

## **The effect of vitamin D3 on nitric oxide levels in patients with multiple sclerosis**

Ghasami K<sup>1</sup>, Ghazavi A<sup>2</sup>, Jand Y<sup>3</sup>, Payani MA<sup>4</sup>, Khazaei MR<sup>4</sup>, Mosayebi G<sup>5\*</sup>

1- Assistant Professor, Neurologist, Department of Internal Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

2- Instructor, MSc of Immunology, Department of Immunology, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

3- General Practitioner, Arak, Iran

4- Laboratory Expert, Department of Immunology, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

5- Associate Professor, PhD of Immunology, Molecular and Medicine Research Center, Department of Immunology, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

Received 6 Feb 2010 Accepted 24 Feb 2010

### **Abstract**

**Background:** Multiple sclerosis (MS) is a chronic, autoimmune disease of the central nervous system (CNS) of unknown etiology. Vitamin D3 (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) has strong immune modulating potential. Nitric Oxide (NO) has been identified as one of the most destructive products of the immune system and is an important factor in demyelination. The effect of short-term vitamin D3 supplementation on NO level was assessed in MS patients.

**Materials and Methods:** The study included 60 MS patients (male and female). Patients were randomized independently, in a double blind design, into one of two treatment groups. Controls (n=30) received current treatment. Vitamin D treated (n=30) individuals received current treatment plus 300000 IU vitamin D3. Vitamin D3 injection was repeated monthly for 6 months. Nitric oxide (NO) production was estimated by Griess reaction.

**Results:** NO levels decreased following vitamin D3 treatment but the differences did not reach significance (12.4±11.1 μmol/L to 9.8±8.9 μmol/L). Control group was also associated with an increase in NO levels but not statistically significant (18.4±17.07 μmol/L to 22.07±16.8 μmol/L).

**Conclusion:** Vitamin D3 has not significant effect on the level of nitric oxide. However, further studies should be done to evaluate the potential of vitamin D as an immune modulator in management of MS.

**Keywords:** Multiple sclerosis, Nitric oxide, Vitamin D3

\*Corresponding author:

Email: gmosayebi@yahoo.com

Address: Molecular and Medicine Research Center, Department of Immunology, Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

## تاثیر ویتامین D3 بر میزان نیتریک اکساید در بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس

دکتر کیوان قسامی<sup>1</sup>، علی قضاوی<sup>2</sup>، یحیی ژند<sup>3</sup>، محمد علی پابانی<sup>4</sup>، محمود رضا خزایی<sup>4</sup>، دکتر قاسم مسیبی<sup>5</sup>\*

- 1- استادیار، متخصص نورولوژی، گروه داخلی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
  - 2- مربی، کارشناس ارشد ایمونولوژی، گروه ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
  - 3- دکترای حرفه ای، اراک، ایران
  - 4- کارشناس آزمایشگاه ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
  - 5- دانشیار، دکترای ایمونولوژی، مرکز تحقیقات پزشکی، ملکولی، گروه ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
- تاریخ دریافت 88/11/17، تاریخ پذیرش 88/12/5

## چکیده

**زمینه و هدف:** مولتیپل اسکلروزیس از دسته بیماری‌های خود ایمن مزمن سیستم عصبی مرکزی با اتیولوژی ناشناخته است. ویتامین D3 توان تعدیل سیستم ایمنی را دارد. نیتریک اکساید یکی از عوامل مخرب سیستم ایمنی و یک فاکتور مهم در تخریب میلین است. در این مطالعه اثر مصرف کوتاه مدت ویتامین D3 بر میزان نیتریک اکساید در بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس مورد بررسی قرار گرفت.

**مواد و روش‌ها:** در مطالعه کارآزمایی بالینی دو سوکور حاضر 60 بیمار مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس به طور تصادفی در دو گروه مورد و شاهد تقسیم شدند. گروه شاهد (30 بیمار) درمان رایج و گروه مورد (30 بیمار) علاوه بر درمان رایج، ماهانه مقدار 300000 واحد ویتامین D3 به صورت تزریقی به مدت 6 ماه دریافت نمودند. میزان نیتریک اکساید قبل و بعد از درمان در هر دو گروه اندازه گیری شد.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد که سطح نیتریک اکساید در گروه تحت درمان با ویتامین D3 نسبتاً کاهش می‌یابد (از  $12/4 \pm 11/1$  به  $9/8 \pm 8/9$  میکرومول در لیتر) ولی این کاهش معنی‌دار نمی‌باشد. در حالی که در گروه کنترل میزان نیتریک اکساید افزایش می‌یابد (از  $18/4 \pm 17/07$  به  $22/07 \pm 16/8$  میکرومول در لیتر).

**نتیجه‌گیری:** ویتامین D3 هر چند تولید نیتریک اکساید را کاهش داده ولی این کاهش معنی‌دار نیست. لازم است مطالعات بیشتری به منظور ضرورت استفاده از ویتامین D3 در درمان بیماری انجام شود.

**واژگان کلیدی:** مولتیپل اسکلروزیس، نیتریک اکساید، ویتامین D3

## مقدمه

مولتیپل اسکلروزیس (Multiple Sclerosis- MS) یک بیماری خود ایمن است که باعث اختلال در سیستم عصبی مرکزی می‌شود. در این بیماری سیستم ایمنی، میلین اطراف آکسون‌های عصبی محیطی و مرکزی را تخریب می‌کند (1). رایج ترین راه درمان این بیماران استفاده از داروهای سرکوب کننده سیستم ایمنی است. مصرف سیستمیک این داروها باعث تضعیف سیستم ایمنی و عوارض دیگری خواهد شد. این بیماری که شیوع آن در ایران 15 تا 30 نفر در هر 100 هزار نفر است، درمان قطعی نداشته و درمان‌های علامتی موجود نیز پر عارضه و گرانقیمت‌اند؛ بنابراین دستیابی به یک روش درمانی کم خطر و ارزان قیمت جهت درمان، کاهش میزان عود و پیشرفت بیماری همچنین تاخیر در بروز ناتوانی‌های فیزیکی سودمند خواهد بود (2).

مطالعات اپیدمیولوژی نشان می‌دهد افرادی که در معرض بیشتر با نور خورشید هستند و یا مواد غذایی سرشار از ویتامین D3 مصرف می‌کنند، کمتر به MS مبتلا می‌شوند (3، 4). مطالعات تجربی بر روی مدل حیوانی این بیماری (آنسفالومیلیت خودایمن تجربی) نیز نشان داد که تجویز این ویتامین در جلوگیری از بیماری موثر است (5-7). در خصوص تأثیر ویتامین D3 در انسان، مطالعات کار آزمایشی محدود و ضد و نقیض وجود دارد که نظر واحدی در خصوص استفاده عام از آن جهت درمان MS ارایه نکرده‌اند (8)؛ به هر حال ارتباط ویتامین D3 و مولتیپل اسکلروزیس به خوبی مشخص نیست. هر چند مطالعات روی مدل حیوانی بیماری نشان می‌دهد که این ویتامین در کاهش عوامل اکسیدان از جمله نیتریک اکساید (Nitric Oxide- NO موثر است (7)، ولی چنین بررسی در مورد بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس وجود ندارد. از طرفی گزارشات نشان می‌دهد که میزان رادیکال‌های آزاد و نیتریک اکساید در این بیماران افزایش یافته و این عوامل در پاتوژنز بیماری نقش دارند (9). ممکن است استفاده از ویتامین D3 به عنوان یک دارو یا مکمل بتواند در درمان بیماری موثر باشد. هدف از انجام این مطالعه تعیین تأثیر

ویتامین D3 بر میزان نیتریک اکساید سرمی بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس است.

## مواد و روش‌ها

این مطالعه یک کارآزمایی بالینی دو سو کور می‌باشد که در بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس استان مرکزی انجام گرفت. پس از تشخیص بیماری توسط پزشک متخصص بر اساس معیارهای کلینیکی و تصویر برداری از مغز، بیماران به طور تصادفی در دو گروه شاهد و مورد (هر گروه 30 بیمار) قرار گرفتند. گروه شاهد درمان رایج به همراه ه پلاسیبو و گروه مطالعه علاوه بر درمان استاندارد ماهانه 300000 واحد بین المللی (IU) ویتامین D3 به صورت تزریقی برای مدت 6 ماه دریافت نمودند.

معیارهای ورود به مطالعه شامل تشخیص قطعی بیماران به مولتیپل اسکلروزیس بود و کسانی که قبلاً ویتامین D3 به صورت قرص یا آمپول دریافت کرده بودند و کسانی که اختلالات کلیوی داشتند از مطالعه حذف شدند. نمونه خون بیماران، قبل از شروع و پس از دوره درمان 6 ماهه، به منظور اندازه گیری میزان نیتریک اکساید گرفته شد. همچنین پارامترهای کلینیکی شامل توانایی حرکتی، درگیری اندام‌های بینایی و حسی، قبل و بعد از درمان مورد بررسی قرار گرفت.

جهت سنجش نیتریک اکساید از روش گریس (Griess) استفاده شد (10). اختصاراً، از محلول 0/1 مولار سدیم نیتريت، یک غلظت 100 میکرومولار تهیه و از این غلظت رقت‌های سریال سه تایی (به عنوان غلظت‌های استاندارد جهت رسم منحنی استاندارد) تهیه گردید. 100 میکرولیتر از هر نمونه سرمی به صورت دوتایی در پلیت 96 حفره‌ای ریخته شد. 100 میکرولیتر از محلول سولفانیل آمید (یک گرم سولفانیل آمید در 100 سی سی اسید فسفوریک 5 درصد) به تمام حفره‌های حاوی نمونه و استاندارد اضافه گردید. پلیت به مدت 10-5 دقیقه در تاریکی و درجه حرارت اتاق انکوبه شد. به تمام حفره‌ها 100 میکرولیتر محلول NED (N-1-نفتیل اتیلن دی آمین دی هیدروکلراید) اضافه و مجدد پلیت به مدت 10-5 دقیقه در

## بحث

مطالعات در مدل حیوانی MS مشخص ساخت که شدت بیماری با وضعیت ویتامین D3 آنها مرتبط است (6، 7، 11). تجویز این ویتامین به موش‌ها از آغاز و پیشرفت بیماری در آنها جلوگیری می‌کند و بر عکس آن کمبود ویتامین باعث افزایش حساسیت آنها به بیماری می‌شود (12). مطالعه حاضر نشان داد که مصرف ویتامین D3 به مدت 6 ماه تاثیری در روند و علائم کلینیکی بیماری ندارد. ماهون و همکاران در سال 2003 با مطالعه روی 39 بیمار مبتلا به MS نشان دادند که مصرف خوراکی ویتامین D3 (25 میکروگرم در روز) تاثیری بر پارامترهای کلینیکی ندارد (13). مطالعه ای دیگر نشان داد که مصرف روزانه 1000 میکروگرم ویتامین D3 به مدت 28 هفته باعث کاهش تعداد پلاک مغزی می‌گردد (14). دو بررسی جداگانه دیگر در تعداد محدودی بیمار نشان داد که مصرف خوراکی این ویتامین منجر به کاهش شدت بیماری می‌گردد (15، 16). علت تناقض در این مطالعات می‌تواند ناشی از جمعیت مورد مطالعه، دوز ویتامین، مدت زمان و روش مصرف باشد.

نیتریک اکساید سنتتاز آنزیمی است که در ساخت NO نقش دارد. اینترفرون گاما عامل اصلی در القاء آنزیم نیتریک اکساید سنتتاز است. NO با سوپراکسید ترکیب شده و پراکسی نیتريت ایجاد می‌کند. پراکسی نیتريت سریعاً تجزیه شده و واسطه‌های بسیار فعالی چون  $\text{NO}_2$  و  $\text{CO}_3$  ایجاد می‌کند. این فرآورده‌ها اثر توکسیک بر CNS دارند (17). نقش NO در ایجاد بیماری MS با مشاهده واحدهای نیترو تیروزین در سلول‌های پلاک‌های مغزی بیماران مبتلا به MS ثابت شده است (18). در مطالعه‌ای نشان داده شد که ویتامین D با کاهش سطح NO باعث کاهش شدت بیمار آنسفالومیلیت خود ایمن در موش می‌شود (19). در خصوص تاثیر ویتامین D3 بر میزان NO در بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس مطالعه ای یافت نشد. نتایج این مطالعه نشان داد که مصرف 6 ماهه ویتامین D3 تاثیری بر سطح نیتریک اکساید ندارد. شاید مصرف طولانی

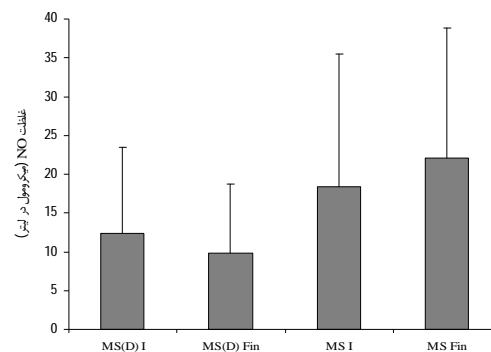
تاریکی و درجه حرارت اتاق انکوبه شد. جذب نوری حداکثر پس از نیم ساعت با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج 530 نانومتر قرائت شد و از روی منحنی استاندارد میزان نیتريت در نمونه‌ها تعیین گردید.

جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون تی زوجی (Paired t-test) استفاده شد. سطح معنی‌داری کمتر از 0/05 در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

بر اساس شدت بیماری در ابتدای مطالعه 54 بیمار (90 درصد) فرم عود کننده - بهبود یافته و 6 بیمار (10 درصد)، فرم پیشرونده ثانویه داشتند که پس از گذشت 6 ماه تغییری در سیر بیماری از نظر کلینیکی مشاهده نشد.

غلظت نیتریک اکساید قبل از درمان و 6 ماه پس از درمان در دو گروه بیماران مبتلا به MS اندازه گیری شد. نتایج نشان داد که غلظت نیتریک اکساید در گروه مطالعه از  $12/4 \pm 11/1$  به  $9/8 \pm 8/9$  میکرومول در لیتر کاهش می‌یابد در حالی که در گروه شاهد پس از گذشت 6 ماه میزان آن افزایش یافت (از  $18/4 \pm 17/07$  به  $22/07 \pm 16/8$  میکرومول در لیتر) ولی این تغییرات معنی‌دار نبود (نمودار 1).



نمودار 1. مقایسه میانگین غلظت نیتریک اکساید (NO) سرم بیماران مبتلا به MS در گروه مورد و شاهد  
 MS(D) I: بیماران گروه مورد پیش از دریافت ویتامین D، MS(D) Fin: بیماران گروه مورد 6 ماه پس از دریافت ویتامین D3  
 MS I: بیماران گروه شاهد در آغاز مطالعه، MS Fin: بیماران گروه شاهد 6 ماه پس از آغاز مورد

effects within the central nervous system. *Acta neuropathologica*. 2003 May;105(5):438-48.

6. Lemire JM, Archer DC. 1,25-dihydroxyvitamin D3 prevents the in vivo induction of murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of clinical investigation*. 1991 Mar;87(3):1103-7.

7. Mosayebi G, Ghazavi A, Payani M. The effect of vitamin D3 on hibition of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *Iran University of Medical Sciences* 2006; 13(52): 189-96.

8. Cantorna MT. Vitamin D and its role in immunology: multiple sclerosis, and inflammatory bowel disease. *Progress in biophysics and molecular biology*. 2006 Sep;92(1):60-4.

9. Sayre LM, Perry G, Smith MA. Oxidative stress and neurotoxicity. *Chemical research in toxicology*. 2008 Jan;21(1):172-88.

10. Bredt DS, Snyder SH. Transient nitric oxide synthase neurons in embryonic cerebral cortical plate, sensory ganglia, and olfactory epithelium. *Neuron*. 1994 Aug;13(2):301-13.

11. Cantorna MT, Hayes CE, DeLuca HF. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 reversibly blocks the progression of relapsing encephalomyelitis, a model of multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996 Jul 23;93(15):7861-4.

12. Muthian G, Raikwar HP, Rajasingh J, Bright JJ. 1,25 Dihydroxyvitamin-D3 modulates JAK-STAT pathway in IL-12/IFN $\gamma$  axis leading to Th1 response in experimental allergic encephalomyelitis. *Journal of neuroscience research*. 2006 May 15;83(7):1299-309.

13. Mahon BD, Gordon SA, Cruz J, Cosman F, Cantorna MT. Cytokine profile in patients with multiple sclerosis following vitamin D supplementation. *Journal of neuroimmunology*. 2003 Jan;134(1-2):128-32.

14. Kimball SM, Ursell MR, O'Connor P, Vieth R. Safety of vitamin D3 in adults with multiple sclerosis. *The American journal of clinical nutrition*. 2007 Sep;86(3):645-51.

15. Goldberg P, Fleming MC, Picard EH. Multiple sclerosis: decreased relapse rate through dietary supplementation with calcium, magnesium and vitamin D. *Medical hypotheses*. 1986 Oct;21(2):193-200.

مدت ویتامین D3 بتواند کاهش معنی داری در سطح NO ایجاد نماید.

### نتیجه گیری

تجویز ویتامین D3 به صورت ماهانه در طی یک دوره 6 ماهه تاثیری بر میزان نیتریک اکساید ندارد. در هر صورت جهت بررسی بیشتر خواص ویتامین D3 و ارتباط آن با بیماری مولتیپل اسکلروزیس به مطالعات بیشتری با تغییر در دوز و مدت زمان مصرف ویتامین نیاز است.

### تشکر و قدردانی

این گزارش حاصل طرح تحقیقاتی شماره 211 مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک می باشد که بدینوسیله از زحمات همه همکاران محترم آن معاونت و شورای محترم پژوهشی تشکر و قدردانی می نمایم.

### منابع

- Lassmann H, Bruck W, Lucchinetti CF. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*. 2007 Apr;17(2): 210-8.
- Bosnjak-Pasic M, Vidrih B, Miskov S, Demarin V. Treatment of multiple sclerosis. *Acta clinica Croatica*. 2009 Sep; 48(3): 349-53.
- Ponsonby AL, Lucas RM, van der Mei IA. UVR, vitamin D and three autoimmune diseases--multiple sclerosis, type 1 diabetes, rheumatoid arthritis. *Photochemistry and photobiology*. 2005 Nov-Dec;81(6):1267-75.
- Van Etten E, Branisteanu DD, Overbergh L, Bouillon R, Verstuyf A, Mathieu C. Combination of a 1,25-dihydroxyvitamin D3 analog and a bisphosphonate prevents experimental autoimmune encephalomyelitis and preserves bone. *Bone*. 2003 Apr; 32(4): 397-404.
- Garcion E, Sindji L, Nataf S, Brachet P, Darcy F, Montero-Menei CN. Treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis in rat by 1,25-dihydroxyvitamin D3 leads to early

16. Nordvik I, Myhr KM, Nyland H, Bjerve KS. Effect of dietary advice and n-3 supplementation in newly diagnosed MS patients. *Acta neurologica Scandinavica*. 2000 Sep;102(3):143-9.
17. Hill KE, Zollinger LV, Watt HE, Carlson NG, Rose JW. Inducible nitric oxide synthase in chronic active multiple sclerosis plaques: distribution, cellular expression and association with myelin damage. *Journal of neuroimmunology*. 2004 Jun;151(1-2):171-9.
18. Xiao BG, Ma CG, Xu LY, Link H, Lu CZ. IL-12/IFN-gamma/NO axis plays critical role in development of Th1-mediated experimental autoimmune encephalomyelitis. *Molecular immunology*. 2008 Feb;45(4):1191-6.
19. Garcion E, Nataf S, Berod A, Darcy F, Brachet P. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits the expression of inducible nitric oxide synthase in rat central nervous system during experimental allergic encephalomyelitis. *Brain research*. 1997 May;45(2):255-67.