

Effect of Mesenchymal Stem Cells' Conditioned Medium on the Expression of CCL3 and CCL4 Chemokines in the Spinal Cord of Rats with Neuropathic Pain

Mohammad-Shafi Mojadadi¹,
Kimia Shahrazad²,
Samad Nazemi³,
Saeideh Sadat Shobeiri⁴

¹ Associate Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran

² Medical Student, Student Research Committee, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran

³ Associate Professor, Cellular and Molecular Research Center, School of Medicine, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran

⁴ PhD in Immunology, Cellular and Molecular Research Center, School of Medicine, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran

(Received August 8, 2023 ; Accepted October 9, 2023)

Abstract

Background and purpose: Inflammation plays an important role in the development of neuropathic pain (NP). Considering the anti-inflammatory effects of mesenchymal stem cells (MSCs) and their conditioned medium (CM), we aimed to investigate the effect of MSC-CM on the expression of CCL3 and CCL4 genes in the spinal cord of rats with NP.

Materials and methods: In this experimental-interventional study, 28 male Wistar rats weighing 200-300 grams were included. NP was induced in male rats using the chronic constriction injury (CCI) model of the sciatic nerve. MSCs-CM was injected intraperitoneally (1ml) into each rat in the experimental group one day before surgery (-1), and 7 and 11 days after the surgery, while the rats of control group received DMEM. At the end of the study (day 15), the expression level of CCL3 and CCL4 genes in the animals' spinal cord was measured using Real time PCR.

Results: Molecular studies showed a significant decrease in CCL3 gene expression ($P < 0.05$) in CM treated animals compared to the control group, but in term of CCL4 gene expression, there was no significant difference between the groups.

Conclusion: Anti-NP effects of MSCs-CM seem to be partly mediated through downregulation of CCL3 chemokine in the spinal cord.

Keywords: neuropathic pain, mesenchymal stem cell, conditioned medium, CCL3, CCL4, hyperalgesia, allodynia

J Mazandaran Univ Med Sci 2023; 33 (226): 164-171 (Persian).

Corresponding Author: Saeideh Sadat Shobeiri - Cellular and Molecular Research Center, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran. (E-mail: Saeideshobeiri@gmail.com)

اثر مایع رویی کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر بیان ژن کموکاین‌های CCL3 و CCL4 در نخاع رت‌های مبتلا به درد نوروپاتیک

محمد شفیع مجددی¹کیمیا شهرآزاد²صمد ناظمی³سعیده سادات شبیری⁴

چکیده

سابقه و هدف: التهاب، نقش مهمی در ایجاد درد نوروپاتیک دارد. نظر به اثرات ضدالتهابی سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) و مایع رویی کشت آن‌ها (MSCs-CM)، هدف این مطالعه بررسی اثر MSCs-CM بر میزان بیان ژن کموکاین‌های CCL3 و CCL4 در نخاع رت‌های نوروپاتیک بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی - مداخله‌ای، 28 رت نر نژاد ویستار با وزن 200-300 گرم وارد مطالعه شدند. درد نوروپاتی در رت‌ها با عمل جراحی و تکنیک آسیب رساندن به عصب سیاتیک، از طریق گره زدن عصب مذکور با نخ‌های مخصوص، القاء شد. سپس، MSCs-CM به صورت داخل صفاقی (یک میلی‌لیتر) در سه روز متفاوت (روز قبل جراحی (-1) و روزهای 7 و 11 بعد از جراحی) به هر کدام از رت‌های گروه آزمایش تزریق شد، در حالی که رت‌های گروه کنترل محیط کشت DMEM را دریافت کردند. در پایان مطالعه (روز 15)، میزان بیان ژن‌های CCL3 و CCL4 در نخاع حیوانات با Real-time-PCR سنجش شد.

یافته‌ها: بررسی‌های مولکولی کاهش معنی‌داری را در بیان ژن CCL3 در حیوانات دریافت‌کننده MSCs-CM نسبت به گروه کنترل نشان داد ($P < 0/05$)، اما از نظر بیان ژن CCL4 تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها مشاهده نشد.

استنتاج: براساس یافته‌های مطالعه حاضر، اثرات ضددردی MSCs-CM، تا حدی از طریق کاهش بیان کموکاین CCL3 در نخاع میانجی‌گری می‌شود.

واژه‌های کلیدی: درد نوروپاتیک، مایع رویی کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی، کموکاین، CCL3، CCL4، هایپرالژزیا، آلودینیا

مقدمه

غیردردناک (می‌باشند) (3). کموکاین‌ها و گیرنده‌های آن‌ها (CXCL، CCL، CX3CL و XCL) علاوه بر سلول‌های ایمنی، در نورون‌ها و گلیال‌ها نیز بیان شده و فعالیت‌های آن‌ها را تنظیم می‌کنند (4،5).

درد نوروپاتیک در اثر آسیب به اعصاب مرکزی یا محیطی به وجود می‌آید (1،2). دو علامت بارز درد نوروپاتیک، هایپرالژزیا (حساسیت شدید به محرک‌های دردناک) و آلودینیا (احساس درد نسبت به محرک‌های

E-mail: Saeideshobeiri@gmail.com

مؤلف مسئول: سعیده سادات شبیری - سبزوار: دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی

1. دانشیار، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران

2. دانشجوی پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران

3. دانشیار، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران

4. دکتری تخصصی پژوهشی ایمونولوژی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران

تاریخ دریافت: 1402/5/17 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1402/6/5 تاریخ تصویب: 1402/7/17

جداسازی و شناسایی MSCs

MSCs براساس روش توضیح داده شده در مطالعات قبلی از استخوان‌های ران دو رت، جدا و با استفاده از فلوسایتومتری از نظر شاخص‌های آنتی‌ژنی سطحی CD34، CD44، CD45 و CD90 (eBioscience, Inc., CA, USA) بررسی شدند (13).

جمع‌آوری MSCs-CM

MSCs-CM در پاساژ دوم جمع‌آوری شد. هنگامی که سلول‌ها 80 درصد کف فلاسک را پر کردند، محیط - کشت رویی آن‌ها با DMEM بدون FBS تعویض شد و سلول‌ها به مدت 48 ساعت در انکوباتور CO₂ قرار گرفتند. سپس، MSCs-CM جمع‌آوری و پس از فیلتر شدن، تا زمان استفاده در 80- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (13).

القای درد نوروپاتیک

درد نوروپاتیک از طریق تکنیک آسیب رساندن به عصب سیاتیک، از طریق گره زدن عصب مذکور با نخ‌های مخصوص (در اصطلاح تکنیک CCI یا chronic constriction injury)، القاء شد (13). پس از بیهوشی رت‌ها با کتامین/زایلازین (60/10 mg/kg)، با ایجاد شکاف در عضله دو سر ران، دسترسی به عصب سیاتیک فراهم گردید. سپس عصب سیاتیک قبل از محل سه شاخه شدن، با چهار گره شل در فواصل یک میلی‌متری بوسیله نخ بخیه کرومیک گات، طوری گره زده شد که اختلالی در جریان خون عصب بوجود نیاید (13). در پایان، محل جراحی بخیه و ضد عفونی شد.

گروه‌های آزمایش و تیمار

رت‌ها تصادفاً به چهار گروه (هر گروه، 7 رت) تقسیم شدند: 1) گروه شم (Sham): حیوانات تحت عمل CCI قرار گرفتند اما عصب سیاتیک آن‌ها گره زده نشد. 2) گروه نوروپاتی (CCI): حیوانات تحت عمل جراحی قرار گرفتند، عصب سیاتیک گره زده شد. 3) گروه نوروپاتی دریافت‌کننده محیط کشت DMEM

بر اساس مطالعات متعاقب آسیب عصبی، بیان CCL3 و CCL4 در سیستم عصبی مرکزی و محیطی افزایش می‌یابد که در نهایت منجر به ایجاد درد نوروپاتی می‌شود (6). داروهای دردهای نوروپاتیک نظیر ضد تشنج‌ها، ضدافسردگی‌ها و ... اثربخشی کم و عوارض جانبی نامطلوب دارند (7). در مقابل، سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) به دلیل توانایی خودتجدیدی و ایمونومودولاتوری، منبعی بالقوه برای درمان برخی بیماری‌ها تلقی می‌شوند (8). این سلول‌ها روند بهبودی عملکرد مغز، نخاع و اعصاب محیطی را تسریع می‌نمایند (9). پیوند MSCs با کاهش سطح سایتوکاین‌ها و کموکاین‌های التهابی مختلف، موجب تخفیف درد در حیوانات با آسیب نخاعی می‌شود (9،10).

ترشح مولکول‌های تعدیل‌کننده سیستم ایمنی توسط MSCs در مایع رویی کشت (CM) آن‌ها و نبود محدودیت‌ها و خطرات مربوط به سلول‌درمانی، استفاده از MSCs-CM را در مرکز توجهات قرار داده است (11،12). نظر به نقش مهم کموکاین‌های CCL3 و CCL4 در روند ایجاد درد نوروپاتیک و اثرات ضددردی MSCs، احتمال دارد MSCs-CM، اثرات خود را از طریق کاهش بیان کموکاین‌های مذکور اعمال نماید. لذا جهت آزمایش این فرضیه، این پژوهش با هدف تعیین اثر تیمار با MSCs-CM بر بیان ژن کموکاین‌های CCL3 و CCL4 در رت‌های مبتلا به درد نوروپاتی انجام شد.

مواد و روش‌ها

حیوانات

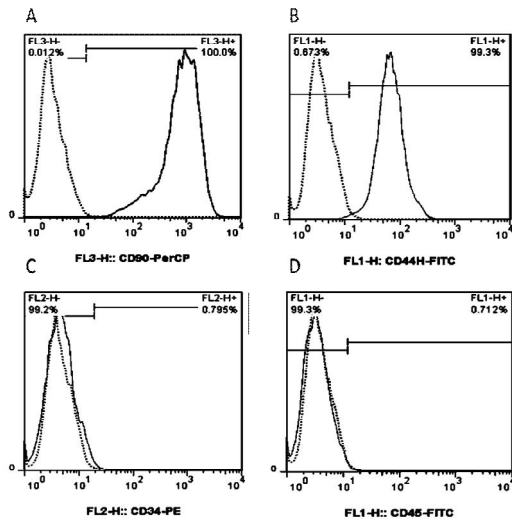
در این مطالعه تجربی - مداخله‌ای، 28 رت نر ویستار (200-300 گرم) از دانشگاه علوم پزشکی مشهد خریداری شد. رت‌ها در شرایط مناسب دمایی و نور، با دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. تمام آزمایش‌ها توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی سبزوار (IR.MEDSAB.REC.1398.070) تایید شد.

آنالیزهای آماری

آنالیز داده‌ها در نرم‌افزار SPSS-16 انجام شد. در صورت نرمال بودن داده‌ها، از ANOVA یک‌طرفه و آزمون تکمیلی بونفرونی استفاده شد و در غیر این صورت، از آزمون کروسکال والیس استفاده گردید. تمام داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شد. $P < 0/05$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار اکسل طراحی شدند.

یافته‌ها و بحث

ایمونوفنوتایپینگ سلول‌های جدا شده از مغز استخوان نتایج فلوسایتومتری بیانگر جداسازی موفقیت‌آمیز MSCs از مغز استخوان رت‌ها و کشت آن‌ها در محیط آزمایشگاه بود (تصویر شماره 1). براساس مطالعات، MSCs رتی واجد شاخص‌های آنتی‌ژنی CD44 و CD90 و فاقد شاخص‌های آنتی‌ژنی CD34 و CD45 (شاخص‌های سلول‌های خون‌ساز) می‌باشند (13).



تصویر شماره 1: ایمونوفنوتایپینگ MSCs. آنالیز فلوسایتومتری نشان داد MSCs جدا شده از مغز استخوان از نظر شاخص‌های CD90 (A) و CD44 (B) مثبت و از نظر شاخص‌های CD34 (C) و CD45 (D) منفی بودند.

(CCI+DMEM): حیوانات تحت عمل CCI قرار گرفتند، عصب سیاتیک گره زده شد و یک میلی‌لیتر محیط کشت DMEM دریافت نمودند (4). گروه نورویاتی دریافت‌کننده محلول رویی محیط کشت (CCI+CM): حیوانات تحت عمل CCI قرار گرفتند، عصب سیاتیک گره زده شد و یک میلی‌لیتر MSCs-CM دریافت نمودند (13). محیط کشت CM یا DMEM یک روز قبل و در روزهای 7 و 11 بعد از عمل جراحی CCI به صورت داخل صفاقی به گروه‌های مربوطه تزریق شد. گروه‌های CCI و sham در زمان‌های مذکور نرمال سالین دریافت کردند.

ارزیابی بیان ژن کموکاین‌های CCL3 و CCL4 در نخاع رت‌ها

در پایان مطالعه (روز 15)، حیوانات با تزریق داخل-صفاقی کتامین/ایلازین (100/10 mg/kg) عمیقاً بیهوش و سپس قربانی شدند (13). در ادامه، بیان نسبی ژن‌های CCL3 و CCL4 در نخاع با استفاده از Real-Time PCR، اندازه‌گیری شد. به طور خلاصه، طناب نخاعی هر موش با نرمال سالین سرد خارج شد و RNA با استفاده از کیت استخراج RNA (سیناکلون، ایران) طبق پروتکل کیت RNX-Plus Takara با استفاده از کیت ساخت cDNA (Bio Inc. Japan) طبق پروتکل صورت گرفت. در نهایت میزان بیان ژن‌های CCL3 و CCL4 با روش سایبرگرین و در دستگاه Bio-Rad (Philadelphia, PA USA) در شرایط دناتوراسیون اولیه 15 دقیقه 95 درجه سانتی‌گراد و سپس 40 سیکل با شرایط دناتوراسیون 10 ثانیه 95 درجه سانتی‌گراد، اتصال پرایمرها 20 ثانیه 60 درجه سانتی‌گراد و ساخته شدن محصول به مدت 30 ثانیه در دمای 72 درجه سانتی‌گراد ارزیابی شد. میزان تغییرات بیان ژن با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ در مقایسه با GAPDH به عنوان ژن مرجع و نسبت به گروه Sham محاسبه شد. توالی پرایمرها، طول محصول و شماره دسترسی در جدول شماره 1 آمده است.

جدول شماره 1: توالی پرایمرهای CCL3، CCL4 و GAPDH

شماره دسترسی	طول محصول (جفت باز)	دمای اتصال	توالی	پرایمر	
NM_013025	81	63 °C	CATGGCGCTCTGGAACGAA	رو به جلو	CCL3
			TGCCGTCCATAGGAGAAGCA	معکوس	
NM_053858	100	59 °C	CCAATAGGCTCTGACCCCTCC	رو به جلو	CCL4
			AAAGGCTGCTGGTCTCATAGT	معکوس	
NM_017008.4	74	59 °C	GCATCTTCTTGTCAGTGCC	رو به جلو	GAPDH
			TACGGCCAAATCCGTTTACA	معکوس	

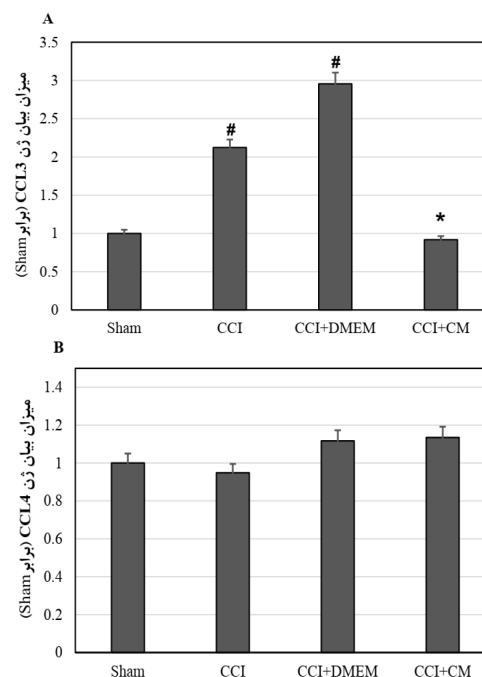
طور معنی داری سبب کاهش بیان نسبی ژن CCL3 در رت‌های نوروپاتیستک شود. در حالی که بیان این ژن در گروه‌های CCI و CCI-DMEM افزایش یافته بود. (B) تفاوت معنی داری در میزان بیان ژن CCL4 در نخاع رت‌های نوروپاتیستک بین گروه‌های مختلف وجود نداشت. * : $P < 0/05$ در مقایسه با گروه‌های CCI و CCI-DMEM. # : $P < 0/05$ در مقایسه با گروه Sham در آزمون ANOVA. نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار نمایش داده شده است

هدف این مطالعه روشن ساختن برخی از مکانیسم‌های احتمالی ضددردی MSCs-CM، از طریق تأثیر بر بیان ژن کموکاین‌های CCL3 و CCL4، در رت‌های نوروپاتیستک بود. متعاقب آسیب عصبی، میکروگلیاها و آستروسیت‌ها در نخاع فعال شده و با رهاسازی سایتوکاین‌های پیش التهابی، کموکاین‌ها و سایر ترکیبات، منجر به تسهیل انتقال درد و شروع درد نوروپاتیستک و در نتیجه، بروز آلودینمای مکانیکی و هایپرآلژزیا می‌شوند (14). از این‌رو در آسیب‌های عصبی، التهاب نقش مهمی در روند ایجاد دردهای نوروپاتیستک دارد. به‌خصوص که کموکاین‌های تولید شده متعاقب آسیب‌های عصبی، در جذب سلول‌های ایمنی، روند التهاب عصبی و در نتیجه توسعه درد و بروز علائم رفتاری درد نوروپاتیستک نقش مهمی دارند (4، 15، 16). در مدل‌های مختلف حیوانی درد نوروپاتیستک، افزایش بیان کموکاین‌های CCL3 و CCL4 با بروز علائم درد نوروپاتیستک همراه بوده و این کموکاین‌ها در روند ایجاد درد نوروپاتیستک بسیار موثر می‌باشند (6، 17).

در این پژوهش، در روز 15 پس از جراحی CCI، بیان ژن CCL3 در نخاع حیوانات افزایش یافته بود، که نشان از نقش مهم این کموکاین در روند ایجاد درد نوروپاتیستک دارد. لذا جلوگیری از بیان و یا کاهش بیان

اثر MSCs-CM بر بیان ژن‌های CCL3 و CCL4

در گروه CCI-CM، میزان بیان نسبی ژن CCL3 نسبت به گروه sham تفاوت معنی داری نداشت ($P > 0/05$). در حالی که بیان آن در گروه‌های CCI و CCI-DMEM، نسبت به گروه sham افزایش قابل ملاحظه‌ای داشت ($P < 0/05$) (تصویر شماره 2A). این نتایج بیانگر آن است که القای درد نوروپاتیستک در رت‌ها، با افزایش بیان کموکاین CCL3 همراه است و تیمار حیوانات نوروپاتیستک با MSCs-CM می‌تواند مانع از بیان زیاد کموکاین CCL3 شود. از طرفی، هیچ تفاوت قابل ملاحظه‌ای در بیان نسبی ژن CCL4، بین گروه‌های مختلف مطالعه وجود نداشت ($P > 0/05$) (تصویر شماره 2B).



تصویر شماره 2: تأثیر MSCs-CM بر میزان نسبی بیان ژن‌های کموکاینی (تکنیک Real time-PCR). (A) MSCs-CM توانست به

ضددردی MSCs-CM، محدود به کاهش بیان CCL3 نیست، بلکه مکانیسم‌هایی نظیر کاهش بیان گیرنده‌های پورینریک P2X4 و P2X7 نیز متعاقب تیمار حیوانات مبتلا به درد نوروپاتی با MSCs-CM گزارش شده است (13). علاوه بر این، با توجه به این که سایتوکاین‌های پیش‌التهابی نظیر IL-1، TNF- α و IL-6 نیز نقش مهمی در روند ایجاد و توسعه دردهای نوروپاتی دارند (19، 20)، بخشی دیگر از اثرات ضد درد مایع‌روبی سلول‌های مزانشیمی را می‌توان به خواص ضدالتهابی این مایع نسبت داد.

از محدودیت‌های این مطالعه، عدم انجام تکنیک‌های ایمونوفلورسانس و وسترن بلات بود. انجام تکنیک‌های مذکور می‌توانست یافته‌های این مطالعه را از نظر بیان/عدم بیان و همچنین میزان بیان پروتئین‌های CCL3 و CCL4 در نخاع حیوانات پشتیبانی نماید. لذا در مطالعات آتی، انجام همزمان این تکنیک‌ها پیشنهاد می‌شود.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که اثرات ضد درد MSCs-CM در مدل درد نوروپاتی CCI تا حدودی بواسطه جلوگیری از افزایش بیان کموکاین CCL3 و به تبع آن کاهش التهاب اعمال می‌شود. هرچند، مطالعات بیشتری در رابطه با نقش کموکاین‌ها در ایجاد و توسعه درد نوروپاتی لازم است.

سپاسگزاری

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه دانشجویی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار می‌باشد.

References

1. Attal N, Bouhassira D, Baron R. Diagnosis and assessment of neuropathic pain through questionnaires. *Lancet Neurol* 2018; 17(5): 456-466.
2. Teng J, Mekhail N. Neuropathic pain: mechanisms and treatment options. *Pain Practice* 2003; 3(1): 8-21.
3. Jensen TS, Finnerup NB. Allodynia and hyperalgesia in neuropathic pain: clinical manifestations and mechanisms. *Lancet Neurol* 2014; 13(9): 924-935.
4. Liou JT, Lee CM, Day YJ. The immune aspect in neuropathic pain: role of chemokines. *Acta Anaesthesiol Taiwan* 2013; 51(3): 127-132.

کموکاین CCL3 احتمالاً می‌تواند از ایجاد درد نوروپاتی جلوگیری کرده و یا باعث تخفیف درد شود. مطالعه ما نیز با هدف آزمایش این فرضیه انجام شد که اثرات ضد درد MSCs-CM، احتمالاً از طریق جلوگیری و یا کاهش بیان برخی از کموکاین‌های مهم اعمال می‌شود. نتایج نشان داد که در حیوانات تیمار شده با MSCs-CM، بیان CCL3 به‌طور قابل ملاحظه‌ای کمتر از حیوانات دریافت کننده محیط کشت DMEM و سالین بود. به‌علاوه، از شدت آلودینیا و هایپرآلژیا نیز در گروه مذکور به صورت معنی‌داری کاسته شده بود (نتایج تست‌های رفتاری در مطالعه قبلی ما آورده شده است (13). بر این اساس، می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که مکانیسم‌های ضددردی MSCs-CM، تا قسمتی از طریق کاهش سطح بیان کموکاین CCL3 اعمال می‌شود.

مطالعه Pawlik و همکاران در 2020 تایید می‌کند که استفاده از آنتاگونیست گیرنده CCR1، از طریق کاهش اتصال لیگاند‌های CCL3 و CCL4 می‌تواند سبب کاهش فعال‌شدن میکروگلیاها، ماکروفاژها، نوتروفیل‌ها و لنفوسیت‌ها و متعاقباً کاهش تولید سایر کموکاین‌ها و سایتوکاین‌های پیش‌التهابی شده و در نتیجه باعث بهبود درد نوروپاتی و نیز افزایش خواص ضددردی مورفین و بوپرنورفین در آسیب عصبی مدل CCI شود (18). با این حال، در مطالعه ما MSCs-CM تاثیری بر میزان بیان کموکاین CCL4 نداشت. لذا به‌نظر می‌رسد اثرات ضد درد MSCs-CM تا حدودی از طریق کاهش بیان CCL3 و نه CCL4، میانجی‌گری می‌شود. البته مکانیسم‌های

5. Fernandes V, Sharma D, Vaidya S, PA S, Guan Y, Kalia K, et al. Cellular and molecular mechanisms driving neuropathic pain: recent advancements and challenges. *Expert Opin Ther Targets* 2018; 22(2): 131-142.
6. Saika F, Kiguchi N, Kobayashi Y, Fukazawa Y, Kishioka S. CC-chemokine ligand 4/macrophage inflammatory protein-1 β participates in the induction of neuropathic pain after peripheral nerve injury. *Eur J Pain* 2012; 16(9): 1271-1280.
7. Xu L, Zhang Y, Huang Y. Advances in the treatment of neuropathic pain. *Adv Exp Med Biol* 2016; 904: 117-129.
8. Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med* 2004; 8(3): 301-316.
9. Siniscalco D, Giordano C, Galderisi U, Luongo L, Alessio N, Di Bernardo G, et al. Intra-brain microinjection of human mesenchymal stem cells decreases allodynia in neuropathic mice. *Cell Mol Life Sci* 2010; 67(4): 655-669.
10. Watanabe S, Uchida K, Nakajima H, Matsuo H, Sugita D, Yoshida A, et al. Early transplantation of mesenchymal stem cells after spinal cord injury relieves pain hypersensitivity through suppression of pain-related signaling cascades and reduced inflammatory cell recruitment. *Stem Cells* 2015; 33(6): 1902-1914.
11. Madrigal M, Rao KS, Riordan NH. A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. *J Transl Med* 2014; 12: 260.
12. Pawitan JA. Prospect of stem cell conditioned medium in regenerative medicine. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 965849.
13. Masoodifar M, Hajihashemi S, Pazhoohan S, Nazemi S, Mojadadi MS. Effect of the conditioned medium of mesenchymal stem cells on the expression levels of P2X4 and P2X7 purinergic receptors in the spinal cord of rats with neuropathic pain. *Purinergic Signal* 2021; 17(1): 143-150.
14. Nazemi S, Manaheji H, Zaringhalam J, Sadeghi M, Haghparast A. Post-injury repeated administrations of minocycline improve the antinociceptive effect of morphine in chronic constriction injury model of neuropathic pain in rat. *Pharmacol Biochem Behav* 2012; 102(4): 520-525.
15. Ren K, Dubner R. Interactions between the immune and nervous systems in pain. *Nat Med* 2010; 16(11): 1267-1276.
16. Folgueras AR, Valdés-Sánchez T, Llano E, Menéndez L, Baamonde A, Denlinger BL, et al. Metalloproteinase MT5-MMP is an essential modulator of neuro-immune interactions in thermal pain stimulation. *Proc Natl Acad Sci* 2009; 106(38): 16451-16456.
17. Ochi-ishi R, Nagata K, Inoue T, Tozaki-Saitoh H, Tsuda M, Inoue K. Involvement of the chemokine CCL3 and the purinoceptor P2X7 in the spinal cord in paclitaxel-induced mechanical allodynia. *Mol Pain* 2014; 10: 53.
18. Pawlik K, Piotrowska A, Kwiatkowski K, Ciapała K, Popiolek-Barczyk K, Makuch W, et al. The blockade of CC chemokine receptor type 1 influences the level of nociceptive factors and enhances opioid analgesic potency in a rat model of neuropathic pain. *Immunology* 2020; 159(4): 413-428.
19. Nazemi S, Jafari F, Amin B, Gholami O, Kafami M, Mojadadi M-S. Effect of Umbelliprenin on antinociceptive activity of morphine in a rat model of neuropathic pain induced by chronic constriction injury of the

- sciatic nerve. *The Natural Products Journal* 2021; 11(3): 392-399.
20. Nazemi S, Rudsarabi H, Amin B, Farahani H, Zarmehri HA, Mojadadi M-S. Anti-neuropathic pain effects of ethyl acetate extract of *Ferula asafoetida* oleo-gum-resin in streptozotocin-induced diabetic rats. *The Natural Products Journal* 2021; 11(4): 546-552.