

## 8. Streszczenie

### Ocena surowiczych stężeń wątrobowego metabolitu witaminy D, cynku i żelaza u w chorobach alergicznych i nawracających zakażeniach układu oddechowego u dzieci

W ciągu ostatnich lat obserwuje się stały wzrost zapadalności na choroby alergiczne u dzieci i dorosłych, zarówno w krajach rozwiniętych jak i rozwijających się. Wiele badań wykazało związek pomiędzy witaminą D i chorobami alergicznymi. Udokumentowano, że wysokie surowicze stężenie witaminy D zmniejsza ryzyko zaostrzeń astmy. Wyniki dotychczas przeprowadzonych badań sugerują, że rola witaminy D w przebiegu atopowego zapalenia skóry (azs) jest znacząca, choć nie do końca wyjaśniona. Uważa się, że niedobór witaminy D jest predykatorem wystąpienia chorób alergicznych w późniejszych latach życia. Udowodniono, że dieta bogata w cynk łagodzi objawy alergii, a obniżone stężenie we krwi tego pierwiastka zwiększa ryzyko rozwoju astmy. Wykazano, że niedobór cynku zaburza równowagę funkcjonalną pomiędzy limfocytami Th1 i Th2.

Żelazo również wpływa na przebieg i rozwój chorób alergicznych. Zaobserwowano, że obniżone stężenie żelaza u matek, istotnie zwiększa ryzyko chorób atopowych u dziecka nawet do 10. roku życia.

Nawracające infekcje górnych i dolnych dróg oddechowych należą do najczęściej występujących schorzeń u dzieci. W ostatnich latach rośnie zainteresowanie witaminą D szczególnie u dzieci i młodzieży ze względu na doniesienia epidemiologiczne sugerujące, że może ona odgrywać rolę we wrodzonej odporności. Badania wykazały, że witamina D może odgrywać znaczącą rolę immunomodulującą w poprawie częstości występowania i nasilenia infekcji bakteryjnych i wirusowych.

Niedobór cynku hamuje zarówno mechanizmy odporności wrodzonej jak i nabytej, zaburzając proces fagocytozy i zabijanie wewnątrzkomórkowe oraz produkcję cytokin przez makrofagi.

Żelazo warunkuje prawidłowe funkcjonowanie układu odpornościowego. Niedobór żelaza prowadzi do osłabienia funkcji obronnych ustroju, zarówno wrodzonej jak i nabytej odporności komórkowej i humoralnej.

Chociaż opublikowano badania oceniające rolę witaminy D, cynku i żelaza w chorobach alergicznych i u często chorujących dzieci to ich wyniki są niejednoznaczne.

Celem pracy była ocena surowiczego stężenia metabolitu witaminy D - 25(OH)D, cynku oraz żelaza u dzieci z regionu łódzkiego z chorobami alergicznymi i nawracającymi zakażeniami układu oddechowego. W szczególności został oceniony związek pomiędzy surowiczymi stężeniami badanych parametrów a wiekiem i płcią pacjentów, porą roku w której wykonano badanie oraz całkowitym stężeniem IgE i IgE swoistych wobec alergenów środowiskowych. Dodatkowo oceniono związek pomiędzy surowiczym stężeniem 25(OH)D, cynku i żelaza a ryzykiem nawrotowych w badanej grupie dzieci.

Badaniem objęto 200 pacjentów (111 chłopców, 89 dziewczynek) w wieku od 1. do 18. roku życia (średni wiek 5,75 lat), u których lekarz rozpoznał chorobę atopową lub nawracające infekcje układu oddechowego; 100 dzieci zakwalifikowano do grupy z chorobą atopową, a 100 dzieci do grupy z nawracającymi infekcjami układu oddechowego. Przez pojęcie choroby atopowej określano objawy kliniczne choroby wywołanej reakcjami nadwrażliwości typu I. Nawracające infekcje układu oddechowego definiowano jako trzykrotny epizod infekcji dróg oddechowych w ciągu 6 miesięcy lub co najmniej 6 epizodów w ciągu roku. Dzieci były diagnozowane i leczone w Poradni Alergologicznej, Poradni Niedoborów Immunologicznych oraz w Oddziale Klinicznym Interny Dziecięcej i Alergologii w Ośrodku Pediatrycznym im. J. Korczaka w okresie od 01.12.2017 r. do 31.08.2019 r.

Oznaczenia stężenia 25- hydroksy-witaminy D prowadzono na aparacie IDS-iSYS 25-Hydroxy Vitamin D<sup>S</sup>. Zestaw do oznaczeń 25(OH)D opierał się na technice chemiluminescencji. Uzyskane wyniki oceniono zgodnie z przyjętą optymalną normą dla stężenia witaminy D w surowicy krwi u dzieci wynoszącą 30-50 ng/ml. Stężenie cynku oznaczano metodą spektrometrii płomieniowej na aparacie PinAAcle 900 T firmy PerkinElmer. Do interpretacji wyników przyjęto wartości referencyjne 70-120 µg/dl. Stężenie żelaza było mierzone na paracie Integra 400 firmy Roche metodą fotometryczną. Za wartość referencyjną stężenia żelaza przyjęto 33-193 µg/dl. Całkowite stężenie IgE oznaczono metodą elektrochemiluminescencji ECLIA na aparacie Cobas 6000 firmy Roche. Stężenie IgE swoistych dla alergenów środowiskowych oznaczano metodą dwuetapowej chemiluminescencji CLIA na aparacie Immulite 2000. W analizie statystycznej zastosowano regresję logistyczną

*Ocena surowiczych stężeń wątrobowego metabolitu witaminy D, cynku i żelaza w chorobach alergicznych i nawracających zakażeniach układu oddechowego u dzieci*

z elastycznymi błędami standardowymi oraz wieloczynnikową analizę wariancji (ANOVA) bez powtórzeń. Za znamienne statystycznie wyniki testów uznawano poziom istotności mniejszy niż 5 punktów procentowych ( $p < 0,05$ ). W następnym etapie analizy wykorzystano nienadzorowaną analizę skupień oraz analizę regresji logistycznej w modelu wielowymiarowym do zdefiniowania zmiennych niezależnie związanych z nawracającymi infekcjami.

Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że u 54 % dzieci z regionu łódzkiego stwierdzono niskie surowicze stężenie 25(OH)D ( $< 30$  ng/ml). Nie wykazano istotnych różnic w stężeniu tego parametru pomiędzy grupą dzieci z nawracającymi infekcjami układu oddechowego, a grupą dzieci, u których stwierdzono chorobę atopową. U 26% badanych dzieci stwierdzono niskie stężenie cynku w surowicy krwi ( $< 70$   $\mu$ g/dl); niedobór ten był nieco większy u dzieci często chorujących w porównaniu z dziećmi atopowymi. Niskie stężenie żelaza ( $< 33$   $\mu$ g/dl) zaobserwowano u 6,5% pacjentów; niedobór ten był nieco większy u dzieci często chorujących w porównaniu z dziećmi, u których stwierdzono chorobę atopową.

Ponadto u dzieci młodszych (do 6. roku życia) surowicze stężenie kalcydiolu było istotnie wyższe niż w pozostałych grupach wiekowych, niezależnie od płci. Nie zaobserwowano istotnej zależności pomiędzy surowiczym stężeniem cynku a wiekiem i płcią dzieci. U dzieci w wieku 13-18 lat surowicze stężenie żelaza było istotnie wyższe niż u dzieci młodszych, niezależnie od płci.

Stężenie witaminy D i cynku w surowicy krwi zależało od pory roku, w której przeprowadzono badanie. Najniższe stężenie 25(OH)D obserwowano w I i II kwartale roku, niższe stężenie cynku odnotowano w I i III kwartale roku. Nie wykazano zależności między stężeniem żelaza a porą roku, w której dokonywano oznaczeń.

Zaobserwowano odwrotną korelację pomiędzy surowiczym stężeniem witaminy D a całkowitym stężeniem IgE; u dzieci z wyższym całkowitym stężeniem IgE stężenie 25(OH)D było istotnie niższe. Nie zaobserwowano zależności pomiędzy stężeniem cynku i żelaza a stężeniem przeciwciał IgE.

Nie wykazano zależności pomiędzy surowiczym stężeniem witaminy D, cynku i żelaza a rodzajem uczulającego alergenu u dzieci atopowych.

Największe skumulowane ryzyko nawrotowych infekcji zaobserwowano w 2 i 4 kwartale roku, u dzieci najmłodszych (do 6 roku życia), z niskim stężeniem 25(OH)D, niskim stężeniem cynku oraz niskim stężeniem żelaza. Dane te uzasadniają próbę

suplementacji badanych mikroelementów, szczególnie u dzieci, u których zdefiniowane czynniki ryzyka nawrotowych infekcji są skumulowane.

Dzieci z niskim surowiczym stężeniem witaminy D i wysokimi stężeniami cynku i żelaza mają istotnie niższe ryzyko infekcji w porównaniu z dziećmi z niedoborami wszystkich badanych parametrów. Wysokie stężenia 25(OH)D przy niskich stężeniach pozostałych parametrów nie zmieniły istotnie ryzyka nawrotowych infekcji, co sugeruje, że suplementacja cynku i żelaza może przynieść korzyści w zmniejszeniu ryzyka częstych infekcji u dzieci.

Obserwowane różnice w ryzyku nawrotowych infekcji pomiędzy skupieniami zdefiniowanymi w oparciu o surowicze stężenia 25(OH)D, cynku i żelaza uzasadniają monitorowanie oraz ewentualną suplementację wszystkich trzech badanych mikroelementów u dzieci z nawrotowymi infekcjami dróg oddechowych.

Ograniczeniem pracy jest brak grupy kontrolnej dzieci zdrowych - czyli dzieci, u których nie rozpoznano częstych infekcji układu oddechowego i choroby alergicznej, co związane jest z możliwościami terapeutycznymi jednego ośrodka klinicznego.

## 9. Abstract

### **Assessment of Serum Vitamin D Hepatic Metabolite, Zinc and Iron Concentrations in Allergic Diseases and Recurrent Respiratory Infections in Children**

In recent years, there has been a steady increase in the incidence of allergic diseases in children and adults in both developed and developing countries. Many studies have shown a link between vitamin D and allergic diseases. High serum concentrations of vitamin D have been documented to reduce the risk of asthma exacerbations. The results of the studies carried out to date suggest that the role of vitamin D in the course of atopic dermatitis (AD) is significant, although not fully explained. Vitamin D deficiency is believed to be a predictor of the onset of allergic diseases later in life.

It has been proved that a zinc-rich diet relieves symptoms of allergy, whereas a reduced concentration of the element in the blood increases the risk of asthma development. Zinc deficiency has been indicated to disturb the functional balance between Th1 and Th2 lymphocytes.

Iron also affects the course and development of allergic diseases. It has been observed that reduced iron concentrations in mothers significantly increase the risk of atopic diseases in children up to the age of 10.

Recurrent upper and lower respiratory tract infections are among the most common diseases in children. In recent years, there has been a growing interest in vitamin D, particularly in children and adolescents, due to epidemiological reports suggesting that it may play a role in innate immunity. Research has shown that vitamin D may play a significant immunomodulatory role in improving the incidence and severity of bacterial and viral infections.

Zinc deficiency inhibits the mechanisms of both innate and acquired immunity, interfering with the phagocytosis process and intracellular killing, as well as the production of cytokines by macrophages.

Iron determines the proper functioning of the immune system. Iron deficiency leads to the weakening of the body's defence functions, both innate and acquired cellular and humoral immunity.

Although studies have been published assessing the role of vitamin D, zinc and iron in allergic diseases and in frequently ill children, their results are inconclusive.

The aim of the study was to assess serum concentrations of vitamin D metabolite – 25(OH)D, zinc and iron in children with allergic diseases and recurrent respiratory infections in the Łódź region. In particular, the relationship between serum concentrations of the tested parameters and the age and gender of patients, the season of the year in which the test was performed, and total concentrations of IgE and IgE specific to environmental allergens was assessed. Additionally, the relationship between serum concentrations of 25(OH)D, zinc and iron and the risk of recurrences in the studied group of children was evaluated.

The study enrolled 200 patients (111 boys, 89 girls) aged 1 to 18 years (mean age 5.75 years) diagnosed with atopic disease or recurrent respiratory infections by their physician; 100 children were classified in the group with atopic disease and 100 – in the group with recurrent infections of the respiratory system. The term atopic disease was used to describe clinical manifestations of the disease caused by type I hypersensitivity reactions. Recurrent respiratory infections were defined as three episodes of respiratory infection within 6 months or at least 6 episodes per year. The children were diagnosed and treated at the Allergology Outpatient Clinic, the Immunological Deficiency Clinic and the Paediatric Internal Medicine and Allergology Clinical Department at the J. Korczak Memorial Paediatric Centre in the period from 1 December 2017 to 31 August 2019.

The 25-hydroxy-vitamin D concentration was determined on the IDS-iSYS 25-Hydroxy Vitamin DS apparatus. The 25(OH)D assay kit was based on the chemiluminescence technique. The obtained results were assessed in accordance with the adopted optimal standard for blood serum vitamin D concentration in children at 30-50 ng/ml. The zinc concentration was determined by flame spectrometry using the PerkinElmer PinAAcle 900 T apparatus. The reference values of 70-120 µg/dl were used for the interpretation of results. The iron concentration was measured on the Roche Integra 400 apparatus by a photometric method. The assumed reference value of iron concentration was 33-193 µg/dl. Total IgE concentration was determined by ECLIA electrochemiluminescence on the Roche Cobas 6000 apparatus. The concentration of IgE specific to environmental allergens was determined by the two-stage CLIA chemiluminescence method on the Immulite 2000 apparatus. The statistical analysis applied logistic regression with flexible standard errors and multivariate analysis of

variance (ANOVA) without replications. The significance level below 5 percentage points was considered statistically significant ( $p < 0.05$ ). The subsequent stage of the analysis used unsupervised cluster analysis and logistic regression analysis in a multivariate model to define variables independently associated with recurrent infections.

Based on the conducted research, it was shown that 54% of children in the Łódź region had a low serum 25(OH)D concentration ( $< 30$  ng/ml). There were no significant differences in the concentrations of the parameter between the group of children with recurrent respiratory infections and the group of children with atopic disease. In 26% of the examined children, a low blood serum zinc concentration was found ( $< 70$   $\mu$ g/dl); the deficiency was slightly greater in children who were frequently ill compared to atopic children. Low iron concentrations ( $< 33$   $\mu$ g/dl) were observed in 6.5% of the patients; the deficiency was slightly greater in children who were frequently ill compared to children with atopic disease.

Moreover, in younger children (up to 6 years of age) the serum calcidiol concentration was significantly higher than in the other age groups, regardless of gender. There was no significant correlation between the serum zinc concentration and the age and gender of the children. In children aged 13-18 years, the serum iron concentration was significantly higher than in younger children, regardless of gender.

Blood serum vitamin D and zinc concentrations depended on the season of the year when they were tested. The lowest concentration of 25(OH)D was observed in the first and second quarter of the year; the lower concentration of zinc was recorded in the first and third quarter of the year. There was no correlation between iron concentration and the season of the year in which the concentration was determined.

An inverse correlation was observed between the serum vitamin D concentration and the total concentration of IgE; in children with a higher total IgE concentration, the 25(OH)D concentration was significantly lower. There were no correlations between serum zinc and iron concentration and the IgE antibody concentration.

There was no correlation between the serum vitamin D, zinc and iron concentrations and the type of allergen in atopic children.

The highest cumulative risk of recurrent infections was observed in the second and fourth quarter of the year, in the youngest children (up to 6 years of age), with the low 25(OH)D concentration, low zinc concentration and low iron concentration.

The data justify an attempt to supplement the studied microelements, especially in children with cumulative defined risk factors of recurrent infections.

Children with the low serum vitamin D concentration and high zinc and iron concentrations have a significantly lower risk of infection compared to children with deficiencies of all the tested parameters. High 25(OH)D concentrations with low concentrations of other parameters did not significantly change the risk of recurrent infections, suggesting that zinc and iron supplementation may be beneficial in reducing the risk of frequent infections in children.

The observed differences in the risk of recurrent infections between clusters defined on the basis of serum 25(OH)D, zinc and iron concentrations justify monitoring and possible supplementation of all the three tested microelements in children with recurrent respiratory infections.

The work is limited by the lack of a control group of healthy children, i.e. children who have not been diagnosed with frequent respiratory infections and allergic diseases, which is related to the therapeutic possibilities of one clinical centre.