DOI: 10.48305/jims.v41.i739.0905

مجله دانشکده پزشکی اصفهان — سال چهل و یکم/شماره‌ی ۷۳۹/هفته‌ی سوم آذر ۱۴۰۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۷/۱۲ — تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۹/۱۸ — تاریخ چاپ: ۱۴۰۲/۹/۲۱

# اثرات حفاظتی والپروئیک اسید در پیشگیری از تخریب بافت میلین و حفظ تراکم آن در جسم پینه‌ای مغز موش

سحر قصوری[۱]، میترا سلیمانی[۲]، ناظم قاسمی[۳]

مقاله پژوهشی

## چکیده

**مقدمه:** عوامل توکسیک محیطی با اثرات مخربی که بر روی سلول‌های عصبی و بافت میلین دارند، می‌توانند باعث اختلال در عملکرد سیستم عصبی شوند. نقش محافظت‌کنندگی نورونی والپروئیک اسید به عنوان نوعی مهارکننده Glycogen synthase kinase 3β (GSK3-β) در برخی از بیماری‌های تخریب‌کننده‌ی نورونی به اثبات رسیده است. در مطالعه‌ی حاضر، اثرات این ترکیب در پیشگیری از تخریب و حفظ تراکم بافت میلین در جسم پینه‌ای مغز موش مورد بررسی قرار گرفت.

**روش‌ها:** تعداد ۴۰ عدد موش سوری ماده نژاد C57BL/6 با وزن ۲۵–۲۰ گرم در چهار گروه شامل گروه شاهد، شم، کاپریزون و والپروئیک اسید /کاپریزون قرار گرفتند. ترکیب والپروئیک اسید بصورت داخل صفاقی، روزانه و با دوز ۳۰۰ mg/kg استفاده شد. در پایان پژوهش، به منظور بررسی تراکم میلین، از روش‌های رنگ‌آمیزی تلوئیدین بلو، ایمونوهیستوشیمی و Real Time PCR استفاده شد.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد که تراکم میلین و درصد سلول‌های بیان کننده‌ی مارکر MBP (Myelin Basic Protein) در گروه دریافت‌کننده‌ی والپروئیک اسید، نسبت به گروه کاپریزون به شکل معنی‌داری افزایش پیدا کرده است. بعلاوه، نتایج بررسی بیان ژن ویژه‌ی میلین هم نشان داد که استفاده از والپروئیک اسید می‌تواند بیان این ژن را افزایش دهند.

**نتیجه‌گیری:** نتایج پژوهش حاضر نشان داد که والپروئیک اسید، توانایی پیشگیری از تخریب بافت میلین و حفظ تراکم آن را دارد و لذا استفاده از این ترکیب می‌تواند راهکاری مناسب، برای پیشگیری از ابتلا و کاهش پیشرفت بیماری‌های تخریب‌کننده‌ی بافت عصبی باشد.

**واژگان کلیدی:** غلاف میلین؛ والپروئیک اسید؛ بیماری‌های تخریب‌کننده‌ی عصبی؛ جسم پینه‌ای

**ارجاع:** قصوری سحر، سلیمانی میترا، قاسمی ناظم. **اثرات حفاظتی والپروئیک اسید در پیشگیری از تخریب بافت میلین و حفظ تراکم آن در جسم پینه‌ای مغز موش.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۲؛ ۴۱ (۷۳۹): ۹۱۱–۹۰۵

## مقدمه

عوامل توکسیک محیطی، به دلیل داشتن آنتی‌ژن‌های هسته‌ای مشابه با پروتئین‌های پایه‌ی میلین و گلیکوپروتئین‌های ویژه‌ی بافت میلین، قادر به فعال کردن سلول‌های ایمنی، تخریب غلاف میلین و اختلال در عملکرد سیستم عصبی می‌باشند. رژیم‌های غذایی نامناسب، عوامل ویروسی و باکتریایی، سیگار کشیدن، کمبود ویتامین‌ها و به ویژه ویتامین D و قرار گرفتن در معرض اشعه‌ی ماوراء بنفش از جمله این عوامل می‌باشند (۱). نتایج مطالعات قبلی اثبات کرده است که این عوامل قادر هستند به نورون‌ها و الیگودندروسیت‌ها آسیب برساند. فعال شدن سلول‌های ایمنی ویژه در بافت عصبی، تهاجم و نفوذ لنفوسیت‌ها به درون بافت عصبی و ترشح سیتوکین‌های ویژه شرایط تخریب بافت میلین را فراهم می‌کند. به منظور بررسی نقش عوامل محیطی در مرگ سلول‌های الیگودندروسیتی و تخریب بافت میلین و همچنین نقش عوامل نوروتروفیک در پیشگیری از آسیب‌های بافتی از مدل‌های حیوانی استفاده می‌شود (۲–۹). از جمله این ترکیبات می‌توان کاپریزون را نام برد.

کاپریزون نوعی عامل کلات‌کننده‌ی مس می‌باشد و با اختلال در عملکرد میتوکندری‌های موجود در الیگودندروسیت‌ها، می‌تواند منجر به مرگ این سلول‌ها و در نهایت تخریب بافت میلین شود (۹). عوامل محافظت‌کننده‌ی عصبی با داشتن اثراتی نظیر محافظت‌کنندگی

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، دانشکده‌ی پزشکی، گروه علوم تشریحی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- استادیار، دانشکده‌ی پزشکی، گروه علوم تشریحی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- دانشیار، دانشکده‌ی پزشکی ،گروه علوم تشریحی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

**نویسنده‌ی مسؤول:** ناظم قاسمی: دانشیار، دانشکده‌ی پزشکی ،گروه علوم تشریحی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: n_ghasemi@med.mui.ac.ir

نورونی، آنتی‌اکسیدانی و ضد آپاپتوزی قادر هستند که اثرات توکسیک ناشی از عوامل توکسیک محیطی را کاهش دهند (۱۰).

والپروئیک اسید (Valproic Acid) VPA یک اسید چرب با زنجیره کوتاه است و می‌تواند به راحتی به سلول‌ها وارد شود. والپروئیک اسید برای دهه‌ها به عنوان یک ماده ضدتشنج و صرع و یک تثبیت‌کننده‌ی خلق و خو به طور گسترده مورد استفاده قرار گرفته است. مکانیسم عملکرد والپروئیک اسید با تنظیم انتقال‌دهنده‌ی عصبی GABA همراه است (۱۱)، همچنین به عنوان مهارکننده‌ی آنزیم‌های Histone deacetylases (HDAC) و GSK3 شناخته می‌شود (۱۲). اخیراً نشان داده شده که والپروئیک اسید، قادر به کاهش آپوپتوز، افزایش حفاظت و بقای سلول‌های عصبی می‌باشد (۱۳). همچنین از سلول‌های عصبی در برابر سم دوپامینرژیک ۱-متیل-فنیل پیریدینیوم (MPP +) محافظت می‌کند (۱۱) و در سیستم عصبی مرکزی باعث ایجاد نوروژنز و تمایز عصبی می‌شود (۱٤). استفاده از والپروئیک اسید در مدل‌های ایسکمی مغزی و مدل‌های تخریب بافت میلین نشان داده است که این ترکیب می‌تواند بعد از ایجاد این آسیب‌ها، میلین‌سازی مجدد را بهبود ببخشد. از آن‌جایی‌که بعد از آسیب‌های عصبی، فرایند میلین‌سازی می‌تواند به صورت خودبه خود هم شروع شود، نمی‌توان بهبود فرایند میلین‌سازی را به صورت صد درصد به والپروئیک اسید نسبت داد. لذا برای بررسی اثرات مطلق والپروئیک اسید بر حفظ تراکم میلین نیاز است که این ترکیب به شکل همزمان با عوامل تخریب‌کننده‌ی عصبی استفاده شود.

با توجه به اینکه در بیشتر مطالعات گذشته اثرات والپروئیک اسید بعد از آسیب عصبی مورد بررسی قرار گرفته است، در این پژوهش عوامل توکسیک و والپروئیک اسید بصورت همزمان استفاده می‌شود و اثرات حفاظتی این ترکیب بر حفظ تراکم میلین مورد توجه قرار گرفته است.

## روش‌ها

این مطالعه‌ی تجربی در دانشکده‌ی پزشکی اصفهان بر روی ٤۰ عدد موش سوری ماده‌ی نژاد C57BL/6 با وزن ۲۵-۲۰ گرم انجام شد. موش‌ها در لانه‌ی حیوانات و در شرایط دمایی و رطوبت مناسب نگهداری شدند. کلیه‌ی دستورالعمل‌های کمیته‌ی اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اصفهان رعایت شد در ابتدا موش‌ها به صورت تصادفی در چهار گروه شاهد، شم، کاپریزون و والپروئیک اسید /کاپریزون قرار گرفتند. حیوانات گروه شاهد با غذای معمولی تغذیه شدند. در سایر گروه‌ها با استفاده از ترکیب کاپریزون ۰/۲ درصد (محلول در ۰/۵ سی‌سی روغن ذرت) و بصورت گاواژ، تخریب بافت میلین القاء شد (۵). در گروه شم بصورت روزانه، نرمال‌سالین بصورت داخل صفاقی همزمان با گاواژ کاپریزون تزریق گردید. همچنین در گروه والپروئیک اسید /کاپریزون، ترکیب والپروئیک اسید بصورت داخل صفاقی، و با دوز mg/kg ۳۰۰ بصورت روزانه و به مدت سه هفته همزمان با گاواژ کاپریزون استفاده شد (۱۵). در پایان مطالعه، بعد از بیهوشی عمیق، با استفاده از روش Cardiac Perfusion و ترکیب کتامین/زایلزین مغز موش‌ها فیکس و سپس خارج شد. در ادامه مراحل تثبیت بافتی انجام شد و مقاطع پارافینه با ضخامت ۵ میکرومتر جهت بررسی‌های ایمونوهیستوشیمیی تهیه گردید. همچنین تعدادی از نمونه‌ها جهت بررسی بیان ژن ویژه میلین مورد استفاده قرار گرفت.

*تکنیک Real time RT-PCR* به منظور بررسی میزان بیان ژن MBP در گروه‌های مختلف، از این تکنیک استفاده شد. بعد از انجام کرانیوتومی، مغز نیمی از موش‌ها در دمای ۷۰- قرار داده شد و در ادامه بعد از جداسازی جسم پینه‌ای مغز، با استفاده از RNeasy mini Kit و بر اساس دستورالعمل ارائه شده و طبق روش مطالعه‌ی قبلی(۵) RNA استخراج گردید. RNA استخراج شده با استفاده از کیت DNase set (شرکت Qiagen) و بر اساس دستور العمل عاری از DNA گردید. به منظور سنتز CDNA، RevertAid™ First StrandcDNA Synthesis Kit استفاده شد. در نهایت با استفاده از پرایمرهای طراحی شده از سایت‌های معتبر بیوانفورماتیک نظیر NCBI و برنامه‌ی مخصوص دستگاه، Real time RT-PCR انجام گرفت و میزان بیان ژن MBP مورد بررسی قرار گرفت. لازم به ذکر است که از ژن β-actin به عنوان ژن رفرانس (Housekeeping) استفاده شد (شکل D ۱).

*رنگ‌آمیزی تولوئیدین بلو:* به منظور بررسی میزان تراکم بافت میلین، محلول تولوئیدن بلو ۱ در صد استفاده شد. طبق روش مطالعه قبلی (۵) ابتدا جهت دپارافینه کردن، نمونه‌ها در دمای ٦۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند. سپس با استفاده از محلول‌های گزیلل و الکل، مراحل پردازش بافتی انجام شد. در ادامه محلول تولوئیدن بلو ۱ درصد به مدت ۳۰ ثانیه استفاده شد. در نهایت لام‌ها در گزیلل به مدت ۵ دقیقه مانت شدند و با استفاده از میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند. میانگین تراکم میلین با استفاده از نرم‌افزار Image J محاسبه شد.

*بررسی مارکر MBP با استفاده از تکنیک ایمونوهیستوشیمی:* به منظور انجام تکنیک ایمونوهیستوشیمی و طبق مطالعه‌ی قبلی (۲)، مقاطع پارافینی تهیه شده با ضخامت ۵ میکرومتر به مدت نیم ساعت در دمای ٦۰ درجه‌ی سانتی‌گراد در دستگاه فور قرار گرفت و پس از آبدهی نمونه‌ها، با استفاده از بافر سیترات بازیابی آنتی‌ژنی انجام شد. مرحله‌ی بلاک کردن آنتی‌ژن‌ها، با استفاده از سرم آلبومین بزی ۱۰ درصد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و در محفظه‌ی مرطوب

انجام شد. در ادامه انکوبه کردن نمونه‌ها با استفاده از آنتی‌بادی اولیه Anti MBP (abcam) و به مدت یک شبانه روز و در محیط مرطوب و در دمای ٤ درجه‌ی سانتی‌گراد انجام شد. سپس انکوبه کردن با آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه شده با FITC به مدت یک ساعت در تاریکی انجام گرفت. در نهایت رنگ‌آمیزی هسته با استفاده از DAPI رقیق شده (DAPI به نسبت 1:1000 با PBS) به مدت ۲ دقیقه انجام شد، نمونه‌ها با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت (Olympus BX51, Japan) مورد بررسی قرار گرفتند. تعداد ۲۰۰ سلول در ۵ فیلد به شکل تصادفی شمارش شد و میانگین درصد سلول‌های بیان‌کننده‌ی مارکر MBP، گزارش گردید. لازم به ذکر است که تکنیک ایمونوهیستوشیمی سه بار تکرار شد.

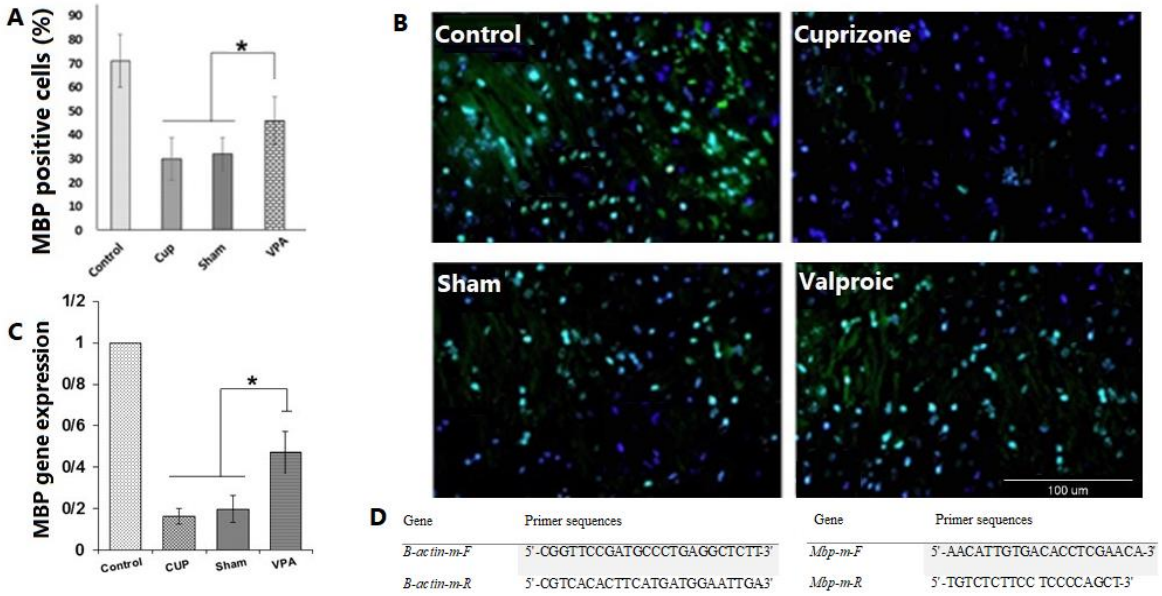
با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۵ (version 25, IBM Corporation, Armonk, NY) و با کمک آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه، مقایسه‌ی داده‌ها انجام شد. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده و P کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

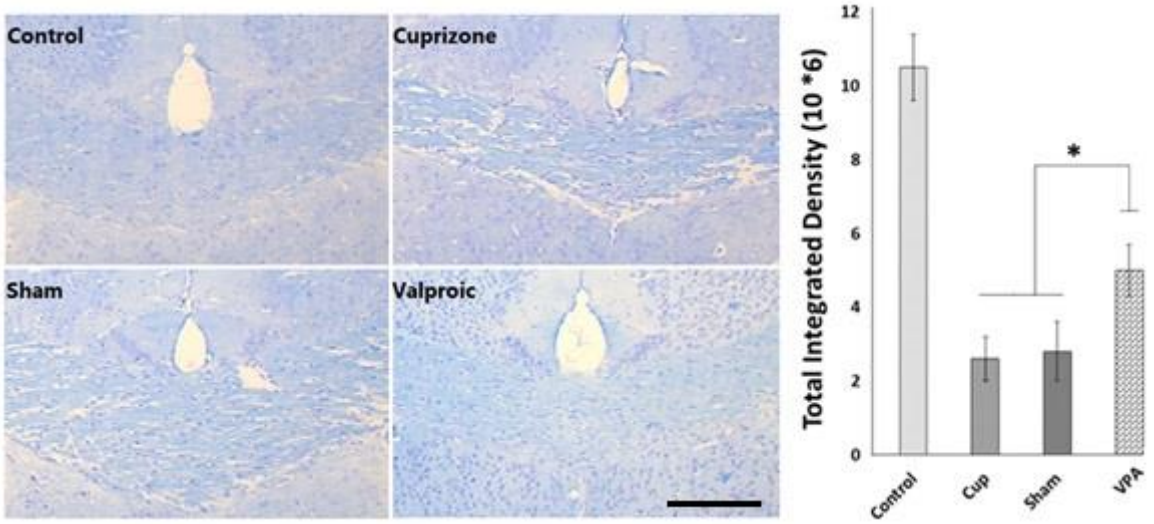
*بررسی مارکرهای MBP در تکنیک ایمونوهیستوشیمی:* نتایج بررسی ایمونوهیستوشیمی نشان داد که میانگین درصد سلول‌های بیان‌کننده‌ی مارکر MBP در گروه‌های دریافت‌کننده‌ی کاپریزون نسبت به سایر گروه‌ها به شکل معنی‌داری کاهش یافته است. بعلاوه درصد سلول‌های بیان‌کننده‌ی مارکر MBP در گروه دریافت‌کننده‌ی والپروئیک اسید نسبت به گروه کاپریزون به شکل معنی‌داری بیشتر می‌باشد (P ≤ ۰/۰۵) (شکل 1A, B).

*تکنیک Real time RT-PCR و بررسی بیان ژن MBP:* نتایج بررسی ژن MBP در چهار گروه مورد مطالعه نشان داد که میزان بیان mRNA، ژن MBP در گروه‌های دریافت‌کننده‌ی کاپریزون کاهش داشته است. بعلاوه میزان بیان آن در گروه دریافت‌کننده‌ی والپروئیک اسید نسبت به دیگر گروه‌ها به شکل معنی‌داری بیشتر می‌باشد و هم جهت با نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی است (P ≤ ۰/۰۵) (شکل 1-C).

*بررسی تراکم میلین در رنگ‌آمیزی تولوئیدین بلو:* بافت میلین در ناحیه‌ی جسم پینه‌ای بعد از رنگ‌آمیزی با تولوئیدین بلو به رنگ آبی و با شدت نوری متفاوت مشاهده گردید. همان طور که در شکل ۲ دیده می‌شود، مرز بین ناحیه‌ی جسم پینه‌ای و بافت‌های مجاور در گروه دریافت‌کننده‌ی کاپریزون بصورت دقیق واضح نمی‌باشد که خود می‌تواند دلیلی بر تخریب میلین و کاهش تراکم آن باشد. نتایج بررسی تراکم میلین با استفاده از نرم‌افزار Image J نشان داد که میانگین تراکم میلین در جسم پینه‌ای موش‌های دریافت‌کننده‌ی والپروئیک اسید نسبت به گروه کاپریزون به شکل معنی‌داری بیشتر می‌باشد (P ≤ ۰/۰۵) (شکل ۲).




**شکل ۱. مقایسه‌ی درصد سلول‌های بیان‌کننده‌ی مارکرMBP و میانگین بیان ژن مربوطه در گروه‌های مختلف. A, B: میانگین درصد سلول‌های بیان‌کننده‌ی مارکر MBP در گروه دریافت‌کننده‌ی والپروئیک اسید به شکل معنی‌داری بیشتر از سایر گروه‌ها می‌باشد (P ≤ ۰۱/۰۵). B: در گروه‌های دریافت‌کننده‌ی کاپریزون، میانگین بیان ژنMBP نسبت به سایر گروه‌ها کمتر و در گروه دریافت‌کننده‌ی والپروئیک اسید به شکل معنی‌داری بیشتر می‌باشد (P ≤ ۰۱/۰۵). D: توالی پرایمرهای استفاده شده در مطالعه.**




**شکل ۲. رنگ‌آمیزی تولوئیدین بلو. میانگین تراکم میلین در گروه دریافت‌کننده‌ی والپروئیک اسید نسبت به گروه‌های دریافت‌کننده‌ی کاپریزون به صورت معنی‌داری افزایش دارد (بزرگ‌نمایی 40X) ($P \leq ۰۱/۰۵$).**

## بحث

در طی بیماری‌های تخریب‌کننده‌ی عصبی و بدلیل نفوذ سلول‌های لنفوسیت به درون بافت عصبی و ترشح اینترلوکین‌های ویژه، مرگ سلول‌های الیگودندروسیت آغاز می‌شود و تخریب بافت میلین منجر به اختلال در انتقال پیام‌های عصبی و بروز اختلالات عملکردی در سیستم عصبی مرکزی می‌شود. عوامل محیطی بسیاری زیادی وجود دارند که می‌توانند در ایجاد این شرایط پاتولوژیک دخالت داشته باشند (۱–۷). عوامل تعدیل‌کننده‌ی سیستم ایمنی و سرکوب‌کننده‌های التهابی قادر نیستند به شکل کامل از تخریب بافت میلین جلوگیری کنند. لذا استراتژی‌های درمانی جدید که بر پایه‌ی پیشگیری از تخریب بافت میلین استوار می‌باشد، نظر پژوهشگران را به خود جلب کرده است. در این بین نقش عوامل نوروتروفیک، مهارکننده‌های آپاپتوز سلولی و آنتی‌اکسیدان‌ها بسیار مهم می‌باشد. والپروئیک اسید نوعی ترکیب نوروپروتکتیو است و نقش محافظت‌کنندگی نورونی و بازسازی آکسونی، فعالیت ضد التهابی و ضد آپاپتوزی آن به اثبات رسیده است (۱۶–۱۸).

Ghasemi-Kasman و همکاران در سال ۲۰۱۵ گزارش کردند که تجویز والپروئیک اسید ممکن است پتانسیل مغز را برای ترمیم آسیب‌های میلین افزایش دهد (۱۹).

همچنین Satoh و همکاران به این نتیجه رسیدند که والپروئیک اسید می‌توانند با فعال کردن مسیرهای سیگنالینگ Wnt، تمایز عصبی سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی را القا کند (۲۰). در مطالعه‌ی حاضر و به منظور بررسی اثرات والپروئیک اسید در پیشگیری از تخریب بافت میلین، از ترکیب کاپریزون جهت القاء تخریب میلین استفاده شد. همانطوری که در تصاویر ایمونوهیستوشیمی مشاهده می‌شود (شکل ۱)، در گروه‌های دریافت‌کننده‌ی کاپریزون، میانگین درصد سلول‌های بیان‌کننده‌ی مارکر MBP کاهش قابل توجهی داشته است. در توجیه این مسأله می‌توان گفت که کاپریزون از طریق مهار عملکرد سیتوکروم اکسیداز و مونوآمین اکسیداز میتوکندریایی، چرخه تولید انرژی در الیگودندروسیت‌ها را دچار اختلال کرده است و آپوپتوز این سلول‌ها را رقم زده است. همچنین بررسی درصد سلول‌های مارکر MBP مثبت در گروه دریافت‌کننده‌ی والپروئیک اسید نشان می‌دهد که جمعیت این سلول‌ها در مقایسه با گروه‌های دریافت‌کننده‌ی کاپریزون بیشتر است. در توجیه این نتایج می‌توان گفت که والپروئیک اسید احتمالاً از طریق تأثیر بر مسیرهای سیگنال‌دهی Wnt/GSK3-β و با تغییر بیان برخی از ژن‌ها، توانسته است از مرگ سلول‌های الیگودندروسیتی و تخریب بافت میلین پیشگیری کند. والپروئیک اسید با اثر بر مسیر سیگنالینگ Wnt/GSK3-β باعث مهار فسفوریلاسیون β-catenin می‌شود و نقشی مهم را در حفاظت عصبی ایفا می‌کند (۲۱).

در مطالعه‌ی حاضر مشاهده شد که میزان بیان ژن MBP در گروه دریافت‌کننده‌ی والپروئیک اسید به صورت معنی‌داری نسبت به گروه‌های دریافت‌کننده‌ی کاپریزون بالاتر بوده است که در راستای نتایج ایمونوهیستوشیمی می‌باشد. Zhu و همکاران در سال ۲۰۲۱ با استفاده از کاپریزون، دمیلیناسیون قابل توجهی را در هیپوکامپ موش ایجاد کردند. این پژوهشگران گزارش دادند که والپروئیک اسید از طریق تنظیم بیوسنتز کلسترول می‌تواند نقشی مهم در پیشگیری از تخریب بافت میلین ایفا کند (۲۲).

Pazhoohan و همکاران ثابت کردند که والپروئیک اسید به عنوان یک درمان بالقوه برای بازسازی مجدد میلین در MS شناخته شده است و برای بهبود سریع‌تر بیماری پیشنهاد می‌شود. همچنین تعداد آکسون‌های میلینه شده را افزایش می‌دهد. به نظر می‌رسد که اثر VPA با به کارگیری پیش‌سازهای اندوژنوس این اثرات درمانی را دارد (۲۳).

Jang و Jeong به این نتیجه رسیدند که والپروئیک اسید با مهار آنزیم هیستون داستیلاز می‌توانند با فعال کردن مسیرهای سیگنالینگ Wnt، تمایز عصبی hADSCs را القا کنند (۲٤).

همچنین Azuchi و همکاران در طی مطالعه‌ای به این نتیجه رسیدند که ترکیب VPA ممکن است برای اختلالات التهابی عصبی مفید باشد. علاوه بر این، VPA ممکن است فاز بهبودی EAE را تسریع کند و تعداد آکسون‌های میلینه شده موجود در ناحیه‌ی ضایعه را با به‌کارگیری سلول‌های بنیادی عصبی و پیش‌سازهای الیگودندروسیت افزایش دهد (۱۵). بنابراین، VPA می‌تواند به طور مؤثری EAE را با اعمال اثرات محافظت‌کننده‌ی عصبی از طریق مکانیسم‌های متعدد، علاوه بر اثرات سرکوب‌کننده‌ی آن بر سلول‌های T، بهبود بخشد.

## نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که والپروئیک اسید، با داشتن اثرات محافظت‌کنندگی نورونی و از طریق افزایش بیان ژن ویژه‌ی بافت میلین، می‌تواند از تخریب بافت میلین پیشگیری کند. لذا استفاده از این ترکیب احتمالاً در جهت پیشگیری از ابتلا به بیماری‌های تخریب‌کننده‌ی عصبی نظیر بیماری اماس مؤثر خواهد بود.

## تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر برگرفته از پایان‌نامه‌ی مقطع دکترای تخصصی علوم تشریحی به شماره‌ی ۳۹۹۸۳۱ مصوب معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است. بدین‌وسیله از معاونت مذکور تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

## References

1. Ghasemi N, Razavi S, Nikzad E. Multiple sclerosis: pathogenesis, symptoms, diagnoses and cell-based therapy. Cell J 2017; 19(1): 1-10.
2. Lotfi A, Soleimani M, Ghasemi N. Astaxanthin reduces demyelination and oligodendrocytes death in a rat model of multiple sclerosis. Cell J 2021; 22(4): 565-71.
3. Bagheri E, Marandi SM, Ghasemi N. Evaluation of curcumin effects on improvement of muscle strength, prevention of oligodendrocytes and myelin damage in brain, in an animal model of multiple sclersosis (MS) [in Persian]. J Kurdistan Univ Med Sci 2018; 23(5): 55-64.
4. Mohammadi-Rad M, Ghasemi N, Aliomrani M. Evaluation of apamin effects on myelination process in C57BL/6 mice model of multiple sclerosis. Res Pharm Sci 2019; 14(5): 424-31.
5. Ghosouri S, Soleimani M, Bakhtiari M, Ghasemi N. Evaluation of in vivo lithium chloride effects as a GSK3-β inhibitor on human adipose derived stem cells differentiation into oligodendrocytes and re-myelination in an animal model of multiple sclerosis. Mol Biol Rep 2023; 50(2): 1617-25.
6. Moradi V, Esfandiary E, Ghanadian M, Ghasemi N, Rashidi B. The effect of Zingiber officinale extract on preventing demyelination of corpus callosum in a rat model of multiple sclerosis. Iran Biomed J 2022; 26(4): 330-9.
7. Bakhtiari M, Ghasemi N, Salehi H, Amirpour N, Kazemi M, Mardani M. Evaluation of Edaravone effects on the differentiation of human adipose derived stem cells into oligodendrocyte cells in multiple sclerosis disease in rats. Life Sci 2021; 282: 119812.
8. Chung W-S, Lin C-L, Kao C-H. Carbon monoxide poisoning and risk of deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a nationwide retrospective cohort study. J Epidemiol Community Health 2015; 69(6): 557-62.
9. Mardani M, Ganji R, Ghasemi N, Kazemi M, Razavi S. Impact of intraventricular human adipose-derived stem cells transplantation with pregnenolone treatment on remyelination of corpus callosum in a rat model of multiple sclerosis. Cell J 2022; 24(12): 748-56.
10. Razavi S, Nazem G, Mardani M, Esfandiari E, Salehi H, Esfahani SHZ. Neurotrophic factors and their effects in the treatment of multiple sclerosis. Adv Biomed Res 2015; 4: 53.
11. Shnayder NA, Grechkina VV, Khasanova AK, Bochanova EN, Dontceva EA, Petrova MM, et al. Therapeutic and toxic effects of valproic acid metabolites. Metabolites 2023; 13(1): 134.
12. Silva MR, Correia AO, Dos Santos GCA, Parente LLT, de Siqueira KP, Lima DGS, et al. Neuroprotective effects of valproic acid on brain ischemia are related to its HDAC and GSK3 inhibitions. Pharmacol Biochem Behav 2018; 167: 17-28.
13. Romoli M, Mazzocchetti P, D'Alonzo R, Siliquini S, Rinaldi VE, Verrotti A, et al. Valproic acid and epilepsy: from molecular mechanisms to clinical evidences. Curr Neuropharmacol 2019; 17(10): 926-46.
14. Duan Q, Li S, Wen X, Sunnassee G, Chen J, Tan S, et al. Valproic acid enhances reprogramming efficiency and neuronal differentiation on small molecules staged-induction neural stem cells: suggested role of mTOR signaling. ront Neurosci 2019; 13: 867.
15. Azuchi Y, Kimura A, Guo X, Akiyama G, Noro T,

Harada C, et al. Valproic acid and ASK1 deficiency ameliorate optic neuritis and neurodegeneration in an animal model of multiple sclerosis. Neurosci Let 2017; 639: 82-7.

**16.** Amirzargar MA, Yaghubi F, Hosseinipanah M, Jafari M, Pourjafar M, Rezaeepoor M, et all. Anti-inflammatory effects of valproic acid in a rat model of renal ischemia/reperfusion injury: alteration in cytokine profile. Inflammation 2017; 40(4): 1310-18.

**17.** Celik E, Tunali S, Gezginci-Oktayoglu S, Bolkent S, Can A, Yanardag R. Vitamin U prevents valproic acid-induced liver injury through supporting enzymatic antioxidant system and increasing hepatocyte proliferation triggered by inflammation and apoptosis. Toxicol Mech Methods 2021; 31(8): 600-8.

**18.** Nielsen NM, Svanström H, Stenager E, Magyari M , Koch-Henriksen N, Pasternak B, et al. The use of valproic acid and multiple sclerosis. Pharmacoepidemiol Drug Saf 2015; 24(3): 262-8.

**19.** Ghasemi-Kasman M, Zare L, Baharvand H, Javan M. In vivo conversion of astrocytes to myelinating cells by miR-302/367 and valproate to enhance myelin repair. J Tissue Eng Regen Med 2018; 12(1): e462-e472.

**20.** Satoh A, Fujimoto S, Irie T, Suzuki T, Miyazaki Y, Tanaka K, et al. Valproic acid promotes differentiation of adipose tissue-derived stem cells to neuronal cells selectively expressing functional N-type voltage-gated Ca2+ channels. Biochem Biophys Res Commun 2022; 589: 55-62.

**21.** Vecera CM, Jones G, Chong AC, Ruiz AC, Rong C, Soares JC, et al. Intracellular signaling cascades in bipolar disorder. Biomarkers in Bipolar Disorders: Elsevier; 2022. p. 331-47.

**22.** Zhu X, Yao Y, Hu Y, Yang J, Zhang C, He Y, et al. Valproic acid suppresses cuprizone-induced hippocampal demyelination and anxiety-like behavior by promoting cholesterol biosynthesis. Neurobiol Dis 2021; 158: 105489.

**23.** Pazhoohan S, Satarian L, Asghari AA, Salimi M, Kiani S, Mani AR, et al. Valproic Acid attenuates disease symptoms and increases endogenous myelin repair by recruiting neural stem cells and oligodendrocyte progenitors in experimental autoimmune encephalomyelitis. Neurodegener Dis 2014; 13(1): 45-52.

**24.** Jang S, Jeong HS. Histone deacetylase inhibition-mediated neuronal differentiation via the Wnt signaling pathway in human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. Neurosci Lett 2018; 668: 24-30.

DOI: *10.48305/jims.v41.i739.0905*

**Journal of Isfahan Medical School** **Vol. 41, No. 739, 3rd Week, December 2023**

Received: 04.10.2023 Accepted: 09.12.2023 Published: 12.12.2023

# Protective Effects of Valproic Acid in Preventing of Myelin Tissue Destruction and Maintaining Its Density in the Corpus Callosum of Mouse Brain

Sahar Ghosouri[1], Mitra Soleimani[2], Nazem Ghasemi[3]

**Original Article**

## Abstract

**Background:** Environmental toxic factors, with their destructive effects on nerve cells and myelin tissue, can induce nervous system dysfunction. The neuroprotective role of valproic acid as an inhibitor of Glycogen synthase kinase 3β (GSK3-β) has been proven in some neurodegenerative diseases. In the present study, the effects of this combination were investigated in preventing myelin tissue destruction and maintaining its density in the corpus callosum of mouse brain.

**Methods:** 40 female C57BL/6 mice weighing 20-25 grams were divided into four groups including control, sham, cuprizone and, valproic acid/cuprizone groups. The valproic acid combination was used intraperitoneally, daily, and at a dose of 300 mg/kg. At the end of the research, to check myelin density, Teloidin blue staining, immunohistochemistry and, real-time methods were used.

**Findings:** The results showed that the density of myelin and the percentage of cells expressing the Myelin Basic Protein (MBP) marker increased significantly in the group that received valproic acid compared to the cuprizone group. In addition, the results of myelin-specific gene expression analysis showed that the use of valproic acid can increase the expression of this gene.

**Conclusion:** The results of the present study showed that valproic acid has the ability to prevent myelin tissue destruction and maintain its density, and therefore, the use of this combination can be a suitable combination to prevent and reduce the progression of diseases that destroy nerve tissue.

**Keywords:** Myelin sheath; Valproic acid; Neurodegenerative disease; Corpus callosum

**Citation:** Ghosouri S, Soleimani M, Ghasemi N. **Protective Effects of Valproic Acid in Preventing of Myelin Tissue Destruction and Maintaining Its Density in the Corpus Callosum of Mouse Brain.** J Isfahan Med Sch 2023; 41(739): 905-11.

1- PhD Student, Department of Anatomical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- Associate Professor, Department of Anatomical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
**Corresponding Author:** Nazem Ghasemi, Associate Professor, Department of Anatomical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; Email: n_ghasemi@med.mui.ac.ir