصبی در نخاع حیوانات جونده آثار مهمی روی حس و حرکت در سطوح زیر ناحیه آسیب دارد [۶]، به طوری که پیوند سلولهای بنیادین عصبی باعث افزایش معنی داری در آلوداینیا و کاهش آستانه درد می شود [۷ و ۸]. دانشمندان بر این باورند که افزایش تمایز این سلولها به استروسیتها مسئول افزایش آلوداینیا هستند. استروسیتها در مدل‌های آسیب دیده، به عنوان رها کننده فاکتورهای تروفیک شناخته شده اند که آثار مستقیم روی جوانه زدن آکسونها و بقای نورونها دارند. همچنین مقدار و اندازه جوانه آکسونها با تعداد سلولهای پیوندی تمایز یافته به استروسیتها ارتباط مستقیم دارند. محققین به این نتیجه رسیده اند که پیوند سلولهای بنیادین عصبی و تمایز بعدی آنها به استروسیت آستانه درد را کاهش می دهد [۷]. می توان

چنین گفت که با افزایش تمایز استروسیتی سلولهای بنیادی تزریق شده، حیوان از نظر حرکتی بهبود می یابد ولی میزان آلوداینیا افزایش می یابد که این امر را می توان به تاثیر فاکتورهای تروفیک مترشحه از استروسیتها تمایز یافته بر شاخه شاخه شدن آکسونهای آسیب دیده دانست.

استفاده از سلولهای بنیادین مغز استخوان برای درمان ضایعات نخاعی نیز مؤثر بوده است. گزارشهایی مبنی بر تمایز سلولهای استرومایی مغز استخوان به سلولهای گلیال و نورون توسط محققین ارائه شده است [۹ و ۱۰]. با توجه به آثار درمانی ثابت شده تزریق سلولهای BMSC در ضایعات نخاعی (از نظر بهبودی حرکتی و نیز ترمیم بافت عصبی آسیب دیده) این پرسش مطرح می شود که تزریق درون وریدی و یا داخل نخاعی این سلولها در بخش آسیب دیده نخاع چه تاثیری بر روی درد ناشی از ضایعه نخاعی می گذارد. بر این اساس در تحقیق حاضر برای نخستین بار، اثرات تزریق سلولهای BMSC بر روی میزان آلوداینیای حرارتی و مکانیکی ناشی از ضایعه نخاعی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

این تحقیق بر روی ۴۰ سر موش صحرایی بالغ ماده نژاد Sprague-Dawley با وزن تقریبی ۲۵۰-۲۲۵ گرم انجام گرفت. این ۴۰ سر به طور تصادفی به ۵ گروه تقسیم گردیدند. این پنج گروه عبارتند از:

گروه سالم (Intact) شامل ۷ سر که در آنها هیچ گونه ضایعه و تزریقی صورت نگرفت. گروههای Vehicle 1 و Vehicle 2 به ترتیب شامل ۶ و ۱۰ سر بودند که در آنها ضایعه نخاعی صورت گرفت و یک هفته بعد از ضایعه به ترتیب فقط تزریق داخل نخاعی و درون وریدی PBS انجام گرفت. گروههای آزمون ۱ و ۲ به ترتیب شامل ۷ و ۱۰ سر بودند که در آنها ضایعه نخاعی صورت گرفت و یک هفته بعد از

پس از چهار تا پنج پاساژ، سلولهای استرومایی یکدست به دست می آید.

برای تزریق درون وریدی، تعداد ۲/۵ میلیون سلول BMSC در ۰/۵ سانتی متر مکعب PBS حل شد و از طریق ورید دمی توسط سرنگ انسولین تزریق گردید [۱۲].

برای تزریق داخل نخاعی، تعداد ۳۰۰,۰۰۰ سلول BMSC در ۱۰ μ L PBS حل شد و با استفاده از سرنگ همیلتون تزریق شد. در این روش تزریق در هر چهار طرف ناحیه آسیب دیده و هر طرف به مقدار ۲/۵ μ L صورت گرفت [۱۲].

آزمونهای رفتاری در تمام گروهها به صورت هفتگی به مدت ۱۰ هفته انجام شدند.

در بررسی آلوداینیای گرمایی از صفحه داغ (Hot Plate) (شرکت سازه کاران آسیا، ساخت ایران) استفاده شد. در این آزمون حیوانات روی Hot plate با درجه استاندارد ۵۰ درجه سانتی گراد قرار می گرفتند و تأخیر در لبسیدن اندام خلفی اندازه گیری شد. در صورتی که حیوان نسبت به صفحه داغ عکس العملی نشان نمی داد بعد از ۱۰۰ ثانیه حیوان از روی صفحه داغ برداشته می شد تا از آسیب بافتی ناشی از گرمای زیاد جلوگیری شود و در این حالت ماکزیمم زمان یعنی ۱۰۰ ثانیه برای حیوان در نظر گرفته شد [۱۳].

در بررسی آلوداینیای مکانیکی از Von Frey Hairs (شرکت داج، ساخت USA) استفاده شد که شامل ۲۰ فیلامنت ظریف از جنس پلی اتیلن با ضخامتهای متفاوت است که هر کدام نیروی مشخصی را از ۰/۰۰۸ gr تا ۳۰۰ gr با توجه به قطر فیلامنت اعمال می کنند. در این روش ناحیه ای که آزمون روی آن انجام شد، پنجه اندام خلفی حیوان بود که رفلکس پس کشیدن اندام خلفی حیوان، آستانه تحریک آن حیوان در نظر گرفته شد. نیروی وارد شده وقتی محاسبه شد که فیلامنت مورد نظر خم شده و خم ایجاد شده تا حدی باشد که فیلامنت از زیر پنجه کف پای حیوان جدا نشود [۸]. در

ضایعه به ترتیب تزریق داخل نخاعی و درون وریدی سلولهای BMSC انجام گرفت. لازم به ذکر است که گفته شود در این مطالعه گروهی نیز مورد بررسی قرار گرفت که در آن گروه فقط لامینکتومی انجام شد و هیچ گونه ضایعه و تزریقی صورت نگرفت. در بررسی آماری این گروه هیچ گونه تفاوت معنی داری با گروه Intact نشان نداد، لذا به دلیل اینکه لامینکتومی در کاهش یا افزایش Allodynia تاثیری نداشت در مطالعات آماری وارد نگردید.

برای ایجاد ضایعه نخاعی Contusion، بعد از انجام عمل لامینکتومی مهره L1، از یک میله فلزی به قطر ۲/۵ میلی متر و وزن ۱۰ گرم استفاده می شود که از ارتفاع ۲/۵ سانتی متری بالای نخاع روی نخاع رها می شود [۱۱].

در این تحقیق از رتهای Sprague Dawley برای تهیه سلولهای استرومایی مغز استخوان استفاده شد. در ابتدا رتها توسط محلول کلروفورم کشته شدند و استخوانهای درشت نی و ران با کنار زدن عضلات و جدا نمودن آنها از استخوانها به دست آمد، استخوانهای به دست آمده در داخل پتری دیش محتوی PBS به همراه پنی سیلین و آمفوتریپسین بتا قرار داده شد. سپس پتری دیش داخل ظرف محتوی یخ گذاشته شده و به زیر هود منتقل گردید. با استفاده از وسایل جراحی استریل دو انتهای استخوانها قطع و با سرنگ حاوی محیط کشت، مغز استخوان موجود در استخوانها در داخل فلاسک تخلیه شد. سپس فلاسکها به انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و فشار CO2 پنج درصد منتقل شد. محیط کشت داخل فلاسکها بعد از ۷۲ ساعت تعویض شد. با تعویض محیط کشت ذرات بافتی و سلولهای خونی جدا شده و اغلب سلولهای استرومایی مغز استخوان که به کف فلاسک چسبیده اند باقی ماندند. پس از آنکه این سلولها در اثر تکثیر، کف فلاسک را پر کردند، با استفاده از محلول تریپسین EDTA سلولها از کف فلاسک جدا کرده و داخل دو فلاسک تقسیم شدند. تقریباً

برای شمارش آستروسیتها از میکروسکوپ نوری استفاده شد، به این ترتیب که از هر یک از گروههای آزمون و Vehicle سه سر موش صحرایی انتخاب شد و بعد از تهیه برش بافتی پارافینی از سراسر مرکز ضایعه، در هر موش صحرایی ده برش بافتی راز مرکز ضایعه با فواصل یکسان در نظر گرفته شد. برای هر برش بافتی از آنتی بادی اولیه ضد GFAP^۴ و سپس آنتی بادی ثانویه کونژوگه به HRP استفاده و با DAB^۵ (3,3'- Diaminobenzidine tetrahydrochloride, Sigma) رنگ آمیزی شد [۱۵].

آنالیز آماری داده‌ها

اطلاعات جمع آوری شده به نرم افزار آماری SPSS وارد و آنالیز شد. برای این منظور در آنالیز توصیفی از شاخصهای میانگین و انحراف معیار استفاده شد و آزمون آماری One-Way ANOVA برای آنالیز آزمونهای رفتاری و از آزمون آماری Mann-Whitney برای آنالیز شمارش آستروسیتها استفاده شد و $p < 0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

بررسی میکروسکپ نوری

نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان می دهد که در حیوانات گروه سالم، در مقاطع پارافینی تهیه شده از نخاع که توسط کرسیل فست ویولت رنگ آمیزی شده بودند، سلولهای عصبی سالم با ظاهر چند وجهی و هسته مرکزی روشن و هستک مشخص دیده شدند و نیز اجسام نیسل به طور یکنواخت در سیتوپلاسم پراکنده شده بودند. در صورتی که در بررسی مقاطع پارافینی ناحیه آسیب دیده نخاع در گروههای Vehicle

این تحقیق از نیروهای ۶، ۸، ۱۰، ۱۵، ۲۶، ۶۰، ۱۰۰، ۱۸۰، ۳۰۰ گرم استفاده شد.

برای بررسی میکروسکوپ نوری در پایان هفته دهم از نخاع حیوانات گروههای مورد مطالعه مقاطع پارافینی تهیه شد و با کرسیل فست ویولت رنگ آمیزی صورت گرفت. تهیه مقاطع پارافینی به صورت زیر انجام گرفت:

بیهوش کردن حیوان با استفاده از کتامین و گزیزیلین که به صورت داخل صفاقی تزریق شد (۱۰ mg/kg گزیزیلین + ۸۰ mg/kg کتامین)؛ ۲- پرفیوژن در بطن چپ قلب؛ ۳- جدا کردن نخاع همسطح مهره‌های T13، L1، L2، ۴- فیکس کردن نهایی در همان محلول پارافمالدئید ۴ درصد.

بعد از انجام مراحل فوق پردازش بافتی در چهار مرحله: آب گیری (Dehydration)، شفاف کردن (Clearing)، آغشتگی (Impregnation) و قالب گیری (Embeding) انجام گرفت.

برای نشاندار کردن سلولها از Brdu^۱ استفاده شد. مقدار ۳ μg/ml از پودر Brdu در محیط کشت فاقد سرم حل شده و پس از فیلتر کردن، در فاز تکثیر به مدت ۷۲ ساعت به محیط کشت سلولها در فلاسک اضافه شد.

در بررسی تمایز سلولهای BMSC به آستروسیتها از روش ایمونوفلوروسنس به روش Double-Staining استفاده شد. در این روش در پایان هفته دهم برای هر برش بافتی پارافینی ابتدا آنتی بادی اولیه ضد Brdu و آنتی بادی ثانویه کونژوگه به Rhodamine^۲ (رقیق شده به نسبت ۱ به ۶۰ در PBS) استفاده شد و سپس آنتی بادی اولیه ضد GFAP و آنتی بادی ثانویه کونژوگه به FITC^۳ (رقیق شده به نسبت ۱ به ۱۰۰ در PBS) استفاده شد و توسط میکروسکوپ فلوروسنس بررسی شد [۱۴].

1- 5-Bromo-2'-deoxyuridine(Sigma)

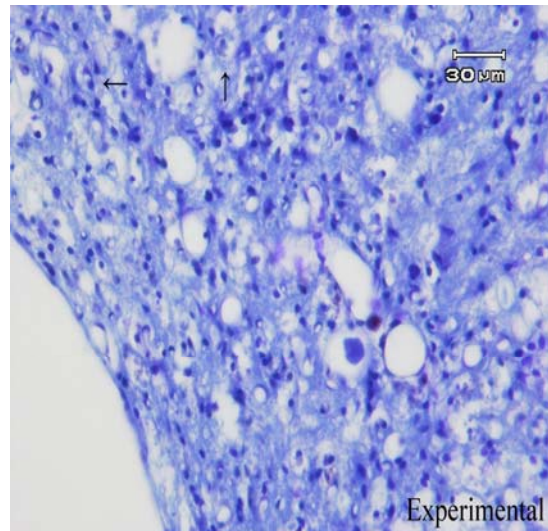
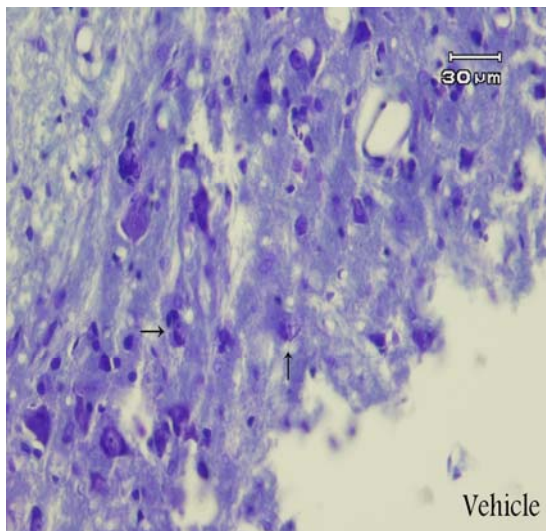
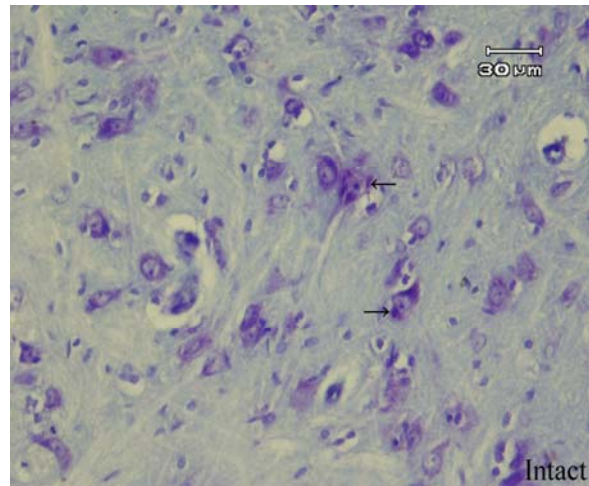
2- Rhodamine conjugated (Chemicon) Goat Anti-mouse IgG

3- Donkey Anti-sheep IgG FITC conjugated(Chemicon)

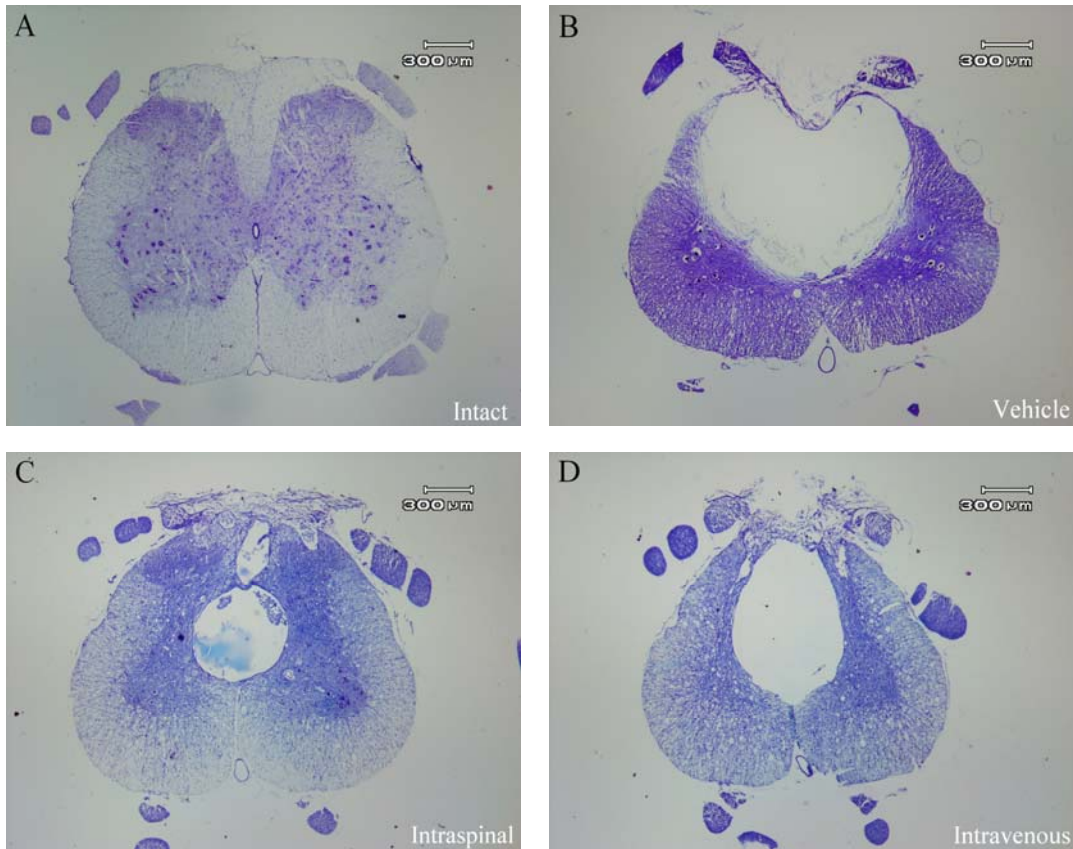
4- Rabbit Anti-Glial fibrillary acidic protein(Chemicon)

نخاع حفره ای مشاهده شد که تقریباً وسعت زیادی از ماده خاکستری نخاع را شامل می شد به طوری که وسعت این حفره در هر دو گروه آزمون نسبت به گروههای Vehicle کاهش یافته بود (شکل ۲).

و آزمون هسته سلول تغییر شکل یافته و در خارج مرکز قرار گرفته بود و اجسام نیسل حالت پراکنده و یکنواخت خود را از دست داده و در حاشیه سیتوپلاسم سلول متمرکز شده بودند (کروماتولیز) (شکل ۱). در ضمن در ناحیه آسیب دیده



شکل ۱. نمایش شکل سلولهای عصبی در گروههای سالم، آزمون و Vehicle. پیکانها نمایانگر نورونها هستند. رنگ آمیزی: کرسیل فست ویولت
 Intact: سالم Vehicle : تزریق PBS Experimental : تزریق BMSCs



شکل ۲. نمایش مقاطع بافتی ناحیه آسیب دیده نخاع در گروههای مورد مطالعه

وسعت حفره در هر دو گروه آزمون نسبت به گروه Vehicle کاهش یافته است. رنگ آمیزی: کریل فسف و یولت

A: سالم، B: تزریق PBS، C: تزریق داخل نخاعی BMSCs، D: تزریق درون وریدی BMSCs

صورت هفتگی به مدت ۱۰ هفته انجام شد که نتایج زیر به دست آمد (جدول ۱).

گروه اول (Intact): میانگین پاسخ درد حیوانات به صفحه داغ در این گروه ثابت و برابر $2/99 \pm 4/7$ ثانیه بود.

گروه دوم (Vehicle): میانگین پاسخ درد حیوانات به صفحه داغ در این گروه در هفته اول برابر 10 ± 0 ثانیه، در هفته دوم $2/50 \pm 98/7$ ، در هفته سوم $1/91 \pm 91/5$ ، در هفته چهارم $1/50 \pm 84/2$ ، در هفته پنجم $6/99 \pm 74/2$ ، در هفته ششم $4/74 \pm 61$ ، در هفته هفتم $6/29 \pm 48/7$ و در هفته هشتم تا دهم میزان ثابت $4/74 \pm 37/7$ بود.

آزمونهای رفتاری

در بررسی آلوداینای حرارتی و مکانیکی، به دنبال تزریق داخل نخاعی و درون وریدی سلولهای BMSC در هر دو گروه آزمون در مقایسه با گروههای Vehicle آلوداینای افزایش معنی داری نشان داد. مقایسه میزان افزایش آلوداینای در هر دو گروه آزمون نشان داد که بین این دو گروه تفاوت معنی داری وجود ندارد (جدول ۱ و ۲).

تغییرات رفتاری گرمایی

در تمام گروههای مورد مطالعه آزمون رفتاری گرمایی به

در پایان هفته دهم اختلاف این گروه با گروه اول، چهارم و پنجم معنی دار ($p < 0/001$) بود و با گروه سوم معنی دار نبود. گروه سوم (Vehicle2): میانگین پاسخ درد حیوانات به صفحه داغ در این گروه در هفته اول برابر 100 ± 10 ثانیه، در هفته دوم $98/6 \pm 3/26$ ، در هفته سوم $87/8 \pm 4/30$ ، در هفته چهارم $79/1 \pm 8/10$ ، در هفته پنجم $69/1 \pm 9/47$ ، در هفته ششم $59/85 \pm 9/68$ ، در هفته هفتم $45/5 \pm 6/37$ و در هفته هشتم تا دهم میزان ثابت $2/58 \pm 37/5$ بود.

در پایان هفته دهم اختلاف این گروه با گروه اول، چهارم و پنجم معنی دار ($p < 0/001$) بود و با گروه دوم معنی دار نبود. گروه چهارم (تزریق داخل نخاعی BMSCs): میانگین پاسخ درد حیوانات به صفحه داغ در این گروه در هفته اول برابر 100 ± 10 ثانیه، در هفته دوم $78/1 \pm 8/39$ ، در هفته سوم $38/8 \pm 10/26$ ، در هفته چهارم $29/7 \pm 4/43$ ، در هفته پنجم $26 \pm 3/36$ ، در هفته ششم $23 \pm 3/01$ و در هفته هفتم تا دهم میزان ثابت $21/8 \pm 2/93$ بود. در پایان هفته دهم اختلاف این گروه با گروه اول، دوم و سوم معنی دار ($p < 0/001$) و با گروه چهارم معنی دار نبود.

در پایان هفته دهم اختلاف این گروه با گروه اول، چهارم و پنجم معنی دار ($p < 0/001$) بود و با گروه دوم معنی دار نبود. گروه چهارم (تزریق داخل نخاعی BMSCs): میانگین پاسخ درد حیوانات به صفحه داغ در این گروه در هفته اول برابر 100 ± 10 ثانیه، در هفته دوم $79/1 \pm 8/91$ ، در هفته سوم $47/4 \pm 2/99$ ، در هفته چهارم $84/2 \pm 1/50$ ، در هفته پنجم $74/2 \pm 6/99$ ، در هفته ششم $61 \pm 4/74$ ، در هفته هفتم $48/7 \pm 6/29$ ، در هفته هشتم $37/7 \pm 4/78$ ، در هفته نهم $37/7 \pm 4/78$ و در هفته دهم $37/7 \pm 4/78$ بود.

جدول ۱. میانگین پاسخ درد حیوانات به صفحه داغ در پایان هفته های اول تا دهم پس از ضایعه (اعداد بر حسب ثانیه)

گروه	هفته	اول	دوم	سوم	چهارم	پنجم	ششم	هفتم	هشتم	نهم	دهم
سالم	۴۷/۴±۲/۹۹	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
Vehicle1	۱۰۰ b *	۹۸/۷±۲/۵۰	b	۹۱/۳±۱/۹۱	b	۸۴/۲±۱/۵۰	b	۷۴/۲±۶/۹۹	b	۷۴/۲±۶/۹۹	b
Vehicle2	۱۰۰ b *	۹۸/۶±۲/۲۶	b	۸۷/۸±۴/۳۰	b	۷۹/۱±۸/۱۰	b	۶۹/۱±۹/۴۷	b	۵۶/۸±۹/۶۸	b
آزمون ۱	۱۰۰ b *	۷۹/۱±۴/۹۱	c	۴۳/۲±۱۰/۴۰	a	۳۱/۲±۴/۱۹	c	۲۵/۴±۳/۳۰	c	۲۱/۲±۳/۶۸	c
آزمون ۲	۱۰۰ b *	۷۸/۱±۸/۳۹	c	۳۸/۸±۱۰/۲۶	a	۲۹/۷±۳/۴۳	c	۲۶±۳/۳۶	c	۲۳±۳/۰۱	c

تفاوت بین گروههای همنام (a-a, b-b, c-c) در پایان هر هفته غیر معنادار ($P > 0/05$)، و بین گروههای غیر همنام (a, b, c) معنادار ($P < 0/001$) است.

-: میانگین $47/4 \pm 2/99$ برای تمام هفته ها در نظر گرفته شده است * : تزریق یک هفته پس از ضایعه

تغییرات رفتاری مکانیکی

گروه اول (Intact): میانگین پاسخ درد حیوانات به تحریک پنجه اندام خلفی در این گروه در تمام طول مدت ۱۰ هفته ثابت و برابر 60 ± 0 گرم بود.

در تمام گروههای مورد مطالعه آزمون رفتاری مکانیکی به صورت هفتگی به مدت ۱۰ هفته انجام شد که نتایج زیر به دست آمد (جدول ۲).

جدول ۲. میانگین پاسخ درد حیوانات به تحریک مکانیکی پنجه اندام خلفی در پایان هفته های اول تا دهم پس از ضایعه (اعداد بر حسب گرم)

گروه	هفته									
	اول	دوم	سوم	چهارم	پنجم	ششم	هفتم	هشتم	نهم	دهم
سالم	۶۰±۰ a	۶۰±۰ a	۶۰±۰ a	۶۰±۰ a	۶۰±۰ a	۶۰±۰ a	۶۰±۰ a	۶۰±۰ a	۶۰±۰ a	۶۰±۰ a
Vehicle1	۳۰۰ b *	۱۸۰±۰ b	۱۰۰±۰ b	۶۰±۰ a	۵۱/۵±۱۷ a	۵۱/۵±۱۷ a	۵۱/۵±۱۷ a	۵۱/۵±۱۷ a	۵۱/۵±۱۷ a	۵۱/۵±۱۷ a
Vehicle2	۳۰۰ b *	۱۶۶±۳۲/۶۵ b	۱۲۰±۴۸/۹ b	۹۳/۳±۱۶/۳۲ b	۶۶/۶±۱۶/۳۲ a	۴۹/۸±۱۶/۴۲ a	۴۹/۸±۱۶/۴۲ a	۴۹/۸±۱۶/۴۲ a	۴۹/۸±۱۶/۴۲ a	۴۹/۸±۱۶/۴۲ a
آزمون ۱	۳۰۰ b *	۹۴/۲±۱۵/۱۱ c	۶۰±۰ a	۴۰/۵±۱۸/۱۷ c	۳۱±۲۰/۴۱ c	۲۱/۲±۵/۸۷ c	۲۱/۲±۵/۸۷ c	۲۱/۲±۵/۸۷ c	۲۱/۲±۵/۸۷ c	۲۱/۲±۵/۸۷ c
آزمون ۲	۳۰۰ b *	۸۴±۲۰/۶۵ c	۶۰±۰ a	۳۹/۶±۱۷/۵۵ c	۳۰/۶±۱۶/۳۳ c	۲۵±۱۳/۴۵ c	۲۱/۶±۵/۶۸ c	۲۱/۶±۵/۶۸ c	۲۱/۶±۵/۶۸ c	۲۱/۶±۵/۶۸ c

تفاوت بین گروههای همنام (a-a, b-b, c-c) در پایان هر هفته غیر معنادار ($P > 0/05$)، و بین گروههای غیر همنام (a, b, c) معنادار ($P < 0/001$) است.

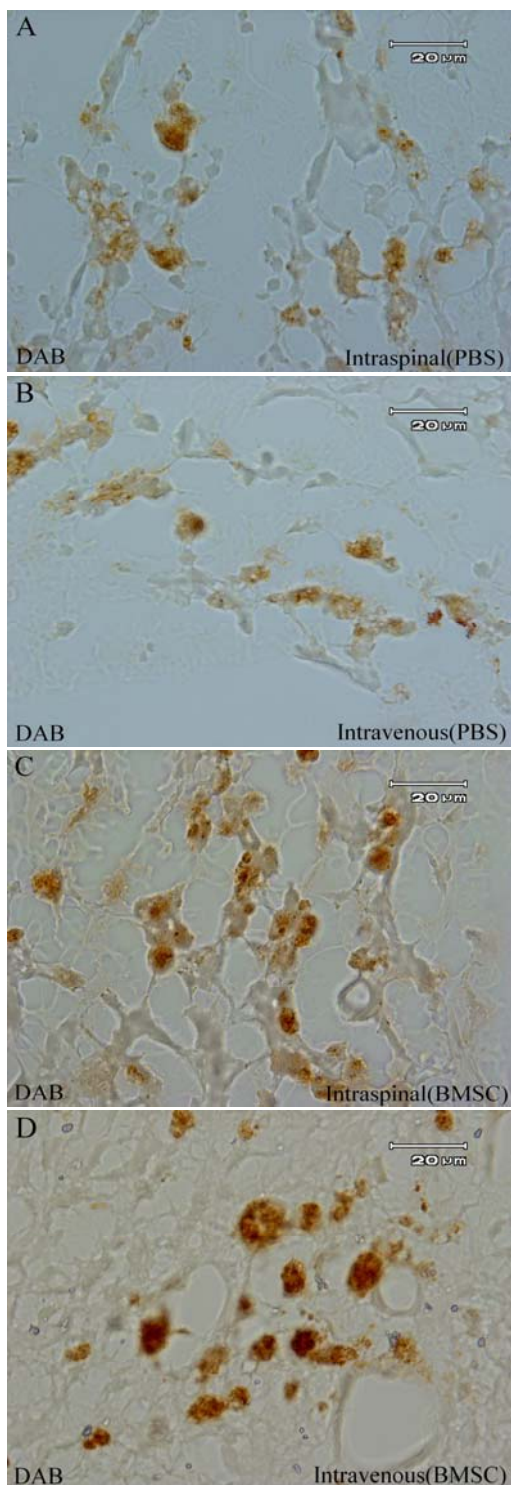
*: تزریق یک هفته پس از ضایعه

بود. در پایان هفته دهم اختلاف این گروه با گروه اول، دوم و سوم معنی دار ($p < 0/001$) و با گروه پنجم معنی دار نبود. گروه پنجم (تزریق درون وریدی (BMSCs): میانگین پاسخ درد حیوانات به تحریک پنجه اندام خلفی در این گروه در هفته اول برابر ۳۰۰ ± ۰ گرم، در هفته دوم $۸۴ \pm ۲۰/۶۵$ ، در هفته سوم ۶۰ ± ۰ ، در هفته چهارم $۳۹/۶ \pm ۱۷/۵۵$ ، در هفته پنجم $۳۰/۶ \pm ۱۶/۳۳$ ، در هفته ششم $۲۵ \pm ۱۳/۴۵$ و در هفته هفتم تا دهم میزان ثابت $۲۱/۶ \pm ۵/۶۸$ بود. در پایان هفته دهم اختلاف این گروه با گروه اول، دوم و سوم معنی دار ($p < 0/001$) و با گروه چهارم معنی دار نبود.

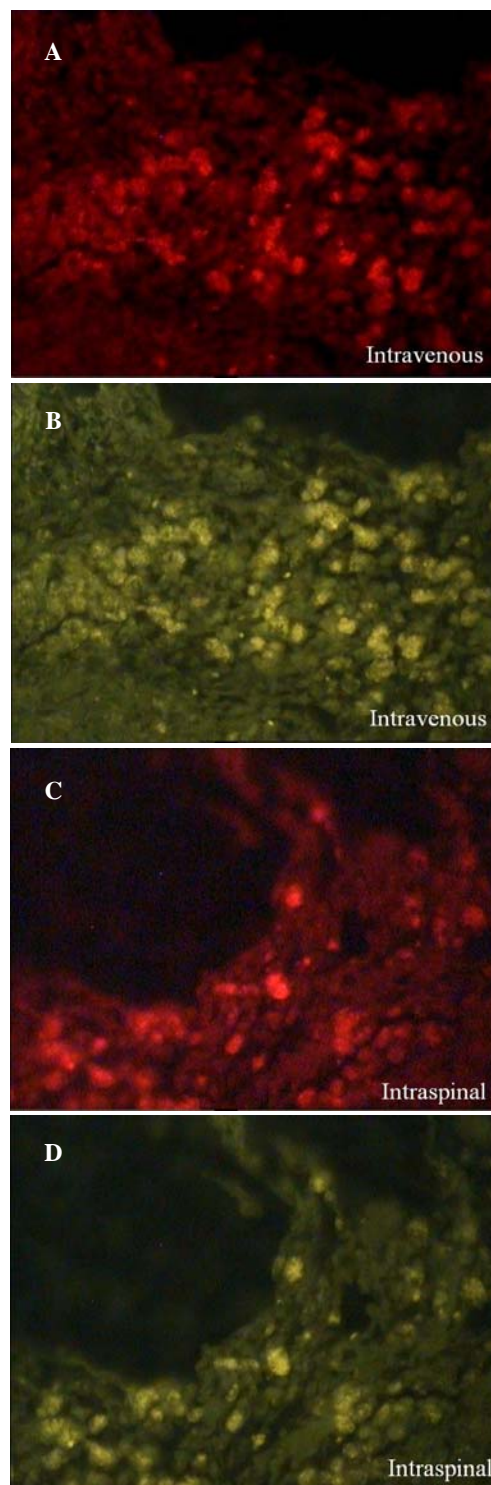
تمایز سلولهای استرومایی به آستروسیتها

در بررسی تمایز سلولهای BMSC به آستروسیتها از تکنیک ایمونوفلوروسنس استفاده شد. نتایج نشان داد که تعدادی از سلولهای BMSC نشاندار شده با Brdu که به منطقه ضایعه مهاجرت کرده بودند به آستروسیت تمایز یافته اند، در این بررسی تمایز آستروسیتی در هر دو گروه آزمون ۱ و ۲ مشاهده شد (شکل ۳).

گروه دوم (Vehicle1): میانگین پاسخ درد حیوانات به تحریک پنجه اندام خلفی در این گروه در هفته اول برابر ۳۰۰ ± ۰ گرم، در هفته دوم ۱۸۰ ± ۰ ، در هفته سوم ۱۰۰ ± ۰ ، در هفته چهارم ۶۰ ± ۰ ، و در هفته پنجم تا دهم میزان ثابت $۵۱/۵ \pm ۱۷$ بود. در پایان هفته دهم اختلاف این گروه با گروه چهارم و پنجم معنی دار ($p < 0/001$) و با گروه اول و سوم معنی دار نبود. گروه سوم (Vehicle2): میانگین پاسخ درد حیوانات به تحریک پنجه اندام خلفی در این گروه در هفته اول برابر ۳۰۰ ± ۰ گرم، در هفته دوم $۱۶۶ \pm ۳۲/۶۵$ ، در هفته سوم $۱۲۰ \pm ۴۸/۹$ ، در هفته چهارم $۹۳/۳ \pm ۱۶/۳۲$ ، در هفته پنجم $۶۶/۶ \pm ۱۶/۳۲$ ، و در هفته ششم تا دهم میزان ثابت $۴۹/۸ \pm ۱۶/۴۲$ بود. در پایان هفته دهم اختلاف این گروه با گروه چهارم و پنجم معنی دار ($p < 0/001$) و با گروه اول و دوم معنی دار نبود. گروه چهارم (تزریق داخل نخاعی (BMSCs): میانگین پاسخ درد حیوانات به تحریک پنجه اندام خلفی در این گروه در هفته اول برابر ۳۰۰ ± ۰ گرم، در هفته دوم $۹۴/۲ \pm ۱۵/۱۱$ ، در هفته سوم ۶۰ ± ۰ ، در هفته چهارم $۴۰/۵ \pm ۱۸/۱۷$ ، در هفته پنجم $۳۱ \pm ۲۰/۴۱$ و در هفته ششم تا دهم میزان ثابت $۲۱/۲ \pm ۵/۸۷$



شکل ۴. نمایش آستروسیتها در گروههای مورد مطالعه با استفاده از رنگ آمیزی DAB. مقطع پارافینی از مرکز ضایعه
 A: تزریق داخل نخاعی PBS. B: تزریق درون وریدی PBS. C: تزریق داخل نخاعی BMSCs. D: تزریق درون وریدی BMSCs



شکل ۳. نمایش تمایز آستروسیتی سلولهای استرومایی در گروههای آزمون ۱ و ۲. مقطع پارافینی از مرکز ضایعه
 A و C: سلولهای نشاندار شده با Brdu.
 B و D: سلولهای نشاندار شده با آنتی بادی ضد GFAP

شمارش آستروسیتها

برای شمارش آستروسیتها از رنگ آمیزی DAB استفاده شد (شکل ۴). نتایج حاصل از شمارش آستروسیتها نشان داد که میانگین تعداد آستروسیتها در گروههای آزمون در مقایسه با گروههای Vehicle بیشتر بوده و اختلاف معنی داری دارد ($P < 0.05$) و نیز میانگین تعداد آستروسیتها در گروه تزریق داخل نخاعی سلولهای BMSC در مقایسه با گروه تزریق درون وریدی این سلولها بیشتر بوده ولی از نظر آماری این اختلاف معنی دار نبود.

بمٹ

از سالهای خیلی دور برای درمان درد ناشی از ضایعه نخاعی درمانهای مختلفی صورت گرفته است. استفاده از داروهایی نظیر Amitriptyline, Clonidine، تزریق Intrathecal مواد مخدر (مورفین) [۱۶]، و روشهایی چون بلوک کردن عصب، بی حسی موضعی، قطع عصب و Sympathectomy در کاهش درد موثر بوده است [۱۱].

در تحقیقی پس از پیوند سلولهای کرومافین غده آدرنال در بخش آسیب دیده نخاع کاهش معنی داری در میزان آلدواینیا در هر دو اندام جلویی و خلفی مشاهده شد [۱۷].

همچنین در تحقیقی هافستتر (Hofstetter) و همکارانش چگونگی آثار سلولهای بنیادین عصبی تزریق شده در بخش آسیب دیده نخاع را روی حس و حرکت زیر ناحیه آسیب شرح دادند [۱۶]، به طوری که در پی تزریق این سلولها افزایش معنی داری در آلدواینیا مشاهده شد. تحقیقات نشان داده است که پیوند سلولهای بنیادی عصبی، موجب کاهش آستانه درد و به عبارتی دیگر موجب افزایش آلدواینیا می شود [۷ و ۸].

در تحقیقی دیگر از سلولهای کرومافین غده آدرنال موش یا گاوی برای تسکین درد استفاده شده، به طوری که عمل پیوند در فضای ساب آرکونوئید [مجاور راههای درد (Lat)]

(Spinothalamic) صورت گرفته است. این نوع پیوند نظیر مینی پمپهای سلولی عمل کرده و موجب ترشح عوامل آنتی نوسیسپتو در اطراف نخاع برای اعصاب محیطی آسیب دیده می شود. مطالعات نشان می دهد که فضای اینتراتکال نخاعی یک مکان قابل دسترس و ایمن برای جایگزینی سلولهای پیوندی خواهد بود. در تحقیقی دیگر به دنبال پیوند سلولهای کرومافین Thermal hyperalgesia و Cold Allodynia به طور قابل ملاحظه ای کاهش یافت [۱۸].

مطالعات نشان داده است که به دنبال تزریق درون وریدی و داخل نخاعی سلولهای BMSC تعدادی از آنها به سلولهای گلیال (آستروسیتها و الیگودندروسیتها) و نورون تمایز می یابند. آستروسیتهای تمایز یافته در مدلهای آسیب دیده نخاعی به دلیل تشدید جوانه زدن آکسونها و فیبرهای نوسیسپتو موجب افزایش آلدواینیا می شوند [۷ و ۸].

در بررسی آلدواینیای گرمایی، در گروه Intact هیچ نشانه ای از آلدواینیا مشاهده نشد و در گروههای Vehicle که فقط PBS دریافت کرده بودند افزایش معنی داری در آلدواینیا در مقایسه با گروه Intact مشاهده شد که این اختلاف به دلیل ضایعه ایجاد شده است؛ زیرا که به دنبال ایجاد ضایعه نخاعی درد نوروپاتییک مرکزی از نوع آلدواینیا ایجاد می شود. در بررسی آلدواینیای مکانیکی نیز در گروه Intact هیچ نشانه ای از آلدواینیا مشاهده نشد اما در گروههای Vehicle که فقط PBS دریافت کرده بودند افزایش آلدواینیا در مقایسه با گروه Intact معنی دار نبود. همچنین در هر دو گروه آزمون ۲ و ۱ (تزریق درون وریدی و داخل نخاعی) افزایش معنی داری در هر دو گروه آلدواینیای گرمایی و مکانیکی در مقایسه با گروههای Vehicle مشاهده شد. در بررسی آلدواینیای گرمایی و مکانیکی بین دو گروه آزمون ۲ و ۱ تفاوت معنی داری در میزان افزایش آلدواینیا مشاهده نشد. این تحقیق در مقایسه با تحقیقی که روی سلولهای بنیادین عصبی صورت گرفته است

آستروسیتها دارد، یعنی هر چه تعداد آستروسیتها افزایش یابد میزان آلوداینیا نیز افزایش خواهد یافت.

در نهایت با توجه به تاثیر مثبت سلولهای BMSC بر ترمیم ضایعه نخاعی و بهبود حرکتی و با توجه به افزایش آلوداینیا پس از تزریق این سلولها، می توان این گونه گفت که به دنبال تزریق این سلولها در محل ضایعه نخاعی، آلوداینیا که می تواند نشانه ای برای بهبود ضایعه نخاعی باشد افزایش می یابد. این موضوع می تواند نشان دهنده تاثیر مثبت این سلولها در بهبود ضایعه نخاعی باشد.

[۶ و ۷]، نتایج مشابهی را نشان می دهد، اما در مقایسه با تحقیقی که روی سلولهای کرومافین غده آدرنال انجام گرفته است نتایج معکوسی را نشان می دهد [۵].

با توجه به نتایج به دست آمده مبنی بر تمایز آستروسیتها و اینکه میانگین تعداد آستروسیتها در گروههای آزمون ۱ و ۲ به طور معنی داری بیشتر از میانگین آنها در گروههای Vehicle است و نیز با توجه به بیشتر بودن معنی دار میزان آلوداینیا در گروههای آزمون نسبت به گروههای Vehicle می توان نتیجه گرفت که افزایش آلوداینیا نسبت مستقیم با افزایش تعداد

References

1. **Ditunno JF, Formal JCS.** Chronic spinal cord injury. *New Engl J Med* 1994; 330: 550-6.
2. **Norenberg MD, Smith J, Marchilo A.** The pathology of human spinal cord injury: defining the problems. *J Neurotraum* 2004; 21: 429-40.
3. **Mills CD, Hains BC, Johnson KM, Hulsebosch CE.** Strain and model differences in behavioral outcome after spinal cord injury in rat. *J Neurotraum* 2001; 18: 743-56.
4. **Bengt H, Sjolund D.** Pain and rehabilitation after spinal cord injury. *Brain Res Rev* 2002; 40: 250-6.
5. **Eaton M.** Cell therapy for neuropathic pain in spinal cord injuries. *Epert Opin Biol TH.* 2004; 4: 1861-9.
6. **Hofstetter CP, Holmstrom NA, Lilja JA.** Allodynia limits the usefulness of intraspinal neural stem cell grafts; directed differentiation improves outcome. *Nat Neurosci* 2005; 8: 346-53.
7. **Sandra K, Clive N.** Stem cells in the injured spinal cord: reducing the pain and increasing the gain. *Nat Neurosci* 2005; 8: 259-60.
8. **Brown A, Ricci MJ, Weaver LC.** NGF message and protein distribution in the injured rat spinal cord. *Exp Neurol* 2004; 188: 115-27.
9. **Woodbury D, Schwarz E, Prochop D, Black I.** Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 2002; 61: 364-70.
10. **Brazelton T, Rossi F, Glimor I.** From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 2000; 290: 1775-6.
11. **Sam Chong M, Zahid H.** Diagnosis and treatment of neuropathic pain. *J Pain Symptom Manag* 2003; 25: S4-S11.
12. **Chopp M, Zhang XH, Li Y, Li W.** spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation. *Neuroreport* 2000; 11: 3001-5.
13. **Karen G, Harry K, Jean RW.** Spinal cord contusion in the rat: Analysis of Functional Neurologic Impairment. *Exp Neurol* 1985; 88: 123-34.
14. **Hume WJ, Keat S.** Immunohistological optimization of detection of bromodeoxyuridine-labeled cells in decalcified tissue. *J Histochem Cytochem* 1990; 38: 509-13.
15. **Gray WP, May K, Sundstron LE.** Seizure induced dentate neurogenesis does not diminish with age in rats. *Neurosci Lett* 2002; 330: 235-8.
16. **Siddall PJ, Molloy AR, Walker S, Mather LE, Rutkowski SB, Cousins MJ.** The efficacy of intrathecal morphine and clonidine in the treatment of pain after spinal cord injury. *Anesth Analg*

- 2000; 91: 1493-8.
17. **Hains BC, Chastain KM, Everhart AW, McAdoo DJ, Chair EH.** Transplants of adrenal medullary chromaffin cells reduce forelimb and hindlimb allodynia in a rodent model of chronic central pain after spinal cord hemisection injury. *Exp Neurol* 2000; 164: 726-37.
18. **Hama AT, Sagen J.** Alleviation of neurophatic pain symptoms by xenogeneic chromaffin cell grafts in the spinal subarachnoid space. *Brain Res* 1994; 651: 183-93.