
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Modularea răspunsului imun în infecții respiratorii virale la pacienții atopici. Corelarea cu nivelul vitaminei D.



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	15
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Vitamina D – structură chimică, elemente de fiziologie și fiziopatologie	19
1.1. Structura chimică a vitaminei D	19
1.1.1. Forme ale vitaminei D	21
1.1.1.1. Colecalciferolul sau vitamina D3	21
1.1.1.2. Ergocalciferolul sau vitamina D2	21
1.1.1.3. Calcidiolul sau 25(OH)D	21
1.1.1.4. Calcitriolul sau 1,25(OH) ₂ D	21
1.2. Elemente de fiziologie a vitaminei D (surse, metabolism acțiuni)	21
1.2.1. Surse de vitamină D	21
1.2.1.1. Sinteza cutanată	22
1.2.1.2. Aportul alimentar (din surse naturale și din alimente îmbogățite cu vit D)	23
1.2.1.3. Suplimentarea cu produse farmaceutice (tablete sau picături)	25
1.2.2. Metabolismul vitaminei D	25
1.2.3. Mecanismul de acțiune și efectele vitaminei D	26
1.2.3.1. Efectele scheletale ale vitaminei D	26
1.2.3.2. Efectele extrascheletale asupra sistemului imun ale vitaminei D	27
1.3. Elemente de fiziopatologie a vitaminei D	27
1.3.1. Nivelul vitaminei D	28
1.3.1.1. Deficiență – insuficiență- nivel normal	28
1.3.1.2. Fiziopatologia deficienței/insuficienței vitaminei D	28
2. Epidemiologia deficitului/insuficienței vitaminei D	29
3. Suplimentarea/administrarea vitaminei D	29
3.1. Necesarul de vitamină D la copii	30
3.2. Corectarea nivelului vitaminei D în caz de insuficiență sau deficiență	31
4. Efectele imunologice ale vitaminei D la copii	31
4.1. Vitamina D în alergii și atopie	32
4.1.1. Producerea unui răspuns imun alergic	32
4.1.2. Rolul vitaminei D în producerea unui răspuns imun alergic	32
4.2. Vitamina D în infecții virale de tract respirator și în wheezingul recurent	33
4.3. Rolul suplimentării antenatale și postnatale cu vitamina D în prevenirea și tratamentul wheezingului	35
4.3.1. Definiția și fenotipurile de wheezing	35
4.3.2. Suplimentarea antenatală cu vit D	36
4.3.3. Suplimentarea postnatală cu vit D	36
4.4. Vitamina D în infecția cu virusul SARS-CoV-2	37
5. Interleukine și rolul lor în infecții și alergii. Relația cu vitamina D	38
5.1. Interleukina-10 (IL-10)	38
5.2. Interleukina-31 (IL-31)	38

5.3. Relația secreției de interleukine cu vitamina D	38
6. Noi biomarkeri și rolul lor în infecții și alergii. Relația cu vitamina D Efectele imunologice ale vitaminei D la copii	39
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteza de lucru/obiective	43
2. Metodologie generală	45
3. Studiul 1 - Nivelul vitaminei D la copiii din Grecia și relația acestuia cu utilizarea cremelor de protecție solară	49
3.1. Introducere	49
3.2. Ipoteza de lucru	50
3.3. Material și metodă	51
3.4. Rezultate	52
3.5. Discuții	56
3.6. Concluzii	60
4. Studiul 2 - Nivelul vitaminei D la copii atopici asimptomatici	62
4.1. Introducere	62
4.2. Ipoteza de lucru	63
4.3. Material și metodă	63
4.4. Rezultate	65
4.5. Discuții	70
4.6. Concluzii	74
5. Studiul 3 Relația dintre nivelul vitaminei D și parametrii hematologici la copiii cu infecții respiratorii virale gripale și non-gripale	75
5.1. Introducere	75
5.2. Ipoteza de lucru/obiective	75
5.3. Material și metodă	76
5.4. Rezultate	78
5.5. Discuții	106
5.6. Concluzii	113
6. Studiul 4 Vitamina D și răspunsul imun la copii cu wheezing recurent	115
6.1. Introducere	115
6.2. Ipoteza de lucru/obiective	115
6.3. Material și metodă	116
6.4. Rezultate	117
6.5. Discuții	121
6.6. Concluzii	124
7. Concluzii generale (sinteză)	125
8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	127
REFERINȚE	129
ANEXE	xx

INTRODUCERE

Vitamina D (vit D) numită și „vitamina soarelui”, este acum recunoscută nu numai pentru importanța sa în promovarea sănătății oaselor la copii, ci și pentru alte beneficii în alte boli cum ar fi infecțiile virale și alergiile. De asemenea are rol în reducerea riscului de boli cronice, cum ar fi bolile autoimune, cancerul și bolile cardiovasculare. Vit D este de fapt un hormon steroid cu efect citoprotector și acțiuni antiinflamatorii. Un număr tot mai mare de studii publicate în reviste de mare prestigiu, și realizate în numeroase țări și regiuni diferite ca și localizare, climă, grad de socializare, nivel economic, politică economică, au arătat că deficitul de vit D este în realitate o problemă frecvent subestimată.

Nivelul scăzut de vit D în sânge poate fi rezultatul unui aport insuficient, al unei expuneri solare deficitare sau al unui consum exagerat în diferite stări patologice. Deficitul de vit D apare frecvent în rândul sugarilor, copiilor și adolescenților sănătoși, în special în anumite grupuri de risc cum ar fi sugarii alăptați la sân, care nu respectă recomandarea de suplimentare cu vit D, copiii și adolescenții cu piele închisă la culoare care trăiesc în țările din nord, copiii și adolescenții fără expunere adecvată la soare și copiii obezi. Faptul că unele stări patologice sau comportamente care au ca rezultat niveluri mai scăzute de vit D în ser sunt asociate cu tulburări imune caracterizate printr-un dezechilibru al raportului de citokine Th1/Th2, conduc la ipoteza unei relații cauză-efect, mai ales în anumite condiții sau numai la anumiți indivizi, făcând puțin probabilă posibilitatea de a fi doar o coincidență. Mai mult, discrepanța dintre studiile observaționale și cele intervenționale sugerează că nivelul scăzut al 25-hidroxi-vitamină D [25(OH)D] este un marker al stării de sănătate. Procesele inflamatorii din anumite boli infecțioase și evoluția lor clinică pot reduce nivelul seric de 25(OH)D, ceea ce ar explica de ce deficiența/insuficiența de vit D este raportată într-o gamă largă de boli virale. Rolul său în patogeneza infecțiilor de tract respirator (ITR) acute, a astmului și alergiilor la copii, este în mare parte necunoscută. Se pare că un nivel scăzut al acestei vitamine este implicat în apariția în copilărie a atopiei și a alergiilor, precum și într-o frecvență crescută a infecțiilor respiratorii acute.

CONTRIBUȚIE PERSONALĂ

Partea de contribuție personală cuprinde 4 studii în care au fost incluși pacienți pediatrici care s-au adresat departamentului nostru pentru atopie, infecții respiratorii acute, episoade de wheezing precum și subiecți sănătoși aflați în evidența Departamentului de Pediatrie. Toate studiile au fost aprobate de către consiliul științific al Spitalului din Ilia, Unitatea spitalicească Amaliada precum și de către Comisia de Etică a Universității de Medicină și Farmacie “Iuliu Hațieganu”, Cluj-Napoca și au fost realizate în conformitate cu principiile Declarației de la Helsinki. În urma acestei cercetări, au rezultat șase articole publicate în reviste ISI (dintre care cinci în quartila 1): *Cells, Frontiers in Pediatrics, Children, Journal of Personalized Medicine, Frontiers in Immunology*.

1. Studiul 1: Nivelul vitaminei D la copiii din Grecia și relația acesteia cu utilizarea cremelor de protecție solară

Scopul acestui prim studiu a fost de a caracteriza prevalența precum și variația sezonieră atât a deficitului cât și a insuficienței de vit D la copiii și adolescenții sănătoși din Grecia și de a explora relația dintre nivelul seric al vit D și utilizarea cremelor de protecție solară. Nivelul seric al 25 (OH) D a fost măsurat la 376 copii și adolescenți (184 de sex masculin și 192 de sex feminin) cu o vârstă medie de $7,6 \pm 4,9$ ani, pe o perioadă de 13 luni. Prevalența nivelului seric scăzut de 25 (OH) D, incluzând atât deficiența cât și insuficiența, a fost de 66,2%. Cea mai mică valoare medie 25(OH)D a fost observată în luna ianuarie ($17,9 \pm 6,8$ ng / mL) și cea mai mare în septembrie, iulie, august și octombrie ($34,6 \pm 8,7$, $33,0 \pm 9,4$, $30,1 \pm 8,2$ și $30,1 \pm 10,6$ ng / mL, respectiv). Interesant, la copiii cărora li s-au aplicat creme de protecție solară pe plajă ($p = 0,001$) sau în afara plajei ($p < 0,001$) au fost detectate niveluri serice mai ridicate de

25(OH)D. Copiii cu nivel scăzut de vit D (atât deficient cât și insuficient) au avut o vârstă semnificativ mai mare decât cei cu niveluri normale de 25(OH)D. În schimb nu au existat diferențe semnificative în funcție de sex. Acest studiu subliniază prevalența ridicată a nivelurilor serice scăzute de 25(OH)D precum și variația sezonieră a acestora la copiii care trăiesc într-o regiune caracterizată ca fiind una însorită. Datele noastre sugerează că utilizarea în condiții reale, în viața de zi cu zi, a produselor de protecție solară în lunile de vară permite o absorbție suficientă a razelor solare pentru o sinteză de vit D la un nivel adecvat și menținerea nivelurilor serice în limite normale.

2. Studiul 2: Nivelul de vitamină D la copiii și adolescenții atopici asimptomatici

În studiu 2, am evaluat starea vit D la copiii și adolescenții asimptomatici din Grecia, cu și fără atopie, precum și variațiile nivelului de vit D în timpul pandemiei de coronavirus 2019 (COVID-19). La 340 de copii și adolescenți asimptomatici (155 de bărbați, 185 de femei), vârsta medie de $8,6 \pm 4,6$ ani, recrutați pe o perioadă de 24 de luni (februarie 2019 – ianuarie 2021) au fost măsurate nivelurile serice de 25(OH)D, imunoglobuline E (IgE) totale și numărul de eozinofile. Atopia, definită ca și un nivel crescut de IgE corespunzător vârstei, a fost asociată cu starea de deficit de vit D ($p=0,041$). Acestor copii nu li s-au administrat suplimente de vit D în lunile precedente studiului. Subiecții cu și fără atopie au prezentat rate similare de niveluri insuficiente și normale ale 25(OH)D. Nivelul mediu de 25(OH)D a fost semnificativ mai mare la subiecții recrutați în timpul pandemiei, când au fost respectate regulile de izolare la domiciliu, decât înainte de pandemie, și semnificativ mai mulți copii au avut niveluri normale de 25(OH)D ($p < 0,001$), în timp ce nu au fost observate diferențe pentru nivelurile de IgE sau numărul de eozinofile. Aceste rezultate susțin o legătură între vit D și inflamațiile alergice și infecțioase, și în special asocierea deficienței de vit D cu atopia asimptomatică, definită ca nivel crescut de IgE corespunzător unei anumite vârste.

3. Studiul 3: Relația dintre nivelul vitaminei D și parametrii hematologici la copiii cu infecții respiratorii virale gripale și non-gripale

Obiectivul studiului 3 a fost de a investiga nivelurile de vit D la copiii care s-au adresat ambulatorului nostru de Pediatrie din cauza unei infecții de tract respirator (ITR) și de a găsi corelații cu mai mulți parametri clinici, hematologici, precum și cu unii markeri de inflamație. Acești copii au fost testați prin teste rapide din secrețiile nazale pentru identificarea tipului de infecție (gripală sau non-gripală). În acest studiu au fost incluși copii cu vârsta cuprinsă între 4-16 ani, mai precis 32 de copii cu gripă și 27 cu infecție virală non-gripală. De asemenea au fost incluși 21 de copii sănătoși de aceeași vârstă. Au fost comparate date demografice, clinice și din hemoleucogramă, inclusiv indicii eritrocitari și plachetari, precum și anumiți indici rezultați din datele hemoleucogramei, cum ar fi masa trombocitară (volum mediu trombocitar*număr de trombocite, MPV*PLT), raportul neutrofile/limfocite (NLR), trombocite/neutrofile (PNR), trombocite/limfocite (PLR). Markerii de inflamație urmăriți au fost proteina C reactivă (PCR), viteza de sedimentare a eritrocitelor (VSH), vit D, precum și citokinele IL-10 și IL-31. Monocitele, eozinofilele și trombocitele precum și rapoartele dintre neutrofile și limfocite (NLR) și cel dintre trombocite și neutrofile (PNR) au fost modificate semnificativ la pacienții cu infecții respiratorii, iar dimensiunea trombocitelor a fost mai mică încă din primele 48 de ore de boală. Grupul de copii cu infecție gripală a prezentat un număr mai redus de trombocite și o masă trombocitară mai scăzută (PLT*MPV). Grupul de copii cu infecții non-gripale a prezentat MPV semnificativ mai scăzut, ceea ce a fost corelat cu nivelurile vit D, dar nu și cu PCR sau VSH. Valoarea vit D*MPV a fost semnificativ mai scăzută în grupul cu infecții non-gripale. PCR și IL-10 sunt modificate semnificativ în ITR, în timp ce vit D este scăzută. Aceste rezultate au arătat că activarea trombocitelor în infecțiile virale ale tractului respirator la copii, măsurată prin MPV, este corelată cu nivelul de vit D, iar această corelație prezintă diferențe între infecția gripală și cea non-gripală.

4. Studiul 4: Vitamina D și răspunsul imun la copiii cu wheezing recurent

În acest ultim studiu, am examinat nivelurile de vit D la copiii preșcolari care au s-au prezentat la medicul pediatru pentru wheezing și am încercat o corelare cu diferiți parametri demografici, clinici, hematologici, precum și cu unii markeri de inflamație. Grupul de studiu 1 a fost format din douăzeci de pacienți care s-au prezentat pentru primul episod de wheezing, iar grupul de studiu 2 a fost format din douăzeci de pacienți cu wheezing recurent, definit ca > 3 episoade de wheezing în ultimele 6 luni, și care în următoarele 6 luni nu au prezentat alt episod. Grupul 3, de control a inclus șaisprezece copii sănătoși. Nivelul vit D scade în grupurile 1 și 3 (control), pe când în grupul 2, în care a fost foarte scăzută inițial, vit D crește, ajungând la punctul final al studiului, la un nivel similar în cele trei grupuri. Între cele două grupuri de pacienți, IL-31 a fost mai scăzută în grupul 2 la ambele momente dar, diferența a fost mai pronunțată la momentul final. IL-10 a fost mai scăzută în grupul 2 decât în grupul 1, atât în momentul final cât și în cel inițial în ambele grupuri. În momentul inițial, au existat diferențe semnificative statistice între cele trei grupuri în ceea ce privește MPV, VSH, PCR, IL-10 și nivelul de vit D. În schimb, după 6 luni, în momentul final al studiului, între cele 3 grupe, aceleași parametrii (MPV, VSH, PCR, IL10, vit D) nu au prezentat nici o diferență semnificativă statistic.

CONCLUZII

La copii, prevalența deficitului și insuficienței de vit D chiar într-o regiune însorită este ridicată și prezintă variații sezoniere, cu niveluri serice normale de 25(OH)D în lunile însorite și niveluri scăzute în lunile mai puțin însorite. Datele noastre sugerează că utilizarea produselor de protecție solară în timpul verii permite ca pielea să primească o cantitate suficientă de lumină solară pentru a permite producerea de vit D la un nivel capabil să mențină nivelurile serice de 25(OH)D în limite normale în lunile însorite. Utilizarea produselor de protecție solară în lunile de vară trebuie încurajată, deoarece, conform studiului nostru, nu reprezintă un factor de risc pentru deficiența vit D.

Rezultate studiului 2 susțin o legătură între statusul vit D și diferite tipuri de inflamații, mai concret alergice sau infecțioase. Deficitul de vit D este asociat cu atopia definită ca și creșterea nivelului de IgE corespunzător vârstei, iar nivelul mediu de vit D este doar ușor scăzut la copiii atopici asimptomatici, comparativ cu copiii sănătoși. În timpul pandemiei, în circumstanțe fără precedent care constau în absența altor infecții, nivelurile serice de vit D au fost mai mari și mai puțini copii au fost predispuși să aibă un status deficient, datorită mai probabil unei cereri reduse de vit D în procesele de imunomodulare. Deficitul de vit D poate să nu fie un factor de risc, ci mai degrabă o consecință a inflamației, cauzată de atopia sau infecții virale, datorită faptului că este folosită de macrofage, limfocitele T și B în procesele de imunomodulare.

La copiii asimptomatici atopici, nivelul vit D trebuie măsurat și, dacă este deficitar, trebuie corectat pentru a încerca schimbarea evoluției naturale a inflamației alergice. Această ipoteză ar putea fi importantă pentru dezvoltarea strategiilor de prevenție a bolilor alergice la copii.

Studiul 3 a arătat că la copiii de 4-16 ani cu ITR, durerile musculare au fost mai frecvente la cei cu infecție gripală, în timp ce diareea, congestia nazală și tahicardia, au fost mai frecvente la copiii cu infecții non-gripale. Simptomul prezent la toți copiii a fost febra, care la cei cu gripă a fost mai înaltă. Parametrii hematologici modificați semnificativ au fost limfocitele, monocitele, eozinofilele și trombocitele precum și raportul dintre neutrofile și limfocite (NLR) și cel dintre trombocite și neutrofile (PNR). ITR virale la copii pot diminua dimensiunea trombocitelor probabil prin suprimarea activării trombocitelor, încă din primele 48 de ore de boală. De asemenea, s-a constatat că MPV a acționat pozitiv ca un reactiv în fază acută la copiii cu ITR gripală, iar nivelurile MPV au fost semnificativ crescute la acești copii. Acest răspuns este asociat cu niveluri scăzute de vit D, care probabil modifică interacțiunea virus-trombocite-răspuns imun/inflamator. Dintre factorii inflamatori, numai PCR și IL-10 sunt modificate semnificativ în ITR, în timp ce vit D este scăzută la limita semnificației. Se pare că atopia asimptomatică predispozează la infecții respiratorii virale.

Studiul 4 a avut ca și obiectiv, identificarea acelor sugari cu wheezing recurent care prezintă risc crescut de recidive ulterioare. Deficiența vit D se pare a fi un factor asociat cu prezenta wheezing-ului recurent la copii, prin urmare determinarea nivelului seric de 25(OH)D este recomandată. Mai mult, considerăm că măsurarea nivelului seric de vit D ar trebui inclusă în evaluarea de rutină a copiilor cu wheezing recurent, iar în caz de deficiență aceasta trebuie corectată. Modularea imună, măsurată prin nivelurile de IL-10 și IL-31 depinde de fenotipul de wheezing, precum și de faza acută a bolii sau de statusul general al sănătății. Sunt necesare însă studii mai ample pentru a confirma rezultatele noastre.

ORIGINALITATEA , CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE TEZEI ȘI PERSPECTIVELE PENTRU STUDII URMĂTOARE

Ideea studiului a pornit de la observația din practica de zi cu zi, în urma căreia am constatat că nivelul scăzut de 25(OH)D este destul de frecvent, atât la copiii sănătoși cât și la copiii cu diferite afecțiuni inflamatorii cum ar fi cei cu atopie, alergii sau ITR. În plus, administrarea de vit D în aceste afecțiuni are rezultate diferite, contradictorii.

Originalitatea tezei rezidă din rezultatele obținute și constă în contribuțiile pe care cercetările efectuate le aduc în înțelegerea legăturii dintre statusul vit D la copii sănătoși, atopici asimptomatici, cu patologii infecțioase sau wheezing recurent.

Studiul 1 a generat date epidemiologice valoroase despre prevalența deficitului de vit D în zone însorite și cu expunere solară mărită. Un rezultat interesant a fost faptul că utilizarea cremelor de protecție solară folosite în viața de zi cu zi, nu duce la o scădere a nivelului seric de vit D. Lucrarea de față este singura de până acum realizată în Grecia, care arată faptul că utilizarea cremelor de protecție solară în cursul verii nu duce la o scădere a nivelului de vit D. Acest fapt are o importanță deosebită și trebuie aplicat în practică, mai ales cunoscând faptul că destui părinți evită folosirea cremelor de protecție solară de frica hipovitaminozei D.

Rezultatele studiului 2 susțin o legătură între statusul vit D și diferite tipuri de inflamații, alergice sau infecțioase. Deficitul de vit D este asociat cu atopia definită ca și creșterea nivelului de IgE corespunzător vârstei. La copiii asimptomatici atopici, nivelul vit D trebuie măsurat și, dacă este deficitar, trebuie corectat pentru a încerca schimbarea evoluției naturale a inflamației alergice. Această ipoteză ar putea fi importantă pentru dezvoltarea strategiilor de prevenție a bolilor alergice la copii.

Studiul 3 a generat date valoroase despre asocierea unor parametri clinici și hematologici, proveniți dintr-un simplu tablou sanguin, cu nivelul de vit D, cu diferite interleukine, dar și cu tipul de infecție respiratorie virală. Acești parametri biologici ar putea constitui markeri de apreciere a prezenței unui anumit tip de infecție virală și pot permite evaluarea severității chiar și la nivel de tratament în ambulatoriu sau în unități medicale cu potențial diagnostic mai redus.

Evoluția clinică a wheezing-ului recurent la copii este dificil de prezis, așa cum este dificil de anticipat care sugari vor progresa înspre astm. Nivelul seric de vit D, ar putea ajuta la identificarea acelor sugari cu wheezing recurent care prezintă risc crescut de recidive ulterioare. Cel puțin până la acest moment, în Grecia, este singurul studiu care evaluează, în timp, nivelul vit D la copii cu mai multe episoade de wheezing, comparativ cu cei care au avut un singur episod. Rămâne de stabilit, dacă nivelul scăzut de vit D la acești copii, predispune la apariția recidivelor, sau episoadele recurente de wheezing predispun la apariția unui status de vit D deficient sau insuficient. Este necesară elaborarea unor protocoale pentru evaluarea copiilor cu ITR și în special a celor cu wheezing recurent care să includă determinarea nivelului de 25(OH)D.

Având în vedere rezultatele obținute în cadrul acestei teze, ar fi interesant de urmărit evoluția în dinamică a nivelului de 25(OH)D în cadrul unui episod acut de ITR și corelarea lui cu ceilalți indici de fază acută. În plus, administrarea de vit D la copii cu nivel scăzut, ar putea face din vit D un tratament adjuvant în infecțiile virale respiratorii, fapt ce empiric, și pentru moment fără dovezi practice, se aplică în cazul COVID-19.

Utilizând baza de date actuală precum și datele bibliografice studiate în cadrul elaborării tezei de față, am publicat un mini-review referitor la sindromul multiinflamator apărut la copii în contextul unei infecții COVID-19 și relația cu vit D.

PhD SUMMARY

Modulation of the immune response to viral respiratory infections in atopic children. Correlation with vitamin D levels

PhD Student **Feketea Gavriela Maria**

PhD Supervisor Prof.dr. **Mihnea Zdrengea**



TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	15
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	
1. Vitamin D - chemical structure, elements of physiology and pathophysiology	19
1.1. Chemical structure of vitamin D	19
1.1.1. Forms of vitamin D	21
1.1.1.1. Cholecalciferol or vitamin D ₃	21
1.1.1.2. Ergocalciferol or vitamin D ₂	21
1.1.1.3. Calcidiol or 25(OH)D	21
1.1.1.4. Calcitriol or 1,25(OH) ₂ D	21
1.2. Elements of vitamin D physiology (sources, metabolism actions)	21
1.2.1. Sources of vitamin D	21
1.2.1.1. Skin synthesis	22
1.2.1.2. Food intake (from natural sources and from foods enriched with vitamin D)	23
1.2.1.3. Pharmaceutical supplementation (tablets or drops)	25
1.2.2. Metabolism of vitamin D	25
1.2.3. Mechanism of action and effects of vitamin D	26
1.2.3.1. Skeletal effects of vitamin D	26
1.2.3.2. Effects of vitamin D on the immun system	27
1.3. Elements of vitamin D pathophysiology	27
1.3.1. Status of vitamin D	28
1.3.1.1. Deficiency – insufficiency- normal level	28
1.3.1.2. Pathophysiology of vitamin D deficiency / insufficiency	28
2. Epidemiology of vitamin D deficiency / insufficiency	29
3. Vitamin D supplementation / administration	29
3.1. Vitamin D requirements in children	30
3.2. Correction of vitamin D levels in case of insufficiency or deficiency	31
4. Immunological effects of vitamin D in children	31
4.1. Vitamin D in allergy and atopy	32
4.1.1. Producing an allergic immune response	32
4.1.2. The role of vitamin D in producing an allergic immune response	32
4.2. Vitamin D in respiratory tract viral infections and recurrent wheezing	33
4.3. The role of antenatal and postnatal vitamin D supplementation in the prevention and treatment of wheezing	35
4.3.1. Wheezing: definition and phenotypes	35
4.3.2. Vitamin D antenatal supplementation	36
4.3.3. Vitamin D postnatal supplementation	36
4.4. Vitamin D in SARS-CoV-2 infection	37
5. Interleukins and their role in infection and allergy. The relationship with vitamin D	38
5.1. Interleukin -10 (IL-10)	38
5.2. Interleukin - 31 (IL-31)	38
5.3. Relationship interleukin production and vitamin D	38
6. New biomarkers and their role in infections and allergy. The relationship with vitamin D. Immunologic effects of vitamin D in children	39

PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Working hypothesis / objectives	43
2. General methodology	45
3. Study 1 - Vitamin D status in Greek children and use of sun protection products	49
3.1. Introduction	49
3.2. Hypothesis /Objectives	50
3.3. Material and methods	51
3.4. Results	52
3.5. Discussions	56
3.6. Conclusions	60
4. Study 2 - Vitamin D status in atopic asymptomatic children	62
4.1. Introduction	62
4.2. Hypothesis /Objectives	63
4.3. Material and methods	63
4.4. Results	65
4.5. Discussions	70
4.6. Conclusions	74
5. Study 3 - Relationship of vitamin D status and hematological parameters in children with viral respiratory infection (influenza and non-influenza)	75
5.1. Introduction	75
5.2. Hypothesis /Objectives	75
5.3. Material and methods	76
5.4. Results	78
5.5. Discussions	106
5.6. Conclusions	113
6. Study 4 - Vitamin D and immun response in children with recurrent wheezing	115
6.1. Introduction	115
6.2. Hypothesis /Objectives	115
6.3. Material and methods	116
5.4. Results	117
5.5. Discussions	121
5.6. Conclusions	124
7. General conclusions	125
8. Originality and innovative contributions	127
REFERENCES	129
APPENDICES	xx

Introduction

Vitamin D (vit D), also known as " sunshine vitamin" is now recognized not only for its importance in promoting bone health in children, but also for other benefits in other diseases such as viral infections and allergies. Additionally, vit D has a role in reducing the risk of chronic diseases such as autoimmune diseases, cancer and cardiovascular disease. Vit D is in fact a steroid hormone with a cytoprotective effect and anti-inflammatory action. An increasing number of studies published in prestigious journals and conducted in countries and regions different as location, climate, degree of socialization, economic level, economic policy, have shown that vit D deficiency is a problem frequently underestimated. Low serum levels of vit D can be the result of insufficient intake, poor sun exposure or excessive consumption in various conditions. Vit D deficiency is common among healthy infants, children and adolescents, especially in certain risk groups such as breastfed infants whose mothers do not follow the recommendation of supplementation with vit D, children and adolescents with dark skin who live in northern countries, children and adolescents without adequate sun exposure and obese children. The fact that some pathological conditions or behaviors that result in lower serum vit D levels are associated with immune disorders characterized by an imbalance of the Th1/Th2 cytokine, leads to the hypothesis of a cause-effect relationship, especially in certain conditions or only in certain individuals, making the possibility of being just a coincidence unlikely. Moreover, the discrepancy between observational and interventional studies suggests that low levels of 25-hydroxy-vitamin D [25(OH)D] is a marker of health. Inflammatory processes in certain infectious diseases and their clinical course may reduce serum 25(OH)D levels, which would explain why vit D deficiency/insufficiency is reported in a wide range of viral diseases. Its role in the pathogenesis of acute respiratory tract infections (RTIs), asthma and allergies in children is largely unknown. It seems that a low level of this vitamin is involved in the appearance of atopy and allergies in childhood, as well as in an increased frequency of acute respiratory infections.

PERSONAL CONTRIBUTION

The section of personal contribution includes 4 studies that comprised (i) pediatric patients who were addressed to our department for atopy, (ii) acute respiratory infections, (iii) episodes of wheezing as well as (iv) healthy subjects from the records of our Department of Pediatrics. All studies were approved by the scientific council of Ilia Hospital, Amaliada Hospital Unit as well as by the ethics committee of the University of Medicine and Pharmacy "Iuliu Hațieganu", Cluj-Napoca and were conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki. The research of this thesis has resulted in six articles published in ISI journals (five of which are in quartile 1): *Cells, Frontiers in Pediatrics, Children, Journal of Personalized Medicine, Frontiers in Immunology*.

1. First study: Vitamin D status in Greek children and use of sun protection products

The aim of the first study was to characterize the prevalence and seasonal variation of both vit D deficiency and insufficiency in healthy children and adolescents in Greece and to explore the relationship between serum vit D levels and the use of sunscreens. The serum level of 25(OH)D was measured in 376 children and adolescents (184 males and 192 females) with a mean age of 7.6 ± 4.9 years, over a period of 13 months. The prevalence of low serum 25(OH)D, including both deficiency and insufficiency, was 66.2%. The lowest mean 25(OH)D value was observed in January (17.9 ± 6.8 ng/mL) and the highest in September, July, August, and October (34.6 ± 8.7 , 33.0 ± 9.4 , 30.1 ± 8.2 and 30.1 ± 10.6 ng/mL, respectively). Interestingly, children using sun protection creams on the beach ($p=0.001$) or off the beach ($p<0.001$) had higher levels of serum 25(OH)D detected. Children with low vit D levels (both deficient and insufficient) were significantly older than those with normal levels of 25(OH)D. However, there were no significant differences by sex. This study highlights the high prevalence of low serum levels of 25(OH)D as well as their seasonal variation in children living in a region characterized as sunny. Our data suggest that the use

of sunscreen products in real life during the summer months allows for sufficient absorption of sunlight for vit D synthesis at an adequate level and the maintenance of serum levels within normal limits.

2. Second study: Vitamin D status in asymptomatic atopic children

In Study 2, we assessed vit D status in asymptomatic children and adolescents in Greece, with and without atopy, as well as changes in vit D levels during the 2019 coronavirus pandemic (COVID-19). Serum levels of 25(OH)D, total immunoglobulin E (IgE) and eosinophil numbers were measured in 340 asymptomatic children and adolescents (155 male, 185 female) with mean age 8.6 ± 4.6 years, recruited over a period of 24 months (February 2019 - January 2021). Atopy, defined as an elevated level of age-appropriate IgE, was associated with vit D deficiency ($p=0.041$). These children were not given vit D supplements in the months before the study. Subjects with and without atopy had similar rates of insufficient and normal levels of 25(OH)D. The average level of 25(OH)D was significantly higher in subjects recruited during the pandemic, when the rules of isolation at home were observed, than before the pandemic, and significantly more children had normal levels of 25(OH)D ($p<0.001$), while no differences were observed for IgE levels or eosinophil counts. These results support a relationship between vit D and allergic and infectious inflammation, and in particular the association of vit D deficiency with asymptomatic atopy, defined as elevated IgE levels corresponding to a certain age.

3. Third study: Relationship of vitamin D status and hematological parameters in children with viral respiratory infection (influenza and non-influenza)

The aim of study 3 was to investigate the levels of vit D in children who were referred to our pediatric outpatient clinic due to a respiratory tract infection (RTI) and to find correlations with several clinical, hematological parameters as well as with certain markers of inflammation. These children were tested by rapid tests of nasal secretions to identify the type of infection (flu or non-flu). This study included children aged 4-16 years, namely 32 children with influenza and 27 with non-influenza viral infection. Also, 21 healthy children of the same age were included. Demographic, clinical, and complete blood count data were compared, including erythrocyte and platelet indices. Certain indices from hemoleukogram data, such as platelet mass (mean platelet volume*platelet count, MPV*PLT), neutrophil and lymphocyte ratio (NLR), platelets and neutrophils (PNR), platelets and lymphocytes (PLR) were compared further. Inflammation markers C-reactive protein (CRP), erythrocyte sedimentation rate (ESR), vit D, and cytokines IL-10 and IL-31 were measured. Monocytes, eosinophils and platelets as well as neutrophil-to-lymphocyte (NLR) and platelet-to-neutrophil (PNR) ratios were significantly altered in patients with respiratory infections, and platelet size was smaller from the first 48 hours of illness. The group of children with influenza infection had a lower platelet count and a lower platelet mass (PLT*MPV). The group of children with non-influenza infections had significantly lower MPV, which was correlated with vit D levels, but not with CRP or ESR. The value of vit D*MPV was significantly lower in the group with non-influenza infections. CRP and IL-10 levels were significantly altered in subjects with RTI, while vit D levels were lower in these patients. These results highlighted the platelet activation in children with viral infections, the correlation with vit D levels and the presence of differences between influenza and non-influenza infections.

4. Forth study: Vitamin D and immune response in children with recurrent wheezing

In the last study, we examined the levels of vit D in preschool children who presented to the pediatrician for wheezing and we examined if there are correlations with different demographic, clinical and hematological parameters, as well as with several markers of inflammation. The first group consisted of twenty patients who presented for the first episode of wheezing. The second group consisted of twenty patients with recurrent wheezing, defined as >3 episodes of wheezing in the last 6 months, and who in the next 6 months did not present another episode. The third control group included sixteen healthy children.

Vit D levels were found decreased in groups 1 and 3 (control), while in group 2, where it was initially at very low level, increases at the end point of the study, being at a similar level in the three groups. Between the two groups of patients, IL-31 was lower in group 2 at both times, but the difference was more pronounced at the end determination. IL-10 was lower in group 2 than in group 1, both at the beginning and at the end of study period, in both groups. At baseline, there were statistically significant differences between the three groups in terms of MPV, ESR, CRP, IL-10 and vit D level. However, the differences between the groups of the same parameters (MPV, ESR, CRP, IL10, vit D) were not statistically significant at the end of the 6-month study.

CONCLUSIONS

In children, the prevalence of vit D deficiency and insufficiency even in a sunny region is high. In addition, there are seasonal variations, with normal serum levels of 25(OH)D in the sunny months and low levels in the less sunny months. Our data suggest that the use of sunscreen products during the summer allows the skin to receive enough sunlight permitting the production of vit D at a level capable of maintaining serum levels of 25(OH)D within normal limits in the sunny months. According to our study, the use of sunscreen products in the summer months is not a risk factor for vit D deficiency and should be encouraged.

The results of study 2 support a link between vit D status and different types of inflammation, allergic or infectious. Vit D deficiency is associated with atopy defined as an increase in age-appropriate IgE levels, and the mean vit D level is only slightly lower in asymptomatic atopic children compared to healthy children. During the pandemic, under unprecedented circumstances in the absence of other infections, serum vit D levels were higher and fewer children were more likely to be deficient, more probably due to reduced demand for vit D in the process of immunomodulation. Vit D deficiency may not be a risk factor, but rather a consequence of inflammation, caused by atopy or viral infections, due to the fact that it is used by macrophages, T and B lymphocytes in immunomodulatory processes. In atopic asymptomatic children, vit D levels should be measured and, if deficient, should be corrected in order to change the natural course of allergic inflammation. This hypothesis could be important for the development of strategies for the prevention of allergic diseases in children.

Study 3 showed that in children aged 4-16 years with RTI, muscle pain was more common in those with influenza infection, while diarrhea, nasal congestion and tachycardia were more common in children with non-influenza infections. The symptom present in all children was fever, which in those with influenza was higher. Significantly altered haematological parameters were lymphocytes, monocytes, eosinophils and platelets as well as the neutrophils-to-lymphocytes ratio (NLR) and platelets-to-neutrophils ratio (PNR). Viral RTIs in children could probably reduce the size of platelets by suppressing platelet activation in the first 48 hours of illness. MPV was also found to act positively as an acute phase reagent in children with influenza RTI, and MPV levels were significantly increased in these children. This response is associated with low vit D levels, which are likely to alter the virus-platelet-immune / inflammatory response. Among the inflammatory factors, only CPR and IL-10 are significantly altered in RTI, while vit D levels were low towards reaching statistical significance. Asymptomatic atopy appears to predispose to viral respiratory infections.

Study 4 aimed to identify those infants with recurrent wheezing who are at increased risk of subsequent recurrences. Vit D deficiency appears to be a factor associated with the presence of recurrent wheezing in children, therefore determination of serum 25(OH)D is recommended. Furthermore, we believe that the measurement of serum vit D levels should be included in the routine assessment of children with recurrent wheezing and should be corrected in case of deficiency. Immune modulation, as measured by IL-10 and IL-31 levels, depends on the type of wheezing as well as the acute phase of the disease or general health status. However, more studies are needed to confirm our results

ORIGINALITY AND INNOVATIVE CONTRIBUTION OF THE THESIS AND PERSPECTIVE FOR FUTURE STUDIES

The idea of the study was based on the observation from daily practice that the low level of 25(OH)D is common in both healthy children and children with various inflammatory conditions such as those with atopy, allergy or RTI. In addition, the supplementation of vit D in these conditions has different, contradictory results. The originality of the thesis lies in the results obtained and consists in the contributions that the studies make in understanding the connection between vit D status in healthy children, asymptomatic atopics, with infectious pathology or recurrent wheezing. Study 1 generated valuable epidemiological data on the prevalence of vit D deficiency in sunny areas and with increased sun exposure. An interesting result was that the use of sunscreens products used in real life conditions does not lead to a decrease in serum vit D. This work is the only one so far done in Greece, which shows that the use of sun protection products during the summer does not lead to a decrease in the level of vit D. This is of particular importance and should be applied in practice, especially knowing that many parents avoid using sunscreen for fear of hypovitaminosis D. The results of study 2 support a link between vit D status and different types of inflammation, allergic or infectious. Vit D deficiency is associated with atopy defined as an increase in age-appropriate IgE levels. In atopic asymptomatic children, vit D levels should be measured and, if deficient, should be corrected aiming to change the progression towards allergic inflammation. This hypothesis could be important for the development of strategies for the prevention of allergic diseases in children. Study 3 generated valuable data on the association of clinical and haematological parameters, from a simple blood cells' count, with the level of vit D, with various interleukins, but also with the type of viral respiratory infection. These biological parameters could be markers for assessing the presence of a certain type of viral infection and can allow the assessment of severity even at the level of outpatient clinics or in medical units with lower diagnostic potential. The clinical course of recurrent wheezing in children is difficult to predict, as it is difficult to predict which infants will progress to asthma. Serum vit D levels may help to identify those infants with recurrent wheezing who are at increased risk of further recurrence. At least so far in Greece, it is the only study that evaluates, over time, the level of vit D in children with multiple episodes of wheezing, compared to those who had a single episode. It remains to study further whether the low level of vit D in these children predisposes to recurrence, or the recurrent episodes of wheezing predispose to a deficient or insufficient vit D status. It is necessary to develop protocols for the assessment of children with RTI and especially those with recurrent wheezing that include the determination of the level of 25(OH)D. Given the results obtained in this thesis, it would be interesting to evaluate the level of 25 (OH) D during an acute episode of RTI through multiple determinations and its correlation with the other acute phase indices. In addition, the administration of vit D in children with low levels could make vit D an adjunctive treatment in respiratory viral infections, which, to date, is empirically applied to COVID-19. Using the current database as well as the bibliographic data studied during the elaboration of this thesis, we published a mini-review regarding the multi-inflammatory syndrome that appeared in children in the context of a COVID-19 infection and the relationship with vit D.