

# اثر پیش درمان تزریق مکمل ویتامین D بر سطح کلوتو در مغز رت‌های ماده نژاد لوئیز مبتلا به آنسفالومیلیت خودایمن تجربی

سیده فاطمه فاطمی<sup>۱</sup>، ضیاء فلاح محمدی<sup>۲\*</sup>، وحید طالبی<sup>۳</sup>، سید مجتبی حسینی<sup>۴</sup>

## مقاله پژوهشی

**مقدمه:** هدف از این مطالعه بررسی تاثیر پیش گیرانه یک دوره مصرف ویتامین D بر سطح کلوتو در مغز رت‌های ماده مبتلا به آنسفالومیلیت خود ایمن تجربی بود.

**روش بررسی:** در این مطالعه آزمایشگاهی تجربی، ۲۵ رت‌های ماده نژاد لوئیز، بعد از ۲ هفته آشنایی با محیط جدید، به ۵ گروه: ۱- کنترل سالم، ۲- کنترل ام اس، ۳- حلال، ۴- مکمل سالم، ۵- مکمل ام اس، تقسیم شدند. گروه مکمل به مدت ۲ هفته، ۲ نانوگرم ویتامین D در ۰/۲ میلی لیتر روغن کنجد، یک روز در میان به صورت درون صفاقی دریافت کردند. به منظور القاء EAE، به هر حیوان میزان ۰/۴ میلی لیتر از محلول ترکیبی نخاع خوکچه هندی و ادجوانت به نسبت برابر، تزریق شد. تجزیه و تحلیل داده‌های سطح کلوتو با استفاده از آزمون one way ANOVA و آزمون تعقیبی Tukey و برای بررسی تغییرات وزن گروه‌های تحقیق از آزمون ناپارامتری من ویتنی در سطح معنی داری پنج درصد استفاده شد. سطح کلوتو به روش الیزا اندازه‌گیری شد.

**نتایج:** بین سطح کلوتو بافت مغز گروه کنترل ام اس در مقایسه با گروه کنترل سالم تفاوت معناداری وجود داشت ( $P=0/0001$ ). سطح کلوتو بافت مغز گروه مکمل ام اس در مقایسه با گروه کنترل ام اس افزایش معناداری نشان داد ( $P=0/0001$ ). هم چنین وزن گروه ویتامین D مبتلا به EAE بیشتر از گروه کنترل ام اس بود ( $P=0/006$ ).

**نتیجه‌گیری:** پیش‌درمان با استفاده از مکمل ویتامین D توانست باعث افزایش سطح کلوتو بافت مغز شود و احتمالی تواند نقش محافظتی روی سطح کلوتو بافت مغز در برابر EAE داشته باشد.

**واژه‌های کلیدی:** ویتامین D، کلوتو، آنسفالومیلیت خود ایمن تجربی

**ارجاع:** فاطمی سیده فاطمه، فلاح محمدی ضیاء، طالبی وحید، حسینی سید مجتبی. اثر پیش درمان تزریق مکمل ویتامین D بر سطح کلوتو در مغز رت‌های ماده نژاد لوئیز مبتلا به آنسفالومیلیت خود ایمن تجربی. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۳۹۷؛ ۲۶ (۸): ۶۶۲-۷۰

۱- کارشناس ارشد فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

۲- دانشیار، دانشکده علوم ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

۳- دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

۴- دکتری فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

\* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۹۱۱۱۱۲۷۶۳۳، پست الکترونیکی: zia-falm@umz.ac.ir، کد پستی: ۴۷۴۱۶۹۵۴۴۷

طریق کاهش میزان التهاب، نقش موثری در بهبود و جلوگیری از گسترش این بیماری ایفا کند (۷). کاهش سطح ویتامین‌های آنتی‌اکسیدانی از جمله رتینول، آسکوربیک اسید، و ویتامین D با افزایش بار اکسایشی مرتبط است. به همین دلیل مصرف این مواد به دلیل نقش آنتی‌اکسیدانی و تنظیم‌کنندگی سیستم ایمنی، بسیار حائز اهمیت می‌باشد (۸).

مطالعات اپیدمیولوژی نشان می‌دهد در مناطقی که در معرض بیشتر نور خورشید هستند، به دلیل نقش مهمی که اشعه ماوراء بنفش در تولید ویتامین D<sub>3</sub> دارد شیوع ام‌اس کمتر است. هم‌چنین در جوامعی که غذاهای سرشار از ویتامین D مصرف می‌کنند شیوع و شدت بیماری کمتر می‌باشد. این مطالعات نشان از ارتباط ویتامین D با این بیماری دارد (۹). مطالعات تجربی بر روی مدل حیوانی این بیماری (آنسفالومیلیت خودایمن تجربی) نیز نشان می‌دهد که تجویز ویتامین D<sub>3</sub> در جلوگیری از experimental autoimmune EAE encephalomyelitis موثر است (۱۰). با آن که مسیرهای سیگنالی مختلفی برای تاثیر حفاظتی ویتامین دی مطرح شده‌اند با این حال هنوز سوالات بی‌پاسخی باقی مانده‌اند. از جمله مسیرهای سیگنالی محافظت سلولی کلوتو می‌باشد که نقش حفاظت نرونی آن مطرح شده است. سوالی که در این جا مطرح می‌شود این است که آیا ویتامین دی از طریق افزایش سطح کلوتو از نرون‌های دستگاه عصبی مرکزی در برابر عوامل تولیدکننده بیماری ام‌اس محافظت می‌کند؟ بنابراین هدف از مطالعه حاضر بررسی تاثیر پیش‌درمان یک دوره مصرف ویتامین D بر سطح کلوتو بافت مغز رت‌های مبتلا به آنسفالومیلیت خودایمن تجربی (EAE) بود.

### روش بررسی

در این مطالعه آزمایشگاهی تجربی ۲۵ سر موش ۴ هفته‌ای ماده نژاد لوئیز با میانگین وزنی  $111/3 \pm 1/60$  گرم از شرکت داروپخش تهران تهیه شدند. بعد از دو هفته نگهداری موش‌ها در آزمایشگاه جوندگان به منظور سازگاری با محیط تقسیم شدند. (۱) گروه حلال: گروهی که تنها روغن کنجد را به صورت درون صفاقی به عنوان حلال دریافت کردند؛ (۲) گروه کنترل

مولتیپل اسکلروزیس (multiple sclerosis MS) یک بیماری خود ایمنی، التهابی و مزمن در سیستم عصبی مرکزی می‌باشد. شایع‌ترین زمان بروز این بیماری بین سنین ۲۰ تا ۴۰ سالگی می‌باشد و در جمعیت کلی، زنان، ۲ برابر مردان به این بیماری دچار می‌شوند (۱).

علت اصلی ام‌اس هنوز ناشناخته است با این وجود از دلایل اصلی دمیلینه شدن در سیستم عصبی مرکزی می‌توان به عوامل ژنتیکی، محیطی و فاکتورهای ایمنی اشاره کرد. مرگ سلولی نورون‌های آپوپتوز شده، باعث تحریک دمیلیناسیون در سیستم عصبی مرکزی می‌شود (۲). ام‌اس با اثر سلول‌های ایمنی خودکار بر سیستم عصبی مرکزی مشخص می‌شود که در پی آن، منجر به التهاب، دمیلینه شدن و تخریب آکسونی می‌شود (۳). استرس‌های اکسایشی نقش مهمی در پاتوژنز این بیماری دارند و بیان بیومارکرهای استرس اکسایشی مختلف در مغز، به طور گسترده باعث تخریب الیگودندروسیت‌ها و نورون‌ها و در نهایت آپوپتوز سلول‌های عصبی و آسیب‌های پروتئینی و لیپیدی در سیستم عصبی مرکزی می‌شود (۴).

به دلیل کاهش معنی‌دار در کل ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سرمی بیماران مبتلا به ام‌اس و به دلیل اهمیتی که استرس‌های اکسایشی در گسترش این بیماری دارند، شناخت فاکتورهایی که نقش محافظتی در برابر آسیب‌های نرونی ناشی از مسیرهای اکسایشی و دمیلینه شدن دارند، نیز مهم است (۵). پروتئین کلوتو از جمله این عوامل می‌باشد که نقش مهمی در محافظت نورون‌ها در برابر آسیب‌های اکسایشی از طریق مکانیزم‌های گوناگون ایفا می‌کند؛ بدین صورت که می‌تواند از طریق فعال کردن مسیرهای مختلف باعث گسترش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و کاهش سطح رادیکال‌های آزاد شود. از سوی دیگر، نتایج بسیاری از مطالعات در مدل‌های حیوانی نشان می‌دهد که کلوتو نقش مهمی در میلین‌سازی ایفا می‌کند (۶). با توجه به اینکه ام‌اس یک بیماری التهابی سیستم عصبی مرکزی می‌باشد و عدم تعادل در T-helper 1 (Th1) / T-helper 2 (Th2) در این بیماری دیده شده است، کلوتو می‌تواند از

EAE در ابتدای هفته هفتم تمرینات القاء شد. مقیاس ارزیابی شدت بیماری شامل؛ ۰- عدم بروز بیماری، ۱- فلج شدن دم، ۲- اختلال در راه رفتن، ۳- فلج پاهای عقبی، ۴- فلجی چهار دست و پا و ۵- مرگ بود (۱۲).

#### بافت برداری

بافت برداری بلافاصله بعد از بروز علائم صورت گرفت. ابتدا، موش ها با ترکیب کتامین زایلازین به نسبت ۵ به ۳ بیهوش شدند. پس از بیهوش شدن کامل حیوان، بافت مغز برای انجام مراحل بعدی آزمایش برداشته شد. بافت ها برای اندازه گیری میزان شاخص های مورد نظر در یخچال با دمای کمتر از ۷۰- درجه نگهداری شدند. بعد از هموژنیز و سانتریفیوژ کردن میزان غلظت *klotho* گروه ها با استفاده از روش ELISA و به وسیله کیت آزمایشگاهی شرکت Zellbio GmbH(Germany) اندازه گیری شد.

#### تجزیه و تحلیل آماری

در این پژوهش به منظور بررسی تفاوت های موجود در سطح کلو تو بین گروه ها از آنالیز واریانس یک طرفه استفاده شد. هم چنین آزمون تعقیبی توکی برای تعیین تفاوت بین گروه ها به کار رفت. علاوه بر این، بررسی نرمال بودن توسط آزمون کولموگروف اسمیرنوف انجام گرفت. برای بررسی میانگین وزن گروه های مختلف تحقیق از آزمون ناپارامتری من ویتنی استفاده شد. در این بررسی ها، سطح معناداری کوچک تر و مساوی ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. تمامی تجزیه و تحلیل های آماری به وسیله نرم افزار spss نسخه ۱۹ انجام شد.

#### ملاحظات اخلاقی

پروپوزال این تحقیق توسط دانشگاه مازندران تایید شده است (کد اخلاق IR.UZ.REC.097003).

#### نتایج

با بررسی تغییرات وزن گروه های مختلف تحقیق، مشخص شد که میانگین وزن گروه کنترل ام اس نسبت به گروه کنترل سالم تفاوت معنی داری داشت ( $P=0/006$ ). به عبارت دیگر القای EAE موجب کاهش معنی دار وزن آزمودنی ها شد. از طرف دیگر، میانگین وزن گروه ویتامین D ام اس با گروه کنترل

سالم که هیچ تیماری را دریافت نکردند و برای تعیین مقادیر پایه در نظر گرفته شدند؛ ۳ گروه کنترل بیمار: گروهی که EAE به آن القاء شد ۴) گروهی که در طول آزمایش تنها ویتامین D دریافت کردند ۵) گروهی که ابتدا ویتامین D دریافت کردند و سپس EAE به آن القاء شد. کلیه گروه ها به صورت آزاد به آب و غذا دسترسی داشتند. جهت تطابق با محیط جدید، حیوانات به صورت گروه هایی پنج تایی در قفس پلی کربنات شفاف در محیطی با دمای ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی گراد در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی با رطوبت نسبی ۴۵-۵۵ درصد نگهداری شدند.

ویتامین  $D_3$  از شرکت دارویی کایمن (آلمان) تهیه شد. مقدار ۲ نانوگرم ویتامین D در ۰/۲ میلی لیتر روغن کنجد حل شده و به مدت دو هفته، یک روز در میان با سرنگ انسولینی به صورت درون صفاقی به هر حیوان تزریق شد. به منظور جلوگیری از عفونت، محل تزریق قبل و بعد از تزریق به وسیله پنبه ای آغشته به الکل ضد عفونی شد. انتخاب دوز تزریقی ویتامین در این مطالعه براساس مطالعات مشابه ای بود که از این ویتامین جهت پیشگیری و حفاظت عصبی در برابر آثار سم عصبی القاء کننده بیماری MS در مدل های حیوانی استفاده شده است (۱۱).

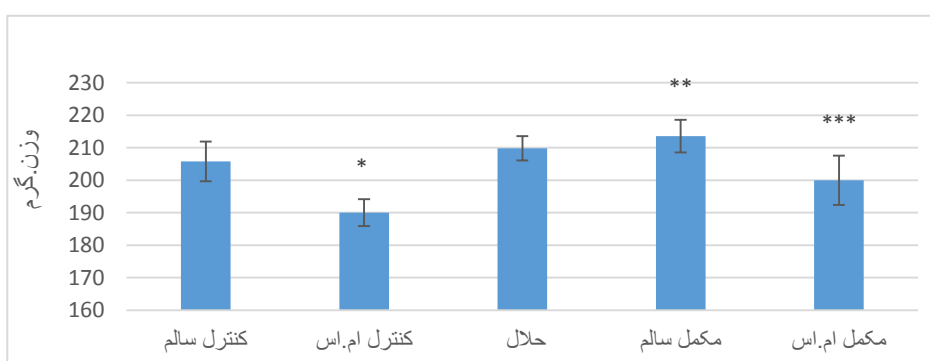
#### القاء EAE و علائم بالینی

به منظور القاء EAE در حیوانات از مخلوطی از نخاع خوکچه هندی و ادجوانت استفاده شد. بدین منظور ابتدا ۵ سر خوکچه هندی از انستیتو پاستور تهران خریداری شد و پس از بیهوشی به وسیله کتامین، نخاع آن برای انجام مراحل بعدی آزمایش خارج شد. پس از منتقل کردن نخاع به داخل میکروتیوب، و فریز کردن بافت در داخل ازت (نیتروژن مایع) نخاع فریز شده درحالی که در مایع شناور بود، کوبیده شد. بافت کوبیده شده و ادجوانت خریداری شده از شرکت سیگما با نسبت ۱ به ۱ داخل فالکون ریخته شد و در دستگاه شیکر قرار گرفت تا به طور کامل مخلوط شود. بعد از بیهوش کردن موش-ها به وسیله مخلوطی از کتامین زایلازین، به هر حیوان مقدار ۰/۴ml از محلول حاصل، در پایه دم حیوان، تزریق شد. مدل

آنسفالومیلیت خودایمن تجربی (*EAE*) در گروه کنترل ام اس نسبت به گروه کنترل سالم کاهش معنی داری دارد ( $P=0/001$ ). این نتایج نشان دهنده این مطلب می باشد که احتمالاً القاء مدل تجربی ام اس تاثیر کاهشی معنی داری بر مقدار کلوتو دارد. از سوی دیگر، سطح کلوتو بافت مغز موش های مبتلا به آنسفالومیلیت خودایمن تجربی در گروه مکمل ام اس در مقایسه با گروه کنترل ام اس افزایش معنی داری داشت ( $P=0/001$ ) (نمودار ۲).

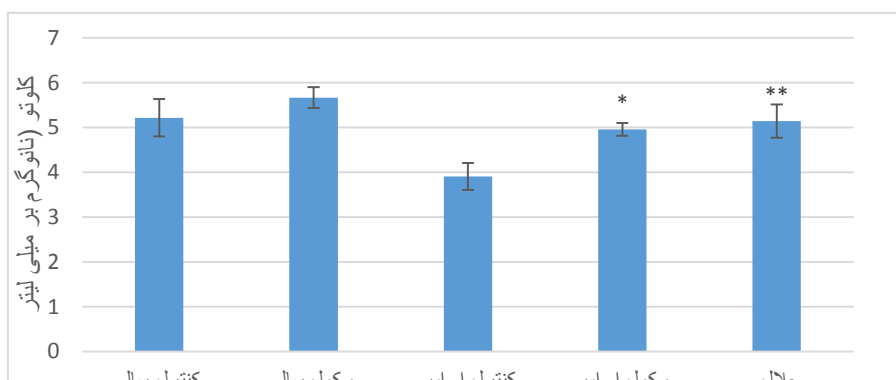
ام اس نیز تفاوت معنادار ( $P=0/02$ ) داشت، که نشان دهنده تاثیر افزایشی ویتامین دی روی مقادیر وزن گروه مصرف کننده مکمل بود.

هم چنین بین گروه کنترل سالم و ویتامین D سالم تفاوت معنادار ( $P=0/05$ ) وجود داشت. از سوی دیگر بین گروه کنترل سالم و ویتامین D ام اس تفاوت معنادار مشاهده نشد ( $P \geq 0/05$ ) (نمودار ۱). نتیجه حاصل از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه نشان داد که سطح کلوتو در بافت مغز موش های مبتلا به



نمودار ۱: میانگین وزن گروه های مختلف تحقیق

\* تفاوت معنادار با کنترل سالم، مکمل سالم



نمودار ۲: میانگین سطح کلوتو گروه های مختلف تحقیق

\*\* تفاوت معنادار با گروه کنترل ام اس و مکمل سالم \*\*\* تفاوت معنادار با گروه کنترل ام اس

وزن گروه مکمل ام اس با کنترل سالم و کنترل ام اس، نشان داد که تزریق ویتامین D باعث جلوگیری از کاهش وزن ناشی از القاء *EAE* شد. هم چنین نتیجه دیگر مطالعه حاضر، افزایش معنی دار سطح کلوتو در گروه مکمل ام اس نسبت به گروه کنترل ام اس ناشی از تزریق ویتامین D بود. به عبارت دیگر، تیمار ویتامین D نقش محافظتی در برابر سم *EAE* داشته و از

## بحث

هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر حفاظتی ۲ هفته مصرف ویتامین D بر سطح کلوتو مغز موش های صحرایی مبتلا به آنسفالومیلیت خود ایمن تجربی بود. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میانگین وزن گروه کنترل ام اس به طور معناداری نسبت به گروه کنترل سالم کمتر بود. از سوی دیگر، مقایسه میانگین

اکساید، در پاسخ به التهاب می‌شود. سطوح بالای از نیتریک-اکساید در مونوسیت، هم چنین میزان زیاد نیتريت و نیترات در مایع مغزی نخاعی بیماران مبتلا به ام‌اس وجود دارد. بنابراین مصرف آنتی‌اکسیدان‌ها می‌تواند نقش مهمی در کاهش آسیب و کمک به بقای بافت عصبی شود چرا که می‌تواند باعث کاهش سطح رادیکال‌های آزاد و در نتیجه مهار پیشرفت بیماری شود (۲۶). از سوی دیگر، 1,25(OH)2D3 باعث افزایش آنتی-اکسیدان‌ها در نوروها می‌شود (۲۷). ویتامین D<sub>3</sub> با مهار mRNA نیتریک اکساید سنتتاز و با مهار سیتوکاین‌های پیش التهابی به طور معنی داری تولید نیتریک اکساید (شاخص استرس اکسایشی) را کاهش می‌دهد (۲۸). از آن جا که نیتریک اکساید سنتتاز در سرکوب رونویسی ژن کلوتو نقش دارد (۲۹)، با توجه به افزایش سطح کلوتو در پژوهش حاضر، می‌توان این احتمال را مطرح نمود که ویتامین D از طریق مهار بیان نیتریک اکساید سنتتاز، باعث افزایش سطح کلوتو می‌شود.

### نتیجه گیری

به طور خلاصه تحقیق کنونی اولین پژوهشی است که تاثیر مصرف ویتامین D را بر سطح کلوتو بافت مغز رت‌های مبتلا به آنسفالومیلیت خودایمن تجربی مورد بررسی قرار داده است و نتایج نشان دهنده افزایش پروتئین در آزمودنی‌های گروه مکمل در مقایسه با گروه کنترل ام‌اس می‌باشد. به عبارت دیگر ویتامین D سطح کلوتو را تنظیم افزایشی کرده است. از سوی دیگر نتایج حاصل از داده‌های وزنی گروه‌های تحقیق، نشان دهنده افزایش معنادار وزن گروه مکمل در مقایسه با گروه کنترل بود و این احتمال را می‌توان مطرح نمود که ویتامین D احتمالاً باعث جلوگیری و پیشگیری از بروز EAE می‌شود.

### سپاسگزاری

این پژوهش حاصل پایان نامه و تلاش نویسندگان این تحقیق می‌باشد که در دانشگاه مازندران انجام شده است. از تمامی افرادی که این پژوهش ما را یاری کردند تشکر می‌شود. در ضمن تمامی منابع مالی توسط محققین پژوهش تامین شده است.

**تعارض منافع:** وجود ندارد.

کاهش سطح این پروتئین جلوگیری کرد. مطالعات مختلف نیز نشان می‌دهد که مصرف فرم فعال ویتامین D از پیشرفت EAE جلوگیری می‌کند. هم چنین نقص یا کمبود ویتامین D حساسیت موش‌ها را به بیماری افزایش می‌دهد (۱۴، ۱۳).

1,25D باعث تحریک بیان mRNA کلوتو می‌شود و این نشان می‌دهد که 1,25D قادر به تقویت پاسخ FGF23 Fibroblast growth factor 23 و افزایش ترشح کلوتو است (۱۵)؛ کلوتو به عنوان عامل موثر در افزایش مقاومت سلول‌ها، باعث فعال شدن Forkhead box FOXO و افزایش بیان سوپراکسیددیسموتاز، و در نتیجه تسهیل حذف گونه‌های فعال و افزایش مقاومت به استرس اکسیداتیو و کاهش عوامل القاء کننده اختلال در عملکرد مانند آپوپتوز سلولی ناشی از استرس‌های اکسیداتیو می‌شود (۱۶، ۱۷). از سوی دیگر کلوتو نقش مهمی در کاهش میزان التهاب دارد (۱۸). مکانیسم‌های متعددی در خصوص تأثیر ویتامین D<sub>3</sub> در جلوگیری یا مهار EAE و MS ذکر شده اند (۱۹). یافته‌ها نشان می‌دهد که ویتامین D<sub>3</sub> در تعدیل پاسخ‌های ایمنی نقش دارد (۲۰، ۲۱)؛ بدین صورت که ممکن است با مهار تولید سیتوکاین‌های التهابی موجب کاهش فراخوانی سلولی به محل التهاب و سایتوکاین‌هایی نظیر IFN- $\gamma$  شود که از این طریق باعث کاهش تکثیر سلولی در محل التهاب می‌شود (۲۲).

مطالعات نشان از دخالت پاسخ‌های ایمنی سلولی نوع TH1 در پاتوژنز بیماری مولتیپل اسکلروزیس و EAE دارد (۲۳، ۲۲). کمبود ویتامین D در سیستم ایمنی موجب کاهش سطح TH2 نسبت به سایر سلول‌های دخیل در مسیر التهاب مانند TH1 می‌گردد. این امر در MS موجب آسیب بیشتر به میلین اطراف سیستم عصبی مرکزی می‌شود. 1,25(OH)2D3 فعال، باعث افزایش سایتوکین‌های TH2 و از طرف دیگر، مانع سنتز سیتوکین‌های TH1 می‌شوند (۲۴). و از طریق القاء آپوپتوز (مرگ برنامه ریزی شده) در سلول‌های التهابی از پیشرفت بیماری EAE جلوگیری می‌کند (۲۵). استرس‌های اکسایشی نقش مهمی در گسترش این بیماری ایفا می‌کنند. در سیستم عصبی مرکزی، نیتریک اکساید سنتتاز باعث تولید نیتریک-

## References:

- 1-Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. *Immunopathology of multiple sclerosis*. Nature Reviews Immunology 2015; 15: 545-58.
- 2-Jin JJ, Ko IG, Kim SE, Shin MS, Kim SH, Jee YS. *Swimming exercise ameliorates multiple sclerosis-induced impairment of short-term memory by suppressing apoptosis in the hippocampus of rats*. J Exer Rehabil 2014; 10(2): 69-74.
- 3-Steinman L. *Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system*. Cell 1996; 85(3): 299-302.
- 4-Tasset I, Agüera E, Sánchez-López F, Feijóo M, Giraldo AI, Cruz AH, et al. *Peripheral oxidative stress in relapsing–remitting multiple sclerosis*. Clin Biochem 2012; 45(6): 440-4.
- 5-Aleagha MSE, Siroos B, Ahmadi M, Balood M, Palangi A, Haghghi AN, et al. *Decreased concentration of Klotho in the cerebrospinal fluid of patients with relapsing–remitting multiple sclerosis*. J Neuroimmunology 2015; 281: 5-8.
- 6-Zeldich E, Chen C-D, Colvin TA, Bove-Fenderson EA, Liang J, Zhou TBT, et al. *The neuroprotective effect of Klotho is mediated via regulation of members of the redox system*. J Biological Chem 2014; 289(35): 24700-15.
- 7-Teocchi MA, Ferreira AÉD, de Oliveira EPdL, Tedeschi H, D'Souza-Li L. *Hippocampal gene expression dysregulation of Klotho, nuclear factor kappa B and tumor necrosis factor in temporal lobe epilepsy patients*. J Neuroinflammation 2013; 1;(10):53.
- 8-Gilgun-Sherki Y, Melamed E, Offen D. *The role of oxidative stress in the pathogenesis of multiple sclerosis: the need for effective antioxidant therapy*. J Neurol 2004; 251(3): 261-8.
- 9-Schwarz S, Leweling H. *Multiple sclerosis and nutrition*. Multiple Scler 2005; 11(1): 24-32.
- 10- Van Etten E, Branisteanu D, Overbergh L, Bouillon R, Verstuyf A, Mathieu C. *Combination of a 1, 25-dihydroxyvitamin D 3 analog and a bisphosphonate prevents experimental autoimmune encephalomyelitis and preserves bone*. Bone 2003; 32(4): 397-404.
- 11- Sherlin DG, Verma R. *Vitamin D ameliorates fluoride-induced embryotoxicity in pregnant rats*. Neurotoxicology teratology 2001; 23(2): 197-201.
- 12- Pazhoohan S, Satarian L, Asghari A-A, Salimi M, Kiani S, Mani A-R, et al. *Valproic Acid attenuates disease symptoms and increases endogenous myelin repair by recruiting neural stem cells and oligodendrocyte progenitors in experimental autoimmune encephalomyelitis*. Neurodegenerative Dis 2013; 13(1): 45-52.
- 13- Cantorna MT. *Vitamin D and autoimmunity: is vitamin D status an environmental factor affecting autoimmune disease prevalence?* Proceedings of the society for Experimental Biology Med 2000; 223(3): 230-3.
- 14- Spach KM, Hayes CE. *Vitamin D3 confers protection from autoimmune encephalomyelitis only in female mice*. The J Immunol 2005; 175(6): 4119-26.

- 15- Forster RE, Jurutka PW, Hsieh J-C, Haussler CA, Lowmiller CL, Kaneko I, et al. *Vitamin D receptor controls expression of the anti-aging klotho gene in mouse and human renal cells*. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 414(3): 557-62.
- 16- Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, Gurnani P, Nandi A, Kurosu H, et al. *Regulation of oxidative stress by the anti-aging hormone klotho*. *J Bio Chem* 2005; 280(45): 38029-34.
- 17- Kokkinaki M, Abu-Asab M, Gunawardena N, Ahern G, Javidnia M, Young J, et al. *Klotho regulates retinal pigment epithelial functions and protects against oxidative stress*. *The J Neurosci* 2013; 33(41):16346-59.
- 18- Kuwahara N, Sasaki S, Kobara M, Nakata T, Tatsumi T, Irie H, et al. *HMG-CoA reductase inhibition improves anti-aging klotho protein expression and arteriosclerosis in rats with chronic inhibition of nitric oxide synthesis*. *Int J Cardiol* 2008; 123(2): 84-90.
- 19- Mana P, Linares D, Fordham S, Staykova M, Willenborg D. *Deleterious role of IFN $\gamma$  in a toxic model of central nervous system demyelination*. *Am J pathol* 2006;168(5): 1464-73.
- 20- Imazeki I, Matsuzaki J, Tsuji K, Nishimura T. *Immunomodulating effect of vitamin D3 derivatives on type-1 cellular immunity*. *Biomed Res* 2006; 27(1): 1-9.
- 21- Lemire J. *1, 25-Dihydroxyvitamin D3—a hormone with immunomodulatory properties*. *Zeitschrift für Rheumatologie* 2000; 59(1): I24-I7.
- 22- Mattner F, Smiroldo S, Galbiati F, Muller M, Di Lucia P, Poliani PL, et al. *Inhibition of Th1 development and treatment of chronic-relapsing experimental allergic encephalomyelitis by a non-hypercalcemic analogue of 1, 25-dihydroxyvitamin D3*. *Eur J immunol* 2000; 30(2): 498-508.
- 23- Mosayebi G, Ghazavi A, Payani MA. *Effect Of Sesame Oil On The Production Of Ifn-Gamma And Il-10 From Th1 And Th2 Cells In C57bl/6 Mice With Experimental Autoimmune* *Medical journal of Tabriz University of Medical sciences* 2007; 29(3).
- 24- Cantorna Mt. *Vitamin D Multiple Sclerosis And Inflammatory Bowel Disease*. *Archives of Biochemistry Biophysics* 2012; 523(1): 103-6.
- 25- Gill D, Tan PH. *Induction of pathogenic cytotoxic T lymphocyte tolerance by dendritic cells: a novel therapeutic target*. *Expert Opin Ther Targets* 2010; 14(8): 797-824.
- 26- Binyamin O, Larush L, Frid K, Keller G, Friedman-Levi Y, Ovadia H, et al. *Treatment of a multiple sclerosis animal model by a novel nanodrop formulation of a natural antioxidant*. *Int J Nanomedicine* 2015; 10: 7165-74.
- 27- Kesby JP, Eyles DW, Burne TH, McGrath JJ. *The effects of vitamin D on brain development and adult brain function*. *Mol Cell endocrinol* 2011; 347(1): 121-7.
- 28- Chang JM, Kuo MC, Kuo HT, Hwang SJ, Tsai JC, Chen H-C, et al. *1- $\alpha$ , 25-Dihydroxyvitamin D 3 regulates inducible nitric oxide synthase messenger RNA expression and nitric oxide release in macrophage-like RAW 264.7 cells*. *J Lab Clin Med* 2004; 143(1): 14-22.
- 29-Moreno JA, Izquierdo MC, Sanchez-Niño MD, Suárez-Alvarez B, Lopez-Larrea C, Jakubowski

A, et al. *The inflammatory cytokines TWEAK and TNFa reduce renal klotho expression through*

*NFκB*. J Am Soc Nephrol 2011; 22(7): 1315-25



## Preventive effect of injections of vitamin D on the levels of Klotho in the brain tissue of female lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis

Seyedeh Fatemeh Fatemi<sup>1</sup>, Ziya Fallah Mohammadi<sup>\*2</sup>, Vahid Talebi<sup>3</sup>, Sayed Mojtaba Hosseini<sup>4</sup>

### Original Article

**Introduction:** The aim of this study was to investigate the effect of vitamin D supplementation on Klotho levels of the brain tissue.

**Methods:** In this laboratory experimental study, 25 female Lewis rats, after 2 weeks adaptation to lab environmental, were randomly divided into 5 groups: 1-control; 2- control+ EAE; 3-sham; 4-vitamin D; 5-vitaminD + EAE.

**Results:** The data were analyzed using one way ANOVA, and to examine the weight changes Mann-Whitney test was used to the research groups. In order to induce EAE, 0.4 ml of solution, a combination of guinea Hindi pig spinal cord and adjuvant ratio was injected to each animal. Klotho levels were measured by ELISA.

**Finding:** There was significantly different in Klotho levels of brain tissue of control+ EAE compared to control group ( $P=0/001$ ). There was significant difference in Klotho levels of the brain tissue in EAE +vitamin D group compared to control group ( $P=0/001$ ). In addition, the weight of vitamin D+EAE group was more than control+EAE group ( $P=0/006$ ).

**Conclusion:** Pre-treatment with vitamin D supplementation increases the Klotho levels of brain tissue and may have protective role against EAE.

**Keywords:** Experimental autoimmune encephalomyelitis, Vitamin D, Klotho.

**Citation:** Fatemi SF, Fallah Mohammadi Z, Talebi V, Hosseini SM. Preventive effect of injections of vitamin D on the levels of Klotho in the brain tissue of female lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2018; 26(8): 662-70.

<sup>1</sup>Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

<sup>2</sup>Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran,

<sup>3</sup>Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

<sup>4</sup>Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

\*Corresponding author: Tel: 09111127633, email: zia-falm@umz.ac.i