

---

TEZĂ DE DOCTORAT (Rezumat)

# Rolul Vitaminei D în patologia inflamatorie a aparatului respirator

---

Doctorand **Teodora-Irina Adam**

---

Conducător de doctorat Prof. Dr. **Alexandru Irimie**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

# CUPRINS

<b>Introducere</b>	3
<b>Stadiul actual al cunoașterii</b>	3
<b>Studiul 1 - Deficitul vitaminei D serice și evoluția clinică a astmului bronșic</b>	4
<b>Studiul 2 - Suplimentarea orală cu VD în astmul bronșic indus experimental: efectul asupra inflamației</b>	5
<b>Studiul 3 - Studiul 3 - Suplimentarea orală cu VD în astmul bronșic indus experimental: efectul asupra stresului oxidativ</b>	7
<b>Concluzii generale, originalitate și contribuții inovative</b>	9

## **Cuvinte cheie:**

- *vitamina D*
- *astm bronșic*
- *inflamație*
- *stres oxidativ*

---

## Introducere

Astmul bronșic este o boală inflamatorie pulmonară, foarte heterogenă, caracterizată prin hipereactivitate și obstrucție inițial reversibilă a căilor aeriene. În evoluție, inflamația cronică determină remodelarea căilor aeriene. Având în vedere tendința semnificativă de creștere a prevalenței bolii, precum și a provocărilor terapeutice pe care heterogenitatea acesteia le ridică, gestionarea patologiei este o preocupare globală în cercetare.

Vitamina D (VD) este o intervenție accesibilă în domeniul sănătății publice datorită costurilor reduse și a administrării facile. Din acest motiv a devenit subiectul multor studii care au investigat potențialul său rol în prevenția și managementul astmului bronșic. Cu toate acestea, actuala poziție a Global Initiative for Asthma subliniază faptul că mai sunt necesare studii care să ofere date asupra rolului terapeutic al VD în astmul bronșic.

Având în vedere interesul pentru această temă, prezenta cercetare doctorală a urmărit să contribuie la corpul de date din literatură privind rolul și utilitatea VD în astmul bronșic.

## Stadiul actual al cunoașterii

Astmul bronșic este caracterizat de un proces inflamator inițiat de celulele T helper de tip 2 (Th2) și mediat de citokinele specifice acestui tip de răspuns: interleukina-4 (IL-4), interleukina-5 (IL-5) și interleukina 13.

Terapia în astmul bronșic vizează controlul inflamației, deoarece acest proces poate continua și în absența simptomelor clinice, determinând modificări de remodelare care în timp produc reducerea funcției pulmonare. Asociat, în cadrul astmului bronșic dezechilibrul dintre sistemele oxidative și cele reducătoare înclină balanța spre dezvoltarea unui mediu oxidativ. Mecanismele stresului oxidativ sunt asociate fenomenelor de obstrucție aeriană, hiperreactivitate bronșică și remodelare. Prin urmare, în astmul bronșic inflamația și modificările redox sunt procese intricate fiziopatologic.

Literatura medicală dezbate rolul antiinflamator al vitaminei D în astmul bronșic. Se pare că această vitamină contribuie la diminuarea inflamației asociate, la ameliorarea funcției pulmonare și la scăderea numărului de exacerbări ale bolii.

VD a fost studiată și în relație cu stresul oxidativ, fiind considerată un adjuvant pentru ameliorarea acestuia. Cu toate acestea, un număr relativ restrâns de cercetări au urmărit efectele antioxidante ale VD în această patologie.

## **Studiul 1 - Deficitul vitaminei D serice și evoluția clinică a astmului bronșic**

### **Introducere și ipoteză de lucru**

Suplimentarea nutrițională cu VD, presupusă a fi o intervenție accesibilă în domeniul sănătății publice, este obiectul diferitelor tipuri de cercetări în legătură cu astmul bronșic.

VD este recunoscută pe scară largă ca având un potențial rol imunomodulator în astmul bronșic, dar mecanismele sale benefice în această patologie nu au fost încă pe deplin explicate.

În prezentul studiu ne-am propus, în primul rând, să analizăm prevalența deficitului seric al 25-hidroxi-vitaminei D (25-OH-VD) la pacienții pediatrici cu astm sau wheezing recurent sugestiv pentru astmul bronșic, din regiunea Cluj, România. În al doilea rând am dorit să aflăm dacă există o corelație între deficitul sau insuficiența 25-OH-VD serice și prezența factorilor asociați cu un control scăzut al astmului, în special la pacienții care au urmat terapie cu suplimente orale de VD.

### **Material și metodă**

Studiul a fost de tip transversal longitudinal și a înrolat 131 de pacienți pediatrici cu astm bronșic sau wheezing recurent. Au fost colectate date socio-demografice, precum și o serie de caracteristici clinice, biologice și terapeutice. Analiza s-a realizat în funcție de nivelul 25-OH-VD serice.

### **Rezultate**

Prevalența nivelului seric neadecvat (deficit sau insuficiență) al 25-OH-VD a fost de 58,8%. La copiii cu vârsta  $\geq 5$  ani, 25-OH-VD serică a fost semnificativ mai mică ( $p < 0,05$ ) decât valorile înregistrate la copiii sub 5 ani. Pentru o proporție considerabilă de pacienți (80,9%,  $n = 106$  din totalul de 131 de pacienți din studiu), părinții sau tutorii legali au declarat că au administrat copilului doza orală de 1000 UI de VD zilnic în timpul sezonului rece (din septembrie până în aprilie).

Prezența unui episod de exacerbare acută a astmului în luna anterioară includerii în studiu a fost semnificativ asociată cu un nivel seric neadecvat al 25-OH-VD, cu un risc relativ 1,49 (95% CI 1,026-2,250),  $p = 0,02$ .

Analiza istoricului bolii în cele patru săptămâni anterioare includerii în studiu, în special pentru copiii suplimentați cu VD, a arătat rezultate similare: grupul de pacienți care a experimentat o exacerbare a astmului în ultima lună a avut un nivel

---

semnificativ mai mic ( $p = 0,047$ ) al 25-OH-VD serice (mediană 26,6 ng/mL, IQR 19,68) comparativ cu cei din grupul fără criză (mediană 32,2 ng/mL, IQR 16,18).

## **Concluzii**

Chiar și sub terapie orală de suplimentare cu VD, pacienții care au avut o criză de astm în ultima lună au prezentat concentrații serice ale 25-OH-VD semnificativ mai mici comparativ cu pacienții fără acutizare a bolii. Rezultatele noastre sugerează utilitatea unor determinări secvențiale ale 25-OH-VD serice pentru evaluarea statusului nutrițional al VD la astmaticii simptomatici. Aastă abordare ar putea oferi o nouă perspectivă pentru identificarea factorilor care interferează cu creșterea 25-OH-VD serice urmărită prin terapia de suplimentare cu VD. De asemenea, rolul și utilitatea terapiei cu VD în timpul unei crize acute a astmului bronșic rămâne o ipoteză interesantă pentru un viitor studiu.

## **Studiul 2 - Suplimentarea orală cu Vitamina D în astmul bronșic indus experimental: efectul asupra inflamației**

### **Introducere și ipoteza de lucru**

Prezentul studiu a urmărit replicarea unui model validat de astm bronșic la șoarece pentru a investiga efectele suplimentării cu VD orală în modularea inflamației asociate. Primul studiu realizat în cadrul acestei cercetări doctorale ne-a indicat faptul că pacienții cu istoric recent de exacerbare astmatică au asociat un nivel seric insuficient al 25-OH-VD. Acest fapt ne-a condus la o nouă ipoteză, și anume verificarea efectului VD administrate în momentul unei acutizări astmatice.

### **Material și metodă**

Pentru a realiza modelul experimental de astm bronșic au fost utilizate femele din specia de șoarece BALB/c. Inflamația de tip astmatic s-a realizat cu ajutorul ovalbuminei (OVA) adsorbită pe hidroxid aluminiu, administrată injectabil intraperitoneal în etapa de sensibilizare. Ulterior, în etapa de provocare bronșică s-a instilat soluție de OVA intranazal. Șoarecii au fost împărțiți în patru grupuri ( $n=5$ ), după cum urmează: control negativ (MARTOR), control pozitiv (ASTM-POZ), grup cu tratament preventiv cu VD inițiat înainte de inducerea astmului (PREV-VD), respectiv grup cu astm și tratament de salvare cu VD (ACUT-VD).

Intervenția experimentală a constat în administrarea orală de VD. Animalele au fost tratate cu soluție de VD prin gavaj oral, folosind o micropipetă. Grupul PREV-VD a urmat un regim terapeutic de lungă durată în doze mici, considerat drept terapie „de prevenție”, respectiv o doză zilnică de 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  VD toată durata experimentului. Prin urmare, șoarecii din grupul PREV-VD au primit cinci doze de VD înainte de începerea

protocolului de inducere a inflamației. Șoarecilor din grupul ACUT-VD li s-a administrat un regim terapeutic pe termen scurt cu doze mari, considerat drept terapie „de salvare”: patru doze zilnice consecutive de 100 ug/kg VD, din ziua 18 până la încheierea experimentului (ziua 21). Prin urmare, în grupul ACUT-VD, s-a inițiat suplimentarea numai înainte de etapa de provocare a protocolului de inflamație. Grupul ASTM-POZ și MARTOR nu au primit tratament. S-au recoltat ser, lichid de lavaj bronhoalveolar (LLBA) și omogenat tisular pulmonar (OTP) pentru analiza produșilor finali stabili ai oxidului nitric (NOx) precum și pentru identificarea ELISA a citokinelor IL-4, IL-5, TGF- $\beta$ 1. Fragmente de țesut pulmonar au fost incluse în parafină pentru analiza histologică și imunohistochimică.

## Rezultate

Analiza histopatologică cu ajutorul colorației hematoxină-eozină și imunohistochimică cu NF-kB p65 a confirmat prezența inflamației pulmonare la subiecții din lotul ASTM-POZ, comparativ cu țesutul sănătos provenind de la animalele din lotul MARTOR. Scorul de inflamație a fost semnificativ mai scăzut în grupurile PREV-VD și ACUT-VD decât în grupul ASTM-POZ ( $p < 0,05$ ), iar grupurile tratate cu VD au prezentat scoruri semnificativ mai mici pentru intensitatea colorării cu anticorpii NF-kB p65 ( $p < 0,05$ ), precum și semnificativ mai puține celule imunopozitive ( $p < 0,05$ ).

Inflamația acută de tip astmatic a determinat creșterea semnificativă a nivelului IL-4 în LLBA la șoarecii din grupul ASTM-POZ, comparativ cu cei din lotul MARTOR ( $p < 0,05$ ). Tratamentul cu VD a avut un efect antiinflamator, producând o scădere a nivelului IL-4 din LLBA la șoarecii din grupurile PREV-VD și ACUT-VD în comparație cu lotul martor pozitiv, dar diferențele observate nu au fost semnificative statistic.

Inflamația experimentală a determinat creșterea nivelurilor citokinelor IL-4, IL-5 și TGF- $\beta$ 1 în OTP la șoarecii din grupul ASTM-POZ, comparativ cu cei din lotul MARTOR. Cu toate acestea, diferența observată nu a fost semnificativă statistic. Tratamentul cu VD a avut un efect antiinflamator, producând o scădere a nivelurilor de IL-4, IL-5 și TGF- $\beta$ 1 în OTP la șoarecii din grupul ACUT-VD în comparație cu ASTM-POZ, dar, în mod similar, efectul observat nu a fost semnificativ statistic.

Pentru evaluarea sintezei de oxid nitric (NO) s-au dozat NOx, metaboliții terminali stabili ai acestuia, din ser, LLBA și OTP. NO, măsurat indirect prin NOx, a fost considerat o modalitate de apreciere a gradului de inflamație. Efectul suplimentării cu VD a fost evaluat luând NOx drept marker proinflamator. În toate tipurile de probe biologice, nivelul NOx a fost mai mare la șoarecii din grupul ASTM-POZ. Cu toate acestea, o creștere semnificativă statistic a fost observată numai pentru NOx seric la șoarecii din grupul ASTM-POZ în comparație cu cei din lotul MARTOR ( $p < 0,05$ ). Suplimentarea cu VD a produs un efect antiinflamator atât la subiecții din grupul PREV-VD, cât și la cei din lotul ACUT-VD. În comparație cu ASTM-POZ, la subiecții din PREV-VD a fost observată o scădere marcată a NOx în ser, LLBA și OTP ( $p < 0,05$ ). În ceea ce privește grupul ACUT-VD, cura scurtă de VD în doză mare a indus o scădere a

---

nivelului de NOx în toate tipurile de probe, dar cu semnificație statistică numai în ser și LLBA ( $p < 0,05$ ).

### **Concluzii**

Histologic și imunohistochimic, VD pare să exercite un efect protectiv semnificativ statistic în contextul inflamației pulmonare de tip astmatic. Scorul de inflamație eozinofilică, respectiv cel evaluat prin colorarea cu anticorpii NF- $\kappa$ B p65 au fost ameliorate de suplimentarea cu VD.

Nivelul citokinelor inflamatorii din LLBA (IL-4) și OTP (IL-4, IL-5, TGF- $\beta$ ) a fost redus de terapia cu VD, deși efectul a fost modest și nu a atins pragul semnificației statistice. Tratamentul cu VD a ameliorat nivelul NOx din ser, LLBA și OTP. Acest efect a fost semnificativ statistic în special când VD a fost administrată drept terapie „de prevenție”.

## **Studiul 3 - Suplimentarea orală cu Vitamina D în astmul bronșic indus experimental: efectul asupra stresului oxidativ**

### **Introducere și ipoteză de lucru**

Un număr important de studii au recunoscut rolul stresului oxidativ în patogeneza astmului bronșic. Acest fenomen apare din cauza dezechilibrului dintre sistemele antioxidante cu rol în protecția plămânului și procesele care generează produși ai stresului oxidativ. Prezentul studiu și-a propus să investigheze efectele terapiei orale cu VD în modularea stresului oxidativ, utilizând un model animal de inflamație pulmonară astmatică.

### **Material și metodă**

Modelul experimental și intervenția terapeutică au fost similare experimentului din studiul 2. Validarea modelului s-a realizat prin analiza histologică. S-au recoltat ser, LLBA și OTP pentru analiza parametrilor de stres oxidativ: statusul oxidativ total (TOS), reactivitatea antioxidantă totală (TAR), indicele de stres oxidativ (OSI), malondialdehida (MDA), tioli totali (SH).

### **Rezultate**

Nivelul de stres oxidativ a fost crescut în serul provenind de la subiecții din grupul ASTM-POZ, parametrii TOS, OSI și MDA fiind semnificativ crescuți comparativ cu grupul MARTOR. Capacitatea antioxidantă a scăzut în lotul ASTM-POZ, nivelul TAR fiind semnificativ mai redus decât la animalele din grupul MARTOR. În acord, nivelul SH seric a fost semnificativ mai diminuat la subiecții din lotul ASTM-POZ suferind de

inflamație experimentală indusă față de subiecții indemni din lotul MARTOR. Terapia cu VD, atât la animalele din grupul PREV-VD, cât și la cele din lotul ACUT-VD a redus nivelul stresului oxidativ în ser: în ambele grupuri, TOS, OSI și MDA au fost semnificativ mai mici comparativ cu valorile raportate pentru ASTM-POZ.

Cu toate acestea, numai suplimentarea cu VD în doză mică perioadă îndelungată (terapie „de prevenție”), aplicată subiecților din grupul PREV-VD, a dus la creșterea semnificativă a TAR, marcă a răspunsului antioxidant. Similar, suplimentarea cu VD a crescut titrul SH, dar numai în grupul PREV-VD, acest efect antioxidant a fost semnificativ statistic.

Am observat o creștere a stresului oxidativ în LLBA, marcată de niveluri mai ridicate ale TOS, OSI și MDA în grupul ASTM-POZ față de MARTOR. TAR și SH au arătat că răspunsul antioxidant a fost semnificativ mai redus în grupul ASTM-POZ. Atât terapia „de prevenție” cu VD, cât și cea „de salvare” au redus gradul de stres oxidativ în LLBA, fiind notate scăderea TOS, OSI și MDA. Terapia de salvare cu VD administrată șoarecilor din lotul ACUT-VD a dus la creșterea semnificativă a nivelului TAR. Suplimentarea VD pare să producă un efect antioxidant marcat de creșterea nivelului SH la animalele tratate, semnificativ statistic pentru grupul PREV-VD.

În ceea ce privește OTP, subiecții din lotul ASTM-POZ au prezentat valori semnificativ statistic mari ale TOS, OSI și MDA în comparativ cu cei din lotul MARTOR. Nivelul TAR a fost semnificativ mai mic la animalele din lotul ASTM-POZ grup spre deosebire de cele aparținând lotului MARTOR. Suplimentarea VD a redus nivelul TOS, OSI și MDA atât în grupul PREV-VD, cât și în grupul ACUT-VD. Rezultate semnificative statistic s-au observat pentru parametrii TOS și OSI, dar nu și pentru MDA. Terapia VD a avut un efect antioxidant semnificativ, determinând creșterea TAR atât la subiecții din PREV-VD, cât și la cei din ACUT-VD.

Nivelul SH a fost statistic semnificativ mai scăzut în ASTM-POZ decât în grupul MARTOR. Terapia cu VD a crescut SH la șoarecii astmatici din loturile PREV-VD și ACUT-VD. Cu toate acestea, numai pentru grupul ACUT-VD beneficiul observat cu privire la SH a fost semnificativ statistic. În plus, valoarea medie SH în grupul ACUT-VD a fost semnificativ mai mare decât cea a grupului PREV-VD.

Analiza histopatologică cu ajutorul colorației hematoxilina-eozină a confirmat prezența inflamației pulmonare la subiecții din lotul ASTM-POZ, comparativ cu țestul sănătos provenind de la animalele din lotul MARTOR.

## **Concluzii**

VD pare să amelioreze echilibrul redox în ser atunci când este administrată într-o doză mică pe termen lung. Nu au fost observate diferențe statistic semnificative între cele două grupuri tratate cu VD.



## Concluzii generale, originalitate și contribuții inovative

1. Statusul neadekvat al 25-OH-VD serice a fost asociat cu istoricul pozitiv pentru exacerbare astmatică în ultima lună anterior dozării metabolitului 25-hidroxiol al VD. Chiar și sub terapie orală de suplimentare cu VD, pacienții care au avut o criză de astm în cele 4 săptămâni dinaintea testării au prezentat concentrații serice ale 25-OH-VD semnificativ mai mici comparativ cu cei fără acutizare a bolii.
2. Al doilea studiu și-a propus să investigheze rolul antiinflamator al terapiei cu VD utilizând un model animal murin de inflamație bronșică acută de tip astmatic. Datele noastre au arătat că VD a avut un efect antiinflamator modest
3. Cel de-al treilea studiu a investigat rolul VD în stresul oxidativ asociat astmului bronșic. VD pare să amelioreze echilibrul redox în ser și LLBA atunci când este administrată în regim „de prevenție”, într-o doză zilnică de 50 μg/kg. În cazul OTP, efectul protector asupra stresului oxidativ a fost observat când VD a fost administrată ca terapie „de salvare” în doză de 100 μg/kg/zi. Astfel, intensitatea efectului antioxidant a fost diferită în funcție de tipul de probă evaluată și de regimul terapeutic utilizat.

Primul studiu a identificat prevalența nivelului neadekvat al VD serice (deficit sau insuficiență) într-o cohortă de pacienți pediatrici cu astm bronșic sau wheezing recurent sugestiv pentru astmul bronșic reprezentativă pentru zona Cluj, Transilvania, România. Deși rezultatele noastre au fost similare cu altele raportate în literatură pentru zona României, elementul de noutate este reprezentat de screeningul statusului seric al VD care s-a realizat la pacienți cu patologia anterior menționată.

Elementele de originalitate aduse prin studiile experimentale au fost reprezentate de modalitatea de administrare a VD. O altă contribuție adusă literaturii a fost prezentarea datelor obținute în urma analizării efectului antiinflamator și antioxidant în trei tipuri de probe: ser, LLBA și OTP.

În concluzie, datele noastre sugerează utilitatea unor determinări secvențiale ale 25-OH-VD serice pentru evaluarea statusului nutrițional al VD la astmaticii simptomatici. În context experimental, suplimentarea cu VD a avut efect protector asupra fenomenului de stres oxidativ asociat inflamației astmatice. Astfel, o posibilă abordare privind rolul VD în astmul bronșic ar putea viza mecanismele prin care VD își exercită efectele antioxidante.

---

PhD THESIS (Abstract)

# The Role of Vitamin D in the Inflammatory Disease of the Respiratory Tract

---

PhD Student **Teodora-Irina Adam**

---

PhD Supervisor Prof. Dr. **Alexandru Irimie**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

# Table of contents

<b>Introduction</b>	12
<b>Current state of knowledge</b>	12
<b>Study 1 - Serum Vitamin D Deficiency and the Clinical Course of Asthma</b>	13
<b>Study 2 - Oral Vitamin D Supplementation in Experimentally Induced Asthma: Effect on Inflammation</b>	14
<b>Study 3 - Oral Vitamin D Supplementation in Experimentally Induced Asthma: Effect on Oxidative Stress</b>	16
<b>General conclusions, originality and innovative contributions</b>	18

## **Keywords:**

- *vitamin D*
- *bronchial asthma*
- *inflammation*
- *oxidative stress*

## **Introduction**

Bronchial asthma is a very heterogeneous pulmonary inflammatory disease characterized by hyperreactivity and airway obstruction that is initially reversible. In time, chronic inflammation causes airway remodeling. Given the significant increase in disease prevalence, as well as the therapeutic challenges that its heterogeneity poses, the management of the pathology is a global research concern.

Vitamin D (VD) is an accessible public health intervention due to its low cost and easy administration. For this reason it has become the subject of many studies investigating its potential role in the prevention and management of asthma. However, the current position of the Global Initiative for Asthma guideline emphasizes that studies are still needed to provide data on the therapeutic role of VD in asthma.

Considering the interest in this topic, the present doctoral research aimed to contribute with data on the role and utility of VD in asthma.

## **Current state of knowledge**

Bronchial asthma is characterized by an inflammatory process initiated by T helper cells type 2 (Th2) and mediated by the cytokines specific to this type of response: interleukin-4 (IL-4), interleukin-5 (IL-5) and interleukin 13. Therapy in bronchial asthma aims to control inflammation, a process that continues even in the absence of clinical symptoms, thus causing airway remodeling and decrease in lung function. Also, in asthma the imbalance between oxidative and reducing systems determines oxidative environment. The mechanisms of oxidative stress are associated with the phenomena of air obstruction, bronchial hyperreactivity and remodeling. Therefore, inflammation and redox changes are pathophysiologically intricate processes in asthma.

The antiinflammatory role of vitamin D in asthma is highly debated in medical literature. It seems that this vitamin reduces the inflammation, improves lung function and leads to a decrease in the number of disease exacerbations.

VD has also been studied in relation to oxidative stress. However, a relatively limited number of studies have looked at the antioxidant effects of VD in bronchial asthma.

---

## **Study 1 - Serum Vitamin D Deficiency and the Clinical Course of Asthma**

### **Introduction and study hypothesis**

Nutritional supplementation with VD, assumed to be an accessible public health intervention, is the subject of various types of asthma-related research.

VD is widely recognized as having a potential immunomodulatory role in asthma, but its beneficial mechanisms in this pathology have not yet been fully elucidated.

In the present study, we aimed to determine the prevalence of serum 25-hydroxy-vitamin D (25-OH-VD) deficiency in pediatric patients with asthma or recurrent wheezing suggestive of bronchial asthma, from Cluj region, Romania. Secondly, we wanted to find out if there was a correlation between the inadequate level of serum 25-OH-VD and the factors associated with poor asthma control, especially in patients who underwent therapy with oral VD supplements.

### **Material and method**

The present cross-sectional study enrolled 131 pediatric patients with bronchial asthma or recurrent wheezing. Socio-demographic data as well as clinical, biological and therapeutic characteristics were recorded. The analysis was performed according to the serum 25-OH-VD level.

### **Results**

The prevalence of inadequate serum level (deficiency or insufficiency) of 25-OH-VD was 58.8%. In children aged  $\geq 5$  years, serum 25-OH-VD was significantly lower ( $p < 0.05$ ) than the values recorded in children younger than 5 years. For a considerable proportion of patients (80.9%,  $n = 106$  of the total 131 patients in the study), the parents or legal guardians stated that they administered the oral dose of 1000 IU of VD daily to the child during the cold season (from September until April).

An episode of acute asthma exacerbation in the month before the inclusion in the study was significantly associated with an inadequate serum 25-OH-VD level, with a relative risk of 1.49 (95% CI 1.026-2.250),  $p = 0, 02$ .

Analysis of disease history in the four weeks prior to inclusion in the study, especially for children supplemented with VD, showed similar results: the group of patients who experienced an asthma attack in the last month had a significantly lower level ( $p = 0.047$ ) of serum 25-OH-VD (median 26.6 ng/mL, IQR 19.68) compared to those with no disease exacerbation (median 32.2 ng/mL, IQR 16.18).

## **Conclusions**

Even under oral VD supplementation therapy, patients who had an asthma attack in the past month had significantly lower serum 25-OH-VD concentrations compared to patients without an exacerbation.

Our results suggest the utility of sequential determinations of serum 25-OH-VD for assessing the nutritional status of VD in symptomatic asthmatics. This approach could provide a new perspective that might help to identify the factors interfering with the increase in serum 25-OH-VD after VD therapy. Also, the role and utility of VD therapy during an acute asthma attack remains an interesting hypothesis for future study.

## **Study 2 - Oral Vitamin D Supplementation in Experimentally Induced Asthma: Effect on Inflammation**

### **Introduction and study hypothesis**

The present study sought to replicate a validated asthma mouse model in order to investigate the effects of oral VD supplementation on inflammation.

The first study carried out within this doctoral research showed us that patients with a recent history of asthmatic exacerbation had an insufficient serum level of 25-OH-VD. Therefore, we also set out to investigate the effect of VD supplementation during an experimental asthma exacerbation.

### **Material and method**

Female BALB/c mice were used to create an experimental model of bronchial asthma. Asthmatic inflammation was induced with ovalbumin (OVA) adsorbed on aluminum hydroxide. During the sensitization stage OVA was administered by intraperitoneal injection. Secondly, during the challenge phase OVA solution was instilled intranasal. Mice were divided into four groups (n=5), as follows: negative control (CONTROL), positive control (ASTM-POZ), group with preventive treatment with VD initiated before asthma induction (PREV-VD), respectively group with asthma and rescue treatment with VD (ACUT-VD). The experimental intervention consisted in VD therapy. Animals were given VD solution by oral gavage using a micropipette. The PREV-VD group followed a long-term therapeutic regimen with low dose, considered „prevention" therapy, namely a daily dose of 50 µg/kg VD for the entire duration of the experiment. Therefore, mice in the PREV-VD group received five doses of VD before starting the inflammation induction protocol. Mice in the ACUT-VD group received a short-term high-dose therapeutic regimen, considered „rescue" therapy: four consecutive daily doses of 100 µg/kg VD, from day 18 until the end of the experiment

(day 21). Therefore, in the ACUT-VD group, supplementation was initiated only before the challenge step of the inflammation protocol. The ASTM-POZ and CONTROL group received no treatment. Serum, bronchoalveolar lavage fluid (BALF), and lung tissue homogenate (LTH) were collected. The stable end products of nitric oxide (NO<sub>x</sub>), IL-4, IL-5 and transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) were tested in the previous mentioned type of samples. Sections of lung tissue were embedded in paraffin for histological and immunohistochemical analysis.

## Results

Pathology analysis using hematoxylin-eosin staining and Nuclear factor kappa B p 65 (NF- $\kappa$ B p65) immunohistochemistry confirmed the presence of pulmonary inflammation in subjects from the ASTM-POZ group, compared to the healthy test from the animals from the CONTROL group. The inflammation score was significantly lower in the PREV-VD and ACUT-VD groups than in the ASTM-POZ group ( $p < 0.05$ ), and the VD-treated groups had significantly lower scores for NF- $\kappa$ B p65 antibody staining intensity ( $p < 0.05$ ) as well as significantly fewer immunopositive cells ( $p < 0.05$ ).

Acute asthmatic-type inflammation caused a significant increase in IL-4 level in the BALF of mice in the ASTM-POZ group compared to those in the CONTROL group ( $p < 0.05$ ). VD treatment had an anti-inflammatory effect, producing a decrease in the level of IL-4 in the BALF of mice in the PREV-VD and ACUT-VD groups compared with the positive control group, but the observed differences were not statistically significant.

Experimental inflammation caused increased in IL-4, IL-5, and TGF- $\beta$ 1 levels in the LTH of mice in the ASTM-POZ group compared with those in the CONTROL group. However, the observed difference was not statistically significant. VD treatment had an anti-inflammatory effect, producing a decrease in IL-4, IL-5 and TGF- $\beta$ 1 levels in the LTH of mice in the ACUT-VD group compared to ASTM-POZ, but similarly the observed effect was not statistically significant.

To evaluate nitric oxide (NO) synthesis, NO<sub>x</sub> were measured in serum, BALF and LTH were dosed. NO, measured indirectly by NO<sub>x</sub>, has been considered a way to assess the degree of inflammation. The effect of VD supplementation was evaluated using NO<sub>x</sub> as a pro-inflammatory marker. In all biological tests, the level of NO<sub>x</sub> was higher in mice in the ASTM-POZ group. However, a statistically significant increase was observed only for serum NO<sub>x</sub> in mice in the ASTM-POZ group compared to those in the CONTROL group ( $p < 0.05$ ). VD supplementation produced an anti-inflammatory effect in both PREV-VD and ACUT-VD group subjects. Compared to ASTM-POZ, subjects in PREV-VD had a marked decrease in serum NO<sub>x</sub>, BALF, and LTH ( $p < 0.05$ ). Regarding the ACUT-VD group, the short course of high-dose VD induced a decrease in NO<sub>x</sub> level in all sample types, but with statistical significance only in serum and BALF ( $p < 0.05$ ).

## **Conclusions**

Pathology analysis showed that VD appeared to exert a statistically significant protective effect in the context of asthmatic lung inflammation. The eosinophilic inflammation score and the NF- $\kappa$ B p65 antibody staining score, were improved by VD supplementation.

The inflammatory cytokines in BALF (IL-4) and LTH (IL-4, IL-5, TGF- $\beta$ ) were reduced by VD therapy, although the effect was modest and did not reach the threshold of statistical significance. VD treatment improved NO<sub>x</sub> in serum, BALF and LTH. This effect was statistically significant especially when VD was administered as „prevention" therapy.

## **Study 3 - Oral Vitamin D Supplementation in Experimentally Induced Asthma: Effect on Oxidative Stress**

### **Introduction and study hypothesis**

A significant number of studies have recognized the role of oxidative stress in the pathogenesis of bronchial asthma. This phenomenon occurs due to the imbalance between the antioxidant systems with a role in lung protection and the processes that generate products of oxidative stress. The present study aimed to investigate the effects of oral VD therapy in modulating oxidative stress, using an animal model of asthmatic lung inflammation.

### **Material and method**

The experimental design and therapeutic intervention were similar to the one described in the previous study. Validation of the experimental design was performed by histological analysis. Serum, BALF and LTH were collected for the analysis of oxidative stress parameters: total oxidative status (TOS), total antioxidant reactivity (TAR), oxidative stress index (OSI), malondialdehyde (MDA), total thiols (SH).

### **Results**

The level of oxidative stress was increased in serum from subjects in the ASTM-POZ group, with TOS, OSI and MDA parameters being significantly increased compared to CONTROL group. The antioxidant capacity decreased in the ASTM-POZ group, the TAR level being significantly lower than the CONTROL group. Serum SH level was significantly more decreased in subjects in the ASTM-POZ group suffering from experimentally induced inflammation compared to healthy subjects in the CONTROL group. VD therapy in both PREV-VD and ACUT-VD animals reduced the level of oxidative stress in serum: in both groups, TOS, OSI and MDA were significantly lower



compared to the values reported for ASTM-POZ. However, only long-term low-dose VD supplementation („prevention” therapy), applied to subjects in the PREV-VD group, resulted in significant increases in TAR, a marker of the antioxidant response. Similarly, VD supplementation increased the SH titer, but only in the PREV-VD group, this antioxidant effect was statistically significant.

We observed an increase in oxidative stress in BALF, marked by higher levels of TOS, OSI and MDA in the ASTM-POZ group compared to CONTROL. TAR and SH showed that the antioxidant response was significantly lower in the ASTM-POZ group. Both „preventive” and „rescue” VD therapy reduced the degree of oxidative stress in BALF, lowering TOS, OSI, and MDA. VD rescue therapy administered to mice in the ACUT-VD group resulted in a significant increase in TAR levels. VD supplementation appears to produce a marked antioxidant effect by increasing SH in the treated animals, statistically significant for the PREV-VD group.

Regarding LTH, subjects in the ASTM-POZ group showed statistically significantly higher values of TOS, OSI and MDA compared to those in the CONTROL group. The level of TAR was significantly lower in animals from the ASTM-POZ group in contrast to those belonging to the CONTROL group. VD supplementation reduced TOS, OSI and MDA in both PREV-VD and ACUT-VD groups. Statistically significant results were observed for TOS and OSI parameters, but not for MDA. VD therapy had a significant antioxidant effect, increasing TAR in both PREV-VD and ACUT-VD subjects. SH level was statistically significantly lower in ASTM-POZ than in the CONTROL group. VD therapy increased SH in asthmatic mice in the PREV-VD and ACUT-VD groups. Regarding SH, only in the ACUT-VD group the observed benefic effect was statistically significant. In addition, the mean SH value in the ACUT-VD group was significantly higher than that of the PREV-VD group.

Pathology analysis using hematoxylin-eosin staining confirmed the presence of lung inflammation in subjects from the ASTM-POZ group, compared to the healthy test from the animals from the CONTROL group.

## **Conclusions**

VD appears to improve serum redox balance in asthma. No statistically significant differences were observed between the two groups treated with VD.

## **General conclusions, originality and innovative contributions**

1. Inadequate serum 25-OH-VD status was associated with positive history of asthmatic exacerbation in the last month prior to the dosing of the 25-hydroxylated metabolite of VD. Even after oral VD supplementation therapy, patients who had an asthma attack in the 4 weeks prior to testing had significantly lower serum 25-OH-VD concentrations compared with those without an exacerbation.
2. The second study aimed to investigate the anti-inflammatory role of VD therapy using a murine animal model of asthmatic-type acute bronchial inflammation. Our data showed that VD had a modest anti-inflammatory effect
3. The third study investigated the role of VD in the oxidative stress associated with bronchial asthma. VD appears to improve redox balance in serum and BALF when administered as a „prevention" therapy at a daily dose of 50 µg/kg. In the case of LTH, the protective effect on oxidative stress was observed when VD was administered as „rescue" therapy at a dose of 100 µg/kg/day. Thus, the intensity of the antioxidant effect was different depending on the type of sample evaluated and the therapeutic regimen used.

The first study identified the prevalence of inadequate serum VD level (deficiency or insufficiency) in a cohort of pediatric patients with bronchial asthma or recurrent wheezing suggestive of bronchial asthma representative of Cluj area, Transylvania, Romania. Although our results were similar to others reported in the literature for Romania, the novelty element is represented by the screening of the serum status of the VD that was performed in patients with the previously mentioned disease.

The elements of originality brought by the experimental studies were represented by the regimen of VD therapy. Another contribution to the literature was the presentation of the data obtained after analyzing the anti-inflammatory and antioxidant effect in three types of samples: serum, BALF and LTH.

In conclusion, our data suggest the utility of sequential determinations of serum 25-OH-VD for assessing the nutritional status of VD in symptomatic asthmatics. In an experimental context, supplementation with VD had a protective effect on the phenomenon of oxidative stress associated with asthmatic inflammation. Thus, a possible approach to the role of VD in asthma could target the mechanisms by which VD exerts its antioxidant effects.