

بررسی اثر ضد آپوپتوزی والپروئیک اسید در مدل موشی ضایعه نخاعی

علی مردی^۱، دکتر علیرضا عبدانی‌پور^۲، دکتر علیرضا بیگلری^۳، دکتر رضا نجات بخش^۲

نویسنده‌ی مسئول: گروه علوم تشریح، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان abdani.anatomy@yahoo.com

دریافت: ۹۵/۶/۱۵ پذیرش: ۹۵/۹/۷

چکیده

زمینه و هدف: آسیب طناب نخاعی باعث از بین رفتن آکسون‌ها و مرگ سلول‌ها از طریق نکروز و آپوپتوز و در در نهایت منجر به اختلال در عملکرد حسی و حرکتی می‌گردد. هدف از تحقیق بررسی والپروئیک اسید بر روی مهار آپوپتوز و بهبود حرکتی در موش مدل ضایعه نخاعی بود. **روش بررسی:** برای ایجاد ضایعه نخاعی از مدل کانثیوژن استفاده شد. تعداد ۳۰ سر موش درای ضایعه نخاعی به‌طور مساوی به ۳ گروه لامینکتومی، درمان شده و درمان نشده تقسیم شدند. در گروه کنترل منفی هیچ تزریقی انجام نشد و در گروه درمان شده ۴۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن مدت یک هفته تزریق داخل صفاقی والپروئیک اسید انجام شد. گروه لامینکتومی نیز به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. بعد از ۲۸ روز موش‌ها کشته شدند و منطقه ضایعه دیده خارج شد و درصد سلول‌های آپوپتوتیک با روش تانل مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین درصد حفره ایجاد شده در ۴۲۰۰ میکرومتر طول ضایعه (در نواحی مرکزی، بالا و پایین‌تر از ضایعه) در هر نمونه مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمون رفتاری (BBB- test) به مدت ۴ هفته (روز سوم و پایان هر هفته) انجام شد. **یافته‌ها:** نتایج آزمون رفتاری نشان داد، نمره آزمون رفتاری گروه درمان شده در مقایسه با گروه درمان نشده به‌طور معناداری افزایش و میزان آپوپتوز کاهش یافت. همچنین درصد حفره ایجاد شده در گروه درمان شده به‌طور معناداری نسبت به گروه درمان نشده کاهش نشان داد. **نتیجه‌گیری:** یافته‌های ما نشان می‌دهد که والپروئیک اسید از سلول‌های عصبی حفاظت می‌کند و بطور موثر حرکات رفتاری را موش مدل ضایعه نخاعی بهبود می‌بخشد.

واژگان کلیدی: والپروئیک اسید، آسیب نخاعی، آپوپتوز

مقدمه

است منجر به از دست دادن کنترل مثانه و همچنین کاهش فعالیت‌های رفلکس روده شود (۲). در حال حاضر درمان قطعی برای آسیب نخاعی وجود ندارد و درمان‌های اخیر به کاهش عوارض ثانویه و همچنین افزایش عملکرد سلول‌های

ضایعه‌ی طناب نخاعی، بیماری ناتوان کننده‌ای است که اغلب منجر به ایجاد اختلالات حسی حرکتی می‌شود و اثرات جسمی و روانی بالایی به فرد، خانواده و جامعه تحمیل می‌کند (۱). با توجه به مکان آسیب، صدمات نخاعی ممکن

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک انسانی، گروه ژنتیک و پزشکی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان

۲- دکترای علوم تشریح، استادیار گروه علوم تشریح، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان

۳- دکترای ژنتیک انسانی، دانشیار گروه ژنتیک و پزشکی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان

باقی مانده محدود شده اند. با این حال درک بهتر پاتوفیزیولوژی آسیب نخاعی و شناسایی عوامل جلوگیری کننده از ترمیم منجر به درمان هدفمند این بیماری از طریق ترویج محافظت نورونی، بازسازی آکسون و سلول عصبی شده است (۳). مطالعات تجربی و بالینی نشان داده‌اند که به دنبال ایجاد صدمه‌ی نخاعی یک فرایند دو مرحله‌ای ایجاد می‌شود که شامل آسیب مکانیکی اولیه و آسیب ثانویه می‌باشد. آسیب اولیه شامل فشرده سازی مستقیم و آسیب عناصر و رگ‌های خونی است که پس از تروما رخ می‌دهد و آسیب ثانویه شامل آشناری از فرآیندهای بیوشیمی و سلولی مانند اختلالات الکترولیتی، تشکیل رادیکال‌های آزاد، ادم، واکنش التهابی، آپوپتوز یا مرگ برنامه ریزی شده سلولی می‌باشد (۱). مهار کننده‌های هیستون داستیلاز از جمله والپروئیک اسید به‌عنوان یک روند مداخله درمانی امیدوار کننده در اختلالات عصبی در نظر گرفته شده است (۴). والپروئیک اسید (VPA) احتمالاً از طریق مهار کردن هیستون داستیلازها و القای پروتئین‌های محافظتی می‌تواند به‌عنوان یک محافظ نورون در مدل‌های آسیب نخاعی به کار برده شوند (۴). از همین رو می‌توان از والپروئیک اسید به‌عنوان انتخاب مناسب در راستای ترمیم ضایعات نخاعی و بهبود بیماری‌های سیستم عصبی بهره برد.

روش بررسی

این مطالعه‌ی تجربی، با کد ZUMS.REC.1394.237 به تصویب کمیته‌ی اخلاق دانشگاه علوم پزشکی زنجان رسید و تمامی مراحل با رعایت اصول و مقررات آیین‌نامه کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب در دانشگاه انجام پذیرفت.

ایجاد ضایعه‌ی نخاعی مدل کانتیوژن: موش‌های صحرایی ماده، نژاد ویستار (Wistar) با وزن ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم انتخاب شدند و در سه گروه ۱۰ تایی مورد مطالعه قرار گرفتند: گروه درمان نشده (فقط عمل کانتیوژن انجام شد)، گروه درمان شده

(۴۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن حیوان اسید والپروئیک را به‌صورت تزریق داخل صفاقی به مدت یک هفته دریافت کردند) و گروه لامینکتومی پس از بیهوشی عمل لامینکتومی بر روی مهره‌های T12- L1 انجام و ضایعه Contusive با استفاده از روش Weight-Drop به کمک یک وسیله طراحی شده با رها کردن وزنه ۱۰ گرمی از ارتفاع ۲/۵ سانتی‌متری (روش [New York University]NYU) انجام شد. سپس محل ضایعه توسط عضلات و فاسیای پوشانده و در دو لایه بخیه زده شد (۵-۷). مراقبت‌های بعد از جراحی شامل تزریق ۵ میلی‌لیتر محلول رینگر لاکتات، ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم آنتی‌بیوتیک سفازولین و فشار دستی مثانه انجام شد (۸-۱۰).

تزریق والپروئیک اسید به طریق داخل صفاقی: گروه کنترل فقط داروهای ویژه مراقبت پس از جراحی را دریافت می‌کرد. گروه تیمار شده علاوه بر داروهای ذکر شده میزان ۴۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن حیوان اسید والپروئیک (Sigma UK) را به‌صورت تزریق داخل صفاقی به مدت یک هفته دریافت کردند. تزریق ۳ ساعت پس از جراحی آغاز گردید (۱۱).

ارزیابی رفتاری بر اساس آزمون BBB Test (Basso-Beattie-Bresnahan): برای مقایسه‌ی بهبود

حرکتی بین گروه‌های آزمایشی، ارزیابی رفتاری (BBB) انجام شد. این آزمون رفتاری به‌منظور بررسی میزان ناتوانی ایجاد شده در حیوان انجام می‌گیرد. در این آزمون امتیاز صفر به معنی فلج کامل و امتیاز ۲۱ به معنی راه رفتن نرمال است. برای این منظور هر موش در روزهای ۳، ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ پس از آسیب نخاعی به‌صورت جداگانه برای مدت چهار دقیقه در داخل یک ظرف پلاستیکی با قطر ۱۱۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۵۰ سانتی‌متر قرار گرفت و حرکات توسط دوربین دیجیتالی فیلم برداری و با استفاده از نرم افزار MGI video wave 5 توسط دو محقق بررسی و ارزیابی شد.

در نهایت از هر برش پنج ناحیه از ماده خاکستری (هر دو شاخ جلویی، هر دو شاخ عقبی و ناحیه‌ی اطراف کانال مرکزی) انتخاب و درصد سلول‌های مثبت محاسبه گردید.

بر اساس مطالعات انجام شده، متغیرهای مداخله‌گر نظیر وزن موش، جنسیت موش، وضعیت تغذیه و نژاد موش می‌توانست تأثیر مخدوش‌کنندگی برای این تحقیق داشته باشد. این عوامل در این تحقیق به حد اقل رسیده‌اند.

تجزیه و تحلیل آماری: این مطالعه از نوع تجربی (Experimental) بوده و تمامی بررسی‌های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS ۱۵ انجام پذیرفت و کلیه‌ی داده‌ها به صورت $SEM \pm Mean$ ارائه شد. مقایسه‌ی آماری بین گروه‌ها با استفاده از آزمون Anova (آزمون تعقیبی Tukeys post hoc test) و آزمون تی آزمون مستقل تجزیه و تحلیل و $P < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

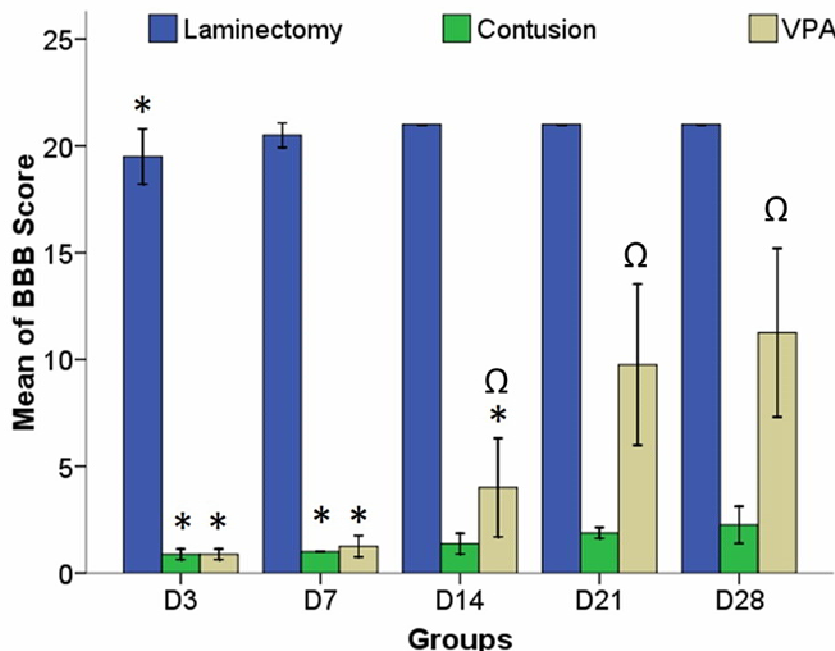
نتایج آزمون رفتاری (BBB Test): آزمون رفتاری در ۲ مرحله پیش آزمون و آزمون اصلی انجام شد. در مرحله‌ی پیش آزمون همه‌ی حیوانات سالم و دارای نمره ۲۱ بودند (در این آزمون نمره ۲۱ به معنی سلامت کامل و نمره صفر به معنی فلج کامل است). آزمون رفتاری به مدت ۴ هفته (روز سوم و پایان هر هفته) انجام شد. نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان داد در تمام گروه‌ها بعد از جراحی نمره آزمون رفتاری دچار کاهش موقت شد و این می‌تواند ناشی از آسیب عضلانی و درد ناشی از عمل جراحی باشد. نتایج نشان داد، گروه درمان شده با والپروئیک اسید نمره حرکتی از پایان هفته دوم افزایش می‌یابد و در پایان هفته چهارم (10.75 ± 1.06) بیشترین نمره‌ی حرکتی را به خود اختصاص می‌دهد که نسبت به گروه درمان نشده $((2.41 \pm 0.46))$ اختلاف معنی‌دار است (شکل ۱). نتایج بررسی درصد حفره ایجاد شده به دنبال ضایعه کانئوزن:

مطالعه‌ی مورفومتریکی (ریخت شناسی): بررسی‌های بافتی بعد از ۲۸ روز بعد از ایجاد ضایعه شروع گردید. بعد از بیهوشی کامل، پرفیوژن ترانس کاردیال توسط پارافرمالدئید ۴ درصد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. مناطق آسیب دیده جدا گردید و در پارافرمالدئید ۴ درصد به مدت ۱۲ ساعت فیکس شدند. برش‌هایی به ضخامت ۷ میکرومتر تهیه گردید و در پارافین قرار داده شد، سپس به وسیله‌ی کلروفرم پارافین زدایی گردید و با همتوکسیلین/اٹوزین رنگ آمیزی شد. جهت ارزیابی درصد حفره ایجاد شده و باقی مانده بافت از Image J software استفاده گردید. حجم کلی بافت و حفره بر حسب میلی‌متر مکعب در منطقه‌ای به طول ۴۲۰۰ میکرومتر از آسیب نخاعی برای هر نمونه مورد ارزیابی قرار گرفت. درصد حفره و بافت باقی مانده با استفاده از معادله $Vsp = a \times d$ (روش Cavalieri) محاسبه گردید. در فرمول V: حجم، a: عمق و d: مساحت می‌باشد (۱۲).

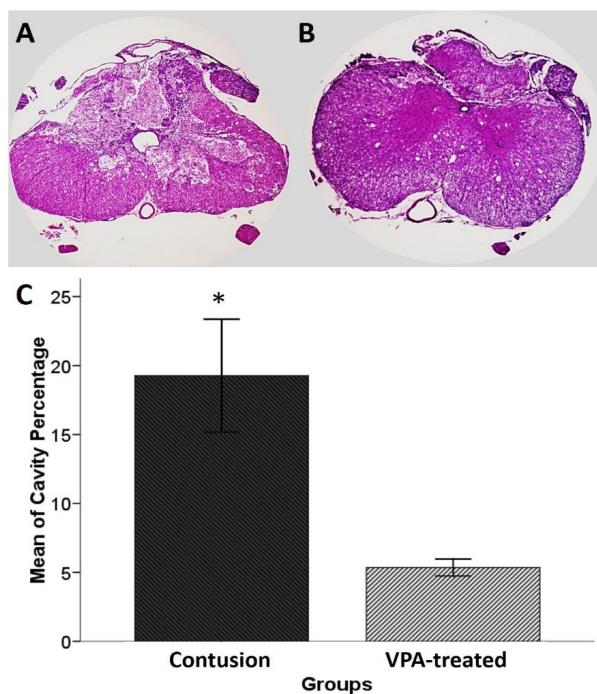
بررسی میزان آپوپتوز: جهت بررسی میزان آپوپتوز از روش TUNEL assay استفاده شد. به این منظور پس از دپارافینه کردن برش‌های بافتی با استفاده از انکوباسیون لام‌ها در دمای ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و با استفاده از زایلن شفاف سازی و با درجات مختلف الکل آب دهی می‌شوند. به منظور افزایش نفوذپذیری سلول‌ها از محلول Permeabilisation (تری‌تون ۰/۱ درصد در سرم ۱۰ درصد استفاده شد. برش‌های بافتی مطابق با دستورالعمل کیت (Roche) (In-Situ Cell Death Detection)، به مدت ۱ ساعت تحت تیمار با محلول Reaction mixture در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و محیط مرطوب قرار گرفتند. در مرحله بعد مقدار ۵۰ میکرولیتر محلول Converter-POD اضافه و مجدداً به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس سلول‌های تانل مثبت توسط میکروسکوپ فلورنسانس بررسی شد. به منظور تسهیل در بررسی، سلول‌ها توسط همتوکسیلین نیز رنگ‌آمیزی گردیدند.

درصد حفره ایجاد شده به دنبال ضایعه کانالیزاسیون ۲۸ روز پس از جراحی در گروه‌های مورد آزمون بررسی شد. تصاویر بافتی حضور حفره‌ای شبیه به تونل را در مکان ضایعه نشان داد که با توجه به مرگ سلولی و تخریب بافتی این تونل در گروه درمان نشده نسبت به گروه درمان شده با والپروئیک اسید از وسعت و پراکندگی بیشتری برخوردار بود (شکل ۲- A, B). بررسی‌های بافتی نشان داد که درصد حفره ایجاد شده بین گروه درمان شده با والپروئیک اسید ($5/35 \pm 0/3$) و درمان نشده ($19/2 \pm 2/04$) از لحاظ آماری دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشند (شکل ۲- C).

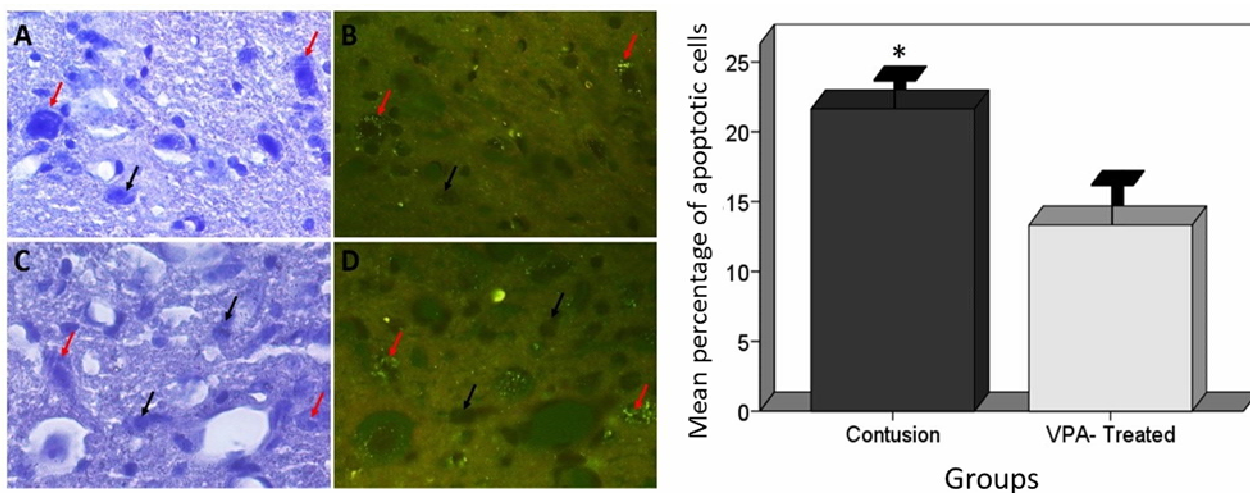
نتایج آزمون تانل: نتایج حاصل از آزمون تانل جهت ارزیابی اثر آنتی‌آپوپتوزی والپروئیک اسید در سلول‌های عصبی ناحیه آسیب دیده ناشی از آسیب نخاعی نشان داد که والپروئیک اسید منجر به کاهش آپوپتوز در سلول‌ها می‌شود. مقایسه درصد سلول‌های آپوپتوتیک در گروه درمان نشده ($23/89 \pm 2/05$) حاکی از وجود اختلاف معناداری بود که این امر نشان‌دهنده اثر حفاظتی والپروئیک اسید بر روی سلول‌های عصبی در برابر آپوپتوز می‌باشد (شکل ۳- A-E).



شکل ۱: نمودار مقایسه میانگین آزمون حرکتی بین گروه‌های لامینکتومی، درمان نشده و درمان شده با والپروئیک اسید؛ نمودار روند بهبود در گروه درمان شده نسبت به گروه‌های درمان نشده را نشان می‌دهد. گروه درمان شده (VPA) در روز سوم، هفتم و چهاردهم اختلاف معنی‌داری را با روز ۲۸ نشان می‌دهد. تعداد حیوانات در هر گروه ۱۰ سر می‌باشد و خطای معیار (SEM). آزمون Anova (آزمون تعقیبی Tukeys post hoc test) * نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با روز ۲۸ بعد از جراحی، Ω نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه درمان نشده (Contusion).



شکل ۲: نمودار درصد حفره ایجاد شده بین گروه‌های مختلف مورد آزمون در پایان هفته چهارم بعد از جراحی کانتیوژن. (A) گروه کانتیوژن (B) گروه والپروئیک اسید (C) مقایسه میانگین بین گروه‌های مختلف نشان می‌دهد که میانگین درصد حفره ایجاد شده در گروه درمانی دارای اختلاف معنی‌دار با گروه درمان نشده (Contusion) می‌باشد.



شکل ۳: نمودار مقایسه درصد سلول‌های تانل مثبت در گروه‌های مورد آزمون (A, C) تصاویر فاز کتراسست مربوط به گروه درمان شده با والپروئیک اسید (A) و درمان نشده یا کانتیوژن (C)؛ (B, D) تصاویر فلورسنت مربوط به گروه درمان شده (B) و درمان نشده (D). پیکان‌های سیاه نشان دهنده سلول‌های تانل منفی و پیکان‌های قرمز نشان‌دهنده سلول‌های تانل مثبت می‌باشند. (E) نمودار مقایسه درصد سلول‌های تانل مثبت در گروه درمان نشده با گروه درمان شده با والپروئیک اسید. * نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه درمان شده با والپروئیک اسید. ($P < 0.05$). بزرگنمایی تصویر ۴۰۰ برابر

بحث

یافته‌های حاصل از این مطالعه نشان داد که والپروئیک اسید باعث کاهش آپوتوز و بهبود رفتار حرکتی در گروه درمان می‌شود. والپروئیک اسید با کاهش آپوتوز باعث حفاظت از سلول‌های عصبی و کاهش علائم ثانویه ناشی از آسیب نخاعی می‌شود. آسیب نخاعی با تحلیل گسترده‌ی آکسون‌ها و همچنین ازدست رفتن تعدادی از نورون‌ها شروع شده و در نتیجه آن اختلال عملکرد نورون‌ها مشاهده می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند که پیشرفت آسیب نورونی و گسترش آسیب به نواحی بالاتر می‌تواند ناشی از ادامه تخریب سلولی از طریق مرگ سلولی به واسطه نکروز و آپوتوز باشد (۱۳). آپوتوز در جمعیت مختلف سلول‌های عصبی از جمله، الیگودندروسیت‌ها، میکروگلیا، و همچنین آستروسیت‌ها رخ می‌دهد که اغلب مرگ الیگودندروسیت‌ها در ماده‌ی سفید برای هفته‌ها پس از آسیب ادامه می‌یابد و ممکن است به دمیلینه شدن پس از آسیب کمک کند. علاوه بر این مکانیسم‌های مختلفی مانند عدم بروز پاسخ محافظتی موثر و یا عدم وجود واسطه‌های ترمیمی مانند نوروتروفین‌ها می‌توانند به تحلیل ثانویه بافت و از دست رفتن عملکرد نورون‌ها کمک کنند (۱۵ و ۱۴). علاوه بر این شواهدی مبنی بر فعال شدن مسیرهای داخل سلولی مهم شناخته شده مانند اجزای بالادست و پایین دست مسیر آپوتوزی کاسپاز ۳ وجود دارد که ابتدا این روند در نورون‌های محل ضایعه و سپس چند ساعت تا چند روز بعد از آن در الیگودندروگلیاهای موجود در مجاورت و دور از محل جراحی دیده می‌شود که باعث فعال شدن مسیرهای پیش آپوتوزی و در نتیجه افزایش آپوتوز می‌شود (۱۶).

شناسایی مکانیسم‌های آسیب‌های ثانویه از جمله آپوتوز، التهاب عصبی و استرس اکسیداتیو ممکن است یک استراتژی موثر برای مداخله‌ی درمانی و بهبود آسیب نخاعی باشد و منجر به یافتن روش‌های درمانی جدیدی برای بهبود

اختلالات عصبی از طریق محافظت نورونی شوند (۲). استفاده از مهارکننده‌های هیستون داستیلاز (HDACs) به عنوان یک ابزار درمانی برای اختلالات عصبی در دهه‌های گذشته مورد بررسی قرار گرفته است. مهارکننده‌های کلاس ۱ و ۲ HDACs روش‌های درمانی جدیدی برای درمان اختلالات عصبی، افسردگی و اضطراب، و کاهش ادراک ناشی از اختلالات عصبی می‌باشند. نقش مهارکننده‌های HDAC در اختلالات عصبی، برای اولین بار با تاثیر بهبود بخش آنها بر علائم بیماری هانتینگتون مشخص شد (۱۷). والپروئیک اسید یک داروی تجویز شده برای درمان طیف گسترده‌ای از اختلالات عصبی و روانی از جمله تشنج، درد نوروپاتی و اختلالات دو قطبی (Bipolar) است که اثرات موثر محافظت نورونی آن برای انواع بیماری‌های عصبی، از جمله آتروفی عضلانی نخاعی، انسداد شریان مغزی گذرا یا دائم، خونریزی داخل مغزی و آسیب‌های مغزی اثبات شده است (۴). علاوه بر این نشان داده شده است که VPA با فعال کردن مسیرهای انتقال پیام NFkB، واسطه‌ی حفاظت و ترمیم نورون‌ها را فراهم کرده و همچنین از عوامل بازدارنده پروآپتوتیک است. آسیب نخاعی باعث مرگ گسترده‌ای از سلول‌ها شده و با ادامه تخریب سلولی از طریق نکروز و مرگ برنامه ریزی شده طولانی مدت منجر به پیشرفت آسیب نورونی می‌گردد (۱۸). در این مطالعه اثر والپروئیک اسید بر بازیابی عملکرد حرکتی و میزان مرگ برنامه ریزی شده و حفره ایجاد شده ناشی از ضربه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این مطالعه تأییدی بر آزمایشات پیشین در ارتباط با اثر حفاظتی والپروئیک اسید در برابر آپوتوز می‌باشد. پتانسیل درمانی VPA در مدل‌های موشی با آسیب نخاعی و همچنین بیماری‌های عصبی دیگر نیز در مطالعات متعددی تایید شده است به عنوان مثال دینس لاگنس و همکارانش در سال ۲۰۰۴ مکانیسم عمل VPA را در درمان اختلال دو قطبی بررسی کرده و نشان دادند که تزریق همزمان VPA و لیتیوم باعث

والپروئیک اسید بر روی بهبود عملکرد حرکتی موش‌های ضایعه‌ی نخاعی توسط عبدانی پور و همکارانش نیز مورد مطالعه قرار گرفت. در این مطالعه تزریق والپروئیک اسید به میزان ۴۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن موش به روش داخلی صفاقی انجام شد. میزان بیان نوروتروفین‌ها نشان داد که تجویز والپروئیک اسید باعث افزایش فاکتورهای رشد عصبی، کاهش پیشرفت آسیب ثانویه و بهبود در نمره آزمون رفتاری و همچنین بازسازی سریع‌تر آسیب نخاعی می‌شود (۲۴). یو و همکارانش نیز ارتباط میان تغییرات بافتی و بهبود عملکردی ناشی از آسیب نخاعی را در مدل‌های موشی درمان شده با والپروئیک را مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه اثرات ناشی از دو هفته تزریق VPA با دوز میلی‌گرم بر کیلوگرم ۲۰۰ در ۷ روز پس از ضایعه مورد بررسی قرار گرفت. بررسی‌ها نشان داد که نمرات آزمون BBB در گروه آزمون به‌طور قابل توجهی نسبت به گروه‌های کنترل بالاتر است (۲۵). لی و همکارانش نشان دادند که والپروئیک اسید باعث کاهش بیان واسطه‌های التهابی از جمله فاکتور نکروز دهنده‌ی توموری آلفا و مهار فعال سازی کاسپاز ۳، می‌شود که این امر موجب کاهش حجم ضایعه و بهبود عملکرد پس از آسیب می‌شود (۲۶).

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از والپروئیک اسید منجر به بهبود حرکت در موش صحرایی می‌شود و همچنین اثرات نوروپروتکتیو این دارو موجب کاهش میزان آپوپتوز و کاهش میزان حفره ایجاد شده می‌شود. بنابراین والپروئیک اسید انتخاب مناسب در راستای ترمیم ضایعات نخاعی است.

تشکر و قدردانی

این مقاله قسمتی از پایان نامه کارشناسی ارشد مصوب در دانشگاه علوم پزشکی زنجان می‌باشد و با حمایت مالی

جولوگیری از بیان ژن‌های پیش آپوپتوزی در سلول‌های عصبی می‌شوند و با افزایش بیان ژن‌های Bcl-2 و BDNF در محافظت نورون‌ها نقش دارند (۱۹). تی سالی و همکارانش نیز عملکرد والپروئیک اسید را در درمان مدل موش‌های مبتلا به SMA نوع III مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه، موش SMA درمان شده با VPA نسبت به موش SMA درمان نشده عملکرد حرکتی بهتر، تحلیل کمتر نورون‌های نخاعی، آتروفی عضلانی کمتر و اتصال عصبی - عضلانی بهتری را نشان داد (۲۰). باربرا مونتی و همکارانش نشان دادند که تجویز VPA طی ۴ هفته به موش صحرایی منجر به مهار قابل توجهی از فعالیت هیستون داستیلاز و در نتیجه افزایش استیلاسیون هیستون H3 در بافت مغز از مدل حیوانی بیماری پارکینسون می‌شود همچنین نتایج حاصله نشان داد که درمان با VPA به‌طور قابل توجهی مانع مرگ سلول‌های عصبی می‌شود (۲۱). از طرف دیگر به عقیده‌ی گیونز، والپروئیک اسید اثر سمی در سلول‌های میکروگلیال دارد. با توجه به نقش متنوع میکروگلیا در مغز، تغییرات ناشی از VPA در فنوتیپ میکروگلیال احتمالاً می‌تواند اثرات عمده‌ای بر عملکرد فیزیولوژیک و پاتولوژیک این سلول‌ها داشته باشد (۲۲). علی رغم نتایج ارزشمندی که تاکنون از بررسی اثرات درمانی والپروئیک اسید بر بهبودی رفتارهای حرکتی در ضایعات عصبی به‌دست آمده است، مکانیسم عمل آن چندان شناخته شده نیست. مطالعات موجود نشان داده‌اند که VPA بر استیلاسیون هیستون‌ها، آپوپتوز و رفتار نورون‌ها تاثیر معناداری دارد. مطالعات نشان داده است که تزریق والپروئیک اسید به‌طور قابل توجهی مانع از کاهش AC-H3 و AC-H4، Bcl-2 و در نهایت منجر به پیشرفت در بازیابی تحرک می‌شود. همچنین والپروئیک اسید باعث کاهش مهارکننده Nogo-A، کاهش فعالیت کاسپاز ۳ و مهار آپوپتوز می‌شود (۲۳). تاثیر والپروئیک اسید بر بهبود بخشی رفتارهای حرکتی در مطالعات متعددی مورد تایید قرار گرفته است. اثر

دکتر تینا شاهانی و جناب آقای دکتر مهرداد پدرام که در انجام این تحقیق نهایت همکاری و راهنمایی را داشتند، کمال تشکر و قدردانی را دارند.

معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه و در آزمایشگاه تحقیقات فناوری نوین پزشکی دانشگاه علوم پزشکی زنجان انجام شده است. نویسندگان مقاله از حمایت‌های بی‌دریغ سرکار خانم

References

- 1- Di Paola R, Impellizzeri D, Salinaro AT, et al. Administration of carnosine in the treatment of acute spinal cord injury. *Biochem Pharmacol*. 2011; 82: 1478-89.
- 2- Jia Z, Zhu H, Li J, Wang X, Misra H, Li Y. Oxidative stress in spinal cord injury and antioxidant-based intervention. *Spinal Cord*. 2012; 50: 264-74.
- 3- Ramer LM, Ramer MS, Bradbury EJ. Restoring function after spinal cord injury: towards clinical translation of experimental strategies. *The Lancet Neurology*. 2014; 13: 1241-56.
- 4- Lv L, Sun Y, Han X, Xu C-c, Tang Y-P, Dong Q. Valproic acid improves outcome after rodent spinal cord injury: potential roles of histone deacetylase inhibition. *Brain Res*. 2011; 1396: 60-8.
- 5- Ohta M, Suzuki Y, Noda T, et al. Bone marrow stromal cells infused into the cerebrospinal fluid promote functional recovery of the injured rat spinal cord with reduced cavity formation. *Experiment Neurol*. 2004; 187: 266-78.
- 6- Chiu CW, Huang WH, Lin SJ, et al. The immunomodulator decoy receptor 3 improves locomotor functional recovery after spinal cord injury. *J Neuro Inflamm*. 2016; 13: 1.
- 7- Cheriyan T, Ryan D, Weinreb J, et al. Spinal cord injury models: a review. *Spinal Cord*. 2014; 52: 588-95.
- 8- Ankeny DP, McTigue DM, Jakeman LB. Bone marrow transplants provide tissue protection and directional guidance for axons after contusive spinal cord injury in rats. *Experiment Neurol*. 2004; 190: 17-31.
- 9- Chopp M, Zhang XH, Li Y, et al. Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation. *Neuroreport*. 2000; 11: 3001-5.
- 10- Krishna V, Andrews H, Jin X, et al. A contusion model of severe spinal cord injury in rats. *J Vis Exp*. 2013; 78: e50111-e.
- 11- Dash PK, Orsi SA, Zhang M, et al. Valproate administered after traumatic brain injury provides neuroprotection and improves cognitive function in rats. *PloS one*. 2010; 5: e11383.
- 12- Pal R, Gopinath C, Rao NM, et al. Functional recovery after transplantation of bone marrow-derived human mesenchymal stromal cells in a rat model of spinal cord injury. *Cytotherapy*. 2010 ; 12: 792-806.
- 13- Sala F. Intraoperative neurophysiology is here to stay. *Child's Nervous System*. 2010; 26: 413-7.
- 14- Jones LL, Oudega M, Bunge MB, Tuszynski MH. Neurotrophic factors, cellular bridges and

- gene therapy for spinal cord injury. *J Physiol.* 2001; 533: 83-9.
- 15- Klopstein A, Santos-Nogueira E, Francos-Quijorna I, et al. Beneficial effects of α B-crystallin in spinal cord contusion injury. *J Neuro Sci.* 2012; 32: 14478-88.
- 16- Springer JE, Azbill RD, Knapp PE. Activation of the caspase-3 apoptotic cascade in traumatic spinal cord injury. *Nature Med.* 1999; 8: 943-6.
- 17- Abel T, Zukin RS. Epigenetic targets of HDAC inhibition in neurodegenerative and psychiatric disorders. *Curr Opinion Pharmacol.* 2008; 8: 57-64.
- 18- Lee JY, Maeng S, Kang SR, Choi HY, Oh TH, Ju BG, et al. Valproic acid protects motor neuron death by inhibiting oxidative stress and endoplasmic reticulum stress-mediated cytochrome C release after spinal cord injury. *J Neurotrauma.* 2014; 31: 582-94.
- 19- Lagace DC, O'Brien WT, Gurvich N, Nachtigal MW, Klein PS. Valproic acid: how it works. Or not. *Clin Neuro Sci Res.* 2004; 4: 215-25.
- 20- Tsai LK, Tsai MS, Ting CH, Li H. Multiple therapeutic effects of valproic acid in spinal muscular atrophy model mice. *J Molec Med.* 2008; 86: 1243-54.
- 21- Monti B, Gatta V, Piretti F, Raffaelli SS, Virgili M, Contestabile A. Valproic acid is neuroprotective in the rotenone rat model of Parkinson's disease: involvement of α -synuclein. *Neurotoxicity Res.* 2010; 17: 130-41.
- 22- Gibbons HM, Smith AM, Teoh HH, et al. Valproic acid induces microglial dysfunction, not apoptosis, in human glial cultures. *Neurobiology of disease.* 2011; 41: 96-103.
- 23- Lv L, Han X, Sun Y, Wang X, Dong Q. Valproic acid improves locomotion in vivo after SCI and axonal growth of neurons in vitro. *Experiment Neurol.* 2012; 233: 783-90.
- 24- Abdanipour A, Schluesener HJ, Tiraihi T. Effects of valproic acid, a histone deacetylase inhibitor, on improvement of locomotor function in rat spinal cord injury based on epigenetic science. *Iran Bio Med J.* 2012; 16: 90-100.
- 25- Yu SH, Cho DC, Kim KT, Nam KH, Cho HJ, Sung JK. The neuroprotective effect of treatment of valproic acid in acute spinal cord injury. *J Korean Neuro Surg Soc.* 2012; 51: 191-8.
- 26- Lee JY, Kim HS, Choi HY, Oh TH, Ju BG, Yune TY. Valproic acid attenuates blood-spinal cord barrier disruption by inhibiting matrix metalloprotease - 9 activity and improves functional recovery after spinal cord injury. *J Neuro Chem.* 2012; 121: 818-29.

Evaluation of Antiapoptotic Effect of Valproic Acid on Rat Model of Spinal Cord Injury

Mardi A¹, Abdanipour AR², Biglari AR¹, Nejatbakhsh R²

¹Dept. of Genetics and Molecular Medicine, Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran.

²Dept. of Anatomy, School of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran.

Corresponding Author: Abdanipour AR, Dept. of Anatomy, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran.

E-mail: abdari.anatomy@yahoo.com

Received: 5 Sep 2016 **Accepted:** 27 Nov 2016

Background and Objective: Spinal cord injury (SCI) leads to the loss of axons and cell death via necrosis and apoptosis, eventually resulting in sensory and motor dysfunction. The aim of this study was to evaluate the effects of valproic acid on the inhibition of apoptosis and the improvement of motor function in the rat model of spinal cord injury.

Materials and Methods: Contusion model was used to induce SCI. Thirty contused rats were equally divided into three groups, laminectomy, cured and not cured, the negative control group did not receive any injections but the treatment group received valproic acid (400 mg/kg intraperitoneally) daily for one week. The laminectomy group was considered as a positive control. Rats were killed 28 days post injury and their damaged spinal cord was removed and examined for apoptotic positive cells using TUNEL-assay. Also, the cavity volume (mm³) percentage at 4200 µm length of the spinal cord (including rostral and caudal regions from the injury epicenter) was assessed for each sample. Subsequently, behavioral testing (BBB test) was performed for 4 weeks (the third and final day per week).

Results: The results of BBB-open-field locomotor score showed a significant improvement in the group that was treated with valproic acid relative to the untreated group. The results acquired from TUNEL-assay showed that the apoptosis rate in the valproic acid treated rats was significantly decreased compared to the control group. Also, the percentage of cavity volume in the valproic acid treated group compared to the control (untreated) group showed a significant decrease.

Conclusion: Our findings showed that Valproic acid protects neural cells and effectively ameliorates locomotor function in SCI rats.

Keywords: Valproic acid, Spinal cord injury, Apoptosis