

## کاهش فعالیت میکروگلیا و ماکروفاژها بعد از تجویز سیتامیک والپروئیک اسید به عنوان یک مهار کننده دی استیلاسیون هیستونی

علی رضا عبدانی پور<sup>۱</sup> Ph.D.\*، تقی طریحی<sup>۲</sup> Ph.D.، سیده مهسا خانمی<sup>۳</sup> M.Sc.

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل، دانشکده پزشکی، آزمایشگاه سلول‌های بنیادی، اردبیل، ایران

۲- مرکز تحقیقات علوم و اعصاب شفا، بیمارستان خاتم الانبیا، تهران، ایران

۳- دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، اردبیل، ایران

\* پست الکترونیک نویسنده مسئول: [abdani.anatomy@yahoo.com](mailto:abdani.anatomy@yahoo.com)

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۸/۱۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۶/۱۵

### چکیده

**هدف:** از این مطالعه بررسی تاثیر اسید والپروئیک به عنوان مهار کننده دی استیلاسیون هیستونی در کاهش فعالیت میکروگلیا/ماکروفاژها و تخریب بافت عصبی بعد از ایجاد ضایعه نخاعی در موش صحرایی می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** برای ایجاد ضایعه نخاعی مدل کانتیون مورد استفاده قرار گرفت. تعداد ده عدد موش صحرایی دارای ضایعه نخاعی به طور مساوی به دو گروه تقسیم شدند: در گروه کنترل هیچ تزریقی انجام نشد و در گروه درمان شده موش‌ها به میزان ۴۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن برای مدت دو هفته تزریق داخل صفاقی اسید والپروئیک انجام شد. ۲۸ روز بعد از ضایعه موش‌ها کشته شدند و نخاع ضایعه دیده خارج شد و درصد سلول‌های ED-1، H3 و OX-42 مثبت با روش ایمونوهیستوشیمی مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین درصد حجمی حفره ایجاد شده در ۴۲۰۰ میکرومتر طول ضایعه (در نواحی مرکزی، بالا و پایین تر از ضایعه) در هر نمونه مورد ارزیابی قرار گرفت.

**نتایج:** نتایج به دست آمده، افزایش استیلاسیون پروتئین هیستونی (H4) و کاهش فعالیت میکروگلیاها/ماکروفاژها را در محل ضایعه نشان می‌دهد. همچنین درصد حفره تشکیل شده در گروه درمان شده با اسید والپروئیک نسبت به گروه کنترل (درمان نشده) کاهش معنی‌داری را نشان داد.

**نتیجه‌گیری:** تجویز اسید والپروئیک در مراحل اولیه مدل ضایعه نخاعی نقش موثری را در کاهش فعالیت میکروگلیا/ماکروفاژها و کاهش آسیب بافت عصبی ایفا می‌کند.

**واژگان کلیدی:** آسیب نخاعی، اسید والپروئیک، اپی ژنتیک، التهاب

## مقدمه

با توجه به پیشرفت‌های فراوان در زمینه دارویی و تکنیک‌های جراحی، ضایعه نخاعی (Spinal Cord Injury (SCI همچنان به‌عنوان یک مسئله پیچیده در علم پزشکی مطرح می‌شود. در این مطالعه با توجه به علم اپی ژنتیک به بررسی تأثیرات ناشی از تزریق اسید والپروئیک (Valproic acid) در درمان ضایعه نخاعی مدل کانتیوژن پرداخته می‌شود. اسید والپروئیک با مهار آنزیم‌های دی‌استیلاز باعث افزایش استیلاسیون در پروتئین‌های هیستونی، تغییر ساختار کروموزوم و تغییر بیان ژن‌ها می‌شود (۱ و ۲). در مراحل اولیه ضایعه نخاعی ارتباطات عصبی قطع می‌شود و در طول چند ساعت به‌دلیل بروز واکنش‌های التهابی و حضور ماکروفاژها، لنفوسیت‌های T وابسته به تیموس، مونوسیت‌ها و فعال شدن میکروگلیاهای مقیم در بافت نخاعی علائم تشدید می‌شوند و در طی روزها و هفته‌ها ادامه خواهد داشت. حضور سلول‌های ایمنی در ناحیه به دلیل آسیب موقتی به سدهای (خونی- مغزی) و (خونی- نخاعی) می‌باشد. التهاب و گسترش حفره در مراحل اولیه نقش تعیین کننده‌ای را در مرحله ثانویه دارد. نوتروفیل‌ها در ساعات اول آسیب در محل ضایعه تجمع می‌یابند و به‌تدریج در اواخر هفته اول از محل ضایعه پاکسازی می‌شوند. فاز اول آسیب نخاعی شامل ترشح سیتوکین‌های التهابی همانند IL\_1، IL\_6 و TNF\_ از سلول‌های آسیب دیده و میکروگلیاها/ماکروفاژها می‌باشد، که باعث افزایش نفوذپذیری رگ‌ها و شروع آبشاری از واکنش‌های التهابی در محل ضایعه می‌شوند (۳). ماکروفاژها و لنفوسیت‌ها غلاف میلین را در سلول‌های سالم تخریب می‌کنند، همچنین سلول‌های گلایالی و الیگودندروسیت‌ها دچار مرگ آپوپتوزیس می‌شوند. این علائم در مراحل بعدی با ایسکمی (Ischemia)، ادم (Edema) و خون‌ریزی در منطقه همراه است. کلیه اتفاقاتی که در منطقه آسیب دیده رخ می‌دهد در مجموع باعث وخیم‌تر شدن علائم بیماری می‌شوند. درنهایت سلول‌های گلایالی باقی مانده در منطقه فعال می‌شوند و با ترشح فاکتورهای رشد نوروئی به ترمیم مکان ضایعه و ایجاد بافت جوشگاهی (Glial scar) در اطراف حفره مرکزی کمک می‌کنند (۴). واکنش‌های التهابی که بعد از ضایعه نخاعی ایجاد می‌شوند یکی از مهم‌ترین عوامل کاهش رشد اکسون‌ها و ایجاد علائم ناتوانی حرکتی می‌باشند (۵). والپروئیک اسید یک زنجیره کوتاه از اسید چرب می‌باشد. تا مدت‌های

طولانی تصور بر این بود مکانیسم عمل این دارو در ارتباط با مسیرهای انتقال دهنده‌های عصبی می‌باشد، اما شواهدی وجود دارد که نشان‌دهنده اثر این دارو بر روی رشد، تمایز و آپوپتوزیس سلول‌ها می‌باشد (۶). والپروئیک اسید در مدل‌های حیوانی باعث رشد زواید عصبی (۷)، بازآرایی آکسونی (۸) و نورون‌زایی در هیپوکامپ (۹) می‌شود. علاوه بر این بر روی بیان ژن در سطح مولکولی و اپی ژنتیک نیز موثر است. از والپروئیک اسید جهت درمان بیماری‌هایی مثل صرع و اختلال دو قطبی نیز استفاده می‌گردد (۱۰ و ۱۱). داروهای مهارکننده آنزیم هیستون دی استیلاز مانند والپروئیک اسید به‌عنوان داروهای حمایت کننده سیستم عصبی (Neuroprotective) محسوب می‌شوند. فعالیت‌های مختلف سلولی مثل ترمیم DNA و بیان ژن در التهاب و تکثیر سلولی به‌وسیله استیله شدن هیستون تنظیم می‌شود (۱۲). فعالیت میکروگلیا/ماکروفاژها به‌وسیله بررسی میزان ED-1 (پروتئین لیزوزومی) و OX-42 (نشانگر فعالیت میکروگلیا/ماکروفاژها) تعیین می‌شود (۱۳ و ۱۴). با توجه به یافته‌های محققین مشخص گردیده است که عوامل آزاد شده توسط سلول‌های التهابی عمل کرد سد خونی- مغزی را تنظیم می‌کند (۱۵). همچنین هنگام آسیب نخاعی میزان استیلاسیون هیستون کاهش می‌یابد (۱۶). با توجه به ویژگی‌های یاد شده برای والپروئیک اسید به‌عنوان مهار کننده آنزیم هیستون دی استیلاز و لزوم کاهش التهاب در مراحل اولیه آسیب نخاعی اثر این دارو روی موش صحرایی مدل آسیب نخاعی مورد بررسی قرار گرفته است.

## مواد و روش‌ها

در این تحقیق تجربی از تعداد ۱۰ عدد موش صحرایی ماده بالغ نژاد Sprague-Drawly در ۲ گروه (گروه‌های ۵ تایی) با وزن ۲۰۰ الی ۳۰۰ گرم (خریداری شده از مرکز تحقیقات رازی) استفاده شد. این گروه‌ها عبارتند از: ۱- درمان نشده: تنها عمل کانتیوژن Contusion در آنها انجام شد. ۲- درمان شده: ۳ ساعت بعد از عمل کانتیوژن به‌میزان ۴۰۰ میلی گرم به‌زای هر کیلوگرم وزن، اسید والپروئیک (Sigma UK) به‌صورت داخل صفاقی تا ۱۴ روز دریافت کردند. مراقبت و نگهداری از موش‌ها مطابق با آیین نامه مصوب کار با حیوانات آزمایشگاهی تصویب شده دانشگاه تربیت مدرس (تهران) انجام گردید.

(۱۰ درصد سرم خوکی در TBS/BSA) به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شده سپس با آنتی بادی‌های اولیه anti-H4 (1:100, ) (Millipore) و anti-ED-1 (1:200, Sigma) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به یک شبانه روز انکوبه گردید. در ادامه برش‌ها با Avidin-biotin-HRP (ABC kit) پردازش گردید و از Diaminobenzidine (DAB) به‌عنوان کروموژن استفاده شد. برای بررسی OX-42 بعد از انکوبه کردن با آنتی بادی اولیه به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و پس از آن شستشو با بافر توسط آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه به Fluorescein Isothiocyanide (FITC) انکوبه شد و در زیر میکروسکپ فلورسنس مشاهده گردید. به‌منظور شمارش سلولی از اتیديوم بروماید و همتوکسیلین استفاده شد. تصاویر با بزرگنمایی ۲۰۰ برابر تهیه شد و جهت ارزیابی درصد پیکسل‌های و تعداد سلول‌های مثبت به‌ازای هر منطقه از نرم افزار ImageJ استفاده گردید. به‌منظور بررسی سلول‌های OX-42 مثبت و H4 مثبت، سه نمونه از هر گروه مورد ارزیابی قرار گرفت و در هر نمونه منطقه ضایعه و مناطق بالاتر و پایین‌تر نسبت به آن برای ارزیابی در نظر گرفته شد. از هر ناحیه برش‌هایی با ضخامت ۷ میکرومتر تهیه شد و در هر برش ۵ ناحیه (هر دو شاخ جلویی، هر دو شاخ عقبی و ناحیه مرکزی نخاع) مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی میانگین درصد پیکسل‌های مثبت در واحد سطح محاسبه شد.

**آنالیز آماری:** آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار SPSS 15.0 انجام گردید و تمامی داده‌ها به‌صورت  $\pm$  SEM ارائه شد. مقایسه آماری بین گروه‌ها با استفاده از *Independent sample t test* انجام شد و  $P < 0.05$  معنی‌دار در نظر گرفته شد.

### نتایج

بررسی درصد حفره ایجاد شده به دنبال ضایعه کانتیوژن درصد حفره ایجاد شده به‌دنبال ضایعه کانتیوژن 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 ۱، A و B). بررسی‌های بافتی نشان داد که میانگین درصد حفره ایجاد شده بین گروه

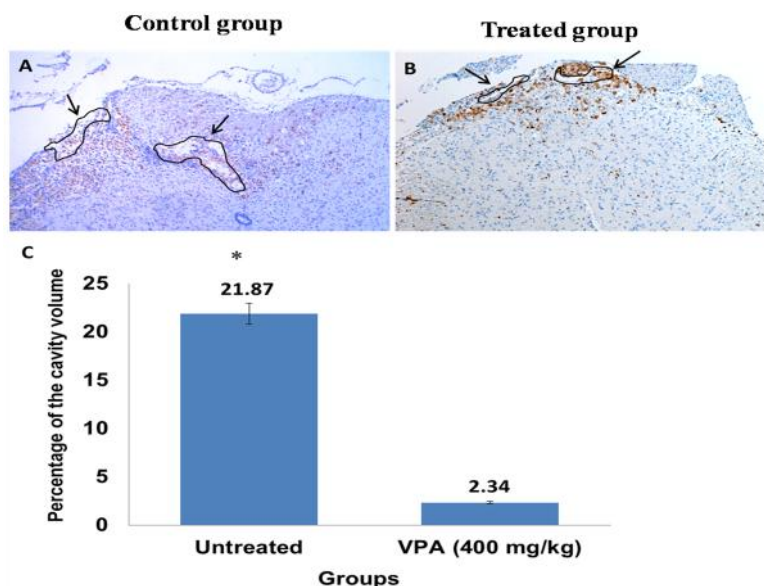
**عمل جراحی کانتیوژن:** پس از بی‌هوشی عمل لامینکتومی بر روی مهره‌های L1-T12 انجام و ضایعه Contusive با استفاده از روش Weight-Drop به کمک یک وسیله طراحی شده با رها کردن وزنه ۱۰ گرمی از ارتفاع ۲/۵ سانتی‌متری (روش New York University [NYU]) انجام شد. سپس محل ضایعه توسط عضلات و فاسیایا پوشانده و در دو لایه بخیه زده شد (۱۴). مراقبت‌های بعد از جراحی شامل تزریق ۵ میلی‌لیتر محلول رینگر لاکتات، ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم آنتی بیوتیک سفازولین (شرکت دارو سازی جابر ابن حیان) و فشار دستی مثانه انجام شد (۱۵).

**تزریق داخل صفاقی والپروئیک اسید:** گروه کنترل فقط داروهای ویژه مراقبت پس از جراحی را دریافت می‌کرد. گروه تیمار شده علاوه بر داروهای ذکر شده میزان ۴۰۰ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن حیوان اسید والپروئیک را به‌صورت تزریق داخل صفاقی به مدت ۲ هفته دریافت کردند. تزریق ۳ ساعت پس از جراحی آغاز گردید.

**ارزیابی بافتی:** بررسی‌ها 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 به‌وسیله پردازشگر بافتی (Leica TP1020) تهیه گردید و در پارافین قرار داده شد، سپس بوسیله کلروفرم پارافین‌زدایی گردید و با همتوکسیلین/ائوزین رنگ آمیزی گردید (۱۶). جهت ارزیابی درصد حفره ایجاد شده و باقی مانده بافت از ImageJ software استفاده گردید. حجم کلی بافت و حفره بر حسب میلی‌متر مکعب ( $\text{mm}^3$ ) در منطقه‌ای به‌طول  $4200$  میکرومتر از آسیب نخاعی برای هر نمونه مورد ارزیابی قرار گرفت. درصد حفره و بافت باقی‌مانده با استفاده از معادله  $V_{sp} = a \times d$  (روش Cavalieri) محاسبه گردید. در فرمول  $V$ : حجم،  $a$ : عمق و  $d$ : مساحت می‌باشد (۱۷).

**ایمونوهیستوشیمی:** برش‌های بافتی به‌وسیله کلروفرم پارافین‌زدایی گردید. سپس با اتانول ۱۰۰، ۹۶ و ۷۰ درصد و آب مقطر هیدراته می‌گردد. پراکسیداز درونی به‌وسیله غوطه‌ور کردن برش‌ها در محلول ۰/۳ درصد هیدروژن پراکسید در متانول به مدت ۱۵ دقیقه غیرفعال گردید. برش‌ها در محلول Blocking

درمانی (۲/۳۴ ± ۰/۷۱) و درمان نشده (۲/۱۲ ± ۲۱/۸۷) از لحاظ آماری دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشند ( $P < ۰/۰۵$ ) (شکل ۱، C).

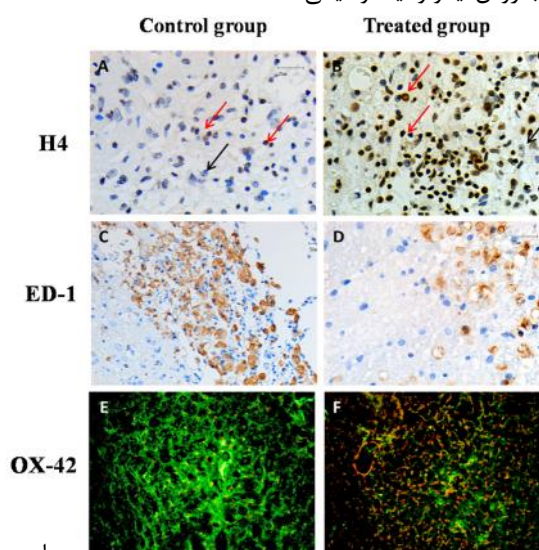


شکل ۱: مقایسه میانگین درصد حفره ایجاد شده در گروه‌های مورد آزمون. میکروگراف‌ها نشان دهنده حفره (Cavitation) در گروه درمان نشده (A) و درمان شده (B) بعد از ۲۸ روز می‌باشند. (C): نمودار درصد حفره ایجاد شده بین گروه‌های مورد آزمون بعد از ۲۸ روز در ۴۲۰۰ میکرومتر نخاع آسیب دیده. مقایسه اختلاف میانگین بین دو گروه نشان می‌دهد که میانگین درصد حفره ایجاد شده در گروه درمان شده با ۴۰۰ میلی‌گرم والپروئیک اسید دارای اختلاف معنی‌داری با گروه درمان نشده می‌باشد. پیکان‌های سیاه رنگ نشان دهنده کویته در هر دو میکروگراف می‌باشند. خطای معیار (SEM)، نشان دهنده اختلاف معنی‌داری بین گروه درمان شده با والپروئیک اسید و گروه درمان نشده (کنترل). ( $P < ۰/۰۵$ ), (بزرگنمایی ۴۰×).

### ارزیابی نشانگرهای میکروگلیا/ماکروفاژی

منظور با استفاده از نرم افزار ImageJ پیکسل‌های مثبت در هر فیلد مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل در شکل ۲ تصاویر C الی F نمایش داده شده است. رنگ آمیزی پروتئین ED-1 (پیکسل‌های قهوه‌ای) نشان از کاهش میزان این پروتئین در گروه‌های درمان شده در مقایسه با گروه درمان نشده است (شکل ۲، C و D).

جهت بررسی تاثیر والپروئیک اسید بر روی فعالیت میکروگلیا/ماکروفاژی در منطقه آسیب دیده از ED-1 (نشانگر لیزوزومی و نشان‌دهنده فعالیت میکروگلیاها در محل ضایعه) و OX-42 (نشانگر فعالیت ماکروفاژهای مهاجر در محل ضایعه) با روش ایمونوهیستوشیمی استفاده شد.



شکل ۲: بررسی ایمونوهیستوشیمی استیلاسیون هیستونی و دو نشانگر فعالیت میکروگلیا/ماکروفاژی: میکروگراف‌های (A و B) نشان‌دهنده سلول‌های H4 مثبت (پیکان قرمز) و H4 منفی (پیکان سیاه)، میکروگراف‌های (C و D) نشان‌دهنده سلول‌های ED-1<sup>+</sup> (پیکسل‌های قهوه‌ای) و میکروگراف‌های (E و F) نشان‌دهنده سلول‌های OX-42<sup>+</sup> (مناطق سبز رنگ) در گروه کنترل (درمان نشده) و درمان شده با والپروئیک اسید (۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) می‌باشند. به‌عنوان شمارش سلولی هسته‌ها با هماتوکسیلین (رنگ بنفش) و اتیدیوم بروماید (رنگ قرمز) رنگ آمیزی شدند، (بزرگنمایی ۲۰۰×).

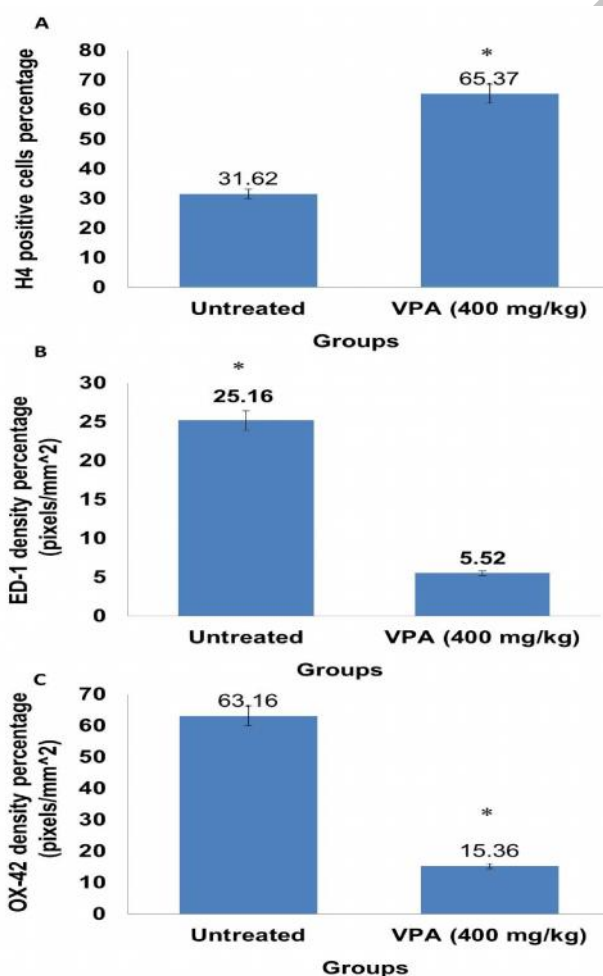
آنالیزهای آماری صورت گرفته روی میانگین درصد سلول‌های بیان‌کننده این پروتئین نیز وجود اختلاف معنی‌داری را میان

برای این

جهت بررسی تاثیر والپروئیک اسید بر روی هایپر استیلاسیون سلول‌های موجود در منطقه آسیب دیده از آنتی بادی H4 با روش ایمنو هیستوشیمی استفاده شد. برای این منظور درصد سلول‌های مثبت در سه منطقه مرکزی، بالایی و پایینی ضایعه مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۲، A و B). در گروه درمان شده با والپروئیک اسید میانگین درصد سلول‌های H4 مثبت  $5/27 \pm$  و در گروه درمان نشده  $4/48 \pm 31/62$  به دست آمد. که با توجه به بررسی‌های آماری اختلاف معنی‌داری را نسبت که گروه درمان نشده نشان می‌دهد ( $P < 0/05$ ) (شکل ۳، A).

گروه درمان شده ( $0/64 \pm 5/52$ ) و گروه درمان نشده ( $2/25 \pm$ ) را نشان می‌دهد ( $P < 0/05$ ) (شکل ۳B). OX-42 نشان‌دهنده فعالیت ماکروفازهای مهاجر در محل آسیب دیده می‌باشد. ارزیابی‌های بافتی صورت گرفته روی این پروتئین نشان‌دهنده کاهش فعالیت این سلول‌ها پس از تیمار با والپروئیک اسید می‌باشد (شکل E و F ۲). آنالیزهای آماری نیز وجود اختلاف معنی‌دار را میان گروه تیمار شده ( $1/02 \pm$ ) و گروه درمان نشده ( $4/24 \pm 63/16$ ) نشان می‌دهد ( $P < 0/05$ ) (شکل ۳C).

#### ارزیابی استیلاسیون هیستون ۴



شکل ۳: مقایسه آماری دو نشانگر ED-1 و OX\_42 و استیلاسیون هیستونی در دو گروه کنترل و تیمار شده: (A) نمودار نشان دهنده درصد سلول‌های H4<sup>+</sup>، (B) نمودار میانگین درصد تراکم پیکسل‌های ED-1<sup>+</sup> و (C) نمودار میانگین درصد تراکم پیکسل‌های OX-42<sup>+</sup> در گروه تیمار شده با والپروئیک اسید در مقایسه با گروه کنترل می‌باشد. خطای معیار (SEM)، نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه درمان شده با والپروئیک اسید و گروه درمان نشده، ( $P < 0/05$ ).

## بحث

افزایش سلول‌های  $H4+$  در محل ضایعه است. نتایج به‌دست آمده با اطلاعات  $LV$  و همکارانش (۱۶) مطابقت دارد. بنابراین مهار هیستون دی استیلاز می‌تواند زمینه درمانی جهت کاهش التهاب و اثرات نوروپروتکتیو باشد. مهم‌ترین نقش پروتئین‌های هیستونی در پیچش  $DNA$  است. هرگونه تغییر در ساختار این پروتئین‌ها می‌تواند باعث تغییر در شکل فضایی کروماتین شود. عمل استیلاسیون و دی استیلاسیون که به ترتیب توسط آنزیم‌های  $Histone$  و  $Histone acetyltransferases (HATs)$  و  $deacetylases (HDACs)$  و بر روی اسید آمینه لیزین در این پروتئین‌ها انجام می‌شود می‌تواند شکل کروماتین را تغییر دهد. هر گونه تغییر در ساختار و پیچیدگی کروماتین در بیان ژن‌ها موثر می‌باشد (۲۶). والپروئیک اسید به‌عنوان داروی ضد صرع کاربرد فراوان دارد. مطالعات انجام شده بر روی این دارو نشان می‌دهد که والپروئیک اسید با افزایش بیان  $MAP-2$  در آستروسیت‌ها و سلول‌های عصبی باعث افزایش دندریتوتونز، افزایش حافظه و بهبودی سد خونی مغزی می‌شود. همچنین باعث افزایش آپوپتوزیس در ماکروفاژها می‌شود. محققین نشان داده‌اند که والپروئیک اسید باعث افزایش بیان  $BDNF, GDNF$  در سلول‌های عصبی و آزرد شده و از این طریق باعث افزایش زوائد عصبی می‌شود (۲۷ و ۲۸). با توجه به بالا رفتن آمار بیماران مبتلا به آسیب‌های نخاعی و مشکلات موجود در تهیه و کشت سلول‌های بنیادی دستیابی به یک روش مناسب و غیر تهاجمی برای ترمیم سلول‌های از دست رفته و جلوگیری از مرگ سلول‌های باقی‌مانده در ناحیه آسیب دیده ضروری است. والپروئیک اسید به‌عنوان یک داروی امیدوار کننده در درمان صدمات طناب نخاعی و سایر آسیب‌های ترومایی ایجاد شده در دستگاه عصبی مرکزی مورد توجه قرار گرفته است. در حال حاضر با توجه به قیمت ارزان آن در درمان‌های کلینیکی بسیاری از بیماری‌های عصبی مثل صرع و میگرن استفاده می‌گردد. مطالعه حاضر برخی از فاکتورهای دخیل در التهاب را مورد بررسی قرار داده است، با این حال ضروری به‌نظر می‌رسد که مطالعات تکمیلی بیشتری نیز در همین زمینه باید انجام شود.

## نتیجه گیری

با توجه به نتایج به‌دست آمده والپروئیک اسید به‌عنوان یک داروی مهار کننده دی استیلاسیون هیستونی می‌تواند در کاهش فعالیت و مهاجرت میکروگلیا/ماکروفاژی نقش به‌سزایی داشته

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که تزریق داخل صفاقی والپروئیک اسید (۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) در ساعات اولیه بعد از آسیب به مقدار قابل توجهی باعث افزایش استیلاسیون هیستونی، کاهش حضور سلول‌های سیستم ایمنی، کاهش فعالیت ماکروفاژها و میکروگلیاهای مقیم در منطقه و به دنبال آن کاهش تخریب بافتی (کاهش درصد حفره ایجاد شده) می‌شود. در ضایعات سیستم عصبی به‌ویژه صدمات طناب نخاعی ترشح سیتوکین‌های التهابی توسط میکروگلیاهای مستقر در محل آسیب، ماکروفاژهای مهاجر و همچنین سلول‌های آسیب دیده باعث وخیم‌تر شدن ضایعه می‌شود (۱۸). محققین تلاش می‌کنند تا با درک چگونگی کنترل برهم‌کنش بین سیستم‌های ایمنی و عصبی در آسیب‌های نخاعی، پدیده تخریب و مرگ سلول‌های عصبی که توان ترمیم دارند را به تاخیر بیندازند. از دست رفتن سلول‌های عصبی، ایجاد حفره و به هم ریختگی مسیرهای عصبی از نتایج صدمه به طناب نخاعی در فازهای اول و دوم آسیب می‌باشد (۱۹ و ۲۰) مطالعات مختلف نشان داده است که با کاهش فعالیت و مهاجرت ماکروفاژها، قدرت ترمیم بافت عصبی افزایش می‌یابد (۲۱). مطالعات بر روی مدل‌های حیوانی نشان داده است که از دست رفتن غلاف میلین و آکسون‌ها در فاز دوم با مهار فعالیت ماکروفاژها کاهش می‌یابد. این نتایج با استفاده از توکسین‌هایی بر علیه ماکروفاژها (۲۱ و ۲۲) و عوامل مهار کننده مهاجرت ماکروفاژها و مونوسیت‌ها (۲۱ و ۲۳) مشخص شده است. در این مطالعه تاثیر اسید والپروئیک با غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن در کاهش فعالیت ماکروفاژها و میکروگلیاها در موش‌های صحرایی دارای آسیب نخاعی مورد بررسی قرار گرفت. کاهش دو پروتئین  $ED-1$  و  $OX-42$  به‌عنوان نشانگرهای فعالیت میکروگلیا/ماکروفاژها در واکنش‌های التهابی بیان کننده کاهش التهاب در محل ضایعه و اطراف آن می‌باشد. نتایج به‌دست آمده در این مطالعه با نتایج مطالعات انجام شده توسط  $Bhavsar$  (۱۲)،  $Carlson$  و همکارانشان (۱۳) مطابقت می‌کند. استیلاسیون هیستون یک مکانیسم کلیدی در تغییر ساختار کروماتین و بیان ژن می‌باشد (۱۲). مهار کننده‌های هیستون دی استیلاز باعث تمایز پیش‌سازهای عصبی (۲۴) و حفظ زوائد نورون‌های بالغ در مقابل عوامل مختلف می‌شوند (۲۵). در این مطالعه تاثیر والپروئیک اسید به‌عنوان مهار کننده هیستون دی استیلاز در کاهش التهاب بررسی گردید. نتایج این مطالعه نشان دهنده

dependent cortical neuronal growth and neurogenesis. *J Neurosci*. 2004; 24(29): 6590-9.

10. Brandt C, Gastens AM, Sun M, Hausknecht M, et al.. Treatment with valproate after status epilepticus: effect on neuronal damage, epileptogenesis, and behavioral alterations in rats. *Neuropharmacology*. 2006; 51(4): 789 -804.

11. Zhang Z, Zhang ZY, Fauser U, Schluesener HJ. Valproic acid attenuates inflammation in experimental autoimmune neuritis. *Cell Mol Life Sci*. 2008; 65 (24): 4055-65.

12. Bhavsar P, Ahmad T, Adcock IM. The role of histone deacetylases in asthma and allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2008; 121(3): 580-4.

13. Carlson SL, Parrish ME, Springer JE, Doty K, et al. Acute inflammatory response in spinal cord following impact injury. *Exp Neurol*. 1998; 151(1): 77-88.

14. Glauben R, Batra A, Fedke I, Zeitz M, et al. Histone hyperacetylation is associated with amelioration of experimental colitis in mice. *J Immunol*. 2006; 176(8): 5015-22.

15. Mautes AE, Weinzierl MR, Donovan F, Noble LJ. Vascular events after spinal cord injury: contribution to secondary pathogenesis. *Phys Ther* 2000; 80(7): 673-687.

16. Lv L, Sun Y, Han X, Xu CC, et al.. Valproic acid improves outcome after rodent spinal cord injury: potential roles of histone deacetylase inhibition. *Brain Res*. 2011. 17:1396:60-8.

17. Pal R, Gopinath C, Rao NM, Banerjee P. Functional recovery after transplantation of bone marrow- derived human mesenchymal stromal cells in rat model of spinal cord injury. *Cytherapy* 2010; 12(6): 792-806.

18. Fleming JC, Norenberg MD, Ramsay DA, Dekaban GA, et al. The cellular inflammatory response in human spinal cords after injury. *Brain*. 2006; 129(12): 3249-69.

19. Beattie MS, Li Q, Bresnahan JC. Cell death and plasticity after experimental spinal cord injury. *Prog Brain Res*. 2000; 128: 9-21.

20. Fehlings MG, Nguyen DH. Immunoglobulin G: A potential treatment to attenuate neuroinflammation following spinal cord injury. *J Clin Immunol*. 2010; 30 (11): 109-12.

21. Blight AR. Effects of silica on the outcome from experimental spinal cord injury: implication of macrophages in secondary tissue damage. *Euroscience*. 1994; 60: 263-273.

22. Popovich PG, Guan Z, Wei P, Huitinga I, et al. Depletion of hematogenous macrophages promotes

باشد و از این طریق در کنترل روند التهاب در مراحل اولیه تاثیرگذار باشد. در نتیجه این دارو باعث کاهش مرگ سلول‌های عصبی و کاهش گسترش تخریب بافتی بعد از صدمات ضایعه نخاعی می‌شود. با توجه به این ویژگی‌ها، از این دارو در درمان بسیاری از بیماری‌ها می‌توان استفاده کرد.

## تشکر و قدردانی

با توجه به اینکه بخشی از این کار در مرکز تحقیقات نوروپاتولوژی دانشگاه توبینگن آلمان انجام شده است، لازم می‌دانیم تا از پروفیسور شولوزینر و همکارانشان در آن مرکز قدردانی کنیم.

## منابع

1. Chen PS, Peng GS, Li G, Yang S, et al. Valproate protects dopaminergic neurons in midbrain neuron/glia cultures by stimulating the release of neurotrophic factors from astrocytes. *Mol Psychiatry*. 2006; 11(12):1116-25.
2. Castro LM, Gallant M, Niles LP. Novel targets for valproic acid: up-regulation of melatonin receptors and neurotrophic factors in C6 glioma cells. *J Neurochem*. 2005; 95(5):1227-36.
3. Donnelly DJ, Popovich PG. Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. *Exp Neurol*. 2008; 209(2): 378-88.
4. Ronsyn MW, Berneman ZN, Van Tendeloo VF, Jorens PG, et al. Can cell therapy heal a spinal cord injury? *Spinal Cord*. 2008; 46(8): 532-9.
5. Anderson KD. Targeting recovery: priorities of the spinal cord-injured population. *J Neurotrauma*. 2004; 21(10):1371-83.
6. Monti B, Polazzi E, Contestabile A. Biochemical, molecular and epigenetic mechanisms of valproic acid neuroprotection. *Curr Mol Pharmacol*. 2009; 2(1): 95-109.
7. Yuan PX, Huang LD, Jiang YM, Gutkind JS, et al. The mood stabilizer valproic acid activates mitogen-activated protein kinases and promotes neurite growth. *J Biol Chem*. 2001; 276(34): 31674-83.
8. Gurvich N, Klein PS. Lithium and valproic acid: parallels and contrasts in diverse signaling contexts. *Pharmacol Ther*. 2002; 96(1): 45-66.
9. Hao Y, Creson T, Zhang L, Li P, et al. Mood stabilizer valproate promotes ERK pathway-

partial hindlimb recovery and neuroanatomical repair after experimental spinal cord injury. *Exp Neurol* 1999; 158: 351–365.

23. Giulian D, Robertson C. Inhibition of mononuclear phagocytes reduces ischemic injury in the spinal cord. *Ann Neurol* .1990; 27: 33–42.

24. Lee S, Lee SK. Crucial roles of histone-modifying enzymes in mediating neural cell-type specification. *Curr Opin Neurobiol*. 2010; 20(1): 29–36.

25. Langley B, D'Annibale MA, Suh K, et al. Pulse inhibition of histone deacetylases induces complete resistance to oxidative death in cortical neurons without toxicity and reveals a role for cytoplasmic p21waf1/cip1 in cell cycle-independent neuroprotection. *J Neurosci*. 2008; 28: 163–176.

26. Saha RN, Pahan K. HATs and HDACs in neurodegeneration: a tale of disconcerted acetylation homeostasis. *Cell Death Differ*. 2006; 13(4): 539-50.

27. Dash PK, Orsi SA, Zhang M, Grill RJ, et al. Valproate administered after traumatic brain injury provides neuroprotection and improves cognitive function in rats. *PLoS One*. 2010; 5(6):e11383.

28. Wu X, Chen PS, Dallas S, Wilson B, et al. Histone deacetylase inhibitors up-regulate astrocyte GDNF and BDNF gene transcription and protect dopaminergic neurons. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2008; 11(8): 1123-34.

Archive of SID



## Study of Microglia/Macrophages Activation Using Systemic Administration of Valproic Acid as A Histone Deacetylase Inhibitor

Abdanipour AR. Ph.D<sup>1\*</sup>, Taki Tiraihi T. Ph.D<sup>2</sup>, Khatami SM. MSc.<sup>3</sup>

1. Stem Cells Research Laboratory, Dept. of Medical Sciences, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, Iran.

2. Shefa Neurosciences Research Center, Khatam Al-Anbia Hospital, Tehran, Iran.

3. Young Researchers and Elite Club, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, Iran

\* Email corresponding author: abdari.anatomy@yahoo.com

Received: 6 Sep. 2013

Accepted: 3 Nov. 2013

---

### Abstract

**Aim:** The aim of this study was to evaluate the effect of Valproic acid (VPA) as a histone deacetylase inhibitor on decrease of microglia /macrophage activity and nervous tissue destruction after spinal cord injury of rat (SIC).

**Material and Methods:** To SCI, contusion model was used. Ten contused rats were equally divided into two groups. Control group did not receive any injection and treatment group received valproic acid (400 mg/kg) intraperitoneally daily for two weeks. Rats were killed at 28 days post injury then damaged spinal cord was removed and examined for H4 acetylation, ED-1 and OX-42 positive cells using immunohistochemistry procedure. Also the cavity volume percentage in 4200  $\mu\text{m}$  length of the spinal cord (central, rostral and caudal regions from the injury epicenter) was assessed for each sample.

**Results:** Results showed increases of *histone H4* acetylation and decreases of ED-1 (lysosomal marker) and OX-42 (microglia marker) positive cells. Also the percentage of cavity volume in valproic acid-treated group compared to control (untreated) showed significant decreases.

**Conclusion:** Prescription of valproic acid in the early stages of SIC decreases microglia/macrophages activity, and neural tissue damage in a spinal cord injury model.

**Key words:** Inflammation, Epigenetic, Spinal cord injury, Valproic acid