Journal of Birjand University of Medical Sciences

Birjand University of Medical Sciences

Original Article

Treatment with conditioned culture media with human mesenchymal stem cells on reserpine-induced thermal fibromyalgia model in rats

Farzaneh Jasbinia[1], Majid Hassanpourezatti[2]*

ABSTRACT

Background and Aims: Fibromyalgia (FM) is a chronic pain syndrome affected by the hippocampal function. Mesenchymal stem cells-conditioned medium (MSC-CMs) has shown antioxidant and neuroprotective potentials in treating various diseases. The present study aimed to investigate the efficacy of MSC-CMs on the thermal treatment of reserpine-induced FM and evaluate the concentration changes of tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) in the hippocampus of rats under these conditions.

Materials and Methods: 220 g. Animals received reserpine (1 mg/kg) in the FM groups, and subcutaneous injection of normal saline in other groups, once a day for 3 consecutive days. Then, the rats received MSC-CM (0.3 and 0.5 mg/ml protein content, intraperitoneally) once a week for three weeks. The thermal pain threshold of mice was evaluated using tail flick and hot plate tests at the beginning and end of the experiments. TNF-α concentration in the hippocampus was determined by an ELISA kit at the end of the experimental period.

Results: The thermal pain threshold of rats in the FM group decreased significantly ($P<0.01$) in both pain tests compared to that of the control group. A significant increase ($P<0.01$) was observed in the level of TNF-α in the hippocampus of rats in the FM group compared to that of the control group. Treatment with MSC-CMs significantly reduced reserpine-induced pain and hippocampal TNF-a concentration despite the effect of fresh and conditioned medium on control rats.

Conclusion: Treatment with MSC-CMs could control thermal pain in the rat model of reserpine-induced fibromyalgia by controlling the TNF-a level in the hippocampus.

Keywords: Culture Medium, Hippocampus, Inflammation, Mesenchymal Stem Cells, Pain, Reserpine

Citation: Jasbinia F, Hassanpourezatti M. [Treatment with Conditioned Culture Media with Human Mesenchymal Stem Cells on Reserpine-Induced Thermal Fibromyalgia Model in Rats]. J Birjand Univ Med Sci. 2022; 29(3): 218-228. [Persian]

DOI https://www.doi.org/10.34785/bums024.2023.004

Received: July 14, 2022 **Accepted:** December 5, 2022

[1] Master of Science, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahed University, Tehran, Iran
[2] Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahed University, Tehran, Iran

***Corresponding Author:** Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahed University, Tehran, Iran
Tel: +989125464439 Fax: +9821512201 E-mail: hassanpourezatti@gmail.com

[DOI: 10.34785/bums024.2023.004]

مقاله اصیل پژوهشی

اثر درمان با محیط‌های کشت شرطی شده با سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسان بر مدل فیبرومیالژیا گرمایی القا شده توسط رزرپین در موش صحرایی

فرزانه جاسبی نیا[1]، مجید حسن پور عزتی[2]*

چکیده

زمینه و هدف: فیبرومیالژیا (FM) یک سندرم درد مزمن متأثر از عملکرد هیپوکامپ است. محیط شرطی شده با سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSC-CMs) پتانسیل‌های آنتی‌اکسیدانی و محافظت‌کننده عصبی در درمان بیماری‌ها مختلف از خود نشان داده است. هدف ما بررسی اثربخشی MSC-CMs بر درمان FM حرارتی ناشی از رزرپین و ارزیابی تغییرات غلظت فاکتور نکروز تومور آلفا (TNF-α)در هیپوکامپ موش‌های صحرایی در این شرایط بود.

روش تحقیق: این یک مطالعه تجربی است که بر روی ۴۲ موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن ۱۸۰ تا ۲۲۰ گرم انجام شد. حیوانات در گروه های FM رزرپین (۱ میلی‌گرم/کیلوگرم) و در دیگر گروه‌ها نرمال سالین، را بصورت زیر جلدی یک بار در روز به مدت ۳ روز متوالی دریافت کردند. سپس، موش‌ها MSC-CM (۰/۳ و ۰/۵ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر محتوای پروتئین، داخل صفاقی) را هفته‌ای یک‌بار به مدت سه هفته دریافت کردند. آستانه درد حرارتی موش‌ها توسط آزمون‌های پس کشیدن دم و صفحه داغ در ابتدا و انتهای آزمایشات ارزیابی شد. غلظت TNF-α در هیپوکامپ توسط کیت الایزا در پایان دوره آزمایشی تعیین شد.

یافته‌ها: آستانه درد حرارتی موش‌های صحرایی در گروه FM نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌دار ($P<0/01$) در هر دو آزمون کاهش یافت. یک افزایش معنی‌دار ($P<0/01$) در سطح TNF-α هیپوکامپ موش‌ها در گروه FM در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد. علیرغم تأثیر محیط کشت تازه و شرطی بر موش‌ها کنترل، درمان با MSC-CMs سبب کاهش معنی‌دار درد القا شده توسط رزرپین و غلظت TNF-α هیپوکامپی شد.

نتیجه‌گیری: درمان با MSC-CMs توانست درد حرارتی در مدل فیبرومیالژیا موش‌های صحرایی القا شده توسط رزرپین را از طریق کاهش غلظت TNF-α در هیپوکامپ کنترل کند.

واژه‌های کلیدی: محیط کشت، هیپوکمپ، التهاب، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، درد، رزرپین

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. ۱۴۰۱؛ ۲۹ (۳): ۲۱۸-۲۲۸.

دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۲۳ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۱۴

[1] دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

[2] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

***نویسنده مسئول:** گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

آدرس: تهران- دانشگاه شاهد- دانشکده علوم پایه

تلفن: ۰۲۱۵۱۲۱۲۲۵۲ نمابر: ۰۲۱۵۱۲۲۰۱ پست الکترونیکی: hassanpourezatti@gmail.com

[DOI: 10.34785/bums024.2023.004]

مقدمه

فیبرومیالژیا [1](FM) بیماری است با علایمی چون درد گسترده اسکلتی-عضلانی، خستگی، خواب‌آلودگی، اختلالات حافظه و مشکلات خلقی که به دلیل اختلال در مسیر انتقال پیام و یا مکانیسم‌های کنترل‌کننده مرکزی درد ایجاد می‌شود. گرچه علل اصلی این بیماری ناشناخته باقی مانده‌اند، ولی از مکانیسم‌های پاتوفیزیولوژیکی که در ارتباط با علت این بیماری مشخص شده‌اند، می‌توان به تغییر در آستانه ادراک حسی درد، استرس اکسیداتیو و التهاب، آسیب به رشته‌های عصبی میلین‌دار و غیرمیلین‌دار اشاره کرد (۱). در حقیقت، این نوع درد به‌عنوان یک چالش واقعی برای بیماران و ارائه‌دهندگان مراقبت‌های بهداشتی شناخته شده است (۲). جالب است که به تازگی همبستگی بین آستانه‌های درد حرارتی و سطح پلاسمائی برخی پروتئین‌های متعلّق به سیستم ایمنی در شرایط FM گزارش شده است (۳). یک مطالعه منتشر شده در سال ۱۳۹۷، شیوع این بیماری در مردان ایرانی را حدود ۷۸ درصد گزارش کرده است (۴). سنجش درد حرارتی حاد یکی از آزمون‌های مورد استفاده برای ارزیابی تشخیصی در شرایط بالینی و اثربخشی درمانی در شرایط پیش‌بالینی مطالعه این سندرم است (۵).

مدل‌های مختلفی برای سنجش درد حاد در مطالعات تجربی استفاده می شوند که دو آزمون پس‌کشیدن دم (Tail-flick test) و صفحه داغ (Hot plate test) از پرکاربردترین این آزمون‌ها هستند. در این راستا، مشخص شده است که درد القا شده توسط آزمون پس‌کشیدن دم، عمدتاً تحت کنترل مکانیسم‌های نخاعی و درد القا شده در آزمون صفحه داغ، عمدتاً تحت کنترل مراکز فوق نخاعی قرار دارند (۶).

جالب است که کاهش وزن باعث بهبودی FM می‌شود. برای مثال گزارش شده است که بیماران چاقی که مبتلا به FM بودند به‌دنبال اعمال رژیم غذایی بسیار کم انرژی (۸۰۰ کیلوکالری در روز) و با کاهش وزن، بهبود نسبی نشان دادند (۷). بر این اساس، سنجش تغییرات وزن به‌عنوان یک فاکتور مداخله‌کننده بر درد در این مطالعات حائز اهمیت محسوب شده و لذا در مطالعات تجربی، تغییرات وزن بدن همراه با آستانه درد مورد سنجش واقع می‌شوند.

رابطه‌ای بین التهاب عصبی با میانجی‌گری آستروسیت‌ها در هیپوکامپ در علت‌شناسی این نوع درد مشخص شده است (۸). در این ارتباط، افزایش تولید فاکتور تومور نکروزی آلفا (TNF-α) از بین فاکتورهای التهابی در هیپوکامپ، به‌عنوان یک واسطه کلیدی در القا این نوع درد مطرح شده است (۹). تولید این فاکتور از طریق مکانیسم‌های وابسته به میکروگلیا، در مغز بیماران مبتلا به FM تأیید شده است و نشان داده شده است که TNF-α در این شرایط بر شکل‌پذیری سیناپسی در این منطقه اثر تنظیمی دارد (۱۰).

تزریق رزرپین به موش صحرایی (rat) به‌عنوان یک مدل پیش‌بالینی القا نشانگان FM در مدل‌های حیوانی معرفی شده است. مزیت این مدل این است که همزمان با القا درد عضلانی، یک مدل جامع برای FM فراهم آورده و سبب القا علایم شناختی چون افسردگی، مشابه با شرایط بالینی، در حیوانات مورد مطالعه می‌شود (۱۱). همچنین، رزرپین سبب افزایش بیان ژن TNF-α در هیپوکامپ می‌شود (۱۲). به این ترتیب، تجویز رزرپین، که به‌عنوان یک داروی مهارکننده انتقال ویزیکول‌های مونوآمینی و آزاد کننده مونوآمین‌ها شناخته می‌شود، یک روش کارآمد پیش‌بالینی برای القا درد عضلانی، همراه با افسردگی و مرتبط با التهاب عصبی را برای مطالعه پیش بالینی FM شبیه سازی می‌کند.

از سوی دیگر، مقالات متعددی پتانسیل القا بی‌دردی توسط درمان با سلول‌های بنیادی مزانشیمی [2](MSC) را مطرح کرده‌اند (۱۳). اما استفاده مستقیم از سلول‌های بنیادی به‌دلیل احتمال تحریک و فعال‌سازی سیستم ایمنی در بیمار عملاً با محدودیت‌هایی مواجه شده است، لذا دانشمندان، استفاده از محیط کشت شرطی شده توسط MSC را به‌عنوان یک راه حل جایگزین درمانی به جای استفاده از سلول‌های بنیادی، با هدف کاهش درد پیشنهاد کرده‌اند (۱۴). در این ارتباط نشان داده شده است که تجویز محیط کشت شرطی‌شده با MSC مشتق از سلول‌های چربی انسان حاوی ترشحات این سلول‌ها بوده و باعث تسکین درد و التهاب عصبی مستقل از روش تجویز آن در بیماران شده است (۱۵). به‌عنوان مثالی

[1] Fibromyalgia

[2] Mesenchymal stem cells

[DOI: 10.34785/bums024.2023.004]

دیگر، گزارش شده است که تجویز این محیط کشت به تنهایی و بدون استفاده از یک داروی ضد درد نیز توانسته سبب کنترل درد در مدل حیوانی درد مفصلی شود (۱۶). اما، علیرغم مطالعات پیش‌بالینی امیدوارکننده، درمان‌های مبتنی بر استفاده از محیط کشت حاوی ترشحات MSC در پزشکی بر روی بیماران اجرا نشده‌اند. محققین دلیل این امر را پیچیدگی عوامل فعال زیستی ترشح شده توسط MSC عنوان داشته‌اند. بعلاوه، مواد موجود در ترشحات MSC که وارد محیط کشت شرطی شده می‌شوند با تغییر اهداکننده، منبع بافتی، شرایط کشت و مراحل رشد سلول‌ها تفاوت‌های فاحشی را از یک محیط کشت به محیط کشت دیگر نشان داده‌اند. ضمن اینکه شناسائی عوامل فعال موجود در ترشحات سلول‌های بنیادی به درون محیط کشت حائز اهمیت بیولوژیکی برای درمان بیماری خاص بوده و خود کاری بس پیچیده است. لذا با هدف رسیدن به استفاده از محیط کشت شرطی شده با MSC انسانی برای درمان بیماری‌های انسانی، به اطلاعات زیادی نیاز است که فقط بخشی از این اطلاعات در دسترس می‌باشند. در این راستا، می‌توان ادعا کرد که استفاده از مدل‌های حیوانی برای ارزیابی محیط کشت شرطی شده با سلول‌های بنیادی انسانی به دلیل قابلیت انتقال اطلاعات از نیمکت به بالین، سریع‌تر منجر به یافته‌های کاربردی می‌شوند.

هدف از این مطالعه، ارزیابی درمان با محیط کشت شرطی شده با MSC انسانی بر مدل درد FM القا شده توسط رزرپین و تعیین تغییرات سطح فاکتور التهابی TNF-α در هیپوکامپ موش‌های صحرایی به‌عنوان میانجی التهاب عصبی در این شرایط است.

روش تحقیق

حیوانات

در این تحقیق از موش‌های صحرایی نر و بالغ از نژاد ویستار با محدوده وزنی ۱۸۰ تا ۲۲۰ گرم استفاده شد. این حیوانات در مرکز نگه‌داری و پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه شاهد در قفس‌های استاندارد به صورت ۴ سر موش در هر قفس با امکان دسترسی آزاد به آب و غذای کافی و تحت دمای استاندارد نگه‌داری شدند. این حیوانات حداقل یک هفته قبل از انجام هر آزمایش به‌منظور سازش با محیط آزمایشگاه دوره سازگاری با محیط را پشت سر گذاشتند.

القای مدل FM توسط تزریق رزرپین

در این پژوهش، القا FM در موش‌های صحرایی با استفاده از روش پیشنهادی Yao انجام شد (۱۱). رزرپین در محلول ۰/۵٪ اسیداستیک و آب مقطر حل شد. این محلول با دوز ۱ میلی‌گرم/کیلوگرم یک بار در روز به مدت سه روز متوالی به‌صورت زیر جلدی به موش‌ها تزریق شد. چون درمان با رزرپین توسط این مدل باعث ایجاد لرزش قابل توجه، کاهش فعالیت حرکتی و کاهش وزن بدن این حیوانات می‌شود، لذا قطعات غذایی پس از تزریق رزرپین در کف قفس ریخته شد، تا امکان تغذیه راحت‌تر برای آن‌ها فراهم شود.

روش تهیه محیط کشت شرطی‌شده با سلول‌های بنیادی

بدین منظور از روش مؤمنی و همکاران در سال ۲۰۱۹ استفاده شد (۱۷). سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSC) از نمونه‌های آسپیره شده از افراد داوطلب پس از کسب رضایت کتبی از آن‌ها با استفاده از گرادیان غلظت ساکارز (Ficoll) جدا شدند. MSC های جدا شده از مغز استخوان به محیط کشت تازه Dulbecco's Modified Eagle's Medium یا به اختصار DMEM حاوی ۱۰٪ آلبومین سرم گاوی (BSA) و ۱٪ پنی‌سیلین–استرپتومایسین منتقل شدند. محیط کشت شرطی شده طبق تعریف به محیط کشتی اطلاق می‌شود که پس از ۱۶ روز تراکم سلول‌ها در محیط کشت به ۶۰ درصد یا حدود ۲۸۰۰۰ سلول در سانتی‌متر مربع برسد. در این زمان مقداری از آن برداشته شده و محیط کشت تازه به MSC افزوده می‌شود. انتخاب محیط کشت بعد از پاساژ دوم بر اساس داده‌های ارائه شده در مقالات موجود انجام شد (۱۸).این محیط کشت پس از برداشت به مدت ۳ دقیقه توسط پلیت سانتریفیوژ، در دور g1000 سانتریفوژ و به کمک فیلتر میلی‌پور با غشای ۰/۲۲ میکرومتری (میلی‌پور، آلمان) فیلتر شده و به‌عنوان محیط کشت شرطی شده در بقیه مراحل ازمایش مورد استفاده قرار گرفت. این محیط کشت تا

[DOI: 10.34785/bums024.2023.004]

زمان مصرف در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای تجویز محیط کشت، ابتدا بر اساس پروتکل Liu و همکاران محیط کشت رقیق‌سازی شده و دو غلظت ۰/۳ و ۰/۵ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر پروتئین تهیه و بر اساس میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن تزریق شد (۱۹).

گروه های آزمایشی

۴۲ سر موش صحرایی نر به‌طور تصادفی به ۷ گروه تقسیم شدند (۶ سر در هر گروه): (۱) گروه کنترل که هیچ گونه درمانی دریافت نمی‌کردند، (۲) گروه سالم تحت درمان با محیط کشت تازه، (۳) گروه سالم تحت درمان با محیط کشت شرطی‌شده با MSC، (۴) گروه دریافت‌کننده رزرپین که به مدت ۳ روز پیاپی رزرپین را با دوز ۱ میلی‌گرم/ کیلوگرم به‌صورت زیر جلدی دریافت کردند، (۵) گروه رزرپین + محیط کشت تازه که ۳ روز متوالی رزرپین و سپس به مدت ۲۱ روز محیط کشت تازه به صورت داخل صفاقی به آن‌ها تزریق شد، گروه رزرپین + محیط کشت شرطی شده که سه روز متوالی رزرپین و سپس به مدت ۲۱ روز محیط کشت شرطی شده (۰/۳ میلی‌گرم/کیلوگرم) را به‌صورت داخل صفاقی دریافت کردند، (۷) گروه رزرپین + محیط کشت شرطی شده که پس از تزریق رزرپین به مدت ۲۱ روز با محیط کشت شرطی شده (۰/۵ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن) را به‌صورت داخل صفاقی دریافت کردند.

ارزیابی اثرات محیط کشت شرطی‌شده با MSC بر درد فیبرومیالژیا

سنجش تغییر در آستانه پردردی حاد حرارتی توسط آزمون پس‌کشیدن دم (Tail Flick test)

این آزمایش توسط سنجش مدت زمان تأخیر تا پاسخ پس‌کشیدن دم در مقابل یک محرک دردزا حرارتی انجام می‌شود. این آزمون بر روی هر حیوان سه بار پیش از القا FM و سه بار در انتهای آزمایشات برای همه حیوانات مورد آزمایش در گروه‌های درمانی مختلف مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. به زمان حد فاصل بین شروع تابش حرارتی به دم تا پس کشیدن دم از مقابل پرتو تابشی زمان تأخیر تا پاسخ می‌شود. آستانه درد حرارتی دم با استفاده از دستگاه پس کشیدن دم (شرکت برج صنعت، ایران) اندازه‌گیری شد. جزئیات روش کار به این شرح است که هر حیوان به آرامی در یک محفظه مقید ساز آکریلیک شفاف (Restrainer) قرار داده شده و سپس به حیوان فرصت داده می‌شد تا کاملاً به مقیدساز سازش یافته و آرام و بی حرکت در درون آن قرار گیرد. زمان تأخیر تا پاسخ (بر حسب ثانیه) به‌دنبال تاباندن پرتو حرارتی به دم آن‌ها (۲ سانتی‌متر قسمت انتهای دم آن‌ها) تا زمان پس کشیدن دم اندازه‌گیری شد. برای جلوگیری از آسیب به بافت به دم، حداکثر زمان تابش پرتو به دم حیوانات، ۲۰ ثانیه انتخاب شد. شدت حرارت دستگاه طوری تنظیم شده بود که میانگین زمان پس کشیدن دم در حیوانات گروه کنترل در حدود ۷ ثانیه باشد. هر حیوان سه بار با فاصله ۱۵ دقیقه آزمایش و میانگین زمان تأخیر تا پاسخ سه بار تکرار برای هر کدام محاسبه و ثبت می‌شد (۲۰).

آزمون صفحه داغ

آزمون صفحه داغ (Hot plate test) نیز برای سنجش تأثیرات تزریق محیط کشت شرطی شده بر آستانه تحمل درد حرارتی حیوانات مورد آزمایش مورد استفاده واقع شد. پس از انجام درمان در هر یک از گروه‌ها، یک موش به تنهایی در درون محفظه دستگاه صفحه داغ قرار داده شد. زمان تأخیر تا پاسخ لیسیدن پنجه عقب، تکان دادن پنجه پای عقب و پریدن‌های حیوان ثبت شد. برای جلوگیری از آسیب بافتی، حداکثر زمان تأخیر تا پاسخ ۴۵ ثانیه در نظر گرفته شد. تست صفحه داغ در اولین و آخرین روز درمان بر روی همه حیوانات انجام شد. محدوده دمای دستگاه بین ۵۰ تا ۵۵ درجه سانتی‌گراد (متوسط ۵۳/۵ درجه سانتی‌گراد) تنظیم شد (۲۱).

اندازه‌گیری تغییرات وزن بدن

وزن بدن هر یک از موش‌ها یک روز قبل و در پایان آزمایشات به کمک ترازوی دقیق توزین حیوانات ساخت شرکت کیمیا کهربای مبین (http://bionicmobin.com) مورد اندازه‌گیری قرار گرفت.

[DOI: 10.34785/bums024.2023.004]

تهیه هموژنای بافت هیپوکامپ از مغز

حیوانات در انتهای آزمایشات بی‌هوش و سر آن‌ها با استفاده از گیوتین به سرعت بریده شد. مغز به سرعت از جمجمه خارج و ناحیه هیپوکامپ مغز در محلولی حاوی کوکتل مهار کننده پروتئاز، PBS و ۱ میلی‌لیتر EDTA و در مجاورت با یخ برداشته و هموژن شد. محلول حاصل سپس به مدت ۳۰ دقیقه و با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دستگاه Micro High Speed Centrifuge سانتریفیوژ شد. محلول فوقانی به وسیله سمپلر جدا و تا زمان سنجش‌های بعدی در دمای ۸۰- درجه نگهداری شد.

سنجش TNF-a در نمونه بافت هیپوکمپ

سطح فاکتور TNF-α در هموژنای هیپوکامپ مغز توسط کیت الایزا سنجیده شد. به این منظور از کیت الایزای خریداری شده از شرکت کارمانیا پارس ژن (http://kpgene.ir) استفاده شد. میزان پروتئین موجود در این هموژن‌ها و محیط‌های کشت شرطی با روش برادفورد (Bradford assay methods) اندازه‌گیری شد.

تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism 5.0 انجام شد. آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و سپس آزمون تعقیبی توکی بر روی داده‌ها صورت گرفت. داده‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد بیان شدند. سطح معنی‌داری آماری ($p<۰/۰۵$) در نظر گرفته شد.

ملاحظات اخلاقی

مطالعه حاضر با شناسه اخلاق IR.SHAHED.REC.1399.074 به تصویب معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شاهد رسیده و در سامانه ملی اخلاق در پژوهش‌های زیست پزشکی ثبت شده است.

یافته‌ها

بررسی تأثیر القای FM بر وزن بدن

علیرغم گزارشات پیشین، یافته‌های این بخش نشان دادند که تجویز رزرپین و هر یک از دوزهای درمانی از محیط‌های کشت به تنهایی یا توأمان هیچ تأثیر معنی‌داری بر تغییرات وزن بدن موش‌ها در طول مطالعه نداشتند (جدول ۱).

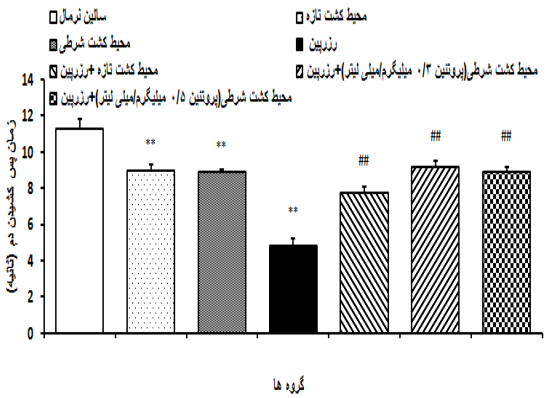
جدول ۱- بررسی تأثیر القای FM و درمان با محیط کشت به تنهای و توأمان بر وزن موش‌ها (به صورت میانگین ± انحراف معیار استاندارد)

گروه / متغیّر	گروه کنترل	گروه رزرپین	کنترل+محیط کشت تازه	کنترل+محیط کشت شرطی شده	رزرپین+محیط کشت تازه	رزرپین+محیط شرطی شده (۰/۳ میلی گرم/کیلوگرم)	رزرپین+محیط شرطی شده (۰/۵ میلی گرم/کیلوگرم)
وزن ابتدای مطالعه (گرم)	۲۰۰± ۱۱	۲۰۰ ± ۱۳	۱۹۳ ± ۱۰	۱۸۷ ± ۱۳	۲۰۹ ± ۱۲	۲۰۵ ± ۱۲	۱۹۵ ± ۱۰
وزن انتهای مطالعه (گرم)	۲۰۵± ۱۵	۲۰۶ ± ۱۳	۲۰۰ ± ۱۱	۱۹۳ ± ۹	۲۱۵ ± ۱۶	۲۱۱ ± ۱۳	۲۰۲ ± ۹

[DOI: 10.34785/bums024.2023.004]

ارزیابی اثر درمان با محیط کشت شرطی شده بر آستانه درد حاد در مدل FM توسط آزمون پس کشیدن دم

نتایج آزمون آماری نشان داد که زمان پس کشیدن دم بین گروه های کنترل، گروه FM و گروه FM درمان شده با محیط کشت شرطی شده تفاوت معنی داری دارد (نمودار ۱). گروه FM کاهش معنی‌دار (P<۰/۰۱) در زمان تأخیر تا پاسخ پس کشیدن دم در مقایسه با گروه کنترل را نشان می‌دهد (نمودار۱). تجویز هر دو غلظت و از محیط کشت شرطی شده و محیط کشت تازه توانست زمان تأخیر تا پاسخ دم را در گروه سالم در مقایسه با گروه کنترل کاهش دهد، ولی در عین حال تجویز آن‌ها به موش صحرایی در گروه FM سبب افزایش معنی‌دار در زمان پس کشیدن دم در آن‌ها شد.



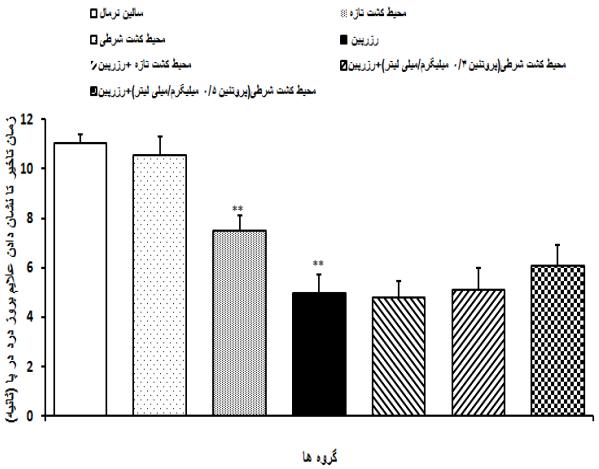
نمودار ۱- زمان تأخیر تا پاسخ در آزمون پس کشیدن دم در مدل القا درد حرارتی FM توسط رزرپین.

گروه ها شامل: کنترل، درمان با محیط کشت تازه، درمان با محیط کشت شرطی شده، دریافت‌کننده رزرپین، درمان با محیط کشت MSC و رزرپین، محیط کشت شرطی رقیق‌شده ۰/۲ میلی‌گرم/میلی لیتر+ رزرپین، محیط کشت شرطی رقیق‌شده ۰/۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر + رزرپین. داده‌ها توسط ANOVA دوطرفه و آزمون توکی مورد مقایسه آماری واقع شده‌اند. تعداد موش‌ها در هر گروه ۶ سر بود.

** نشان دهنده P<۰/۰۱ در مقایسه با گروه کنترل و ## نشان دهنده P<۰/۰۱ در مقایسه با گروه دریافت‌کننده رزرپین به تنهایی است.

ارزیابی اثر درمان با محیط کشت شرطی‌شده بر آستانه درد حاد موش‌های بزرگ مبتلا به FM توسط آزمون صفحه داغ

تزریق رزرپین باعث افزایش حساسیت به درد حرارتی در آزمون صفحه داغ در این گروه در مقایسه با گروه کنترل شد (نمودار ۲). اگرچه تیمار با محیط کشت شرطی شده و محیط کشت تازه، در حیوانات گروه کنترل سبب کاهش آستانه درد حرارتی شد، ولی بر حیوانات تحت درمان با رزرپین، اثر ضددردی معنی‌دار در مقایسه با گروه رزرپین (نمودار ۲) نداشت.



نمودار ۲- اثربخشی تجویز محیط کشت شرطی‌شده با سلول‌های بنیادی و محیط کشت تازه بر تغییرات رفتاری ناشی از رزرپین در آزمون صفحه داغ.

گروه‌ها شامل: کنترل، درمان با محیط کشت تازه، درمان با محیط کشت شرطی‌شده، دریافت کننده رزرپین، درمان با محیط کشت MSC و رزرپین، محیط کشت شرطی رقیق‌شده ۰/۲ میلی‌گرم/میلی‌لیتر+ رزرپین، محیط کشت شرطی رقیق‌شده ۰/۵ میلی‌گرم/میلی لیتر + رزرپین.

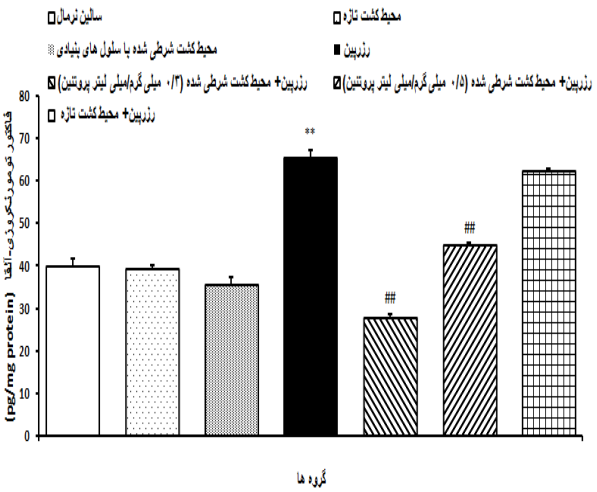
تمام مقادیر به صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین (SEM) تعداد ۶ حیوان ارائه شده‌اند. نتایج با استفاده از ANOVA دو طرفه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته و به‌دنبال آن از آزمون توکی برای مقایسه گروه‌ها استفاده شده است.

** نشان دهنده P<۰/۰۱ در مقایسه با گروه کنترل است.

[DOI: 10.34785/bums024.2023.004]

اثرات درمان با محیط کشت شرطی‌شده با سلول‌های بنیادی بر سطح TNF-a در بافت هیپوکامپ مغز در مدل FM ناشی از رزرپین

نمودار ۳ اثرات درمان با محیط کشت شرطی شده و تازه بر سطح TNF-α هیپوکامپ در شرایط پر دردی حرارتی گرمایی ناشی از رزرپین را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشخص است تجویز رزرپین به حیوانات سبب افزایش معنی‌دار در غلظت TNF-α در بافت هیپوکامپ نسبت به گروه‌های کنترل و درمان با محیط کشت به تنهایی می‌شود. درمان با محیط کشت شرطی‌شده و تازه به‌تنهایی هیچ اثر معنی‌داری بر سطح این فاکتور در هیپوکامپ حیوانات نداشت. اما درمان با هر دو غلظت پروتئنی مختلف از محیط کشت شرطی شده توانست سبب کاهش سطح این فاکتور در شرایط دریافت رزرپین در موش‌ها شود. محیط کشت تازه نیز تأثیر معنی‌دار بر این فاکتور در هیپوکامپ آن‌ها نداشت.



نمودار ۳- اثرات درمان با محیط کشت شرطی‌شده و تازه بر نشانگرهای التهابی TNF-α در بافت هیپوکامپ مغز موش‌های دریافت رزرپین در مقایسه با موش‌های درمان شده با نرمال سالین.

گروه‌ها شامل: کنترل، درمان با محیط کشت تازه، درمان با محیط کشت شرطی‌شده، دریافت کننده رزرپین، درمان با محیط کشت MSC و رزرپین، محیط کشت شرطی رقیق‌شده ۰/۲ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر+ رزرپین، محیط کشت شرطی رقیق‌شده ۰/۵ میلی گرم/ میلی‌لیتر + رزرپین. داده‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین بیان می‌شوند (n=۵) و با استفاده از آنالیز واریانس دو طرفه و سپس آزمون توکی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

** نشان‌دهنده P<۰/۰۱ در مقایسه با گروه کنترل و ## نشان‌دهنده P<۰/۰۱ در مقایسه با گروه دریافت‌کننده رزرپین به تنهایی است.

بحث

یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهند که تجویز محیط کشت شرطی‌شده در هر دو غلظت و محیط کشت تازه سبب کاهش زمان تأخیر تا پاسخ پس کشیدن دم در موش های صحرایی گروه کنترل می‌شود، ولی برعکس تجویز آن‌ها به حیوانات مبتلا به FM سبب افزایش معنی‌دار زمان پس کشیدن دم در آن‌ها می‌شود. پژوهشگران پیش از این نیز به تأثیر کاهش دهنده تجویز این محیط‌های کشت بر آستانه گیرنده‌های حس درد مکانیکی و حرارتی در انواع موش‌ها اشاره کرده‌اند، گرچه مکانیسم دقیق چنین فرایندی هنوز مشخص نشده است، ولی عنوان شده است که محیط‌های کشت می‌توانند بر برخی عملکردهای سیناپسی تأثیر بگذارند (۲۲). یافته حاضر با استناد به گزارشات قبلی دال بر مکانیسم مرکزی کنترل درد برای FM و اثرات ضد دردی مرکزی برای محیط کشت شرطی‌شده مشابه با برخی ترکیبات دیگر در این شرایط است (۲۳).

در ادامه نتایج آزمون صفحه داغ مشخص کرد که تزریق رزرپین باعث افزایش حساسیت به درد حرارتی در این آزمون می‌شود و درمان با محیط کشت شرطی‌شده و محیط کشت تازه سبب کاهش آستانه درد حرارتی نشد. همچنین در نمودار ۲ مشخص است که محیط کشت شرطی شده و تازه تأثیری بر آستانه درد در گروه رزرپین نداشته‌اند. مطالعه ما همسو با مطالعه Rivat و همکاران بود (۲۴). آن‌ها یافته‌های خود را چنین تفسیر کرده‌اند که اثر ضد دردی تنها به دلیل اثر و فعال کردن گیرنده با خاصیت ضد درد مثلا اپیوئیدی نیست، بلکه می‌تواند به دلیل فعال شدن سیستم‌های دیگر کنترل‌کننده درد نیز حاصل شده باشد. در توضیح این یافته با توجه به مکانیسم مرکزی حاکم بر کنترل درد در آزمون صفحه داغ و ناهمسو با مطالعه Sargent و همکارانش مبنی بر عدم کارائی درمان‌های مبتنی بر سلول‌های بنیادی در مقابل بیماری سیستم عصبی مرکزی (۲۵) که به دلیل تفاوت در مکانیسم‌های کنترل‌کننده درددر دو آزمون مختلف و اثرات متفاوت مرکزی مواد مؤثره موجود در محیط کشت شرطی شده پاسخ کاهشی بر درد در آزمون صفحه داغ مشاهده نشده است. یافته‌های ما دال بر بروز تغییر در سطح فاکتور التهابی TNF-α در هیپوکامپ به‌عنوان زمینه ساز القا پر

[DOI: 10.34785/bums024.2023.004]

دردی حرارتی به هنگام FM و اثرات درمان با محیط کشت شرطی‌شده با سلول‌های بنیادی بر این مدل است. Yao و همکارانش تعدیل درد توسط مکانیسم وابسته به سیستم سروتونرژیک و استرس اکسیداتیو را توسط مواد آزاد شده از سلول‌های بنیادی مطرح کردند (۱۱). از سوی دیگر نشان داده شده است که سرکوب تولید TNF-α سبب کاهش دردهای FM می‌شود (۹). امّا در توضیح این که اثرات ضد دردی محیط کشت شرطی‌شده احتمالاً مربوط به چه خاصیتی در این محیط کشت است. می‌توان بر اساس گزارش Hong و همکارانش آن را شاید بتوان به خاصیت ضد دردی آنتی‌اکسیدان‌های موجود در محیط کشت شرطی شده نسبت داد (۲۶). ضمن اینکه گزارش شده است که محیط کشت شرطی‌شده با سلول‌های بنیادی دارای خاصیت محافظت‌کننده عصبی نیز می‌باشد (۲۷). لذا به‌عنوان یک پیشنهاد می‌توان این نظریه را مطرح کرد که خواص آنتی‌اکسیدانی و محافظت‌کننده عصبی محیط کشت شرطی شده عاملی برای اثرات کنترل‌کننده آن بر FM القا شده توسط رزرپین در مطالعه حاضر بوده است.

بعلاوه داده‌های این مطالعه نشان داد که نه تجویز رزرپین و نه محیط کشت‌های شرطی به تنهایی و نه همراه با هم، سبب تغییر معنی‌دار در وزن بدن حیوانات مورد مطالعه نمی‌شود. اگرچه گزارش قبلی دال بر کاهش وزن بدن موش‌های صحرایی به‌دنبال القا FM توسط رزرپین در دست است (۲۲).

مطالعه ما نشان داد حیواناتی که دچار FM القا شده توسط رزرپین شده بودند، کاهش آستانه معنی‌داری در آستانه پردردی حرارتی نشان دادند. درمان با محیط کشت شرطی شده با سلول‌های بنیادی قادر به پیشگیری از این کاهش در آستانه درد در آزمون فرمالین شد، ولی بر پاسخ آن‌ها در آزمون صفحه داغ بی‌تأثیر بود. به این ترتیب یافته‌های این پژوهش همسو با مطالعات قبلی این نظریه را تأیید می‌کنند که محیط کشت شرطی شده دارای اثرات پیشگیری‌کننده از شرایط درد التهابی، اما فاقد توان پیشگیری از دردهای با منشأ عصبی است (۲۷، ۱۹). همچنین مطالعه حاضر نشان داد که درمان با محیط کشت شرطی شده با سلول‌های بنیادی به طور قابل توجهی تغییرات ناشی از رزرپین بر افزایش TNF-α در بافت هیپوکامپ را کاهش داد. نتیجه مطالعه حاضر با یافته‌های یک مطالعه قبلی مطابقت دارد که در آن محیط کشت شرطی شده با سلول‌های بنیادی پتانسیل محافظت عصبی خود را از طریق مدولاسیون تعداد زیادی از فاکتورهای التهابی متنوع اعمال می‌کند (۲۷). به این ترتیب، در مطالعه حاضر نقش TNF-α در ایجاد درد FM و سرکوب آن توسط درمان با محیط کشت شرطی شده با سلول های بنیادی به‌عنوان مکانیسم عملکرد این درمان در این مدل نشان داده شده است.

نتیجه‌گیری

تجویز محیط کشت شرطی‌شده با سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌تواند پردردی حرارتی القا شده توسط رزرپین را همگام با تنظیم سطح TNF-α در هیپوکامپ مغز موش‌های صحرایی بدون تأثیر کاهشی بر وزن بدن سرکوب کند.

تقدیر و تشکّر

این مقاله حاصل پایان‌نامه تحت عنوان "تأثیر محیط‌های کشت مزانشیمی شرطی‌شده با سلول های بنیادی انسان بر مدل پردردی عضلانی در موش صحرایی"، در مقطع کارشناسی ارشد در سال ۱۴۰۰ می‌باشد که با حمایت دانشگاه شاهد اجرا شده است. بدین‌وسیله از تمامی مسئولین و افرادی که ما را در اجرای این پایان‌نامه و تدوین این مقاله یاری دادند تشکر می‌شود. پروپوزال پژوهش حاضر به تصویب شورای پژوهشی دانشکده علوم پایه دانشگاه شاهد رسیده است.

تضاد منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ گونه تضاد منافعی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

[DOI: 10.34785/bums024.2023.004]

منابع:

1- Hung CH, Lee CH, Tsai MH, Chen CH, Lin HF, Hsu CY,et al. Activation of acid-sensing ion channel 3 by lysophosphatidylcholine 16:0 mediates psychological stress-induced fibromyalgia-like pain. Ann Rheum Dis. 2020; 79(12): 1644-56. DOI: 10.1136/annrheumdis-2020-218329.

2- Shahrjerdi S. Prevalence and associated factors of musculoskeletal pain in students of engineering and humanities faculties of Arak University in 2018-2019. J Arak Uni Med Sci. 2021; 24 (4): 482-95. DOI: 10.32598/jams.24.4.620.4 URL: http://jams.arakmu.ac.ir/article-1-6827-fa.html [Persian].

3- Gerdle B, Wåhlén K, Gordh T, Ghafouri B. Thermal pain thresholds are significantly associated with plasma proteins of the immune system in chronic widespread pain-an exploratory pilot study using multivariate and network analyses. J Clin Med. 2021; 10(16): 3652. DOI: 10.3390/jcm10163652.

4- Golgoli E, Mottaghian H, Roshandel Hesari A. study of musculoskeletal disorders and pain prevalence in computer operators in Bojnoord. Paramedical Sciences and Military Health. 2018; 13 (1): 41-6 URL: http://jps.ajaums.ac.ir/article-1-139-fa.html [Persian].

5- López-Solà M, Pujol J, Monfort J, Deus J, Blanco-Hinojo L, Harrison BJ,et al. The neurologic pain signature responds to nonsteroidal anti-inflammatory treatment vs placebo in knee osteoarthritis. Pain Rep. 2022; 7(2): e986. DOI: 10.1097/PR9.0000000000000986.

6- Cifani C, Avagliano C, Micioni Di Bonaventura E, Giusepponi ME, De Caro C, et al. Modulation of pain sensitivity by chronic consumption of highly palatable food followed by abstinence: Emerging role of fatty acid amide hydrolase. Front Pharmacol. 2020; 11: 266. DOI: 10.3389/fphar.2020.00266.

7- Stubbs A, Harte S, Clauw DJ, Williams DA, McAfee J, Miller N,et al. Early relationships of a low-energy diet with symptoms of fibromyalgia. ACR Open Rheumatol. 2022; 4(5): 464-69. DOI: 10.1002/acr2.11418.

8- Abd-Ellatief RB, Mohamed HK, Kotb HI. Reactive astrogliosis in an experimental model of fibromyalgia: effect of dexmedetomidine. Cells Tissues Organs. 2018; 205(2): 105-19. DOI: 10.1159/000488757.

9- Amri J, Sadegh M, Moulaei N, Palizvan MR. Transgenerational modification of hippocampus TNF-α and S100B levels in the offspring of rats chronically exposed to morphine during adolescence. Am J Drug Alcohol Abuse. 2018; 44(1): 95-102. DOI: 10.1080/00952990.2017.1348509.

10- Liu Y, Zhou LJ, Wang J, Li D, Ren WJ, Peng J,et al. TNF-α differentially regulates synaptic plasticity in the hippocampus and spinal cord by microglia-dependent mechanisms after peripheral nerve injury. j neurosci. 2017; 37(4): 871-81. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2235-16.2016.

11- Yao X, Li L, Kandhare AD, Mukherjee-Kandhare AA, Bodhankar SL. Attenuation of reserpine-induced fibromyalgia via ROS and serotonergic pathway modulation by fisetin, a plant flavonoid polyphenol. Exp Ther Med. 2020; 19(2): 1343-55. DOI: 10.3892/etm.2019.8328.

12- Park BK, Kim YR, Kim YH, Yang C, Seo CS, Jung IC, et al. Antidepressant-Like Effects of Gyejibokryeong-hwan in a Mouse Model of Reserpine-Induced Depression. Biomed Res Int. 2018; 2018: 5845491. DOI: 10.1155/2018/5845491

13- Motejunas MW, Bonneval L, Carter C, Reed D, Ehrhardt K. Biologic Therapy in Chronic Pain Management: a Review of the Clinical Data and Future Investigations. Curr Pain Headache Rep. 2021; 25(5): 30. DOI: 10.1007/s11916-021-00947-2.

14- Joseph A, Baiju I, Bhat IA, Pandey S, Bharti M, Verma M,. Mesenchymal stem cell-conditioned media: A novel alternative of stem cell therapy for quality wound healing. J Cell Physiol. 2020; 235(7-8): 5555-5569. DOI: 10.1002/jcp.29486.

15- Sano M, Tanabe A, Urushihata N, Liu XL. Effect of human adipose-derived mesenchymal stem cell conditioned medium on musculoskeletal pain. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2022; 26(5): 1570-78. DOI: 10.26355/eurrev_202203_28223.

[DOI: 10.34785/bums024.2023.004]

16- Nazemian V, Manaheji H, Sharifi AM, Zaringhalam J. Long term treatment by mesenchymal stem cells conditioned medium modulates cellular, molecular and behavioral aspects of adjuvant-induced arthritis. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 2018; 64(1): 19-26. DOI: 10.14715/cmb/2018.64.2.5.

17- Momeni-Moghaddam M, Gholami R. The Effect of the Mesenchymal Stem Cell Conditioned Media on Mouse Fibroblast Collagen Gene Expression. J Sabzevar Univ Med Sci. 2019; 26(5): 651-6. URL: http://jsums.medsab.ac.ir/article_1125.html?lang=en [Persian].

18- Sears V, Ghosh G. Harnessing mesenchymal stem cell secretome: Effect of extracellular matrices on proangiogenic signaling. Biotechnol Bioeng. 2020; 117(4): 1159-71. DOI: 10.1002/bit.27272.

19- Liu B, Ding F, Hu D, Zhou Y, Long C, Shen L,et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell conditioned medium attenuates renal fibrosis by reducing inflammation and epithelial-to-mesenchymal transition via the TLR4/NF-κB signaling pathway in vivo and in vitro. Stem Cell Res Ther. 2018; 9(1): 7. DOI: 10.1186/s13287-017-0760-6.

20- Atabaki R, Hassanpour-Ezatti M. Improvement of Lidocaine Local Anesthetic Action Using Lallemantia royleana Seed Mucilage as an Excipient. Iran J Pharm Res. 2014; 13(4): 1431-6. PMCID: PMC4232811

21- Peres Klein C, Rodrigues Cintra M, Binda N, Montijo Diniz D, Gomez MV, Souto AA, de Souza AH. Coadministration of Resveratrol and Rice Oil Mitigates Nociception and Oxidative State in a Mouse Fibromyalgia-Like Model. Pain Res Treat. 2016; 2016: 3191638. DOI: 10.1155/2016/3191638.

22- Ejiri Y, Uta D, Ota H, Mizumura K, Taguchi T. Nociceptive chemical hypersensitivity in the spinal cord of a rat reserpine-induced fibromyalgia model. Neurosci Res. 2022; 181: 87-94. DOI: 10.1016/j.neures.2022.03.005.

23- Siracusa R, Paola RD, Cuzzocrea S, Impellizzeri D. Fibromyalgia: Pathogenesis, Mechanisms, Diagnosis and Treatment Options Update. Int J Mol Sci. 2021; 22(8): 3891. DOI: 10.3390/ijms22083891.

24- Rivat C, Ballantyne J. The dark side of opioids in pain management: basic science explains clinical observation. Pain Rep. 2016; 1(2): e570. DOI: 10.1097/PR9.0000000000000570.

25- Sargent A, Bai L, Shano G, Karl M, Garrison E, Ranasinghe L, Planchon SM, Cohen J, Miller RH. CNS disease diminishes the therapeutic functionality of bone marrow mesenchymal stem cells. Exp Neurol. 2017; 295: 222-32. DOI: 10.1016/j.expneurol.2017.06.013.

26- Hong HE, Kim OH, Kwak BJ, Choi HJ, Im KH, Ahn J,et al. Antioxidant action of hypoxic conditioned media from adipose-derived stem cells in the hepatic injury of expressing higher reactive oxygen species. Ann Surg Treat Res. 2019; 97(4): 159-67. DOI: 10.4174/astr.2019.97.4.159.

27- Palomares T, Cordero M, Bruzos-Cidon C, et al. The Neuroprotective Effect of Conditioned Medium from Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells is Impaired by N-acetyl Cysteine Supplementation.Mol Neurobiol. 2018; 55(1): 13-25. DOI: 10.1007/s12035-017-0714-0.

28- Ekram S, Khalid S, Salim A, Khan I. Regulating the fate of stem cells for regenerating the intervertebral disc degeneration. World J Stem Cells. 2021; 13(12): 1881-904. DOI: 10.4252/wjsc.v13.i12.1881.

29- Jin QH, Kim HK, Na JY, Jin C, Seon JK. Anti-inflammatory effects of mesenchymal stem cell-conditioned media inhibited macrophages activation in vitro. Sci Rep. 2022; 12(1): 4754. DOI: 10.1038/s41598-022-08398-4.

[DOI: 10.34785/bums024.2023.004]