

УТИЦАЈ ПРИМЕНЕ АЛФАКАЛЦИДОЛА НА КОНЦЕНТРАЦИЈЕ ЦИТОКИНА У СЕРУМУ КОД ОСОБА ОБОЛЕЛИХ ОД МУЛТИПЛЕ СКЛЕРОЗЕ

Слободан ВОЈИНОВИЋ¹, Јелена ВОЈИНОВИЋ², Владан ЂОСИЋ³, Војин САВИЋ⁴

¹Клиника за неурологију, Клинички центар Ниш, Ниш; ²Дечја интерна клиника, Клинички центар Ниш, Ниш; ³Завод за медицинску биохемију, Ниш; ⁴Клиника за нефрологију, Клинички центар Ниш, Ниш

КРАТАК САДРЖАЈ

Мултипле склероза (МС) настаје као последица деловања генетских и фактора спољашње средине. Географски, генетски и биолошки докази указују на то да један од важних имунопатогенетских фактора може бити и недостатак витамина *D*. У нашој студији је испитан имуномодулациони ефекат алфакалцидола, аналога витамина *D*, на ниво цитокина код болесника с релапсно-ремитентним обликом МС (РРМС) у релапсу. У испитивање је укључено 15 болесника са РРМС у релапсу (РРМС група) и 20 испитаника који су сврстани у две контролне групе; прву групу контрола чинило је 10 неуролошки здравих испитаника, а другу 10 болесника с неинфламационим неуролошким болестима (НИНБ контрола). Терапијски протокол подразумевао је примену 5 μg алфакалцидола у току пет дана (болус) код болесника РРМС групе. Концентрација *TNF- α* , *IL-10*, *IL-4* и *IL-12* (ELISA, Quantikine Human Immunoassay, R&D Systems, UK) одређивана је у серуму свих испитаника оболелих од МС дан пре и дан после завршеног терапијског протокола и у обе контролне групе. Резултати испитивања показали су да код болесника са РРМС у релапсу постоји статистички значајно нижа концентрација *IL-4* и *IL-12* у односу на обе контролне групе ($p < 0,001$), док статистички значајне разлике у нивоима *TNF- α* и *IL-10* није било. Болус терапија високим дозама алфакалцидола код болесника са РРМС у релапсу довела је до статистички значајног повећања концентрација *IL-4* и *IL-12* у серуму ($p < 0,001$), те после терапијског протокола није уочена разлика у концентрацији ових цитокина у поређењу са контролним групама. Витамин *D*, тј. његови аналози, попут алфакалцидола, примењени у великим дозама имају значајан имуномодулациони и потенцијално позитиван ефекат у лечењу болесника оболелих од мултипле склерозе.

Кључне речи: мултипле склероза; витамин *D*; алфакалцидол; цитокини

УВОД

Мултипле склероза (МС) је хетерогена болест (синдром) нејасне етиологије. Посредована је имунолошким механизмима с обележјима аутоимунске болести. Настаје услед дејства генетских и фактора спољашње средине (тзв. *intrinsic* фактори се удружују с факторима спољашње средине, што доводи до развоја болести), односно развија се само код особа с генетском склоношћу, под дејством једног или више фактора спољашње средине [1].

Дејство фактора спољашње средине се огледа у општој варијацији преваленције и инциденције МС. Преваленција расте удаљавањем од Екватора према северу или југу. Цео свет се, практично, може поделити на подручје високе преваленције (50-100/100.000), које обухвата западну и северну Европу, Канаду, САД, Аустралију и Нови Зеланд, и подручје ниске преваленције, које обухвата остатак света [2]. Овакав распоред се не може објаснити генетским факторима (доминантно становништво у зонама високе преваленције је кавкаског порекла), већ је вероватније да је фактор спољашње средине одговоран за чешће јављање болести у подручјима с већом географском ширином.

Голдберг (Goldberg) [3] је први предложио концепт да сунчево зрачење може штитити појединце од развоја МС преко активности витамина *D*, јер се географска подручја с ниском инсолацијом и неадекватном исхраном поклапају с подручјима високе преваленције МС вероватно због последичног смањења стварања витамина *D*. Супротно томе, прева-

ленција МС је мала тамо где је витамина *D* у изобиљу, у сунчаним пределима, вишим надморским висинама и подручјима где је исхрана богата рибом и рибљим уљем.

Ембри (*Embry*) и сарадници [4] су показали да постоји скоро синусоидна годишња варијација у броју активних лезија на налазу нуклеарне магнетне резонанције (НМР) болесника са МС. Највећи број активних лезија код ових болесника јавља се после два месеца од најмање концентрације $25(\text{OH})\text{D}_3$ у серуму, док је најмање активних лезија два месеца после највеће концентрације $25(\text{OH})\text{D}_3$ у серуму, што указује на могући имуномодулациони ефекат витамина *D* на запаљење у централном нервном систему (ЦНС).

Недостатак витамина *D* је потврђен код особа оболелих од МС. Ниво $25(\text{OH})\text{D}_3$ у серуму, који је најбољи индикатор биорасположивости витамина *D*, код 69% испитаних болесника био је, у просеку, знатно мањи од адекватног (само 43 nmol/l), при чему је код 25% болесника забележен изразити недостатак витамина *D* (мање од 25 nmol/l). Осим тога, код болесника са МС густина кости је значајно смањена, у поређењу са здравим особама исте старости и истог пола, што такође указује на неадекватан метаболизам витамина *D*. Густина костију код болесника са МС се од три до седам пута брже смањује, а фрактуре су десет пута чешће у односу на здраве особе исте старости и истог пола. Промене су најизраженије код болесника код којих је утврђена најмања концентрација $25(\text{OH})\text{D}_3$ (мање од 20 ng/ml) [5]. Лечење са $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ потпуно блокира индукцију експерименталног аутоимунског енцефаломијелити-

са (ЕАЕ), као и прогресију развијеног ЕАЕ. С друге стране, мишеви са недостатком витамина *D* показују повећану осетљивост ка развоју ЕАЕ. Мишеви са тешким акутним ЕАЕ се опорављају од парализа неколико дана од почетка лечења са $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ [6]. Природа везе између витамина *D* и МС је засад непозната. Откриће рецептора витамина *D* у ћелијама имунског система потврђује његову улогу у регулацији функција имунског система. Активни метаболит витамина *D* ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) смањује производњу проинфламационих цитокина *IL-2*, *TNF- α* и *TNF- β* , *IFN- γ* , као и *IL-12*, а повећава производњу антиинфламационих цитокина *IL-4* и *TGF- β 1* [7]. Сви горенаведени подаци указују на то да би витамин *D* могао бити есенцијалан за развој МС.

ЦИЉ РАДА

Циљ овог рада је био да се утврде ефекти великих доза алфакалцидола, аналога витамина *D*, на производњу одређених проинфламационих и антиинфламационих цитокина код болесника са релапсно-ремитентним обликом МС у релапсу.

МЕТОД РАДА

Експерименталну групу (РРМС) чинило је 15 болесника (десет жена и пет мушкараца) просечне старости од 37,71 године (*SD* 10,95; опсег 22-52), код којих је болест, у просеку, трајала 6,14 година (*SD* 4,80; опсег 2-15), и са просечним *EDSS* од 3,32 (*SD* 0,87; опсег 2-5), код којих је дошло до погоршања болести, тј. били су у релапсу (појава нових или поновно појављивање или погоршање претходних неуролошких симптома и знака за један степен *EDSS* у трајању од најмање 24 часа) у току највише две недеље пре почетка студије. У експерименталну групу укључени су следећи болесници: а) са дијагнозом клинички дефинитивне мултипле склерозе [8]; б) са релапсно-ремитентним обликом мултипле склерозе (РРМС) [9]; в) мушког и женског пола старости 18-50 година; г) са клинички дефинитивном болешћу у трајању од најмање годину дана; д) са *EDSS* скором $\leq 5,5$ [10]; њ) са најмање две егзацербације у последње две године пре почетка студије; е) код којих се није примењивала имуносупресивна терапија два месеца пре почетка студије; ж) који не болују од других имунолошких или неуролошких болести. Контролне групе чиниле су две групе испитаника: а) контролну групу (контрола) чинило је 10 неуролошки здравих испитаника (седам жена и три мушкараца) истог старосног доба као и испитаници експерименталне групе; б) НИНБ контролну групу (НИНБ контрола) чинило је 10 испитаника (шест жена и четири мушкараца) оболелих од неинфламационих неуролошких болести (два болесника с идиопатском епилепсијом и осам болесника с исхемијским цереброваскуларним инсултом) исте старосне доби као и испитаници експерименталне групе.

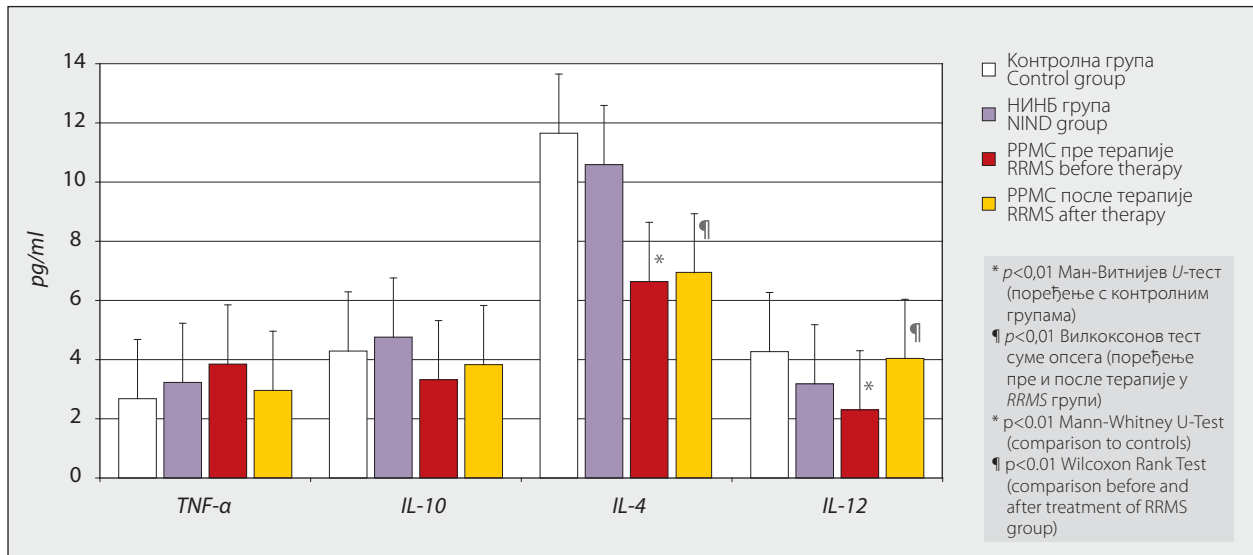
Терапијски протокол у РРМС групи подразумевао је примену $5 \mu\text{g}$ на дан алфакалцидола *per os* то-

ком пет дана. Дневна доза је подељена у две дозе: јутарња – 2/3 и вечерња – 1/3, уз унос два литра течности дневно. Прекид терапијског протокола настукао је код болесника код којих се одржавала хиперкалцемија или хиперкалциурија или код значајног погоршања болести. Концентрација цитокина је одређивана у узорцима серума добијеним дан пре почетка примене терапије и дан по завршетку протокола, као и у једном узорку код свих испитаника у обе контролне групе. Тестирање је вршено *ELISA* техником *Quantikine Human Immunoassay* тестовима (*R&D Systems, UK*), и то за: фактор некрозе тумора алфа (*TNF- α*) – *DTA50*, интерлеукин 4 (*IL-4*) – *D4050*, интерлеукин 10 (*IL-10*) – *D1000* и интерлеукин 12 (*IL-12*) – *D1200*. Интензитет боје мерен је на 450 nm , са корекцијом на 540 nm или 570 nm .

Статистичка обрада резултата у свим групним узорцима вршена је израчунавањем средње вредности, стандардне девијације, стандардне грешке и варијансе. За утврђивање статистичке значајности између испитиваних група коришћени су Студентов *t*-тест, као параметријски тест, и Ман-Витнијев (*Mann-Whitney*) *U*-тест и Вилкоксонов (*Wilcoxon*) тест суме опсега, као непараметријски тестови. За анализу корелација између појединих параметара коришћен је Пирсонов (*Pearson*) линеарни корелациони модел. Статистичка обрада података вршена је применом *SSPS 11.0* софтвера. Сви добијени резултати су приказани нумерички, табеларно и графички.

РЕЗУЛТАТИ

На графикону 1 је приказана концентрација *TNF- α* у серуму, која се није разликовала међу испитиваним групама, тј. није постојала значајна разлика између контролних група и РРМС групе. Примена великих болусних доза алфакалцидола током пет дана није условила статистички значајне промене у концентрацијама *TNF- α* у серуму. Добијене вредности после примене лека нису статистички значајно одступале од вредности у контролним групама. Концентрације *IL-10* се нису статистички значајно разликовале (Графикон 1) међу контролним групама, а истовремено није утврђена значајна разлика између контролних група и РРМС групе пре примене терапије. Примена великих болусних доза алфакалцидола у току пет дана није условила статистички значајне промене у концентрацијама *IL-10* у серуму. Добијене вредности после примене терапије нису статистички значајно одступале од вредности у контролним групама. Из резултата приказаних на графикону 1 види се да су код болесника из РРМС групе забележене статистички значајно ($p < 0,01$) мање концентрације *IL-4* у серуму, у односу на контролну групу здравих испитаника, као и у односу на контролну НИНБ групу болесника ($p < 0,01$). После оралне примене великих доза алфакалцидола код болесника с МС дошло је до статистички значајног ($p < 0,01$) повећања концентрације *IL-4* у серуму које се нису више статистички значајно разликовале од концентрација у контролним групама. Концентрације *IL-12* у серуму у контролним групама нису показивале међусобне статистички значај-



ГРАФИКОН 1. Концентрације *TNF-α*, *IL-10*, *IL-4* и *IL-12* у серумима болесника са РРМС и одговарајућим групама контролних испитаника.
GRAPH 1. TNF-α, IL-10, IL-4, and IL-12 concentrations in serums of RRMS patients and of matching groups of control subjects.

ТАБЕЛА 1. Позитивне корелације концентрација цитокина у серуму код болесника са РРМС пре и после примене алфакалцидола.
TABLE 1. Positive correlation of cytokine levels in serums of RRMS patients before and after alfacalcidol therapy.

PPMC / RRMS	TNF-α	IL-10	IL-4	IL-12
Пре примене терапије Before therapy	$p < 0.01$ за <i>IL-4</i> for <i>IL-4</i>	-	$p < 0.001$ за <i>IL-12</i> for <i>IL-12</i>	$p < 0.05$ за <i>TNF-α</i> for <i>TNF-α</i>
После примене терапије After therapy	$p < 0.05$ за <i>IL-4</i> for <i>IL-4</i>	$p < 0.05$ за <i>IL-4</i> и <i>IL-12</i> for <i>IL-4</i> and <i>IL-12</i>	$p < 0.001$ за <i>IL-12</i> for <i>IL-12</i>	$p < 0.05$ за <i>TNF-α</i> for <i>TNF-α</i>

не разлике (Графикон 1). Вредности *IL-12* у РРМС групи биле су статистички значајно ниже у односу на концентрације у обе контролне групе. После примене алфакалцидола дошло је до статистички значајног повећања концентрације *IL-12* у серуму, тако да вредности нису одступале од оних забележених код испитаника контролних група.

Применом Пирсоновог линеарног корелационог модела испитана је статистичка значајност међусобних корелација у промени нивоа цитокина пре и после примене терапије у РРМС групи (Табела 1). Код болесника са РРМС који су били у релапсу пре лечења установљена је статистички врло високо значајна ($p < 0,001$) позитивна корелација између концентрација *IL-4* и *IL-12* у серуму, статистички високо значајна ($p < 0,01$) позитивна корелација између концентрација *IL-4* и *TNF-α* у серуму, као и статистички значајна ($p < 0,05$) позитивна корелација између концентрација *IL-12* и *TNF-α* у серуму. После примене алфакалцидола и даље су постојале значајне корелације као пре примене терапије, тако да се одржавала статистички врло високо значајна ($p < 0,001$) позитивна корелација између концентрација *IL-4* и *IL-12* у серуму, као и статистички значајна ($p < 0,05$) позитивна корелација између концентрација *IL-4* и *TNF-α* и између концентрација *IL-12* и *TNF-α* у серуму. Лечење алфакалцидомом довело је до статистички значајне ($p < 0,05$) позитивне корелације између концентрација *IL-4* и *IL-10*, као и између концентрација *IL-12* и *IL-10* у серуму.

ДИСКУСИЈА

Мултипле склероза, према најновијим расположивим подацима, пре представља спектар демиелинизационих синдрома него болест. С друге стране, цитокини се производе у целом телу, али имају кратак радијус дејства и делују углавном у локалној средини, имају врло кратак полуживот и брзо се везују за рецепторе локално и у циркулацији, што објашњава тешкоће у њиховом откривању, али и добијене контрадикторне податке.

TNF-α је потврђен у акутним и хроничним активним лезијама код МС, али изостаје код хроничних неактивних лезија, што указује на његову улогу у формирању лезија. Овај цитокин се налази у ћелијама, на ивицама плакова, у астроцитима и пенастим макрофагима, а ређе у ендотелним ћелијама, на ивицама акутних лезија. Повећање броја *TNF-α* позитивних ћелија у слезини и периферној крви није могуће доказати, што значи да се експресија овог цитокина одвија локално у ЦНС [11]. *TNF-α* се налази и у ликвору болесника са МС, а његов ниво може корелирати са тежином и прогресијом болести [12]. Ниво *TNF-α* у ликвору је већи код болесника с активним обликом болести и корелира с оштећењем крвно-мозгане баријере. Према налазима Кофлона (*Chofflon*) и Фељеја (*Fellay*) [13], није било разлике у концентрацији *TNF-α* у серуму између болесника са РРМС у релапсу и контролних испитаника. Наше истраживање је такође показало да нема статистички значајних

разлика у концентрацији *TNF- α* између испитаника РРМС групе и контролних група, као и да примењена терапија алфакалцидолом није изазвала значајне ефекте на концентрацију овог цитокина. Ово је и разумљиво ако се има у виду да се повећана активност *TNF- α* може забележити само у првим сатима од почетка запаљењског процеса, и то првенствено локално, у ткивима захваћеним запаљењем.

У једноједарним ћелијама периферне крви постоји повећана експресија *IL-12* иРНК спонтано током развоја акутних лезија код болесника са РРМС, као и после стимулације ових ћелија мијелин-базичним протеином (МБП) и анти-*CD28* моноклонским антителима, а посебно непосредно пре клиничке појаве релапса. Повишени нивои *IL-12* су откривени у серуму и ликвору болесника са МС, али није утврђена корелација у односу на тежину болести [14]. Поред овог, производња *IL-12* изазвана митогеном је повећана код особа оболелих од МС, у поређењу са здравим испитаницима, али и код оних с акутним обликом МС у односу на болеснике са стабилним обликом МС [15]. Резултати наше студије су показали да је код болесника са РРМС у релапсу концентрација *IL-12* у серуму била смањена, у поређењу са испитаницима контролних група. Разлика у измереним вредностима *IL-12* у различитим студијама вероватно је последица чињенице да је дефиниција релапса условљена клиничким налазом. За развој клиничког налаза неопходно је време, тј. претходно одвијање запаљењског процеса у ЦНС. Стога су разумљиви различити налази за различите цитокине, у зависности од тога да ли су одређивани у ткиву, ликвору или серуму, а посебно у зависности од тренутка када су мерени. У нашој студији лечење алфакалцидолом изазвало је повећање и нормализацију производње овог цитокина. У студијама *in vitro* показано је да лечење витамином *D* супримира диференцијацију претходно стимулираних моноцита у дендритске ћелије, као и да инхибира секрецију *IL-12* и *IL-10* [16]. Такође, у условима *in vitro* витамин *D* може потпуно да заустави даљу диференцијацију дендритских ћелија и лучење свих цитокина *Th1* профила [17]. Различити налази могу бити последица чињенице да витамин *D* може као инхибитор или стимулатор утицати на ћелијске функције у зависности од тога да ли делује на претходно активираним ћелијама или, пак, на ћелијама које мирују. Наиме, комбинована студија *in vitro* и *in vivo* код болесника с реуматоидним артритисом показала је овакав двојни потенцијал алфакалцидола на пролиферацију лимфоцита [18].

Према налазима неких аутора, ниво *IL-10* иРНК је нижи код особа оболелих од МС у односу на здраве испитанике, а експресија се смањује пре и током егзацербација [19]. Резултати нашег испитивања су показали да нема статистички значајних разлика у концентрацији *IL-10* код болесника са РРМС у релапсу у односу на здраве и испитанике са неинфламационим неуролошким болестима. Занимљиво је да Дјуран (*Duran*) и сарадници [20] нису открили разлике у проценту ћелија које производе *IL-10* и *IL-12* између болесника с различитим клиничким облицима болести и здравих испитаника. Код болесника са примарно прогресивним обликом МС утврђен је смањен број *CD4+* Т ћелија које производе *IL-12*,

IL-13 и *TNF- α* , а повећан број *CD8+* Т ћелија које производе *IL-4* и *IL-10* у односу на болеснике са другим клиничким облицима болести и здраве испитанике [21]. *IL-4* је откривен у повећаним концентрацијама пре релапса, а *IL-10* после релапса [22]. Лечење алфакалцидолом није значајно утицало на концентрацију *IL-10* код испитаника укључених у наше истраживање. Концентрација *IL-4* била је статистички значајно мања код болесника са РРМС у релапсу пре примене лека, у односу на испитанике контролне групе, а лечење алфакалцидолом довело је до статистички значајног повећања нивоа *IL-4*, што је омогућило достизање вредности као и код испитаника контролних група. Овакав налаз за *IL-4* је скоро идентичан с резултатима за *IL-12* које смо добили у нашем истраживању, што се може сматрати потпуном супротности у односу на класичну поставку да је *IL-12* цитокин који омогућава усмеравање имунске регулације у правцу одговора типа *Th1*. Регулација имунског одговора *in vivo* је толико сложена, да стриктна подела на *Th1* и *Th2* тип регулације није могућа, чему у прилог говори и налаз позитивних корелација концентрација цитокина који су показани у нашој студији. Линк (*Link*) [23] је вероватно најправилније дефинисао имунорегулацију код МС када је закључио да је МС вероватно удружена са цитокинском „олујом”, која се одликује огромном повећаном регулацијом свих нивоа цитокина, како на нивоу иРНК, тако и на нивоу лучења.

Према налазима наше студије, може се претпоставити да се алфакалцидол понаша као стабилизатор функција ћелије, са тенденцијом поновног увођења природне регулационе равнотеже и успостављања начина регулације какав постоји код здравих људи. Другим речима, „олују” цитокина, коју описује Линк, доводи у стање природне равнотеже. Сазнања везана за значај и улогу витамина *D* посебно су актуелна последњих година, када се сазнало да он може утицати на диференцијацију и аксоналну адхезију олигодендроцита током развоја мозга, као и да релативни недостатак витамина *D* може повећати апоптозу олигодендроцита [24]. Имајући ово у виду, реално је претпоставити да ће примена витамина *D* у лечењу особа оболелих од мултипле склерозе добити све већи значај у клиничкој пракси.

ЗАКЉУЧАК

Резултати нашег истраживања показују да алфакалцидол примењен орално у великим дозама има имуномодулационо дејство на регулацију нивоа цитокина код болесника са РРМС у релапсу. За утврђивање вероватног позитивног ефекта лечења неопходно је урадити обимнију клиничку студију која би обухватила и НМР евалуацију.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ebers GC, Dyment DA. Genetics of multiple sclerosis. *Seminars in Neurology* 1998; 18:295-9.
2. Sadovnick AD, Ebers GC. Epidemiology of multiple sclerosis: a critical overview. *Can J Neurol Sci* 1993; 20:17-29.

3. Goldberg P. Multiple sclerosis: vitamin D and calcium as environmental determinants of prevalence (a viewpoint). Part 1: Sunlight, dietary factors and epidemiology. *Int J Environ Stud* 1974a; 6:19-27.
4. Embry AF, Snowdon LR, Vieth R. Vitamin D and seasonal fluctuations of gadolinium enhancing magnetic resonance imaging lesions in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2000; 48:271-2.
5. Nieves J, Cosman F, Herbert J, et al. High prevalence of vitamin D deficiency and reduced bone mass in multiple sclerosis. *Neurology* 1994; 44:1687-92.
6. Cantorna MT, Hayes CE, DeLuca HF. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 reversibly blocks the progression of relapsing encephalomyelitis, a model of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 7861-4.
7. Lemire JM, Archer DC, Back L, et al. Immunosuppressive action of 1,25-dihydroxyvitamin D3. Preferential inhibition of Th1 functions. *J Nutr* 1995; 125:1704S-8S.
8. McDonald WI, Compston A, Edan G, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the international panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001; 50:121-7.
9. Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: Results of an international survey. *Neurology* 1996; 46:907-11.
10. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983; 33: 1444-52.
11. Selmaj KW, Raine CS, Cannella B, et al. Identification of lymphotoxin and tumor necrosis factor in multiple sclerosis lesions. *J Clin Invest* 1991; 87:949-54.
12. Drulovic J, Mostarica-Stojkovic M, Levic Z, et al. Interleukin-12 and tumor necrosis factor-alpha levels in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *J Neurol Sci* 1997; 147:145-50.
13. Chofflon M, Fellay B. Monitoring multiple sclerosis course and activity with TNF- α . *Mult Scl* 1998; 4:188-92.
14. Clerici M, Saresella M, Trabattoni D, et al. Single-cell analysis of cytokine production shows different immune profiles in multiple sclerosis patients with active or quiescent disease. *J Neuroimmunol* 2001; 121:88-101.
15. Ferrante P, Fusi ML, Saresella M, et al. Cytokine production and surface marker expression in acute and stable multiple sclerosis: altered IL-12 production and augmented signaling lymphocytic activation molecule (SLAM)-expressing lymphocytes in acute multiple sclerosis. *J Immunol* 1998; 160:1514-21.
16. Lyakh LA, Sanford M, Chekol S, et al. TGF- β and vitamin D3 utilize distinct pathways to suppress IL-12 production and modulate rapid differentiation of human monocytes into CD83+ dendritic cells. *J Immunol* 2005; 174(4):2061-70.
17. Gauzzi MC, Purificato C, Donato K, et al. Suppressive effect of 1- α , 25-dihydroxyvitamin D3 on type I IFN-mediated monocyte differentiation into dendritic cells: impairment of functional activities and chemotaxis. *J Immunol* 2005; 174(1):270-6.
18. Anđelković Z, Vojinović J, Pejinović N, et al. Disease modifying and immunomodulatory effect of high dose 1 α (OH)D3 in rheumatoid arthritis patients. *Clin Exp Rheumatol* 1999; 17:453-6.
19. van Boxel-Dezaire AHH, Hoff SCJ, Oosten BW, et al. Decreased interleukin-10 and increased interleukin-12p40 mRNA are associated with disease activity and characterize different disease stages in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1999; 45:695-703.
20. Duran I, Martinez-Caceres EM, Brieva L, et al. Similar pro- and anti-inflammatory cytokine production in the different clinical forms of multiple sclerosis. *Mult Scler* 2001; 7:151-6.
21. Killestein J, Den Drijver BF, van der Graaf WL, et al. Intracellular cytokine profile in T-cell subsets of multiple sclerosis patients: different features in primary progressive disease. *Mult Scler* 2001; 7:145-50.
22. Peterit HF, Pukrop R, Fazekas F, et al. Low interleukin-10 production is associated with higher disability and MRI lesion load in secondary progressive multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2003; 206: 209-14.
23. Link H. The cytokine storm in multiple sclerosis. *Mult Scl* 1998; 4:12-5.
24. Chaudhuri A. Why we should offer routine vitamin D supplementation in pregnancy and childhood to prevent multiple sclerosis. *Med Hypotheses* 2005; 64(3):608-18.

EFFECTS OF ALFACALCIDOL THERAPY ON SERUM CYTOKINE LEVELS IN PATIENTS WITH MULTIPLE SCLEROSIS

Slobodan VOJINOVIĆ¹, Jelena VOJINOVIĆ², Vladan ČOSIĆ³, Vojin SAVIĆ⁴

¹Clinic of Neurology, Clinical Centre, Niš; ²Clinic of Paediatrics, Clinical Centre, Niš;
³Biochemistry Institute, Clinical Centre, Niš; ⁴Clinic of Nephrology, Clinical Centre, Niš

ABSTRACT

Multiple sclerosis (MS) is a consequence of genetic and environmental factors. Geographic, genetic, and biological evidence suggests that an important immunopathogenic factor might be the insufficiency of vitamin D. The aim of our study was to investigate the immunomodulatory effect of alfacalcidol, a vitamin D analogue, on cytokine levels in RRMS patients in relapse. We investigated 15 patients suffering from RRMS relapse (an RRMS group) and two control groups: one control group of healthy subjects (n=10) and a NIND group, consisting of patients with non-inflammatory neurological diseases (n=10). All of the MS patients were treated with 5 μ g/day of oral alfacalcidol for a period of five days. The serum cytokine levels of TNF- α , IL-10, IL-4, and IL-12 were measured in all the MS patients one day prior to and one day after therapy, and in all the control subjects (ELISA, Quantikine human immunoassay, R&D Systems, UK). Our results showed significantly lower IL-4 and IL-12 levels in the RRMS patients group compared to the N group and the NIND group ($p < 0.001$ Mann-Whitney U-test). No significant differences in TNF- α and IL-10 levels were found

between the groups, and there was no influence of alfacalcidol on these cytokines in RRMS patients. High doses of oral alfacalcidol induced significant increases in IL-4 and IL-12 levels in RRMS patients ($p < 0.001$, Wilcoxon rank signed test). Therefore, there were no differences in IL-4 and IL-12 levels compared to the N group and the NIND group. Alfacalcidol therapy in RRMS patients did not provoke any side effects. Vitamin D and its analogues, such as alfacalcidol, act as immunomodulatory agents, with potential therapeutic effects for patients with multiple sclerosis.

Key words: multiple sclerosis; vitamin D; alfacalcidol; cytokine

Slobodan VOJINOVIĆ
Klinika za neurologiju
Klinički centar Niš
Bulevar dr Zorana Đinđića 48, 18000 Niš
Tel: 018 233 772
Faks: 018 539 460
E-mail: boban2@eunet.yu

* Rad je saopšten na Kongresu Udruženja alergologa i kliničkih imunologa Srbije i Crne Gore septembra 2004. u Niškoj Baњи.